



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD: Fundamentos de Investigación Biomédica

Curso académico 2011/2012

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Efecto de la vinflunina sobre la transición
epitelio-mesénquima en líneas celulares
epiteliales de cáncer de vejiga**

Vanessa Abella Cajigal

29/05/2012

Relación de directores del Trabajo

Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvís

ÍNDICE

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Epitelio y cáncer	5
1.2. Transición epitelio-mesénquima (EMT)	6
1.3. Reversión de EMT: papel de la vinflunina	8
2. Hipótesis	10
3. Objetivos.....	11
4. Material y métodos	12
4.1. Líneas celulares y cultivo celular	12
4.2. Ensayo de citotoxicidad	12
4.3. Microscopía de contraste de fases	13
4.4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	13
4.5. PCR cuantitativa a tiempo real	13
4.6. Western blotting.....	14
5. Resultados.....	16
5.1. Efecto de vinflunina sobre la viabilidad celular de HT1376, HT1197, UM-UC-3 y SW780.....	16
5.2. Reversión del fenotipo mesenquimal de células tumorales al fenotipo epitelial por vinflunina	17
5.3. Efecto de vinflunina sobre la expresión de marcadores EMT en células HT1376	20
6. Discusión	23
6.1. Citotoxicidad de vinflunina: equilibrio entre dosis y tiempo de tratamiento	23
6.2. Reversión de EMT: regulación de E-cadherina.....	23
6.3. Perspectivas	24
7. Conclusiones	26
8. Bibliografía.....	27

RESUMEN

Vinflunina es un nuevo fármaco anticancerígeno que causa inhibición de microtúbulos. Recientes investigaciones demuestran la existencia de una relación entre la dinámica de los microtúbulos y las uniones adherentes. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la vinflunina sobre las uniones célula-célula que implican complejos E-cadherina-catenina y la reversión del fenotipo mesenquimal al fenotipo epitelial de líneas celulares tumorales de vejiga, proceso denominado transición mesénquima-epitelio.

Para ello se trataron cuatro líneas celulares de tumor de vejiga con el fármaco a seis concentraciones (0, 2, 10, 20, 50 y 100 μM) y tres tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas). Se analizó el efecto del fármaco sobre el fenotipo celular mediante microscopía de contraste de fases y sobre marcadores de la transición epitelio-mesenquima (EMT) mediante análisis de los niveles de ARN mensajero y proteína. Los resultados obtenidos muestran una reversión de fenotipo mesenquimal a epitelial a bajas concentraciones de vinflunina, acompañado de un aumento de E-cadherina y reducción de la proteína Hakai, sin embargo a altas concentraciones se observa muerte celular. Así, se abren nuevas vías de investigación para comprender el mecanismo por el cual la vinflunina ejerce un efecto sobre la reversión de EMT.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epitelio y cáncer

El cáncer es un grupo de patologías caracterizadas por un crecimiento no regulado de células y la invasión y diseminación de células desde el sitio de origen a otras partes del organismo. Durante la carcinogénesis, las células tumorales sufren mutaciones que les confieren una serie de capacidades entre las que se incluyen: autosuficiencia respecto a las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales antimitogénicas, evasión de la apoptosis, pérdida de la limitación replicativa, angiogénesis y crecimiento invasivo y metástasis ⁽¹⁾.

El tipo de cáncer más común es el carcinoma, consecuencia de transformaciones malignas en células epiteliales. La mayoría de los casos de cáncer de vejiga son carcinomas de células transicionales, el cáncer se origina en las células que conforman el urotelio, capa epitelial que recubre el interior de la vejiga.

El epitelio se caracteriza por presentar elevada tasa de renovación celular, lo que favorece la aparición de mutaciones que, ocasionalmente, pueden dar lugar a tumores ⁽¹⁾. Las células epiteliales desempeñan una importante función de barrera y forman uniones estrechas, desmosomas y uniones adherentes que contribuyen a esa función. Muchas proteínas están implicadas en el establecimiento de contactos celulares, pero E-cadherina es la mejor caracterizada y con mayor expresión en células epiteliales. La E-cadherina forma las uniones adherentes, su dominio extracelular establece interacciones homofílicas dependientes de calcio responsables de los contactos celulares, y su dominio intracelular interacciona con proteínas implicadas en señalización celular, como las cateninas, α -catenina, β -catenina y p120-catenina, y el citoesqueleto de actina (Figura 1) ⁽²⁾. El desarrollo del cáncer epitelial se ha asociado con la pérdida de contactos celulares y de la función de E-cadherina, por lo que esta proteína se considera supresora de tumores ⁽³⁾.

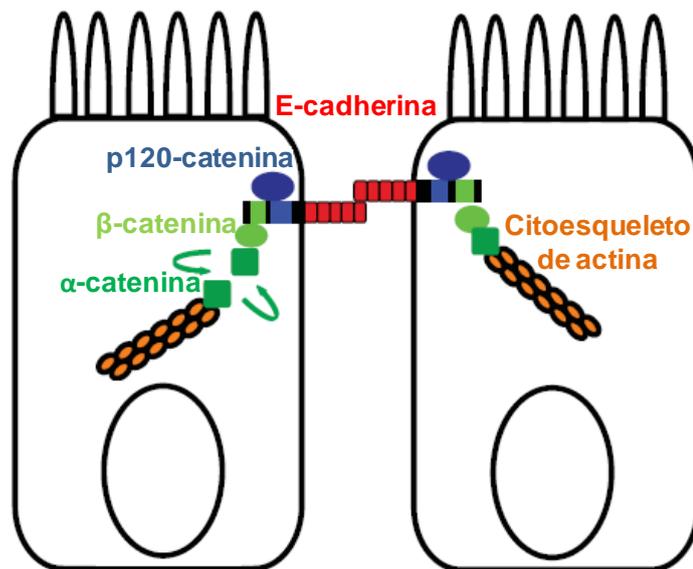


Figura 1. Complejo E-cadherina en las uniones adherentes. El dominio extracelular de la E-cadherina es responsable de las uniones célula-célula y el dominio citoplasmático interacciona con otras proteínas que están en contacto con el citoesqueleto de actina y están implicadas en señalización celular.

1.2. Transición epitelio-mesénquima (EMT)

La transición epitelio-mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) se ha relacionado con la desorganización de los contactos célula-célula y con la pérdida de E-cadherina. E-cadherina es considerada como un gen supresor de tumores y su pérdida es indicadora de mala prognosis. Durante EMT, las células de carcinomas adquieren mayor motilidad, invasividad y resistencia a la apoptosis ⁽⁴⁾. En este proceso se produce pérdida de la adhesión por cadherinas en las uniones adherentes, pérdida de marcadores de polaridad, reorganización del citoesqueleto, que ocasiona disminución de capas del epitelio, y degradación de la membrana basal (Figura 2) ⁽⁵⁾.

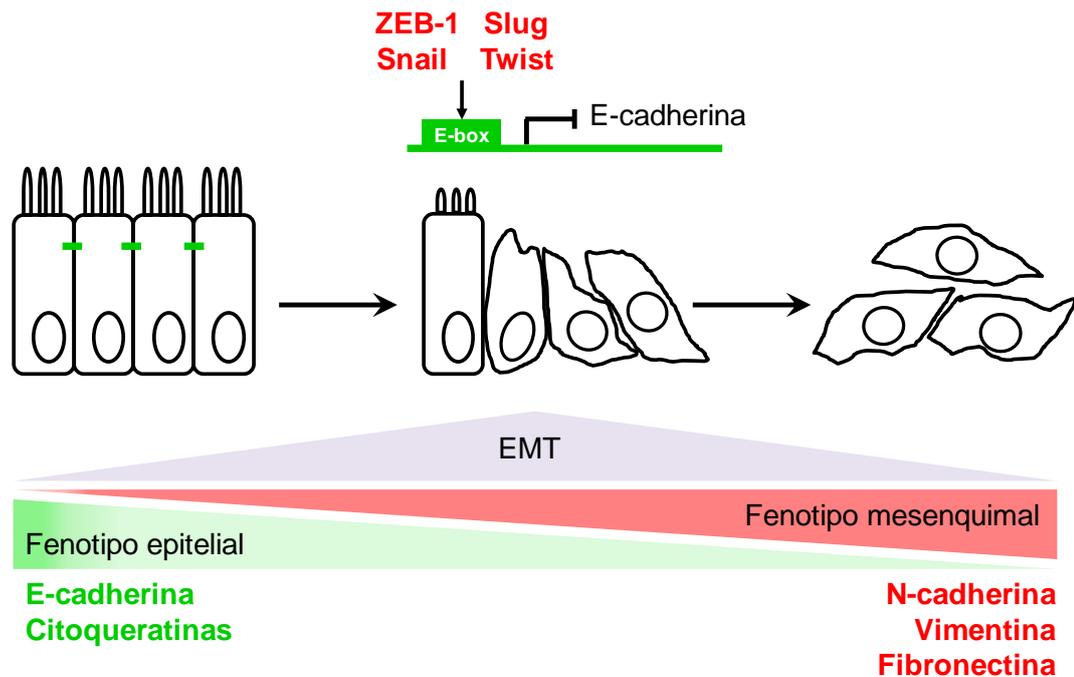


Figura 2. La transición epitelio-mesénquima. Las células epiteliales presentan uniones adherentes. Durante la EMT, los represores transcripcionales ZEB-1, Snail, Slug y Twist reclutan histonas desacetilasas a elementos E-box del promotor de E-cadherina que reprimen su expresión. La pérdida de E-cadherina favorece el fenotipo mesenquimal.

Se han descrito varios marcadores de EMT que caracterizan el fenotipo epitelial, como E-cadherina y citoqueratinas (CK18, CK19 o CK20) y el fenotipo mesenquimal, como vimentina, fibronectina, ZEB-1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*), Snail, Slug o Twist ⁽⁶⁾. E-cadherina es regulada a nivel transcripcional por los represores ZEB-1, Snail, Slug y Twist que reclutan histonas desacetilasas a elementos E-box del promotor de E-cadherina, entre otros genes (Figura 2) ⁽⁷⁾. A nivel postraduccional, la E-cadherina es regulada por la proteína Hakai. En 2002, Hakai fue identificada como una nueva E3 ubiquitín-ligasa, de la familia Cbl de ubiquitín-ligasas, que actúan sobre el complejo E-cadherina mediando su ubiquitinización, endocitosis y posterior degradación vía lisosomas, alterando así las uniones adherentes (Figura 3) ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾. La excesiva internalización o degradación de E-cadherina, como cuando

Hakai está sobreexpresado, se relaciona con el proceso de invasión y metástasis, sugiriendo su participación en carcinogénesis ^{(10) (11) (12)}.

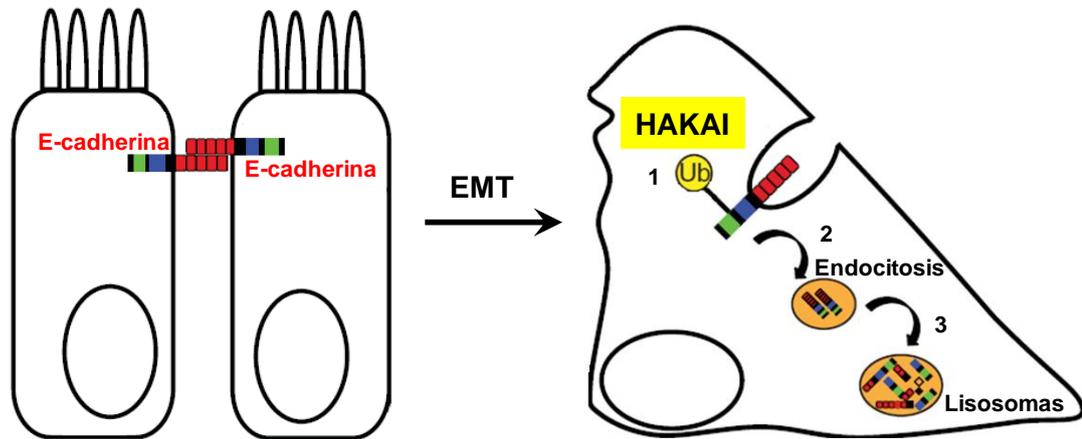


Figura 3. Modelo propuesto para la función de Hakai. (1) Hakai media la ubiquitinización de E-cadherina. (2) El complejo E-cadherina es endocitado y (3) degradado en lisosomas.

1.3. Reversión de EMT: papel de la vinflunina

La reversión de estos cambios, denominada transición mesénquima-epitelio (*mesenchymal-epithelial transition*, MET) también puede tener lugar, y es importante en el desarrollo normal de los tejidos.

Vinflunina es un nuevo medicamento contra el cáncer, perteneciente al grupo de alcaloides de la vinca. La vinflunina se utiliza para el tratamiento de adultos con carcinoma urotelial de células de transición avanzado o metastásico cuando ha fracasado el tratamiento previo con un medicamento contra el cáncer que contenga platino. La actividad antitumoral que presenta es superior a la de otros alcaloides de la vinca y su mecanismo de acción reside en su capacidad para unirse a la tubulina, impidiendo así la formación de microtúbulos y favoreciendo la disolución de los ya existentes, como consecuencia se detiene la mitosis celular en la metafase, y se induce la apoptosis. Además, se ha

observado que, a concentraciones no citotóxicas, puede afectar a la migración celular y a la diferenciación de células endoteliales ⁽¹³⁾.

Recientes investigaciones demuestran la existencia de una interrelación entre la dinámica de microtúbulos y los sitios de adhesión y el citoesqueleto de actina ⁽¹⁴⁾. En base a ello, en este trabajo nos interesa estudiar el posible efecto de la vinflunina sobre la adhesión célula-célula mediante la posible reversión del fenotipo mesenquimal de las células tumorales a un fenotipo epitelial. Para investigar esta posibilidad, hemos examinado el fenotipo de líneas celulares de cáncer de vejiga y la expresión de marcadores EMT. Además, mediante ensayo de citotoxicidad, determinamos el IC₅₀ para vinflunina.

2. HIPÓTESIS

En base a la interrelación entre la dinámica de microtúbulos y los sitios de adhesión, se plantea la hipótesis de que vinflunina, descrito como inhibidor de microtúbulos, pueda tener un efecto sobre la adhesión celular mediante la reversión del fenotipo mesenquimal de las células tumorales a un fenotipo epitelial.

3. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar el IC₅₀ de vinflunina para las diferentes líneas celulares de cáncer de vejiga mediante ensayo MTT de citotoxicidad.
- Analizar posibles cambios fenotípicos inducidos por la vinflunina en las líneas celulares de cáncer de vejiga mediante microscopia de contraste de fases.
- Examinar los efectos de vinflunina sobre la expresión de marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de vejiga mediante análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real.
- Examinar los efectos de vinflunina sobre la expresión de marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer de vejiga mediante análisis de niveles de proteínas por la técnica del Western blot.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Líneas celulares y cultivo celular

Se emplearon cuatro líneas celulares tumorales de epitelio de vejiga. Las líneas HT1376 y HT1197 fueron obtenidas del ATCC y las líneas UM-UC-3 y SW780 fueron generosamente cedidas por PharmaMar. Las células fueron cultivadas a 37°C con 5% de dióxido de carbono, HT1376 y HT1197 en DMEM (*Dubelcco's modified Eagle's medium*, Gibco®) suplementado con 10% de aminoácidos no esenciales, UM-UC-3 en DMEM y SW780 en Leibovitz's L-15 (Gibco®). Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina y penicilina/estreptomicina.

4.2. Ensayo de citotoxicidad

Las células HT1376, HT1197, UM-UC-3 y SW780 fueron cultivadas con una densidad de 10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Tras tratamiento de 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones (0, 2, 10, 20, 50 y 100 μM) se realizó en ensayo MTT de citotoxicidad. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El ensayo se realizó según lo descrito por el fabricante (Sigma-Aldrich), con medición de la absorbancia a 570nm después de 24 horas de la solubilización de los cristales de formazán. Para eliminar el posible ruido de fondo de los medios de cultivo en la medida de la absorbancia, se realizó un blanco con medio sin células.

4.3. Microscopía de contraste de fases

Las células HT1376 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos a una concentración inicial de $2,5 \cdot 10^5$ células/ml y tratadas con vinflunina a diferentes concentraciones (2, 10, 20, 50 y 100 μM), estableciendo un control negativo sin medicamento. La vinflunina fue obtenida de Pierre Fabre Ibérica y diluida en el medio de cultivo. Tras 48 y 72 horas de tratamiento, fueron lavadas con tampón fosfato salino dos veces y se tomaron imágenes con microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse Ti).

4.4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Después de cultivar las células HT1376 en las condiciones descritas en el epígrafe 4.3, fueron recogidas para a continuación extraer el ARN total con el reactivo TriPure® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se midió con espectrofotómetro (NanoDrop®). El ARN extraído fue retrotranscrito a ADN complementario empleando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System para PCR cuantitativa a tiempo real (Invitrogen) con el método de los cebadores aleatorios.

4.5. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real fue llevada a cabo empleando el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Los cebadores empleados se indican en la Tabla I. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el aparato LightCycler® 480 (Roche) con las siguientes condiciones: fase de activación, 95°C 10 min; fase de amplificación, 45 ciclos a 95°C 10 s, 62°C 10 s y 72°C 10 s; fase

de enfriamiento, 40°C 10s. Los valores de HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*) se emplearon como control endógeno para normalizar las diferencias en la cantidad de ARN mensajero. Se hicieron dos réplicas de cada reacción.

Tabla I. Secuencias de los cebadores para los genes estudiados.

Gen	Secuencias
HPRT	Directo 5' – TGACCTTGATTTATTTTGCATACC Reverso 5' -CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
Twist1	Directo 5' - CCTCGGACAAGCTGAGCAAG -3' Reverso 5' - CCATCTTGGAGTCCAGCTCG -3'
Slug	Directo 5' - CCTCAGCTCAGGAGCATAACAGC -3' Reverso 5' - GGAGGTGTCAGATGGAGGAGG -3'
ZEB1	Directo 5' - TGAATGGGCGACCAAGAACA -3' Reverso 5' - ACTGCCTGGTGTGCTGAAA -3'
Snail	Directo 5' - GGATCTCCAGGCTCGAAAGG -3' Reverso 5' - GGCTTCGGATGTGCATCTTG -3'
Vimentina	Directo 5' - CAGCCGGAGCTACGTGACTA -3' Reverso 5' - AGAGGAGCGCGTGGCATA -3'
N-cadherina	Directo 5' - CCATACACCAGCCTGGAACG -3' Reverso 5' - GTTGCTGTTTGGGTCCGGTCT -3'
Hakai	Directo 5' – CGCAGACGAATTCCTATAAAGC -3' Reverso 5' - CCTTCTTCATCACCAGGTGG -3'
E-cadherina	Directo 5' - AGTGTCCTCCCGGTATCTTCC -3' Reverso 5' - CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT -3'
CK18	Directo 5' - GAGGGCTCAGATCTTCGCAA -3' Reverso 5' - AGCCCATGGATGTCGTTCTC -3'

4.6. Western blotting

Células HT1376, después de cultivarlas en las condiciones descritas en el epígrafe 4.3, fueron recogidas y extraídas las proteínas con tampón de lisis TX-100 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl y 1% TX-100] suplementado con fenilmetilsulfonil fluoruro y combinado de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Las proteínas se cuantificaron

empleando el método BCA, con albúmina de suero bovino como estándar. Cantidades iguales de los extractos proteicos (10µg) se resolvieron en un gel al 10% de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y se transfirieron a membranas de PVDF (Polivinilideno de difluorido, Immobion-P, Millipore®). La inmunodetección se realizó empleando como anticuerpos primarios anti-Hakai de conejo policlonal (Hakai-2498), proporcionado por el Dr. Yasuyuki Fujita, anti-E-cadherina de ratón monoclonal (Invitrogen) y anti- α -Tubulina de ratón policlonal (Invitrogen). Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-conejo-HRP y anti-ratón-HRP (GE Healthcare). Todos los anticuerpos fueron empleados a una dilución 1:1000. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron con el kit de detección quimioluminiscente (ECL kit) de GE Health System.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de vinflunina sobre la viabilidad celular de HT1376, HT1197, UM-UC-3 y SW780

Las características morfológicas de las líneas celulares empleadas se presentan en la Figura 4. HT1376 y HT1197 forman colonias, donde se establecen contactos celulares, aunque se observan células con aspecto fibroblástico, posibilitando el estudio de la reversión de EMT mediante marcadores epiteliales. UM-UC-3 y SW780 no forman colonias y presentan un fenotipo más fibroblástico que las dos líneas anteriores, lo que facilitaría la observación de la reversión de EMT por microscopía de contraste de fases.

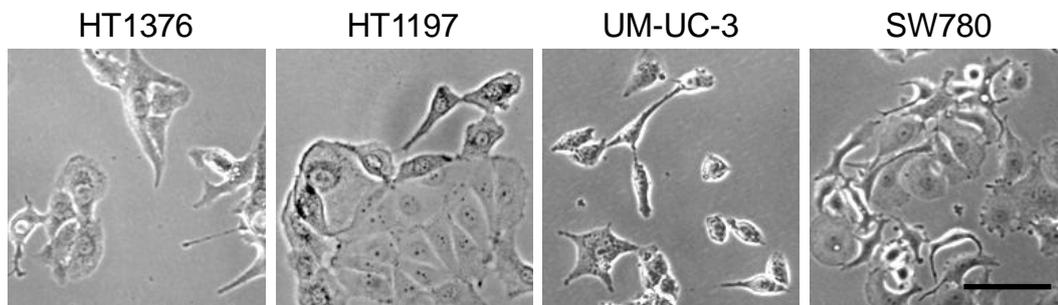


Figura 4. Fenotipo de las cuatro líneas celulares tumorales de vejiga empleadas. La barra de escala equivale a 100 μm .

Inicialmente investigamos la capacidad de la vinflunina de inducir muerte celular. Determinamos la viabilidad celular en las cuatro líneas, empleando el ensayo MTT de citotoxicidad y calculamos la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}), considerándose aquella concentración de vinflunina a la cual se alcanza el 50% del efecto citotóxico en estudio con respecto al tratamiento control ($0\mu\text{M}$). Así, determinamos un IC_{50} de 10 μM a 24, 48 y 72 horas para las líneas HT1376 y HT1197, de 20 μM a 24 horas y de 2 μM a 48 y 72 horas para UM-UC-3, y por último, un IC_{50} de

2 μM a 24 y 72 horas para SW780, siendo estas las menos resistentes al fármaco (Figura 5 A).

En la Figura 5 B se observa más claramente la disminución de la viabilidad según aumenta el tiempo de los tratamientos. A concentraciones bajas (2, 10 y 20 μM) y tiempo prolongado de 72 horas se mantiene la viabilidad celular, no siendo así bajo altas concentraciones, donde se detecta una reducción drástica de viabilidad celular.

5.2. Reversión del fenotipo mesenquimal de células tumorales al fenotipo epitelial por vinflunina

Para analizar el posible efecto de la vinflunina sobre la adhesión célula-célula y su efecto sobre la reversión de EMT, las células HT1376 fueron tratadas con el medicamento a cinco concentraciones (2, 10, 20, 50 y 100 μM) durante 48 y 72 horas. Vinflunina induce reversión de EMT a bajas concentraciones, de 2, 10 y 20 μM , donde las células se muestran en monocapa unidas fuertemente mediante contactos celulares, de acuerdo con un fenotipo epitelial y pierden las proyecciones citoplásmicas que se observan en las condiciones control. Tal y como se ha descrito previamente, a altas concentraciones (50 y 100 μM para HT1376) se produce muerte celular, las células se redondean, pierden adherencia al substrato y se tornan apoptóticas. Estos cambios morfológicos se observan a las 48 y 72 horas de tratamiento (Figura 6).

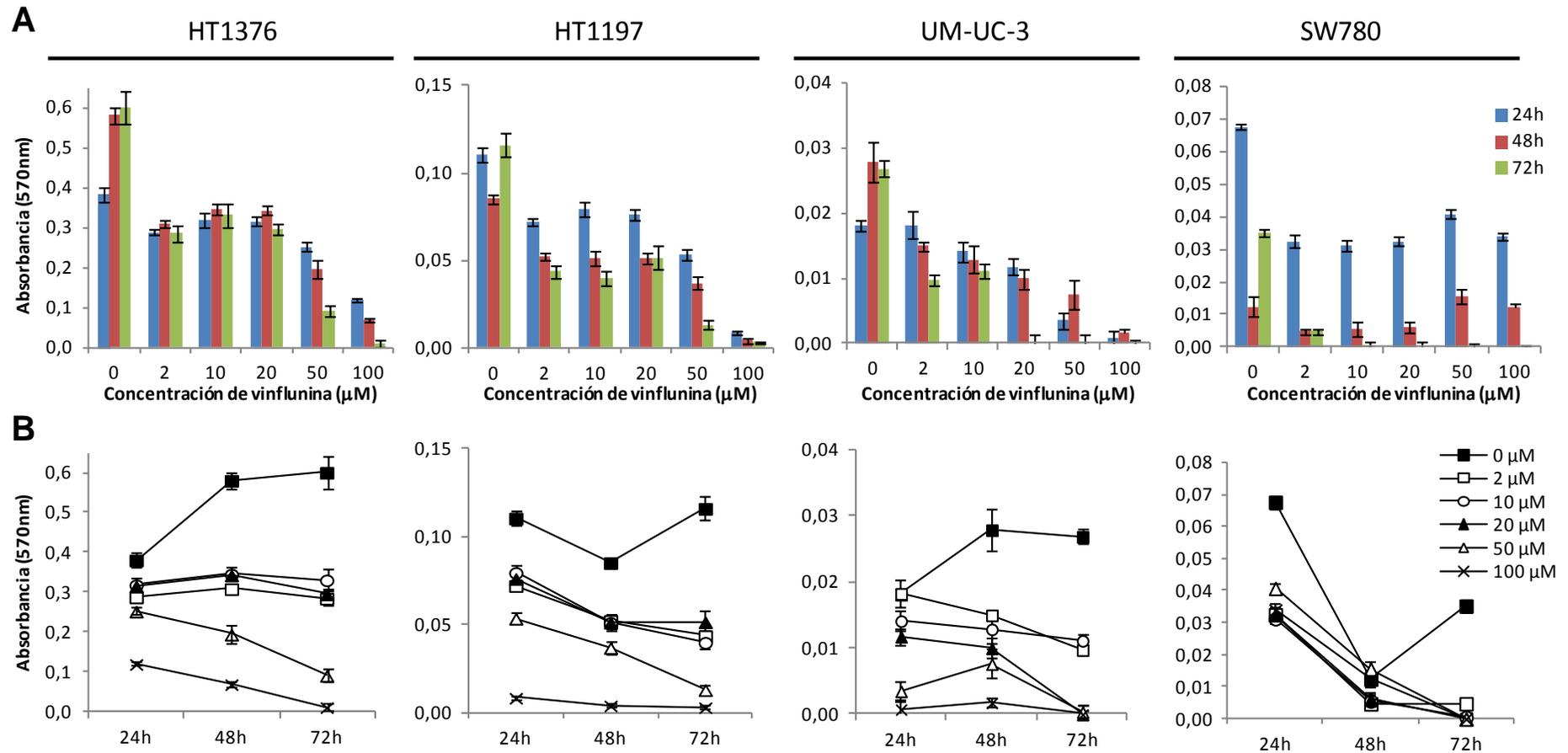


Figura 5. Citotoxicidad de vinflunina. Ensayo MTT de células HT1376, HT1197, UM-UC-3 y SW780 después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con vinflunina a distintas concentraciones. **(A)** Viabilidad celular según la concentración de vinflunina, **(B)** viabilidad según el tiempo de tratamiento. Cada punto representa la media de 8 réplicas \pm error estándar de la media.

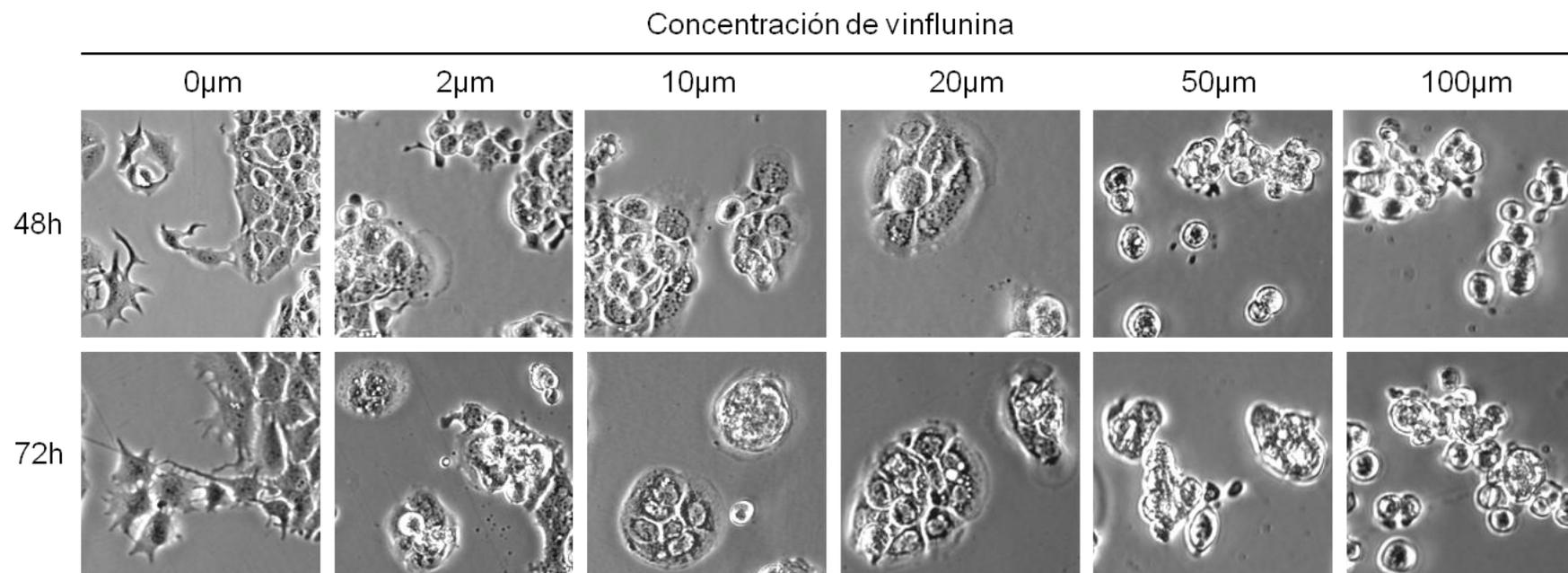


Figura 6. Efecto sobre el fenotipo celular bajo el tratamiento por vinflunina. Imágenes tomadas con microscopio de contraste de fases (10X) de células HT1376 después de 48 y 72 horas del inicio del tratamiento con vinflunina a las concentraciones indicadas.. A concentraciones de 50 y 100 μ M, se observa muerte celular.

5.3. Efecto de vinflunina sobre la expresión de marcadores EMT en células HT1376

Para investigar el efecto de vinflunina sobre el proceso de EMT estudiamos la expresión de diferentes marcadores descritos de este proceso, atendiendo a aquellos marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) y Western blot en la línea celular HT1376.

En el estudio de los niveles de ARN mensajero, se obtuvo un incremento significativo de la expresión de los marcadores epiteliales E-cadherina y CK18 según aumenta la concentración de vinflunina (Figura 7 A). Para E-cadherina, el aumento se produce a concentración de 2 μ M, manteniéndose sin variaciones significativas a 2, 10 y 20 μ M. CK18 presenta un incremento de la expresión a 72 horas, aunque no se observa regulación por el tratamiento. Por otro lado, no se detectan cambios en la expresión de marcadores mesenquimales Hakai y Slug (Figura 4B). Finalmente, no se detecta expresión de los marcadores de Twist1, ZEB1, Snail, Vimentina y N-cadherina (Tabla II).

Tabla II. Expresión relativa de marcadores de EMT. (+) Aumento de la expresión respecto al tratamiento control, (=) expresión no regulada por vinflunina, (-) no expresión.

Marcadores epiteliales	E-cadherina	+
	CK18	+
Marcadores mesenquimales	Hakai	=
	Slug	=
	Twist1	-
	ZEB1	-
	Snai	-
	Vimentina	-
	N-cadherina	-

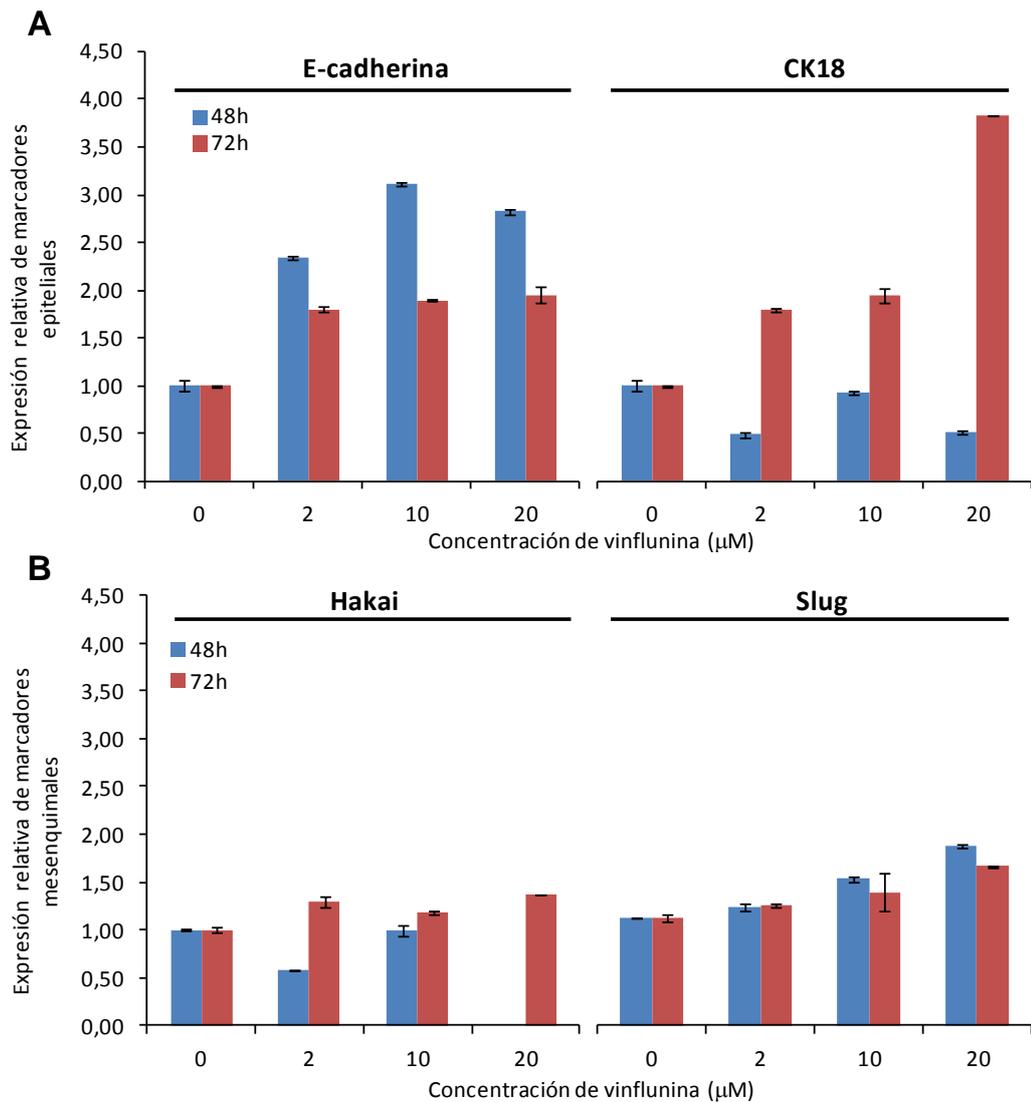


Figura 7. (A) Niveles relativos de ARNm de marcadores epiteliales (E-cadherina y CK18) y **(B)** Niveles relativos de ARNm mesenquimales (Hakai y Slug). Cada punto representa la media de 2 réplicas \pm desviación estándar de la media.

A continuación, se analizó el efecto de la vinflunina sobre los marcadores E-cadherina y Hakai mediante Western blot. Como se observa en las figuras 8 y 9, a 72 horas de tratamiento se detecta un aumento de los niveles de E-cadherina de 0 a 10 μM que se correlaciona con un descenso de la proteína Hakai de 2 a 10 μM . A concentraciones altas, E-cadherina y Hakai disminuyen, lo que concuerda con los datos obtenidos por microscopía de contraste de fases y de citotoxicidad. Estos cambios no se detectan a 24 horas (Figura 8, panel superior). Todos

estos datos en conjunto sugieren que el aumento de E-cadherina puede ser debido a un descenso de los niveles de Hakai. La proteína de E-cadherina no es degradada, ya que Hakai disminuye por efecto de la vinflunina, y la falta de degradación aumenta sus niveles.

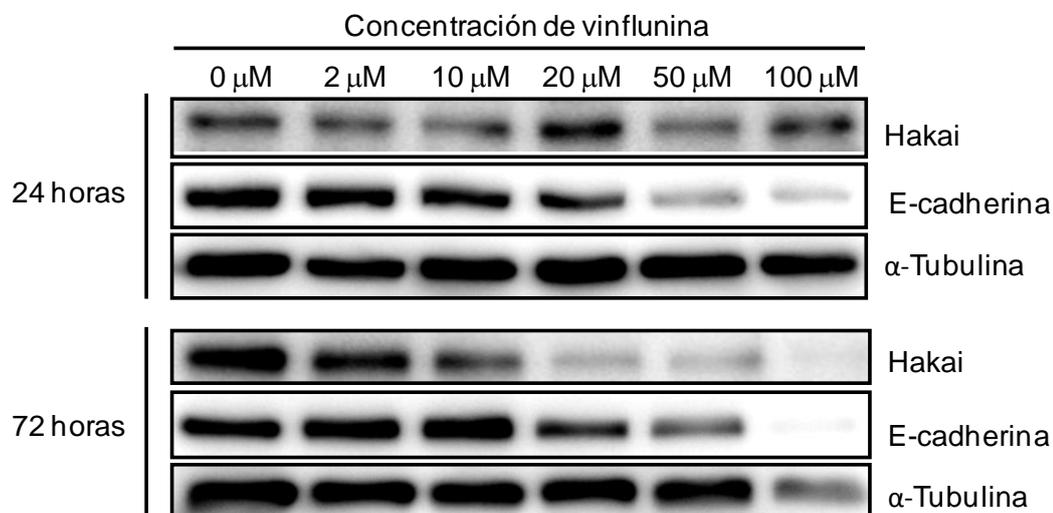


Figura 8. Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina y Hakai tras 24 horas y 72 horas de las concentraciones indicadas de vinflunina. α -tubulina fue utilizado como control de carga.

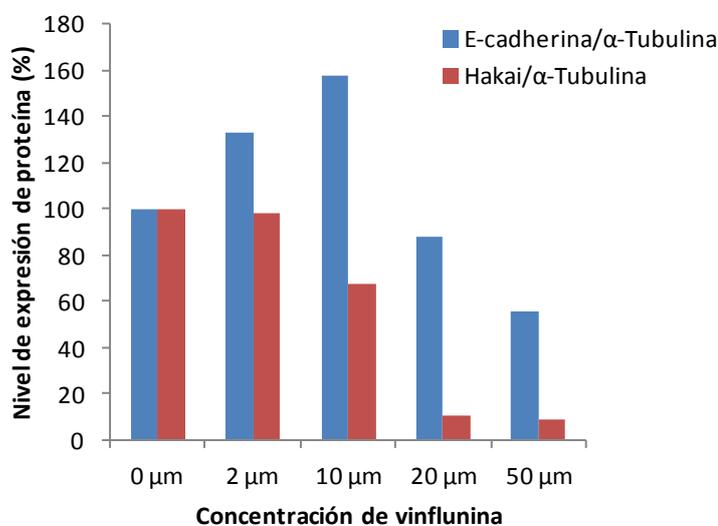


Figura 9. Cuantificación mediante densitometría de los niveles de proteína E-cadherina y Hakai a 72 horas de tratamiento con vinflunina.

6. DISCUSIÓN

6.1. Citotoxicidad de vinflunina: equilibrio entre dosis y tiempo de tratamiento

Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, el IC₅₀ de vinflunina para las cuatro líneas celulares es alrededor de 10 μ M. A esta concentración sólo sobreviven al tratamiento el 50% de las células. Este dato es muy superior al descrito por Kruczynski *et al.* ⁽¹⁵⁾ en células de leucemia de ratón y por Bonfil *et al.* ⁽¹⁶⁾ en células de cáncer de vejiga de ratón, que ronda 400 nM.

El interés del cálculo del IC₅₀ es poder llegar a un equilibrio entre la dosis y el tiempo de tratamiento. Se observa que una concentración alta (50 μ M) poco tiempo (24 horas) induce muerte celular (Figura 6) y por el contrario concentraciones bajas (2 μ M) y largos periodos (72 horas) se observa una reversión del fenotipo mesenquimal a epitelial, sin disminuir significativamente la viabilidad. Esto sugiere que se podría determinar si un tratamiento combinando las dos fases anteriores permitiría, en primer lugar, inducir la muerte de las células cancerígenas a altas concentraciones, y, en segundo lugar, a bajas concentraciones revertir el fenotipo mesenquimal de aquellas células que mantengan capacidad invasiva, inhibiendo así su potencial de metastatizar.

6.2. Reversión de EMT: regulación de E-cadherina

A la vista de los resultados mostrados en Figura 6 y Figura 9, se produce reversión de EMT a las mismas concentraciones a las que aumenta la expresión de la proteína E-cadherina. Esto sugiere que vinflunina puede estar regulando la expresión de E-cadherina de un modo directo o indirecto y producen consecuencia revirtiendo la EMT.

Según lo descrito en la bibliografía, E-cadherina es un marcador epitelial que se pierde durante la EMT ⁽¹⁷⁾. Se ha descrito que su regulación a nivel transcripcional esta mediada por los represores ZEB-1, Snail, Slug y Twist ⁽⁷⁾. La baja expresión que se obtiene mediante qRT-PCR de ZEB-1, Snail y Twist, y la expresión sin variaciones de Slug según la concentración de medicamento (Tabla II y Figura 7) sugieren que posiblemente vinflunina no regula la expresión de estos represores transcripcionales, y que el incremento de E-cadherina debe estar controlado por otros factores. Sin embargo, debería confirmarse esta premisa mediante análisis de los niveles de proteínas.

E-cadherina también es regulada a nivel postraducciona por la proteína Hakai, que induce su ubiquitinización y consiguiente degradación vía lisosomas ⁽⁹⁾. En la Figura 9 se observa, a 10 μ M, un descenso en los niveles de proteína Hakai y un mayor aumento de E-cadherina, lo que sugiere que E-cadherina podría estar regulada a nivel postraducciona, y por tanto, el descenso de Hakai por vinflunina evitaría la degradación de E-cadherina vía lisosomas.

Recientes publicaciones ⁽¹⁴⁾ relacionan los complejos E-cadherina con los microtúbulos. De hecho se ha demostrado que la dinámica de los microtúbulos permite a las células concentrar E-cadherina en los contactos celulares mediante la regulación de la distribución de E-cadherina una vez alcanza la superficie celular ⁽¹⁸⁾. Por tanto, cabe la posibilidad de que en nuestro sistema, vinflunina inhiba los microtúbulos y esto tenga un impacto sobre la localización de E-cadherina en uniones adherentes.

6.3. Perspectivas

Es necesario validar los resultados obtenidos en el fenotipo observado así como en los niveles de marcadores de EMT en otras líneas celulares de vejiga.

La determinación del IC_{50} permitirá estudiar la evolución de los marcadores de EMT a esa concentración a diferentes tiempos de tratamiento para evaluar aquellos que puedan estar implicados en rutas de señalización descritas en EMT. El estudio de los contactos celulares mediante inmunofluorescencia podría mostrar datos sobre la pérdida de E-cadherina en estas localizaciones por la inhibición de microtúbulos debida a la vinflunina, así como determinar la localización celular de Hakai.

Finalmente, resultaría interesante profundizar en el estudio de la apoptosis para determinar si existen diferencias en el porcentaje de células en apoptosis a baja y alta concentración de vinflunina.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten inferir las siguientes conclusiones:

- a. Vinflunina induce muerte celular a altas concentraciones.
- b. A bajas concentraciones de vinflunina se observa un cambio de fenotipo mesenquimal a epitelial.
- c. Vinflunina incrementa la expresión ARNm y proteína de E-cadherina.
- d. Vinflunina reduce los niveles de proteína de Hakai

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144(4):646-674.
2. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell* 2003;112(4):535-548.
3. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008;27(55):6920-6929.
4. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39:305-318.
5. Levayer R, Lecuit T. Breaking down EMT. *Nat Cell Biol* 2008;10:757-759.
6. McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis* 2009;28:335-344.
7. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-428.
8. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Beherns J, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Mol Biol Cell* 2002;4(3):222-231.
9. Palacios F, Tushir J, Fujita Y, D'Souza-Schorey C. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Mol Cell Biol* 2005;25:389-402.
10. Pece S, Gutkind J. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol* 2002;4:72-74.
11. Aparicio LA, Valladares M, Blanco M, Alonso G, Figueroa A. Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer Met Rev* 2012; 31:375-86.

12. Rodríguez-Rigueiro T, Valladares-Ayerbes M, Haz-Conde M, Aparicio LA, Figueroa A. Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion. *BMC Cancer* 2011;11:474-480.
13. Pasquier E, André N, Braguer D. Targeting microtubules to inhibit angiogenesis and disrupt tumor vasculature: implications for cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:566-581.
14. Harris TJC, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Mol Cell Biol* 2010;11:502-514.
15. Kruczynski A, Barret JM, Etiévant C, Colpaert F, Fahy J, Hill BT. Antimitotic and tubulin-interacting properties of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Biochem Pharmacol* 1998;55:635-648.
16. Bonfil RD, Russo DM, Binda MM, Delgado FM, Vincenti M. Higher antitumor activity of vinflunine than vinorelbine against an orthotopic murine model of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology* 2002;7:159-166.
17. Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(6):621-628.
18. Stehbens SJ, Paterson AD, Crampton MS, Shewan AM, Ferguson C, Akhmanova A, et al. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci* 2006;119:1801-1811.