

ESTUDIANDO LA SENESCENCIA CELULAR EN CÁNCER COLORRECTAL CON INMUNOSENSADO ELECTROQUÍMICO MODERNO

María Pedrero¹, Sandra Tejerina-Miranda¹, María Gamella¹, Ana Montero-Calle², José M. Pingarrón¹, Rodrigo Barderas², Susana Campuzano¹

¹Dpto. de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.

E-mail: mpedrero@quim.ucm.es. X(twitter): @GEBEUCM

²Programa de Enfermedades Crónicas, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España
X(twitter): @ProteoFun

Abstract

Con la edad, en un número creciente de células del organismo se producen daños en el DNA que derivan en senescencia celular [1]. Las células senescentes se acumulan en los tejidos creando microambientes pro-tumorales y aumentando la expresión de diversos biomarcadores, entre los que cabe destacar el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) y el inhibidor tisular de la metaloproteína 1 (TIMP-1), ambos implicados en procesos de senescencia celular y metástasis en cáncer colorrectal (CRC) [2-4].

Con el propósito de profundizar en el papel de dichos biomarcadores en estos procesos, recientemente se han desarrollado inmunoplateformas electroquímicas aplicadas con éxito al análisis de extractos y secretomas de células de CRC con diferente capacidad metastásica y de plasma y tejido de pacientes con CRC en distintos estadios. Los resultados obtenidos han puesto en valor el papel que juegan estos dos biomarcadores en el entendimiento y tratamiento de estos trastornos.

1. Introducción

La senescencia se define como el proceso de envejecimiento de las células hasta que dejan de dividirse sin morir. Las células senescentes se acumulan en los tejidos del organismo y permanecen activas liberando sustancias dañinas que producen inflamación y lesiones en las células vecinas e intervienen en la aparición de enfermedades como el cáncer [5]. De hecho, la acumulación de células senescentes en los tejidos crea microambientes pro-tumorales a través del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), aumentando la expresión de quimioquinas, proteasas, factores de crecimiento, citoquinas y otros biomarcadores [2]. Entre estos, el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) y el inhibidor tisular de la metaloproteína 1 (TIMP-1) se han relacionado con senescencia celular y metástasis en cáncer colorrectal (CRC) [2-4]. Es por ello por lo que disponer de tecnologías que permitan la determinación de estos dos biomarcadores en el microambiente tumoral, tanto de forma individual como simultánea, se considera de gran interés para profundizar en el papel que desempeñan en la senescencia celular y progresión del CRC, así como en la relación entre estos procesos, determinante para mejorar su comprensión y tratamiento. Las tecnologías que se utilizan habitualmente para

determinar dichos biomarcadores, enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA), tecnologías de inmunotransferencia en membrana (blotting), reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) e incluso resonancia de plasmón superficial (SPR) no alcanzan a cumplir las demandas de la clínica actual en términos de simplicidad, costo asequible, posibilidad de determinaciones multiplexadas y aplicabilidad en el punto de atención [2, 3]. Considerando el gran potencial de los biosensores electroquímicos en este campo, y aunando la experiencia de nuestro Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Universidad Complutense de Madrid (GEBE-UCM) en el desarrollo de plataformas electroquímicas, con la del Grupo de Investigación ProteoFun de la Unidad de Proteómica Funcional del Instituto de Salud Carlos III en el empleo de tecnologías proteómicas de última generación para identificar (bio)marcadores y de herramientas (bio)informáticas modernas para analizar y concluir los resultados obtenidos y con acceso a muestras clínicas, en esta última década hemos contribuido de forma determinante a valorizar la competitividad de las tecnologías electroanalíticas de última generación para realizar determinaciones multiplexadas, incluso en diferentes niveles moleculares, y en el gran reto que supone el análisis de muestras biológicas de elevada complejidad, como el secretoma celular, que permiten estudiar en mayor profundidad el microambiente tumoral. En el marco de este escenario colaborativo ideal, recientemente hemos desarrollado, descrito y aplicado tecnologías inmunoelectroquímicas habilitadoras tanto para la determinación individual como simultánea de GDF-15 y TIMP-1 [2, 3], cuyas características y aplicabilidad se resumen en este artículo.

2. Descripción y características de las inmunoplateformas desarrolladas

Las bioplateformas propuestas combinan las ventajas del uso de micropartículas magnéticas (MBs) y transducción amperométrica sobre electrodos serigrafados de carbono con uno (SPCEs) o dos (SPdCEs) electrodos de trabajo, lo que las hace particularmente adecuadas para determinar los biomarcadores diana en muestras clínicas de forma sencilla, en tiempo reducido y empleando instrumentación de coste asequible y carácter portátil, aspectos clave en aplicaciones rutinarias e *in situ*. En la Fig. 1 se muestra un esquema de la fabricación de la bioplateforma dual

desarrollada y de la obtención de respuestas amperométricas, comprobándose la ausencia de reactividad cruzada entre los electrodos adyacentes y la excelente especificidad de los anticuerpos empleados hacia su proteína diana. Así, la construcción de la inmunoplateforma dual se llevó a cabo preparando lotes independientes de inmunocomplejos tipo sándwich de cada proteína diana empleando anticuerpos específicos de captura (CAb) y de detección biotinilados (*b*-DAb) que se marcan enzimáticamente con un conjugado comercial de estreptavidina y la enzima peroxidasa de rábano (Strep-HRP) siguiendo los procedimientos optimizados previamente para cada una de las plataformas individuales [2, 3]. Para realizar la transducción amperométrica a -0.20 V (vs. el electrodo de *pseudoreferencia* de Ag) usando el sistema electroquímico H₂O₂/HRP/hidroquinona (HQ), las MBs modificadas con los inmunocomplejos de cada diana se atrapan magnéticamente en el electrodo de trabajo correspondiente de los SPdCEs, obteniéndose variaciones de corriente catódica directamente proporcionales a la concentración de cada marcador. En las condiciones experimentales exhaustivamente optimizadas (Tabla 1) se obtuvieron las características analíticas y operacionales recogidas en la Tabla 2.

Como se puede observar en la Tabla 1, el tiempo necesario para la preparación de los inmunocombinados CAb-MBs para la determinación de GDF-15 es mayor que para el análisis de TIMP-1. Además, mientras que la formación del inmunocomplejo de TIMP-1 se puede llevar a cabo en una sola etapa de incubación de 60 min con una disolución mezcla de TIMP-1, *b*-DAb_{TIMP-1} y Strep-HRP, el inmunocomplejo de GDF-15 se preparó en tres etapas incubando las CAb_{GDF-15}-MBs secuencialmente en las disoluciones de la proteína diana, el *b*-DAb_{GDF-15}, y el

trazador enzimático Strep-HRP, respectivamente, lo que supone un tiempo total de 75 min, algo mayor que el requerido para formar el inmunocomplejo de TIMP-1. Este hecho puede deberse a las diferentes eficiencias de los procesos de captura y/o marcaje por las distintas afinidades de los anticuerpos empleados para cada una de las dianas.

Tabla 1. Variables experimentales optimizadas para la determinación de GDF-15 y TIMP-1.

Variable	GDF-15	TIMP-1
[CAb], µg mL ⁻¹	25.0	25.0
t _{inc} (CAb), min	45	2.5
Nº etapas ensayo	3	1
[<i>b</i> -DAb], µg mL ⁻¹	0.5	1.0
Dilución Strep-HRP	1/1000	1/1000
t _{inc} (GDF-15), min	15	-
t _{inc} (<i>b</i> -DAb _{GDF-15}), min	30	-
t _{inc} (Strep-HRP _{GDF-15}), min	30	-
t _{inc} (TIMP-1 + <i>b</i> -DAb _{TIMP-1} + Strep-HRP), min	-	60

Por lo que se refiere a las características analíticas y operacionales obtenidas con las inmunoplateformas desarrolladas (Tabla 2), cabe destacar, en primer lugar, los bajos límites de detección (LODs) calculados que se encuentran muy por debajo de los valores de corte séricos descritos para identificar pacientes con CRC (1000 pg mL⁻¹ para GDF-15 [6, 7] y 200-600 ng mL⁻¹ para TIMP-1 [8-10]). Por otro lado, la buena reproducibilidad que demuestran estas inmunoplateformas, con desviaciones estándar relativas (RSDs) siempre inferiores al 5 %,

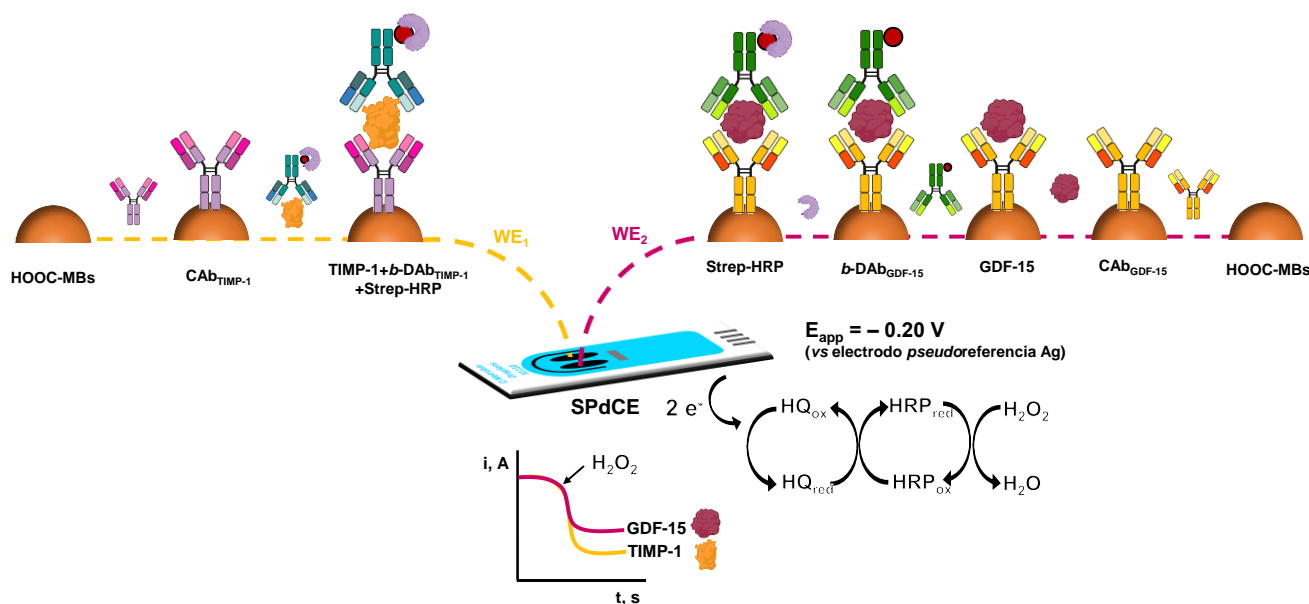


Fig. 1. Fabricación de la inmunoplateforma dual para la determinación simultánea de GDF-15 y TIMP-1 y transducción amperométrica. Figura preparada con ayuda de Biorender.

Tabla 2. Características analíticas y operacionales de las inmunoplateformas desarrolladas para la determinación de GDF-15 y TIMP-1.

Parámetro	Bioplateformas individuales		Bioplateforma dual	
	GDF-15	TIMP-1	GDF-15	TIMP-1
Intervalo lineal, pg mL ⁻¹	140-10000	43-2500	55-1000	64-1000
Pendiente, nA mL pg ⁻¹	0.236 ± 0.005	1.16 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Ordenada en el origen, nA	56 ± 21	70 ± 36	29 ± 7	52 ± 6
R ²	0.9964	0.9960	0.9906	0.9969
LOD ¹ , pg mL ⁻¹	42.0	13.01	16.6	19.2
RSD ² (n =10), %	4.3	3.6	2.1	2.8
Estabilidad ³ , días	28	28	28	28
Tiempo de análisis ⁴ , min	75	60	75	60

¹Valores estimados según el criterio $3 \times s_b/m$; ²valores calculados a niveles de concentración de 1000 (plataformas individuales) y 500 pg mL⁻¹ (cada biomarcador, plataforma dual); ³estabilidad de los conjugados CAB-MBs una vez bloqueados con etanolamina conservados en PBS a 4 °C; ⁴calculado desde el momento de incubación en la disolución que contiene los biomarcadores diana.

confirman la viabilidad y fiabilidad de los procesos de fabricación de los inmunocomplejos, su captura magnética sobre los electrodos de trabajo y de la transducción amperométrica, tanto sobre SPCEs como sobre SPdCEs. Además, la estabilidad de almacenamiento de ambos inmunoconjugados CAB-MBs en tampón fosfato salino (PBS) a 4 °C, de al menos 28 días, permite simplificar y acortar los tiempos de ensayo y facilita llevar a cabo determinaciones en el punto de atención.

La selectividad de las inmunoplateformas descritas se estudió comparando las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de algunas proteínas que, por encontrarse presentes en suero o plasma humanos, podrían actuar como posibles interferentes. De todas ellas, sólo la hemoglobina humana (Hb) y la albúmina de suero humano (HSA) provocaron interferencia en la determinación de TIMP-1 a los niveles de concentración más elevados ensayados, mientras que tanto la Hb, como la HSA, la inmunoglobulina G de suero humano (hIgG) y el TNF α humano lo hicieron en la determinación de GDF-15. Sin

embargo, estas interferencias se minimizaban tras una dilución y, además, su presencia y concentración depende de la naturaleza de la muestra a analizar.

3. Aplicación al análisis de muestras clínicas

La aplicabilidad de las plataformas descritas se evaluó analizando muestras clínicas de diferente naturaleza (Fig. 2): extractos (plataforma individual de TIMP-1) y secretomas (plataforma dual) de células CRC metastásicas y no metastásicas, muestras de plasma de pacientes con CRC en diferentes estadios de la enfermedad e individuos sanos (plataforma individual de GDF-15 y plataforma dual) y extractos de tejidos adyacentes tumorales y no tumorales de pacientes de CRC en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) (plataforma TIMP-1). Las muestras fueron proporcionadas por el biobanco del Hospital Clínico San Carlos tras recibir el consentimiento de los pacientes y la aprobación de su Comité Ético (CEI PI 45 y CEI PI 13_2020- v2).

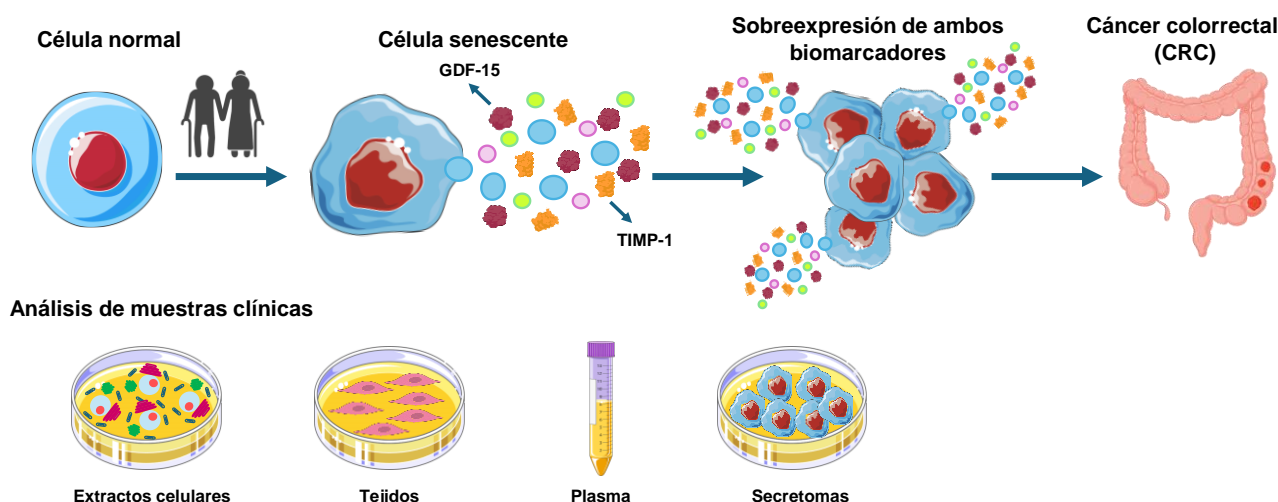


Fig. 2. Procesos de senescencia celular y CRC: muestras clínicas ensayadas. Figura preparada con ayuda de Biorender y Servier Medical ART.

Los resultados de estas investigaciones nos permitieron concluir:

- (1) El potencial de la plataforma individual de GDF-15 para analizar muestras de plasma diluidas 25 veces necesitando tan solo 1 μ L de muestra por determinación [2]. Aunque no se apreció efecto matriz, dada la pequeña cantidad de biomarcador presente en el volumen de muestra analizada, se optó por emplear el método de adiciones estándar para llevar a cabo estos análisis. Los resultados obtenidos confirmaron un nivel mayor de GDF-15 en las muestras de plasma procedentes de pacientes de CRC que en las de individuos sanos y permitían además diferenciar entre pacientes de CRC en estadios tempranos (I y II) y en estadios avanzados (III y IV), resultados que concuerdan con el potencial de este biomarcador para la detección y pronosis de CRC, lo que podría realizarse de forma mínimamente invasiva con la inmunoplateforma desarrollada y en tan solo 75 min.
- (2) Los resultados obtenidos en el análisis de extractos de células de CRC con diferente potencial metastásico empleando la inmunoplateforma desarrollada para la determinación de TIMP-1 [3] confirmaron la sobreexpresión de este biomarcador en las células metastásicas de los pares isogénicos analizados, resultados que concordaron con los obtenidos por Western Blot (WB). Por otro lado, el análisis de tejidos de CRC pareados con esta bioplateforma derivó en niveles mayores de TIMP-1 en las muestras tumorales. Todo ello pone de manifiesto el potencial de la inmunoplateforma desarrollada, que permite la determinación de TIMP-1 en las muestras analizadas en tan sólo 1 h, partiendo de los inmunoconjugados CAB_{TIMP-1}-MB, empleando únicamente 0.10 y 0.25 μ g de extractos tisulares y celulares, respectivamente, ofreciéndose muy competitiva frente a otras técnicas disponibles para este tipo de análisis como ELISA y WB.
- (3) Finalmente, la viabilidad de la plataforma dual para la determinación simultánea de GDF-15 y TIMP-1 [3] se evaluó enfrentándola al análisis de muestras de plasma de individuos sanos y pacientes de CRC en estadios III y IV y de secretomas de células de CRC. Sólo fue necesaria una dilución de las muestras líquidas de 1/25 o 1/250 para GDF-15 y TIMP-1, respectivamente, tras lo cual y dada la ausencia de efecto matriz, las señales obtenidas para cada muestra se interpolaron en los calibrados realizados para los estándares de cada diana. La aplicación de la inmunoplateforma dual al análisis de muestras de plasma permitió discriminar entre individuos sanos y pacientes con CRC, mientras que aplicada al análisis de secretomas fue capaz de diferenciar entre muestras metastásicas y no metastásicas, resultados concordantes con los obtenidos mediante Dot-Blot. Es de destacar que esta ha sido la primera vez que se describe la determinación de estos biomarcadores en secretomas celulares. La exactitud y reproducibilidad de las metodologías descritas para el análisis de muestras biológicas complejas se demostraron mediante estudios de

recuperación. Asimismo, la capacidad diagnóstica de GDF-15 y TIMP-1 para el CRC se evaluó mediante el análisis estadístico construyendo curvas ROC (característica operativa del receptor), cuyos parámetros (área bajo curva, sensibilidad y especificidad del 100 %), demostraron la plena capacidad diagnóstica de estos biomarcadores CRC.

Resulta importante destacar la versatilidad de aplicación de las inmunoplateformas desarrolladas al análisis de muestras clínicas de diferente naturaleza, con diferentes requerimientos para su obtención y capaces de proporcionar información diferencial y en muchos casos complementaria para mejorar la fiabilidad y precisión del diagnóstico y pronóstico clínico y tanto de la enfermedad original como circulante [11]. Así, por ejemplo:

- El plasma, porción líquida de la sangre obtenida mediante centrifugación en presencia de anticoagulantes, se obtiene mediante punción venosa, método considerado mínimamente invasivo, y se caracteriza también por su elevado contenido proteico, características que lo convierten en una muestra ideal para el análisis clínico de rutina con el propósito de realizar el cribado de biomarcadores y monitorizar el estado del paciente a lo largo de extensos períodos de tiempo [12].
- La obtención directa de muestras de tejido sospechoso de enfermedad requiere, sin embargo, procedimientos de extracción invasivos que pueden ocasionar complicaciones posteriores en los pacientes, además de incomodidad, dolor y molestias. A pesar de ello, el análisis de extractos tisulares aporta información fundamental de las características del propio tumor y su grado de agresividad, esenciales para la toma de decisiones terapéuticas en la medicina de precisión [13, 14].
- Las líneas celulares se definen como poblaciones homogéneas de células que se pueden cultivar repetidamente, manteniendo sus características fenotípicas y sus funciones específicas. Las procedentes de neoplasias asociadas a pacientes oncológicos se dividen rápidamente y tienen potencial para ser cultivadas indefinidamente en un número aceptable de pases, lo que, junto con su amplia disponibilidad comercial en bancos de células, las convierte en potenciales modelos *in vitro* para la investigación médica, el estudio de procesos fisiológicos y patológicos y el descubrimiento de agentes terapéuticos anticancerígenos [15, 16]. Dado que la membrana celular representa una barrera física que, si se analizan células enteras limita la información de los cambios producidos en su interior, en muchas ocasiones se utilizan extractos celulares, es decir, preparaciones que contienen los componentes intracelulares liberados de células vivas mediante procedimientos de lisis celular, para llevar a cabo estudios proteómicos, transcriptómicos y metabolómicos que proporcionan una visión más global de las poblaciones celulares y arrojan información más detallada de los procesos biológicos en su contexto natural [17].

- El término “secretoma” engloba a todas las macromoléculas secretadas por una célula al medio extracelular, algunas de las cuales son proteínas que desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral, la invasión, la metástasis y/o la angiogénesis mediante la regulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. El secretoma del cáncer se emplea para investigar las interacciones que ocurren en el microambiente tumoral, contribuyendo a la comprensión de fenómenos como la inducción de la tumorigénesis y la estimulación de las células inmunitarias [18-20]. Su análisis constituye una estrategia poderosa que ofrece información detallada sobre las interacciones moleculares en el microambiente tumoral, mejorando la comprensión de los procesos oncológicos y proporcionando oportunidades para enfoques más precisos en diagnóstico y tratamiento. Es importante destacar que la concentración significativamente inferior de marcadores en los secretomas en comparación con extractos celulares requiere de tecnologías particularmente sensibles para su evaluación, como las bioplataformas que se han descrito en este artículo, resultando a menudo imposible su análisis con las tecnologías convencionales de “blotting”.

El potencial demostrado por las bioplataformas descritas para realizar el análisis de muestras clínicas de compleja y diferente naturaleza, empleando cantidades muy pequeñas de material biológico y en tiempos de análisis muy cortos es, por todo ello, de gran importancia no sólo para la detección temprana de enfermedades como el CRC, condicionante tanto de la calidad como de la esperanza de vida, sino también para la evaluación de cualquiera de sus estadios, incluso antes de que sus síntomas se manifiesten, y para la localización de lesiones precancerosas, lo que podría ayudar a frenar el desarrollo del cáncer.

4. Conclusiones

Este artículo resume los logros obtenidos recientemente en el desarrollo y aplicación de nuevas bioplataformas electroquímicas para la determinación, tanto individual como simultánea, de GDF-15 y TIMP-1, biomarcadores de relevancia emergente relacionados con senescencia celular y el diagnóstico y pronóstico del CRC. Estas inmunoplataformas se basan en la formación de inmunocomplejos tipo sándwich entre los biomarcadores diana y anticuerpos específicos empleados para capturarlos sobre la superficie de micropartículas magnéticas y detectarlos mediante marcaje con HRP. Los inmunocomplejos formados se capturan magnéticamente sobre los electrodos de trabajo de electrodos serigrafados desechables para la transducción amperométrica final con el sistema H_2O_2 /HRP/HQ. El atractivo rendimiento analítico de las inmunoplataformas desarrolladas que ofrecen LODs considerablemente inferiores a los valores de corte establecidos en suero para diagnosticar varios tipos de cáncer con reproducibilidad, estabilidad y selectividad destacables, han permitido su aplicación con resultados muy prometedores en el análisis de pequeñas

cantidades de una variedad de muestras clínicas relevantes de alta complejidad. Los anticuerpos de los kits ELISA recomendados para la determinación de TIMP-1 o GDF-15 en sobrenadante de cultivos celulares, suero y plasma se han utilizado con resultados confiables incluso en extractos de células y tejidos y, por primera vez, en secretomas celulares. Las bioherramientas desarrolladas han demostrado su capacidad para distinguir entre individuos sanos y pacientes con CRC empleando tanto biopsias líquidas como sólidas, en tiempos muy cortos (poco mayores de 1 h), y utilizando protocolos simples y cantidades mínimas de muestra. Las tecnologías desarrolladas emplean además instrumentación electroquímica de bajo coste compatible con análisis de rutina y, en su caso, con dispositivos portátiles que permitirían realizar mediciones *in situ* para seguir contribuyendo tanto a arrojar luz en su papel en los procesos de senescencia celular como al diagnóstico, pronóstico y terapia de precisión en CRC.

Agradecimientos

Se agradece a Microchimica Acta-Springer la concesión del premio a la mejor comunicación tipo Póster presentada por M.P. en la XXIV Reunión de la SEQA. Asimismo, se agradece el apoyo financiero de los Proyectos de Investigación PID2022-1363510B-I00 y PID2022-1403070B-I00 financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, del “ERDF A way of making Europe”, EU’s Horizon 2020 funding program (Fondo específico de investigación UCM FEI-EU-22-08) y de las subvenciones PI20CIII/00019 y PI23CIII/00027 del programa AES-ISCI. S.T.M. agradece el contrato predoctoral concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación español (PRE2020-092859).

Referencias

- [1] D. Hanahan, Hallmarks of cancer: New dimensions, *Cancer Discov.* 12 (2022) 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [2] S. Tejerina-Miranda, V. Pérez-Ginés, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, A. Montero-Calle, J.M. Pingarrón, R. Barderas, S. Campuzano, Magneto-controlled electrochemical immunosensing platform to assess the senescence-associated GDF-15 marker in colorectal cancer, *Sens. Diagn.* 3 (2024) 238-247. <https://doi.org/10.1039/d3sd00311f>.
- [3] S. Tejerina-Miranda, M. Gamella, M. Pedrero, A. Montero-Calle, R. Rejas, J.M. Pingarrón, R. Barderas, S. Campuzano, Dual immunoplatform to assess senescence biomarkers TIMP-1 and GDF-15: Advancing in the understanding of colorectal cancer, *Electrochim. Acta* 503 (2024) 144822. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.144822>.
- [4] I. Guccini, A. Revandkar, M. D'Ambrosio, M. Colucci, E. Pasquini, S. Mosole, M. Troiani, D. Brina, R. Sheibani-Tezerji, A.R. Elia, A. Rinaldi, N. Pernigoni, J.H. Rüschoff, S. Dettwiler, A.M. De Marzo, E.S. Antonarakis, C. Borrelli, A.E. Moor, R. García-Escudero, A. Alajati, G. Attanasio, M. Losa,

- H. Moch, P. Wild, G. Egger, A. Alimonti, Senescence reprogramming by TIMP1 deficiency promotes prostate cancer metastasis, *Cancer Cell* 39(1) (2021) 68-82. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.10.012>.
- [5] Instituto Nacional del Cáncer de EUA (NCI). Diccionario del cáncer: senescencia. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/senescencia>. Última consulta, 23/08/2024.
- [6] C. Li, X. Wang, J.I. Casal, J. Wang, P. Li, W. Zhang, E. Xu, M. Lai, H. Zhang, Growth differentiation factor 15 is a promising diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer, *J. Cell. Mol. Med.* 20 (2016) 1420-1426. <https://doi.org/10.1111/jcmm12830>.
- [7] X. Wang, Z. Yang, H. Tian, Y. Li, M. Li, W. Zhao, C. Zhang, T. Wang, J. Liu, A. Zhang, D. Shen, C. Zheng, J. Qi, D. Zhao, J. Shi, L. Jin, J. Rao, W. Zhang, Circulating MIC-1/GDF15 is a complementary screening biomarker with CEA and correlates with liver metastasis and poor survival in colorectal cancer, *Oncotarget* 8 (2017) 24892-24901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15279>.
- [8] A. Katoch, D. Nayak, M.M. Faheem, A. Kumar, P.K. Sahu, A.P. Gupta, L.D. Kumar, A. Goswami, Natural podophyllotoxin analog 4DPG attenuates EMT and colorectal cancer progression via activation of checkpoint kinase 2, *Cell Death Discov.* 7 (2021) 25. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00405-3>.
- [9] M. Vočka, D. Langer, V. Fryba, J. Petrtyl, T. Hanus, M. Kalousova, T. Zima, L. Petruzela, Serum levels of TIMP-1 and MMP-7 as potential biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer, *Int. J. Biol. Markers* 34 (2019) 292-301. <https://doi.org/10.1177/1724600819866202>.
- [10] C. Meng, X. Yin, J. Liu, K. Tang, H. Tang, J. Liao, TIMP-1 is a novel serum biomarker for the diagnosis of colorectal cancer: a metaanalysis, *PLoS ONE* 13(11) (2018) e0207039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207039>.
- [11] C. Muñoz San Martín, Herramientas bioelectroanalíticas para pronóstico oncológico a través del proteoma y subproteoma, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2024.
- [12] Z. Meng, T.D. Veenstra, Proteomic analysis of serum, plasma, and lymph for the identification of biomarkers, *Proteomics: Clin. Appl.* 1 (2007) 747-757. <https://doi.org/10.1002/prca.200700243>.
- [13] J. Marrugo-Ramírez, M. Mir, J. Samitier, Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: a promising non-invasive alternative to tissue biopsy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2877. <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>.
- [14] R.A. Mathai, R.V.S. Vidya, B. Shrikar, L. Thomas, K. Udupa, J. Kolesar, M. Rao, Potential utility of liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for the assessment of solid tumors: implications in the precision oncology, *J. Clin. Med.* 8 (2019) 373. <https://doi.org/10.3390/jcm8030373>.
- [15] Z. Li, *In vitro* micro-tissue and -organ models for toxicity testing, in: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed., Academic Press, 2011, Vol. 5, pp. 551-563. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00503-1>.
- [16] A. Verma, Animal tissue culture: principles and applications, in: A. S. Verma, A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, Academic Press, 2014, pp. 211-231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2>.
- [17] J. de-Carvalho, O. Deshpande, C. Nabais, I.A. Telley, Chapter 10 - A cell-free system of *Drosophila* egg explants supporting native mitotic cycles, in H. Maiato, M. Schuh (Eds.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2018, Vol. 144, pp. 233-257. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2018.03.011>.
- [18] C.C. Wu, C. W. Hsu, C. De Chen, C.J. Yu, K.P. Chang, D.I. Tai, H.P. Liu, W.H. Su, Y. S. Chang, J.S. Yu, Candidate serological biomarkers for cancer identified from the secretomes of 23 cancer cell lines and the human protein atlas, *Mol. Cell. Proteomics* 9(6) (2010) 1100-1117. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900398-MCP200>.
- [19] P. Liu, Y. Weng, Z. Sui, Y. Wu, X. Meng, M. Wu, H. Jin, X. Tan, L. Zhang, Y. Zhang, Quantitative secretomic analysis of pancreatic cancer cells in serum-containing conditioned medium, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37606. <https://doi.org/10.1038/srep37606>.
- [20] M. Padgaonkar, S. Shendre, P. Chatterjee, S. Banerjee, Cancer secretome: finding out hidden messages in extracellular secretions, *Clin. Transl. Oncol.* 25 (2023) 1145-1155. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-03027-y>.