



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**TP73 COMO DIANA TERAPÉUTICA: REGULACIÓN
DIFERENCIAL DE SUS ISOFORMAS POR β -CRIPTOXANTINA Y
APLICACIÓN CLÍNICA EN CÁNCER DE COLON**

TESIS DOCTORAL

CORAL SAN MILLÁN BLANCO

MADRID, 2015

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**



**TP73 COMO DIANA TERAPÉUTICA: REGULACIÓN
DIFERENCIAL DE SUS ISOFORMAS POR β -CRIPTOXANTINA Y
APLICACIÓN CLÍNICA EN CÁNCER DE COLON**

TESIS DOCTORAL presentada por
CORAL SAN MILLÁN BLANCO
Licenciada en Biotecnología,
Para optar al grado de Doctor.

DIRECTORES:

DRA. GEMMA DOMÍNGUEZ MUÑOZ

DR. FÉLIX BONILLA VELASCO

Universidad Autónoma de Madrid

Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM

La Dra. Gemma Domínguez Muñoz, Profesora del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid e investigadora principal en el Departamento de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM y el Dr. Félix Bonilla Velasco, investigador principal del Grupo de Investigación en Mecanismos Moleculares Tumorales del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “TP73 como diana terapéutica: regulación diferencial de sus isoformas por β -criptoxantina y aplicación clínica en cáncer de colon”, que presenta CORAL SAN MILLÁN BLANCO para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y 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 20 de Febrero de 2015.

Dra. Gemma Domínguez Muñoz
Directora de Tesis

Dr. Félix Bonilla Velasco
Director de Tesis

Esta tesis doctoral, realizada en el Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM, ha sido financiada por ISCIII-RTICC-RD06/0020/0020, la Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, la Fundación Banco Santander, el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria (PI11/00593), S-GEN-266-2006, Fundación científica AECC, Comunidad de Madrid S2010/BMD-2344 y SAF2010-20750.

A mis padres y a mi hermana

Agradecimientos

Gracias a todas las personas e instituciones que habéis hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Gracias a mis directores, a la Dra. Gemma Domínguez Muñoz y al Dr. Félix Bonilla Velasco. Gracias a los dos por darme la oportunidad de trabajar y aprender a vuestro lado. Gracias Gemma por tu confianza, por tu cercanía, por tu lucha y por tu valentía. Gracias Félix por tu confianza, por tu apoyo, por tu cercanía, por ser tan bueno y por tu ejemplo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por todos los buenos momentos (científicos o no), por haber creado un ambiente de trabajo tan agradable y por haberme hecho sentir una más del laboratorio de "los Bonilla". Gracias Bea, por ser mi *partner* y mi amiga, por enseñarme, por ayudarme y por animarme. Gracias Martix, por ser tan buena y genuina, por tu complicidad, por estar siempre ahí, por ser una gran amiga. Gracias Alberto, por contagiarme tu tranquilidad y por ser un compañero inmejorable. Gracias Bea G, por ayudarme tanto y por tu sentido del humor. Gracias Javito por ser tan genial y porque tus "javitadas" han hecho que mis "coraladas" no pareciesen tan graves. Gracias Vane, por tu risa contagiosa y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Gracias Merce por tu alegría y por hacernos reír tanto. Gracias Cris, por tus saludos llenos de energía y por todos los buenos ratos. Gracias Alejandro, por ayudarme en esta última etapa con el experimento *in vivo*.

Gracias a Carmen Marín y a Margot Marqués por la cesión de las construcciones de Δ NP73. Gracias a Fernando Granados por haber hecho posible el estudio de intervención en humanos. Gracias a Belén Pérez por su ayuda en los análisis por UPLC. Gracias a Paloma Martín por su colaboración con las inmunohistoquímicas. Gracias a Jesús Romero, por su disponibilidad y ayuda en un paso crítico del ensayo Cometa. Gracias a Encarna, por su ayuda con los análisis bioquímicos.

Gracias a mis vecinos de laboratorio, "los Vallina", por estar siempre dispuestos a ayudarme. Irenita, gracias por tu sonrisa permanente, por transmitir tan buena onda y por formar un *pack* genial con nuestra Marta. Gracias Compte, por tener siempre tiempo o inventarlo para ayudarme con las citometrías y por cuidarme tanto. Gracias Anita, por tu saludo cargado de cariño todos los días. Gracias Rodrigo, por enseñarme todo lo que sé de experimentación animal. Gracias Ana, Natalia y Rocío por estar siempre dispuestas a echarme un cable. Gracias a mis otras vecinas, gracias Julia, por tu vitalidad y por tu amistad y gracias Laura, Coral y Lucía.

Gracias también a los vecinos de la última etapa de mi tesis en el iib, en especial a Elvira y al laboratorio de Alberto Muñoz, por hacer que los primeros meses en el iib fueran más fáciles.

Gracias a tod@s mis amig@s por su apoyo. En especial, gracias a mis amigas de siempre, a mis *"always connected"*, Estela, Sheila y Laura, y a Vero por ser mis AMIGAS con mayúsculas, por quererme como soy, por estar siempre ahí, por innumerables momentos buenos juntas, riéndoos conmigo (o de mis coraladas) y los que nos quedan. Gracias Pauli, por tus consejos y por haber conseguido una amistad inquebrantable a pesar de los kilómetros de distancia. Gracias Clara, por todos los ratos compartidos y por poder seguir hablando durante horas sin darnos cuenta. Gracias Elvira, por ser mi amiga dentro y fuera del iib, antes, durante y después de Madrid. Gracias Lore, por tus ánimos y tus visitas a la ciudad madrileña. Gracias Jordi, Víctor y Herny, por conseguir que la amistad que nació en un congreso, se mantenga en el tiempo y la distancia. Gracias María, por tu apoyo, por transmitirme tu optimismo y llegar a casa siempre con una sonrisa. Gracias Lucía, Raquel, Alba, Paula, Barbie, Rober,... Nombraros a tod@s sería muy extenso pero a tod@s os digo gracias.

Gracias a mis tí@s y a mis prim@s, por vuestra confianza y por estar siempre ahí. En especial a los más pequeños, Eneko, Markel, Nira, June y Cloe, gracias a todos por contagiarme vuestra alegría y por darme tanta energía.

Gracias Alberto, por haberte cruzado en mi camino, por ser como eres y quererme como me quieres.

Y por encima de todo, gracias a mis padres y a mi hermana por quererme y apoyarme incondicionalmente. Gracias Mamá, por ser tan buena, por tu paciencia y comprensión, por escucharme, por apoyarme y aconsejarme, por compartir los buenos momentos y animarme sin descanso en los malos. Gracias Papá, por tu paciencia, por tu saber estar, por tu ejemplo, por tus consejos, por ser capaz de tranquilizarme con sólo unas palabras. Gracias Silvia, por ser tan fuerte, tan valiente y por tener esa sensibilidad tan especial. Os quiero.

Resumen

A pesar de los avances de los últimos años en terapia antitumoral, la aparición de resistencias y la toxicidad asociada a los tratamientos empleados, continúan siendo los principales retos a los que se enfrenta la investigación actual en este campo. Por ello, es fundamental la identificación de dianas terapéuticas sobre las que actuar para combatir estas limitaciones y desarrollar así estrategias de tratamiento más efectivas para los pacientes. En este contexto, cada vez más estudios proponen a *TP73* como una prometedora diana terapéutica, ya que su desregulación juega un papel clave en el proceso tumorigénico. Su expresión alterada durante la progresión del cáncer conlleva a la disminución de los niveles de las variantes supresoras tumorales, *TAP73*, y a la sobreexpresión de las oncogénicas, Δ *TAP73*. Así, resulta de interés desarrollar estrategias terapéuticas que restauren o potencien la actividad de las isoformas supresoras tumorales y/o inhiban la actividad de las variantes oncogénicas. En las últimas décadas, la identificación de nuevos agentes antitumorales ha dependido en gran medida de la búsqueda de moléculas farmacológicamente activas presentes en la naturaleza, que frecuentemente presentan menor toxicidad que las drogas sintéticas. Uno de los compuestos naturales con probado papel protector en cáncer es el carotenoide β -criptoxantina. Además, se ha descrito su potencial terapéutico en distintos tipos tumorales. Aunque el mecanismo por el que β -criptoxantina podría ejercer estos efectos se desconoce, algunos estudios realizados sugieren que podría regular la expresión de genes asociados con la progresión tumoral, entre ellos, *TP73*.

En este trabajo abordamos el estudio de la regulación de *TP73* por β -criptoxantina, su potencial antitumoral en cáncer de colon y los mecanismos moleculares a través de los que ejerce su efecto.

Los resultados muestran que β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las variantes de *TP73* a favor de las variantes supresoras tumorales y en detrimento de las variantes oncogénicas *in vitro*, *in vivo* y en humanos. Además, demostramos que este carotenoide tiene efecto antiproliferativo y sensibiliza a la terapia con oxaliplatino a las células de cáncer de colon tanto en aproximaciones *in vitro* como en modelos animales, a través de la regulación negativa de la variante oncogénica Δ *NP73*. La concentración de oxaliplatino necesaria para inducir el mismo porcentaje de muerte celular, disminuye en presencia de β -criptoxantina. Esto se traduce en una reducción de la dosis acumulada efectiva de oxaliplatino y por tanto, de sus efectos secundarios. Con estos resultados, este estudio sienta las bases para el uso de una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer de colon, que se basa en la combinación de β -criptoxantina con un agente quimioterapéutico convencional, oxaliplatino. Este trabajo soportaría el desarrollo de estudios preclínicos *in vivo* con finalidad terapéutica.

Summary

Despite the progresses in recent years in the cancer therapy field, the acquired resistance and the toxicity associated to treatments remain as the main challenges still today. Thus, the identification of new therapeutic targets in our way to solve these failures and improve patients' outcomes is urgently needed. In this context, *TP73* is emerging as a pharmacological target for cancer therapy due to its implication in the carcinogenic process. *TP73* alteration during cancer progression associates with the inhibition of the *TAP73* tumor suppressor function and promotion of the oncogenic activities of Δ *TAP73* variants. Therefore, it is attractive the development of new therapies which restore or enhance the activity of tumor suppressor isoforms and/or inhibit the oncogenic variants. Identification of new agents that are pharmacologically active against human cancer has depended largely on the screening of bioavailable natural products, which frequently seem to be less toxic than synthetic drugs. Currently, cumulative data sustain the protective role of the natural carotenoid β -cryptoxanthin in cancer. In addition, some reports support its putative use as an antitumoral compound in several types of cancer. Although the mechanisms underlying these effects are unknown, some studies have suggested that β -cryptoxanthin regulates some genes involved in the tumorigenic process, among them, *P73*.

Here we focus on the regulation of *P73* by β -cryptoxanthin, its therapeutic potential in colon cancer and on the molecular basis underlying its effect.

Our results show that β -cryptoxanthin differentially regulates the expression of the *P73* variants *in vitro*, *in vivo* and in humans. Specifically, β -cryptoxanthin up-regulates tumor suppressor variants and down-regulates oncogenic isoforms. We also demonstrate that this carotenoid decreases cell proliferation and cooperates with oxaliplatin to induce apoptosis in colon cancer *in vitro* and in animal models, through the negative regulation of Δ *NP73*. The antitumoral concentrations of oxaliplatin decrease in the presence of β -cryptoxanthin to achieve same percentage of growth inhibition. Thus, the concentration-limiting toxicity of oxaliplatin and therefore its side-effects are reduced in the presence of the carotenoid. We propose a putative novel therapeutic strategy for the treatment of colon cancer based on the combination of β -cryptoxanthin with a conventional chemotherapeutic agent, oxaliplatin. This work could be the precursor for future clinical trials.

Índice

CLAVE DE ABREVIATURAS	33
1. INTRODUCCIÓN	39
1.1. Cáncer.....	41
1.2. Cáncer colorrectal	42
1.2.1. Terapia del cáncer colorrectal.....	44
1.2.2. Limitaciones de las terapias actuales: toxicidad y desarrollo de resistencias.....	46
1.2.2.1. Toxicidad	46
1.2.2.2. Resistencia a la terapia.....	47
1.2.3. Alternativas a las terapias actuales. Identificación de nuevas dianas terapéuticas	48
1.3. Familia de P53: posible diana terapéutica en cáncer	48
1.4. TP73: miembro de la familia de TP53	49
1.4.1. Funciones supresoras tumorales de TAP73	52
1.4.1.1. Participación en parada del ciclo celular.....	52
1.4.1.2. Inducción de apoptosis	52
1.4.1.3. Mantenimiento de la estabilidad genómica	53
1.4.1.4. Sensibilidad a la terapia	53
1.4.1.5. Otros: papel en diferenciación, mantenimiento de la polaridad celular y en metabolismo.....	53
1.4.2. Funciones oncogénicas de Δ TAP73	54
1.4.2.1. Inducción de proliferación	54
1.4.2.2. Participación en procesos de quimiorresistencia	54
1.4.2.3. Activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), invasión y adquisición de capacidades “stem”	55
1.4.3. Regulación del ratio TAP73/ Δ TAP73: clave en la función de TP73 en el contexto tumoral.....	56
1.4.4. TP73 como diana terapéutica	57
1.5. Compuestos naturales: potencial terapéutico en cáncer	58
1.5.1. Potencial terapéutico del carotenoide β -criptoxantina en cáncer	59
1.6. Consideraciones finales. Hipótesis	60
2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65

3.1. Cultivos celulares	67
3.2. Preparación de la solución de β-criptoxantina y tratamiento de las líneas celulares	67
3.3. Extracción de β-criptoxantina y análisis por UPLC	67
3.4. Estudio de intervención	68
3.4.1. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica	69
3.4.2. Extracción de β -criptoxantina del suero de los sujetos y análisis por UPLC	69
3.5. Extracción de ARN total de tejidos, líneas celulares y linfocitos	69
3.6. Análisis de expresión génica	70
3.6.1. Retrotranscripción (RT)	70
3.6.2. PCR cuantitativa (qPCR).....	70
3.6.3. PCR arrays.....	71
3.7. Vectores de expresión	72
3.7.1. Trasfección transitoria.....	72
3.7.2. Trasfección estable.....	72
3.8. Extracción de proteína total	72
3.9. Inmunotransferencia (Western Blot)	73
3.10. Ensayos de proliferación	74
3.10.1. Método del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Plumb et al., 1989).	74
3.10.2. Contaje celular	74
3.10.3. Estimación de la tasa de proliferación	74
3.10.4. Incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU)	74
3.11. Ensayos de apoptosis	75
3.12. Ensayos de viabilidad	75
3.13. Cálculo del índice de combinación	75
3.14. Animales de experimentación y xenotrasplantes tumorales	76
3.14.1. Puesta a punto de la pauta de tratamiento	76
3.14.2. Evaluación del crecimiento tumoral en respuesta a β -criptoxantina y al tratamiento combinado <i>in vivo</i>	77
3.14.3. Inmunohistoquímica	78
3.14.4. Estudio de toxicidad	78

3.15. Ensayo Cometa (Electroforesis alcalina de células individuales)	78
3.16. Análisis estadístico	79
4. RESULTADOS	81
4.1. β -criptoxantina se incorpora en las células de cáncer de colon después del tratamiento	83
4.2. β -criptoxantina regula la expresión de genes de la familia de <i>TP53</i>	83
4.3. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de <i>TP73</i> en células de cáncer de colon	84
4.4. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de <i>TP73</i> después de un estudio de intervención en sujetos sanos	85
4.5. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon	87
4.6. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$	90
4.7. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon.....	91
4.7.1. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon a tiempos cortos de pretratamiento con el carotenoide.....	91
4.7.2. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon a tiempos largos de pretratamiento con el carotenoide	92
4.7.3. El tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino reduce la viabilidad celular en un porcentaje similar a dosis dobles de oxaliplatino	94
4.7.4. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de manera sinérgica	95
4.8. β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$	96
4.9. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de forma <i>TP53</i> independiente	98
4.10. β -criptoxantina no incrementa la formación de aductos en el tratamiento combinado con oxaliplatino	100
4.11. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo y potencia a oxaliplatino <i>in vivo</i>	101
4.11.1. Puesta a punto de la pauta de tratamiento. Estudio piloto.....	101
4.11.2. β -criptoxantina reduce el crecimiento tumoral y potencia el efecto de oxaliplatino en xenotransplantes de cáncer de colon en modelos animales	103

4.11.3. Evaluación de la toxicidad del tratamiento <i>in vivo</i>	107
5. DISCUSIÓN	111
5.1. Desarrollo de estrategias terapéuticas antitumorales. TP73 como diana terapéutica.....	113
5.2. Papel preventivo de β -criptoxantina en cáncer.....	115
5.3. Papel terapéutico de β -criptoxantina en cáncer.....	116
5.3.1. Efecto antiproliferativo	116
5.3.2. Sensibilización a la terapia	117
5.4. Consideraciones finales	120
6. CONCLUSIONES	121
7. BIBLIOGRAFÍA.....	125
8. CLAVE DE ABREVIATURAS	155

Índice de Figuras

Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral	41
Figura 2. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas..	42
Figura 3. Organización estructural y homología entre los miembros de la familia de <i>TP53</i>	50
Figura 4. Isoformas de <i>TP73</i>	51
Figura 5. Funciones supresoras tumorales y oncogénicas diferencialmente reguladas por las isoformas <i>TAP73</i> y Δ <i>TAP73</i>	55
Figura 6. Imagen de una célula individual obtenida después del ensayo Cometa.	78
Figura 7. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de <i>TP73</i> en células de cáncer de colon.	86
Figura 8. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de <i>TP73</i> después de un estudio de intervención en sujetos sanos.....	87
Figura 9. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon a los 6 y 8 días de tratamiento.....	88
Figura 10. Evaluación del porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo (marcaje con Anexina V-FITC y yoduro de propidio) después de 6 y 8 días de tratamiento.....	89
Figura 11. Cuantificación de los niveles de ARNm de Δ <i>NP73</i> después de 3, 6 y 8 días de tratamiento y cuantificación de los niveles de ARNm de <i>TAP73</i> después de 3, 6 y 8 días de tratamiento..	89
Figura 12. β -criptoxantina reduce la proliferación celular de las células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de Δ <i>NP73</i>	90
Figura 13. Dosis respuesta de las líneas celulares de cáncer de colon HCT116, SW480-ADH y SW1417 al tratamiento con oxaliplatino.....	91
Figura 14. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon a tiempos cortos de pre-tratamiento con el carotenoide	93
Figura 15. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon después de 6 días de pre-tratamiento con β -criptoxantina.	94
Figura 16. El tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino reduce la viabilidad celular en un porcentaje similar a dosis dobles de oxaliplatino.	95

Figura 17. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de manera sinérgica.	96
Figura 18. β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$ (apoptosis).....	97
Figura 19. β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$ (viabilidad)	98
Figura 20. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de forma $TP53$ independiente	99
Figura 21. Inmunotransferencia de P53, ATM, ERCC1 y de β -actina (control de carga) después de los tratamientos con vehículo, β -criptoxantina 10 μM , oxaliplatino 100 μM y el tratamiento combinado de β -criptoxantina 10 μM y oxaliplatino 100 μM	101
Figura 22. Puesta a punto del régimen de tratamiento <i>in vivo</i> . Representación del porcentaje de crecimiento tumoral empleando varias pautas de tratamiento.....	104
Figura 23. β -criptoxantina inhibe el crecimiento tumoral y potencia la actividad antitumoral del oxaliplatino <i>in vivo</i>	105
Figura 24. Cuantificación de los niveles de ARNm de $\Delta NP73$, $TAP73$, $\Delta EXON2/3P73$, $\Delta EXON2P73$ en los xenotrasplantes de los ratones al final del tratamiento.....	106
Figura 25. Cuantificación de los niveles de ARNm de $\Delta NP73$ y $TAP73$ en los riñones y en los hígados de los ratones al final del tratamiento..	107
Figura 26. Evaluación de la toxicidad de los tratatamientos <i>in vivo</i>	108
Figura 27. Imágenes representativas de las PBMCs de los ratones después del ensayo Cometa..	109

Indice de Tablas

Tabla I. Compuestos que regulan positivamente las variantes TAP73 y/o negativamente las variantes Δ TAP73.	58
Tabla II. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos funcionales desarrollados en el estudio.....	67
Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la cuantificación a tiempo real.	71
Tabla IV. Anticuerpos usados para la inmunodetección y cuantificación por inmunotransferencia de proteínas específicas.	73
Tabla V. Rango de CI, símbolo y descripción del efecto de acuerdo al programa Calcosyn (Biosoft), basado en el método Chou Talalay	76
Tabla VI. Genes con una desregulación más significativa en el PCR array de la vía de señalización de <i>TP53</i> en las células HCT116 después del tratamiento con β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 48 horas.....	83
Tabla VII. Genes con una desregulación más significativa en el PCR array de la vía de señalización de respuesta a daño en el ADN en las células HCT116 después del tratamiento con β -criptoxantina a 10 μ M durante 48 horas.....	84
Tabla VIII. Valores de intensidad de la cola del cometa (TI) y del momento de la cola del cometa (TM) en las células HCT116 obtenidos con el ensayo Cometa.....	100

Clave de abreviaturas

5-FU	5-fluouracilo
ABCB1	Del inglés <i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family B, Member 1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Del inglés <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAX	Del inglés <i>BCL2-Associated X</i>
BRAF	Del inglés <i>V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CCR	Cáncer Colorectal
CDK	Del inglés <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDKN1A, P21	Del inglés <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN1C	Del inglés <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
CI	Índice de Combinación, del inglés <i>Combination Index</i>
Cox4i1	Del inglés <i>Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1</i>
DBD	Dominio de unión al ADN
DMSO	Dimetil sulfóxido
E2F1	Del inglés <i>E2F Transcription Factor 1</i>
E-Cadherina	Del inglés <i>Epithelial Cadherin 1, Type 1</i>
EGFR	Del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPLIN	Del inglés <i>Epithelial Protein Lost in Neoplasm</i>
FAP	Poliposis adenomatosa familiar (del inglés <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>)
FCC	Cáncer colorrectal familiar (del inglés <i>Familial Colorectal Cancer</i>)
FDA	Del inglés <i>Food Drug Administration</i>
FdUMP	5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato
FGFR1	Del inglés <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
FUTP	5-fluoridina-5'-trifosfato
G6PD	Del inglés <i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>
GADD45	Del inglés <i>Growth Arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
GLS2	Del inglés <i>Glutaminase 2</i>
GRAMD4	Del inglés <i>GRAM domain containing 4</i>
HMGB1	Del inglés <i>High Mobility Group Protein B1</i>

HNPCC	Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (del inglés <i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>)
hTERT	Del inglés <i>human telomerase reverse transcriptase</i>
IGF	Del inglés <i>Insulin Growth Factor</i>
IL4-R	Del inglés <i>Interleukin 4 Receptor</i>
INF α	Del inglés <i>Interferon alfa</i>
iPS	Del inglés <i>induced Pluripotent Stem cells</i>
ITCH	Del inglés <i>Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
KRAS	Del inglés <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LC50	Concentración de droga que induce el 50% de muerte celular
MLH1	Del inglés <i>mutL homolog 1</i>
MLH2	Del inglés <i>mutL homolog 2</i>
MMR	Del inglés <i>Mismatch repair</i>
MTT	Agente <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
NER	Del inglés <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NIST	Del inglés <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OD	Dominio de oligomerización (del inglés <i>Oligomerization Domain</i>)
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (del inglés <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFR	Del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PEDF	Del inglés <i>Pigment epithelium-derived factor</i>
PTEN	Del inglés <i>Phosphatase Y Tensin Homolog</i>
PUMA	Del inglés <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
RB	Retinoblastoma
SAM	Del inglés <i>Steril Alpha Motif</i>
SDHA	Subunidad A del complejo Succinato Deshidrogenasa, del inglés <i>Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A</i>
TA	Dominio de transactivación
TA ₂	Segundo dominio de transactivación
TBP	Proteína de Unión a TATA
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
TGF β	Del inglés <i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>

THF	Tetrahidrofurano
TI	Intensidad de la cola del cometa (del inglés <i>Tail intensity</i>)
TM	Momento de la cola del cometa (del inglés <i>Tail moment</i>)
TNF α	Del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNM	Tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis
TP53	Del inglés <i>Tumor Protein P53</i>
TP63	Del inglés <i>Tumor Protein P63</i>
TP73	Del inglés <i>Tumor Protein P73</i>
TTP	Timidina trifosfato
UBC	Ubiquitina C
UPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
VEGF	Del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
WHO	Del inglés <i>World Health Organization</i>
ZEB1	Del inglés <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

1. Introducción

1.1. CÁNCER

Cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Presenta una alta heterogeneidad y variabilidad de un paciente a otro y se caracteriza por el crecimiento excesivo y descontrolado de células anormales que adquieren la capacidad de migrar e invadir tejidos distantes. Una célula normal se transforma en célula tumoral por la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas. Las distintas alteraciones adquiridas confieren a la célula una ventaja “evolutiva” que le permitirá progresar de un fenotipo normal a uno tumoral, que se caracteriza por la adquisición de las siguientes capacidades: proliferación y replicación ilimitada, inestabilidad genómica, crecimiento independiente de las señales supresoras del crecimiento, resistencia a las señales apoptóticas, desarrollo de nuevos vasos a partir del lecho vascular preexistente (angiogénesis), diseminación a órganos distantes y adaptación al nuevo microambiente (metástasis), reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011) (**Figura 1**).



Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

Las alteraciones genéticas pueden producirse espontáneamente como resultado de las limitaciones existentes en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, heredarse de los progenitores y/o ser causadas por factores carcinogénicos endógenos (hormonales o productos del metabolismo celular) y/o exógenos (tabaco, alcohol, contaminantes de los alimentos, radiaciones, contaminación ambiental, exposiciones ocupacionales o infecciones causadas por determinados virus). El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, probablemente debido a la acumulación de

alteraciones en el ADN por la exposición continuada a distintos factores de riesgo y por la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular de perder eficacia con la edad (World Cancer Report, 2008).

Se ha observado un crecimiento en la incidencia de cáncer a nivel mundial de 12,8 millones de diagnósticos en 2008 a 15,5 millones en 2013 (WHO, World Health Organization). Este aumento se debe posiblemente al incremento de la esperanza de vida de la población (Muñoz, 2004). En nuestro país, el cáncer es la segunda causa de muerte de la población total (27,5% de todas las defunciones) y la primera causa en hombres, superando a las enfermedades cardiovasculares (<http://www.seom.org>). Aunque se prevé que los casos de cáncer aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas, se estima que la mortalidad relacionada con esta enfermedad se reducirá un 10% en hombres y un 7% en mujeres como consecuencia de los avances que se realicen en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (<http://www.cancer.gov>).

1.2. CÁNCER COLORRECTAL

Como otros tumores, el cáncer colorrectal (CCR) surge como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas heredadas y/o causadas por factores endógenos y/o exógenos que provocan la transformación de un epitelio normal en un adenocarcinoma invasivo (Markowitz y Bertagnolli, 2009). La exposición continuada a factores ambientales de riesgo, entre los que destaca la dieta (alto consumo de triglicéridos, carne roja y un bajo consumo de fibra, vitamina D o fosfatos) y algunos metabolitos procedentes de la flora intestinal o de las heces (Sharpe et al., 2002a, 2002b; Winawer et al., 1990), pueden producir mutaciones en cada etapa de la carcinogénesis en uno o varios genes reguladores del metabolismo celular (MMR, APC, KRAS, PTEN, TP53 o la vía supresora tumoral de TGF- β , entre otros) que favorecerán la formación y progresión del tumor. La progresión de la carcinogénesis de colon está descrita en el modelo clásico de Fearon y Vogelstein (Vogelstein et al., 1988), en la que se destacan alteraciones en los genes APC, KRAS, TP53 y BRAF (Jasperson et al., 2010) (**Figura 2**).

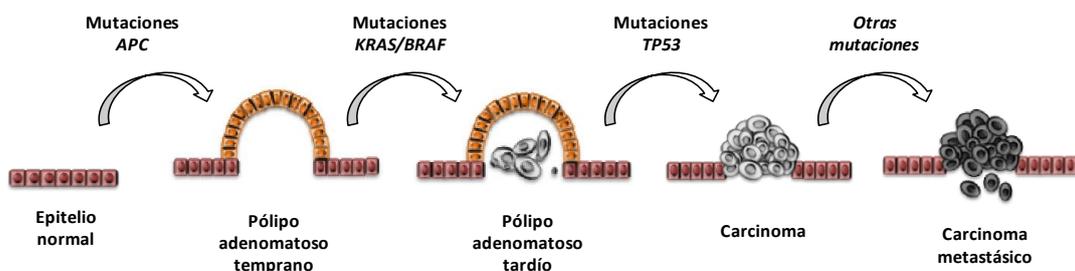


Figura 2. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas. Basado en el modelo de Fearon y Vogelstein (Vogelstein et al., 1988).

El 25% de los casos de CCR se atribuyen a la herencia de alteraciones en genes de predisposición a esta neoplasia (10%) o a factores de contribución genética (exposición de los miembros de la familia a un agente cancerígeno, 15%). En el conjunto de las lesiones asociadas a factores de riesgo hereditarios se diferencian dos formas caracterizadas molecularmente. La primera se denomina Poliposis Adenomatosa Familiar, FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), representa el 0.01% de los casos hereditarios y se caracteriza por alteraciones genéticas en el gen APC (Kinzler et al., 1991; Spirio et al., 1993). La segunda forma es conocida como Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico, HNPCC (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), representa entre el 5-10% de los tumores asociados a herencia y se caracteriza por mutaciones germinales en los genes que codifican para proteínas que participan en la reparación de bases mal apareadas (*mismatch repair* o MMR), siendo las mutaciones en MLH1 y MSH2 las más frecuentes. Un tercer grupo de cáncer de colon engloba a familias con una clara agregación de adenomas de colon, Cáncer Colorrectal Familiar, FCC (*Familial Colorectal Cancer*) (Fuchs et al., 1994) para los que todavía no se conocen mutaciones relevantes (Jasperson et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de los cánceres de colon diagnosticados (75%) son formas esporádicas causadas por mutaciones adquiridas espontáneamente a lo largo de la vida de los individuos y, aunque se desconocen los factores genéticos que se asocian con la enfermedad, en muchos casos se observan mutaciones similares a los síndromes hereditarios.

El CCR representa el 9,4% de los casos de cáncer a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar en hombres y el tercero en mujeres. En España es el tumor más frecuente (aproximadamente un 15% de los casos diagnosticados), por delante, en términos globales, del cáncer de pulmón y del cáncer de mama. La supervivencia de estos pacientes estimada a los 5 años se ha incrementado hasta el 50%, dependiendo fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Así, en los pacientes con CCR en estadio I, II, III y IV de acuerdo con la clasificación TNM (tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis), la supervivencia a 5 años es de 95-100%, 70-85%, 50-70% y 5-15%, respectivamente. En la última década, la tasa de mortalidad muestra un descenso significativo en mujeres y una estabilización en hombres, debido al avance en el conocimiento de los mecanismos que participan en el desarrollo y la progresión del CCR, a la identificación de factores genéticos implicados en la caracterización de la historia natural de esta neoplasia, al establecimiento de diversas estrategias preventivas, al desarrollo de técnicas diagnósticas (la prueba de sangre oculta en heces, la sigmoidoscopia flexible, la colonoscopia y la colonoscopia virtual) y a la introducción de nuevas estrategias terapéuticas.

Aún así, sigue existiendo un gran desconocimiento sobre la biología del tumor que podría predecir su comportamiento y por tanto, permitir una práctica clínica más efectiva.

Para el caso particular del CCR, y el del cáncer en general, es importante la identificación de marcadores moleculares con valor diagnóstico y/o pronóstico así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de estrategias de tratamiento más efectivas. Aunque actualmente son pocos los marcadores y dianas terapéuticas útiles, la aplicación de las técnicas *-ómicas* en biomedicina está permitiendo avanzar en el estudio y la descripción molecular de esta neoplasia, haciendo que el traslado del conocimiento genético y proteómico del cáncer de colon a la práctica clínica habitual esté cada vez más cerca.

1.2.1. Terapia del cáncer colorectal

Los pilares terapéuticos actuales de los pacientes con CCR siguen siendo la cirugía y/o la quimioterapia tradicional. En etapas avanzadas, se pueden aplicar terapias dirigidas.

La **quimioterapia tradicional** es el tratamiento de las enfermedades neoplásicas con drogas que destruyen las células tumorales deteniendo su capacidad de división activa. En el caso del CCR, las drogas citotóxicas utilizadas como agentes quimioterapéuticos incluyen:

1) Antimetabolitos análogos de bases pirimidínicas:

- 5-fluorouracilo (5-FU): *in vivo* se convierte en tres metabolitos activos: 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), 5-fluoridina-5'-trifosfato (FUTP) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP). El FdUMP actúa inhibiendo la timidilato sintetasa, lo que resulta en el agotamiento de la timidina trifosfato (TTP), uno de los cuatro nucleótidos trifosfato utilizados en la síntesis de ADN. Además, el metabolito FUTP se incorpora en el ARN y el FdUTP en el ADN, impidiendo su correcto procesamiento. El 5-FU actúa por tanto inhibiendo la fase S del ciclo celular (Longley et al., 2003; Noordhuis et al., 2004).
- Capecitabina (Xeloda®): profármaco oral que se convierte en su metabolito activo, 5-FU, por la timidina fosforilasa, enzima que se encuentra sobreexpresada en varios tipos tumorales (Walko y Lindley, 2005). El mecanismo de acción del 5-FU es el que se ha detallado en el párrafo anterior.

2) Agentes sinérgicos con antineoplásicos:

- Leucovorina (Fusilev®): metabolito activo del ácido fólico y coenzima esencial para la síntesis de ácidos nucleicos. En el contexto del tratamiento del CCR potencia la

actividad de 5-FU al estabilizar la unión del metabolito activo FdUMP a la enzima timidilato sintetasa (Longley et al., 2003; Noordhuis et al., 2004).

3) Análogos del platino:

- Oxaliplatino (Eloxatin®): pertenece a la tercera generación de drogas quimioterapéuticas basadas en el platino. Es un derivado del 1,2-diaminociclohexano de platino que se activa por el desplazamiento del anillo de oxalato por dos átomos de cloro y la subsiguiente formación de una variedad de especies alquilantes. Estas especies reaccionan con residuos de guanina adyacentes en el ADN, y provocan entrecruzamientos de ADN intra- o intercatenarios, inhibiendo por tanto la síntesis de ADN (Alcindor y Beauger, 2011).

4) Inhibidores de las topoisomerasas:

- Irinotecán (Camptosar®): inhibidor de la topoisomerasa I, enzima nuclear implicada en el correcto enrollamiento del ADN durante la replicación. El irinotecán actúa uniéndose al complejo topoisomerasa I-ADN. La formación de este complejo ternario interfiere en la replicación e induce roturas de doble hebra en el ADN (Mathijssen et al., 2001; Xu y Villalona-Calero, 2002).

Las **terapias dirigidas** contra el cáncer engloban a fármacos o compuestos que interfieren con moléculas específicas implicadas en el crecimiento de las células tumorales. Así, se han desarrollado los siguientes anticuerpos monoclonales para el tratamiento del CCR:

- Cetuximab (Erbix®) y Panitumumab (Vectivix®): anticuerpos monoclonales frente al receptor de crecimiento epidérmico (EGFR). Compiten por los ligandos de EGFR, induciendo la internalización del receptor y reduciendo los niveles de receptor en la superficie celular. De esta forma bloquean la señalización mediada por EGFR, lo que conduce a un incremento de apoptosis y a una reducción de proliferación y angiogénesis (Dubois y Cohen, 2009; Kirkpatrick et al., 2004; Lenz, 2007; Messersmith y Hidalgo, 2007).
- Bevacizumab (Avastin®) y Ziv-aflibercept (Zaltrap®): anticuerpos monoclonales frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Están diseñados para unirse directamente a VEGF extracelular evitando su interacción con los receptores de VEGF (VEGFRs) en la superficie de las células endoteliales, inhibiendo así la actividad angiogénica de VEGF (Ellis, 2006; Patel y Sun, 2013).

- Regorafenib (Stivarga®): inhibidor de múltiples quinasas de membrana e intracelulares implicadas en angiogénesis y en el mantenimiento del microambiente tumoral entre las que destacan VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 y PDGFR (Aprile et al., 2013; Schmieder et al., 2014).

La elección y administración de los fármacos mencionados sigue unas pautas específicas. Así, el tratamiento estándar para los pacientes con cáncer de colon en la fase de enfermedad localizada es la cirugía mediante escisión local (polipectomía) o resección de la zona afectada (colectomía), así como la extirpación de los ganglios linfáticos primarios y regionales. El valor potencial de la quimioterapia adyuvante para los pacientes de cáncer de colon en estadio II sigue siendo polémico. La decisión de utilizar quimioterapia adyuvante en estos pacientes es complicada y exige que tanto el paciente como el médico lo ponderen. En el caso de pacientes con CCR en estadio III, las opciones de tratamiento estándar son cirugía seguida de quimioterapia adyuvante. Antes del año 2000, el análogo de la pirimidina 5-fluouracilo (5-FU) fue el tratamiento de referencia en el entorno adyuvante para estos pacientes. Actualmente, los regímenes de quimioterapia más usados para estos casos son el régimen FOLFOX (oxaliplatino, leucovorina y 5-FU) y el régimen XELOX (capecitabina y oxaliplatino). El tratamiento de los pacientes de cáncer de colon avanzado o recidivante depende de la ubicación de la enfermedad. Se aplica la resección quirúrgica si es posible, seguida de quimioterapia y terapia dirigida. En la actualidad, los mismos fármacos activos usados en el tratamiento adyuvante, están aprobados para pacientes con cáncer colorrectal metastático, bien en monoterapia o en combinación con otros medicamentos. El mecanismo de acción de los mismos se ha detallado previamente: 5-FU, Capecitabina, Irinotecán, Oxaliplatino, Leucovorina, Cetuximab, Panitumumab, Bevacizumab, Aflibercept y Regorafenib.

1.2.2. Limitaciones de las terapias actuales: toxicidad y desarrollo de resistencias

En los últimos años se han logrado avances significativos en la terapia del CCR. Sin embargo, siguen existiendo dos limitaciones importantes: 1) La toxicidad de los tratamientos empleados, y 2) El desarrollo de resistencias a estos tratamientos.

1.2.2.1. Toxicidad

Los efectos secundarios de la quimioterapia tradicional pueden variar de un paciente a otro. En general, son causados por la muerte de las células normales de crecimiento rápido. Estas células se encuentran en las vellosidades intestinales, en la boca, en las células del sistema hematopoyético, y en las células de los folículos pilosos. Por lo tanto, los efectos secundarios comunes de la quimioterapia incluyen recuento bajo de células sanguíneas (neutropenia y

trombocitopenia), anemia, falta de apetito, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida del cabello y mucositis oral. Además de estos efectos, algunos quimioterápicos pueden causar efectos secundarios específicos, como es el caso del oxaliplatino, que frecuentemente induce neurotoxicidad. La toxicidad de la terapia dirigida sobre las células normales es menor que la quimioterapia tradicional. Sin embargo, los tratamientos de terapia dirigida que se han desarrollado hasta el momento para el tratamiento del CCR no están exentos de efectos secundarios, siendo los más comunes: incremento de la presión arterial, diarrea, debilidad, infecciones, foliculitis cutánea y mucositis oral.

1.2.2.2. Resistencia a la terapia

Evitar el desarrollo de resistencia a las terapias antitumorales sigue siendo un reto en el tratamiento del cáncer. La inestabilidad genética, la heterogeneidad y la alta tasa de mutaciones de las células tumorales favorecen la aparición de resistencias. Los factores farmacocinéticos tales como la absorción del fármaco, su distribución, metabolismo y eliminación limitan la concentración efectiva de fármaco que alcanza el tumor. Las células tumorales pueden desarrollar resistencia por numerosos mecanismos, incluyendo: 1) la disminución de la absorción del fármaco, 2) el aumento de la expulsión del fármaco a través de las bombas exportadoras tipo ABC, 3) la inactivación o la falta de activación de las drogas utilizadas, 4) la activación de los sistemas de detoxificación, 5) la activación de los mecanismos de reparación del ADN, 6) la mutación o alteración de los niveles de expresión de la diana efectora, 7) la activación de rutas de señalización alternativas que favorecen la supervivencia y, 8) la evasión de la apoptosis inducida por los fármacos en uso (Holohan et al., 2013).

En el caso particular de las terapias utilizadas en el CCR, se han descrito resistencias tanto a la quimioterapia tradicional como a las terapias dirigidas. Así, se ha descrito que las células de CCR desarrollan resistencia a 5-FU mediante la activación de mecanismos de reparación de ADN y por la sobreexpresión de su diana efectora, la enzima timidilato sintetasa (Johnston et al., 1995; Temraz et al., 2014). La resistencia a oxaliplatino es multifactorial. Los mecanismos de resistencia que se han propuesto incluyen su ineficiente absorción y acumulación (Hector et al., 2001), la activación del sistema de detoxificación glutatión-S-transferasa (Sau et al., 2010), la activación de los mecanismos de reparación por escisión de base (vía NER) (Ahmad, 2010), y la activación de rutas de señalización antiapoptóticas (Gourdier et al., 2002; Huang y Hung, 2009; Temraz et al., 2014; Yang et al., 2009). La resistencia a irinotecán se asocia a una activación de EGFR y a una sobreexpresión de la topoisomerasa II α (Coss et al., 2009; Petitprez y Larsen, 2013). En lo que respecta a las terapias dirigidas, la resistencia a los anticuerpos monoclonales que actúan bloqueando EGFR, se atribuye a la activación constitutiva de las vías de señalización activadas por

este receptor así como a la activación de receptores tirosin-quinasa alternativos (Holohan et al., 2013; Temraz et al., 2014). Asimismo, la resistencia a los anticuerpos monoclonales que actúan bloqueando VEGF implica la activación de cascadas de señalización angiogénicas alternativas (Bergers y Hanahan, 2008; Ellis y Hicklin, 2008).

1.2.3. Alternativas a las terapias actuales. Identificación de nuevas dianas terapéuticas

A pesar de la variedad de mecanismos de resistencia y la complejidad causada por la heterogeneidad del tumor y sus interacciones con el microambiente, no debemos perder de vista el hecho de que la quimioterapia y los tratamientos dirigidos son eficaces en muchos contextos, ya sea curando la enfermedad o prolongando la vida del paciente de manera significativa. El desafío presente es aprender de la experiencia del tratamiento con las terapias empleadas hasta la actualidad, para que en el futuro se utilicen las terapias en desarrollo de la forma más efectiva. A menudo, se propone la combinación racional de fármacos para mejorar la respuesta al tratamiento. En el caso del CCR, actualmente hay más de quince ensayos clínicos activos en los que se proponen diferentes terapias combinadas (*National Cancer Institute*). Resultaría muy relevante el que fuéramos capaces de estratificar a los pacientes en función de su predisposición a responder a un fármaco o a una combinación de fármacos en particular, pudiendo así llevar a la práctica clínica una terapia personalizada.

El avance en las técnicas genómicas y proteómicas ha permitido incrementar nuestra capacidad para identificar nuevos genes y redes de señalización implicados en el desarrollo de resistencias y en la respuesta al tratamiento. Además, el uso de técnicas de alto rendimiento en combinación con la bioinformática y la biología de sistemas han permitido la identificación de firmas moleculares que predicen las respuestas a algunos tratamientos. Al mismo tiempo, estos enfoques permiten la identificación de nuevas dianas terapéuticas sobre las que actuar para superar o contrarrestar la resistencia a la terapia (Holohan et al., 2013).

1.3. FAMILIA DE TP53: POSIBLE DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER

TP53 es uno de los genes supresores tumorales más frecuentemente mutado en cáncer (Kandoth et al., 2013). En general, P53 actúa como un factor de transcripción que se activa en respuesta a señales de estrés regulando genes implicados en ciclo celular, apoptosis, senescencia, diferenciación, reparación de ADN y metabolismo celular (Jiang et al., 2013; Maddika et al., 2007; Maddocks et al., 2013; Maddocks y Vousden, 2011). Su inactivación es esencial para la iniciación y progresión de la mayoría de los tumores. Por eso, P53 ha sido y sigue siendo una diana

terapéutica en cáncer. Así, se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas dirigidas a activar la ruta de P53, algunas de las cuales se encuentran en fase de ensayo clínico. Se incluyen: 1) la aplicación de terapia génica para restaurar la función de P53 (Stegh, 2012), 2) la identificación de inhibidores de la interacción de P53 con su regulador negativo MDM2, como Nutlina (Vassilev et al., 2004), RITA (Issaeva et al., 2004), MI-219 (Shangary et al., 2008) y RG7112 (Saha et al., 2013), 3) la identificación de moléculas capaces de restaurar la función de P53, tales como PRIMA-1 (Bykov et al., 2005), Phikan083 (Boeckler et al., 2008), NSC319726 (Yu et al., 2012), CP31398 (Foster et al., 1999), SCH529074 (Demma et al., 2010), Elíptica (Peng et al., 2003), WR1065 (North et al., 2002), y p53R3 (Weinmann et al., 2008), 4) la identificación de moléculas que eliminan P53 mutado como 17AAG y SAHA (Li et al., 2011), y 5) el desarrollo de vacunas (Chiappori et al., 2010; Speetjens et al., 2009).

En este contexto, uno de los miembros de la familia de P53, P73, juega un papel clave en la respuesta al estrés celular en cáncer, por lo que el interés de su estudio como diana terapéutica ha crecido en los últimos años (Pflaum et al., 2014).

1.4. TP73: MIEMBRO DE LA FAMILIA DE TP53

En el año 1997 se identificaron dos genes con alta homología estructural y funcional con *TP53*, *TP63* (Schmale y Bamberger, 1997; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998) y *TP73* (Kaghad et al., 1997).

La estructura génica de *TP53*, *TP63* y *TP73* está altamente conservada siendo el dominio de transactivación NH₂-terminal (TA), el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de oligomerización COOH-terminal (OD) los más conservados (Moll y Slade, 2004). Además, *TP63* y *TP73* tienen en común un segundo dominio de transactivación (TA₂), un dominio de interacción proteína-proteína tipo *steril alpha motif* (SAM), y un dominio inhibitorio de la transcripción (TI). El hecho de que los tres genes compartan una homología de más del 60% en su dominio de unión al ADN apoya que puedan regular la transcripción de los mismos genes efectores (Grob et al., 2001; Jost et al., 1997; Zhu et al., 1998). Sin embargo, se han encontrado diferencias en su estructura que podrían explicar por qué presentan diferentes patrones de expresión (Candi et al., 2014) (**Figura 3**). Debido al procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) tanto en la región amino- como en la carboxi-terminal, todos los miembros de la familia pueden dar lugar a diferentes isoformas, algunas de las cuales presentan, como se ha descrito para P53, funciones supresoras tumorales y otras llamativamente, muestran actividades oncogénicas (Bourdon et al., 2005; De Laurenzi et al., 1998, 1999; Grob et al., 2001).



Figura 3. Organización estructural y homología entre los miembros de la familia de TP53. TA: dominio de transactivación, DBD: dominio de unión al ADN, OD: dominio de oligomerización, TA₂: segundo dominio de transactivación, SAM: dominio de interacción proteína-proteína tipo *steril-alpha motif*.

P53, P63 y P73 son transcripcionalmente activos en forma de homo-tetrámeros. A pesar de su homología, sólo P63 y P73 son capaces de interactuar entre sí formando heterotetrámeros más estables que los homotetrámeros (Boeckler et al., 2008; Coutandin et al., 2009; Joerger et al., 2009).

Aunque inicialmente se atribuyeron funciones supresoras tumorales para TP73 similares a las descritas para su homólogo TP53, la ausencia de mutaciones en su secuencia, la sobreexpresión de la forma nativa en distintos tipos tumorales (Melino et al., 2002) y la ausencia de fenotipo tumoral en el ratón nulo (Yang et al., 2002), sugerían que TP73 tenía un mecanismo de acción diferente en el contexto tumoral. Estudios posteriores mostraron datos contradictorios en los que algunos autores describían funciones supresoras tumorales para TP73 mientras que otros le atribuían actividades oncogénicas (Jost et al., 1997; Petrenko et al., 2003; Pozniak et al., 2000; Stiewe et al., 2002; Zaika et al., 2001, 2002). La identificación de distintas isoformas (Fillippovich et al., 2001; Zaika et al., 2002) y el desarrollo de los ratones *knock-out* isoforma-específicos, está ayudando a descifrar el papel de P73 en el proceso tumoral (Tomasini et al., 2008; Wilhelm et al., 2010).

A día de hoy se sabe que *TP73* consta de 14 exones y que mediante el procesamiento alternativo del ARNm y/o la transcripción a partir de dos promotores distintos, da lugar a un complejo número de isoformas con funciones opuestas. Las variantes que se transcriben a partir del primer promotor y que no sufren modificaciones en su región amino-terminal se denominan *TAP73*, mientras que aquellas que carecen parcial o completamente del dominio amino-terminal, se conocen colectivamente como Δ *TAP73* e incluyen a las variantes Δ *EX2P73*, Δ *EX2/3P73*, Δ *NP73* y Δ *N`P73*. Como consecuencia del procesamiento alternativo de la región de transactivación, Δ *EX2P73* y Δ *EX2/3P73* pierden los exones 2 ó 2 y 3, respectivamente (G Domínguez et al., 2006; Kaghad et al., 1997; Sherr y Weber, 2000). La variante Δ *N`P73* se genera a partir del primer promotor e incluye en su secuencia 198 pares de bases del exón 3' que dan lugar a 13 aminoácidos adicionales (G Domínguez et al., 2006; Ishimoto et al., 2002). Un segundo promotor

situado en la región intrónica del exón 3 da lugar a la forma $\Delta NP73$, en la que se incluye un exón adicional 3' (G Domínguez et al., 2006; Wilhelm et al., 2010). Curiosamente, el producto proteico resultante de la traducción de ΔN^p73 y $\Delta NP73$ es indistinguible (G Domínguez et al., 2006; Ishimoto et al., 2002). A su vez, todos los transcritos pueden ser procesados desde el exón 10 al 14 en la región carboxi-terminal generando, al menos, 8 variantes diferentes (α , β , γ , ζ , δ , ϵ , η , $\eta 1$) (De Laurenzi et al., 1998). No todas las isoformas se expresan en un tipo celular, lo que sugiere que algunas de ellas pueden tener funciones solapantes (Ishimoto et al., 2002) (**Figura 4**).

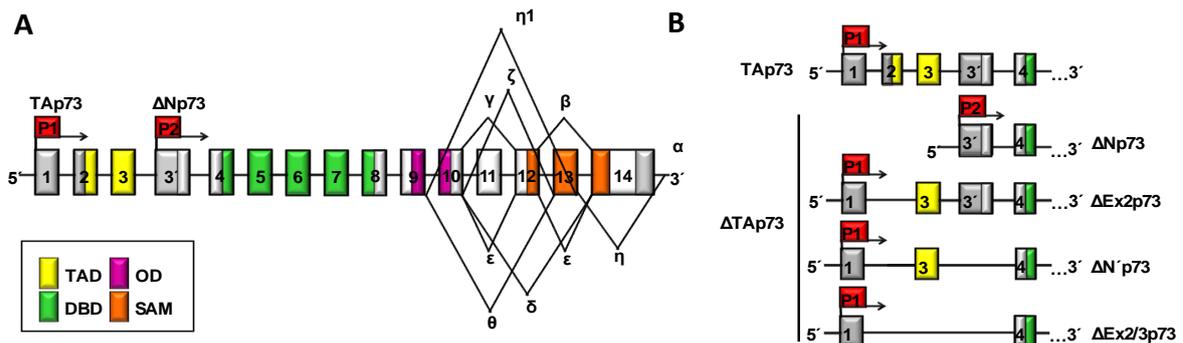


Figura 4. Isoformas de TP73. Los exones se organizan según la siguiente estructura de dominios: dominio de transactivación (TAD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio de oligomerización (OD) y motivo alpha esteril (SAM). (A) Se indican las dos regiones promotoras (P1 y P2) y el procesamiento de la región COOH-terminal. (B) Se indican las isoformas NH₂-terminal (TAP73 y $\Delta TAP73$). Estas variantes (B) también pueden ser procesadas simultáneamente en el COOH-terminal.

Al igual que P53, TAP73 induce parada del ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular a través de la transactivación de los mismos genes diana de P53, por lo que se le atribuyen características supresoras tumorales. Sin embargo, las isoformas $\Delta TAP73$ pueden operar como oncogenes actuando como reguladores negativos de P53 y TAP73 mediante la formación de hetero-tetrámeros transcripcionalmente inactivos (Zorić et al., 2013) y por competición directa por los sitios de unión en los promotores de sus genes diana (Buhlmann y Pützer, 2008; Ishimoto et al., 2002). Asimismo, se ha descrito un mecanismo de regulación negativo mediante el que TAP73 y P53 pueden activar la expresión de $\Delta NP73$ por unión directa al segundo promotor de TP73 (Grob et al., 2001). Además, publicaciones recientes apoyan la función exclusiva de $\Delta NP73$ activando la transcripción de su propio conjunto de genes efectores con funciones oncogénicas (Lin et al., 2009) mediante su participación en procesos clave pro-tumorales como proliferación (Soldevilla et al., 2011; Vilgelm et al., 2010), angiogénesis (Díaz et al., 2008), transición epitelio-mesénquima –TEM- (Zhang et al., 2013; Y. Zhang et al., 2012), resistencia a drogas (Soldevilla et al., 2011; Vera et al., 2013; Vilgelm et al., 2008) y adquisición de capacidades “stem” (Lin et al., 2012).

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

1.4.1. Funciones supresoras tumorales de TAP73

Como miembro de la familia de TP53, TAP73 puede ejercer su función supresora tumoral transactivando los mismos genes diana que TP53 o activando sus propios genes efectores:

1.4.1.1. Participación en parada del ciclo celular

TAP73 puede inducir parada del ciclo celular en respuesta a estrés transactivando a P21, GADD45, CDKN1A y CDKN1C (Merlo et al., 2005; Strano et al., 2005). Además, TAP73 limita el número de divisiones celulares regulando indirectamente la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) (Beitzinger et al., 2006).

1.4.1.2. Inducción de apoptosis

TAP73 se acumula en respuesta a estrés genotóxico u oncogénico y desencadena la muerte celular a través de diferentes vías. Así, puede inducir la vía intrínseca de la apoptosis transactivando los mismos genes diana que P53 (Melino et al., 2004; Pietsch et al., 2008), o de forma P53-independiente activando la transcripción de GRAMD4 (John et al., 2011). Además, algunas publicaciones sugieren que TAP73 también podría activar la vía extrínseca de la apoptosis (Melino et al., 2002; Müller et al., 2005). Otros mecanismos por los que TAP73 induce apoptosis implican la inhibición de rutas de señalización antiapoptóticas como la inducción del co-represor PML, que se une a EGFR inhibiendo su transcripción (Klanrit et al., 2009) y/o la activación de rutas de señalización pro-apoptóticas como el eje IGF (Baxter, 2014), c-JUN (P. Zhang et al., 2012), IL4-R (Sasaki et al., 2003), PEDF (Broadhead et al., 2009; Sasaki et al., 2005), TNF α (Rastogi et al., 2012) y TGF β (Yamamura et al., 2008). Además, publicaciones recientes proponen que TAP73 podría estar implicado en la inducción de muerte celular mediante la activación del proceso de autofagia (Crighton et al., 2007; He et al., 2013; Rosenbluth et al., 2008; Schipper et al., 2014).

1.4.1.3. Mantenimiento de la estabilidad genómica

TAP73 contribuye a la integridad del genoma regulando proteínas implicadas en la reparación del ADN (Lin et al., 2009; Shimodaira et al., 2003; Zaika et al., 2011), suprimiendo la poliploidía y la aneuploidía por un mecanismo independiente de P53 (Talos et al., 2007) e interaccionando con componentes esenciales durante la formación del huso mitótico, para que la segregación cromosómica tenga lugar de forma correcta (Tomasini et al., 2009).

1.4.1.4. Sensibilidad a la terapia

La respuesta celular tras el daño genómico producido por el tratamiento quimioterápico implica la sobre-expresión de TP53 y de las isoformas TAP73 (Concin et al., 2005; Vilgelm et al., 2008) que desencadenan la activación de vías apoptóticas mediante la transcripción de genes diana comunes (Lin et al., 2009; Zhu et al., 1998) o exclusivos (Lin et al., 2009; Scian et al., 2008). Así, se ha descrito el papel de TAP73 en la sensibilización a la terapia por diferentes mecanismos y en diferentes contextos tumorales (Herrerros-Villanueva et al., 2010; Jain et al., 2005; Leung y Ngan, 2010; Sang et al., 2006; P. Zhang et al., 2012).

1.4.1.5. Otros: papel en diferenciación, mantenimiento de la polaridad celular y en metabolismo

Se ha descrito el papel de TAP73 en diferenciación (Agostini et al., 2011) y en el mantenimiento de la polaridad celular mediante la inhibición de la transición epitelio-mesénquima a través de la regulación negativa de *Snail*, *Slug* y *Twist* (Y. Zhang et al., 2012). Actualmente la controversia en torno al papel de TAP73 en el contexto tumoral ha vuelto al panorama científico por las recientes publicaciones que sitúan a TAP73 como un gen central en el control del metabolismo celular. Se ha descrito que TAP73 regula positivamente la expresión de varias enzimas metabólicas, G6PD, Cox4i1 y GLS2 (Amelio et al., 2013; Jiang et al., 2013; Velletri et al., 2013), así como su participación en varias rutas anabólicas (síntesis de aminoácidos, síntesis de acetilCoA y metabolismo de la arginina) (Amelio et al., 2014) que, en un contexto tumoral, favorecerían la progresión del tumor mediante el incremento de la tasa de proliferación de las células modificadas. Sin embargo, Agostini et al., 2014, proponen que el control de TAP73 sobre el metabolismo celular debe interpretarse en otros contextos biológicos, especialmente en la regulación del envejecimiento, sugiriendo que TAP73 promueve la reprogramación metabólica para proteger a las células de la senescencia prematura y no para incrementar la tasa proliferativa.

1.4.2. Funciones oncogénicas de Δ TAP73

La sobreexpresión de las variantes Δ TAP73 y específicamente de Δ NP73 en numerosos tumores humanos como neuroblastoma (Casciano et al., 2002), ovario (Concin et al., 2005), mama, colon (Gemma Domínguez et al., 2006a), próstata (Guan y Chen, 2005), tiroides (Ito et al., 2006), hígado (Müller et al., 2005), leucemia (Rizzo et al., 2004), pulmón (Uramoto et al., 2004), gástrico, esofágico (Vilgelm et al., 2010) y meduloblastoma (Zitterbart et al., 2007), entre otros, junto con su asociación en muchos de ellos con supervivencias más cortas de los pacientes (Becker et al., 2006; Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005; Gemma Domínguez et al., 2006a; Liu et al., 2006; Müller et al., 2005; Soldevilla et al., 2013; Sun, 2002; Uramoto et al., 2004; Wager et al., 2006), ha llevado a pensar en el posible papel oncogénico de estas isoformas. Actualmente se está esclareciendo en qué etapas del proceso tumoral podrían estar implicadas estas isoformas.

1.4.2.1. Inducción de proliferación

Uno de los primeros procesos que se ve alterado en el inicio del desarrollo de un tumor es la proliferación de la célula tumoral. Las isoformas Δ TAP73 por interferencia con la actividad de TAP73 y P53, inhiben apoptosis y favorecen la progresión del ciclo celular (Buhlmann y Pützer, 2008). Así, aunque algunos grupos descartan la asociación entre los niveles altos de expresión de la variante Δ NP73, el incremento en la tasa de proliferación celular y el desarrollo de un fenotipo más agresivo (Marabese et al., 2005), muchos estudios sugieren que la disminución de los niveles de Δ NP73, aumenta la tasa de muerte celular y disminuye la proliferación en células de neuroblastoma (Simões-Wüst et al., 2005), en mioblastos (Belloni et al., 2006) y cáncer de cérvix (C.-X. Di et al., 2013). Los estudios realizados en el modelo de ratón deficiente para esta isoforma (Pozniak et al., 2000; Wilhelm et al., 2010) junto con datos recientes que describen que la sobreexpresión de Δ NP73 en células de cáncer de colon incrementa significativamente su tasa de proliferación (Soldevilla et al., 2011) confirman estos resultados.

1.4.2.2. Participación en procesos de quimiorresistencia

Varios estudios han descrito la presencia de niveles altos de expresión de las isoformas Δ TAP73, y especialmente de Δ NP73, y su asociación con el desarrollo de resistencia a las drogas utilizadas (Müller et al., 2006). Δ NP73 favorece la resistencia a la terapia a través de la regulación negativa de genes diana de TAP73 y P53 con función apoptótica como Bax o PUMA, entre otros (Buhlmann y Pützer, 2008; C. Di et al., 2013), y por mecanismos transcripcionales independientes de TAP73 o de P53. Así, se ha descrito que Δ NP73 se puede unir e inhibir a JNK para proteger a las

células de la respuesta apoptótica (Lee et al., 2004) o regular negativamente la transcripción de PTEN, induciendo proliferación e inhibiendo apoptosis (Vella et al., 2009). Además, Δ NP73 puede transactivar genes asociados con procesos de resistencia a drogas como ABCB1 y HMGB1 (Johnson et al., 2005; Uramoto et al., 2003; Vilgelm et al., 2008) o regular otros transportadores de la familia ABC a través del eje Δ NP73-miR205 modulado por E2F-1 (Alla et al., 2012; Vera et al., 2013).

1.4.2.3. Activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), invasión y adquisición de capacidades “stem”

La TEM es un proceso altamente conservado cuya activación aberrante en las células tumorales se asocia con la progresión tumoral y la metástasis. La conversión fenotípica durante la TEM incluye la pérdida de las uniones célula-célula, la pérdida de la polaridad y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas, incluyendo la capacidad de degradar la matriz extracelular. Típicamente, estos cambios fenotípicos se han asociado con la pérdida de marcadores epiteliales, tales como E-cadherina y con el incremento de proteínas mesenquimales como por ejemplo N-cadherina, vimentina o fibronectina. En este sentido, varios estudios definen las isoformas Δ NP73 como nuevos reguladores de la TEM durante la progresión maligna en el cáncer. Se ha descrito que Δ NP73, mediante la regulación positiva de *Slug*, induce un fenotipo mesenquimal acompañado de una reorganización del citoesqueleto, la pérdida de E-cadherina y la regulación positiva de N-cadherina y vimentina (Steder et al., 2013). Nuevos estudios sugieren una asociación entre la TEM y la adquisición de un fenotipo “stem”. En este sentido, la sobre-expresión de Δ NP73 puede aumentar la eficiencia de generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Lin et al., 2012).

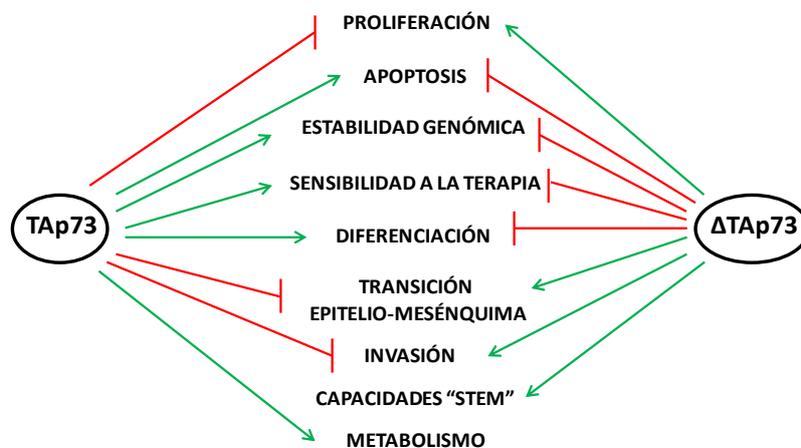


Figura 5. Funciones supresoras tumorales y oncogénicas diferencialmente reguladas por las isoformas TAp73 y Δ TAp73. \rightarrow Activación; $--|$ Inhibición

1.4.3. Regulación del ratio TAP73/ Δ TAP73: clave en la función de TP73 en el contexto tumoral

La función de TP73, y por tanto el destino celular, está altamente determinado por el ratio entre los niveles de expresión de las isoformas TAP73 y Δ TAP73. Así, en condiciones fisiológicas los niveles de Δ NP73 son relativamente altos en algunos tejidos (útero, glándulas salivares y lengua), mientras que son comparables a los de TAP73 en otros tejidos (Buhlmann y Pützer, 2008). Sin embargo, en un contexto no fisiológico, cuando el balance de este ratio se inclina hacia las isoformas con funciones anti-apoptóticas, la célula puede adquirir propiedades pro-tumorogénicas. Los mecanismos que controlan este ratio son todavía desconocidos. Se ha descrito que la unión de la proteína Δ EF1/ZEB-1 en el primer intrón del gen inhibe la expresión de TAP73 y Δ NP73, incluso en presencia de E2F-1 (Fontemaggi et al., 2001; Pipaon et al., 2005). En 2006, nuestro grupo observó en pacientes con cáncer de colon que una delección en esta región de unión de ZEB-1 se traducía en la disminución de los niveles de TAP73, inclinándose el ratio en favor de la expresión de las isoformas oncogénicas Δ TAP73 (Coates, 2006; Gemma Domínguez et al., 2006a). Se ha descrito, que en la tumorogénesis de hígado, anfiregulina podría participar en la inhibición de la proteína reguladora de procesamiento Slu7, lo que conduciría a la expresión de la forma pro-tumoral Δ EX2P73 (Castillo et al., 2009). Además, estudios recientes han identificado otras vías de degradación selectiva de las isoformas de P73 dependientes del tipo y el contexto celular (Dulloo et al., 2010; Gonzalez-Cano et al., 2013; Sayan et al., 2010).

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

Al igual que ocurre con P53, en condiciones fisiológicas los niveles de proteína de las isoformas TAP73 y Δ NP73 se mantienen muy bajos por acción de su modulador ITCH, que regula la degradación de estas proteínas por la vía del proteasoma (Oberst et al., 2005; Rossi et al., 2005). Sin embargo, como respuesta a estrés, ITCH se degrada permitiendo la rápida acumulación de TAP73 y su efecto pro-apoptótico (Kubo et al., 2010), mientras que Δ NP73 es degradado para bloquear sus actividades anti-apoptóticas (Oberst et al., 2005; Rossi et al., 2005). Además, la estabilidad de P73 va a depender de la aplicación secuencial de una serie de modificaciones post-

traduccionales, siendo la fosforilación la más importante tras un daño genotóxico (Agami et al., 1999; Gaiddon et al., 2001; Mantovani et al., 2004; Nyman et al., 2009; Sanchez-Prieto et al., 2002; Toh et al., 2004; Tomlinson et al., 2010; Tsai y Yuan, 2003; Urist et al., 2004; Wang, 2000).

1.4.4. TP73 como diana terapéutica

La expresión, estabilidad y localización celular de las isoformas TAP73 y Δ TAP73 depende del contexto celular y está sujeta a una compleja red de regulación que responde a una gran variedad de estímulos. Su desregulación durante la progresión del cáncer provoca la inhibición de la función supresora tumoral de TAP73 y promueve las actividades oncogénicas de Δ NP73. Por ello, adquiere especial relevancia el desarrollo de estrategias terapéuticas que en un contexto tumoral, restauren o potencien la actividad supresora tumoral de TAP72 y/o inhiban la actividad oncogénica de Δ NP73. En este sentido, en la **tabla I** se resumen los compuestos que se han descrito hasta la fecha que son capaces de inhibir o desplazar a los reguladores negativos de TAP73 o que incrementan la estabilidad, la actividad o la expresión de la isoforma supresora tumoral. No hay que olvidar sin embargo que Δ NP73 es un inhibidor de TAP73, por lo que en tumores que sobreexpresan Δ NP73, la estrategia terapéutica de reactivación de TAP73 sería insuficiente. En este sentido, adquiere especial relevancia el desarrollo de estrategias que puedan inhibir a Δ NP73. En la **tabla I**, también se resumen los compuestos descritos hasta el momento que regulan negativamente a esta isoforma (Engelmann et al., 2014).

Compuesto	Mecanismo de acción	Referencias
RETRA	Inhibe la interacción P53-mutado/P73	(Kravchenko et al., 2008)
PRIMA-1	Inhibe la interacción P53-mutado/P73	(Rökaeus et al., 2010; Saha et al., 2013)
Prodigiosina	Inhibe la interacción P53-mutado/P73	(Hong et al., 2014)
PI-103 y MK-2206	Inhibidores de PI3K: Inhibe la interacción P53-mutado/P73	(Hamilton et al., 2014)
Nutlina-3a	Inhibidor de MDM2: Estabiliza TAP73	(Ray et al., 2011; Zheng et al., 2010)
Panobinostat	Inhibidor de ITCH: Estabiliza TAP73	(Sampath et al., 2009)
Fludarabine	Acumulación nuclear de TAP73	(Christopherson et al., 2014)
MLN8054	Inhibidor de Aurora Quinasa A: Activación de TAP73	(Dar et al., 2008; Katayama et al., 2012)
Rapamicina	Inhibidor de mTOR: Activación de TAP73	(Rosenbluth et al., 2008; Wong et al., 2011)
Metformina	Inhibidor de mTOR: Activación de TAP73	(Rosenbluth et al., 2008)
α-TEA	Inhibidor de mTOR: Activación de TAP73	(Tiwary et al., 2011)
PF-04691502	Inhibidor de PI3K/mTOR: Activación de TAP73	(Herzog et al., 2013)
CDF (curcumina difluorada)	Activación de TAP73	(Azmi et al., 2011)
Mahanine	Activación de TAP73	(Das et al., 2014)
Forodesina	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Alonso et al., 2009)
Lenalidomida	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Lapalombella et al., 2010)
Enzastaurina	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Raab et al., 2009)
Timoquinona	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Alhosin et al., 2012, 2010)

EGCG (epigallocatequina-3-galato)	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Achour et al., 2013; Onoda et al., 2011)
Polifenoles	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Sharif et al., 2010)
Trióxido arsénico	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Momeny et al., 2010; Zheng et al., 2014)
Propranolol	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Wolter et al., 2014)
Melfalán	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Park et al., 2013)
Butirato de sodio	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Decrion-Barthod et al., 2010)
7-hidroxi-estaurosporina	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Decrion-Barthod et al., 2010)
Afidicolina	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Tebbi et al., 2011)
Resveratrol	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Tebbi et al., 2011)
4-propoxifenol	Regulación positiva de la expresión de TAP73	(Tebbi et al., 2011)
Celecoxib	Regulación positiva de la expresión de TAP73 y regulación negativa de Δ NP73	(Lau et al., 2009)
Tazaroteno	Regulación positiva de la expresión de TAP73 y regulación negativa de Δ NP73	(Papoutsaki et al., 2004)
Interferon (IFN)α	Regulación negativa de la expresión de Δ NP73	(Testoni et al., 2011)
ASO116	Inhibición de Δ EXON2/3P73	(Emmrich et al., 2009)
Vitamina D	Regulación negativa de TAP73 y Δ NP73	(Díaz et al., 2010)

Tabla I. Compuestos que regulan positivamente las variantes TAP73 y/o negativamente las variantes Δ TAP73.

1.5. COMPUESTOS NATURALES: POTENCIAL TERAPÉUTICO EN CÁNCER

La identificación de agentes activos farmacológicamente para el tratamiento del cáncer ha dependido en gran medida del cribado de compuestos naturales y de sus análogos. En vista de la enorme biodiversidad del planeta, la búsqueda de agentes antitumorales en los recursos naturales podría tener un futuro prometedor. En 1960, el Instituto Nacional del Cáncer inició un programa de cribado a gran escala para la búsqueda de compuestos derivados de plantas con potencial antitumoral. En los últimos 50 años, se testaron más de 100.000 compuestos, de los que varios han recibido la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en clínica, entre los que se incluyen: 1) el paclitaxel, aislado del tejo *Taxus brevifolia*, se usa para el tratamiento del cáncer de ovario y de mama; 2) la camptotecina, aislada de árboles del género *Champtotecha*, tiene propiedades antiproliferativas en varios tipos de cáncer, usándose en clínica dos de sus análogos, el topotecán (en cáncer de ovario y pulmón) y el irinotecán (en cáncer de colon); 3) la podofilotoxina, aislada de plantas del género *Podophyllum*, ha permitido la síntesis del fosfato de etopósido, que se usa en clínica para el tratamiento de Sarcoma de Ewin, cáncer de pulmón, linfomas y glioblastoma y, 4) los alcaloides vincristina y vinblastina, aislados de *Catharanthus roseus*, se usan en clínica para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Gordaliza, 2007; Mann, 2002; Ma y Wang, 2009).

Actualmente, la búsqueda de agentes bioactivos naturales para el tratamiento del cáncer está en auge debido principalmente a su bio-seguridad, ya que los efectos secundarios derivados de estos son previsiblemente menores que los de las drogas sintéticas (Madka y Rao, 2013). En el caso del cáncer de colon, ha crecido el interés de la comunidad científica por el posible papel terapéutico de compuestos naturales derivados de la dieta (Kuppusamy et al., 2014). Se han descrito propiedades antitumorales *in vitro* y en modelos animales de cáncer de colon de varios flavonoides como la quercetina (Kim et al., 2010; Park et al., 2005), la apigenina (Chung et al., 2007; Leonardi et al., 2010), la epilocalcatequina-3-galato (Kumazoe et al., 2013; Larsen y Dashwood, 2010), la naringenina (Leonardi et al., 2010), la cianidina (Kim et al., 2008), la delfinidina (Yun et al., 2009) y la silibinina (Hogan et al., 2007; Rajamanickam et al., 2010; Velmurugan et al., 2008). Igualmente, se ha descrito el potencial terapéutico en cáncer de colon de los polifenoles curcumina (Su et al., 2006) y resveratrol (Sánchez-Fidalgo et al., 2010; H. Wu et al., 2008), de algunos isotiocianatos (Cheung et al., 2008; Lai et al., 2010; Rudolf et al., 2009; Shen et al., 2007), terpenoides (Dillard y Lane, 2008; Park et al., 2008), ácidos grasos omega-3 (Kato et al., 2007), y esfingolípidos (Symolon et al., 2004). También se ha descrito el efecto terapéutico en cáncer de colon de algunos carotenoides como el licopeno (Palozza et al., 2010) y la astaxantina (Nagendraprabhu y Sudhandiran, 2011).

1.5.1. Potencial terapéutico del carotenoide β -criptoxantina en cáncer

β -criptoxantina es un compuesto natural derivado de la dieta con potencial preventivo y terapéutico en cáncer. Se trata de uno de los seis principales carotenoides medidos rutinariamente en suero humano (β -caroteno, licopeno, luteína, β -criptoxantina, zeaxantina y α -caroteno). Está contenida principalmente en las frutas cítricas (Granado et al., 1996), pero también se encuentra en el maíz, guisantes y algunos productos de origen animal tales como yema de huevo y mantequilla.

Existen varios estudios que apuntan a un posible papel preventivo de β -criptoxantina en cáncer. Estos estudios sugieren que los niveles de β -criptoxantina en suero están inversamente relacionados con el riesgo de desarrollar diferentes tipos de tumor: colorrectal (Park et al., 2009), gástrico (Abnet et al., 2003; Jenab et al., 2006), de mama (Mignone et al., 2009; Tamimi et al., 2012, 2005), de ovario (Siegel et al., 2010), de pulmón (Comstock et al., 2008; Klarod et al., 2011), de próstata (Stram et al., 2007; Zhang et al., 2007), de hígado (Nishino et al., 2009), de vejiga (Hung et al., 2006) y linfoma no Hodgkin (Chiu et al., 2011), entre otros. Aunque se han publicado algunos resultados en los que no se encuentra ninguna asociación entre los niveles de β -criptoxantina en suero y el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer (Beydoun et al., 2011; Kabat et al., 2012; Ollberding et al., 2012), el papel preventivo de β -criptoxantina queda patente

en varios estudios de carcinogénesis inducida en diversos tejidos (colon, pulmón, vejiga, hígado y lengua) en modelos animales (Kohno et al., 2001; Miyazawa et al., 2007; Tanaka et al., 2000).

El potencial terapéutico de este carotenoide en cáncer está empezando a ser estudiado por la comunidad científica. Estudios recientes han demostrado el efecto antitumoral de este carotenoide en cáncer de pulmón no microcítico (Lian et al., 2006), cáncer de estómago (Wu et al., 2013) y melanoma (Baudeflet et al., 2013) en modelos celulares *in vitro*. Aunque el mecanismo por el cual β -criptoxantina podría ejercer su efecto terapéutico se desconoce, los estudios genómicos realizados hasta la fecha sugieren que β -criptoxantina podría estimular la expresión del gen *RB*, un gen supresor tumoral, y de *WAF-1* (Nishino et al., 2000; Murakami et al., 1999, comunicación personal), e inducir la expresión de diversos genes implicados en cáncer, tales como *P16* y *P73* (Nishino et al., 2009, referencia original no publicada).

1.6. CONSIDERACIONES FINALES. HIPÓTESIS

Numerosos estudios ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para superar los problemas de toxicidad y resistencia a los tratamientos actuales en cáncer de colon. En este contexto, la búsqueda de agentes bioactivos naturales que actúen frente a dianas terapéuticas conocidas está en auge debido principalmente a su bioseguridad y disponibilidad. TP73 se presenta como una atractiva diana terapéutica dado que su desregulación juega un papel clave en el proceso tumoral. Así, la inhibición de la función supresora tumoral de TAP73 y la activación de la variante oncogénica, Δ NP73, parecen asociadas a la progresión de ciertos tumores. Por otro lado, uno de los compuestos naturales que está empezando a despertar interés en la comunidad científica por su papel protector en cáncer y su potencial terapéutico en distintos tipos tumorales es el carotenoide β -criptoxantina. El mecanismo por el que β -criptoxantina podría ejercer los efectos mencionados se desconoce en la actualidad, pero los estudios realizados sugieren que podría regular la expresión de genes implicados en el proceso tumorigénico, entre ellos, TP73. Basándonos en esto, nuestras hipótesis de trabajo son:

- β -criptoxantina puede regular positivamente la expresión de las isoformas TAP73 (con función supresora tumoral) y/o inhibir la expresión de las isoformas Δ TAP73 (con función oncogénica).
- Si β -criptoxantina regula diferencialmente las isoformas de TP73, puede tener función terapéutica en cáncer de colon administrada de forma aislada o en terapia combinada con agentes utilizados actualmente en clínica.

2.Objetivos

La desregulación de P73 en favor de las isoformas oncogénicas Δ TAP73 juega un papel clave en el proceso tumoral. Por ello, adquiere especial importancia el desarrollo de estrategias con potencial aplicabilidad que favorezcan la actividad supresora tumoral de las variantes TAP73 y/o inhiban la actividad oncogénica de las variantes Δ TAP73. Este trabajo tiene la finalidad de evaluar si el carotenoide β -criptoxantina modula la expresión de estas isoformas en este sentido y su posible aplicación clínica en el tratamiento del cáncer de colon. Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Evaluar si β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las variantes de *TP73* en modelos celulares de cáncer de colon.
2. Analizar si, concentraciones no tóxicas de β -criptoxantina, regulan diferencialmente la expresión de las variantes de *TP73* en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos después de la ingesta del carotenoide.
3. Si β -criptoxantina regula positivamente la expresión de las isoformas supresoras tumorales *TAP73* y/o regula negativamente la expresión de las variantes oncogénicas Δ TAP73, estudiar su posible actividad antitumoral en cáncer colon:
 - 3.1. Evaluar si β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo y/o pro-apoptótico en modelos celulares de cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*.
 - 3.2. Evaluar si β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino, quimioterápico utilizado habitualmente en clínica, en líneas celulares de cáncer de colon y en modelos animales.
 - 3.3. Si β -criptoxantina tiene actividad antitumoral, estudiar la posible toxicidad sistémica inducida por el carotenoide.
 - 3.4. Si β -criptoxantina presenta actividad antitumoral, analizar el papel de las variantes de *TP73* en este contexto.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivos celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. De forma rutinaria se descartó contaminación por *Mycoplasma* utilizando el sistema Mycoplasma Plus™ Primer Set (Stratagen). En la **tabla II** se indican las líneas celulares utilizadas:

Línea celular	Proveedor	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
HCT116 P53+/+	ATCC	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C
HCT116 P53-/-	Prof. Carmen Marín	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C
SW480-ADH	Prof. Alberto Muñoz	Fenotipo adhesivo de cáncer de colon	Humano	RPMI-C
SW1417	ATCC	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C

Tabla II. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos funcionales desarrollados en el estudio.

ATCC: *American Type Cell Culture Collection*. DMEM-C: DMEM-Completo, medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% (V/V) de FCS (suero fetal bovino) (Lonza), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), penicilina (100 U/ml) y estreptomiciina (100 ng/mL) (Lonza) y fungizona (0.25 µg/mL) (Roth). RPMI-C: RPMI-Completo, medio RPMI (Lonza) suplementado con 10% (V/V) de FCS (suero fetal bovino) (Lonza), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 ng/mL) (Lonza) y fungizona (0.25 µg/mL) (Roth).

3.2. Preparación de la solución de β-criptoxantina y tratamiento de las líneas celulares

Se preparó una solución de β-criptoxantina a una concentración de 5 mmol/L disolviendo el carotenoide (Extrasynthese, Lyon, Francia) en tetrahidrofurano (THF) (Sigma) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para el tratamiento de las células en los experimentos *in vitro* se sembraron las células en placas de 6, 24 o 96 pocillos, dependiendo del ensayo. Después de 24 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), el medio celular se reemplazó por el medio de cultivo suplementado con THF (vehículo) o β-criptoxantina a la concentración deseada. La concentración final de THF en el medio de cultivo celular fue siempre menor del 1%. El medio de cultivo celular se cambió cada 24 horas y todos los procedimientos se realizaron en la oscuridad.

3.3. Extracción de β-criptoxantina y análisis por UPLC

Se sembraron las células HCT116 en placas p6 y se trataron como se explica en el epígrafe 3.2. A continuación, se recogieron los medios de cultivo, se tripsinizaron las células, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Se utilizaron 20 µL de la

suspensión celular para contar el número total de células (ADAM, Digital Bio). El resto de la suspensión celular y los medios de cultivo recogidos se utilizaron para la extracción de carotenoides intracelulares y extracelulares, respectivamente. La extracción de carotenoides se llevó a cabo como se describió previamente (Granado-Lorencio et al., 2006), con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 500 μ L de etanol a 500 μ L de muestra (de suspensión celular o de medio de cultivo). Después de agitar vigorosamente durante 45 segundos, se mezclaron con 2 mL de hexano/diclorometano (5:1), se agitó de nuevo la mezcla durante 3 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos. Se recuperó la fase orgánica y se repitió de nuevo este paso. Las dos fases orgánicas recuperadas se mezclaron y se evaporaron en atmósfera de nitrógeno. Finalmente se reconstituyeron con 100 μ L de una solución de tetrahidrofurano: etanol (1:1) y se inyectó 1.0 μ L en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (UPLC, Waters Corporation, Spain). El sistema UPLC consistió en una columna HSS T3 (2.1 x 100 mm; 1.8 μ m) con elución en gradiente y la detección se realizó mediante red de fotodiodos y cuantificación a 450 nm (Granado-Lorencio et al., 2010). La identificación de β -criptoxantina se realizó comparando los tiempos de retención con patrones auténticos y con el espectro de absorción on-line. Los datos fueron recogidos y procesados por el software de cromatografía Empower (Waters). Las muestras del mismo set se analizaron en el mismo día para reducir la variabilidad analítica. La precisión y exactitud a corto y largo plazo se contrastó periódicamente mediante la participación en *Fat-Soluble Quality Assurance Program* dirigido por el *National Institute of Standards and Technology* (NIST; Gaithersburg, MD).

3.4. Estudio de intervención

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Madrid. Todos los sujetos fueron informados y firmaron su consentimiento antes de su inclusión en el estudio.

Se seleccionaron por muestreo no probabilístico 20 voluntarios sanos. Se definieron como criterios de inclusión presentar perfiles bioquímicos y hematológicos y los niveles séricos de vitamina A, E y carotenoides dentro de los rangos de referencia aceptados (Granado-Lorencio et al., 2014). Se consideraron criterios de exclusión aquellos factores que podrían alterar la biodisponibilidad o el estado del compuesto de interés tales como el uso de vitaminas y/o suplementos dietéticos, embarazo, recibir medicación crónica o sufrir enfermedades recurrentes o infecciones.

Los voluntarios ingirieron un zumo enriquecido con 0.75 mg de β -criptoxantina (ensayo clínico número NCT01074723, registrado en ClinicalTrials.gov) diariamente durante un mes.

Aunque no se esperaban efectos secundarios de la intervención, se hizo un seguimiento de los parámetros bioquímicos evaluados en la práctica clínica habitual (perfil lipídico, función hepática y renal e índices hematológicos).

3.4.1. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica

Se recogieron 10 mL de sangre antes y después del estudio de intervención. Se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min (4°C) para separar el suero. El resto de la muestra se utilizó para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) mediante procedimientos estándar basados en la formación de un gradiente de densidad con la solución separadora Ficoll (Lymphoprep™, ATOM, Axis-Shield PoC AS, Noruega) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

3.4.2. Extracción de β -criptoxantina del suero de los sujetos y análisis por UPLC

La extracción de carotenoides y la cuantificación de β -criptoxantina en el suero de los voluntarios antes y después del estudio de intervención se llevó a cabo como se describió en el epígrafe 3.3.

3.5. Extracción de ARN total de tejidos, líneas celulares y linfocitos

La extracción de ARN total de tejidos, líneas celulares y linfocitos se llevó a cabo utilizando el kit de extracción TRIsure (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los tejidos, el primer paso del protocolo fue modificado de la siguiente manera: se homogenizaron 30 mg de cada muestra y se disgregaron mecánicamente siguiendo las instrucciones del equipo MagNA Lyser (Roche Diagnostics) en presencia de 800 μ L de la primera solución de lisis del kit y de 6 μ L de β -mercaptoetanol. Los siguientes pasos se mantuvieron según el protocolo.

La concentración de ARN total extraído se calculó a partir del valor de absorbancia obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE). La pureza de las muestras se valoró mediante el ratio de las absorbancias 260/280 nm, que en todas las muestras osciló entre 1.6 y 2, valores óptimos para muestras diluidas en agua. Cada muestra fue diluida a una concentración de 100 ng/ μ L para continuar con los análisis de expresión génica.

3.6. Análisis de expresión génica

3.6.1. Retrotranscripción (RT)

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

3.6.2. PCR cuantitativa (qPCR)

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

Las diferencias de expresión de los genes analizados entre las muestras problema y sus respectivos controles se calculó según el Ratio Relativo Normalizado = $E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$, donde C_p = número de ciclo, E = eficiencia, T = gen diana, R = gen de referencia, C = control, S = muestra. En los sujetos del estudio de intervención, la expresión de los niveles del gen de estudio se calculó para cada individuo como un ratio entre los valores obtenidos para los niveles del gen en las PBMCs después de la intervención con respecto a los niveles del mismo gen en las PBMCs antes de la intervención. Se utilizó el signo negativo para simbolizar la disminución de los niveles de ARNm del gen problema al finalizar al estudio de intervención.

Para la cuantificación relativa de los genes de estudio se utilizó la media geométrica de tres genes de referencia, *TBP* (proteína de unión a TATA), *SDHA* (subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa) y *UBC* (Ubiquitina C). Las parejas de oligonucleótidos para los genes de referencia y las diferentes isoformas de *TP73* se describieron previamente por nuestro grupo y se muestran en la **Tabla III** (Gemma Domínguez et al., 2006a). Las parejas de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes $\Delta Np73$ y *TAp73* en ratón y el gen de referencia *Sdha* de ratón se especifican igualmente en la **Tabla III**. La especificidad de cada pareja de oligonucleótidos se confirmó por la curva de disociación (curva de melting) de los productos amplificados por PCR.

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

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
<i>TAP73</i>	Directo	5'GCACCACGTTTGAGCACCTCT 3'
	Reverso	5'GCAGATTGAACTGGGCCATGA 3'
Δ EXON2/3P73	Directo	5'GACGCCTGCAGGGAACCAGA 3'
	Reverso	5'TGCCCTCCAGGTGGAAGACG 3'
Δ EXON2P73	Directo	5'GCGACGGCTGCAGGCCAGT 3'
	Reverso	5'TCGGTGTTGGAGGGGATGACA 3'
Δ NP73	Directo	5'CAAACGGCCCGCATGTTCCC 3'
	Reverso	5'TTGAAGTGGGCCGTGGCGAG 3'
<i>TBP</i>	Directo	5'TCTGGGATTGTACCGCAGC 3'
	Reverso	5'CGAAGTGCAATGGTCTTTAGG 3'
<i>SDHA</i>	Directo	5'TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3'
	Reverso	5'CCACCACTGCATCAAATTCATG 3'
<i>UBC</i>	Directo	5'ATTTGGGTCGCGGTTCTTG 3'
	Reverso	5'TGCCTTGACATTCTCGATGGT 3'
<i>Sdha (ratón)</i>	Directo	5'ACCCGGAATTCGAGACGG 3'
	Reverso	5'AGGCACAATCTGATCCTGGC 3'
<i>TAp73 (ratón)</i>	Directo	5'CTTCAATGAAGGACAGTCTGC 3'
	Reverso	5'AATTCTGTTCCACCTGTGGG 3'
Δ Np73 (ratón)	Directo	5'TCGGTGACCCCATGAGACAC 3'
	Reverso	5'GCGTGCTCCGGGGTGTAGG 3'

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la cuantificación a tiempo real.

3.6.3. PCR arrays

Se llevaron a cabo dos RT²-ProfilerTM PCR Arrays para analizar los perfiles de expresión de genes que participan en la cascada de señalización de *TP53* (HAP-029, SABiosciences, CA) y de genes implicados en la respuesta al daño en el ADN (HAP-027, SABiosciences, CA). Cada kit analiza con precisión los niveles de 84 secuencias de genes e incluye 5 genes de referencia y controles de contaminación por ADN genómico, calidad del ARN y de rendimiento de la qPCR. En primer lugar,

se prepararon las muestras: muestra problema (cDNA de células tratadas con β -criptoxantina 10 μ M durante 48 horas) y muestra control (cDNA de células tratadas con vehículo 0.2% V/V durante 48 horas). A continuación, se cargó una alícuota de cada muestra junto con la reacción mezcla que contiene la polimerasa FastStart DNA, buffer de reacción, dNTPs, $MgCl_2$ y SYBR Green I en cada placa de 96 pocillos del PCR array. Seguidamente, se llevó a cabo una PCR cuantitativa de 40 ciclos (LightCycler 480 Real-Time PCR System) y finalmente, se analizaron los resultados con el software suministrado por SABiosciences, que se basa en el método $\Delta\Delta Ct$. De forma simplificada, la ecuación que aplica el programa es $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. En nuestro caso: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\beta\text{-criptoxantina}} - \Delta Ct_{\text{vehículo}}$, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$ siendo Ct el ciclo de amplificación.

3.7. Vectores de expresión

3.7.1. Trasfección transitoria

Los vectores pcDNA3.1 y pcDNA3.1- $\Delta NP73\beta$, este último utilizado para proceder con la expresión ectópica de esta isoforma, fueron cedidos por la Dra. Carmen Marín Vieira (Instituto de biomedicina IBIOMED, Universidad de León, España). Tras llevar las células a una confluencia de 50-80%, éstas se transfectaron con el vector que contenía $\Delta NP73\beta$ y el correspondiente vector vacío (pcDNA3.1) con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.7.2. Trasfección estable

La construcción en el vector *pEGFP-1* para la expresión ectópica de la isoforma $\Delta NP73\beta$ fue cedida por la Dra. Carmen Marín Vieira (Instituto de biomedicina IBIOMED, Universidad de León, España). Las células HCT116 se transfectaron con 60 μ g de ADN *pEGFP-1 $\Delta NP73\beta$* o *pEGFP-1* (vector vacío). Después de 7 días, las células que expresaban *GFP*, y por tanto habían incorporado *pEGFP-1 $\Delta NP73\beta$* o *pEGFP-1* en su genoma, fueron seleccionadas por citometría de flujo (*cell sorting*) (FACS-Aria II SORTER BD Biosciences) y expandidas en DMEM suplementado con 20% de FBS.

3.8. Extracción de proteína total

Para la extracción de proteína total de cultivos celulares, las células se lavaron con PBS y posteriormente se lisaron con la solución T-perp (Thermo Scientific) a la que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Scientific). El lisado resultante se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos para eliminar los componentes no proteicos y se recuperó el sobrenadante, que se conservó para la posterior detección de proteínas por inmunotransferencia.

La concentración de proteína total se cuantificó usando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

3.9. Inmunotransferencia (Western Blot)

Se desnaturalizaron entre 30 y 60 µg de proteína total en buffer 2X SDS a 95°C y se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 6, 10 o 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45µm (BioRad) mediante la aplicación de 100V durante 2 horas o utilizando el sistema iBlot Western Blotting System y los reactivos iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Invitrogen Life Technologies). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución Odyssey Blocking Buffer (Li-COR Biosciences) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS que contenía 0.01% del detergente Tween20, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con IRDye 800 o IRDye700 (Rockland Immunochemicals) diluidos en solución de bloqueo 1:15000. Después de eliminar los restos de anticuerpo secundario con tres lavados de 5 minutos con PBS al 0.01% Tween20, las bandas se visualizaron y cuantificaron por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences).

A continuación se resumen las características de los anticuerpos utilizados:

Antígeno	Clon	Especie	Conjugación	Proveedor
β Actina	Policlonal	Conejo	-	Abcam
P53	Monoclonal	Ratón	-	Abcam
ATM	Monoclonal	Conejo	-	Abcam
ERCC1	Monoclonal	Conejo	-	Abcam
IgG conejo	Policlonal	Burro	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG conejo	Policlonal	Burro	IRDye700	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Policlonal	Conejo	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Policlonal	Conejo	IRDye700	Rockland Immunoc.

Tabla IV. Anticuerpos usados para la inmunodetección y cuantificación por inmunotransferencia de proteínas específicas.

3.10. Ensayos de proliferación

Para la determinación de la proliferación y/o viabilidad celular se utilizaron varias aproximaciones:

3.10.1. Método del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Plumb et al., 1989).

Este método se basa en la reducción del MTT por la deshidrogenasa mitocondrial, dando lugar a formazán, de color morado, cuya cantidad es proporcional al número de células viables. Para llevar a cabo este ensayo se sembraron las células en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), el medio celular se reemplazó por el medio de tratamiento correspondiente: (i) vehículo o (ii) β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 1, 3, 6 y 8 días. Al finalizar los tiempos de tratamiento se añadió la solución de MTT y transcurridas 3 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio, se disolvieron los cristales de formazán y se obtuvo la medida de absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ex; Thermo Scientific).

3.10.2. Contaje celular

Se sembraron y trataron las células como se indica en el epígrafe anterior (3.9.1). Al finalizar los tratamientos, las células se tripsinizaron, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Seguidamente, se utilizaron 20 μ L de la suspensión celular para contar el número de células viables y no viables con un contador celular (ADAM, Digital Bio) al final de cada tratamiento.

3.10.3. Estimación de la tasa de proliferación

Se calculó la tasa de proliferación a partir de la ecuación $N_t = N_0 2^{t/f}$, donde N_t es el número de células en el tiempo t , N_0 es el número inicial de células y $1/f$ es el tiempo de duplicación.

3.10.4. Incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU)

La bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido sintético cuya analogía con la timidina permite una sustitución casi total (entre el 99.8 y el 100%) de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis. Para cuantificar la incorporación de BrdU, se sembraron las células en placas de 24 pocillos. Después de 24 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), el medio celular se reemplazó por el medio de tratamiento correspondiente: (i) vehículo + BrdU 10 μ M o (ii) β -criptoxantina 10 μ M + BrdU 10 μ M durante 8

días. Finalmente, la incorporación de BrDU se cuantificó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU conjugado con FITC (BD Pharmigen).

3.11. Ensayos de apoptosis

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), el medio celular se reemplazó por el medio de tratamiento correspondiente: (i) vehículo o (ii) β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 24 horas o 6 días. Después de estos tiempos de pre-tratamiento con vehículo o β -criptoxantina (10 μ M), se continuó el tratamiento con vehículo, β -criptoxantina (10 μ M), oxaliplatino o con la combinación de oxaliplatino y β -criptoxantina (10 μ M) durante 36 horas más. Una vez finalizados los tratamientos, se recogieron tanto las células en suspensión como las células adheridas para cuantificar el porcentaje de células apoptóticas en cada caso. Para ello, las células se tiñeron con Anexina V conjugada con FITC (BD Pharmigen) y yoduro de propidio (Sigma). Después del marcaje, los datos fueron adquiridos en el citómetro EPICS XL (Beckman Coulter) y analizados en el programa FCS Express. Para elegir la concentración de oxaliplatino empleada en cada caso, se trataron las células con concentraciones crecientes de esta droga (0, 10, 25, 50, 100, 150 μ M) y tras evaluar la tasa de apoptosis, se eligió la dosis que indujo el 45 \pm 15% de apoptosis en cada tipo celular (dosis cercana al LC50, concentración de droga que induce el 50% de muerte celular).

3.12. Ensayos de viabilidad

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), se trataron siguiendo la pauta indicada para los estudios de apoptosis (3.11). Al finalizar los tiempos de tratamiento se añadió la solución de MTT y transcurridas 3 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio, se disolvieron los cristales de formazán y se obtuvo la medida de absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ex; Thermo Scientific).

3.13. Cálculo del índice de combinación

La medida cuantitativa del grado de interacción entre β -criptoxantina y oxaliplatino en términos de efecto aditivo, sinérgico o antagonista se evaluó por el índice de combinación (CI) obtenido utilizando el software Calcsyn (Biosof) basado en el método de Chou-Talalay (Chou y Talalay, 1984). Brevemente, se trataron las células con 4 concentraciones crecientes de β -criptoxantina, 5 concentraciones crecientes de oxaliplatino y diferentes regímenes combinados. Se evaluó la viabilidad en cada caso mediante el ensayo MTT y con esos datos se determinaron los

valores de CI en el programa Calculusyn (Biosof). El rango de CI y la descripción del efecto se describen en la **tabla V**.

Rango de CI	Símbolo	Descripción
<0.1	+++++	Sinergismo muy fuerte
0.1-0.3	++++	Sinergismo fuerte
0.3-0.7	+++	Sinergismo
0.7-0.85	++	Sinergismo moderado
0.85-0.90	+	Sinergismo leve
0.90-1.10	±	Efecto casi aditivo
>1.10	-	Antagonismo

Tabla V. Rango de CI, símbolo y descripción del efecto de acuerdo al programa Calculusyn (Biosoft), basado en el método Chou Talalay (Chou TC et al., 1984).

3.14. Animales de experimentación y xenotrasplantes tumorales

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

3.14.1. Puesta a punto de la pauta de tratamiento. Estudio piloto

Se llevó a cabo un estudio piloto para determinar las dosis de oxaliplatino y β -criptoxantina, así como la vía de administración del carotenoide. Se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116 resuspendidas en 20% de matrigel (10.6 mg/mL, Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) en el flanco de ratones atímicos (ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu, hembras, edad de 6 semanas, Harlan Laboratories). El volumen tumoral se determinó mediante los valores de diámetro obtenidos con un calibre y aplicados a la siguiente fórmula: ancho² x largo x 0.52. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 75-150 mm³, se asignaron arbitrariamente en grupos (5 ratones/grupo), que se organizaron de la siguiente manera:

- A. 1. CONTROL: vehículo vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg
- A. 2. TRATAMIENTO I: β -criptoxantina 10 μ M vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg
- A. 3. TRATAMIENTO II: β -criptoxantina 20 μ M vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg

- B. 1. CONTROL:** vehículo vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg
- B. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg
- B. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg
- C. 1. CONTROL:** vehículo vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- C. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- C. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- D. 1. CONTROL:** vehículo vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- D. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- D. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg

El vehículo y la β -criptoxantina se administraron diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm³ hasta el final del tratamiento. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 250-300 mm³ se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino durante 5 días, seguido de 5 días de descanso, pauta que se repitió durante dos ciclos (Ta et al., 2009).

3.14.2. Evaluación del crecimiento tumoral en respuesta a β -criptoxantina y al tratamiento combinado *in vivo*

Tras elegir la pauta de tratamiento **A** indicada en el apartado anterior, se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116 resuspendidas en 20% de matrigel (10.6 mg/mL, Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) en el flanco de ratones atímicos (ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu, hembras, edad de 6 semanas, Harlan Laboratories). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 75-150 mm³, se asignaron arbitrariamente en cuatro grupos de tratamiento (7 ratones/grupo): (i) vehículo, (ii) β -criptoxantina 10 μ M, (iii) vehículo + oxaliplatino 3 mg/Kg y (iv) β -criptoxantina 10 μ M + oxaliplatino 3 mg/Kg. El vehículo y la β -criptoxantina se administraron vía oral diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm³ hasta el final del tratamiento. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 250-300 mm³, se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino (3 mg/Kg) durante 5 días, seguido de 5 días de descanso y repitiéndose este ciclo dos veces.

Al término de los tratamientos o cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1500 mm³, se anestesiaron vía inhalatoria con isofluorano y se obtuvo una muestra de sangre periférica por punción intracardiaca, para la posterior separación del suero y aislamiento de las PBMCs por el mismo procedimiento que el indicado en **3.4.1**. Posteriormente, los ratones se sacrificaron y sus tumores se diseccionaron y procesaron para los análisis correspondientes.

3.14.3. Inmunohistoquímica

Se realizaron secciones de 2 a 4 μm de grosor del tejido de estudio (embebido previamente en parafina) para ser procesadas según los protocolos estándar antes de ser incubadas con el anticuerpo primario Ki67 (DAKO) durante toda la noche. La inmuno-detección se realizó con la técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa (LSA; DAKO) usando el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Todas la inmunotinciones se realizaron usando el dispositivo de inmunotinción automático TechMate 500 (DAKO).

La cuantificación de la expresión de Ki67 se llevó a cabo por dos observadores independientes mediante el conteo de células positivas a través de un microscopio óptico. El porcentaje de células positivas se determinó por cada 1000 células, contadas en 5 campos de 200 células cada uno. Los casos que no exhibían tinción fueron considerados negativos.

3.14.4. Estudio de toxicidad

Para evaluar la posible toxicidad sistémica de los tratamientos empleados, se controló el peso de los ratones y se midieron en un autoanalizador ADVIA 2400 (Siemens Healthcare Diagnostics) los siguientes parámetros bioquímicos clínicos: alanina transaminase (ALT), gamma glutamil transferase (GGT), colesterol, creatinina, bilirrubina sérica, y albúmina.

3.15. Ensayo Cometa (Electroforesis alcalina de células individuales)

Esta técnica fue desarrollada originariamente para medir la presencia de roturas de hebra simple en el ADN. Con esta aproximación, el ADN genómico que no presente roturas exhibirá una movilidad electroforética determinada (*cabeza del cometa*), que será siempre menor que la movilidad de los pequeños fragmentos de material genético producto de rotura (*cola del cometa*). Así, a mayor daño en forma de roturas de hebra sencilla menor será el tamaño de la *cabeza del cometa*, aumentando en paralelo la intensidad y/o longitud de la cola (**Figura 6**).

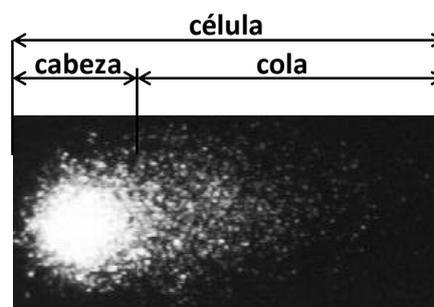


Figura 6. Imagen de una célula individual obtenida después del ensayo Cometa. Se distinguen la cabeza y la cola.

Sin embargo, para la cuantificación de aductos es necesario tener en cuenta que esta forma de daño en el ADN impide la desnaturalización de la doble hebra y se requiere la incorporación de un paso en el protocolo que induce roturas de ADN de hebra sencilla al azar (usando una dosis definida de radiación γ , 3 Gy para las células HCT116 y 1Gy para las PBMCs (acelerador Varian). De esta manera, las roturas al azar en el ADN libre de aductos generan fragmentos de ADN, mientras que la presencia de aductos impide la desnaturalización completa de la doble hebra de ADN resultando en la disminución del número de fragmentos libres. Por lo tanto, en este caso, a medida que el número de aductos aumenta, la cantidad de fragmentos de ADN de hebra sencilla capaces de migrar en la electroforesis disminuye. Se siguió el protocolo de (Singh et al., 1988) con algunas modificaciones menores. Para la realización del ensayo se utilizaron portaobjetos (Fisher Scientific, PC) previamente cubiertos con agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 1% disuelta en PBS, pH 7.4. A continuación, se prepararon alícuotas de 5 μ L con aproximadamente 20.000 células HCT116 o 40.000 PBMCs que se mezclaron con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5% en PBS. Esta mezcla celular se depositó sobre los portaobjetos que se cubrieron inmediatamente con un cubreobjetos. Una vez solidificada, se añadió una tercera capa de agarosa LMA al 0,5%. A continuación, las preparaciones fueron irradiadas como se ha indicado anteriormente e inmediatamente, se sumergieron en tampón de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, DMSO 10%, 1% Tritón X-100, pH 10) durante 1 hora a 4°C. Después de la lisis, las preparaciones se lavaron con buffer de neutralización (0.4 mM de Tris-HCl, pH 7.4) y seguidamente se dispusieron en la cubeta de electroforesis 30 minutos a 25 V y 300 Ma. Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos fueron lavados de nuevo con buffer de neutralización y finalmente fijados en etanol. Previo a su análisis, se tiñeron con 50 μ L de bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/mL. La visualización se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus España, S.A.), conectado a la cámara CCD CoHu 40912 (CoHu, Inc. San Diego, CA). La imagen de cada célula se capturó empleando el programa Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd., Nottingham, UK). Para la cuantificación del daño se utilizaron dos parámetros: (1) Momento de la cola (TM), producto del porcentaje de ADN en la cola (respecto al ADN total) y la longitud de la cola, e (2) Intensidad de la cola (TI), porcentaje de ADN en la cola. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar de los TMs y TIs de 100 células HCT116 por tratamiento o de 100 PBMCs de 3 ratones por cada grupo.

3.16. Análisis estadístico

Los ensayos realizados con cultivos celulares se han representado como la media \pm desviación típica de al menos tres experimentos independientes. Los ensayos realizados en animales se han representado como la media \pm desviación típica de al menos 5 ratones. Se utilizó

el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre grupos independientes en los estudios *in vitro* e *in vivo*. Para el análisis de los datos pareados del estudio de intervención se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon. En todos los análisis estadísticos se han considerado significativos (*P*) los valores inferiores a 0,05 en contrastes de dos colas; todos ellos se han llevado a cabo con el programa SPSS versión 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)

4. Resultados

4.1. β -criptoxantina se incorpora en las células de cáncer de colon después del tratamiento

Con el fin de testar si β -criptoxantina se incorpora en las células HCT116 tratadas, se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) el contenido intracelular del carotenoide en condiciones basales (antes del tratamiento) y después del tratamiento. Los resultados mostraron que la absorción neta de β -criptoxantina fue de 35.44 ± 0.256 y 118.903 ± 0.362 ng de β -criptoxantina/ 10^6 células, 24 y 48 horas después del tratamiento, respectivamente.

4.2. β -criptoxantina regula la expresión de genes de la familia de *TP53*

Para evaluar los cambios de expresión génica en las células de cáncer de colon después del tratamiento con β -criptoxantina, se llevaron a cabo dos RT²-Profiler™ PCR Arrays en la línea celular HCT116 después de 48 horas de exposición al carotenoide. El primero de los PCR array contiene genes que participan en la cascada de señalización de *TP53*, incluyendo genes implicados en procesos de apoptosis, ciclo celular, proliferación y diferenciación. Además, y teniendo en cuenta que β -criptoxantina tiene propiedades antioxidantes, se eligió un segundo PCR array para el estudio de genes implicados en la respuesta al daño en el ADN. En las **Tablas VI y VII** se presentan los cinco genes que presentaron una desregulación más marcada en cada PCR array. Ambos PCR arrays mostraron sobre-expresión de *TP53* y de *TP73*. Nosotros nos hemos centrado en el menos conocido, *TP73*.

Gen	Descripción	Niveles relativos de ARNm β -criptoxantina: vehículo
<i>ATM</i>	Del inglés: <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	10.5
<i>TP53</i>	Del inglés: <i>Tumor protein p53</i>	6.1
<i>APAF-1</i>	Del inglés: <i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	5.4
<i>TP73</i>	Del inglés: <i>Tumor protein p73</i>	3.1
<i>PTTG1</i>	Del inglés: <i>Pituitary tumor-transforming 1</i>	-3.2

Tabla VI. Genes con una desregulación más significativa en el PCR array de la vía de señalización de *TP53* en las células HCT116 después del tratamiento con β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 48 horas. Los niveles relativos de ARNm de las células tratadas con β -criptoxantina respecto a las células control (tratadas con vehículo) fueron calculados con el software suministrado por SABiosciences que, de forma simplificada, se basa en la ecuación $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. En este caso: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\beta\text{-criptoxantina}} - \Delta Ct_{\text{vehículo}}$, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$ siendo *Ct* el ciclo de amplificación. El signo negativo simboliza la disminución de los niveles de ARNm del gen en estudio.

Gen	Descripción	Niveles relativos de ARNm β -criptoxantina: vehículo
TP73	Del inglés: <i>Tumor protein p73</i>	9.8
TP53	Del inglés: <i>Tumor protein p53</i>	4.7
SMC1A	Del inglés: <i>Structural maintenance of chromosomes 1A</i>	3.5
CHEK1	Del inglés: <i>CHK1 checkpoint homolog (S.Pombe)</i>	3.4
CCNH	Del inglés: <i>Cyclin H</i>	-14.4

Tabla VII. Genes con una desregulación más significativa en el PCR array de la vía de señalización de respuesta a daño en el ADN en las células HCT116 después del tratamiento con β -criptoxantina a 10 μ M durante 48 horas. Los niveles relativos de ARNm de las células tratadas con β -criptoxantina respecto a las células control (tratadas con vehículo) fueron calculados con el software suministrado por SABiosciences que, de forma simplificada, se basa en la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En este caso: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\beta\text{-criptoxantina}} - \Delta Ct_{\text{vehículo}}$, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$ siendo Ct el ciclo de amplificación. El signo negativo simboliza la disminución de los niveles de ARNm del gen en estudio.

4.3. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de TP73 en células de cáncer de colon

Para evaluar si β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las distintas variantes de TP73 *in vitro*, se trataron las células de cáncer de colon HCT116, SW480-ADH y SW1417 con vehículo o β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 24 y 48 horas y se cuantificaron los niveles de ARNm de las variantes TAP73, $\Delta NP73$, $\Delta EXON2P73$ y $\Delta EXON2/3P73$.

En las células HCT116 el tratamiento con β -criptoxantina incrementó los niveles de TAP73 2.2 y 4.6 veces, a las 24 y 48 horas de tratamiento, respectivamente. A esos mismos tiempos, los niveles de $\Delta NP73$ se redujeron 3.4 y 2.7 veces. Además, se evaluó el efecto de β -criptoxantina sobre las variantes $\Delta EXON2/3P73$ y $\Delta EXON2P73$. Así, los niveles de $\Delta EXON2/3P73$ se redujeron 1.8 y 2.0 veces después de 24 y 48 de tratamiento, mientras que los niveles de $\Delta EXON2P73$ se incrementaron 2.7 y 3.6 veces (**Figura 7A**).

En las células SW480-ADH, el tratamiento con β -criptoxantina aumentó los niveles de TAP73 1.8 y 16.9 veces, 24 y 48 horas post-tratamiento, respectivamente. Por otro lado, los niveles de $\Delta NP73$ se redujeron 1.8 veces a las 48 horas de tratamiento. Además, los niveles de $\Delta EXON2/3P73$ y de $\Delta EXON2P73$ también disminuyeron significativamente a varios tiempos de tratamiento (**Figura 7B**).

En la tercera línea celular de cáncer de colon evaluada, la línea celular SW1417, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *TAP73* después del tratamiento con el carotenoide. Sin embargo, todas las variantes de *TP73* con el dominio N-terminal truncado ($\Delta NP73$, $\Delta EXON2/3P73$ $\Delta EXON2P73$) fueron reguladas negativamente a diferentes tiempos de tratamiento (**Figura 7C**).

4.4. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de *TP73* después de un estudio de intervención en sujetos sanos

Con el fin de evaluar si β -criptoxantina regula la expresión de *TP73* *in vivo*, se llevó a cabo un estudio de intervención en 20 voluntarios sanos que ingirieron zumo enriquecido con 0.75 mg de β -criptoxantina diariamente durante un mes. Se midieron por UPLC los niveles séricos de β -criptoxantina antes y después del estudio de intervención y se obtuvo que los niveles netos de este carotenoide en suero oscilaban entre 11,6 y 75 mg β -criptoxantina/dL. Además, se cuantificaron los niveles de ARNm de las variantes *TAP73* y $\Delta NP73$ en los linfocitos de estos sujetos antes y después de la ingesta del zumo enriquecido y los resultados mostraron una modificación de la expresión de las isoformas de *TP73* en el 65% de los individuos. Concretamente, un 25% de los casos presentó niveles más altos de *TAP73* después de la ingesta de β -criptoxantina, un 10% mostró una disminución de los niveles de $\Delta NP73$, un 20% presentó ambos efectos, en un 5% se observó una bajada en los niveles de ambas variantes, en un 5% una subida de los niveles de $\Delta NP73$ y en un 5% una bajada de los niveles de *TAP73*. Aunque la regulación positiva de *TAP73* después de la ingesta de zumo enriquecido con β -criptoxantina no fue estadísticamente significativa, sí lo fue la regulación negativa de la variante oncogénica $\Delta NP73$ ($P = 0,04$). (**Figura 8**).

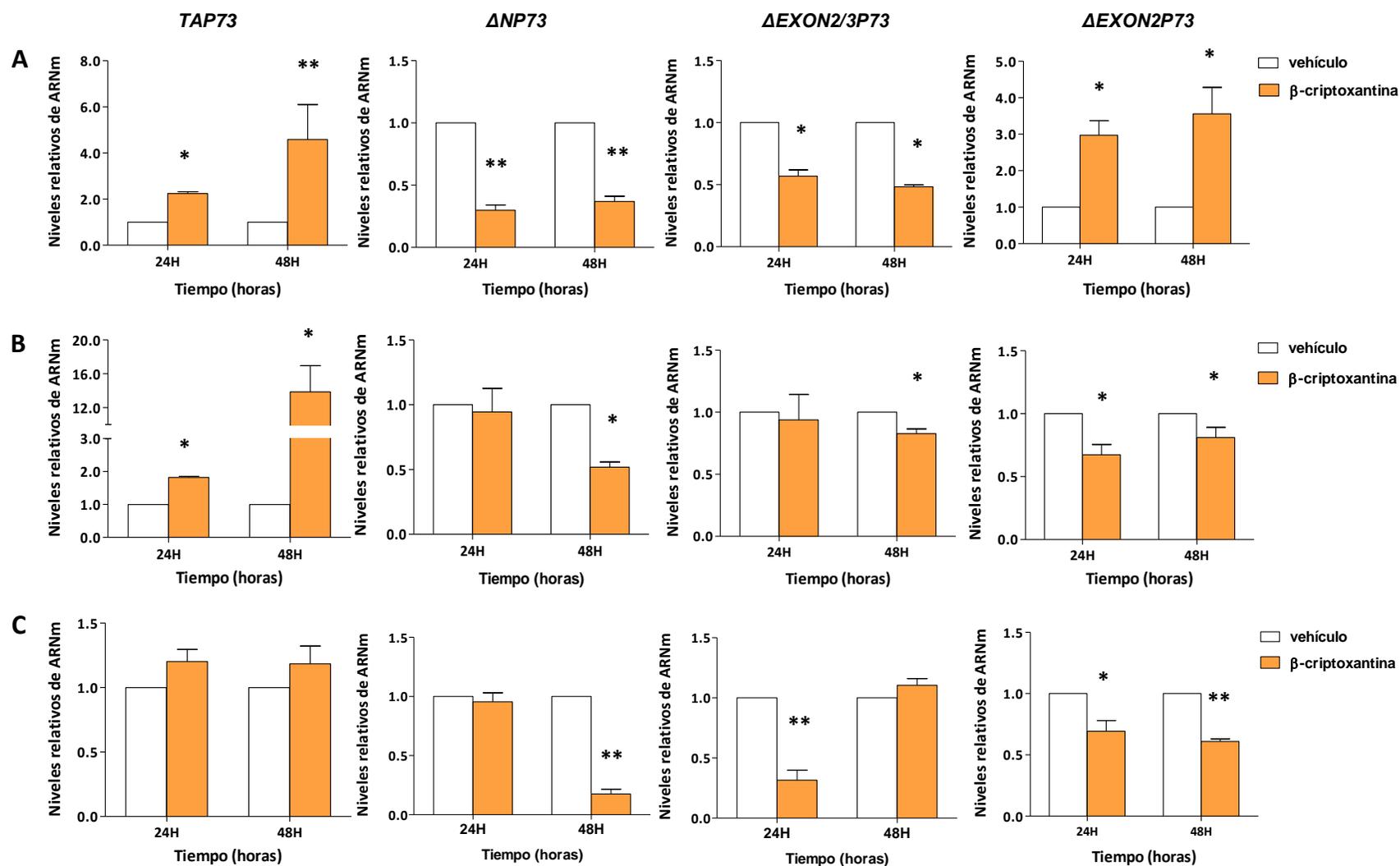


Figura 7. β-criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de TP73 en células de cáncer de colon. Cuantificación de los niveles de ARNm de *TAP73*, *ΔNP73*, *ΔEXON2/3P73* y *ΔEXON2P73* después de 24 y 48 horas de tratamiento con vehículo o β-criptoxantina a una concentración de 10 μM en las líneas celulares de cáncer de colon **(A)** HCT116, **(B)** SW480-ADH y **(C)** SW1417. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

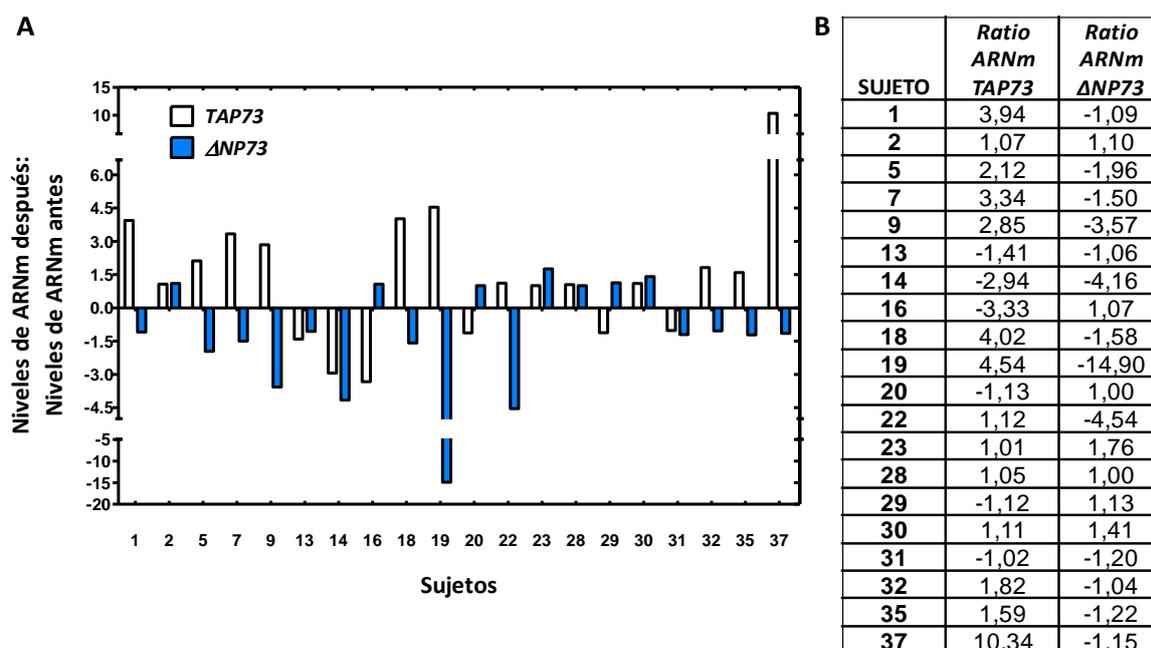


Figura 8. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de *TP73* después de un estudio de intervención en sujetos sanos. (A) Representación, y (B) Cuantificación de la variación de los niveles de ARNm de las isoformas *TAP73* y Δ *NP73* después de la ingesta diaria de zumo enriquecido con 0.75 mg de β -criptoxantina, respecto a los niveles de ARNm de estas isoformas antes de la intervención. Se representa para cada individuo el ratio entre los valores obtenidos para los niveles de ARNm de *TAP73* o Δ *NP73* en los linfocitos después de la intervención con respecto a los niveles de ARNm del mismo gen en los linfocitos antes de la intervención. El signo negativo simboliza la disminución de los niveles de ARNm de la isoforma de estudio.

4.5. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon

Para evaluar si β -criptoxantina presenta efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon, llevamos a cabo el tratamiento de las células HCT116 con vehículo o β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M durante 1, 3, 6 y 8 días. El ensayo de proliferación MTT reveló que β -criptoxantina redujo el porcentaje de células viables después de 6 y 8 días de tratamiento ($P=0.04$, $P=0.02$, respectivamente) (Figura 9A). Se obtuvieron resultados similares cuantificando el número de células viables a los diferentes tiempos de tratamiento especificados (Figura 9B). De acuerdo con estos resultados, la estimación del tiempo de duplicación en las células control fue de 1.34 días, mientras que las células tratadas con β -criptoxantina incrementaron su tiempo de duplicación a 1.47 días ($P=0.002$) (Figura 9C). Además, la incorporación de BrdU en las células tratadas con el carotenoide fue menor que en las células control a los 8 días de tratamiento ($P=0.02$) (Figura 9D).

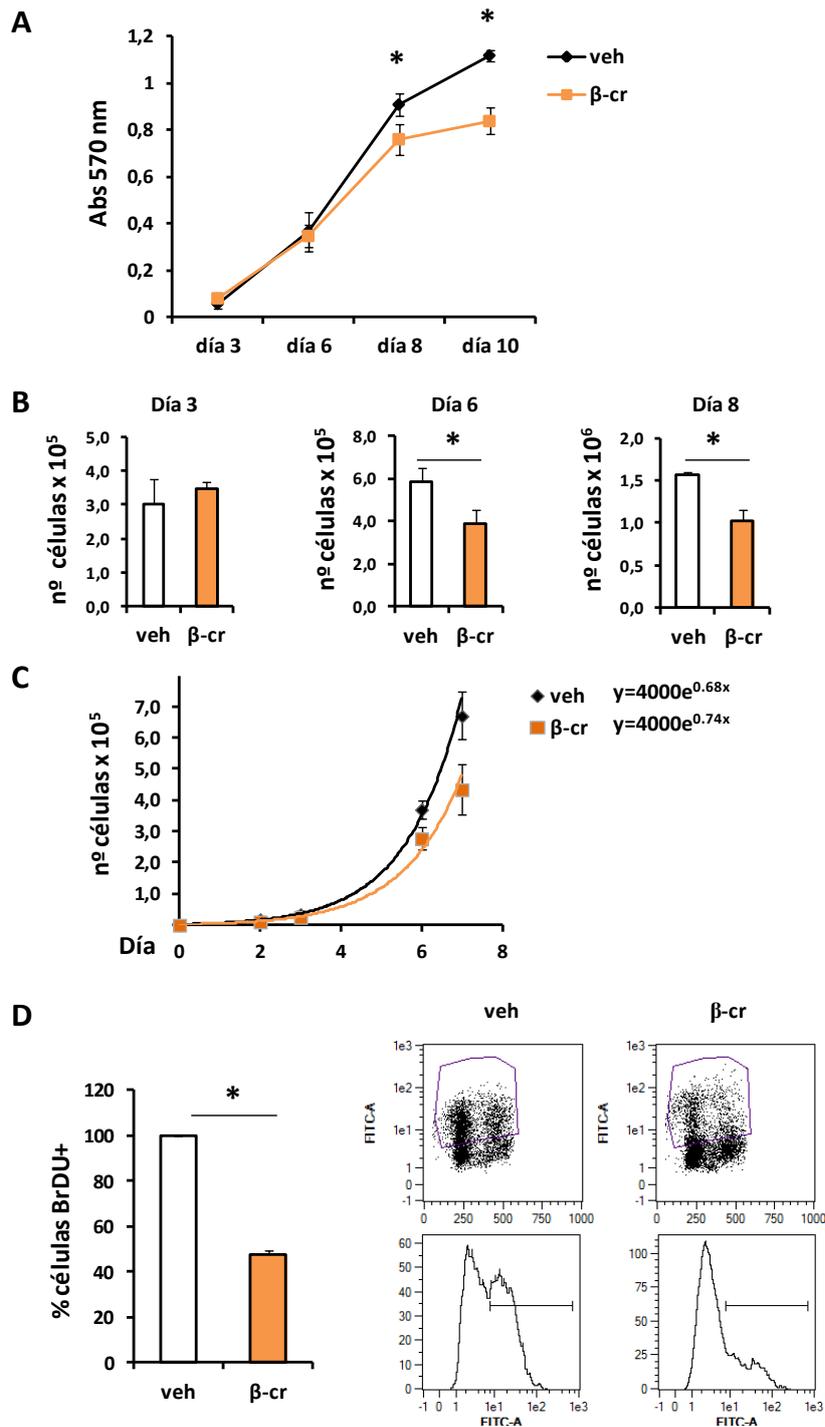


Figura 9. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon a los 6 y 8 días de tratamiento. (A) Cuantificación del porcentaje de células viables mediante el ensayo MTT, y (B) contaje celular a los 3, 6 y 8 días de tratamiento con vehículo o β -criptoxantina a 10 μ M. (C) Estimación de la tasa de proliferación en las células tratadas con β -criptoxantina a 10 μ M y en las células control. (D) Cuantificación del porcentaje de células que incorporan BrDU (izquierda) y representación gráfica (derecha) después de 8 días de tratamiento con vehículo o β -criptoxantina a 10 μ M. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. * P <0.05. veh: vehículo al 0.02% V/V; β -cr: β -criptoxantina 10 μ M.

Sin embargo, bajo estas mismas condiciones β -criptoxantina no indujo apoptosis celular a ninguno de los tiempos (Figura 10).

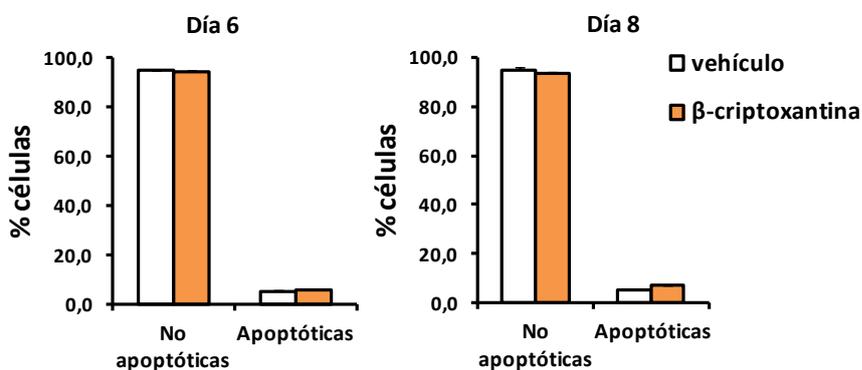


Figura 10. Evaluación del porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo (marcaje con Anexina V-FITC y yoduro de propidio) después de 6 y 8 días de tratamiento. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes.

Además, los niveles de $\Delta NP73$ se redujeron a estos tiempos de tratamiento (Figura 11A), pero no se observaron diferencias en los niveles de $TAP73$ (Figura 11B).

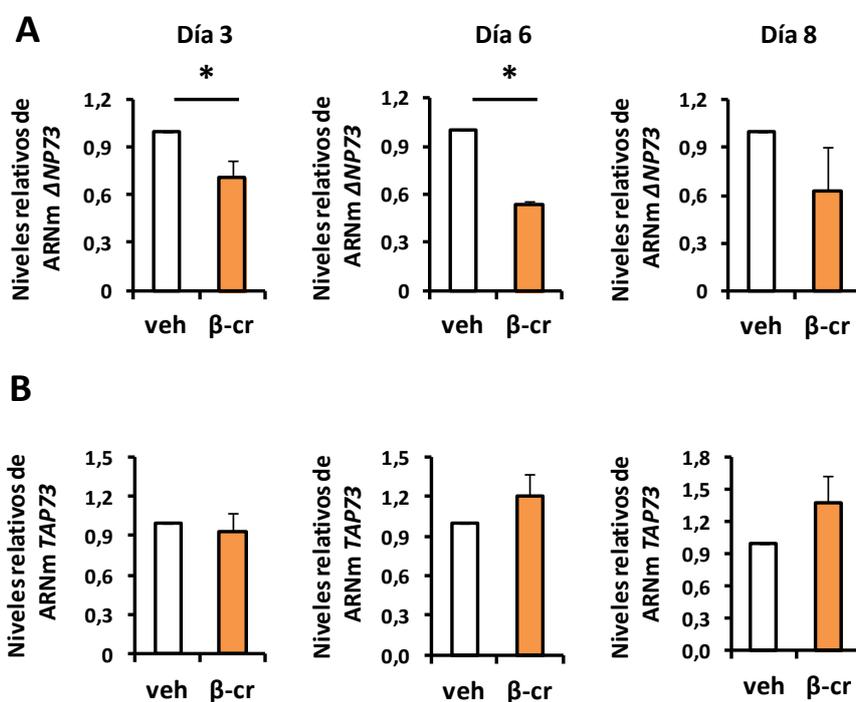


Figura 11. (A) Cuantificación de los niveles de ARNm de $\Delta NP73$ después de 3, 6 y 8 días de tratamiento, y (B) Cuantificación de los niveles de ARNm de $TAP73$ después de 3, 6 y 8 días de tratamiento. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes * $P < 0.05$; veh: vehículo al 0.02% V/V ; β -cr: β -criptoxantina 10 μ M.

4.6. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$

Con el fin de evaluar si β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$, se transfectaron de manera estable las células HCT116 con una construcción de $\Delta NP73\beta$ o con el vector vacío pEGFP-1 (células control). En primer lugar, se comprobó que la sobreexpresión de $\Delta NP73\beta$ no comprometía la viabilidad celular (95-98% en ambos casos), cuantificando el porcentaje de células viables y no viables con un contador celular automático (ADAM, Digital Bio). A continuación, las células se trataron con vehículo o con 10 μM de β -criptoxantina durante 6 y 8 días y se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. A día 6, la viabilidad de las células control tratadas con β -criptoxantina se redujo un 30% respecto a las mismas células tratadas con el vehículo ($P=0.002$). Sin embargo, en las células que sobreexpresan $\Delta NP73\beta$, la viabilidad celular tras el tratamiento con β -criptoxantina sólo se redujo un 14% a los 6 días de tratamiento respecto a las células tratadas con vehículo ($P=0.01$). Así a día 6, la viabilidad celular se redujo un 16% más en las células transfectadas con el vector vacío tratadas con β -criptoxantina que en las células que sobreexpresan $\Delta NP73\beta$ ($P=0.003$) (Figura 12A). A día 8 los resultados fueron más llamativos, las células control tratadas con β -criptoxantina redujeron su viabilidad en un 16% ($P=0.01$) mientras que en las células HCT116 que sobreexpresan $\Delta NP73\beta$ el carotenoide no tuvo efecto sobre la viabilidad celular (Figura 12B).

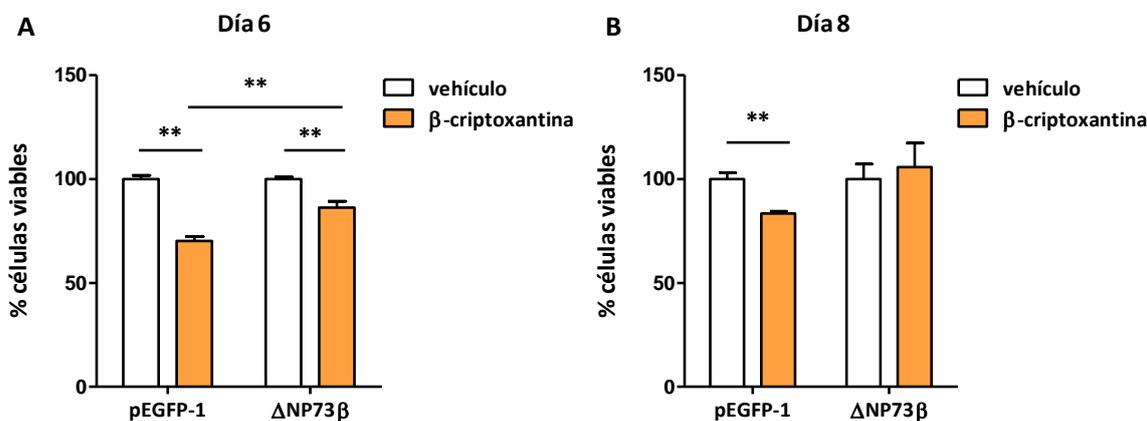


Figura 12. β -criptoxantina reduce la proliferación celular de las células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$. Ensayo de proliferación MTT en células HCT116 control (transfectadas con el vector vacío pEGFP-1) y en células que sobreexpresan $\Delta NP73\beta$ (transfectadas con un vector pEGFP-1 que contiene $\Delta NP73\beta$) después de (A) 6 días y (B) 8 días de tratamiento con vehículo (barra blanca) o β -criptoxantina a una concentración de 10 μM (barra naranja). Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

4.7. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon

La concentración de oxaliplatino utilizada se determinó en base a la curva dosis respuesta de cada línea celular al tratamiento con este agente durante 36 horas (**Figura 13**), eligiendo en cada caso la concentración de oxaliplatino que indujo un $45 \pm 15\%$ de muerte celular (concentración cercana al LC50, dosis que induce el 50% de muerte celular).

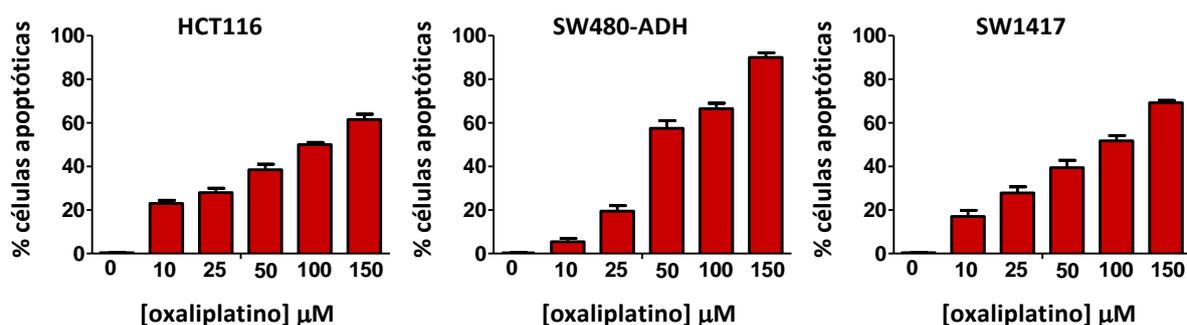


Figura 13. Dosis respuesta de las líneas celulares de cáncer de colon HCT116, SW480-ADH y SW1417 al tratamiento con oxaliplatino. Representación del porcentaje de células apoptóticas después del tratamiento con concentraciones crecientes de oxaliplatino (0, 10, 25, 50, 100 y 150 μM) durante 36 horas. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

4.7.1. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon a tiempos cortos de pretratamiento con el carotenoide

Para evaluar si la disminución de ΔNP73 por β -criptoxantina en células de cáncer de colon se traduce en una mayor sensibilidad a oxaliplatino, se llevaron a cabo ensayos de apoptosis por citometría de flujo (marcaje con AnexinaV-FITC y yoduro de propidio) y de viabilidad celular (MTT) después del tratamiento con la siguiente pauta: se pretrataron las células con vehículo o con β -criptoxantina a una concentración de 10 μM durante 24 horas y a continuación se trataron con vehículo, β -criptoxantina a 10 μM , oxaliplatino, o con la combinación de oxaliplatino y β -criptoxantina durante 36 horas.

El tratamiento de la línea celular HCT116 con oxaliplatino a una concentración de 100 μM indujo un 61,0% de apoptosis comparado con las células tratadas con vehículo. La combinación de esta concentración de oxaliplatino con β -criptoxantina a 10 μM resultó en un incremento de la inducción de apoptosis de un 11.5% ($P=0.05$) (**Figura 14A**). Paralelamente se evaluó la viabilidad celular obteniéndose resultados equivalentes ($P=0.02$) (**Figura 14B**).

Se obtuvieron resultados similares en las otras dos líneas celulares de cáncer de colon en estudio. En las células SW480-ADH el tratamiento con oxaliplatino a una concentración de 50 μM indujo un 30.3% de apoptosis en comparación con las células tratadas con vehículo. La combinación de esta concentración de oxaliplatino con 10 μM de β -criptoxantina incrementó el efecto del oxaliplatino en un 24.6% ($P=0.03$) (**Figura 14A**). En un ensayo en paralelo, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular y se obtuvo que el tratamiento combinado disminuyó la viabilidad un 15% más que el tratamiento con oxaliplatino administrado de forma aislada ($P=0.03$) (**Figura 14B**).

Por otro lado, el tratamiento con oxaliplatino a una concentración de 100 μM en las células SW1417 resultó en un 27.8% de apoptosis en comparación con las células tratadas con vehículo. El tratamiento combinado de oxaliplatino a 100 μM con β -criptoxantina a una concentración de 10 μM incrementó el porcentaje de apoptosis inducida en un 13.8% ($P=0.05$) (**Figura 14A**). Además, en el ensayo de viabilidad el tratamiento combinado potenció la actividad de oxaliplatino en un 21.1% ($P=0.03$) (**Figura 14B**).

4.7.2. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon a tiempos largos de pretratamiento con el carotenoide

Además, para evaluar si tiempos más largos de pre-tratamiento con β -criptoxantina se traducen en una mayor sensibilidad a oxaliplatino en el tratamiento combinado, se llevaron a cabo ensayos de apoptosis y viabilidad en las células HCT116 después del tratamiento con la siguiente pauta: Las células se pre-trataron con vehículo o β -criptoxantina a una concentración de 10 μM durante 6 días y a continuación se trataron con vehículo, 10 μM de β -criptoxantina, oxaliplatino a 50 μM o con la combinación de oxaliplatino y β -criptoxantina durante 36 horas. El ensayo de apoptosis reveló que el tratamiento combinado incrementó en un 11.1% ($P=0.03$) el efecto antitumoral del oxaliplatino (**Figura 15A**). Además, en el ensayo de viabilidad celular, el tratamiento combinado redujo la viabilidad celular un 35.1% más ($P=0.02$) que el oxaliplatino administrado de forma aislada (**Figura 15B**).

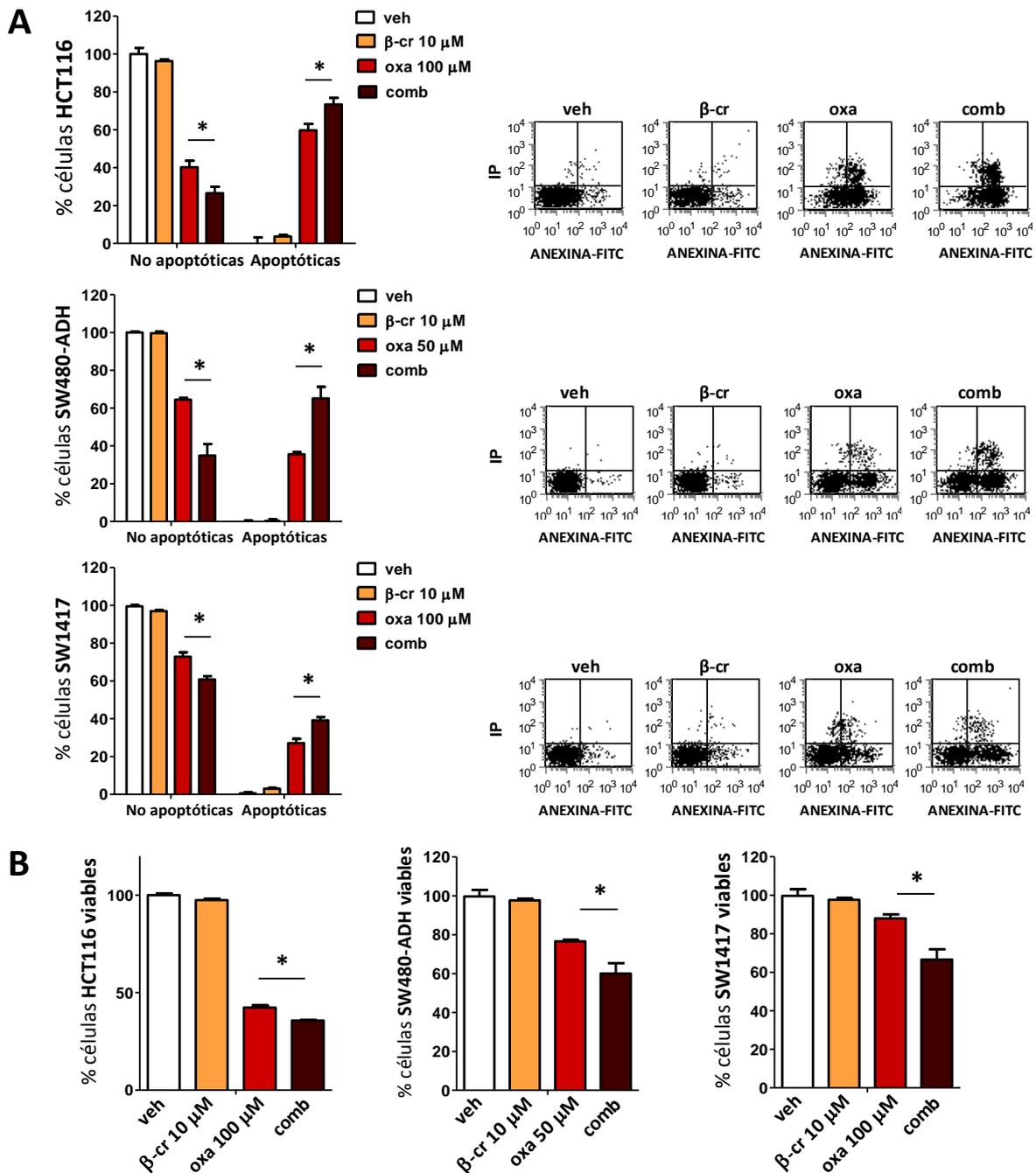


Figura 14. β -criptoxantina potencia el efecto del oxaliplatino en células de cáncer de colon. (A) Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo (marcaje con Anexina V-FITC y yoduro de propidio) en las células de cáncer de colon HCT116, SW480-ADH y SW1417 después de la siguiente pauta de tratamiento: pretratamiento con vehículo o β -criptoxantina a 10 μ M durante 24 horas y a continuación, tratamiento con vehículo, β -criptoxantina, oxaliplatino o con el tratamiento combinado de oxaliplatino y β -criptoxantina durante 36 horas (izquierda), e imágenes representativas (derecha). Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes * P <0.05. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células viables mediante el ensayo MTT después de la pauta de tratamiento indicada en **(A)**. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes * P <0.05. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino).

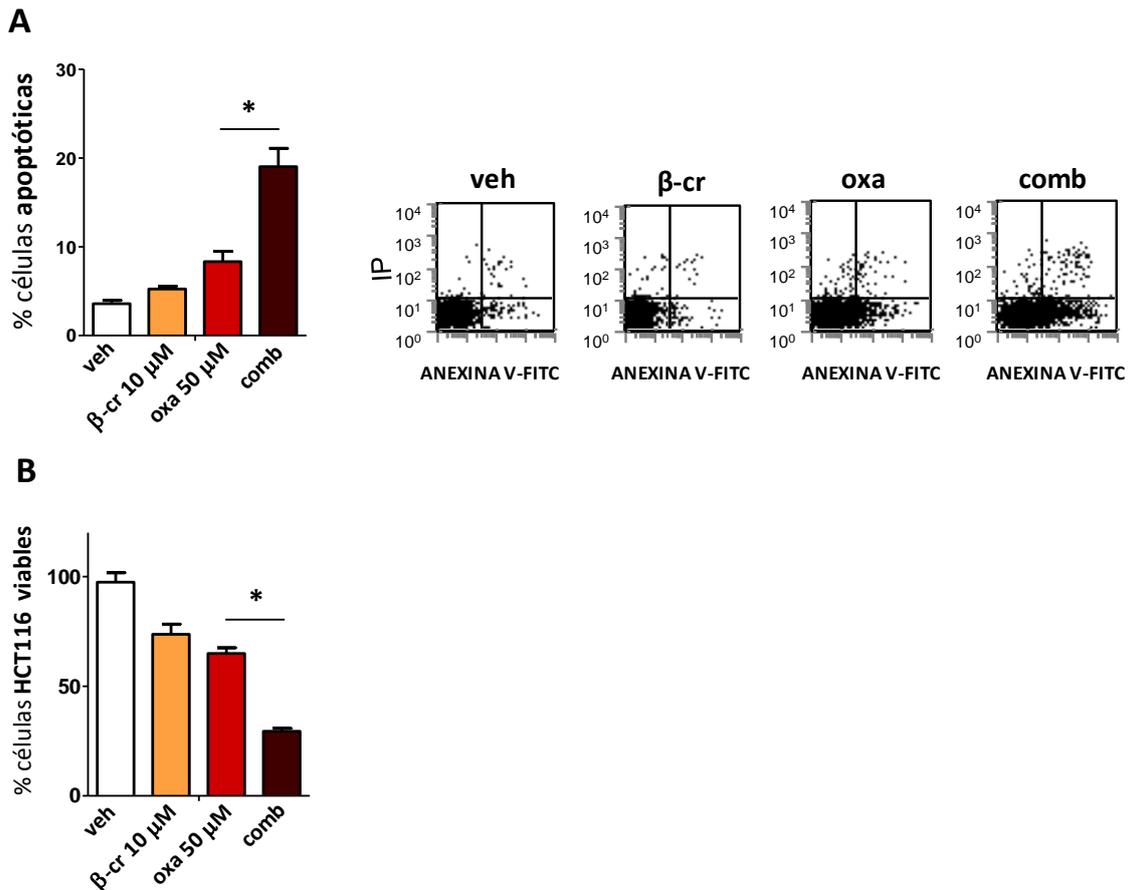


Figura 15. β -criptoxantina potencia el efecto del oxaliplatino en células de cáncer de colon después de 6 días de pre-tratamiento con β -criptoxantina. (A) Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo (marcaje con Anexina V-FITC y yoduro de propidio) en las células de cáncer de colon HCT116 después de la siguiente pauta de tratamiento: pretratamiento con vehículo o 10 μ M de β -criptoxantina durante 6 días y a continuación, tratamiento con vehículo, 10 μ M de β -criptoxantina, 50 μ M de oxaliplatino o con el tratamiento combinado de oxaliplatino y β -criptoxantina durante 36 horas (izquierda), e imágenes representativas (derecha). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células viables mediante el ensayo MTT después de la pauta de tratamiento indicada en **(A)**. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes * $P < 0.05$. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino).

4.7.3. El tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino reduce la viabilidad celular en un porcentaje similar a dosis dobles de oxaliplatino

También se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular después del tratamiento con los cuatro regímenes indicados anteriormente, incluyendo en este caso varias concentraciones de oxaliplatino (en la administración aislada y en el tratamiento combinado) para cada línea celular. En las células HCT116, el tratamiento combinado de β -criptoxantina a 10 μ M y oxaliplatino a 50

μM redujo la viabilidad celular en un porcentaje similar al tratamiento con oxaliplatino a una concentración de $100 \mu\text{M}$. Asimismo, en las células SW480-ADH, el tratamiento combinado de $10 \mu\text{M}$ de β -criptoxantina y $20 \mu\text{M}$ de oxaliplatino resultó en una reducción de la viabilidad celular en un porcentaje similar al tratamiento con oxaliplatino a $50 \mu\text{M}$ (Figura 16).

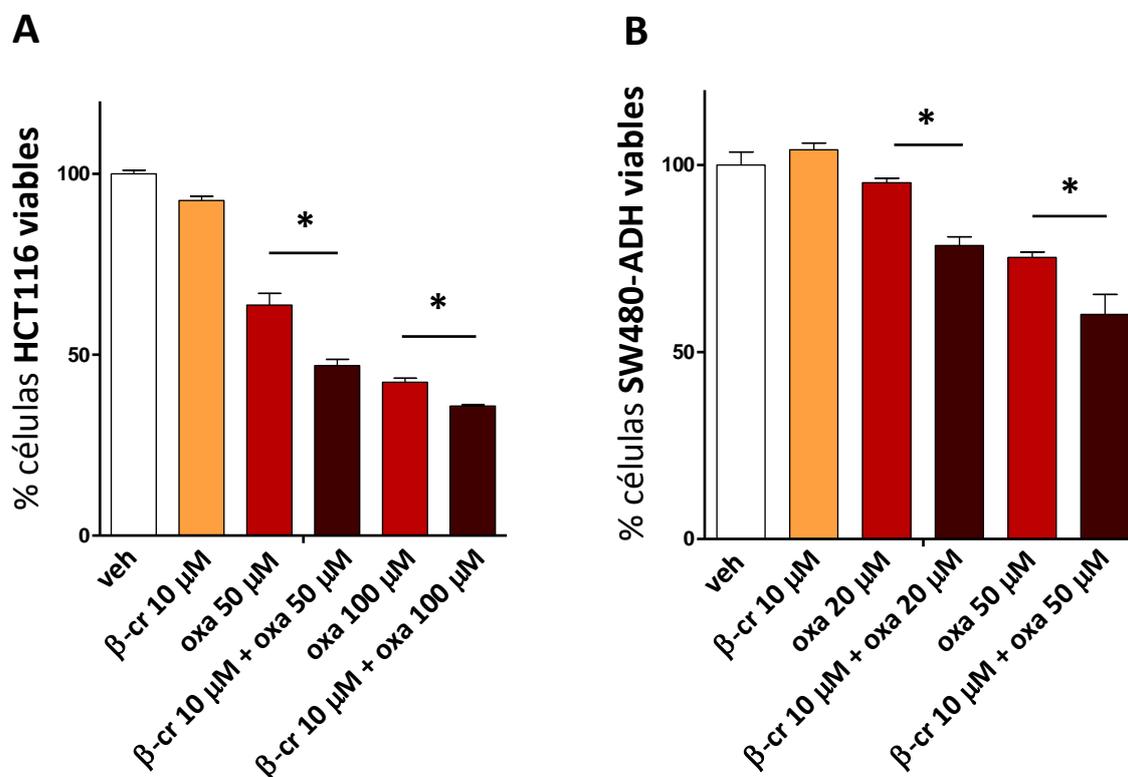


Figura 16. El tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino reduce la viabilidad celular en un porcentaje similar a dosis dobles de oxaliplatino. Cuantificación del porcentaje de células viables mediante el ensayo MTT después de los tratamientos indicados en las células de cáncer de colon (A) HCT116 y (B) SW480-ADH. Se representan las medias y desviaciones típicas de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino.

4.7.4. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de manera sinérgica

De acuerdo con el Método de Chou-Talalay (Chou y Talalay, 1984), el valor de CI (índice de combinación) en los ensayos de tratamiento combinado osciló entre 0.4 y 0.7 (Figura 17), por lo que la combinación de ambos agentes responde a un efecto sinérgico.

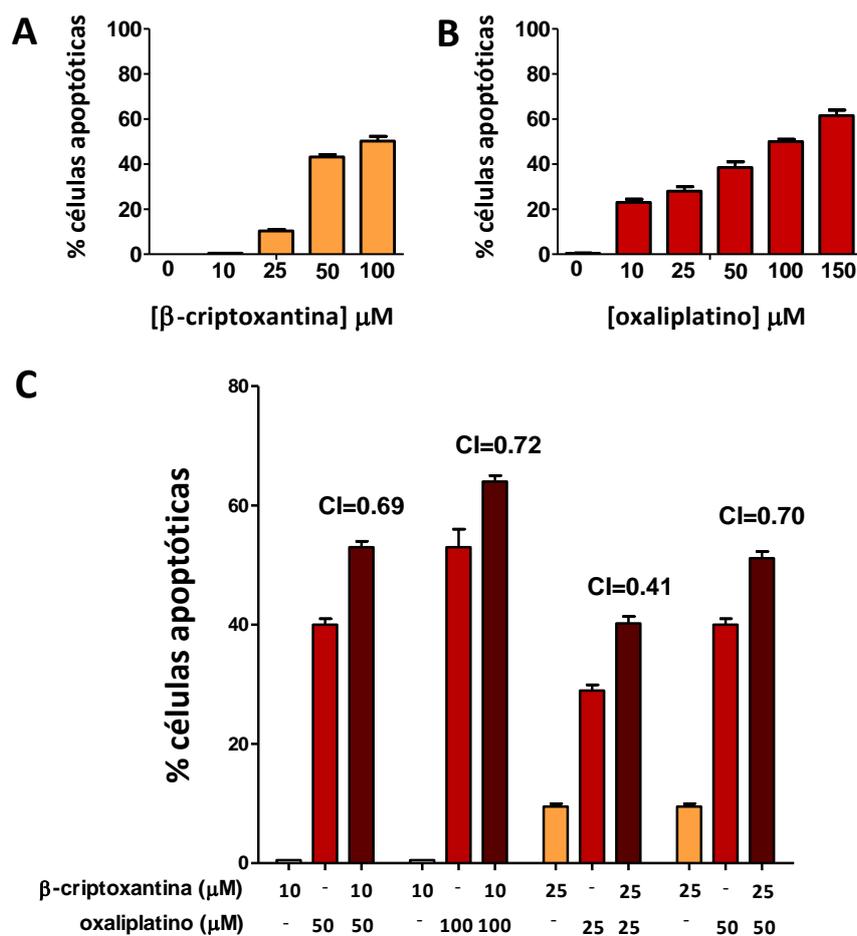


Figura 17. β-criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de manera sinérgica. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas después del tratamiento con: **(A)** concentraciones crecientes de β-criptoxantina, **(B)** concentraciones crecientes de oxaliplatino, y **(C)** distintos tratamientos combinados. Los índices de combinación (CI) para cada ensayo se calcularon utilizando el software Calcsyn (Biosof). Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

4.8. β-criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$

Para estudiar si β-criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$, se transfectaron de manera transitoria las células HCT116 y las células SW480-ADH con una construcción de $\Delta NP73\beta$ o con el vector vacío pcDNA3.1 (células control). Después de cuantificar el porcentaje de células viables y no viables con un contador celular automático (ADAM, Digital Bio) y comprobar así que la sobreexpresión de $\Delta NP73\beta$ no comprometía la viabilidad celular (95-98%), se llevó a cabo un ensayo de apoptosis (**Figura 18**) y paralelamente otro de viabilidad celular (**Figura 19**). Se siguió la pauta de tratamiento indicada en

el epígrafe 4.6.1. Los resultados mostraron que en las células control (transfectadas con el vector vacío) el efecto del tratamiento combinado es mayor que el del oxaliplatino administrado de forma aislada mientras que en las células que sobreexpresan ectópicamente $\Delta NP73\beta$, el tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino no incrementa el efecto del oxaliplatino.

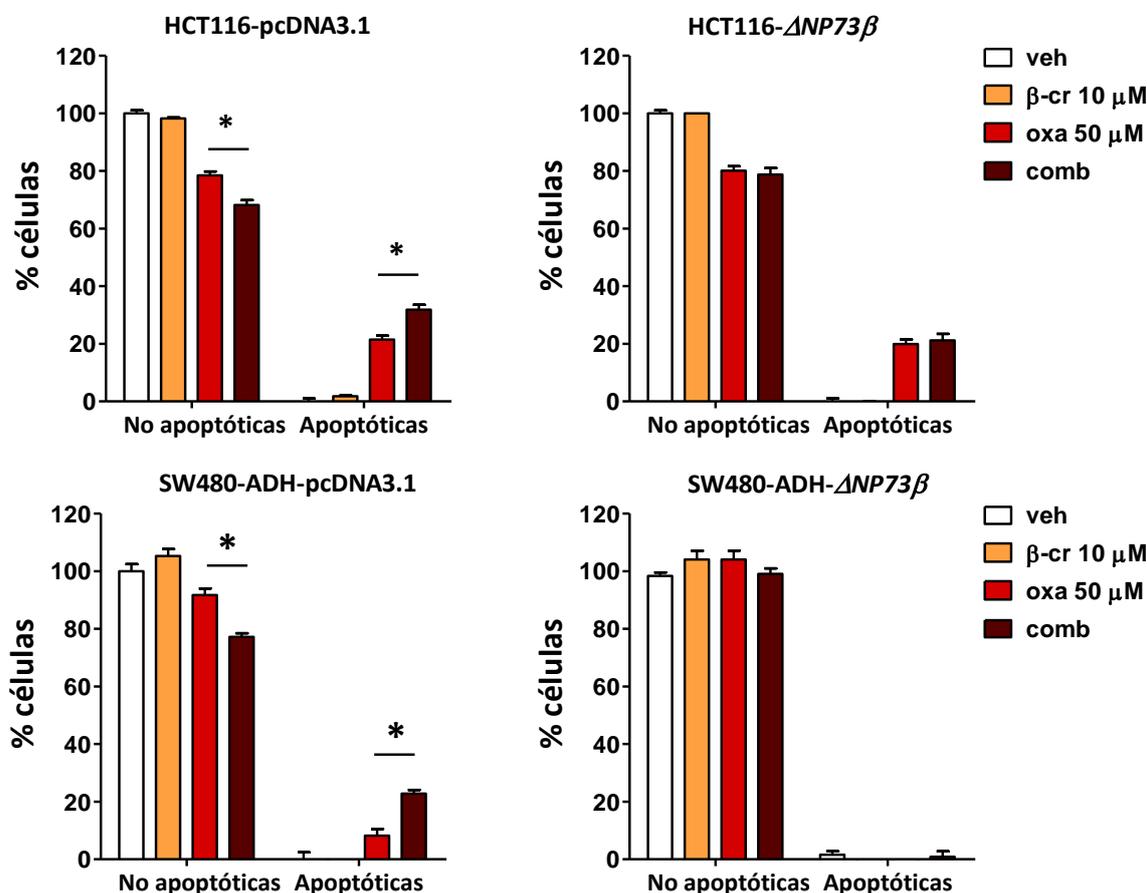


Figura 18. β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral del oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$ (apoptosis). Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo (marcaje AnexinaV-FITC y yoduro de propidio) después de 16 o 24 horas de pre-tratamiento con β -criptoxantina y 36 horas de tratamiento con vehículo, β -criptoxantina, oxaliplatino o tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino) en las células cáncer de colon HCT116 y SW480-ADH que sobreexpresan ectópicamente $\Delta NP73\beta$. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino).

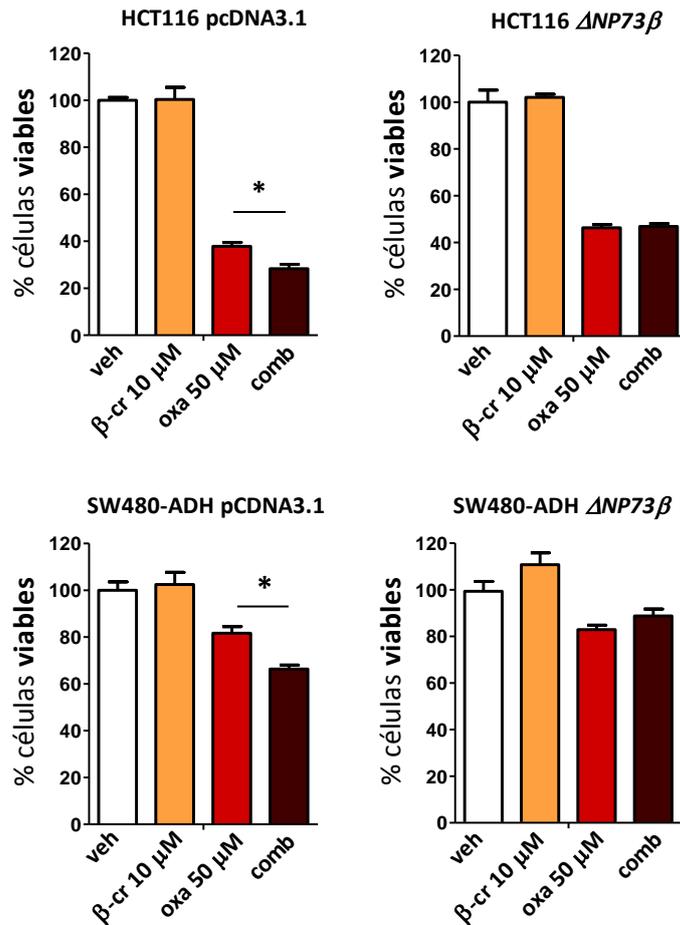


Figura 19. β-criptoxantina potencia el efecto antitumoral del oxaliplatino en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de $\Delta NP73$ (viabilidad). Cuantificación del porcentaje de células viables mediante el ensayo MTT después de 16 o 24 horas de pre-tratamiento con β-criptoxantina y 36 horas de tratamiento con vehículo, β-criptoxantina, oxaliplatino o tratamiento combinado (β-criptoxantina + oxaliplatino) en las células cáncer de colon HCT116 y SW480-ADH que sobreexpresan ectópicamente $\Delta NP73\beta$. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$. veh: vehículo; β-cr: β-criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β-criptoxantina + oxaliplatino).

4.9. β-criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de forma $TP53$ independiente

Con el fin de evaluar el impacto de $TP53$ en la respuesta al tratamiento combinado de β-criptoxantina y oxaliplatino, se llevaron a cabo varios ensayos funcionales en las células HCT116 $P53^{-/-}$. Al igual que en las células HCT116 $P53^{+/+}$, el tratamiento con β-criptoxantina a una concentración de 10 μM incrementó significativamente los niveles de $TAP73$ y reguló negativamente los niveles de $\Delta NP73$ (Figura 20A). Como ya se había descrito en la literatura, las células HCT116 $P53^{-/-}$ fueron más resistentes al tratamiento con oxaliplatino que las células

HCT116 P53 +/+. Sin embargo, no se observaron diferencias en su respuesta al tratamiento combinado, tanto cuando el tiempo de pre-tratamiento con β -criptoxantina fue de 24 horas (**Figura 20B**) como con tiempos de pre-tratamiento más largos (6 días) (**Figura 20C**). Ambas líneas celulares mostraron una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad con el tratamiento combinado en comparación con la administración aislada de oxaliplatino, siendo el porcentaje de reducción de viabilidad similar en ambas líneas celulares.

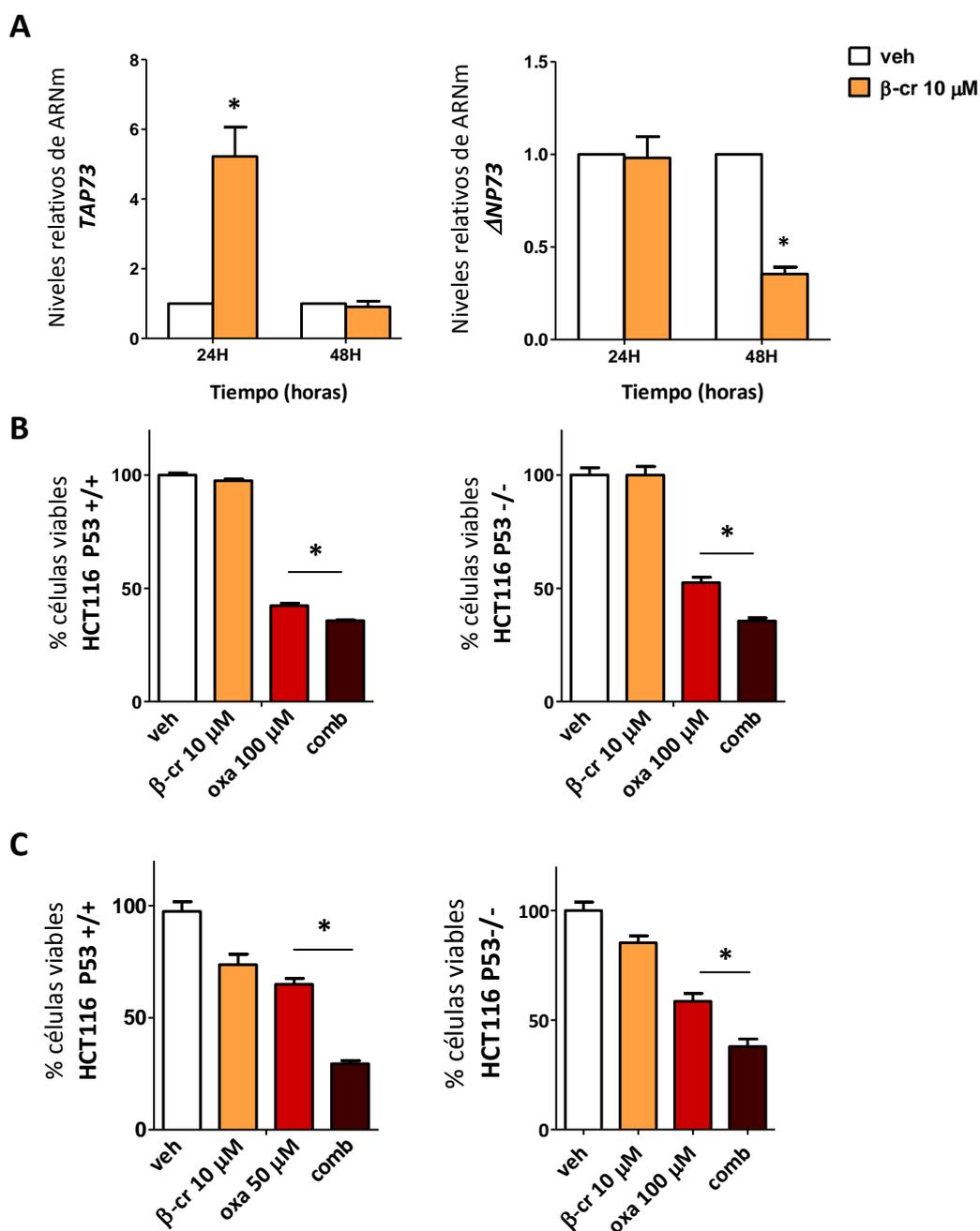


Figura 20. β -criptoxantina potencia el efecto de oxaliplatino en células de cáncer de colon de forma *TP53* independiente. (A) Cuantificación de los niveles de ARNm de *TAP73* y Δ *NP73* en las células HCT116 P53-/- después de 24 y 48 horas de tratamiento con vehículo o β -criptoxantina a 10 μ M, **(B)** Cuantificación del porcentaje de células viables después de 24 horas de pre-tratamiento con β -criptoxantina y 36 horas de

tratamiento con vehículo, β -criptoxantina, oxaliplatino o tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino) en las células HCT116 P53 +/+ y en las células HCT116 P53-/. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células viables después de 6 días de pre-tratamiento con β -criptoxantina y 36 horas de tratamiento con vehículo, β -criptoxantina, oxaliplatino o tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino) en las células HCT116 P53 +/+ y en las células HCT116 P53-/. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino).

4.10. β -criptoxantina no incrementa la formación de aductos en el tratamiento combinado con oxaliplatino

Dado que oxaliplatino actúa induciendo entrecruzamientos intra o inter-catenarios, se estudió si β -criptoxantina potenciaba el efecto antitumoral de oxaliplatino incrementando la formación de aductos. Para ello, llevamos a cabo el ensayo Cometa en las células HCT116. En este experimento, las células fueron pre-tratadas con vehículo o β -criptoxantina 10 μM durante 16 horas y a continuación se trataron con vehículo, β -criptoxantina 10 μM , oxaliplatino 100 μM o con el tratamiento combinado. Los valores de *intensidad de la cola del cometa* (TI) y del *momento de la cola del cometa* (TM) se presentan en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	INTENSIDAD DE LA COLA (TI)	MOMENTO DE LA COLA (TM)
Vehículo	26 \pm 11,1	8,1 \pm 3,8
β -criptoxantina 10 μM	23,4 \pm 14,4	7,6 \pm 5,6
Oxaliplatino 100 μM	20,6 \pm 12,2	6,2 \pm 3,5
Tratamiento combinado	18,04 \pm 8,49	6,76 \pm 3,6

Tabla VIII. Valores de intensidad de la cola del cometa (TI) y del momento de la cola del cometa (TM) en las células HCT116 obtenidos con el ensayo Cometa después de los tratamientos indicados en la tabla.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los siguientes tratamientos: vehículo respecto a oxaliplatino ($p < 0.05$ para TI y TM) y vehículo respecto al régimen combinado ($p < 0,05$ para TI y TM). Sin embargo, no se observaron diferencias entre el tratamiento con oxaliplatino y el régimen combinado, lo que sugiere que β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino sin inducir mayor formación de aductos.

Con el fin de profundizar en este tema, se analizaron los niveles de algunas proteínas clave en el proceso de reparación del ADN. Observamos que el tratamiento con oxaliplatino (solo y en combinación con β -criptoxantina) se asociaba con un aumento de P53, mientras que ATM y ERCC1

disminuían después del tratamiento con oxaliplatino (solo y en combinación con β -criptoxantina). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de las proteínas de reparación mencionadas entre el tratamiento con oxaliplatino y el régimen combinado (Figura 21).

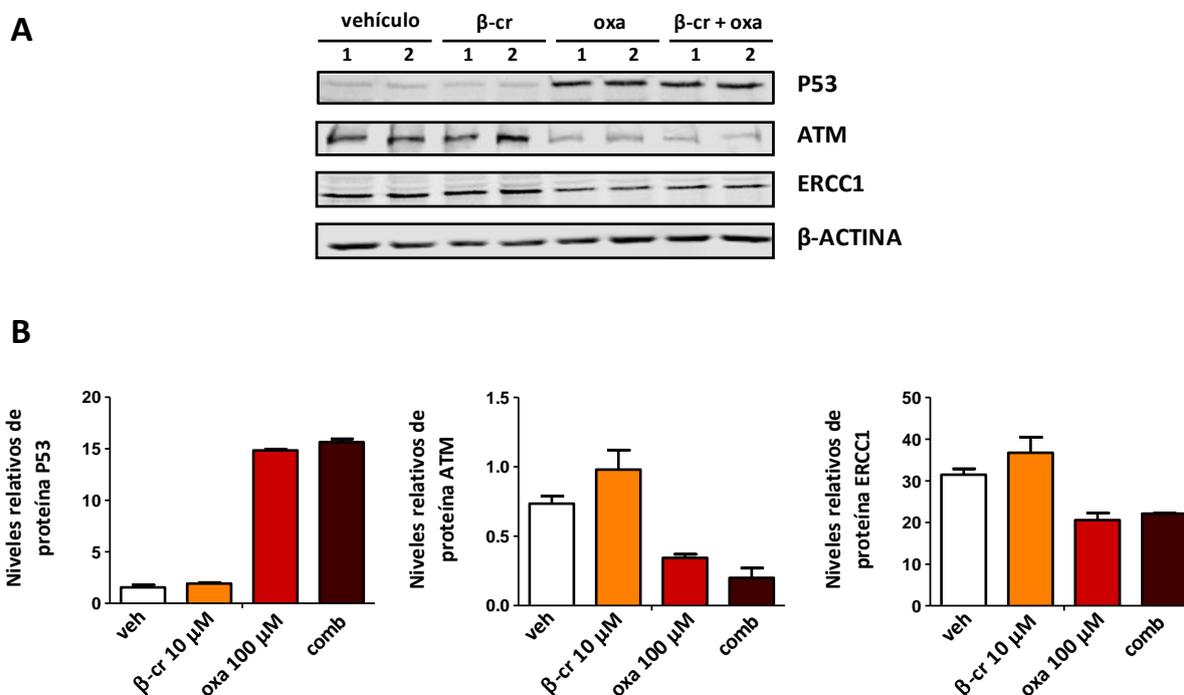


Figura 21. Inmunotransferencia de P53, ATM, ERCC1 y de β -actina (control de carga) después de los tratamientos con vehículo, β -criptoxantina 10 μ M (β -cr), oxaliplatino 100 μ M (oxa) y el tratamiento combinado de β -criptoxantina 10 μ M y oxaliplatino 100 μ M (β -cr + oxa). (A) Inmunotransferencias representativas, y (B) Cuantificación de la proteína de interés normalizada con los niveles de la proteína de referencia β -actina. veh: vehículo; β -cr: β -criptoxantina; oxa: oxaliplatino; comb: tratamiento combinado (β -criptoxantina + oxaliplatino).

4.11. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo y potencia el efecto de oxaliplatino *in vivo*

4.11.1. Puesta a punto de la pauta de tratamiento. Estudio piloto.

Para evaluar si el tratamiento con β -criptoxantina se traduce en una disminución de los niveles de $\Delta Np73$ y del crecimiento tumoral y en una mayor sensibilidad a oxaliplatino *in vivo*, se llevaron a cabo varias aproximaciones experimentales en ratones inmunodeprimidos (Hsd:Athymic Nude-Fox1nu).

Se realizó inicialmente un estudio piloto con el fin de seleccionar las dosis adecuadas de oxaliplatino y β -criptoxantina, así como la vía de administración del carotenoide. Para ello, se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116 en los animales de estudio. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 75-150 mm³, se asignaron arbitrariamente en grupos (5 ratones/grupo), que se organizaron de la siguiente manera:

- A. 1. CONTROL:** vehículo vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg
- A. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg
- A. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía oral + oxaliplatino 3 mg/Kg

- B. 1. CONTROL:** vehículo vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg
- B. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg
- B. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 3 mg/Kg

- C. 1. CONTROL:** vehículo vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- C. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- C. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía oral + oxaliplatino 1.5 mg/Kg

- D. 1. CONTROL:** vehículo vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- D. 2. TRATAMIENTO I:** β -criptoxantina 10 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg
- D. 3. TRATAMIENTO II:** β -criptoxantina 20 μ M vía intraperitoneal + oxaliplatino 1.5 mg/Kg

El vehículo y la β -criptoxantina se administraron diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm³ hasta el final del tratamiento. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 250-300 mm³ se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino durante 5 días, seguido de 5 días de descanso y repitiéndose este ciclo un total de dos veces.

Se llevó a cabo un seguimiento del crecimiento tumoral a lo largo del tratamiento. En la aproximación experimental **A**, en la que β -criptoxantina se administra de forma oral, la reducción del crecimiento tumoral al final del primer y del segundo ciclo fue mayor en el grupo tratado con la combinación de oxaliplatino 3 mg/Kg y β -criptoxantina (10 ó 20 μ M) que en el grupo que recibe oxaliplatino 3 mg/Kg como único tratamiento. En el planteamiento experimental **B**, en el que β -criptoxantina se administra intraperitonealmente, la reducción del crecimiento tumoral al final del primer ciclo es mayor en los grupos que reciben el tratamiento combinado (tanto con 10 como con 20 μ M de β -criptoxantina) que en el grupo que recibe oxaliplatino 3 mg/Kg como único tratamiento. Sin embargo, al final del segundo ciclo, la reducción de crecimiento tumoral respecto al grupo control, sólo es mayor en el grupo que recibe tratamiento combinado con 10 μ M de β -criptoxantina. En la pauta de tratamiento **C**, en la que se utiliza una dosis de oxaliplatino de 1.5

mg/Kg y β -criptoxantina se administra vía oral, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos a ninguno de los tiempos evaluados. Finalmente, en el diseño experimental **D**, en el que se utiliza una dosis de 1.5 mg/Kg de oxaliplatino y β -criptoxantina se administra intraperitonealmente, la reducción del crecimiento tumoral al final del primer ciclo es mayor en el grupo tratado con el tratamiento combinado (con las dos concentraciones de β -criptoxantina utilizadas) que en el grupo que recibe oxaliplatino 1.5 mg/Kg como único tratamiento. Sin embargo, al final del segundo ciclo, la reducción de crecimiento tumoral respecto al grupo control, sólo es mayor en el grupo que recibe tratamiento combinado con 20 μ M de β -criptoxantina (**Figura 22**).

4.11.2. β -criptoxantina reduce el crecimiento tumoral y potencia el efecto de oxaliplatino en xenotransplantes de cáncer de colon en modelos animales

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio piloto, se decidió abordar el experimento *in vivo* con la pauta **A**, eligiendo la concentración de β -criptoxantina de 10 μ M, ya que los resultados obtenidos con la concentración más alta fueron similares.

Se inocularon subcutáneamente 1×10^6 células HCT116 en los ratones inmunodeprimidos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre 75-150 mm³, se asignaron arbitrariamente en cuatro grupos de tratamiento (7 ratones/grupo): (i) vehículo, (ii) β -criptoxantina 10 μ M, (iii) vehículo + oxaliplatino 3 mg/Kg y (iv) β -criptoxantina 10 μ M + oxaliplatino 3 mg/Kg. El vehículo y la β -criptoxantina se administraron vía oral diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm³ hasta el final del tratamiento. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 250-300 mm³, se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino (3mg/Kg) durante 5 días, seguido de 5 días de descanso y repitiéndose este ciclo dos veces.

Se monitorizó el crecimiento tumoral a lo largo del tratamiento y se observó que el volumen del tumor en el grupo tratado con β -criptoxantina era significativamente menor que en el grupo tratado con vehículo ($p < 0.05$). Además, los resultados mostraron que β -criptoxantina también potencia el efecto del oxaliplatino *in vivo*. Así, se observó una reducción del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de oxaliplatino y β -criptoxantina al final del primer ($P = 0.01$) y segundo ciclo ($P = 0.02$) de tratamiento, en comparación con el grupo que recibe oxaliplatino como única pauta (**Figura 23A**). De acuerdo con esto, los niveles del marcador de proliferación Ki67 fueron significativamente menores en el grupo que recibió el tratamiento combinado que en el grupo tratado con oxaliplatino ($P = 0.04$) (**Figura 23B**).

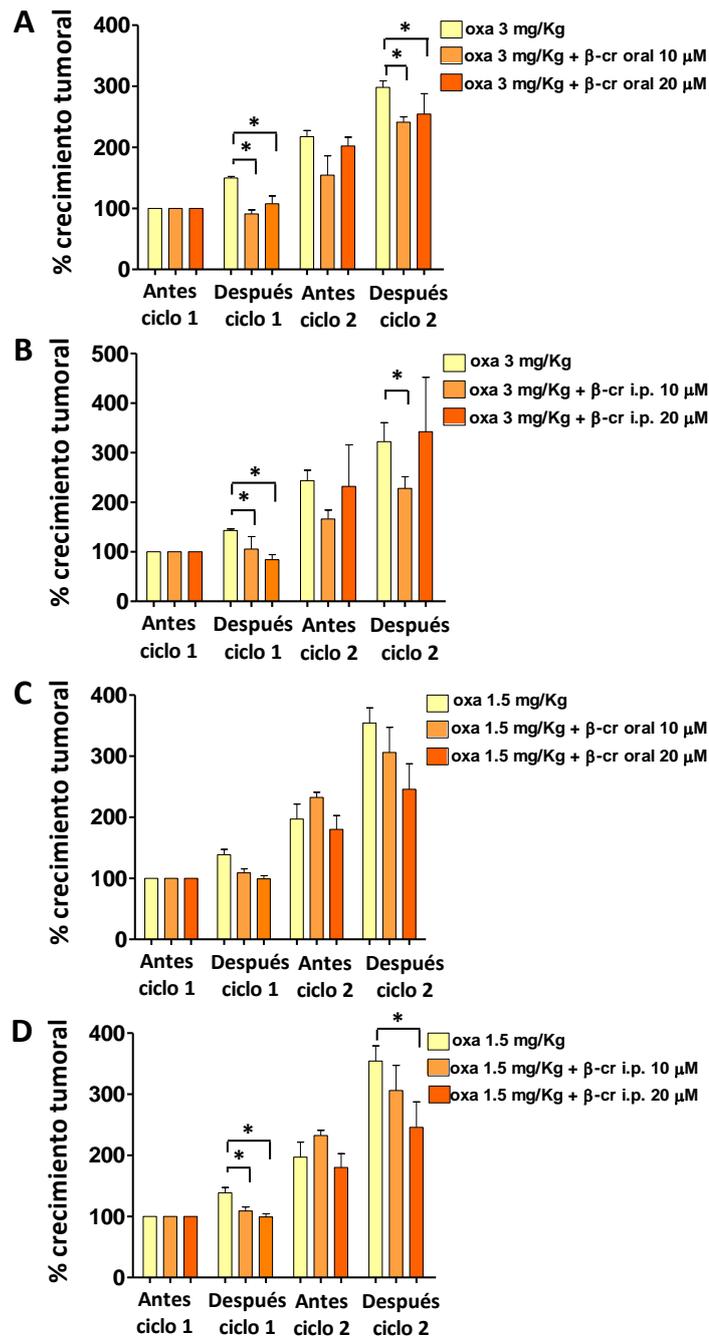


Figura 22. Puesta a punto del régimen de tratamiento *in vivo*. Representación del porcentaje de crecimiento tumoral empleando varias pautas de tratamiento. Vehículo y β-criptoxantina se administraron diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm³ hasta el final del tratamiento. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 250-300 mm³, se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino durante 5 días, seguido de 5 días de descanso y repitiéndose este ciclo dos veces. **(A)** Dosis de oxaliplatino: 3 mg/Kg; Dosis de β-criptoxantina: 10 o 20 μM; Vía de administración de β-criptoxantina: oral. **(B)** Dosis de oxaliplatino: 3 mg/Kg; Dosis de β-criptoxantina: 10 o 20 μM; Vía de administración de β-criptoxantina: intraperitoneal. **(C)** Dosis de oxaliplatino: 1.5 mg/Kg; Dosis de β-criptoxantina: 10 o 20 μM; vía de administración de β-criptoxantina: oral. **(D)** Dosis de oxaliplatino: 1.5 mg/Kg; Dosis de β-criptoxantina: 10 o 20 μM; Vía de administración de β-criptoxantina: intraperitoneal. Oxa: oxaliplatino; β-cr: β-criptoxantina; i.p.: administración intraperitoneal. Se representan las medias y desviaciones típicas del tamaño tumoral de al menos cuatro ratones por grupo. * *P*<0.05.

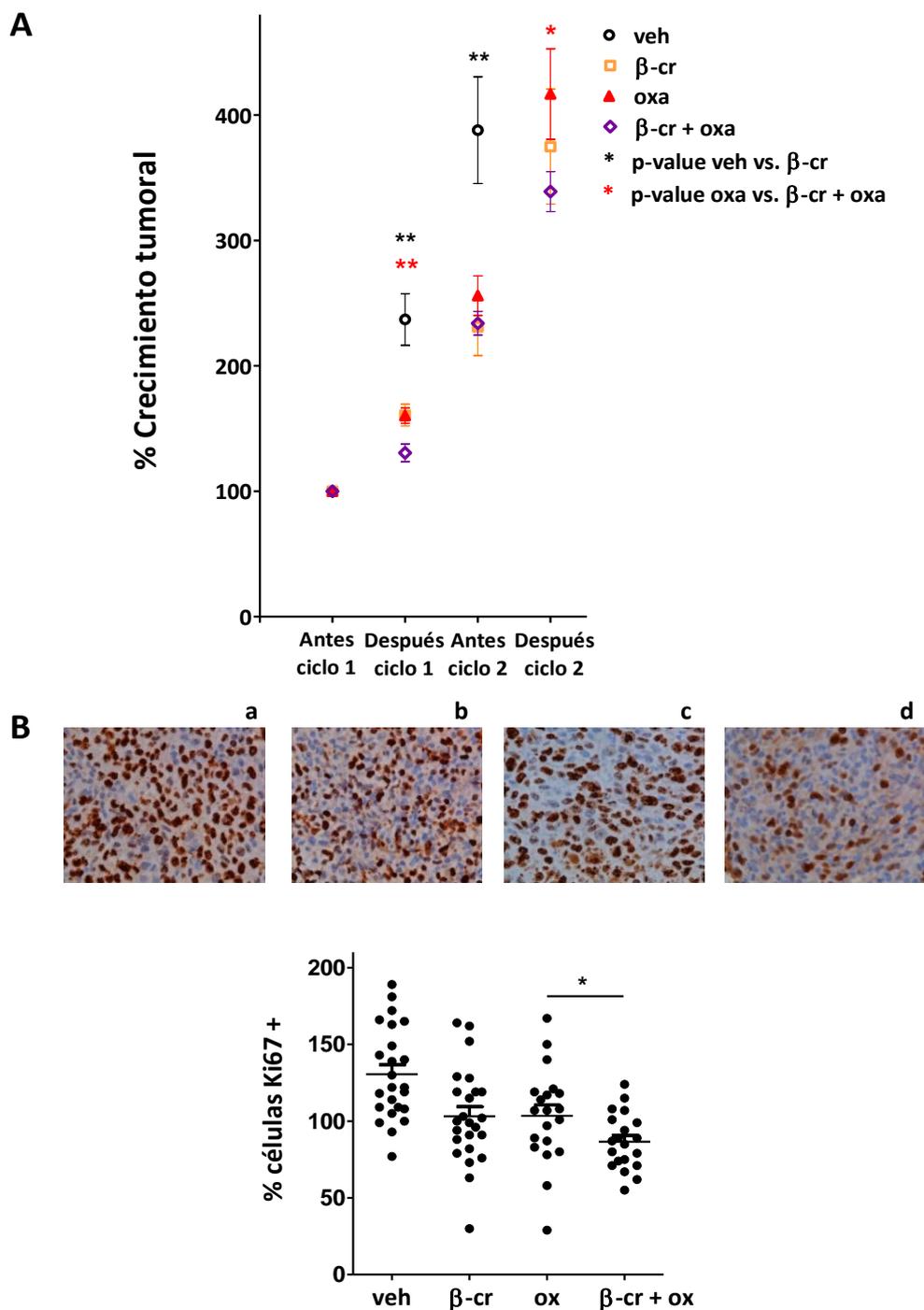


Figura 23. β -criptoxantina inhibe el crecimiento tumoral y potencia la actividad antitumoral del oxaliplatino *in vivo*. (A) Representación del porcentaje de crecimiento tumoral al inicio y final del primer y segundo ciclo de tratamiento. Vehículo y β -criptoxantina 10 μ M se administraron diariamente desde que los tumores midieron 75-150 mm^3 hasta el final del tratamiento. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 250-300 mm^3 se inició la administración intraperitoneal de oxaliplatino 3mg/Kg durante 5 días, seguido de 5 días de descanso y repitiéndose este ciclo dos veces; (B) Imágenes representativas (arriba) y cuantificación (abajo) del marcador de proliferación Ki67; a. vehículo, b. β -criptoxantina 10 μ M, c. oxaliplatino 3 mg/Kg; d. tratamiento combinado de β -criptoxantina 10 μ M y oxaliplatino 3 mg/Kg; Se representan las medias y desviaciones típicas del tamaño tumoral de al menos siete ratones por grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Al final del tratamiento, los niveles de $\Delta NP73$ en los tumores del grupo tratado con β -criptoxantina y del grupo que recibió el tratamiento combinado disminuyeron respecto al grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de $TAP73$, $\Delta EXON2/3P73$ ni $\Delta EXON2P73$ (Figura 24).

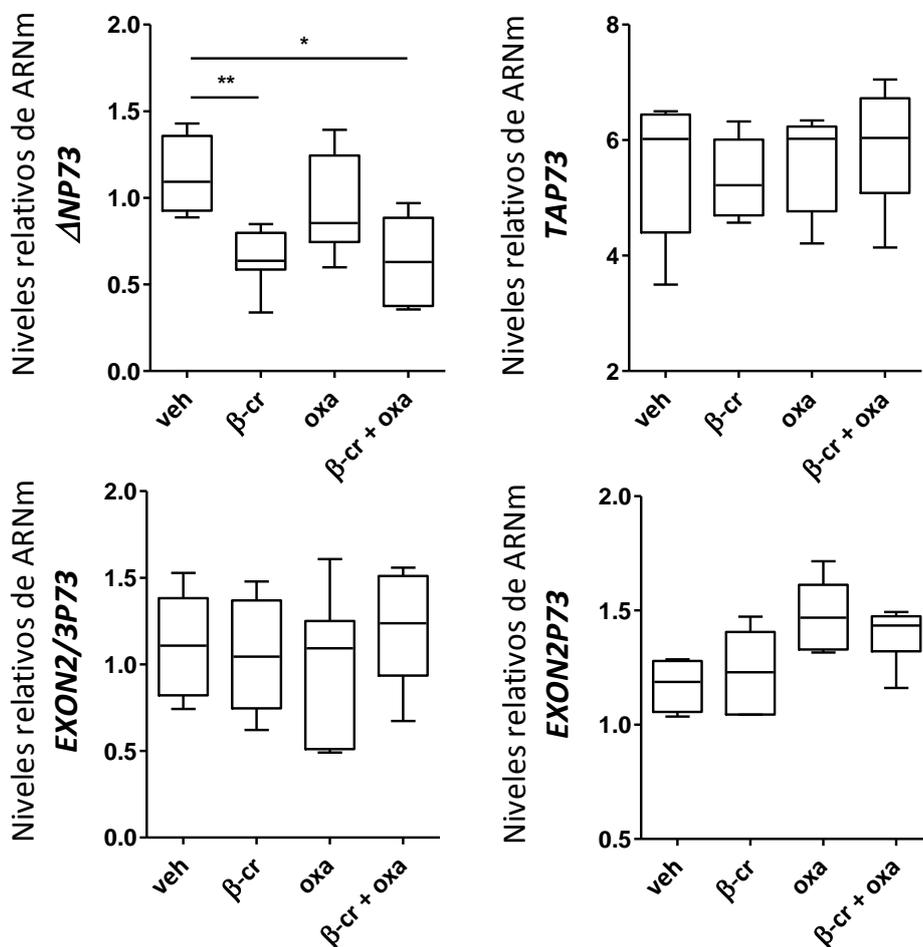


Figura 24. Cuantificación de los niveles de ARNm de $\Delta NP73$, $TAP73$, $\Delta EXON2/3P73$, $\Delta EXON2P73$ en los xenotrasplantes de los ratones al final del tratamiento. Se representan las medias y desviaciones típicas del tamaño tumoral de al menos siete ratones por grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. veh: vehículo, β -cr: β -criptoxantina, oxa: oxaliplatino, β -cr + oxa: β -criptoxantina + oxaliplatino.

Se evaluaron también los niveles de $TAp73$ y $\Delta Np73$ en los tejidos de riñón e hígado de los ratones tratados con vehículo y con β -criptoxantina. Se observó una disminución significativa en la expresión $\Delta Np73$ en el riñón de los ratones al final del tratamiento ($P = 0,03$). No se observaron diferencias en los niveles de $TAp73$ en el riñón ni en hígado (Figura 25).

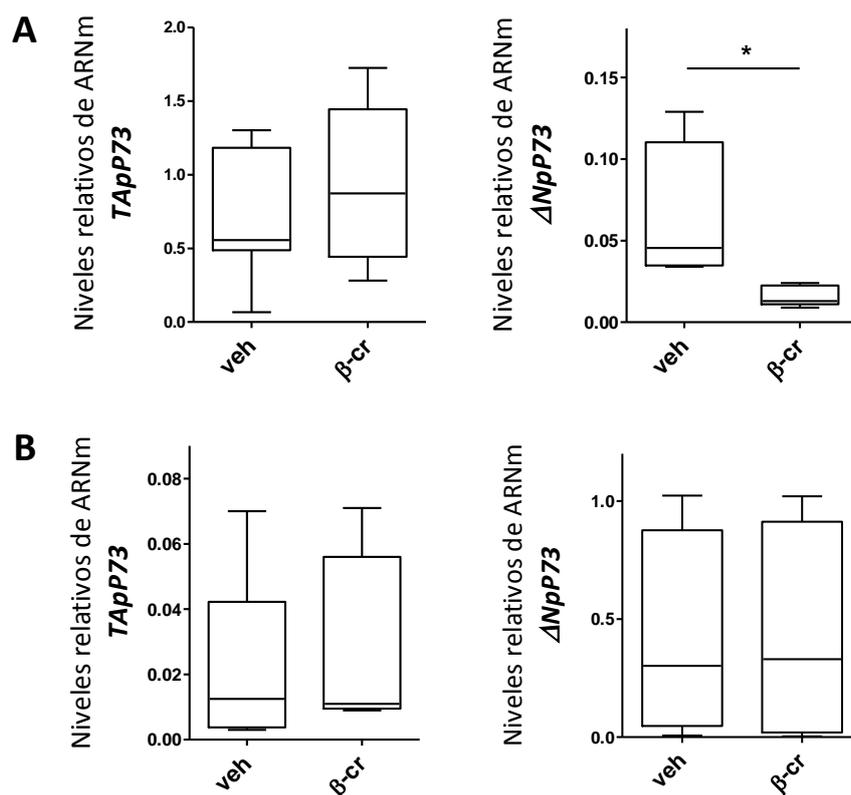


Figura 25. Cuantificación de los niveles de ARNm de $\Delta NP73$ y *TAP73* en los riñones (A) y en los hígados (B) de los ratones al final del tratamiento. Se representan las medias y desviaciones típicas del tamaño tumoral de al menos siete ratones por grupo. * $P < 0.05$. veh: vehículo, β -cr: β -criptoxantina, oxa: oxaliplatino, β -cr + oxa: β -criptoxantina + oxaliplatino.

4.11.3. Evaluación de la toxicidad del tratamiento *in vivo*

Para evaluar la posible toxicidad de los tratamientos empleados, se analizaron distintos parámetros bioquímicos y se hizo un seguimiento del peso de los ratones. En ningún caso se observaron diferencias entre los animales tratados y el grupo control (**Figura 26**). Por otro lado, para evaluar si β -criptoxantina puede tener algún efecto genotóxico sobre las células normales, se realizó el ensayo Cometa en las células polimorfonucleares de la sangre periférica (PBMCs) de los ratones. No se vieron diferencias en los niveles de daño basal entre el grupo control y el grupo tratado con β -criptoxantina. Como se sabe que el oxaliplatino puede formar aductos en los leucocitos, se evaluó también la formación de aductos en las PBMCs. Para ello, se llevó a cabo una versión modificada del ensayo Cometa que permite medir la formación de aductos en el ADN. Los resultados indicaron que la formación de aductos en las PBMCs de los ratones que recibieron el tratamiento combinado fue menor que en las PBMCs de los ratones a los que se les administró oxaliplatino como único tratamiento (TM= 4.98 ± 0.14 vs 4.33 ± 1.65 ; $p = 0.03$; TI= 28.71 ± 1.78 vs 25.09 ± 1.65 ; $p = 0.06$, respectivamente) (**Figura 27**).

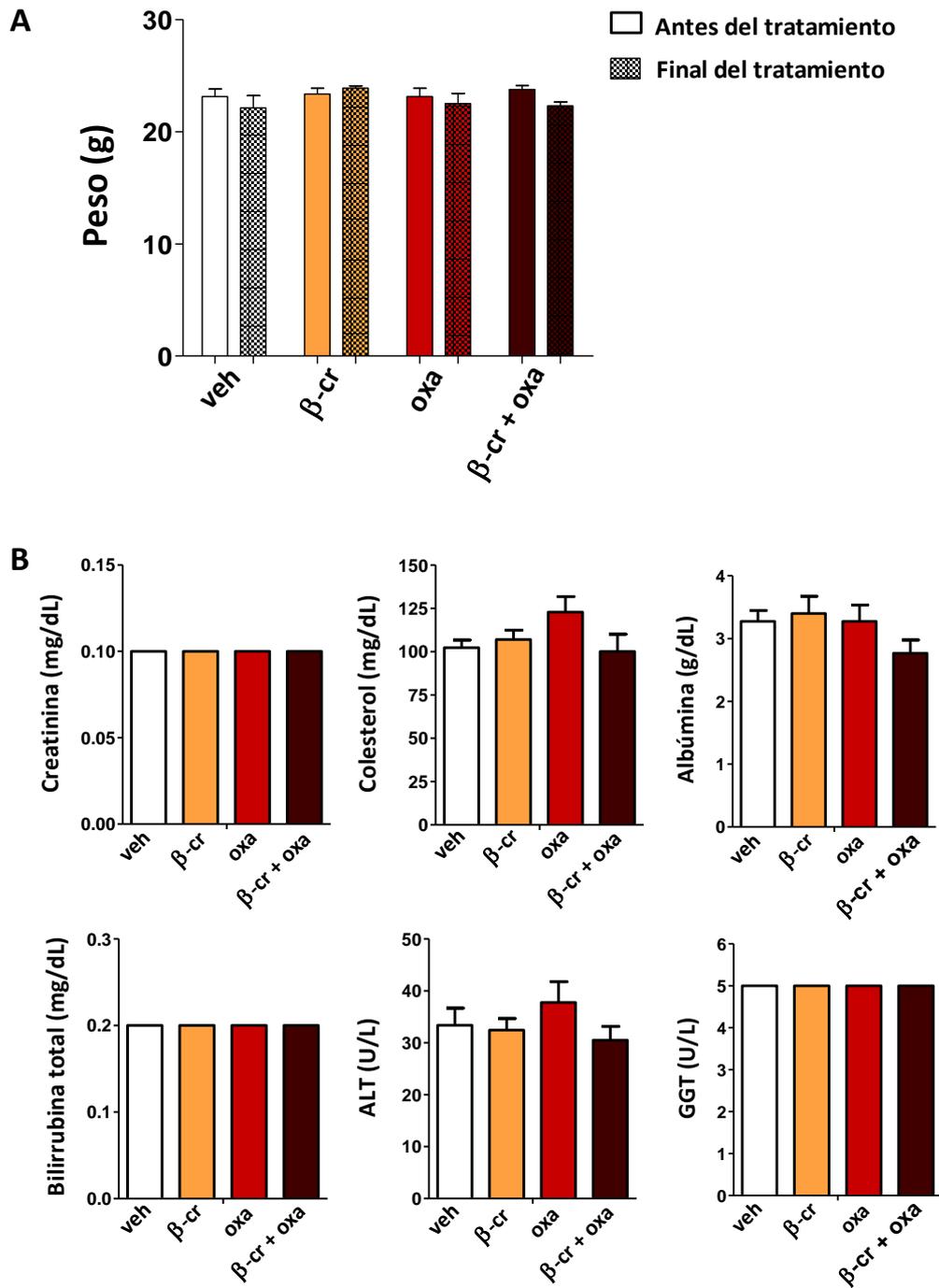


Figura 26. Evaluación de la toxicidad de los tratamientos *in vivo*. (A) Peso corporal en los ratones antes y después del tratamiento; (B) Representación de los parámetros bioquímicos clínicos en los ratones después del tratamiento: creatinina (mg/dL), colesterol (mg/dL), albúmina (g/dL), bilirrubina total (mg/dL), alanina transaminase (ALT) (U/L), gamma glutamil transferase (GGT) (U/L). Se representan las medias y desviaciones típicas del tamaño tumoral de al menos siete ratones por grupo. veh: vehículo, β -cr: β -criptoxantina, oxa: oxaliplatino, β -cr + oxa: β -criptoxantina + oxaliplatino.

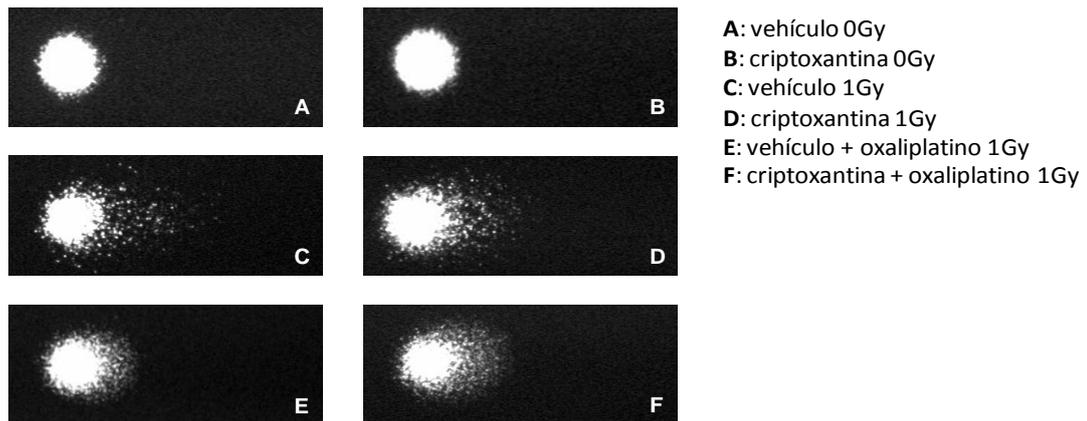


Figura 27. Imágenes representativas de los linfocitos de los ratones después del ensayo Cometa. Se muestran las diferencias en el daño basal (A: vehículo, B: β -criptoxantina) y en los aductos formados por los diferentes tratamientos (C: vehículo, D: β -criptoxantina, E: vehículo y oxaliplatino, F: oxaliplatino y β -criptoxantina).

5. Discusión

5.1. Desarrollo de estrategias terapéuticas antitumorales. TP73 como diana terapéutica

A pesar de los avances de los últimos años en nuestro conocimiento molecular y de comportamiento del cáncer, el tratamiento de esta enfermedad continúa siendo un reto en nuestros días. Sin duda, se han logrado progresos significativos en el terreno terapéutico, sin embargo, la toxicidad de los tratamientos empleados y la resistencia adquirida a los mismos siguen presentándose como dos limitaciones importantes. Además, la enorme heterogeneidad en el perfil genético de cada tipo de tumor y de cada paciente, hacen necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas y el desarrollo de drogas frente a las mismas que permitan una terapia más personalizada y efectiva. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas de análisis masivo, tanto a nivel genómico como proteómico, está permitiendo establecer los mecanismos de acción de nuevas drogas, así como las características genotípicas y/o fenotípicas de una célula o paciente que hacen que un tratamiento sea o no efectivo. Estos avances están permitiendo desarrollar nuevos fármacos destinados a bloquear la acción de moléculas específicas implicadas en vías de señalización críticas para la progresión tumoral y para el desarrollo de resistencias en cada tipo de tumor. En este contexto, adquiere especial relevancia la búsqueda de nuevos compuestos que actúen sobre estas dianas y que, combinados con los tratamientos existentes o administrados de forma aislada, permitan superar las limitaciones actuales y por tanto, una práctica clínica más efectiva.

Una de las principales fuentes de moléculas bioactivas con potencial terapéutico en cáncer lo suponen los recursos naturales, debido principalmente a su disponibilidad y bioseguridad (Madka y Rao, 2013). Ya en 1960, el Instituto Nacional del Cáncer, en colaboración con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, inició un programa de cribado a gran escala de agentes antitumorales derivados de plantas. Así, durante los últimos 50 años, se ha evaluado el potencial terapéutico de más de 100.000 compuestos, algunos de los cuales ya han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en clínica como la camptotecina, la vincristina, la vinblastina o el paclitaxel (Gordaliza, 2007; Mann, 2002; Ma y Wang, 2009).

En este trabajo nos hemos centrado en *TP73* como potencial diana terapéutica. *TP73* se transcribe en un complejo número de isoformas con funciones opuestas conocidas como *TAP73* y Δ *TAP73*. Las variantes *TAP73* inducen parada del ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular transactivando los mismos genes diana que *TP53* o genes efectores propios, por lo se les atribuyen características supresoras tumorales. Sin embargo, las variantes Δ *TAP73*, que engloban a Δ *NP73*, Δ *N'P73*, Δ *EXON2P73* y Δ *EXON2/3P73* tienen funciones oncogénicas. Estas isoformas pueden

operar como oncogenes actuando como reguladores negativos de P53 y TAP73 mediante la formación de hetero-tetrámeros transcripcionalmente inactivos (Zorić et al., 2013) y por competición directa por los sitios de unión en los promotores de sus genes diana (Buhlmann y Pützer, 2008; Ishimoto et al., 2002). Además, Δ NP73 muestra actividades oncogénicas independientes de P53 y/o TAP73 (Lin et al., 2009), mediante la inducción de proliferación (Soldevilla et al., 2011; Vilgelm et al., 2010), angiogénesis (Díaz et al., 2008), transición epitelio-mesénquima (Steder et al., 2013; Y. Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2013) o resistencia a drogas (Soldevilla et al., 2011; Vera et al., 2013; Vilgelm et al., 2008). Dado que la sobreexpresión de las formas oncogénicas, principalmente de Δ NP73, se ha observado en la mayoría de tumores humanos (Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005; Gemma Domínguez et al., 2006a; Guan y Chen, 2005; Ito et al., 2006; Müller et al., 2005; Rizzo et al., 2004; Uramoto et al., 2004; Vilgelm et al., 2010; Zitterbart et al., 2007), está creciendo el interés en la comunidad científica por su posible papel como diana terapéutica (Pflaum et al., 2014).

En las células tumorales el ratio TAP73: Δ TAP73 se encuentra alterado a favor de estas últimas. En este contexto, es interesante el desarrollo de estrategias terapéuticas que restauren o potencien la actividad supresora tumoral de TAP73 y/o inhiban la actividad oncogénica de las variantes Δ TAP73. Hasta el momento, se han descrito varios compuestos capaces de desplazar a los reguladores negativos de TAP73 o de incrementar la actividad de esta variante, así como compuestos capaces de regular negativamente a la isoforma oncogénica Δ NP73 (Engelmann et al., 2014). Muchos de ellos son drogas sintéticas como RETRA (Kravchenko et al., 2008), PRIMA-1 (Saha et al., 2013), Nutlina3 (Zheng et al., 2010), fludarabina (Christopherson et al., 2014), rapamicina (Rosenbluth et al., 2008) o el inhibidor de PI3K/mTOR PF-04691502 (Herzog et al., 2013); otros son compuestos de origen natural como el aceite esencial del té verde α -TEA (Tiway et al., 2011), el alcaloide mahanine extraído del árbol *Micromelum minutum* (Das et al., 2014), el aceite esencial timoquinona extraído de la planta *Nigella sativa* (Alhosin et al., 2012, 2010), el extracto del té verde epigallocatequina-3-galato (Achour et al., 2013; Onoda et al., 2011; Stearns y Wang, 2011), el resveratrol (Sharif et al., 2010) o la vitamina D (Díaz et al., 2010). En este trabajo nos hemos centrado en la identificación de compuestos naturales capaces de estabilizar o activar las variantes TAP73 y/o de regular negativamente las variantes Δ TAP73 en cáncer de colon.

En los últimos años, varios trabajos han estudiado el potencial terapéutico de compuestos naturales derivados de la dieta para el tratamiento del cáncer de colon (Kuppasamy et al., 2014). De hecho, como ya se comentó en la introducción, se han descrito propiedades antitumorales *in vitro* y en modelos animales de cáncer de colon de metabolitos secundarios contenidos en frutas, verduras y otros vegetales como los flavonoides (Hogan et al., 2007; Kim et al., 2010; Kumazoe et al., 2013; Larsen y Dashwood, 2010; Leonardi et al., 2010; Park et al., 2005; Velmurugan et al.,

2008; Yun et al., 2009), otros polifenoles (Sánchez-Fidalgo et al., 2010; Su et al., 2006; H. Wu et al., 2008), carotenoides (Nagendraprabhu y Sudhandiran, 2011; Palozza et al., 2010), isotiocianatos (Cheung et al., 2008; Lai et al., 2010; Rudolf et al., 2009; Shen et al., 2007) y terpenoides (Dillard y Lane, 2008; Park et al., 2008). En la búsqueda de compuestos naturales que pudieran modificar los niveles de las distintas isoformas de *TP73*, nos centramos en el carotenoide β -criptoxantina, puesto que Nishino et al., 2000 (comunicación oral), habían sugerido que este carotenoide podría regular *TP73*. En este trabajo los autores se refirieron a los niveles totales de expresión de *TP73*, sin analizar qué isoformas específicas estaban siendo reguladas por β -criptoxantina. Nosotros decidimos estudiar si este carotenoide regulaba diferencialmente la expresión de las isoformas de *TP73* activando la expresión de las variantes supresoras tumorales y/o inhibiendo la expresión de las variantes oncogénicas, y si esta regulación se podría traducir en un efecto terapéutico.

5.2. Papel preventivo de β -criptoxantina en cáncer

El papel preventivo de β -criptoxantina en cáncer de colon (Mühlhölfer, 2003; Park et al., 2009) y en otros tipos de cáncer (mama, ovario, pulmón, próstata, hígado y vejiga entre otros) ha sido descrito en numerosos estudios epidemiológicos (Comstock et al., 2008; Hung et al., 2006; Klarod et al., 2011; Mignone et al., 2009; Nishino et al., 2009; Siegel et al., 2010; Stram et al., 2007; Tamimi et al., 2012; Tung et al., 2005). Además, se ha demostrado el papel protector de este carotenoide en modelos de carcinogénesis inducida por agentes químicos en piel (Nishino et al., 2000), pulmón (Kohno et al., 2001), vejiga (Miyazawa et al., 2007), hígado y lengua (Tanaka et al., 2012) y sobretodo en modelos animales de cáncer de colon inducido por los agentes azoximetano y/o nitrosourea (Narisawa et al., 1999; Tanaka et al., 2000, 2012). En el estudio más reciente llevado a cabo por Tanaka et al., 2012, propusieron que β -criptoxantina podría inhibir el desarrollo de neoplasias de colon inducidas químicamente a través de la reducción de los niveles de algunas citoquinas inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1-}\beta$, IL-6 , COX-2 e iNOS y a través de la inducción de las enzimas destoxicadoras glutatión-S-transferasa y quinona reductasa así como del factor de transcripción Nrf2 , que regula la expresión inducible de las mismas. Además, en todos ellos se ha asociado el efecto protector de β -criptoxantina con una disminución de los niveles del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). En nuestro estudio hemos mostrado que β -criptoxantina regula negativamente los niveles de ΔNP73 , isoforma oncogénica de *TP73* implicada en procesos de proliferación (Soldevilla et al., 2011) y cuyos niveles aumentan en paralelo con el estadio tumoral en cáncer de colon y otros (Gemma Domínguez et al., 2006a). Por ello, es posible que la regulación negativa de ΔNP73 por β -criptoxantina también se asocie al papel protector descrito en los estudios mencionados previamente.

5.3. Papel terapéutico de β -criptoxantina en cáncer

Aunque el efecto protector de β -criptoxantina en el desarrollo de cáncer ha sido ampliamente descrito, son pocos los trabajos que han abordado su potencial terapéutico. Hasta la fecha, tan solo se han publicado tres estudios que han demostrado el efecto antitumoral de este carotenoide en modelos celulares de cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de estómago y melanoma (Baudelet et al., 2013; Lian et al., 2006; Wu et al., 2013).

5.3.1. Efecto antiproliferativo

En nuestro estudio hemos observado que β -criptoxantina inhibe la proliferación celular a partir de los seis días de tratamiento *in vitro* y a partir de los diez días de tratamiento en nuestro modelo animal, lo que se asoció con una disminución en el número de células en fase S y del marcador de proliferación Ki67, respectivamente. Dado que no detectamos inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con el carotenoide, sugerimos que el efecto antitumoral de β -criptoxantina *per se* se debe en gran parte a su actividad antiproliferativa. En los tres estudios que hemos mencionado previamente se describen resultados similares en células de cáncer de pulmón no microcítico (Lian et al., 2006), en células de cáncer de estómago (Wu et al., 2013), y en células de melanoma (Baudelet et al., 2013) que apoyan el papel antiproliferativo pero no proapoptótico de β -criptoxantina. La reproducibilidad de estos resultados en diferentes modelos celulares, sugiere que la actividad antiproliferativa de β -criptoxantina podría extenderse a otros tipos tumorales. Tanto el estudio en células de cáncer de pulmón (Lian et al., 2006) como el estudio en células de cáncer de estómago (Wu et al., 2013) sugieren que β -criptoxantina inhibe la proliferación celular regulando la expresión de genes implicados en ciclo celular, activando la expresión de p21 e inhibiendo la expresión de la ciclina D1 y de la ciclina E. En este aspecto, los resultados de nuestro PCR array también muestran la regulación de genes clave en el ciclo celular, en concreto, la regulación negativa de la ciclina H después del tratamiento con β -criptoxantina. Además, en este estudio demostramos que la sobreexpresión ectópica de $\Delta NP73B$ anula parcialmente el efecto antiproliferativo de β -criptoxantina, lo que apoya la hipótesis de que la regulación negativa de esta variante podría ser uno de los mecanismos por los que este carotenoide ejerce su actividad antiproliferativa. Las concentraciones de β -criptoxantina utilizadas se encuentran dentro del rango de las descritas previamente para este carotenoide en varios tipos de cáncer en modelos celulares (1-20 μ M) (Lian et al., 2006; Wu et al., 2013) y en los modelos animales de carcinogénesis inducida (1-25 ppm) (Narisawa et al., 1999; Tanaka et al., 2000, 2012). Como ya hemos comentado, los estudios previos de β -criptoxantina en animales mostraron el potencial quimiopreventivo de este carotenoide *in vivo*. Sin embargo, este es el primer estudio

que evalúa su efecto como agente inhibidor de la progresión tumoral, sugiriendo la utilidad antitumoral de β -criptoxantina en el tratamiento del cáncer de colon.

5.3.2. Sensibilización a la terapia

En este trabajo, además de testar la actividad antitumoral de β -criptoxantina administrada de forma aislada, quisimos estudiar su efecto en combinación con oxaliplatino, droga antitumoral de primera línea de elección en el tratamiento del CCR, para evaluar así su posible utilización como un agente complementario de utilidad en pacientes con cáncer de colon. Oxaliplatino muestra actividad aditiva o sinérgica en combinación con varios agentes antitumorales en modelos preclínicos. Sin embargo, en algunos casos sólo se ha demostrado el efecto sinérgico *in vitro* como por ejemplo con el fármaco antiangiogénico endostar (Jin et al., 2012), con el inhibidor de metiltransferasas decitabina (Flis et al., 2009), o con el inhibidor de COX, sulfuro de sulindaco (Flis y Sptwiński, 2009). En otros casos, como el del inhibidor de la familia Src, desatinib, los resultados parecen no ser reproducibles ya que sólo se observa el efecto sinérgico en algunas de las líneas celulares analizadas (Kopetz et al., 2009). Nuestros resultados fueron reproducibles en las cuatro líneas celulares de cáncer de colon en estudio y mostraron que β -criptoxantina potencia de forma sinérgica la actividad antitumoral de oxaliplatino tanto *in vitro* como *in vivo*. Este aumento de la sensibilidad a oxaliplatino se correlaciona con la regulación negativa de $\Delta NP73$ en las células y en los xenotransplantes de los ratones tratados con β -criptoxantina (administrada de forma aislada o en combinación con oxaliplatino). De nuevo, la sobreexpresión ectópica de $\Delta NP73\beta$ suprimió este efecto, lo que apoya el papel de $\Delta NP73$ en quimiorresistencia, descrito previamente por nuestro grupo (Soldevilla et al., 2011) y otros grupos (Vilgelm et al., 2008). Estos resultados sugieren que la regulación negativa de $\Delta NP73$ es una de las vías de señalización por la que β -criptoxantina sensibiliza las células de cáncer de colon a oxaliplatino. Además, como la sobreexpresión de $\Delta NP73$ ha sido descrita en numerosos tipos de cáncer (Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005; Gemma Domínguez et al., 2006b; Guan y Chen, 2005; Ito et al., 2006; Müller et al., 2005; Rizzo et al., 2004; Uramoto et al., 2004; Vilgelm et al., 2010; Zitterbart et al., 2007), no podemos descartar que el potencial terapéutico de β -criptoxantina, administrado de forma aislada o en combinación con otras drogas en uso, pueda extenderse al tratamiento de otras neoplasias. Asimismo, demostramos que el efecto sinérgico de β -criptoxantina y oxaliplatino es independiente del estatus de P53, aspecto importante si tenemos en cuenta que se ha descrito que P53, que está mutado en el 50% de los casos de cáncer colorectal (Vogelstein et al., 2000), juega un papel determinante en la sensibilidad celular a diferentes terapias, incluyendo 5-FU (Arango et al., 2001), cisplatino (Magrini et al., 2002) y oxaliplatino (Toscano et al., 2007).

En nuestro caso, a tiempos cortos y largos de pre-tratamiento con β -criptoxantina, el carotenoide potencia el efecto apoptótico de oxaliplatino en un porcentaje similar. Sin embargo, cuando el pre-tratamiento con β -criptoxantina se prolonga seis días, el porcentaje de reducción de viabilidad en el tratamiento combinado respecto a oxaliplatino es mayor que cuando los tiempos de pretratamiento son más cortos. Estos resultados sugieren que a tiempos largos de pre-tratamiento con β -criptoxantina se debe sumar su capacidad de sensibilizar las células de cáncer de colon a la apoptosis inducida por oxaliplatino que ya observamos a tiempos cortos, con el efecto antiproliferativo que hemos descrito que presenta el carotenoide *per se*, resultando una estrategia de tratamiento más efectiva.

Nuestros resultados muestran que β -criptoxantina administrada de forma aislada no induce apoptosis pero sí potencia la apoptosis inducida por oxaliplatino. Dado que oxaliplatino actúa induciendo entrecruzamientos intra o inter-catenarios en el ADN (Alcindor y Beauger, 2011) y que se ha descrito que el efecto sinérgico de algunas drogas con oxaliplatino resulta en una mayor formación de aductos y en una reducción de los niveles de la proteína de reparación ERCC1 (Balin-Gauthier et al., 2008, p. -; Nannizzi et al., 2010), hemos estudiado si en nuestro diseño experimental β -criptoxantina potencia la actividad de oxaliplatino incrementando la formación de aductos y/o alterando los niveles de ERCC1 y/o de otras proteínas de reparación. En nuestras aproximaciones *in vitro* observamos que β -criptoxantina no tiene efecto sobre la formación de aductos ni sobre los niveles de ERCC1, ATM o P53 en el tratamiento combinado respecto al oxaliplatino. Estos resultados sugieren que el efecto sinérgico de β -criptoxantina con oxaliplatino no tiene lugar mediante el incremento de la formación de aductos, sino que posiblemente esté mediado en parte por mecanismos moleculares específicos desencadenados por la regulación negativa de $\Delta NP73$. Probablemente, la reducción de los niveles de $\Delta NP73$ en las células tumorales pueda favorecer la señalización del daño en el ADN que se ve afectada cuando se sobreexpresa $\Delta NP73$ (Wilhelm et al., 2010) y/o modificar otros mecanismos aún no descritos a través de los cuales la inhibición de $\Delta NP73$ puede traducirse en una sensibilización a la terapia. Sería necesario profundizar en este aspecto para dilucidar el mecanismo por el que la reducción de $\Delta NP73$ por β -criptoxantina potencia la actividad de oxaliplatino, así como el significado de la regulación negativa de $\Delta NP73$ en los linfocitos y otros tejidos que hemos observado en nuestro estudio de intervención y en el abordaje en ratones.

A día de hoy el tratamiento con oxaliplatino tiene un impacto positivo en el pronóstico de los pacientes con CCR, pero puede inducir efectos mielotóxicos, formación de aductos en los leucocitos, neutropenia, trombocitopenia, anemia y molestias gastrointestinales. Uno de los efectos secundarios más limitantes en el uso del oxaliplatino es la inducción de neurotoxicidad

(Stein y Arnold, 2012). Se ha planteado el uso de infusiones de calcio y magnesio para reducir esta neurotoxicidad (Hochster et al., 2007; Wen et al., 2013; Xu et al., 2013), sin embargo algunos estudios han demostrado que la efectividad no es la deseada (Gamelin et al., 2008; Han et al., 2013). Nosotros hemos mostrado que las concentraciones de oxaliplatino necesarias para lograr el mismo porcentaje de reducción de viabilidad celular disminuyen significativamente en presencia de β -criptoxantina. En vista de estos resultados, la administración de β -criptoxantina podría reducir la dosis acumulada efectiva de oxaliplatino, moderando así los efectos secundarios que normalmente conducen a la interrupción del tratamiento. Al mismo tiempo, cuando evaluamos la toxicidad de los diferentes tratamientos, los resultados del ensayo Cometa revelaron que el daño genómico en las células mononucleares de la sangre periférica de los ratones fue menor en los que recibieron el régimen combinado que en los tratados con oxaliplatino, lo que sugiere que β -criptoxantina podría reducir la toxicidad sistémica. Asimismo, se comprobaron los perfiles bioquímicos indicadores de la actividad renal y hepática y estaban dentro de los rangos de referencia aceptados en los ratones de todos los grupos de tratamiento. Si estos efectos se confirmaran en ensayos clínicos, la adición de un suplemento de β -criptoxantina al tratamiento de los pacientes con CCR podría suponer un aumento de la eficacia de la terapia, o el mantenimiento del efecto del fármaco antitumoral con la administración de una dosis menor, lo que se traduciría también en una menor toxicidad. En este contexto, otros compuestos naturales en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales han demostrado eficacia para disminuir la concentración tóxica de estos últimos en el tratamiento del cáncer de colon. Algunos ejemplos son la curcumina con el oxaliplatino (Howells et al., 2011), el extracto de romero con el 5-fluouracilo (González-Vallinas et al., 2013) o la mahanina con el oxaliplatino (Das et al., 2014). Sería interesante confirmar en un estudio más extenso si el tratamiento combinado que aquí se propone disminuye la genotoxicidad sistémica y otros efectos secundarios del oxaliplatino.

En nuestras aproximaciones *in vitro*, la concentración de oxaliplatino utilizada para alcanzar el LC_{50} fue más alta de la esperada y de la utilizada en muchos estudios (Samuel et al., 2014; Zeng et al., 2014), pero similar a la utilizada en otros (Arango et al., 2004; Cross-Knorr et al., 2013). Por otro lado, los resultados en el modelo animal se han obtenido siguiendo los patrones estandarizados (pauta de tratamiento y dosis acumulada de oxaliplatino) utilizados en otros estudios llevados a cabo en ratones (Ding et al., 2011; Fichtner et al., 2004; Massicot et al., 2013; Moser et al., 2007; Ta et al., 2009). En conjunto, los resultados obtenidos en el modelo animal, apoyan el traslado de nuestros resultados al paciente. Sin embargo, para relacionar nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* con la posible aplicación clínica de β -criptoxantina y poder, entre otras determinaciones, extrapolar la dosis efectiva de este carotenoide en los pacientes, es esencial

profundizar en el estudio de su metabolismo así como de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas en el organismo (Arts y Hollman, 2005).

5.4. Consideraciones finales

Los avances en el conocimiento de la biología del cáncer muestran que el crecimiento y progresión del tumor dependen de la alteración de una compleja red de diferentes vías de señalización. Desarrollar estrategias terapéuticas que actúen sobre estas vías podría tener un impacto positivo en la evolución de los pacientes. En los últimos años, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer. Cada vez parece más claro que se van a necesitar pautas terapéuticas que combinen varios compuestos con el fin de inhibir simultáneamente diferentes rutas de señalización alteradas en cáncer, manteniendo la toxicidad dentro de los límites aceptables (Hanahan y Weinberg, 2011). En este contexto, los compuestos naturales se presentan como una opción prometedora ya que además de su actividad anti-tumoral, es probable que tengan efectos protectores sistémicos inherentes. Varias moléculas de origen vegetal o sus análogos se han aprobado en las últimas décadas para uso clínico en los Estados Unidos y / o en Europa, como placlitaxel, camptotecina, etopósido y vincristina (Ma y Wang, 2009). Actualmente, más de 30 compuestos de origen natural se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Gordaliza, 2007). Asimismo, en los últimos años, se ha evaluado el uso de numerosos compuestos naturales administrados de forma aislada o en combinación con las terapias convencionales en aproximaciones *in vitro* y en modelos animales y se han tratado de identificar sus dianas moleculares, tanto en cáncer de colon (Das et al., 2014; González-Vallinas et al., 2013; Guo et al., 2014; Howells et al., 2011) como en otros tipos tumorales (Banerjee et al., 2009; Farrand et al., 2013; Ko et al., 2010; Stearns y Wang, 2011; Tiwary et al., 2011). Estos diseños y el presentado en este trabajo, podrían ser los precursores de estudios preclínicos.

Este estudio sienta las bases para el uso una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer de colon, que se basa en la combinación de β -criptoxantina con un agente quimioterapéutico convencional, oxaliplatino. Hemos demostrado que el régimen combinado tiene un efecto antitumoral más potente que cualquier tratamiento individual, sin aumentar los efectos secundarios, por lo que la concentración de oxaliplatino y por tanto los efectos secundarios se podrían reducir en presencia del carotenoide. En un futuro, sería necesario el estudio de esta estrategia en pacientes con cáncer de colon con el fin de validar su aplicación clínica de forma controlada e integrada en el tratamiento habitual del paciente.

6. Conclusiones

1. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de *TP73* en células de cáncer colon, modulando positivamente la expresión de la variante supresora tumoral *TAP73* e inhibiendo la expresión de la variante oncogénica $\Delta NP73$.
2. β -criptoxantina regula diferencialmente la expresión de las isoformas de *TP73* en células mononucleares de sangre periférica de sujetos que han ingerido el carotenoide durante un mes, resultando la regulación negativa de $\Delta NP73$ estadísticamente significativa. Estos datos sugieren que concentraciones no tóxicas de β -criptoxantina pueden regular negativamente los niveles de la variante oncogénica en humanos.
3. β -criptoxantina tiene efecto antiproliferativo aunque no apoptótico en modelos celulares de cáncer de colon *in vitro* y en animales de experimentación, lo que apoya su utilidad como agente antitumoral.
4. La sobre-expresión ectópica estable de $\Delta NP73$ en células tumorales de colon suprime parcialmente el efecto antiproliferativo de β -criptoxantina, lo que sugiere que su actividad antiproliferativa se debe, al menos en parte, a la regulación negativa de $\Delta NP73$.
5. β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino en modelos celulares de cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*, siendo la interacción entre ambos compuestos sinérgica. Estos resultados apoyan el potencial uso de β -criptoxantina en estrategias de terapia combinada con oxaliplatino para el tratamiento del cáncer colorrectal.
6. El tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino reduce la viabilidad celular en un porcentaje similar a dosis dobles de oxaliplatino, lo que apunta a que la administración de β -criptoxantina podría reducir la dosis acumulada efectiva de oxaliplatino, moderando así sus efectos secundarios.
7. La sobreexpresión ectópica de $\Delta NP73$ en células de cáncer de colon anula el efecto sinérgico observado en el tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino, lo que apoya que una de las vías de señalización por las que el carotenoide sensibiliza las células de cáncer de colon a oxaliplatino es la regulación negativa de $\Delta NP73$.
8. β -criptoxantina sensibiliza al tratamiento con oxaliplatino tanto a las células HCT116-P53 nativo como en las células HCT116-P53 mutado, lo que sugiere que este carotenoide potencia el efecto antitumoral de oxaliplatino independientemente del estatus del supresor tumoral.

9. El efecto sinérgico de β -criptoxantina con oxaliplatino en células de cáncer de colon no tiene lugar mediante el incremento de la formación de aductos, sino que posiblemente esté mediado, al menos en parte, por mecanismos desencadenados por la regulación negativa de *ΔNP73*.
10. β -criptoxantina reduce la formación de aductos inducida por oxaliplatino en las células polimorfonucleares de sangre periférica en animales de experimentación, lo que reduce la genotoxicidad sistémica inducida por el quimioterápico y apoya el papel protector inherente del carotenoide.

7. Bibliografía

- Abnet, C.C., Qiao, Y.-L., Dawsey, S.M., Buckman, D.W., Yang, C.S., Blot, W.J., Dong, Z.-W., Taylor, P.R., Mark, S.D., 2003. Prospective study of serum retinol, beta-carotene, beta-cryptoxanthin, and lutein/zeaxanthin and esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control CCC* 14, 645–655.
- Achour, M., Mousli, M., Alhosin, M., Ibrahim, A., Peluso, J., Muller, C.D., Schini-Kerth, V.B., Hamiche, A., Dhe-Paganon, S., Bronner, C., 2013. Epigallocatechin-3-gallate up-regulates tumor suppressor gene expression via a reactive oxygen species-dependent down-regulation of UHRF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 208–212.
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y., 1999. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399, 809–813.
- Agostini, M., Niklison-Chirou, M.V., Catani, M.V., Knight, R.A., Melino, G., Rufini, A., 2014. TAp73 promotes anti-senescence-anabolism not proliferation. *Aging* 6, 921–930.
- Agostini, M., Tucci, P., Killick, R., Candi, E., Sayan, B.S., Rivetti di Val Cervo, P., Nicotera, P., McKeon, F., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., 2011. Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21093–21098.
- Ahmad, S., 2010. Platinum–DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. *Chem. Biodivers.* 7, 543–566.
- Alcindor, T., Beauger, N., 2011. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* 18, 18–25.
- Alhosin, M., Abusnina, A., Achour, M., Sharif, T., Muller, C., Peluso, J., Chataigneau, T., Lugnier, C., Schini-Kerth, V.B., Bronner, C., Fuhrmann, G., 2010. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1251–1260.
- Alhosin, M., Ibrahim, A., Boukhari, A., Sharif, T., Gies, J.-P., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012. Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of α and β tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. *Invest. New Drugs* 30, 1813–1819.
- Alla, V., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Emmrich, S., Schmitz, U., Steder, M., Pützer, B.M., 2012. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3067–3078.
- Alonso, R., López-Guerra, M., Upshaw, R., Bantia, S., Smal, C., Bontemps, F., Manz, C., Mehrling, T., Villamor, N., Campo, E., Montserrat, E., Colomer, D., 2009. Forodesine has high antitumor

- activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood* 114, 1563–1575.
- Amelio, I., Antonov, A.A., Catani, M.V., Massoud, R., Bernassola, F., Knight, R.A., Melino, G., Rufini, A., 2014. TAp73 promotes anabolism. *Oncotarget* 5, 12820–12934.
- Amelio, I., Markert, E.K., Rufini, A., Antonov, A.V., Sayan, B.S., Tucci, P., Agostini, M., Mineo, T.C., Levine, A.J., Melino, G., 2013. p73 regulates serine biosynthesis in cancer. *Oncogene*.
- Aoki, I., Higuchi, M., Gotoh, Y., 2012. NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene*.
- Aprile, G., Macerelli, M., Giuliani, F., 2013. Regorafenib for gastrointestinal malignancies : from preclinical data to clinical results of a novel multi-target inhibitor. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 27, 213–224.
- Arango, D., Corner, G.A., Wadler, S., Catalano, P.J., Augenlicht, L.H., 2001. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61, 4910–4915.
- Arango, D., Wilson, A.J., Shi, Q., Corner, G.A., Arañes, M.J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J.M., Augenlicht, L.H., 2004. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* 91, 1931–1946.
- Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S–325S.
- Azmi, A.S., Ali, S., Banerjee, S., Bao, B., Maitah, M.N., Padhye, S., Philip, P.A., Mohammad, R.M., Sarkar, F.H., 2011. Network modeling of CDF treated pancreatic cancer cells reveals a novel c-myc-p73 dependent apoptotic mechanism. *Am. J. Transl. Res.* 3, 374–382.
- Balin-Gauthier, D., Delord, J.-P., Pillaire, M.-J., Rochaix, P., Hoffman, J.-S., Bugat, R., Cazaux, C., Canal, P., Allal, B.C., 2008. Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br. J. Cancer* 98, 120–128.
- Banerjee, S., Wang, Z., Kong, D., Sarkar, F.H., 2009. 3,3'-Diindolylmethane enhances chemosensitivity of multiple chemotherapeutic agents in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69, 5592–5600.
- Baudelet, P.-H., Gagez, A.-L., Bérard, J.-B., Juin, C., Bridiau, N., Kaas, R., Thiéry, V., Cadoret, J.-P., Picot, L., 2013. Antiproliferative Activity of Cyanophora paradoxa Pigments in Melanoma, Breast and Lung Cancer Cells. *Mar. Drugs* 11, 4390–4406.
- Baxter, R.C., 2014. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat. Rev. Cancer* 14, 329–341.

- Becker, K., Pancoska, P., Concin, N., Vanden Heuvel, K., Slade, N., Fischer, M., Chalas, E., Moll, U.M., 2006. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int. J. Oncol.* 29, 889–902.
- Beitzinger, M., Oswald, C., Beinoraviciute-Kellner, R., Stiewe, T., 2006. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. *Oncogene* 25, 813–826.
- Belloni, L., Moretti, F., Merlo, P., Damalas, A., Costanzo, A., Blandino, G., Levrero, M., 2006. DNp73alpha protects myogenic cells from apoptosis. *Oncogene* 25, 3606–3612.
- Bergers, G., Hanahan, D., 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603.
- Beydoun, H.A., Shroff, M.R., Mohan, R., Beydoun, M.A., 2011. Associations of serum vitamin A and carotenoid levels with markers of prostate cancer detection among US men. *Cancer Causes Control CCC* 22, 1483–1495.
- Boeckler, F.M., Joerger, A.C., Jaggi, G., Rutherford, T.J., Veprintsev, D.B., Fersht, A.R., 2008. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10360–10365.
- Bourdon, J.-C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Lane, D.P., 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–2137.
- Broadhead, M.L., Dass, C.R., Choong, P.F.M., 2009. Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: prospects for therapy. *Trends Mol. Med.* 15, 461–467.
- Buhlmann, S., Pützer, B.M., 2008. DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 207–216.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Zache, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Bergman, J., Selivanova, G., Wiman, K.G., 2005. Reactivation of Mutant p53 and Induction of Apoptosis in Human Tumor Cells by Maleimide Analogs. *J. Biol. Chem.* 280, 30384–30391.
- Candi, E., Agostini, M., Melino, G., Bernassola, F., 2014. How the TP53 Family Proteins TP63 and TP73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors. *Hum. Mutat.*
- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., Romani, M., 2002. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.* 9, 246–251.
- Castillo, J., Goñi, S., Latasa, M.U., Perugorría, M.J., Calvo, A., Muntané, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Prieto, J., Avila, M.A., Berasain, C., 2009. Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology* 137, 1805–1815.e1–4.

- Cheung, K.L., Khor, T.O., Yu, S., Kong, A.-N.T., 2008. PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. *AAPS J.* 10, 277–281.
- Chiappori, A.A., Soliman, H., Janssen, W.E., Antonia, S.J., Gabrilovich, D.I., 2010. INGN-225: a dendritic cell-based p53 vaccine (Ad.p53-DC) in small cell lung cancer: observed association between immune response and enhanced chemotherapy effect. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10, 983–991.
- Chiu, B.C.-H., Kwon, S., Evens, A.M., Surawicz, T., Smith, S.M., Weisenburger, D.D., 2011. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control CCC* 22, 1183–1195.
- Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55.
- Christopherson, R.I., Mactier, S., Almazi, J.G., Kohnke, P.L., Best, O.G., Mulligan, S.P., 2014. Mechanisms of action of fludarabine nucleoside against human Raji lymphoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33, 375–383.
- Chung, C.S., Jiang, Y., Cheng, D., Birt, D.F., 2007. Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol. Carcinog.* 46, 773–782.
- Coates, P.J., 2006. Regulating p73 isoforms in human tumours. *J. Pathol.* 210, 385–389.
- Comstock, G.W., Alberg, A.J., Huang, H.-Y., Wu, K., Burke, A.E., Hoffman, S.C., Norkus, E.P., Gross, M., Cutler, R.G., Morris, J.S., Spate, V.L., Helzlsouer, K.J., 2008. The Risk of Developing Lung Cancer Associated with Antioxidants in the Blood: Ascorbic Acids, Carotenoids, α -Tocopherol, Selenium, and Total Peroxyl Radical Absorbing Capacity. *Am. J. Epidemiol.* 168, 831–840.
- Concin, N., Hofstetter, G., Berger, A., Gehmacher, A., Reimer, D., Watrowski, R., Tong, D., Schuster, E., Hefler, L., Heim, K., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Moll, U.M., Zeimet, A.G., Zeillinger, R., 2005. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 8372–8383.
- Coss, A., Tosetto, M., Fox, E.J., Sapetto-Rebow, B., Gorman, S., Kennedy, B.N., Lloyd, A.T., Hyland, J.M., O'Donoghue, D.P., Sheahan, K., Leahy, D.T., Mulcahy, H.E., O'Sullivan, J.N., 2009. Increased topoisomerase II α expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. *Cancer Lett.* 276, 228–238.
- Coutandin, D., Löhr, F., Niesen, F.H., Ikeya, T., Weber, T.A., Schäfer, B., Zielonka, E.M., Bullock, A.N., Yang, A., Güntert, P., Knapp, S., McKeon, F., Ou, H.D., Dötsch, V., 2009.

- Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ.* 16, 1582–1589.
- Crichton, D., O'Prey, J., Bell, H.S., Ryan, K.M., 2007. p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14, 1071–1079.
- Cross-Knorr, S., Lu, S., Perez, K., Guevara, S., Brilliant, K., Pisano, C., Quesenberry, P.J., Resnick, M.B., Chatterjee, D., 2013. RKIP phosphorylation and STAT3 activation is inhibited by oxaliplatin and camptothecin and are associated with poor prognosis in stage II colon cancer patients. *BMC Cancer* 13, 463.
- Dar, A.A., Belkhir, A., Ecsedy, J., Zaika, A., El-Rifai, W., 2008. Aurora kinase A inhibition leads to p73-dependent apoptosis in p53-deficient cancer cells. *Cancer Res.* 68, 8998–9004.
- Das, R., Bhattacharya, K., Sarkar, S., Samanta, S.K., Pal, B.C., Mandal, C., 2014. Mahanine synergistically enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil through ROS-mediated activation of PTEN and p53/p73 in colon carcinoma. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 149–164.
- Decrion-Barthod, A.-Z., Bosset, M., Plissonnier, M.-L., Marchini, A., Nicolier, M., Launay, S., Prétet, J.-L., Rommelaere, J., Mougin, C., 2010. Sodium butyrate with UCN-01 has marked antitumour activity against cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 30, 4049–4061.
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M., Melino, G., 1998. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J. Exp. Med.* 188, 1763–1768.
- De Laurenzi, V.D., Catani, M.V., Terrinoni, A., Corazzari, M., Melino, G., Costanzo, A., Levrero, M., Knight, R.A., 1999. Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ.* 6, 389–390.
- Demma, M., Maxwell, E., Ramos, R., Liang, L., Li, C., Hesk, D., Rossman, R., Mallams, A., Doll, R., Liu, M., Seidel-Dugan, C., Bishop, W.R., Dasmahapatra, B., 2010. SCH529074, a small molecule activator of mutant p53, which binds p53 DNA binding domain (DBD), restores growth-suppressive function to mutant p53 and interrupts HDM2-mediated ubiquitination of wild type p53. *J. Biol. Chem.* 285, 10198–10212.
- Díaz, R., González-Sancho, J.M., Soldevilla, B., Silva, J., García, J.M., García, V., Peña, C., Herrera, M., Gómez, I., Bonilla, F., Domínguez, G., 2010. Differential regulation of TP73 isoforms by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and survivin in human colon and breast carcinomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 49, 1135–1142.
- Díaz, R., Peña, C., Silva, J., Lorenzo, Y., García, V., García, J.M., Sánchez, A., Espinosa, P., Yuste, R., Bonilla, F., Domínguez, G., 2008. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression

- in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int. J. Cancer* 123, 1060–1067.
- Di, C.-X., Yang, L.-N., Zhang, H., An, L.-Z., Zhang, X., Ma, X.-F., Sun, C., Wang, X.-H., Yang, R., Wu, Z.-H., Si, J., 2013. Effects of carbon-ion beam or X-ray irradiation on anti-apoptosis Δ Np73 expression in HeLa cells. *Gene* 515, 208–213.
- Di, C., Yang, L., Zhang, H., Ma, X., Zhang, X., Sun, C., Li, H., Xu, S., An, L., Li, X., Bai, Z., 2013. Mechanisms, function and clinical applications of DNp73. *Cell Cycle* 12, 1861–1867.
- Dillard, A.C., Lane, M.A., 2008. Retinol Increases beta-catenin-RXRalpha binding leading to the increased proteasomal degradation of beta-catenin and RXRalpha. *Nutr. Cancer* 60, 97–108.
- Ding, Z.-B., Hui, B., Shi, Y.-H., Zhou, J., Peng, Y.-F., Gu, C.-Y., Yang, H., Shi, G.-M., Ke, A.-W., Wang, X.-Y., Song, K., Dai, Z., Shen, Y.-H., Fan, J., 2011. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6229–6238.
- Domínguez, G., García, J.M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M.E., Rivera, J.A., García-Andrade, C., Bonilla, F., 2006a. Δ TAp73 Upregulation Correlates With Poor Prognosis in Human Tumors: Putative In Vivo Network Involving p73 Isoforms, p53, and E2F-1. *J. Clin. Oncol.* 24, 805–815.
- Domínguez, G., García, J.M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M.E., Rivera, J.A., García-Andrade, C., Bonilla, F., 2006b. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 805–815.
- Domínguez, G., Peña, C., Silva, J., García, J.M., García, V., Rodríguez, R., Cantos, B., Citores, M.J., España, P., Bonilla, F., 2006. The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas. *J. Pathol.* 210, 390–397.
- Dubois, E.A., Cohen, A.F., 2009. Panitumumab. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68, 482–483.
- Dulloo, I., Gopalan, G., Melino, G., Sabapathy, K., 2010. The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4902–4907.
- Ellis, L.M., 2006. Mechanisms of Action of Bevacizumab as a Component of Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Semin. Oncol.* 33, S1–S7.
- Ellis, L.M., Hicklin, D.J., 2008. Pathways Mediating Resistance to Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* 14, 6371–6375.

- Emmrich, S., Wang, W., John, K., Li, W., Pützer, B.M., 2009. Antisense gapmers selectively suppress individual oncogenic p73 splice isoforms and inhibit tumor growth in vivo. *Mol. Cancer* 8, 61.
- Engelmann, D., Meier, C., Alla, V., Pützer, B.M., 2014. A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene* 0.
- Farrand, L., Byun, S., Kim, J.Y., Im-Aram, A., Lee, J., Lim, S., Lee, K.W., Suh, J.-Y., Lee, H.J., Tsang, B.K., 2013. Piceatannol enhances cisplatin sensitivity in ovarian cancer via modulation of p53, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), and mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 288, 23740–23750.
- Fichtner, I., Slisow, W., Gill, J., Becker, M., Elbe, B., Hillebrand, T., Bibby, M., 2004. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 40, 298–307.
- Fillipovich, I., Sorokina, N., Gatei, M., Haupt, Y., Hobson, K., Moallem, E., Spring, K., Mould, M., McGuckin, M.A., Lavin, M.F., Khanna, K.K., 2001. Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* 20, 514–522.
- Flis, S., Gnyszka, A., Misiewicz-Krzemińska, I., Sptławiński, J., 2009. Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205. *Cancer Cell Int.* 9, 10.
- Flis, S., Sptławiński, J., 2009. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res.* 29, 435–441.
- Fontemaggi, G., Gurtner, A., Strano, S., Higashi, Y., Sacchi, A., Piaggio, G., Blandino, G., 2001. The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8461–8470.
- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J., Rastinejad, F., 1999. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286, 2507–2510.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., Willett, W.C., 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331, 1669–1674.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., Prives, C., 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1874–1887.
- Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Morel, A., Poirier, A.L., Berger, V., Gamelin, E., Tournigand, C., de Gramont, A., 2008. Oxaliplatin-related neurotoxicity: interest of calcium-magnesium

- infusion and no impact on its efficacy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1188–1189; author reply 1189–1190.
- Gonzalez-Cano, L., Hillje, A.-L., Fuertes-Alvarez, S., Marques, M.M., Blanch, A., Ian, R.W., Irwin, M.S., Schwamborn, J.C., Marín, M.C., 2013. Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. *Cell Death Dis.* 4, e704.
- González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., de la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., García-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G., Ramírez de Molina, A., 2013. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 72, 61–68.
- Gordaliza, M., 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 9, 767–776.
- Gourdier, I., Del Rio, M., Crabbé, L., Candeil, L., Copois, V., Ychou, M., Auffray, C., Martineau, P., Mechti, N., Pommier, Y., Pau, B., 2002. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* 529, 232–236.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Rojas-Hidalgo, E., 1996. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 246–250.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., 2010. Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids). *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1389–1393.
- Granado-Lorencio, F., Lagarda, M.J., Garcia-López, F.J., Sánchez-Siles, L.M., Blanco-Navarro, I., Alegría, A., Pérez-Sacristán, B., Garcia-Llatas, G., Donoso-Navarro, E., Silvestre-Mardomingo, R.A., Barberá, R., 2014. Effect of β -cryptoxanthin plus phytosterols on cardiovascular risk and bone turnover markers in post-menopausal women: a randomized crossover trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 24, 1090–1096.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Blázquez-García, S., Pérez-Sacristán, B., 2006. Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: application in clinical assessments. *Clin. Biochem.* 39, 180–182.
- Grob, T.J., Novak, U., Maisse, C., Barcaroli, D., Lüthi, A.U., Pirnia, F., Hügli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., Melino, G., Tobler, A., 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* 8, 1213–1223.
- Guan, M., Chen, Y., 2005. Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score. *J. Clin. Pathol.* 58, 1175–1179.

- Guo, L., Shen, Y.-Q., Zhao, X.-H., Guo, L.-J., Yu, Z.-J., Wang, D., Liu, L.-M., Liu, J.-Z., 2014. Curcumin Combined with Oxaliplatin Effectively Suppress Colorectal Carcinoma in vivo Through Inducing Apoptosis. *Phytother. Res. PTR*.
- Hamilton, G., Abraham, A.G., Morton, J., Sampson, O., Pefani, D.E., Khoronenkova, S., Grawenda, A., Papaspyropoulos, A., Jamieson, N., McKay, C., Sansom, O., Dianov, G.L., O'Neill, E., 2014. AKT regulates NPM dependent ARF localization and p53mut stability in tumors. *Oncotarget* 5, 6142–6167.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Han, C.H., Khwaounjoo, P., Kilfoyle, D.H., Hill, A., McKeage, M.J., 2013. Phase I drug-interaction study of effects of calcium and magnesium infusions on oxaliplatin pharmacokinetics and acute neurotoxicity in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 13, 495.
- Hector, S., Bolanowska-Higdon, W., Zdanowicz, J., Hitt, S., Pendyala, L., 2001. In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 48, 398–406.
- Herreros-Villanueva, M., Muñiz, P., García-Girón, C., Cavia-Saiz, M., del Corral, M.J.C., 2010. TAp73 is one of the genes responsible for the lack of response to chemotherapy depending on B-Raf mutational status. *J. Transl. Med.* 8, 15.
- Herzog, A., Bian, Y., Vander Broek, R., Hall, B., Coupar, J., Cheng, H., Sowers, A.L., Cook, J.D., Mitchell, J.B., Chen, Z., Kulkarni, A.B., Van Waes, C., 2013. PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 antitumor activity is enhanced with induction of wild-type TP53 in human xenograft and murine knockout models of head and neck cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 3808–3819.
- He, Z., Liu, H., Agostini, M., Yousefi, S., Perren, A., Tschan, M.P., Mak, T.W., Melino, G., Simon, H.U., 2013. p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene. *Cell Death Differ.* 20, 1415–1424.
- Hochster, H.S., Grothey, A., Childs, B.H., 2007. Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 4028–4029.
- Hogan, F.S., Krishnegowda, N.K., Mikhailova, M., Kahlenberg, M.S., 2007. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J. Surg. Res.* 143, 58–65.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G., 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714–726.
- Hong, B., Prabhu, V.V., Zhang, S., van den Heuvel, A.P.J., Dicker, D.T., Kopelovich, L., El-Deiry, W.S., 2014. Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. *Cancer Res.* 74, 1153–1165.

Howells, L.M., Sale, S., Sriramareddy, S.N., Irving, G.R.B., Jones, D.J.L., Ottley, C.J., Pearson, D.G., Mann, C.D., Manson, M.M., Berry, D.P., Gescher, A., Steward, W.P., Brown, K., 2011. Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 129, 476–486.

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

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

Huang, W.-C., Hung, M.-C., 2009. Induction of Akt Activity by Chemotherapy Confers Acquired Resistance. *J. Formos. Med. Assoc.* 108, 180–194. doi:10.1016/S0929-6646(09)60051-6

Hung, R.J., Zhang, Z.-F., Rao, J.Y., Pantuck, A., Reuter, V.E., Heber, D., Lu, Q.-Y., 2006. Protective Effects of Plasma Carotenoids on the Risk of Bladder Cancer. *J. Urol.* 176, 1192–1197.

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

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

Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G.G.C., Masucci, M., Pramanik, A., Selivanova, G., 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.* 10, 1321–1328.

Ito, Y., Uramoto, H., Funa, K., Yoshida, H., Jikuzono, T., Asahi, S., Higashiyama, T., Tomoda, C., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Kuma, K., Miyauchi, A., 2006. Delta Np73 expression in thyroid neoplasms originating from follicular cells. *Pathology (Phila.)* 38, 205–209.

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

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W., 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058.

Jenab, M., Riboli, E., Ferrari, P., Friesen, M., Sabate, J., Norat, T., Slimani, N., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Boutron-Ruault, M.-C., Clavel-Chapelon, F., Boeing, H., Schulz, M., Linseisen, J., Nagel, G., Trichopoulou, A., Naska, A., Oikonomou, E., Berrino, F., Panico, S., Palli, D., Sacerdote, C., Tumino, R., Peeters, P.H., Numans, M.E., Bueno-de-Mesquita, H.B., Büchner, F.L., Lund, E., Pera, G., Chirlaque, M.D., Sánchez, M.-J., Arriola, L., Barricarte, A., Quirós, J.R., Johansson, I., Johansson, A., Berglund, G., Bingham, S., Khaw, K.-T., Allen, N., Key, T., Carneiro, F., Save, V., Giudice, G.D., Plebani, M., Kaaks, R., Gonzalez, C.A., 2006.

- Plasma and dietary carotenoid, retinol and tocopherol levels and the risk of gastric adenocarcinomas in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Br. J. Cancer* 95, 406–415.
- Jiang, P., Du, W., Yang, X., 2013. p53 and regulation of tumor metabolism. *J. Carcinog.* 12.
- Jin, F., Ji, H., Jia, C., Brockmeier, U., Hermann, D.M., Metzen, E., Zhu, Y., Chi, B., 2012. Synergistic antitumor effects of endostar in combination with oxaliplatin via inhibition of HIF and CXCR4 in the colorectal cell line SW1116. *PloS One* 7, e47161.
- Joerger, A.C., Rajagopalan, S., Natan, E., Veprintsev, D.B., Robinson, C.V., Fersht, A.R., 2009. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17705–17710.
- John, K., Alla, V., Meier, C., Pützer, B.M., 2011. GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell Death Differ.* 18, 874–886.
- Johnson, R.A., Shepard, E.M., Scotto, K.W., 2005. Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. Role of the DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 280, 13213–13219.
- Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., Leichman, L., 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 55, 1407–1412.
- Jost, C.A., Marin, M.C., Kaelin, W.G., 1997. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191–194.
- Kabat, G.C., Kim, M.Y., Sarto, G.E., Shikany, J.M., Rohan, T.E., 2012. Repeated measurements of serum carotenoid, retinol and tocopherol levels in relation to colorectal cancer risk in the Women’s Health Initiative. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 549–554.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., Caput, D., 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809–819.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339.
- Katayama, H., Wang, J., Treekitkarnmongkol, W., Kawai, H., Sasai, K., Zhang, H., Wang, H., Adams, H.P., Jiang, S., Chakraborty, S.N., Suzuki, F., Arlinghaus, R.B., Liu, J., Mobley, J.A., Grizzle,

- W.E., Wang, H., Sen, S., 2012. Aurora kinase-A inactivates DNA damage-induced apoptosis and spindle assembly checkpoint response functions of p73. *Cancer Cell* 21, 196–211.
- Kato, T., Kolenic, N., Pardini, R.S., 2007. Docosahexaenoic acid (DHA), a primary tumor suppressive omega-3 fatty acid, inhibits growth of colorectal cancer independent of p53 mutational status. *Nutr. Cancer* 58, 178–187.
- Kim, H.-J., Kim, S.-K., Kim, B.-S., Lee, S.-H., Park, Y.-S., Park, B.-K., Kim, S.-J., Kim, J., Choi, C., Kim, J.-S., Cho, S.-D., Jung, J.-W., Roh, K.-H., Kang, K.-S., Jung, J.-Y., 2010. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8643–8650.
- Kim, J.-M., Kim, J.-S., Yoo, H., Choung, M.-G., Sung, M.-K., 2008. Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8427–8433.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., 1991. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366–1370.
- Kirkpatrick, P., Graham, J., Muhsin, M., 2004. Cetuximab. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 549–550.
- Klanrit, P., Taebunpakul, P., Flinterman, M.B., Odell, E.W., Riaz, M.A., Melino, G., Salomoni, P., Mymryk, J.S., Gäken, J., Farzaneh, F., Tavassoli, M., 2009. PML involvement in the p73-mediated E1A-induced suppression of EGFR and induction of apoptosis in head and neck cancers. *Oncogene* 28, 3499–3512.
- Klarod, K., Hongsprabhas, P., Khampitak, T., Wirasorn, K., Kiertiburanakul, S., Tangrassameeprasert, R., Daduang, J., Yongvanit, P., Boonsiri, P., 2011. Serum antioxidant levels and nutritional status in early and advanced stage lung cancer patients. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 27, 1156–1160.
- Kohno, H., Taima, M., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H., Tanaka, T., 2001. Inhibitory effect of mandarin juice rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer Lett.* 174, 141–150.
- Ko, J.-C., Su, Y.-J., Lin, S.-T., Jhan, J.-Y., Ciou, S.-C., Cheng, C.-M., Chiu, Y.-F., Kuo, Y.-H., Tsai, M.-S., Lin, Y.-W., 2010. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. *Lung Cancer Amst. Neth.* 69, 155–164.
- Kontaki, H., Talianidis, I., 2010. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* 39, 152–160.
- Kopetz, S., Lesslie, D.P., Dallas, N.A., Park, S.I., Johnson, M., Parikh, N.U., Kim, M.P., Abbruzzese, J.L., Ellis, L.M., Chandra, J., Gallick, G.E., 2009. Synergistic activity of the SRC family kinase

- inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res.* 69, 3842–3849.
- Kravchenko, J.E., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., Agapova, L.S., Kochetkov, D.V., Strom, E., Frolova, E.I., Kovriga, I., Gudkov, A.V., Feinstein, E., Chumakov, P.M., 2008. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6302–6307.
- Kubo, N., Okoshi, R., Nakashima, K., Shimosato, O., Nakagawara, A., Ozaki, T., 2010. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 405–411.
- Kumazoe, M., Sugihara, K., Tsukamoto, S., Huang, Y., Tsurudome, Y., Suzuki, T., Suemasu, Y., Ueda, N., Yamashita, S., Kim, Y., Yamada, K., Tachibana, H., 2013. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. *J. Clin. Invest.* 123, 787–799.
- Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P., Ichwan, S.J.A., Soundharrajan, I., Govindan, N., 2014. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharm. Sin. B* 4, 173–181.
- Lai, K.-C., Hsu, S.-C., Kuo, C.-L., Ip, S.-W., Yang, J.-S., Hsu, Y.-M., Huang, H.-Y., Wu, S.-H., Chung, J.-G., 2010. Phenethyl isothiocyanate inhibited tumor migration and invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human colon cancer HT29 cells. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11148–11155.
- Lapalombella, R., Andritsos, L., Liu, Q., May, S.E., Browning, R., Pham, L.V., Blum, K.A., Blum, W., Ramanunni, A., Raymond, C.A., Smith, L.L., Lehman, A., Mo, X., Jarjoura, D., Chen, C.-S., Ford, R., Rader, C., Muthusamy, N., Johnson, A.J., Byrd, J.C., 2010. Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood* 115, 2619–2629.
- Larsen, C.A., Dashwood, R.H., 2010. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits Met signaling, proliferation, and invasiveness in human colon cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 52–57.
- Lau, L.M.S., Wolter, J.K., Lau, J.T.M.L., Cheng, L.S., Smith, K.M., Hansford, L.M., Zhang, L., Baruchel, S., Robinson, F., Irwin, M.S., 2009. Cyclooxygenase inhibitors differentially modulate p73 isoforms in neuroblastoma. *Oncogene* 28, 2024–2033.
- Lee, A.F., Ho, D.K., Zanassi, P., Walsh, G.S., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2004. Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9174–9184.
- Lenz, H.-J., 2007. Cetuximab in the management of colorectal cancer. *Biol. Targets Ther.* 1, 77–91.

- Leonardi, T., Vanamala, J., Taddeo, S.S., Davidson, L.A., Murphy, M.E., Patil, B.S., Wang, N., Carroll, R.J., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2010. Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 235, 710–717.
- Leung, T.H.-Y., Ngan, H.Y.-S., 2010. Interaction of TAp73 and breast cancer-associated gene 3 enhances the sensitivity of cervical cancer cells in response to irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 70, 6486–6496.
- Lian, F., Hu, K.-Q., Russell, R.M., Wang, X.-D., 2006. Beta-cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor beta expression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 119, 2084–2089.
- Li, D., Marchenko, N.D., Moll, U.M., 2011. SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ.* 18, 1904–1913.
- Lin, Y., Cheng, Z., Yang, Z., Zheng, J., Lin, T., 2012. DNp73 improves generation efficiency of human induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biol.* 13, 9.
- Lin, Y.-L., Sengupta, S., Gurdziel, K., Bell, G.W., Jacks, T., Flores, E.R., 2009. p63 and p73 Transcriptionally Regulate Genes Involved in DNA Repair. *PLoS Genet.* 5.
- Liu, S.S., Chan, K.Y.-K., Cheung, A.N.-Y., Liao, X.-Y., Leung, T.-W., Ngan, H.Y.-S., 2006. Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 3922–3927.
- Logotheti, S., Michalopoulos, I., Sideridou, M., Daskalos, A., Kossida, S., Spandidos, D.A., Field, J.K., Vojtesek, B., Liloglou, T., Gorgoulis, V., Zoumpourlis, V., 2010. Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73gamma in lung cancer. *FEBS J.* 277, 3014–3027.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M., 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 10, 13–29.
- Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., Vousden, K.H., 2013. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* 493, 542–546.

- Maddocks, O.D.K., Vousden, K.H., 2011. Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 89, 237–245.
- Madka, V., Rao, C.V., 2013. Anti-inflammatory phytochemicals for chemoprevention of colon cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 542–557.
- Magrini, R., Bhonde, M.R., Hanski, M.-L., Notter, M., Scherübl, H., Boland, C.R., Zeitz, M., Hanski, C., 2002. Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 101, 23–31.
- Mann, J., 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer* 2, 143–148.
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., Del Sal, G., 2004. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol. Cell* 14, 625–636.
- Marabese, M., Marchini, S., Sabatino, M.A., Polato, F., Vikhanskaya, F., Marrazzo, E., Riccardi, E., Scanziani, E., Broggin, M., 2005. Effects of inducible overexpression of DNp73alpha on cancer cell growth and response to treatment in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* 12, 805–814.
- Markowitz, S.D., Bertagnolli, M.M., 2009. Molecular Origins of Cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449–2460.
- Massicot, F., Hache, G., David, L., Chen, D., Leuxe, C., Garnier-Legrand, L., Rat, P., Laprévotte, O., Coudoré, F., 2013. P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach. *PLoS One* 8, e66830.
- Mathijssen, R.H.J., Alphen, R.J. van, Verweij, J., Loos, W.J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A., 2001. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* 7, 2182–2194.
- Ma, X., Wang, Z., 2009. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov. Today* 14, 1136–1142.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C., Vousden, K.H., 2004. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J. Biol. Chem.* 279, 8076–8083.
- Melino, G., De Laurenzi, V., Vousden, K.H., 2002. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 605–615.
- Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Lavia, P., Levrero, M., 2005. A role of p73 in mitotic exit. *J. Biol. Chem.* 280, 30354–30360.

- Messersmith, W.A., Hidalgo, M., 2007. Panitumumab, a monoclonal anti epidermal growth factor receptor antibody in colorectal cancer: another one or the one? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 4664–4666.
- Mignone, L.I., Giovannucci, E., Newcomb, P.A., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., Hampton, J.M., Willett, W.C., Egan, K.M., 2009. Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 124, 2929–2937.
- Miyazawa, K., Miyamoto, S., Suzuki, R., Yasui, Y., Ikeda, R., Kohno, H., Yano, M., Tanaka, T., Hata, K., Suzuki, K., 2007. Dietary beta-cryptoxanthin inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Oncol. Rep.* 17, 297–304.
- Moll, U.M., Slade, N., 2004. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res. MCR* 2, 371–386.
- Momeny, M., Zakidizaji, M., Ghasemi, R., Dehpour, A.R., Rahimi-Balaei, M., Abdolazimi, Y., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Ghaffari, S.H., 2010. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and survivin. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 27, 833–842.
- Moser, C., Lang, S.A., Kainz, S., Gaumann, A., Fichtner-Feigl, S., Koehl, G.E., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Stoeltzing, O., 2007. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2868–2878.
- Mühlhölfer, A., 2003. Carotenoids are decreased in biopsies from colorectal adenomas. *Clin. Nutr.* 22, 65–70.
- Müller, M., Schilling, T., Sayan, A.E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H., 2005. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.* 12, 1564–1577.
- Müller, M., Schleithoff, E.S., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H., Schilling, T., 2006. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 9, 288–306.
- Muñoz, A., 2004. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice.
- Nagendraprabhu, P., Sudhandiran, G., 2011. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon

- carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Invest. New Drugs* 29, 207–224.
- Nannizzi, S., Veal, G.J., Giovannetti, E., Mey, V., Ricciardi, S., Ottley, C.J., Del Tacca, M., Danesi, R., 2010. Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 547–558.
- Narisawa, T., Fukaura, Y., Oshima, S., Inakuma, T., Yano, M., Nishino, H., 1999. Chemoprevention by the oxygenated carotenoid beta-cryptoxanthin of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 90, 1061–1065.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H., Satomi, Y., 2009. Cancer prevention by carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 165–168.
- Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuka, N., Yano, M., 2000. Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors Oxf. Engl.* 13, 89–94.
- Noordhuis, P., Holwerda, U., Wilt, C.L.V. der, Groenigen, C.J.V., Smid, K., Meijer, S., Pinedo, H.M., Peters, G.J., 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann. Oncol.* 15, 1025–1032.
- North, S., Pluquet, O., Maurici, D., El-Ghissassi, F., Hainaut, P., 2002. Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothiols WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol. Carcinog.* 33, 181–188.
- Nyman, U., Vlachos, P., Cascante, A., Hermanson, O., Zhivotovsky, B., Joseph, B., 2009. Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1814–1825.
- Oberst, A., Rossi, M., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., Oren, M., Melino, G., Bernassola, F., 2005. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 707–712.
- Ollberding, N.J., Maskarinec, G., Conroy, S.M., Morimoto, Y., Franke, A.A., Cooney, R.V., Wilkens, L.R., Le Marchand, L., Goodman, M.T., Hernandez, B.Y., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., 2012. Prediagnostic circulating carotenoid levels and the risk of non-Hodgkin lymphoma: the Multiethnic Cohort. *Blood* 119, 5817–5823.
- Onoda, C., Kuribayashi, K., Nirasawa, S., Tsuji, N., Tanaka, M., Kobayashi, D., Watanabe, N., 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int. J. Oncol.* 38, 1403–1408.

- Palozza, P., Colangelo, M., Simone, R., Catalano, A., Boninsegna, A., Lanza, P., Monego, G., Ranelletti, F.O., 2010. Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis* 31, 1813–1821.
- Papoutsaki, M., Lanza, M., Marinari, B., Nisticò, S., Moretti, F., Levrero, M., Chimenti, S., Costanzo, A., 2004. The p73 gene is an anti-tumoral target of the RARbeta/gamma-selective retinoid tazarotene. *J. Invest. Dermatol.* 123, 1162–1168.
- Park, C.H., Chang, J.Y., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.-K., Yang, C.H., 2005. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 227–234.
- Park, G.B., Kim, Y.-S., Kim, D., Kim, S., Lee, H.-K., Cho, D.-H., Lee, W.J., Hur, D.Y., 2013. Melphalan-induced apoptosis of EBV-transformed B cells through upregulation of TAp73 and XAF1 and nuclear import of XPA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 6281–6291.
- Park, J.-S., Koh, Y.-S., Bang, J.-Y., Jeong, Y.-I., Lee, J.-J., 2008. Antitumor effect of all-trans retinoic acid-encapsulated nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-conjugated chitosan against CT-26 colon carcinoma in vitro. *J. Pharm. Sci.* 97, 4011–4019.
- Park, S.-Y., Nomura, A.M.Y., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., 2009. Carotenoid Intake and Colorectal Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *J. Epidemiol. Jpn. Epidemiol. Assoc.* 19, 63–71.
- Patel, A., Sun, W., 2013. Ziv-aflibercept in metastatic colorectal cancer. *Biol. Targets Ther.* 8, 13–25.
- Pediconi, N., Guerrieri, F., Vossio, S., Bruno, T., Belloni, L., Schinzari, V., Scisciani, C., Fanciulli, M., Levrero, M., 2009. hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1989–1998.
- Peng, Y., Li, C., Chen, L., Sebt, S., Chen, J., 2003. Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene* 22, 4478–4487.
- Petitprez, A., Larsen, A.K., 2013. Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models. *Curr. Pharm. Des.* 19, 958–964.
- Petrenko, O., Zaika, A., Moll, U.M., 2003. deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5540–5555.
- Pflaum, J., Schlosser, S., Müller, M., 2014. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front. Oncol.* 4, 285.
- Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B., Murphy, M.E., 2008. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507–6521.

- Pipaon, C., Real, P.J., Fernandez-Luna, J.L., 2005. Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Lett.* 579, 4610–4614.
- Plumb, J.A., Milroy, R., Kaye, S.B., 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49, 4435–4440.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2000. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 289, 304–306.
- Raab, M.S., Breitskreutz, I., Tonon, G., Zhang, J., Hayden, P.J., Nguyen, T., Fruehauf, J.H., Lin, B.K., Chauhan, D., Hideshima, T., Munshi, N.C., Anderson, K.C., Podar, K., 2009. Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood* 113, 1513–1521.
- Rajamanickam, S., Velmurugan, B., Kaur, M., Singh, R.P., Agarwal, R., 2010. Chemoprevention of intestinal tumorigenesis in APCmin/+ mice by silibinin. *Cancer Res.* 70, 2368–2378.
- Rastogi, S., Rizwani, W., Joshi, B., Kunigal, S., Chellappan, S.P., 2012. TNF- α response of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells involve differential utilization of ASK1 kinase and p73. *Cell Death Differ.* 19, 274–283.
- Ray, R.M., Bhattacharya, S., Johnson, L.R., 2011. Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 16, 35–44.
- Rizzo, M.G., Giombini, E., Diverio, D., Vignetti, M., Sacchi, A., Testa, U., Lo-Coco, F., Blandino, G., 2004. Analysis of p73 expression pattern in acute myeloid leukemias: lack of DeltaN-p73 expression is a frequent feature of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 18, 1804–1809.
- Rökaeus, N., Shen, J., Eckhardt, I., Bykov, V.J.N., Wiman, K.G., Wilhelm, M.T., 2010. PRIMA-1(MET)/APR-246 targets mutant forms of p53 family members p63 and p73. *Oncogene* 29, 6442–6451.
- Rosenbluth, J.M., Mays, D.J., Pino, M.F., Tang, L.J., Pietenpol, J.A., 2008. A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5951–5964.
- Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y.-C., Vousden, K.H., Cesareni, G., Melino, G., 2005. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* 24, 836–848.
- Rudolf, E., Andelová, H., Cervinka, M., 2009. Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47, 2366–2373.

- Saha, M.N., Qiu, L., Chang, H., 2013. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 6, 23.
- Sampath, D., Calin, G.A., Puduvali, V.K., Gopisetty, G., Taccioli, C., Liu, C.-G., Ewald, B., Liu, C., Keating, M.J., Plunkett, W., 2009. Specific activation of microRNA106b enables the p73 apoptotic response in chronic lymphocytic leukemia by targeting the ubiquitin ligase Itch for degradation. *Blood* 113, 3744–3753.
- Samuel, T., Fadlalla, K., Gales, D.N., Putcha, B.D.K., Manne, U., 2014. Variable NF- κ B pathway responses in colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. *BMC Cancer* 14, 599.
- Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Cárdeno, A., Talero, E., Sánchez-Hidalgo, M., Motilva, V., Alarcón de la Lastra, C., 2010. Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 29, 663–673.
- Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V.J., Servitja, J.-M., Gutkind, J.S., 2002. Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* 21, 974–979.
- Sang, M., Li, Y., Ozaki, T., Ono, S., Ando, K., Yamamoto, H., Koda, T., Geng, C., Nakagawara, A., 2006. p73-dependent induction of 14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 327–333.
- Sasaki, Y., Mita, H., Toyota, M., Ishida, S., Morimoto, I., Yamashita, T., Tanaka, T., Imai, K., Nakamura, Y., Tokino, T., 2003. Identification of the interleukin 4 receptor alpha gene as a direct target for p73. *Cancer Res.* 63, 8145–8152.
- Sasaki, Y., Naishiro, Y., Oshima, Y., Imai, K., Nakamura, Y., Tokino, T., 2005. Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* 24, 5131–5136.
- Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A.M., 2010. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 116–122.
- Sayan, B.S., Yang, A.L., Conforti, F., Tucci, P., Piro, M.C., Browne, G.J., Agostini, M., Bernardini, S., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., 2010. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12877–12882.
- Schipper, H., Alla, V., Meier, C., Nettelbeck, D.M., Herchenröder, O., Pützer, B.M., 2014. Eradication of metastatic melanoma through cooperative expression of RNA-based HDAC1 inhibitor and p73 by oncolytic adenovirus. *Oncotarget* 5, 5893–5907.
- Schmale, H., Bamberger, C., 1997. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 15, 1363–1367.

- Schmieder, R., Hoffmann, J., Becker, M., Bhargava, A., Müller, T., Kahmann, N., Ellinghaus, P., Adams, R., Rosenthal, A., Thierauch, K.-H., Scholz, A., Wilhelm, S.M., Zopf, D., 2014. Regorafenib (BAY 73-4506): Antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 135, 1487–1496.
- Scian, M.J., Carchman, E.H., Mohanraj, L., Stagliano, K.E.R., Anderson, M. a. E., Deb, D., Crane, B.M., Kiyono, T., Windle, B., Deb, S.P., Deb, S., 2008. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene* 27, 2583–2593.
- Seelan, R.S., Irwin, M., van der Stoop, P., Qian, C., Kaelin, W.G., Jr, Liu, W., 2002. The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia N. Y. N* 4, 195–203.
- Shangary, S., Qin, D., McEachern, D., Liu, M., Miller, R.S., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Ding, K., Wang, G., Chen, J., Bernard, D., Zhang, J., Lu, Y., Gu, Q., Shah, R.B., Pienta, K.J., Ling, X., Kang, S., Guo, M., Sun, Y., Yang, D., Wang, S., 2008. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3933–3938.
- Sharif, T., Auger, C., Alhosin, M., Ebel, C., Achour, M., Etienne-Selloum, N., Fuhrmann, G., Bronner, C., Schini-Kerth, V.B., 2010. Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by inducing a redox-sensitive up-regulation of p73 and down-regulation of UHRF1. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 46, 983–994.
- Sharpe, C.R., Siemiatycki, J.A., Rachet, B.P., 2002a. The effects of smoking on the risk of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 45, 1041–1050.
- Sharpe, C.R., Siemiatycki, J., Rachet, B., 2002b. Effects of alcohol consumption on the risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite (Canada). *Cancer Causes Control CCC* 13, 483–491.
- Shen, G., Khor, T.O., Hu, R., Yu, S., Nair, S., Ho, C.-T., Reddy, B.S., Huang, M.-T., Newmark, H.L., Kong, A.-N.T., 2007. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by natural dietary compounds sulforaphane and dibenzoylmethane alone and in combination in *ApcMin/+* mouse. *Cancer Res.* 67, 9937–9944.
- Sherr, C.J., Weber, J.D., 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94–99.
- Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R.D., Wang, J.Y.J., 2003. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2420–2425.
- Siegel, E.M., Salemi, J.L., Villa, L.L., Ferenczy, A., Franco, E.L., Giuliano, A.R., 2010. Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 118, 289–294.

- Simões-Wüst, A.P., Sigrist, B., Belyanskaya, L., Hopkins Donaldson, S., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U., 2005. DeltaNp73 antisense activates PUMA and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *J. Neurooncol.* 72, 29–34.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Soldevilla, B., Díaz, R., Silva, J., Campos-Martín, Y., Muñoz, C., García, V., García, J.M., Peña, C., Herrera, M., Rodriguez, M., Gómez, I., Mohamed, N., Marques, M.M., Bonilla, F., Domínguez, G., 2011. Prognostic Impact of Δ TAp73 Isoform Levels and Their Target Genes in Colon Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 17, 6029–6039.
- Soldevilla, B., Millán, C.S., Bonilla, F., Domínguez, G., 2013. The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer? *Genes. Chromosomes Cancer* 52, 989–1006.
- Speetjens, F.M., Kuppen, P.J.K., Welters, M.J.P., Essahsah, F., Voet van den Brink, A.M.E.G., Lantrua, M.G.K., Valentijn, A.R.P.M., Oostendorp, J., Fathors, L.M., Nijman, H.W., Drijfhout, J.W., van de Velde, C.J.H., Melief, C.J.M., van der Burg, S.H., 2009. Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 1086–1095.
- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B., 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75, 951–957.
- Stearns, M.E., Wang, M., 2011. Synergistic Effects of the Green Tea Extract Epigallocatechin-3-gallate and Taxane in Eradication of Malignant Human Prostate Tumors. *Transl. Oncol.* 4, 147–156.
- Steder, M., Alla, V., Meier, C., Spitschak, A., Pahnke, J., Fürst, K., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Petigk, J., Egberts, F., Schäd-Trcka, S.G., Gross, G., Nettelbeck, D.M., Niemetz, A., Pützer, B.M., 2013. DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. *Cancer Cell* 24, 512–527.
- Stegh, A.H., 2012. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 67–83.
- Stein, A., Arnold, D., 2012. Oxaliplatin: a review of approved uses. *Expert Opin. Pharmacother.* 13, 125–137.
- Stiewe, T., Pützer, B.M., 2000. Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* 26, 464–469.
- Stiewe, T., Tuve, S., Peter, M., Tannapfel, A., Elmaagacli, A.H., Pützer, B.M., 2004. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 626–633.

- Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H., Pützer, B.M., 2002. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res.* 62, 3598–3602.
- Stram, D.O., Yuan, J.-M., Chan, K.K., Gao, Y.-T., Ross, R.K., Yu, M.C., 2007. Beta-cryptoxanthin and lung cancer in Shanghai, China--an examination of potential confounding with cigarette smoking using urinary cotinine as a biomarker for true tobacco exposure. *Nutr. Cancer* 57, 123–129.
- Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccarini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., Del Sal, G., Levrero, M., Blandino, G., 2005. The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol. Cell* 18, 447–459.
- Su, C.-C., Lin, J.-G., Li, T.-M., Chung, J.-G., Yang, J.-S., Ip, S.-W., Lin, W.-C., Chen, G.-W., 2006. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 26, 4379–4389.
- Sun, X.-F., 2002. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 165–170.
- Symolon, H., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Merrill, A.H., 2004. Dietary soy sphingolipids suppress tumorigenesis and gene expression in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice and ApcMin/+ mice. *J. Nutr.* 134, 1157–1161.
- Ta, L.E., Low, P.A., Windebank, A.J., 2009. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol. Pain* 5, 9.
- Talos, F., Nemajerova, A., Flores, E.R., Petrenko, O., Moll, U.M., 2007. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol. Cell* 27, 647–659.
- Tamimi, R.M., Colditz, G.A., Hazra, A., Baer, H.J., Hankinson, S.E., Rosner, B., Marotti, J., Connolly, J.L., Schnitt, S.J., Collins, L.C., 2012. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 159–167.
- Tamimi, R.M., Hankinson, S.E., Campos, H., Spiegelman, D., Zhang, S., Colditz, G.A., Willett, W.C., Hunter, D.J., 2005. Plasma Carotenoids, Retinol, and Tocopherols and Risk of Breast Cancer. *Am. J. Epidemiol.* 161, 153–160.
- Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H., 2000. Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 88, 146–150.
- Tanaka, T., Tanaka, T., Tanaka, M., Kuno, T., 2012. Cancer Chemoprevention by Citrus Pulp and Juices Containing High Amounts of β -Cryptoxanthin and Hesperidin. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.

- Tebbi, A., Guittet, O., Cottet, M.-H., Vesin, M.-F., Lepoivre, M., 2011. TAp73 induction by nitric oxide: regulation by checkpoint kinase 1 (CHK1) and protection against apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 7873–7884.
- Temraz, S., Mukherji, D., Alameddine, R., Shamseddine, A., 2014. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 217–230.
- Testoni, B., Schinzari, V., Guerrieri, F., Gerbal-Chaloin, S., Blandino, G., Levrero, M., 2011. p53-paralog DNp73 oncogene is repressed by IFN α /STAT2 through the recruitment of the Ezh2 polycomb group transcriptional repressor. *Oncogene* 30, 2670–2678.
- Tiwary, R., Yu, W., Sanders, B.G., Kline, K., 2011. α -TEA cooperates with chemotherapeutic agents to induce apoptosis of p53 mutant, triple-negative human breast cancer cells via activating p73. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R1.
- Toh, W.H., Siddique, M.M., Boominathan, L., Lin, K.W., Sabapathy, K., 2004. c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. *J. Biol. Chem.* 279, 44713–44722.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S.K., Wilhelm, M., Ruffini, A., Tsao, M., Iovanna, J.L., Jurisicova, A., Melino, G., Mak, T.W., 2009. TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 797–802.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Ruffini, A., Cheung, C.C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M.-S., Iovanna, J.L., Squire, J., Jurisica, I., Kaplan, D., Melino, G., Jurisicova, A., Mak, T.W., 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 22, 2677–2691.
- Tomlinson, V., Gudmundsdottir, K., Luong, P., Leung, K.-Y., Knebel, A., Basu, S., 2010. JNK phosphorylates Yes-associated protein (YAP) to regulate apoptosis. *Cell Death Dis.* 1, e29.
- Toscano, F., Parmentier, B., Fajoui, Z.E., Estornes, Y., Chayvialle, J.-A., Saurin, J.-C., Abello, J., 2007. p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 74, 392–406.
- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J., Sidransky, D., 1998. A new human p53 homologue. *Nat. Med.* 4, 747–748.
- Tsai, K.K.C., Yuan, Z.-M., 2003. c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res.* 63, 3418–3424.
- Tung, K.-H., Wilkens, L.R., Wu, A.H., McDuffie, K., Hankin, J.H., Nomura, A.M.Y., Kolonel, L.N., Goodman, M.T., 2005. Association of Dietary Vitamin A, Carotenoids, and Other Antioxidants with the Risk of Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 669–676.
- Uramoto, H., Izumi, H., Nagatani, G., Ohmori, H., Nagasue, N., Ise, T., Yoshida, T., Yasumoto, K., Kohno, K., 2003. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding

- transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. *Biochem. J.* 371, 301–310.
- Uramoto, H., Sugio, K., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Morita, M., Funa, K., Yasumoto, K., 2004. Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 6905–6911.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., Prives, C., 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.* 18, 3041–3054.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., Liu, E.A., 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Vella, V., Puppini, C., Damante, G., Vigneri, R., Sanfilippo, M., Vigneri, P., Tell, G., Frasca, F., 2009. DeltaNp73alpha inhibits PTEN expression in thyroid cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 124, 2539–2548.
- Velletri, T., Romeo, F., Tucci, P., Peschiaroli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Niklison-Chirou, M.V., Amelio, I., Knight, R.A., Mak, T.W., Melino, G., Agostini, M., 2013. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 3564–3573.
- Velmurugan, B., Singh, R.P., Tyagi, A., Agarwal, R., 2008. Inhibition of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation by silibinin in male Fisher 344 rats. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 1, 376–384.
- Vera, J., Schmitz, U., Lai, X., Engelmann, D., Khan, F.M., Wolkenhauer, O., Putzer, B.M., 2013. Kinetic Modeling-Based Detection of Genetic Signatures that Provide Chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 Network. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4095
- Vilgelm, A.E., Hong, S.-M., Washington, M.K., Wei, J., Chen, H., El-Rifai, W., Zaika, A., 2010. Characterization of Δ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene* 29, 5861–5868.
- Vilgelm, A., Wei, J.X., Piazuelo, M.B., Washington, M.K., Prassolov, V., El-Rifai, W., Zaika, A., 2008. DeltaNp73alpha regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function. *Oncogene* 27, 2170–2176.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532. doi:10.1056/NEJM198809013190901
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Wager, M., Guilhot, J., Blanc, J.-L., Ferrand, S., Milin, S., Bataille, B., Lapierre, F., Denis, S., Chantereau, T., Larsen, C.-J., Karayan-Tapon, L., 2006. Prognostic value of increase in

- transcript levels of Tp73 DeltaEx2-3 isoforms in low-grade glioma patients. *Br. J. Cancer* 95, 1062–1069.
- Walko, C.M., Lindley, C., 2005. Capecitabine: a review. *Clin. Ther.* 27, 23–44.
- Wang, J.Y., 2000. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19, 5643–5650.
- Wang, Y., He, X., Yu, Q., Eng, C., 2013. Androgen receptor-induced tumor suppressor, KLLN, inhibits breast cancer growth and transcriptionally activates p53/p73-mediated apoptosis in breast carcinomas. *Hum. Mol. Genet.*
- Weinmann, L., Wischhusen, J., Demma, M.J., Naumann, U., Roth, P., Dasmahapatra, B., Weller, M., 2008. A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 15, 718–729.
- Wen, F., Zhou, Y., Wang, W., Hu, Q.C., Liu, Y.T., Zhang, P.F., Du, Z.D., Dai, J., Li, Q., 2013. Ca/Mg infusions for the prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 24, 171–178.
- Wilhelm, M.T., Rufini, A., Wetzels, M.K., Tsuchihara, K., Inoue, S., Tomasini, R., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Arsenian-Henriksson, M., Melino, G., Kaplan, D.R., Miller, F.D., Mak, T.W., 2010. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* 24, 549–560.
- Winawer, S.J., St John, J., Bond, J., Hardcastle, J.D., Kronborg, O., Flehinger, B., Schottenfeld, D., Blinov, N.N., 1990. Screening of average-risk individuals for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull. World Health Organ.* 68, 505–513.
- Wolter, J.K., Wolter, N.E., Blanch, A., Partridge, T., Cheng, L., Morgenstern, D.A., Podkowa, M., Kaplan, D.R., Irwin, M.S., 2014. Anti-tumor activity of the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol in neuroblastoma. *Oncotarget* 5, 161–172.
- Wong, S.W., Tiong, K.H., Kong, W.Y., Yue, Y.C., Chua, C.H., Lim, J.Y., Lee, C.Y., Quah, S.I., Fow, C., Chung, C., So, I., Tan, B.S., Choo, H.L., Rosli, R., Cheong, S.-K., Leong, C.-O., 2011. Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 301–313.
- Wu, C., Han, L., Riaz, H., Wang, S., Cai, K., Yang, L., 2013. The chemopreventive effect of β -cryptoxanthin from mandarin on human stomach cells (BGC-823). *Food Chem.* 136, 1122–1129.
- Wu, H., Liang, X., Fang, Y., Qin, X., Zhang, Y., Liu, J., 2008. Resveratrol inhibits hypoxia-induced metastasis potential enhancement by restricting hypoxia-induced factor-1 alpha expression in colon carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 62, 613–621.

- Wu, S., Murai, S., Kataoka, K., Miyagishi, M., 2008. Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 75–81.
- Xu, X.T., Dai, Z.H., Xu, Q., Qiao, Y.Q., Gu, Y., Nie, F., Zhu, M.M., Tong, J.L., Ran, Z.H., 2013. Safety and efficacy of calcium and magnesium infusions in the chemoprevention of oxaliplatin-induced sensory neuropathy in gastrointestinal cancers. *J. Dig. Dis.* 14, 288–298.
- Xu, Y., Villalona-Calero, M.A., 2002. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 13, 1841–1851.
- Yamamura, Y., Lee, W.L., Goh, M.X., Ito, Y., 2008. Role of TAp73alpha in induction of apoptosis by transforming growth factor-beta in gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 582, 2663–2667.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., McKeon, F., 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet. TIG* 18, 90–95.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305–316.
- Yang, S.Y., Sales, K.M., Fuller, B., Seifalian, A.M., Winslet, M.C., 2009. Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends Mol. Med.* 15, 225–233.
- Yun, J.-M., Afaq, F., Khan, N., Mukhtar, H., 2009. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Mol. Carcinog.* 48, 260–270.
- Yu, X., Vazquez, A., Levine, A.J., Carpizo, D.R., 2012. Allele-specific p53 mutant reactivation. *Cancer Cell* 21, 614–625.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., Moll, U.M., 2001. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J. Biol. Chem.* 276, 11310–11316.
- Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W., Pearl, M., Chalas, E., Moll, U.M., 2002. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* 196, 765–780.
- Zaika, E., Wei, J., Yin, D., Andl, C., Moll, U., El-Rifai, W., Zaika, A.I., 2011. p73 protein regulates DNA damage repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 4406–4414.
- Zeng, Z., Luo, H., Yang, J., Wu, W., Chen, D., Huang, P., Xu, R., 2014. Overexpression of the circadian clock gene Bmal1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 1042–1052.
- Zhang, M., Holman, C.D.J., Binns, C.W., 2007. Intake of specific carotenoids and the risk of epithelial ovarian cancer. *Br. J. Nutr.* 98, 187–193.

- Zhang, P., Liu, S.S., Ngan, H.Y.S., 2012. TAp73-mediated the activation of c-Jun N-terminal kinase enhances cellular chemosensitivity to cisplatin in ovarian cancer cells. *PloS One* 7, e42985.
- Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., Chen, X., 2012. Mammary epithelial cell polarity is regulated differentially by p73 isoforms via epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 287, 17746–17753.
- Zhang, Y., Yan, W., Jung, Y.S., Chen, X., 2013. PUMA Cooperates with p21 to Regulate Mammary Epithelial Morphogenesis and Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *PloS One* 8, e66464.
- Zheng, T., Wang, J., Song, X., Meng, X., Pan, S., Jiang, H., Liu, L., 2010. Nutlin-3 cooperates with doxorubicin to induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells through p53 or p73 signaling pathways. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 1597–1604.
- Zheng, T., Yin, D., Lu, Z., Wang, J., Li, Y., Chen, X., Liang, Y., Song, X., Qi, S., Sun, B., Xie, C., Meng, X., Pan, S., Liu, J., Jiang, H., Liu, L., 2014. Nutlin-3 overcomes arsenic trioxide resistance and tumor metastasis mediated by mutant p53 in Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Cancer* 13, 133.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Chen, X., 1998. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* 58, 5061–5065.
- Zitterbart, K., Zavrelova, I., Kadlecova, J., Spesna, R., Kratochvilova, A., Pavelka, Z., Sterba, J., 2007. p73 expression in medulloblastoma: TAp73/DeltaNp73 transcript detection and possible association of p73alpha/DeltaNp73 immunoreactivity with survival. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 641–650.
- Zorić, A., Horvat, A., Slade, N., 2013. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* 34, 522–529.

8. Anexo

El trabajo desarrollado en este período de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en publicaciones y patentes cuyas referencias aparecen aquí indicadas:

PUBLICACIONES:

- **Coral San Millán**, Beatriz Soldevilla, Paloma Martín, Beatriz Gil-Calderón, Marta Compte, Belén Pérez-Sacristán, Encarnación Donoso, Cristina Peña, Jesús Romero, Fernando Granado-Lorencio, Félix Bonilla, Gemma Domínguez. “ β -cryptoxanthin enhances the anti-tumoral activity of oxaliplatin through Δ Np73 negative regulation in colon cancer”. *Clinical Cancer Research*. Segunda revisión.
- Fernando Granado-Lorencio, Laura de las Heras, **Coral San Millán**, Francisco Javier García-López, Inmaculada Blanco-Navarro, Belén Pérez Sacristán, Gemma Domínguez. “ β -cryptoxanthin modulates the response to phytosterols in post-menopausal women carrying NPC1L1 L272L and ABCG8 A632 V polymorphisms: an exploratory study”. *Genes Nutr* 2014 Sep; 9(5):428.
- Beatriz Soldevilla, Marta Rodríguez, **Coral San Millán**, Vanesa García, Rodrigo Fernández-Periañez, Beatriz Gil- Calderón, Paloma Martín, Arantxa García-Grande, Javier Silva, Félix Bonilla y Gemma Domínguez. “Tumor-derived exosomes are enriched in Δ Np73, promote oncogenic potential to acceptor cells y correlate with patients survival”. *Hum Mol Genet* 2014 Jan 15; 23(2):467-78.
- Beatriz Soldevilla, **Coral San Millán**, Félix Bonilla y Gemma Domínguez. “The TP73 complex network: ready for clinical translation in cancer?”. *Genes Chromosomes Cancer* 2013 Nov; 52(11):989-1006.
- Beatriz Soldevilla, Raquel Díaz, Rocío Urduguio, **Coral San Millán**, Mario Fraga, Félix Bonilla, Gemma Domínguez. “Survivin induces epigenetic changes in the p73 promoter modifying its transcription”. *BMC Cancer* (Enviado).

PATENTE:

Título: "COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER"

Número de solicitud: P201331376

Fecha de presentación: 30.09.2013

Solicitantes: Universidad Autónoma de Madrid & Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

Inventores: Gemma Domínguez, **Coral San Millán**, Beatriz Soldevilla, Félix Bonilla.

