

Papel de Hakai durante la progresión tumoral: implicaciones sobre la plasticidad epitelial

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR INTERNACIONAL

Raquel Carballo Castosa

Tesis doctoral

2017

Directora y Tutora: Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvís

Programa de doctorado en Ciencias da Saúde



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ANGÉLICA FIGUEROA CONDE-VALVÍS, Doutora en Bioquímica e Bioloxía Molecular pola Universidade Autónoma de Madrid, e coordinadora do Grupo Plasticidade Epitelial e Metástase no Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

CERTIFICA:

Que Dña. **Raquel Carballo Castosa**, Licenciada en Biotecnoloxía pola Universidade de León, realizou baixo a miña supervisión o traballo que leva por título “**Papel de Hakai durante la progresión tumoral: implicaciones sobre la plasticidad epitelial**”. Dito traballo reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para ser defendido públicamente e optar ao grado de doutor internacional en Ciencias da Saúde.

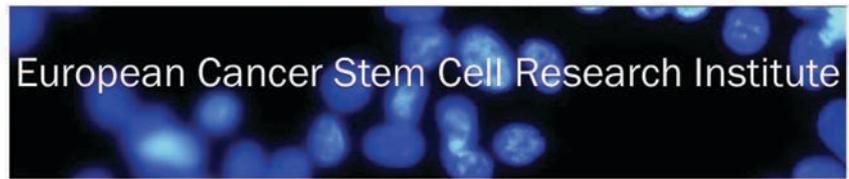
Y para que así conste, firmo el presente certificado en A Coruña, a 13 de Novembro de 2017.

Asdo. Angélica Figueroa Conde-Valvís

Directora

Asdo. Raquel Carballo Castosa

Doctoranda



Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se realizó una estancia predoctoral, con la obtención de una beca INDITEX-UDC durante el año académico 2014/2015, en el *European Cancer Stem Cell Research Institute* de *Cardiff University* bajo la supervisión de la Dra. Catherine Hogan, líder del grupo *Cell-cell interactions in early carcinogenesis*.

Aos meus pais

Aos meus yayos

Aos meus abuelos

A Merce

"I Believe, I can fly"

Peter Pan

*"Mamá dice que la vida es como una caja de bombones,
nunca sabes lo que te va a tocar"*

Forrest Gump

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que presenta una elevada tasa de mortalidad a nivel mundial, y su incidencia se está incrementando progresivamente año tras año. El carcinoma, el más común de todos los cánceres, es el resultado de una serie de transformaciones en células epiteliales. Durante esta transformación, las células alteran varias características fenotípicas incluyendo un aumento de la proliferación, y una disminución de las adhesiones célula-célula y célula-sustrato adquiriendo capacidad motil e invasiva. La E-cadherina es el miembro prototipo mejor caracterizado de las uniones adherentes y con mayor expresión en células epiteliales. La pérdida de función o expresión de E-cadherina es un marcador de un proceso denominado transición epitelio-mesénquima lo que favorece la motilidad y la capacidad invasiva y es indicador de pronóstico malo. En 2002, se identificó la proteína Hakai como una E3 ubiquitina-ligasa, cuyo sustrato específico es E-cadherina, y actúa mediando su ubiquitinización y posterior degradación, debilitando así las uniones célula-célula y favoreciendo la motilidad celular. En este contexto, por un lado, se estudió el efecto de un alcaloide la vinca, la vinflunina, fármaco comúnmente utilizado en pacientes que padecen un carcinoma de vejiga metastásico en estadio avanzado, y que no responden al tratamiento con cisplatino. La vinflunina actúa inhibiendo la dinámica de microtúbulos, y dado que recientes publicaciones ponen de manifiesto la relación entre la dinámica de microtúbulos y las uniones adherentes se analizó mediante experimentos *in vitro* su efecto sobre las uniones adherentes dependientes de E-cadherina, y sobre Hakai. Se observó que la vinflunina es capaz de inducir diferenciación epitelial, y fortalecer las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina, regulando a su vez la expresión de Hakai. Por otro lado, se analizó el papel de la proteína Hakai *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se empleó en una línea celular epitelial no transformada (MDCK) a la que se le sobreexpresó de forma estable la proteína Hakai (Hakai-MDCK), y se corroboró que Hakai induce la transición epitelio-mesénquima, incrementa la proliferación y la invasividad celular, lo que se acompaña de una disminución de los sustratos específicos de dicha proteína, E-cadherina y Cortactina. Para el estudio *in vivo*, se utilizaron ratones atímicos desnudos a los que se inyectaron dichas células MDCK y Hakai-MDCK, y se confirmó que Hakai induce la formación de tumores, incrementa su tasa de proliferación, y regula los marcadores de transición epitelio-mesénquima *in vivo*, observándose tumores muy desdiferenciados, altamente agresivos, y con micrometástasis en pulmón.

RESUMO

O cancro é unha enfermidade que presenta unha elevada taxa de mortalidade a nivel mundial, e a súa incidencia estase incrementando ano tras ano. O carcinoma, o máis común de todos os cancros, é o resultado dunha serie de transformacións en células epiteliais. Durante esta transformación, as células alteran varias características fenotípicas incluíndo un incremento da proliferación, e unha diminución das unións célula-célula e célula-substrato adquirindo capacidade motil e invasiva. A E-cadherina é o membro prototipo mellor caracterizado das unións adherentes e con maior expresión en células epiteliais. A perda de función ou expresión de E-cadherina é un marcador dun proceso denominado transición epitelio-mesénquima, o que favorece a motilidade e a capacidade invasiva, e é indicador de pronóstico malo. En 2002, identificouse a proteína Hakai como unha E3 ubiquitina-ligasa, cuxo substrato específico é E-cadherina, e actúa mediando a súa ubiquitinización e posterior degradación, debilitando así as unións célula-célula e favorecendo a motilidade celular. Neste contexto, por un lado, estudouse o efecto dun alcaloide da vinca, a vinflunina, fármaco comúnmente utilizado en pacientes que padecen un carcinoma de vexiga metastásico en estadio avanzado, e que non responden ao tratamento con cisplatino. A vinflunina actúa inhibindo a dinámica de microtúbulos, e dado que recentes publicacións poñen de manifesto a relación entre a dinámica de microtúbulos e as unións adherentes, analizouse mediante experimentos *in vitro* o seu efecto sobre as unións adherentes dependentes de E-cadherina e sobre Hakai. Observouse que a vinflunina é capaz de inducir diferenciación epitelial, e fortalecer as unións célula-célula mediadas por E-cadherina, regulando á súa vez a expresión de Hakai. Por outro lado, analizouse o papel da proteína Hakai *in vitro* e *in vivo*. Para elo, empregouse unha liña celular epitelial non transformada (MDCK) á que se lle sobreexpresou de forma estable a proteína Hakai (Hakai-MDCK), e corroborouse que Hakai induce a transición epitelio-mesénquima, incrementa a proliferación e a invasividade celular, o que se acompaña dunha diminución dos substratos específicos de dita proteína, E-cadherina e Cortactina. Para o estudo *in vivo* utilizáronse ratóns atómicos desnudos aos que se lles inxectaron ditas células, MDCK e Hakai-MDCK, e confirmouse que Hakai induce a formación de tumores, incrementa a súa taxa de proliferación, e regula os marcadores de transición epitelio-mesénquima *in vivo*, observándose tumores moi desdiferenciados, altamente agresivos, e micrometástases en pulmón.

ABSTRACT

Cancer is a disease with a high mortality rate worldwide, and its incidence is increasing steadily. Carcinoma, the most common type of cancers, is the result of transformations in epithelial cells. During this transformation, cells acquire various phenotypic characteristics including increased cell proliferation, loss of cell-cell and cell-substrate adhesions, increasing motility and invasiveness. E-cadherin, the best characterized and prototype member of the adherens junctions, is expressed in epithelial cells. Loss of function or expression of E-cadherin protein is considered as a hallmark of epithelial-to-mesenchymal transition, favouring cell motility and invasiveness and being a poor prognosis predictor. In 2002, Hakai protein was identified as an E3 ubiquitin-ligase for E-cadherin substrate. Hakai induces E-cadherin ubiquitination and subsequent degradation, thus altering cell-cell junctions and increasing cell motility. In this context, firstly it was studied the possible role of a vinca alkaloid, vinflunine, on cell-cell contacts. Vinflunine is commonly used in patients with advanced stage metastatic bladder carcinoma that do not respond to cisplatin treatment. Vinflunine is an anti-microtubule agent, and since recent publications show a relationship between microtubule dynamics and adherens junctions, vinflunine effect on E-cadherin-dependent junctions and on Hakai was analyzed by *in vitro* studies. It was observed that vinflunine induces epithelial differentiation, E-cadherin dependent cell-cell contacts. Moreover, it regulates Hakai protein expression. On the other hand, the role of the Hakai protein was analyzed *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, it was used Hakai overexpressing MDCK cells (Hakai-MDCK) and it was corroborated that Hakai induces epithelial-to-mesenchymal transition, increases proliferation and cellular invasiveness, which is accompanied by a decrease in its specific substrates, E-cadherin and Cortactin. For the *in vivo* study, an athymic nude mouse model was used by injecting MDCK and Hakai-MDCK cells into the flanks. Hakai induces tumor formation, increases its tumour growth, and regulates the epithelial-to-mesenchymal transition markers *in vivo*. Undifferentiated and highly aggressive tumors are formed and micrometastasis are detected in lung of Hakai-MDCK injected mice.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	23
1. Incidencia y epidemiología del cáncer	25
2. Estrategias de clasificación de la progresión tumoral	28
3. Alteraciones fisiológicas de las células tumorales	29
4. Células epiteliales: carcinomas	33
4.1. Invasión y metástasis de carcinomas	34
5. Transición epitelio-mesénquima.....	36
5.1. Transición epitelio-mesénquima fisiológica y patológica	36
5.2. Transición epitelio-mesénquima y cáncer.....	38
5.3. Plasticidad epitelial: implicaciones clínicas.....	41
6. Uniones adherentes: E-cadherina.....	43
6.1. Estructura de la E-cadherina	45
6.2. Uniones adherentes y microtúbulos: Vinflunina	48
6.2.1. Relación entre uniones adherentes y microtúbulos	48
6.2.2. Inhibidores de microtúbulos y transición epitelio-mesénquima..	50
6.2.3. Vinflunina y su papel en cáncer de vejiga.....	51
7. Regulación de E-cadherina.....	52
7.1. Reguladores de E-cadherina	52
7.2. Síntesis, endocitosis, reciclaje y degradación de E-cadherina	54
8. Ubiquitinización: E3 ubiquitina-ligasa Hakai	57
8.1. Proceso de ubiquitinización	57
8.2. E3 ubiquitina-ligasa Hakai	59
8.3. Estructura de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai	59
8.4. Funciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	61
8.5. Hakai como diana terapéutica	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Cultivos celulares	77
2. Reactivos y anticuerpos	78
3. Ensayos de viabilidad celular	79
4. Caracterización fenotípica.....	80
5. Extracción y análisis de proteínas mediante western-blot	81
5.1. Extracción y cuantificación de la concentración de proteínas	81
5.2. Preparación de las muestras para Western-Blot	82
5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	83
5.4. Transferencia de las proteínas a la membrana de inmunodetección	84

6.	Microscopía electrónica.....	85
7.	Ensayos de apoptosis	86
7.1.	Detección por TUNEL	86
7.2.	Detección por Anexina V-FITC	87
8.	Extracción de ARN y PCR en tiempo real.....	88
8.1.	Extracción y cuantificación de la concentración de ARN.....	88
8.2.	Retrotranscripción.....	89
8.3.	PCR cuantitativa (qPCR).....	90
9.	Inmunofluorescencia	93
10.	Ensayos de proliferación celular.....	93
11.	Ensayo de invasión celular	95
12.	Ensayo de capacidad de formación de colonias en agar blando	96
13.	Ensayos de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos.....	98
13.1.	Animales, grupos experimentales y desarrollo del modelo: estudio piloto	98
13.2.	Sacrificio y recogida de muestras.....	99
13.3.	Análisis histopatológico	101
13.3.1.	Procesamiento histológico de las muestras incluidas en parafina.....	101
13.3.2.	Tinciones histológicas: Hematoxilina-Eosina (H&E).....	102
13.3.3.	Tinciones inmunohistoquímicas.....	103
14.	Cuantificación de micrometástasis en pulmón en un modelo de ratón <i>in vivo</i>	104
15.	Análisis estadístico	106
	RESULTADOS	107
	A. PAPEL DE LA VINFLUNINA SOBRE LAS UNIONES CELULARES EN CÉLULAS TUMORALES EPITELIALES DE VEJIGA	109
1.	Efecto de la vinflunina sobre la viabilidad celular de células epiteliales humanas de cáncer de vejiga	109
2.	La vinflunina induce un fenotipo epitelial en las células tumorales de vejiga.....	111
3.	Efecto de la vinflunina sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima.....	112
4.	Efecto de la vinflunina sobre las uniones célula-célula mediante microscopía electrónica de transmisión.....	115
5.	Efecto de la vinflunina sobre la diferenciación epitelial y la apoptosis...	116
6.	La vinflunina promueve la degradación de Hakai mediada por proteasoma.....	118
	B. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA E3 UBIQUITINA-LIGASA HAKAI <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.....	121
1.	Efecto de la sobreexpresión de Hakai en células MDCK <i>in vitro</i>	121
2.	Hakai induce la formación de tumores <i>in vivo</i>	128
3.	Hakai incrementa la proliferación, la invasión y modula marcadores de transición epitelio-mesénquima <i>in vivo</i>	131

4. Hakai induce micrometástasis en pulmón <i>in vivo</i>	136
DISCUSIÓN	139
A. ACCIÓN DE LA VINFLUNINA SOBRE LAS UNIONES ADHERENTES DE CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES DE VEJIGA: IMPLICACIÓN SOBRE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA.....	141
B. EFECTO DE HAKAI <i>in vivo</i>	147
1. La sobreexpresión de Hakai induce transición epitelio-mesénquima <i>in vitro</i>	147
2. Hakai induce la formación de tumores y la proliferación celular <i>in vivo</i>	147
3. Hakai induce invasión local observándose un fenotipo mesenquimal en las células tumorales	149
4. Hakai induce micrometástasis en pulmón <i>in vivo</i>	150
CONCLUSIONES	153
CONCLUSIONS.....	157
BIBLIOGRAFÍA	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de la mortalidad en varones a nivel mundial durante el año 2012.	26
Figura 2. Estimación de la mortalidad en mujeres a nivel mundial durante el año 2012.	26
Figura 3. Manifestaciones fisiológicas adquiridas por las células tumorales. .	30
Figura 4. Diagrama de células epiteliales de intestino delgado con polaridad apico-basal.	34
Figura 5. Progresión tumoral en carcinomas.	36
Figura 6. Tipos de transición epitelio-mesénquima: fisiológica y patológica...	38
Figura 7. Transición epitelio-mesénquima y progresión tumoral.....	40
Figura 8. Plasticidad epitelial.....	43
Figura 9. Uniones celulares en tejido epitelial de vertebrados.....	44
Figura 10. Representación esquemática de la estructura de E-cadherina.	46
Figura 11. Complejo E-cadherina/cateninas en las uniones adherentes.	47
Figura 12. Microtúbulos y uniones adherentes.	49
Figura 13. Mecanismos moleculares de regulación de los niveles de expresión de E-cadherina.....	54
Figura 14. Ruta de síntesis, endocitosis, reciclaje y degradación de la proteína E-cadherina.....	55
Figura 15. Proceso de ubiquitinización.	58
Figura 16. Diagrama esquemático del dominio HYB de la proteína Hakai.	61
Figura 17. Regulación de vías de señalización mediadas por Hakai.....	63
Figura 18. Fenotipo de las líneas celulares HT1376, 5637, SW780, UMUC3 y T24.....	110
Figura 19. Efecto de la vinflunina sobre la viabilidad celular de líneas tumorales de vejiga.	111
Figura 20. Efecto de la vinflunina sobre el fenotipo celular de las líneas celulares HT1376, 5637 y UMUC3.	112

Figura 21. Efecto de la vinflunina sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima.....	115
Figura 22. Análisis del efecto de la vinflunina sobre los contactos célula-célula mediante microscopía electrónica de transmisión.	116
Figura 23. Efecto de la vinflunina sobre diferenciación epitelial y la apoptosis.	118
Figura 24. Efecto de la vinflunina sobre los niveles de expresión de ARNm de Hakai.	119
Figura 25. La vinflunina induce la degradación de Hakai vía proteasoma en la línea celular 5637.....	120
Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre el fenotipo celular. .	122
Figura 27. Caracterización proteica de marcadores en las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK.....	123
Figura 28. Especificidad de marcaje citoplasmático para E-cadherina mediante inmunofluorescencia.	124
Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de la proteína Hakai sobre la proliferación celular.	125
Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre la apoptosis celular de las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4.....	126
Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de Hakai en la línea celular MDCK sobre la invasión celular.....	127
Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de Hakai en la línea celular MDCK sobre la formación de colonias en agar blando.	128
Figura 33. Formación de tumores en ratones atímicos desnudos (Nu/Nu)...	130
Figura 34. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina de los tumores extraídos de ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4.	132
Figura 35. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina del tumor extraído de ratones atímicos desnudos inoculados con células Hakai-MDCK clon 4.	132
Figura 36. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina de los tejidos extraídos de ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4.	133
Figura 37. Expresión del marcador epitelial E-cadherina, y Hakai en ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4.....	135

Figura 38. Expresión de los marcadores de transición epitelio-mesénquima y de proliferación en ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4.....	135
Figura 39. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre la mitosis celular en tejido tumoral de ratones atímicos desnudos mediante tinción de hematoxilina-eosina.....	136
Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre la micrometástasis celular en tejido pulmonar de ratones atímicos desnudos mediante PCR cuantitativa.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en western-blott	79
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia	79
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica	79
Tabla 4. Composición del tampón de lisis utilizado para la extracción de proteínas	81
Tabla 5. Composición del tampón de carga Laemmli 5x	83
Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados en SDS-PAGE	84
Tabla 7. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para llevar a cabo la retrotranscripción de las muestras de ARN.	90
Tabla 8. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para qPCR a partir de ARNm.....	90
Tabla 9. Oligos utilizados para el análisis de los genes de interés.	92
Tabla 10. Tampón de reacción para analizar la proliferación celular	95
Tabla 11. Nomenclatura y condiciones del modelo animal.	99
Tabla 12. Programa utilizado por el inclusor de parafina Myr.	101
Tabla 13. Oligos utilizados para el análisis de los genes de interés	105
Tabla 14. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para qPCR a partir de ADN.....	105

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APS	Persulfato de amonio (<i>Ammonium persulfate</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsi	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido biconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina (<i>5-Bromo-2-Deoxyuridine</i>)
BSA	Albúmina de suero bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CBLL1	<i>Cbl proto-oncogene like 1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
cm ³	Centímetros cúbicos
CTC	Célula tumoral circulante
d	Días
DAB	Diaminobencidina (<i>Diaminobenzidine</i>)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol (<i>4',6-diamino-2-phenylindole</i>)
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato (<i>Deoxyuridine triphosphate</i>)
DS	Desviación estándar

dUTP	Desoxiuridina trifosfato (<i>Deoxyuridine triphosphate</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EdU	5-etinil-2-desoxiuridina (<i>5-ethynyl-2-deoxyuridine</i>)
EE	Error estándar
ER α	Receptor de estrógenos alpha (<i>Estrogen receptor alpha</i>)
EGF	Factor crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor factor crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
FGF	Factor crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>)
g	Gramos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
h	Horas
HA	Hemaglutinina
H&E	Hematoxilina-Eosina
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HYB	<i>Hakai pTyr-binding</i>
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Ioduro de propidio
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Miliamperio
m6A	N6-metiladenosina
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>

MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
miARN	Micro ácido ribonucleico
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OCT	Temperatura óptima de corte (<i>Optimum cutting temperature</i>)
PAGE	Electroforesis gel poliacrilamida (<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción cadena polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor crecimiento derivado plaquetas (<i>Platelet-derived growth reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PVDF	Polivinilideno de difluorido
qPCR	Reacción cadena polimerasa cuantitativa (<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
Robo	Receptor Roundabout
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Seg	Segundos

TBS	Tampón Tris-Salino (<i>Tris-Buffered saline</i>)
TBS-T	Tampón Tris-Salino con Tween20 (<i>Tris-Buffered saline Tween20</i>)
TGF- β	Factor crecimiento transformante β (<i>Transforming growth factor β</i>)
T _m	Temperatura de fusión (<i>Melting temperature</i>)
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TME	Transición mesénquima-epitelio
V	Voltios
VFL	Vinflunina
v-Src	Virus aviar del sarcoma de Rous
ZEB-1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB-2	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>
°C	Grados centígrados
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
μ M	Micromolar
λ	Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

1. Incidencia y epidemiología del cáncer

El cáncer constituye una enorme carga mundial que tiene previsiones de ir en aumento debido al incremento de la población, al envejecimiento de la sociedad y a la adopción de un estilo de vida en el que existen factores de riesgo ampliamente descritos como el hábito de fumar, la inactividad física diaria, una alimentación deficiente, la obesidad o cambios en los patrones de reproducción, que se han incrementado considerablemente en las últimas décadas. Los últimos datos a nivel mundial sobre incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer publicados por GLOBOCAN en el año 2012 han recogido 14.1 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y 8.2 millones de muertes causadas por cáncer en ese mismo año. El principal motivo de muerte por cáncer se origina por tumores de pulmón en varones (Figura 1) y de mama en mujeres (Figura 2). Otros tumores diagnosticados frecuentemente a nivel mundial tienen su origen en hígado, estómago y colon en el caso de varones, y estómago, útero y colon entre las mujeres (1). El cáncer de pulmón fue el más diagnosticado y la principal causa de muerte en varones durante el año 2012, aunque la estimación de prevalencia de tumores en varones está ocupada en primer lugar por el cáncer de próstata seguido de intestino grueso, vejiga, pulmón y riñón, en este orden. La contaminación ambiental, la exposición a carcinogénicos ambientales como radón o hidrocarburos aromáticos, y el hábito de fumar son los principales factores de riesgo que hacen a este tipo de cáncer uno de los más prevenibles. Además, según ha publicado la Organización Mundial de la Salud, 1 de cada 3 muertes ocasionadas por cáncer se deben a causas evitables, como el factor de riesgo del tabaco, entre otros. En el grupo de las mujeres, el diagnóstico de cáncer de mama presenta es el más frecuente. Existe una gran variabilidad en la incidencia del cáncer de mama entre países, que pone de manifiesto las diferencias en la disponibilidad y el acceso a un diagnóstico precoz entre países. El cáncer colorrectal es el tercero más diagnosticado en varones y el segundo en mujeres. En algunos países como Estados Unidos se ha observado una disminución de la incidencia de cáncer colorrectal atribuida al incremento de análisis de cribado y extirpación de adenomas pre-cancerosos, acompañados del manejo de los factores de riesgo como fumar, obesidad y dieta con elevado consumo de carne roja y procesada (2).

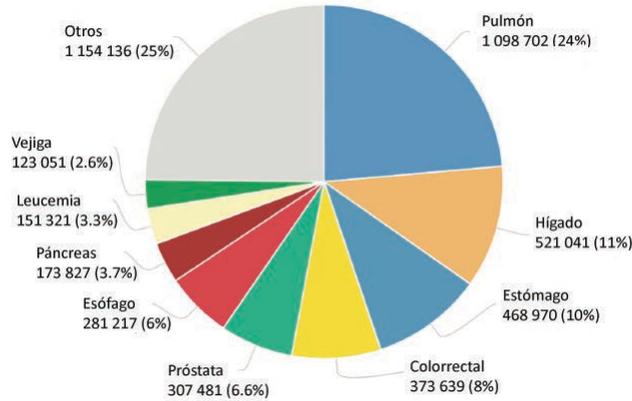


Figura 1. Estimación de la mortalidad en varones a nivel mundial durante el año 2012. Datos recogidos en el proyecto GLOBOCAN 2012, llevado a cabo por la Agencia internacional de investigación sobre el cáncer. Imagen obtenida y adaptada de *Global Cancer Observatory*.

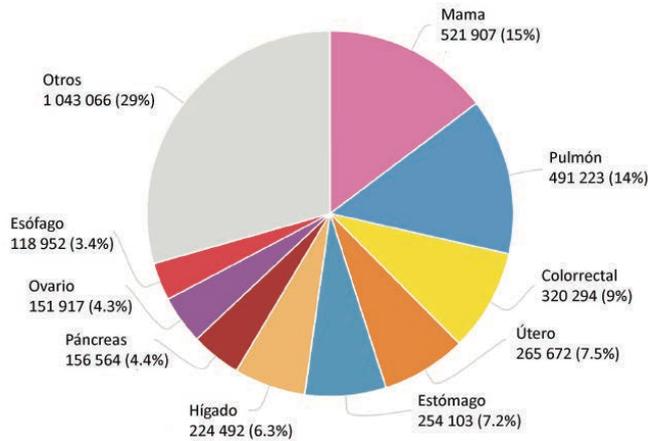


Figura 2. Estimación de la mortalidad en mujeres a nivel mundial durante el año 2012. Datos recogidos en el proyecto GLOBOCAN 2012, llevado a cabo por la Agencia internacional de investigación sobre el cáncer. Imagen obtenida y adaptada de *Global Cancer Observatory*.

El conocimiento del mecanismo etiológico del cáncer ha permitido concluir que además de las alteraciones genéticas que se producen en las células a lo largo de la vida, gran parte de los tumores están asociados a factores externos denominados carcinógenos, que son asimilados y provocan alteraciones celulares que derivan en la formación de un tumor. Además, la incidencia del cáncer

también podría disminuir si se ponen en marcha medidas de control que han sido ampliamente establecidas y descritas, como son el control del hábito de fumar, detección precoz, actividad física y patrones de dieta sana. En muchos otros casos, la prevención no es suficiente ya que el riesgo de padecer un tumor también está asociado a diferencias hormonales y por tal está ligado al sexo, y por supuesto a diferencias genéticas inherentes a cada persona. Por ello, una vez que se diagnostica un cáncer es importante recibir el tratamiento adecuado para cada tipo de tumor en función de sus características moleculares. Tradicionalmente, se consideraba el cáncer como un proceso autónomo, donde el genotipo celular era el único causante de todos los aspectos del fenotipo celular, y por ello responsable de las características propias de cada tumor. Sin embargo, actualmente se abarca como una sinergia entre el genotipo celular, y el microambiente tumoral, en el que toman parte muchos aspectos y factores siendo un proceso complejo. El estudio de este proceso complejo en su totalidad es difícil, mientras que extraer etapas más sencillas del mismo y estudiarlas por separado, permite obtener conclusiones parciales, que en conjunto facilitan el estudio del proceso inicial objeto de estudio. Actualmente, la tendencia se centra en adquirir la capacidad de proporcionar un tratamiento adecuado a cada paciente, lo que se denomina medicina personalizada o de precisión, asumiendo que la biología que encierra cada tumor es única para cada caso. Esto permitirá desarrollar fármacos dirigidos a dianas específicas en las células tumorales, evitando dañar las células no tumorales, disminuyendo o evitando los efectos secundarios.

Los resultados arrojados por el último estudio de GLOBOCAN en el año 2012 reflejan que los tumores con mayor incidencia en la sociedad española están encabezados por el cáncer de colon, seguido del cáncer de próstata, pulmón, mama y vejiga. La edad es un factor que influye sobre la incidencia de forma directamente proporcional, es decir, a medida que aumenta la edad también lo hace la probabilidad de padecer cáncer. Por tanto, el mayor factor de riesgo de esta enfermedad es el envejecimiento. No obstante, la supervivencia de los enfermos de cáncer se ha incrementado durante los últimos años en los países europeos, probablemente debido a la mejora y avances en los tratamientos y al diagnóstico precoz.

2. Estrategias de clasificación de la progresión tumoral

La clasificación del estadio tumoral se puede establecer en base al sistema TNM, según el Instituto Nacional del Cáncer, que recoge el tamaño del tumor y la extensión del mismo (3, 4). El TNM hace referencia a tres aspectos: **A)** T, tamaño del tumor. También indica hasta dónde se ha diseminado en el tejido adyacente. Puede ser valorado como 1, 2, 3 y 4. **B)** N, nódulo. Hace referencia a la ausencia o presencia de células tumorales en los nódulos linfáticos. Está comprendido entre 0, no invasión de nódulos linfáticos, y 3, elevado número de nódulos linfáticos con presencia de células tumorales. **C)** M, metástasis. Describe la posible diseminación del tumor primario hacia otros tejidos del cuerpo. El valor 0 indica ausencia de diseminación, y el valor 1 presencia.

La definición del estadio tumoral mediante las características descritas por TNM se complementa con la clasificación en un sistema numérico (5) que se divide en: **A)** Estadio 0 o carcinoma *in situ*: existencia de células anormales en un tejido, que no se han diseminado al tejido cercano. No es un cáncer, pero podría convertirse en cáncer en un futuro. **B)** Estadio I, Estadio II y Estadio III: cuanto más alto es el estadio, mayor es el tamaño del tumor y más se ha extendido hacia los tejidos cercanos, pudiendo existir invasión del tejido adyacente y presencia de células tumorales en los nódulos linfáticos. **C)** Estadio IV: el tumor ha conseguido alcanzar el torrente sanguíneo, extravasarlo y colonizar otro órgano del cuerpo, formando un tumor secundario o metastático.

El tratamiento que recibe un paciente oncológico varía en función de la localización del tumor. En general, si se trata de un adenocarcinoma o de un carcinoma *in situ*, un tratamiento local como la cirugía o la radioterapia pueden ser suficientes. Si el tumor se ha diseminado, llegando al torrente sanguíneo y alcanzando otros tejidos del cuerpo diferentes al tejido originario, es necesaria la aplicación de tratamientos sistémicos como son la quimioterapia, la terapia hormonal y las terapias biológicas.

El grado y la diferenciación de las células anormales que forman el tumor son otros aspectos de gran relevancia clínica, y muy útiles para el diagnóstico y la administración del tratamiento más adecuado a cada caso concreto.

Generalmente, los tumores se clasifican en tres grados: **A)** Grado 1: las células tumorales son muy similares a las células normales, y su crecimiento es bajo. **B)** Grado 2: las células tumorales pierden similitud morfológica con las células normales, y su tasa de crecimiento es mayor que en condiciones normales. **C)** Grado 3: las células tumorales adquieren morfología anormal, alejada de las células normales, y presentan una elevada tasa de división celular. Además, otros factores clínico-patológicos del paciente pueden influir en el desarrollo de la enfermedad.

3. Alteraciones fisiológicas de las células tumorales

La progresión tumoral es un proceso complejo en el que están implicadas múltiples alteraciones genéticas que conducen a las células normales a malignizarse, a través de un proceso de transformación progresivo. El genotipo celular alterado tiene sus manifestaciones fisiológicas, que derivan en un crecimiento maligno, iniciando así el proceso tumoral, y su posterior progresión. Tradicionalmente, se han descrito seis alteraciones fisiológicas características de las células tumorales, comunes en la mayoría de los tumores, que son: 1) autosuficiencia de las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada o apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) capacidad de angiogénesis, y 6) capacidad invasiva y metastática (6) (Figura 3). Posteriormente, se han incorporado dos nuevas características fisiológicas de las células tumorales, que son reprogramación del metabolismo energético, y la evasión del sistema inmune (7).

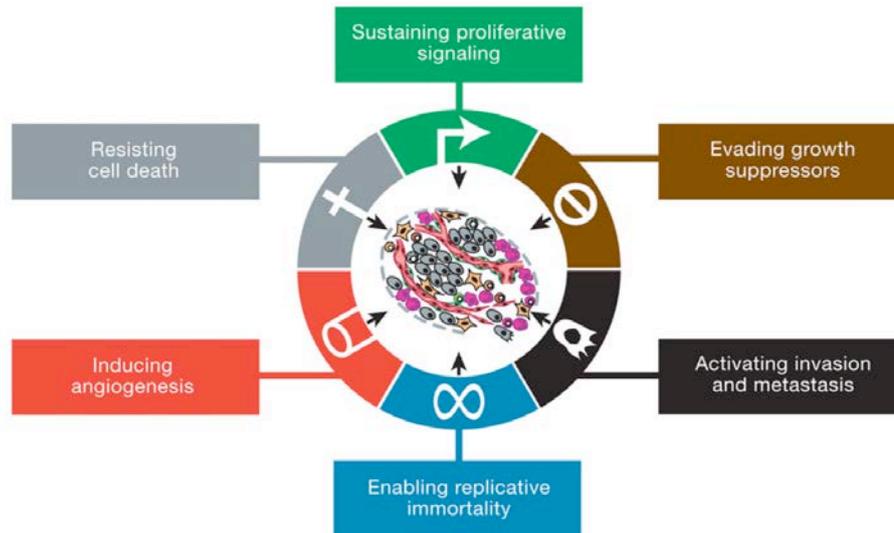


Figura 3. Manifestaciones fisiológicas adquiridas por las células tumorales. Estas competencias malignas son producto de las alteraciones genéticas que ocurren desde el inicio del tumor y durante la progresión tumoral. Imagen obtenida de *Hanahan et al, 2011*.

◆ Autosuficiencia de las señales de crecimiento: las células normales o no transformadas necesitan señales de crecimiento para poder dividirse y proliferar, que son captadas del medio extracelular a través de receptores transmembrana de la célula, y que les permiten modificar su estado de quiescencia hacia uno de proliferación. Por su parte, las células tumorales son capaces de generar sus propios estímulos de crecimiento (señales autocrinas), reduciendo la dependencia de los estímulos del microambiente celular. Uno de los mecanismos celulares que capacitan a las células con autosuficiencia de las señales de crecimiento se encuentra en la desregulación de los receptores transmembrana. Durante el proceso tumoral, algunos receptores de factores de crecimiento, generalmente aquellos con actividad tirosina quinasa en su dominio citoplasmático, están sobreexpresados, lo que conlleva una respuesta excesiva a los factores de crecimiento, induciendo a las células a un estado de división activa, que en condiciones normales no desencadenarían proliferación. Aún así, las células normales adyacentes a las células tumorales, y que forman parte del tumor, juegan un papel importante en la proliferación mediante señales paracrinas y endocrinas (8).

◆ Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento: la homeostasis de los tejidos se mantiene mediante un balance entre las señales de crecimiento y las señales antiproliferativas. Las señales antiproliferativas bloquean la proliferación mediante dos mecanismos: **A)** Arresto de las células en un estadio de quiescencia (G_0) reversible, y alteración del ciclo celular a través del control de la fase G1. Por ejemplo, la proteína de retinoblastoma bloquea la proliferación celular secuestrando aquellos factores de transcripción que controlan la expresión de los genes principales para la progresión desde la fase G1 a la fase S (9). **B)** Diferenciación a un tipo celular concreto, a través de un proceso irreversible. Por ejemplo, en adenocarcinoma de colon, la inactivación de la vía APC/ β -catenina bloquea la diferenciación de las células epiteliales de las criptas del intestino, manteniendo así su capacidad proliferativa (10).

◆ Evasión de la muerte celular programada o apoptosis: la progresión tumoral depende del balance de la capacidad proliferativa de las células, y del porcentaje de muerte celular. El balance óptimo para un avance tumoral rápido es una elevada capacidad proliferativa, y una mínima muerte celular programada. Para ello, las células tumorales han adquirido la capacidad de evasión de apoptosis a través de diferentes vías (11).

◆ Potencial replicativo ilimitado: una población celular posee un número limitado de divisiones tras el cual no es capaz de seguir multiplicándose, y alcanza un estado de senescencia (12). Esta incapacidad para seguir dividiéndose se explicó con el descubrimiento de los telómeros, unas secuencias cortas presentes en los extremos de los cromosomas. Los telómeros se acortan en cada ciclo replicativo debido a la incapacidad de las ácido desoxirribonucleico (ADN) polimerasas para replicar los extremos 3' de los cromosomas. En las células tumorales no se ha observado un acortamiento de los telómeros, debido a un incremento de la expresión de la enzima telomerasa que añade repeticiones de hexanucleótidos en los extremos de los cromosomas (13).

◆ Capacidad de angiogénesis: el acceso al oxígeno y a los nutrientes presentes en el torrente sanguíneo es fundamental para la funcionalidad y la supervivencia celular. Las señales que inducen o bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos se transmiten como factores solubles que son captados por los

receptores de membrana de las células endoteliales que recubren el interior de los vasos sanguíneos (14). Durante el desarrollo tumoral se activa el proceso angiogénico al cambiarse el balance homeostático entre los inductores angiogénicos y los inhibidores. En muchos casos, el factor de crecimiento endotelial vascular incrementa sus niveles de expresión induciendo angiogénesis, en comparación con los inhibidores endógenos del proceso como β -interferon o trombospondina-1 que disminuyen (15).

◆ Capacidad invasiva y metastásica: algunas de las células presentes en el tumor primario son capaces de desprenderse del mismo, invadir el tejido adyacente y viajar por el torrente sanguíneo hasta sitios distantes donde son capaces de colonizar y formar tumores secundarios metastáticos. Dado que las metástasis son las responsables de alrededor del 90% de muertes por cáncer, este campo de investigación se ha incrementado y consolidado en los últimos años (16). El tipo más frecuente de todos los cánceres es el carcinoma, que se origina en células epiteliales. En las células tumorales transformadas, se encuentran alteradas las proteínas implicadas en las uniones célula-célula y célula-matriz. La E-cadherina es el prototipo mejor caracterizado y el principal componente de las uniones adherentes en células epiteliales. La unión de dos células epiteliales adyacentes a través de E-cadherina media la traducción de señales intercelulares, como puede ser la transmisión de señales inhibitoras de crecimiento o la activación de rutas intracelulares mediante la interacción de su dominio citoplasmático con la proteína β -catenina (17). Estudios previos, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* empleando ratones, han demostrado que la expresión forzada de E-cadherina disminuye la capacidad invasiva y metastática en un modelo de carcinogénesis, de la misma forma que al disminuir su expresión se incrementan dichas capacidades. Por lo tanto, E-cadherina funciona como un supresor tumoral, y su pérdida es un marcador de presencia de invasión y la metástasis en células epiteliales. Como se ha comentado, las uniones célula-matriz extracelular medidas por integrinas también juegan un papel fundamental en el proceso de invasión y metástasis. Durante la progresión tumoral, las células epiteliales cambian la expresión de ciertas integrinas presentes en el tejido epitelial normal por otras integrinas que se unen preferentemente a los componentes degradados del estroma generados por las proteasas extracelulares (18). Además, existen otras proteínas implicadas en la adquisición de capacidad invasiva y metastásica como son las proteasas que

degradan la matriz extracelular. Se ha observado que en muchos tipos de carcinomas, las proteasas no son sintetizadas por las propias células epiteliales tumorales, si no por las células estromales o inflamatorias que rodean al tumor (19). A lo largo del presente trabajo nos vamos a centrar en el estudio de las uniones adherentes, uniones dependientes de E-cadherina, particularmente en la regulación de la expresión de dicha proteína que forma parte de las uniones célula-célula, y cuya pérdida es un marcador de pronóstico clínico malo en carcinomas, así como marcador de presencia de invasión y metástasis de carcinomas.

4. Células epiteliales: carcinomas

El epitelio es un tejido formado por una o varias capas de células unidas entre sí que recubren las superficies externas o internas del organismo. El tejido epitelial normal presenta una estructura característica formada por las capas de células epiteliales unidas entre sí mediante contactos celulares, entre los que se incluyen: uniones estrechas, uniones adherentes, uniones tipo gap y desmosomas (20). A su vez, las células están en contacto con la membrana basal, a través de contactos célula-sustrato, que las separa de las células del tejido conectivo denominado estroma (Figura 4). La polaridad apico-basal es un rasgo característico de las células epiteliales, que presentan su superficie apical hacia el lumen, y su superficie basal hacia la membrana basal. Esta polarización conlleva una localización asimétrica del núcleo celular sobre la superficie basal, y una mayor superficie apical donde están presentes proteínas de superficie celular, mediante las que se establecen los diferentes tipos de uniones con células epiteliales adyacentes.

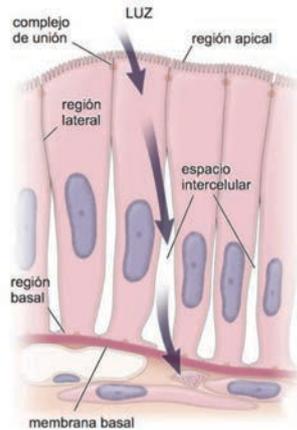


Figura 4. Diagrama de células epiteliales de intestino delgado con polaridad apico-basal. Las células epiteliales adyacentes están unidas entre sí mediante contactos celulares (complejo de unión), presentes en la región lateral de las células, que actúan como barrera entre el lumen (luz) y el espacio intercelular. Además, las células epiteliales mantienen una polaridad apico-basal hacia el lumen, y una región basal hacia la membrana basal. Imagen obtenida de *The biology of cancer. Weinberg, 2007.*

Los carcinomas son los más comunes de todos los cánceres, y tienen su origen en células epiteliales. Presentan una gran complejidad estructural observada mediante la caracterización histológica del tejido, donde se observan diferentes tipos celulares, incluyendo células normales o no neoplásicas, que constituyen el estroma y que representan alrededor del 90% de la masa tumoral, y las células tumorales o transformadas. Algunos ejemplos de tipos celulares que forman el estroma son fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, adipocitos, macrófagos y linfocitos, entre otras. La comunicación entre los diferentes tipos celulares que forman el estroma y el epitelio es fundamental para mantener la arquitectura y estructura del tejido, y su función. Esta comunicación se denomina heterotípica. Las células estromales y epiteliales colaboran en la formación de la matriz extracelular (MEC), que se denomina específicamente membrana basal o lámina normal en los tejidos epiteliales (21).

4.1. Invasión y metástasis de carcinomas

Los carcinomas comienzan en la zona epitelial más próxima a la membrana basal, y se consideran benignos mientras las células que lo forman se mantengan en la capa epitelial. Tarde o temprano, algunos carcinomas adquieren la capacidad de

romper la membrana basal, y son capaces de invadir el estroma y metastatizar, cuando alcanzan este punto se denominan malignos. Este tumor original o primero se considera un tumor primario. La invasión local del estroma requiere la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular para generar espacios a través de los cuales pueden avanzar las células tumorales. En algunos tipos de cánceres, las propias células tumorales secretan sus propias proteasas, mientras que en otros tipos de tumores, son las células estromales las que secretan dichas proteasas (22). Para que un tumor primario crezca, necesita que se desarrolle una red de vasos linfáticos y sanguíneos que cubran las necesidades metabólicas de las células, obteniendo de estos últimos nutrientes y oxígeno. Esta nueva formación de vasos se denomina linfangiogénesis y angiogénesis, respectivamente, y permite la diseminación de las células tumorales y su entrada en los vasos linfáticos y sanguíneos mediante un proceso denominado intravasación, accediendo así al torrente circulatorio (23). Algunas veces, estas células tumorales presentes en el sistema circulatorio pueden penetrar en un tejido distal al tumor primario mediante un proceso denominado extravasación, y donde pueden dar lugar a micrometástasis. Las células que forman parte de la micrometástasis pueden crecer, dividirse y formar una metástasis macroscópica o macrometástasis para alcanzar el estadio de colonización, y dar lugar a lo que se denomina tumor secundario (24). La probabilidad de que una célula complete todos los pasos descritos, desde la invasión hasta la formación de metástasis, es muy baja. Los primeros pasos son ejecutados con elevada eficiencia por las células metastáticas, no así los pasos finales que implican colonización (25). Aún así, el hecho de que células neoplásicas circulen por el torrente circulatorio corporal se considera un factor de pronóstico malo para el paciente (26) (Figura 5). Como se ha mencionado anteriormente, las metástasis son responsables de alrededor del 90% de las muertes por cáncer, de ahí la importancia de un diagnóstico precoz y el estudio de nuevas terapias que bloqueen los estadios tempranos del proceso de invasión y metástasis.

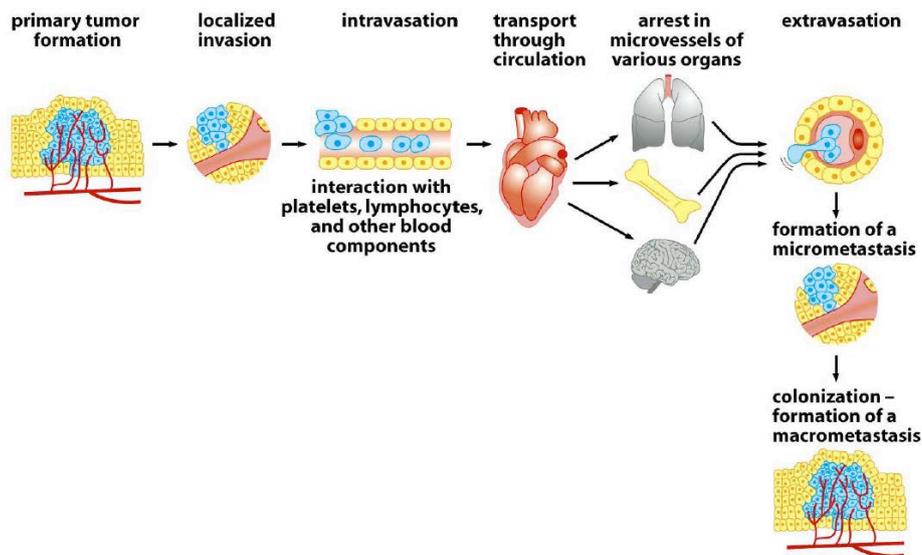


Figura 5. Progresión tumoral en carcinomas. Los carcinomas comienzan en el tejido epitelial, en la zona más próxima a la membrana basal. Las células tumorales son capaces de invadir el estroma, y acceder a los vasos linfáticos y sanguíneos mediante un proceso denominado intravasación. Una vez han alcanzado el torrente sanguíneo, pueden penetrar en un tejido epitelial de un órgano distal al tumor primario, a través de vasos mediante un proceso denominado extravasación. Una vez en el órgano distal, las células tumorales pueden crecer, colonizar y formar metástasis que darán lugar al tumor secundario. Imagen obtenida de *The biology of cancer*. Weinberg, 2007.

5. Transición epitelio-mesénquima

5.1. Transición epitelio-mesénquima fisiológica y patológica

La progresión tumoral de carcinomas se caracteriza por la capacidad de invasión de tejido epitelial adyacente al tumor por parte de las células tumorales epiteliales que sufren múltiples alteraciones al someterse a un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) que tiene lugar en estadios tempranos de la invasión y la metástasis. Durante la TEM en cáncer, las células epiteliales pierden su fenotipo polarizado y epitelial (27, 28). Este proceso está acompañado de una reorganización del citoesqueleto celular y una pérdida de adhesión célula-célula y célula-sustrato que dan lugar a una morfología fibroblastoide o mesenquimal, y que proporciona a las células una capacidad invasiva al tejido epitelial adyacente, y capacidad de metastatizar, pudiendo migrar por el torrente sanguíneo a órganos distales diferentes al del tumor primario (29-31).

Originariamente, la TEM fue descrita por primera vez por Elisabeth Hey durante el desarrollo embrionario, como un paso clave en la formación de órganos y tejidos (32). Posteriormente, se observó el proceso de TEM en los procesos de regeneración tisular y fibrosis, y por último, tal y como se ha mencionado, se describió la TEM durante el cáncer asociada a la progresión tumoral y la metástasis. La TEM asociada a cáncer se considera un proceso patológico, a diferencia de las otras dos descritas como procesos fisiológicos normales para el correcto funcionamiento del organismo. De esta forma, el proceso de TEM se ha descrito en tres marcos biológicos muy diferentes, donde la generación de células mesenquimales es común para todos ellos, mientras que el proceso biológico a través del cual se adquiere el fenotipo mesenquimal es muy diferente. La primera propuesta para la clasificación de la TEM tuvo lugar en el “*Third international symposium on the Epithelial–Mesenchymal Transition*” celebrado en Polonia en el año 2007 (28). Actualmente, se aceptan los siguientes tres tipos de TEM propuestos en función del proceso biológico (Figura 6):

- a) TEM tipo I. Asociada con la implantación, la formación embrionaria y el desarrollo de órganos. Todos estos procesos precisan generar diferentes tipos celulares, que comparten fenotipos mesenquimales comunes.
- b) TEM tipo II. Asociada con la cicatrización de heridas, regeneración tisular, inflamación y fibrosis. El proceso de regeneración genera fibroblastos y otros tipos celulares relacionados para regenerar el tejido dañado después de un trauma o una inflamación.
- c) TEM tipo III. Asociada a la conversión de células epiteliales en células mesenquimales, que pueden migrar e invadir tejidos, favoreciendo la progresión tumoral.

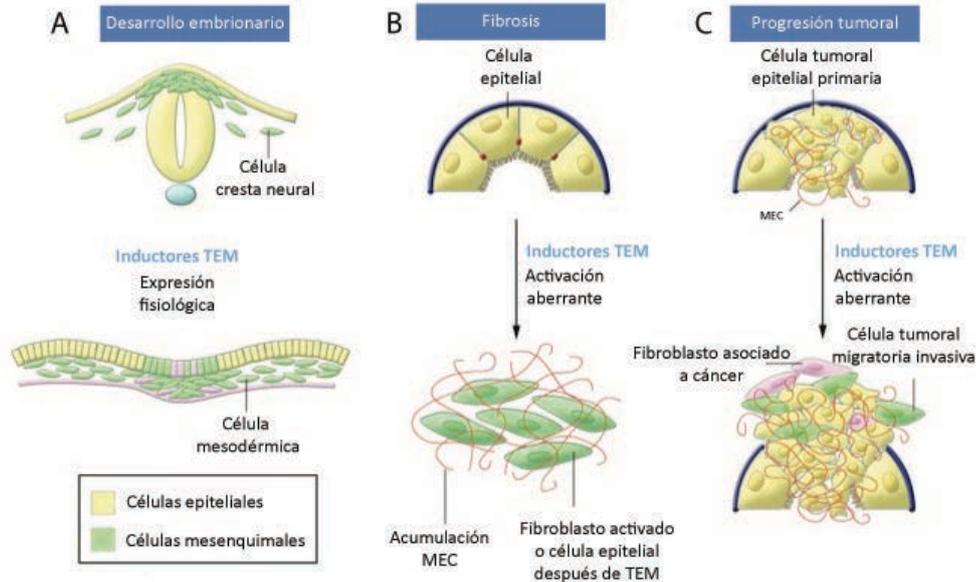


Figura 6. Tipos de transición epitelio-mesénquima: fisiológica y patológica. **A**, Tipo I, asociada con la implantación y la gastrulación embrionaria, que da lugar al mesodermo y endodermo, y a las células móviles de la cresta neuronal. **B**, Tipo II, ligada a procesos de inflamación y fibrosis. Finalmente, puede dañar órganos si el proceso inflamatorio primario se prolonga en el tiempo. **C**, Tipo III, las células epiteliales pueden sufrir una transformación maligna hacia células tumorales, capaces de migrar, invadir tejidos adyacentes, y metastatizar órganos distales. Imagen adaptada de *Kalluri et al, 2009*.

5.2. Transición epitelio-mesénquima y cáncer

La adquisición de capacidades propias de células mesenquimales por parte de las células epiteliales implica una progresión maligna de las mismas, a través de un proceso biológico en el que se suprimen los marcadores celulares epiteliales, las células pierden su polaridad, y las uniones célula-célula también se ven alteradas. Esto provoca cambios en la morfología celular y en el citoesqueleto, lo que hace que las células pierdan el fenotipo epitelial y adquieran una morfología similar a fibroblastos, además de inducir capacidades de migración e invasión celular (33). Estos cambios están acompañados por la pérdida de marcadores epiteliales en las células, tales como E-cadherina, Zonula Occludens-1 (ZO-1), y citoqueratinas, así como por un incremento de los marcadores mesenquimales que incluyen N-cadherina, Vimentina, actina de músculo liso, y proteína-1 específica de fibroblastos, además de la producción de componentes de matriz extracelular como colágeno tipo I y fibronectina (34). Por otro lado, también cabe destacar que

la la desestabilización del complejo E-cadherina/ β -catenina deriva en la acumulación citoplasmática de la proteína β -catenina, que es capaz de translocarse al núcleo donde actúa como activador de Tcf-1/LEF, y por tanto comienzan a expresarse genes que codifican proteínas con un importante papel como oncogénico, tales como Ciclina D1 y c-Myc, que como resultado final pueden inducir un proceso de TEM (35).

El conjunto total de señales que contribuyen al proceso de TEM asociado al cáncer no está perfectamente definido. Una de las hipótesis plantea que las alteraciones genéticas y epigenéticas, que sufren las células tumorales durante el proceso de formación de tumor primario, se inducen mediante las comunicaciones heterotípicas originadas por las células del estroma asociado al tumor. Además, las células estromales también pueden secretar factores de crecimiento, como el factor de crecimiento hepático (HGF) (36, 37), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (38), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (39), y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (40), que pueden inducir la expresión de los factores de transcripción Snail, Slug, ZEB-1, ZEB-2 y Twist (41-44). Estos factores de transcripción actúan como represores transcripcionales de la proteína E-cadherina, disminuyendo la expresión de la misma en la membrana celular, lo que implica la pérdida de uniones célula-célula y de la polaridad apical. También se ha observado que la pérdida de E-cadherina durante la progresión tumoral va acompañada de la expresión de *novo* de las cadherinas mesenquimales N-cadherina, P-cadherina, cadherina-6, cadherina-11. Así por ejemplo, la sobreexpresión de N-cadherina en diferentes tipos de cáncer como cáncer de próstata o mama promueve la motilidad y la migración celular, y sustituye a la E-cadherina en los contactos célula-célula provocando un efecto opuesto en el mantenimiento de los contactos celulares, denominado "*cadherin switch*" (45). En cáncer colorrectal se ha observado un incremento significativo de la expresión de N-cadherina con respecto al tejido sano adyacente, y se ha relacionado con una baja diferenciación tumoral que se traduce en una baja supervivencia y baja tasa de supervivencia libre de enfermedad (46). De la misma forma, en cáncer epitelial de vejiga se ha propuesto el intercambio de E-cadherina por N-cadherina como un factor de malignidad que capacita a las células tumorales epiteliales de vejiga de un fenotipo invasivo (47). Además, se ha observado una asociación entre N-cadherina y diferentes miembros de la familia del factor de crecimiento de

fibroblastos (FGF) en múltiples tumores, lo que facilitaría el mantenimiento de la fosforilación de E-cadherina en los residuos de tirosina y su subsecuente endocitosis y desaparición de los contactos celulares. P-cadherina y cadherina-11 se expresan en tumores de mama invasivos, y cadherina-6 se encuentra sobreexpresado en carcinoma renal, lo que se correlaciona con mal pronóstico (48).

Las vías de señalización intracelular donde están implicadas dichas proteínas, al igual que la expresión de proteínas de membrana características, son necesarias para completar el programa de TEM (Figura 7).

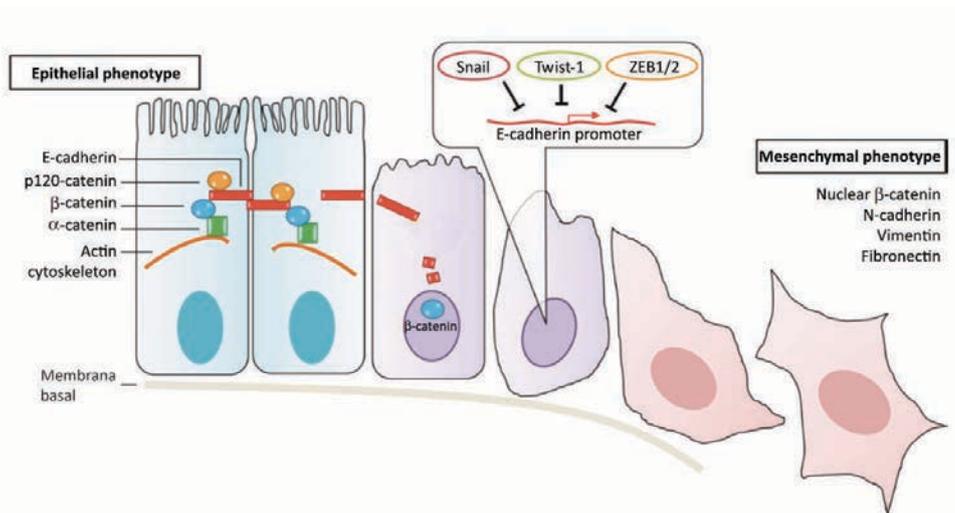


Figura 7. Transición epitelio-mesénquima y progresión tumoral. Las células epiteliales (izquierda) están unidas entre sí mediante uniones adherentes a través de la proteína E-cadherina, que está unida al citoesqueleto de actina mediante la interacción con diferentes cateninas. El proceso de TEM se caracteriza por la disminución de los niveles de expresión de E-cadherina; a nivel transcripcional, se han descrito diferentes represores transcripcionales como Snail, Twist y Zeb-1/Zeb-2. Esta disminución del marcador epitelial E-cadherina se completa con la inducción de marcadores mesenquimales como vimentina, N-cadherina o fibronectina, y la translocación de β-catenina al núcleo, que en conjunto inducen un fenotipo mesenquimal (derecha). Imagen modificada de Aparico *et al*, 2013.

5.3. Plasticidad epitelial: implicaciones clínicas

Generalmente, la TEM es un proceso transitorio y reversible, es decir, las células epiteliales que han adquirido capacidades y fenotipos mesenquimales pueden revertir el proceso y volver a su estado inicial epitelial diferenciado si se someten a proceso inverso denominado transición mesénquima-epitelio (TME). Este proceso transitorio y reversible recibe el nombre de plasticidad epitelial (49). Además, es un proceso dinámico en el que las células se mueven por diferentes estados intermedios a lo largo de todo el espectro epitelio-mesénquima, pudiendo existir TEM parcial.

A nivel clínico, el proceso de TEM tiene lugar en el carcinoma primario, en estadios tempranos de la invasión y la metástasis, y cuando las células han alcanzado órganos distales y forman micrometástasis, tiene lugar el proceso inverso denominado TME. El papel de la TEM en la progresión tumoral está en debate porque la identificación y detección de células tumorales circulantes (CTCs) que sufren un proceso de TEM en el torrente sanguíneo de pacientes oncológicos es muy difícil debido a que están presentes en muy bajo número. Las CTCs son células tumorales que se desprenden del tumor primario y viajan por el torrente sanguíneo hasta alcanzar otras partes del cuerpo originando metástasis tumorales (50) (Figura 8). Las metástasis tumorales son las causante de la mayoría de muertes por cáncer, aunque el proceso biológico de la metástasis es muy poco eficiente, dado que menos del 0.01% de las células presentes en el tumor primario son capaces de acceder al torrente sanguíneo y dar lugar a metástasis (51). En algunas ocasiones, alrededor de 4-5% de las metástasis clínicas ocurren incluso antes de detectar el tumor primario, lo que sugiere que el proceso de TEM ha tenido lugar antes de que el tumor crezca en el órgano primario (52). Existen diferentes abordajes planteados para frenar las metástasis a través de la acción sobre la TEM: 1) Inhibir la inducción de la TEM, 2) Promover la TME, o 3) Eliminar o inhibir funcionalmente a las células tumorales mesenquimales (53). Uno de los primeros abordajes planteados para bloquear la metástasis fue inhibir el proceso de TEM para prevenir la diseminación de células tumorales desde el tumor primario. Sin embargo, aunque la aplicación de esta estrategia es efectiva en algunos tipos de cáncer específicos, como el carcinoma de ovario (54), se ha observado que este abordaje podría favorecer la formación

de tumores secundarios al inducir la TEM, que favorecería la colonización del tejido y el crecimiento del tumor secundario o micrometástasis (55). Por otro lado, aparte de la importancia del proceso de TEM en la invasión y la metástasis, se ha observado una relación directa entre TEM y resistencia a quimioterapia. Actualmente, existen múltiples ensayos clínicos que testan compuestos cuya diana terapéutica son genes implicados en el proceso de plasticidad epitelial. Por ejemplo, la detección de altos niveles de Zeb-1 y Twist, represores transcripcionales de E-cadherina, y la reducción de E-cadherina y otros marcadores epiteliales se relaciona con la resistencia al tratamiento con diferentes drogas, como son 5-fluorouracilo, gemcitabina o cisplatino (56). Además, la disminución en la expresión de E-cadherina se utiliza en el ámbito clínico como factor de mal pronóstico, ya que se relaciona con una baja diferenciación epitelial de las células tumorales y se asocia a procesos de invasión y metástasis que implican baja supervivencia en diferentes tipos de cáncer como el cáncer de mama o cáncer colorrectal (57, 58).

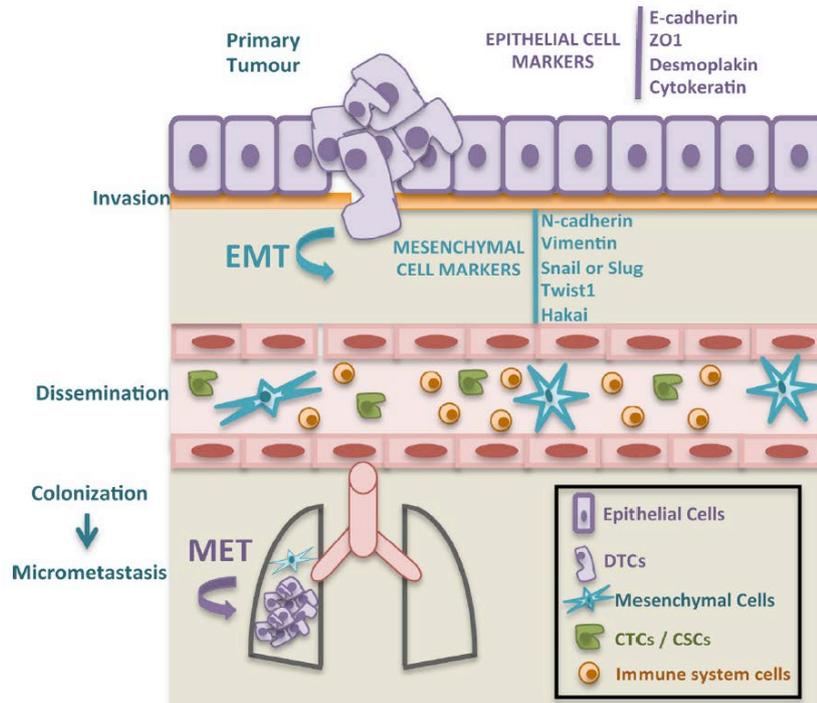


Figura 8. Plasticidad epitelial. Las células epiteliales normales pueden sufrir alteraciones fisiológicas que inducen un cambio de fenotipo epitelial a mesenquimal, lo que conlleva al aumento de expresión de marcadores mesenquimales en detrimento de los marcadores epiteliales, durante un proceso de TEM que induce características motiles e invasivas en el tumor primario. Entonces, las células tumorales son capaces de migrar e invadir el tejido adyacente, alcanzar al torrente sanguíneo y finalmente extravasarse y colonizar órganos distales, momento en el que sufren el proceso reverso de transición mesénquima-epitelio (TME) y forman así un tumor secundario o micrometástasis. El proceso de TEM está asociado a las células madre tumorales (CSCs) que circulan por el torrente sanguíneo, y su detección en sangre periférica de pacientes oncológicos puede ayudar en la evaluación de la progresión tumoral y la metástasis. Imagen obtenida de *Aparico et al, 2015*.

6. Uniones adherentes: E-cadherina

Tal y como se ha descrito anteriormente, la E-cadherina es el miembro prototipo mejor caracterizado de las uniones adherentes en células epiteliales de mamíferos. E-cadherina es un supresor de tumores y su pérdida de expresión es un marcador de TEM, y está asociada a estadios tempranos de invasión y metástasis, a un menor grado de diferenciación, y a un pronóstico clínico malo. Por ello, el estudio de la regulación de la E-cadherina en las uniones adherentes es importante, dado que su pérdida marca los estadios tempranos de cáncer, antes de que las metástasis se produzcan.

Las células epiteliales se mantienen unidas entre sí para estructurar el epitelio que formará parte de un tejido polarizado e íntegro. Los animales vertebrados poseen cuatro tipos de uniones intercelulares (59) que en conjunto reciben el nombre de complejo de unión celular, (Figura 9) y son: 1) Uniones estrechas, mantienen la barrera epitelial evitando el tránsito de moléculas pequeñas de una capa a otra, 2) Uniones adherentes, asociadas con el citoesqueleto de actina, 3) Uniones gap, canales intercelulares que permiten el transporte directo célula-célula de iones y pequeñas moléculas, y 4) Desmosomas, un tipo especializado de uniones célula-célula mediado por cadherinas, que se une a los filamentos intermedios.

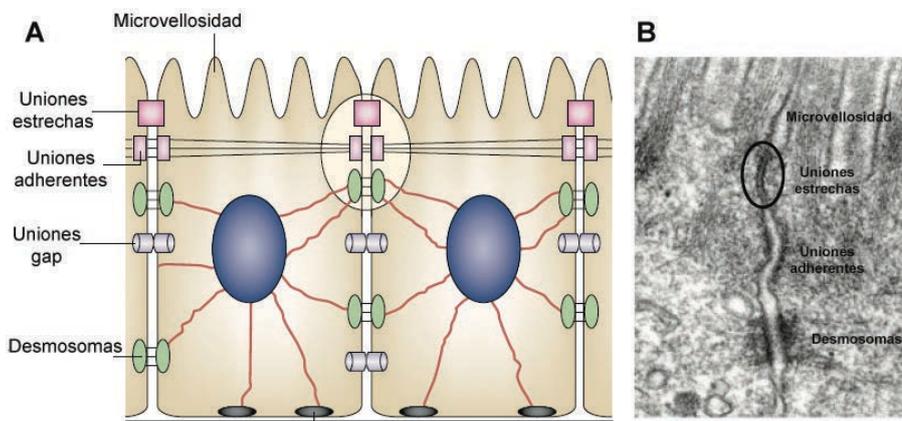


Figura 9. Uniones celulares en tejido epitelial de vertebrados. **A**, Detalle de células epiteliales intestinales de vertebrado donde se observa el complejo de unión formado por uniones estrechas, uniones adherentes, uniones gap, y desmosomas, que en conjunto mantienen unidas las células epiteliales del epitelio. **B**, Observación de las uniones celulares en una muestra de epitelio intestinal de ratón analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Imagen adaptada de *Tsukita et al, 2001*.

Las uniones adherentes son estructuras adhesivas dependientes de cadherina, que están ligadas a los filamentos de actina del citoesqueleto celular. Las cadherinas fueron identificadas por primera vez en los laboratorios de Takeichi, Kemler y Jacob, como una superfamilia de glicoproteínas de membrana que median la adhesión célula-célula dependiente de calcio. Dentro de esta superfamilia, se han descrito los cinco subgrupos de cadherinas siguientes:

cadherinas clásicas, cadherinas atípicas, cadherinas demosomales, cadherinas flamingo, y protocadherinas. Las primeras que se descubrieron y en las cuales se han realizado los principales estudios son las cadherinas clásicas (60). Las cadherinas clásicas se clasificaron originariamente en función del tejido en el que se expresaban mayoritariamente: epitelial (E), neural (N), vascular-endotelial (VE), placentar (P), retinal (R), y de riñón (K) (34), aunque estos patrones de expresión no son exclusivos, y las cadherinas se pueden localizar en diferentes tipos de tejidos.

Las uniones adherentes están formadas por glicoproteínas que presentan una región transmembrana y median la unión a la superficie extracelular de células epiteliales adyacente a través del dominio extracelular, además de ser responsables de la respuesta inter- e intracelular, ya que las proteínas citosólicas asociadas a su dominio citosólico están unidas estructuralmente al citoesqueleto, permitiendo así a las células individuales que conforman el epitelio funcionar como un tejido coordinado que mantiene la organización del epitelio y la comunicación con el microambiente. La alteración de las uniones adherentes es un rasgo asociado a los procesos tumorales, por lo que en este trabajo se profundizará en la descripción de las uniones adherentes, y su implicación en los procesos tumorales (61).

6.1. Estructura de la E-cadherina

La E-cadherina es el miembro prototipo mejor caracterizado de la familia de cadherinas. Se expresa en todos los epitelios presentes en mamíferos, y funcionalmente se ha relacionado con el mantenimiento de la polaridad apico-basal, la preservación de la supervivencia, y el control de la proliferación celular (62). Esta proteína está codificada por el gen *cadherin 1* (*CDH1*) presente en el brazo largo del cromosoma 16.

El precursor de la proteína E-cadherina es un polipéptido de secuencia corta que es importado al retículo endoplasmático, donde es procesado primero en un pro-péptido de 130 aminoácidos (aa), y un polipéptido maduro de 728 aa (63). La forma madura de la E-cadherina presenta un dominio transmembrana de un solo paso, un dominio citoplasmático de aproximadamente 150 aa, y un dominio extracelular dimerico de 550 aa (64) (Figura 10).

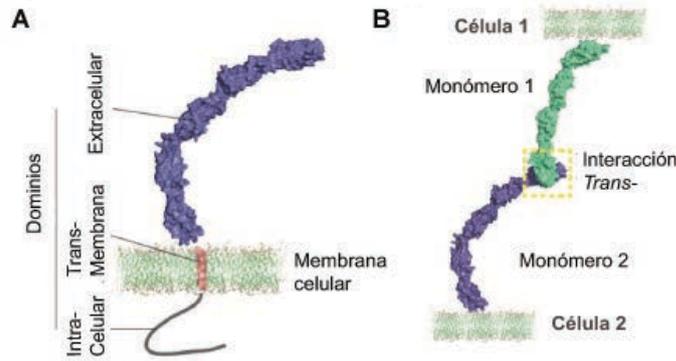


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de E-cadherina. **A**, La proteína E-cadherina presenta un dominio intracelular, una región transmembrana y un dominio extracelular. **B**, Las células epiteliales adyacentes se mantienen unidas, en parte, mediante uniones adherentes en las que se establecen interacciones entre los dominios extracelulares de la E-cadherina de cada una de las células (panel derecho). Imagen modificada de *Biswas et al, 2017*.

◆ Dominio extracelular

El dominio extracelular dimérico de 550 aa está formado por cinco dominios repetidos en tándem que unen calcio, y permiten el establecimiento de interacciones homofílicas a través de los dominios extracelulares de E-cadherina presentes en la superficie de las células adyacentes, formando así los contactos célula-célula. De los cinco dominios, cuatro de ellos se denominan repeticiones de cadherina extracelular, y el quinto dominio se designa como dominio extracelular proximal a membrana (65). Cada una de las cinco repeticiones extracelulares están formadas por aproximadamente 110 aa, cuya estructura es similar a una inmunoglobulina. Esta estructura del dominio extracelular se altera por la unión de iones Ca^{2+} a cuatro regiones situadas entre las cinco repeticiones de E-cadherina (66) (Figura 11).

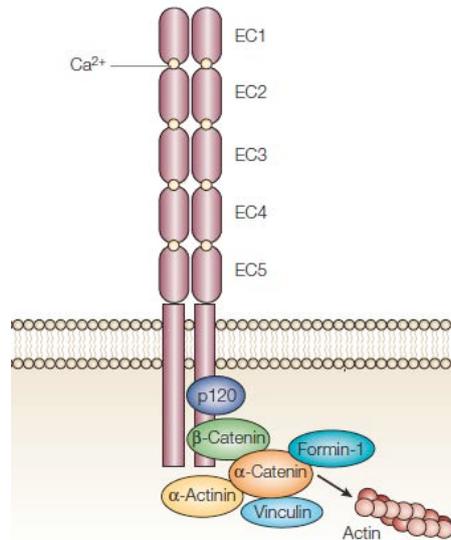


Figura 11. Complejo E-cadherina/cateninas en las uniones adherentes. El dominio extracelular de la E-cadherina es un homodímero, donde cada uno de los monómeros está formado por cinco dominios repetitivos (EC1, EC2, EC3, EC4 y EC5) que se mantienen unidos entre sí mediante iones de calcio (Ca^{2+}). El dominio intracelular de la E-cadherina es capaz de interactuar con la proteína p120 en la región de juxtamembrana, y con β -catenina en la región distal que activa la unión de α -catenina. Esta proteína es capaz de unirse a actina, estableciendo así una relación entre las uniones adherentes y el citoesqueleto celular, y a otras proteínas de unión a actina como son α -actinina, vinculina y formina-1. Imagen adaptada de *Gumbiner et al, 2005*.

◆ Dominio citoplasmático

El dominio citoplasmático se divide en los dominios: 1) Dominio de juxtamembrana, y 2) Dominio de unión a β -catenina (63). A través de este último dominio establece conexiones con diferentes cateninas, como β -catenina o γ -catenina (placoglobina), que van a jugar un papel fundamental en la señalización celular. La proteína β -catenina o γ -catenina (placoglobina), ambas son homólogas a la proteína armadillo de *Drosophila melanogaster*, presentan varios dominios de repetición de 42 aa. γ -catenina es un homólogo de β -catenina, y pueden intercambiarse bajo ciertas circunstancias, aunque γ -catenina está más ligada con su asociación a desmosomas (60).

La unión de β -catenina a través de 12 repeticiones de 42 aa al dominio citoplasmático de E-cadherina implica un cambio estructural en la conformación

de la proteína, crítico para el transporte de la E-cadherina recién sintetizada en el citoplasma hacia la membrana celular, responsable de formar los contactos célula-célula (67). La estructura E-cadherina/ β -catenina se asocia con la proteína α -catenina a través de la región amino-terminal de β -catenina. α -catenina es un homodímero cuando se encuentra en solución, pero se disocia para unirse al complejo E-cadherina/ β -catenina a la membrana celular como monómero. Esta proteína estabiliza al complejo E-cadherina/ β -catenina mediante su unión directa a la proteína F-actina, que forma parte de los filamentos de actina del citoesqueleto, un proceso fundamental para la estabilización de las uniones intercelulares, para la estabilidad mecánica de la célula, y para el mantenimiento de la polaridad epitelial a través del citoesqueleto de actina. También puede mediar la unión al citoesqueleto de actina de forma indirecta a través de proteínas como vinculina, α -actinina y ZO-1. La asociación de las uniones adherentes con el citoesqueleto tiene que ser dinámica, para poder adaptarse a los cambios intercelulares que ocurren durante los múltiples procesos biológicos y fisiológicos del organismo como la morfogénesis, y la homeostasis tisular, entre otros.

6.2. Uniones adherentes y microtúbulos: Vinflunina

6.2.1. Relación entre uniones adherentes y microtúbulos

Los microtúbulos son el componente principal del citoesqueleto celular, están formados por filamentos de tubulina (Figura 12A), y proporcionan soporte estructural en el transporte de vesículas u orgánulos además de jugar un papel importante en la morfogénesis celular y la mitosis. Los microtúbulos tienen un comportamiento dinámico en respuesta a la señalización celular, y son fundamentales en el proceso de mitosis, donde son responsables de la formación del huso mitótico implicado en la segregación de los cromosomas durante la mitosis celular. Debido a la importancia de los microtúbulos en la mitosis, la proliferación celular, la angiogénesis, la migración celular y el transporte intracelular se han propuesto como diana terapéutica para el diseño de compuestos antitumorales (67).

Generalmente, en un tejido epitelial, los microtúbulos de las células epiteliales se sitúan de forma paralela a la superficie lateral de las células con su

extremo positivo hacia la membrana basal. Pero, en ocasiones, algún grupo de microtúbulos se extienden de forma radial para alcanzar las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina (68), y cuya unión sugiere una regulación directa sobre las uniones adherentes (Figura 12B). De esta forma, la despolimerización de los microtúbulos rompe dichas uniones célula-célula (69), de la misma forma que la inhibición de la dinámica de microtúbulos, mediante el uso de compuestos estabilizadores de microtúbulos, también rompe las uniones adherentes. Se ha propuesto que el mecanismo molecular que podría conectar los microtúbulos con las cadherinas podría ser a través de la interacción de β -catenina, proteína que se ancla al dominio citoplasmático de E-cadherina, y con la proteína motora dineína asociada a microtúbulos. También, la proteína p120, localizada en la región juxtamembrana de E-cadherina que facilita su acoplamiento en la membrana celular, puede interactuar directamente con los microtúbulos o con las proteínas kinesinas, que facilitan el transporte vesicular a través de los microtúbulos (68).

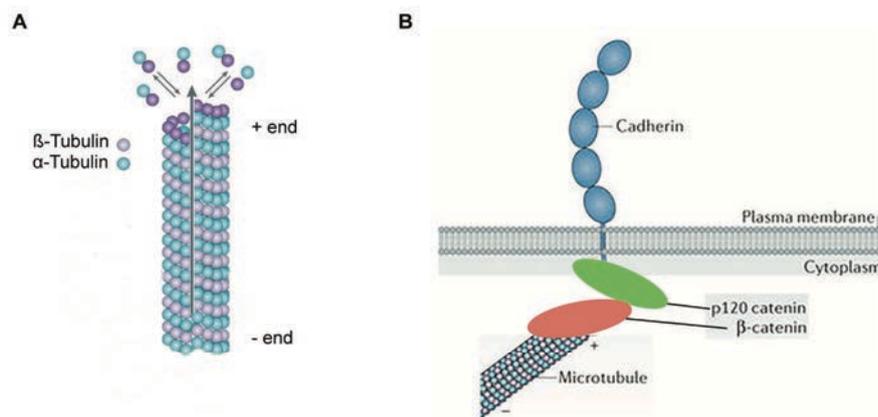


Figura 12. Microtúbulos y uniones adherentes. **A**, Estructura de un microtúbulo formado por filamentos de tubulina (β -tubulina y α -tubulina), que presenta un extremo positivo (+ *end*), y un extremo negativo (- *end*). **B**, Los microtúbulos establecen contactos con las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina a través de proteína intermedias, como son p120 y β -catenina, y ejercen una regulación directa sobre dichas uniones adherentes. Imagen adaptada y modificada de *Takeichi, 2014*.

Estudios previos han demostrado que la inhibición de la dinámica de microtúbulos no se traduce en la disminución de los niveles de E-cadherina que median las uniones célula-célula, lo que sugiere que los microtúbulos actúan previniendo la dispersión y pérdida de E-cadherina presente en las uniones

adherentes. Uno de los mecanismos propuestos para la regulación del mantenimiento de E-cadherina en las uniones célula-célula es a través del bloqueo de la interacción de miosina II, proteína motora dependiente de actina, con E-cadherina evitando así su dispersión (70).

6.2.2. Inhibidores de microtúbulos y transición epitelio-mesénquima

El citoesqueleto celular, que en su conjunto está formado por el citoesqueleto de actina, los filamentos intermedios y la red de microtúbulos, juega un papel fundamental en el proceso de TEM, ya que la reorganización del citoesqueleto de actina durante la progresión tumoral es un paso clave en la adquisición de capacidades migratorias e invasivas de las células tumorales que promueven la metástasis celular. También se ha observado una sustitución de la citoqueratina presente en los filamentos intermedios por Vimentina durante la TEM (71). La red de microtúbulos proporciona la fuerza motora necesaria para la migración celular durante la progresión tumoral. Los microtúbulos se distribuyen uniformemente en el citoplasma celular de células epiteliales no transformadas, mientras que las protusiones en la membrana celular, características de la pérdida de polaridad apico-basal en células epiteliales sometidas a procesos de TEM, son estructuras asociadas a microtúbulos (72).

A nivel biológico, el impacto de los microtúbulos sobre el crecimiento y la proliferación celular está ampliamente descrito, hasta el punto de que *in vivo* se emplean compuestos que inhiben la polimerización y la dinámica de los microtúbulos para el tratamiento de pacientes con cáncer (73). Los compuestos antimetabólicos que se unen a microtúbulos se clasifican en dos grupos: 1) Agentes estabilizadores de microtúbulos, y 2) Desestabilizadores de microtúbulos que actúan inhibiendo la polimerización. Algunos ejemplos son la vinflunina y el nocodazole. Además, el compuesto quinolin-6-yloxyacetamidas identificado inicialmente como un fungicida frente a un amplio rango de fitopatógenos (74), se ha descrito como un desestabilizador de microtúbulos con propiedades antiproliferativas en células tumorales de pulmón y ovario resistentes al tratamiento con otras drogas (75).

Dada la relevante asociación entre las uniones adherentes dependientes de E-cadherina y el citoesqueleto, se ha planteado la posibilidad de que las drogas que actúan inhibiendo la dinámica de microtúbulos, principal componente del citoesqueleto formado por filamentos de tubulina, puedan tener un impacto sobre las adhesiones celulares (76).

6.2.3. Vinflunina y su papel en cáncer de vejiga

Los alcaloides de la vinca son un conjunto de agentes anti-mitóticos y anti-microtúbulos que se llevan utilizando en clínica desde hace 40 años. Sus miembros de origen natural, la vinblastina y la vincristina, se aislaron de las hojas de la planta *Catharanthus roseus*, comúnmente conocida como vinca de Madagascar, y se utilizan con fines medicinales desde el siglo XVII. Sin embargo, no fue hasta finales de 1950 cuando se descubrieron sus propiedades como antimitóticos, y su potencial uso como antitumorales con efectos beneficiosos en los procesos tumorales hematológicos (77). A partir de entonces, su eficacia clínica en combinación con otros compuestos promovió el desarrollo de nuevos análogos químicos semi-sintéticos, entre los que se incluye a la vinflunina (VFL).

La VFL es un alcaloide de la vinca semi-sintético que inhibe la dinámica de microtúbulos *in vitro* e *in vivo* (78). Actúa despolimerizando los microtúbulos e inhibiendo la formación del huso mitótico, lo que bloquea la mitosis celular e induce la apoptosis de las células tumorales (73). En el 2009, esta droga fue aprobada por la Agencia Europea de Medicamentos como tratamiento para pacientes con carcinoma urotelial resistente al tratamiento quimioterápico de primera línea con cisplatino. Además, se han observado que la VFL presenta propiedades anti-angiogénicas, anti-vasculares y anti-metastáticas *in vitro* e *in vivo* (79). En base a la acción de la VFL como inhibidor de microtúbulos y su función anti-metastásica, es posible que pueda tener un efecto sobre las uniones celulares mediadas por uniones adherentes, en base a la comunicación descrita entre la red de microtúbulos y las uniones célula-célula, lo que tendría un gran impacto sobre la organización celular, la polaridad y la motilidad celular (80).

7. Regulación de E-cadherina

Mediante múltiples estudios clínicos y experimentales se ha demostrado que la pérdida de E-cadherina es frecuente en la mayoría de los cánceres humanos de origen epitelial (81, 82). Los niveles totales de E-cadherina expresados en las células dependen del balance entre la síntesis y la degradación, y son fundamentales para mantener la adhesión celular. La adquisición de fenotipo maligno altamente invasivo se define por la pérdida de E-cadherina, y generalmente está asociado con dispersión metastática de las células tumorales (83). En algunos tumores diferenciados de pacientes se detecta expresión de E-cadherina, pero en general existe una correlación inversa entre los niveles de E-cadherina, el estadio tumoral y la tasa de mortalidad del paciente (81, 84). Además, también se ha observado que el re-establecimiento de los complejos formados por la interacción de E-cadherina con β -catenina, γ -catenina y p120, da lugar a una reversión del fenotipo mesenquimal hacia fenotipo epitelial de células tumorales en cultivo (85).

7.1. Reguladores de E-cadherina

Dada la gran importancia de la pérdida de E-cadherina en el proceso de TEM y en la progresión tumoral, se han estudiado extensamente los reguladores de E-cadherina (Figura 13), entre los que se encuentran:

◆ Reguladores genéticos o epigenéticos

En varios tipos de tumores se han identificado alteraciones genéticas del gen *CDH1*, que codifica para E-cadherina, y que causan la pérdida de su funcionalidad. Por ejemplo, alteraciones somáticas de *CDH1* se han observado en cánceres de mama, ovario, y endometrio. Además, se han identificado mutaciones en la línea germinal en pacientes con predisposición de sufrir cáncer gástrico (86). Otro factor que provoca la pérdida de expresión de E-cadherina en células tumorales es la metilación aberrante o hipermetilación de la región del promotor de *CDH1* que corresponde con islas CG, como ocurre en cánceres de hígado, de próstata y colorrectal.

◆ Reguladores transcripcionales

Existen diferentes moduladores de E-cadherina a nivel transcripcional. En concreto, la acción de diferentes represores transcripcionales de E-cadherina durante la TEM, como Snail, Slug, Twist, ZEB-1, y ZEB-2, está muy bien establecida. La unión de estos factores de transcripción al promotor del gen de E-cadherina da lugar a la pérdida de expresión de esta proteína (43, 87).

◆ Reguladores post-traduccionales

Existen diferentes niveles de regulación a nivel post-traduccionales, entre los que se encuentran la fosforilación, la glicosilación o la proteólisis. La fosforilación de los residuos de tirosina de E-cadherina esta mediada por receptores tirosina quinasa, como son EGF y FGF, y el no receptor tirosina quinasa c-Src, que son responsables de la fosforilación de E-cadherina, lo que resulta en la pérdida de E-cadherina en los contactos célula-célula, y en la pérdida de polaridad celular (88). Del mismo modo, la proteína caseína quinasa 1 (CK1) es una serina/treonina quinasa que también actúa como un regulador negativo de E-cadherina mediando la fosforilación de residuos de su dominio citoplasmático (89). Otro ejemplo bien establecido es la degradación proteolítica de E-cadherina por diferentes metaloproteasas de matriz (MMP) como son MMP2, MMP9 y MMP14. El resultado de la degradación de la longitud completa de la E-cadherina es una forma soluble de 80 kDa, que se encuentra con frecuencia en células tumorales en cultivo y en muestras de biopsias tumorales (90).

En el año 2002, se describió el primer regulador post-traduccionales de la estabilidad de la proteína E-cadherina. Este regulador, denominado Hakai por su significado de *destrucción* en japonés, se describió como una E3 ubiquitina-ligasa que media la ubiquitinización y la degradación de E-cadherina de un modo dependiente de fosforilación, lo que provoca su desaparición de los contactos celulares, y por tanto la alteración de las uniones celulares (91). La regulación y acción de Hakai sobre los niveles de expresión de E-cadherina se desarrollarán en profundidad más adelante.

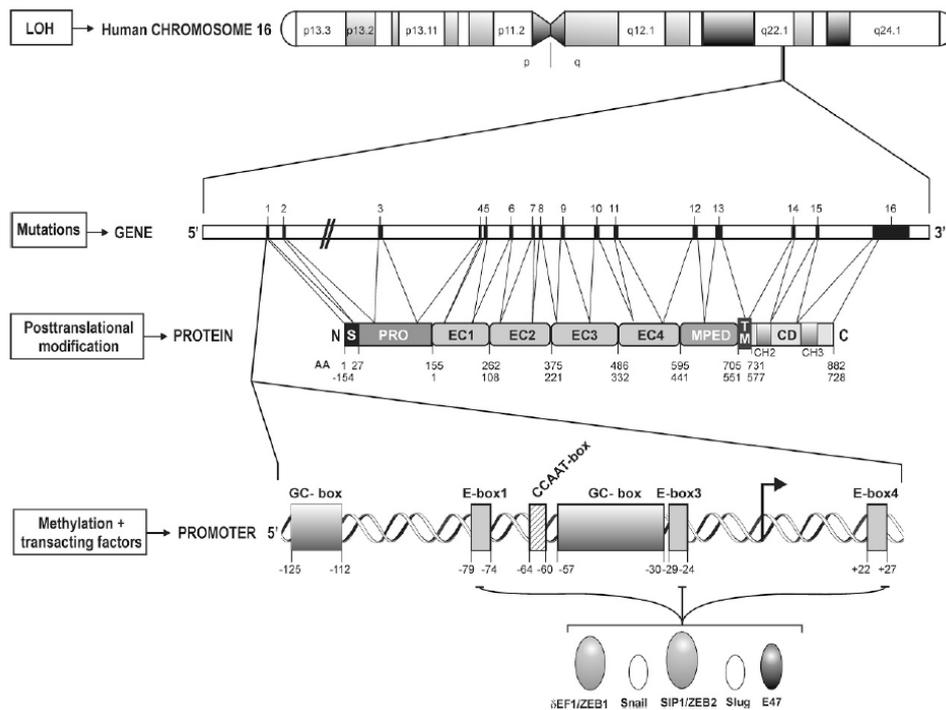


Figura 13. Mecanismos moleculares de regulación de los niveles de expresión de E-cadherina. La proteína E-cadherina está codificada por el gen CDH1 que se localiza en el brazo largo del cromosoma 16 (16q22.1), una región que presenta una elevada tasa de heterocigosis en diferentes tipos de carcinomas humanos. La regulación de los niveles de expresión de E-cadherina puede ocurrir a nivel genético con mutaciones que inactivan su expresión, a nivel epigenético mediante la metilación del promotor del gen de E-cadherina, a nivel transcripcional mediante la unión de represores transcripcionales que impiden su transcripción, y a nivel post-traducciona mediante fosforilización, glicosilación, proteólisis u otras modificaciones. Imagen modificada de *van Roy et al, 2008*.

7.2. Síntesis, endocitosis, reciclaje y degradación de E-cadherina

La cantidad de E-cadherina presente en la superficie celular pone de manifiesto un complejo mecanismo que implica su transporte, acompañada con β -catenina desde el citoplasma, donde es sintetizada por el aparato de Golgi, hasta la membrana celular (92). La E-cadherina presenta un motivo dileucina en la región de juxtamembrana que es crítico para el reconocimiento de la membrana plasmática, y su posterior unión a la misma (93). En la membrana celular, la E-cadherina de una célula es capaz de interactuar con la E-cadherina de células adyacentes formando uniones célula-célula. Alternativamente, la E-cadherina libre, que no forma interacciones, es endocitada formando vesículas endocíticas.

Las vesículas endocíticas se dirigen hacia un órgano endocítico denominado endosoma temprano, donde se determina el reciclaje de E-cadherina hacia la membrana plasmática o su transporte irreversible hacia los lisosomas para su degradación (94) (Figura 14).

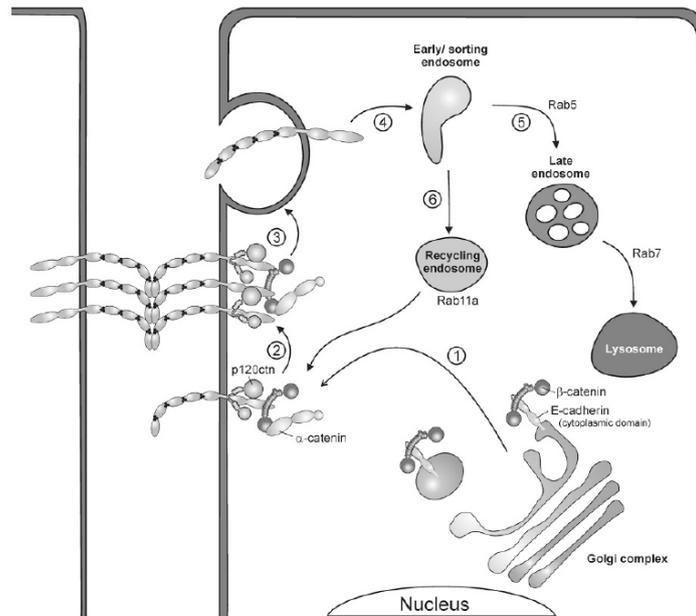


Figura 14. Ruta de síntesis, endocitosis, reciclaje y degradación de la proteína E-cadherina. La proteína β -catenina se asocia con E-cadherina en etapas muy tempranas de su síntesis en el aparato de Golgi. Este complejo β -catenina/E-cadherina es transportado hacia la membrana basolateral donde interacciona con las proteínas p120 y α -catenina, lo que provoca su ensamblaje funcional, pudiendo establecer interacciones con el dominio extracelular de E-cadherina de células adyacentes. Una vez en la membrana, la E-cadherina puede sufrir un proceso de endocitosis, por el cual es transportada hacia los endosomas tempranos, desde donde puede ser reciclada de nuevo hacia la membrana celular por los endosomas de reciclaje, o dirigirse hacia los endosomas tardíos para finalmente degradarse en los lisosomas. Imagen adaptada de *van Roy et al, 2008*.

Como se ha mencionado, aunque la pérdida de E-cadherina en los contactos célula-célula se ha propuesto como un pre-requisito para la invasión celular de los tumores y la formación de metástasis, parece que únicamente la pérdida de E-cadherina no es suficiente para promover la invasión celular, si no que se requieren otras señales adicionales, como la activación de la ruta de Wnt,

mediada por β -catenina que se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción activando la expresión de oncogenes, o bien mediante la estimulación de GTPasas, como Rho, Rac y Cdc42 que están implicadas en migración celular mediante la modulación del citoesqueleto de actina (95).

El gen del virus aviar del sarcoma de Rous (*v-Src*) fue el primer oncogén definido, y que codifica para la primera tirosina quinasa citosólica reconocida capaz de anclarse a la membrana celular, independiente de receptor, y que pertenece a la familia de no-receptor tirosina quinasa. La proteína quinasa *v-Src* se encuentra activada de forma aberrante en la mayor parte de cánceres, debido a la sobreexpresión o desregulación de receptores de factores de crecimiento presentes en la membrana plasmática, como son el receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR), el receptor 2 del factor de crecimiento epitelial humano (HER2), el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor de crecimiento fibroblástico (FGFR), el receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), integrinas o la quinasa de adhesión focal (FAK). La sobreexpresión de estos receptores, de sus ligandos, o de ambos, es común en muchos tipos de tumores, y concurren con la desregulación de la actividad de la tirosina quinasa de *v-Src* (96), que se transloca del citoplasma a la membrana plasmática, donde se activa mediante fosforilación del residuo tirosina Y416 actuando como un promotor tumoral que regula procesos oncogénicos. El incremento de la actividad de *v-Src* favorece la formación de adhesiones célula-matriz y su unión a integrinas, receptores de superficie celular que interaccionan con la matriz extracelular, facilitando la motilidad celular (97). Múltiples estudios han demostrado que la actividad de *v-Src* se incrementa durante la progresión en diversos tipos de cánceres, adquiriendo un papel fundamental en el desarrollo de metástasis, ya que facilita la migración e invasión de las células tumorales del tumor primario, al disminuir la expresión de E-cadherina en los contactos célula-célula a través de su fosforilación en residuos de tirosina, e incrementar la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular. Todo ello induce un proceso de TEM en el que se reducen los niveles de expresión de E-cadherina, y también se incrementa su endocitosis y degradación vía proteosoma y/o lisosoma. Esto se demostró en la línea celular *Madin-Darby canine kidney* (MDCK), un modelo celular epitelial no transformado utilizado clásicamente para el estudio de TEM, en el que tras la fosforilación de E-cadherina por *v-Src*, ésta es

ubiquitinizada y endocitada, proceso que es mediado por la unión de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai (91, 96).

8. Ubiquitinización: E3 ubiquitina-ligasa Hakai

8.1. Proceso de ubiquitinización

El proceso de ubiquitinización consiste en la adición de una o varias moléculas de ubiquitina, una proteína pequeña, de manera covalente a una proteína diana. Este marcaje puede tener diferentes consecuencias. Aunque la más estudiada es la degradación de la proteína diana vía subunidad 26S del proteasoma, pueden también alterar su ubicación celular, afectar su actividad, y promover o prevenir las interacciones de proteínas (98, 99).

La ubiquitina es una proteína ubicua muy conservada de 76 aa, con una glicina en el extremo carboxilo terminal por donde se une al nitrógeno epsilon de una lisina del sustrato. La ubiquitinización es un proceso post-traducciona en el que participan tres enzimas (100, 101) (Figura 15):

- ◆ E1, Enzima activadora de ubiquitina. Esta enzima se encarga de activar a la ubiquitina mediante la hidrólisis de ATP, estableciéndose un enlace tioéster entre la enzima E1 y la ubiquitina.
- ◆ E2, Enzima conjugadora de ubiquitina. Se transfiere la ubiquitina del centro activo de E1 a E2 a través de la reacción de transtioesterificación.
- ◆ E3, Enzima ubiquitina-ligasa. Miembro terminal de la cascada de enzimas que reconoce el sustrato, y por tanto marca la especificidad del sustrato elegido a ubiquitinar. Las enzimas E3 ubiquitina-ligasas son capaces de interaccionar tanto con la enzima E2 como con el sustrato.

Además, existen otras enzimas denominadas deubiquitinasas que reconocen e hidrolizan el enlace entre el residuo de glicina de la molécula de ubiquitina y la lisina del sustrato, por lo que deubiquitinizan los sustratos. Estas enzimas reciclan ubiquitina para mantener una fuente de dichas moléculas libres,

y editan los conjugados con ubiquitina. La ubiquitinización es un proceso enormemente regulado (102-104).

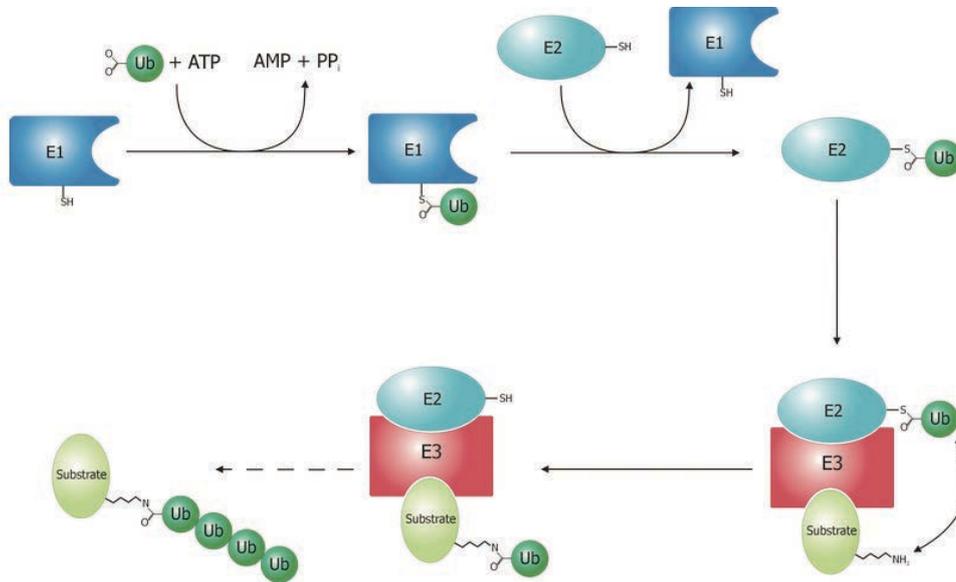


Figura 15. Proceso de ubiquitinización. Proceso mediado por tres enzimas: E1, Enzima activadora de ubiquitina; E2, Enzima conjugadora de ubiquitina; y E3, enzima ubiquitina-ligasa. La enzima E3 ubiquitina-ligasa media la etapa final de ubiquitinización de sustratos fosforilados en residuos de tirosina induciendo su degradación vía lisosoma o proteasoma. Tanto la fosforilación como la ubiquitinización son procesos reversibles regulados por la actividad de fosfatasa y DUBs, respectivamente. Imagen obtenida de *Murata et al, 2009*.

La ubiquitinización es, en general, un proceso muy regulado en el que frecuentemente la fosforilación de las proteínas sustrato constituye la señal de reconocimiento de las E3 ubiquitina-ligasas específicas, o bien permite la relocalización celular del sustrato (102). En la reacción de ubiquitinización, las enzimas E3 ubiquitina-ligasas son las responsables de conferir la especificidad de sustrato. Cada vez existen más evidencias en la literatura que muestran la existencia de desregulación de E3 ubiquitina-ligasas en cáncer. De hecho, algunas E3 ubiquitina-ligasas se encuentran sobreexpresadas en cánceres humanos, lo cual se relaciona con un aumento a la quimioresistencia y un pronóstico clínico malo (105, 106).

La degradación de proteínas vía ubiquitina-proteasoma es un mecanismo esencial en múltiples procesos celulares, incluyendo la regulación de la expresión génica, la respuesta a estrés o el ciclo celular. El descubrimiento de este proceso fue tan importante que el Dr. Aaron Ciechanover, el Dr. Avram Hershko y el Dr. Irwin Rose fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en el año 2004 (107, 108) dado que la degradación de proteína abrió una nueva ruta para el descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer.

8.2. E3 ubiquitina-ligasa Hakai

En el año 2002, se identificó un nuevo regulador post-traducciona l de la estabilidad de la E-cadherina, que se denominó Hakai, que en japonés significa “destrucción”, ya que induce la ubiquitinación y posterior degradación de E-cadherina que implica su pérdida de los contactos célula-célula, fundamentales para el mantenimiento de la cohesión y la integridad de los tejidos (91). Desde entonces, numerosas publicaciones de impacto han descrito nuevas funciones biológicas de Hakai señalando su influencia en la progresión tumoral (109-111). La excesiva degradación de E-cadherina, como la producida cuando Hakai está sobreexpresada, se relaciona con el proceso de invasión y metástasis, sugiriendo su participación en la progresión tumoral (112). El gen *Cbl proto-oncogene like 1* (*CBL1*) codifica para la proteína Hakai que actúa como una enzima E3 ubiquitina-ligasa, y que reconoce E-cadherina como sustrato específico cuando dicha proteína está fosforilada en los residuos de tirosina Y753 e Y754 del tallo citoplasmático tras la activación de la tirosina quinasa v-Src. Se ha demostrado que la fosforilación del residuo de tirosina Y754 es crítica para el reconocimiento de E-cadherina como sustrato de Hakai (113). En los siguientes apartados, se profundizará sobre la estructura molecular de Hakai y sus funciones descritas.

8.3. Estructura de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai

Aunque el proceso de ubiquitinización está altamente regulado, se sabe que son las enzimas E3 ubiquitina-ligasas las que reconocen el sustrato específico a ubiquitinar. Actualmente, se ha establecido la existencia de tres clases de E3 ubiquitina-ligasas que median la ubiquitinización de proteínas con residuos de tirosina fosforilados: miembros de la familia CBL, Hakai y familia de SOCS (102). Además, la mayor parte de las E3 ubiquitina-ligasas se dividen en dos categorías

en función del diseño estructural de sus dominios: 1) dominio HECT, donde la enzima E3 recibe la ubiquitina de E2 y la transfiere directamente al sustrato, y 2) dominio *RING finger*, en el que la enzima E3 posiciona a E2 cerca del sustrato para facilitar la transferencia de la molécula de ubiquitina (103, 104). En general, está establecido que la ubiquitinización de las proteínas solubles, citosólicas o nucleares, son degradadas vía proteasoma, mientras que la ubiquitinización de las proteínas receptoras de membrana son degradadas vía lisosomas. No obstante, existen casos en los que no es así, como por ejemplo el receptor c-Met en el que su ubiquitinización da lugar a una degradación proteasomal (114).

Originariamente, la E3 ubiquitina-ligasa c-Cbl fue identificada como homóloga del oncogen v-Cbl en el retrovirus de ratón. Los miembros de esta familia de E3 ubiquitina-ligasa (c-Cbl, Cbl-b y Cbl-3) presentan un dominio central que une zinc denominado *RING finger* rodeado de los siguiente motivos: 1) dominio altamente conservado de unión de tirosina fosforilada (pTyr-B) en el extremo N-terminal y compuesto por un bucle de cuatro hélices, 2) dominio de unión a calcio denominado "*EF hand*", y 3) un dominio atípico SH2 (*Src homology 2*) (105). Teniendo en cuenta que Hakai está relacionado con c-Cbl a nivel estructural y funcional, se establecieron tres dominios: dominio típico *RING-finger* en la región amino-terminal, dominio corto pTyr-B, y dominio rico en prolina en el extremo carboxilo-terminal.

Sin embargo, un reciente estudio publicado en 2012 ha descrito un nuevo dominio pTyr-B presente en la proteína Hakai, que se denominó Hakai pTyr-b (HYB) (Figura 16), y que consiste en un homodímero, donde cada monómero está formado por un dominio *RING finger*, y por otro dominio corto pTyr-B. Por lo tanto, el dominio HYB presenta cuatro dominios que unen zinc, y que participan en la unión de residuos fosforilados en tirosina rodeados de aminoácidos (115).

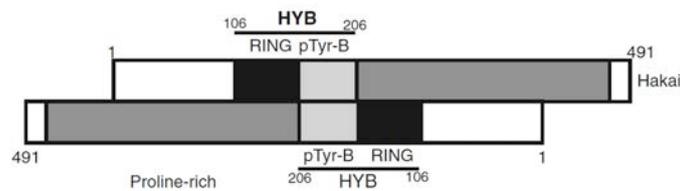


Figura 16. Diagrama esquemático del dominio HYB de la proteína Hakai. El nuevo dominio identificado como HYB, de sus siglas en inglés *Hakai pTyr-binding*, está formado por dos monómeros unidos mediante una configuración antiparalela. Cada monómero presenta dos dominios *zinc-finger*: un dominio *RING finger*, y el dominio HYB que incorpora un motivo *zinc-finger* atípico. Ambos dominios son importantes para la dimerización. Imagen obtenida de *Mukherjee et al, 2012*.

La dimerización de los monómeros facilita la formación del dominio HYB, que reconoce residuos específicos de tirosina fosforilados. Por ello, la dimerización de Hakai es el único pre-requisito para la unión a sustrato, y ocurre a través de la región carboxilo-terminal de Hakai (106-206 aa). Numerosos miembros de la familia de ubiquitina-ligasas con *RING finger* necesitan dimerización para ser funcionales (116). Principalmente, la formación de dímero es necesaria para la interacción de la enzima E2 conjugadora de ubiquitina con el dominio *RING finger*. En el caso de Hakai, el proceso de dimerización parece ser un mecanismo único para el reconocimiento específico de sustrato, más que para la asociación con el *RING finger*. La importancia de la conformación dimérica para la formación del dominio HYB en el reconocimiento de sustrato fosforilado en residuos de tirosina, hace que este dominio HYB sea estructuralmente diferente de otros dominios de unión a residuos de tirosina fosforilados, y por ello se propone como una buena diana terapéutica para el diseño de inhibidores como potenciales compuestos terapéuticos contra el cáncer (116).

8.4. Funciones *in vitro* e *in vivo*

La inducción de TEM como respuesta a diferentes rutas de señalización y su influencia sobre la disminución de los niveles de E-cadherina mediado por la acción de Hakai ha sido ampliamente estudiada. Tras la expresión de Src, la E-cadherina es internalizada y transportada al lisosoma donde se degrada, en lugar de ser reciclada de nuevo hacia la membrana lateral, lo que sirve como un medio para asegurar que las células no formen contactos célula-célula, adquiriendo motilidad. Se ha descrito que esta degradación vía lisosomas de la E-cadherina

está mediada por v-Src, Hrs (Sustrato tirosín-fosforilado regulado por HGF), y la activación de las GTPasas Rab5 y Rab7 (117). Aunque se ha demostrado que la expresión de Src regula la ubiquitinización de E-cadherina vía lisosoma (118), no fue hasta el año 2008 cuando se describió la ruta completa. Tras la depleción de Ca^{2+} , Cdc42 (proteína Rho GTPasa) se activa y en consecuencia también lo hace Src, que también se puede activar por la ruta de EGFR. La activación de Src induce la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio citoplasmático de E-cadherina induciendo su ubiquitinización mediada por Hakai (119). Además, también se ha descrito la proteína Rack1, que actúa como sustrato e inhibidor de Src (120), promueve las uniones célula-célula estabilizando E-cadherina mediante el bloqueo de la fosforilación de los residuos de tirosina en su dominio citoplasmático (Figura 17A) (121). Por otro lado, la ruta de TGF- β juega un papel importante en la TEM y la progresión tumoral (122, 123). Se ha demostrado que TGF- β y Raf cooperan en la inducción de ubiquitinización de E-cadherina, y este efecto se explica, al menos en parte, por la inducción transcripcional de ARNm de Hakai en presencia de ambos inductores, TGF- β y Raf. Los autores demuestran que en estadios tempranos de la TEM inducida por TGF- β y Raf se produce una regulación post-traducciona de E-cadherina, mientras que la pérdida de E-cadherina vía represión transcripcional se produce en estadios tardíos de la TEM (124) (Figura 17B).

La ruta Slit-Robo también parece estar relacionada con la degradación de E-cadherina debida a la acción de Hakai. Algunos tumores sólidos, como el carcinoma colorrectal humano, secretan la proteína Slit que se une a receptor transmembrana Roundabout (Robo) expresado por las células endoteliales del tejido vascular y linfático para estimular la angiogénesis y la formación de vasos linfáticos (125). La ruta de señalización inducida por la interacción Slit-Robo recluta Hakai hacia E-cadherina promoviendo su ubiquitinización y degradación vía lisosoma, no observándose regulación transcripcional de E-cadherina mediada por represores como Snail, Slug, Twist, ZEB-1 o ZEB-2 (Figura 17C). Esta disminución de los niveles de E-cadherina mediado por Hakai induce un cambio fenotípico de epitelial a mesenquimal en carcinoma colorrectal humano modulado de forma autocrina por Slit-Robo (126). También se ha demostrado que un pH ácido, característico en el microambiente tumoral, activa Src quinasas que dan lugar a la fosforilación de los residuos de tirosina del tallo citoplasmático de E-

cadherina, lo que contribuye a la inestabilidad de E-cadherina en las uniones adherentes (127, 128).

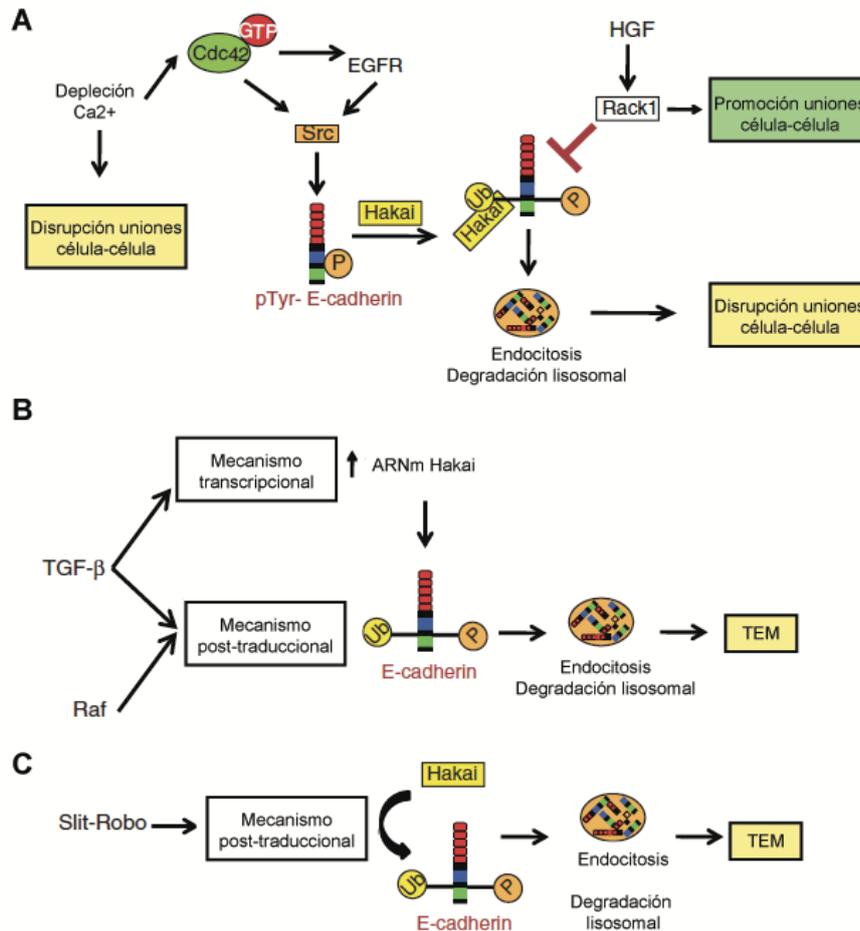


Figura 17. Regulación de vías de señalización mediadas por Hakai. **A**, La depleción de Ca^{2+} activa Cdc42 para iniciar la activación de EGFR y Src, que fosforilación los residuos de tirosina del tallo citoplasmático de E-cadherina, que facilita su reconocimiento por parte de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai que media su ubiquitinización y degradación. La inhibición de Rack 1 en las uniones adherentes de células epiteliales induce endocitosis de E-cadherina. **B**, Las rutas de señalización de TGF- β y Raf regulan la TEM mediante un mecanismo post-traduccionalel que media la ubiquitinización y degradación de E-cadherina. **C**, La ruta de señalización Slit-Robo induce la transformación maligna de las células epiteliales a través de la degradación de E-cadherina mediada por Hakai. Imagen adaptada de Aparicio *et al*, 2012.

Las funciones de Hakai *in vivo* fueron descritas por primera vez en *Drosophila melanogaster* (129). Se observó que los dobles mutantes de Hakai morían durante las etapas larvales, lo que sugiere que Hakai es necesaria para la supervivencia. Sin embargo, Hakai no era indispensable para la proliferación y la diferenciación de la célula en el epitelio del disco del ala, aunque se observaron defectos en la especificación y en la migración celular. No se demostró una interacción directa entre Hakai y el dominio citoplasmático de E-cadherina, poniendo de manifiesto que, en *Drosophila melanogaster*, Hakai no juega un papel directo ni fundamental en la regulación de los niveles de expresión de E-cadherina, y sugiriendo que la asociación entre ambas proteínas necesita componentes intermedios capaces de unir a la proteína citoplasmática Hakai con el dominio extracelular o transmembrana de E-cadherina. Además, cuando Hakai se sobreexpresa no se detecta en los contactos célula-célula, pero sí co-localiza con E-cadherina en vesículas intracelulares no identificadas aún pero que difieren de las descritas previamente como compartimentos endosomales asociados a Rab5, Rab7 o Rab11 (117). Además, la expresión de Hakai es esencial durante el desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster*, observándose elevados niveles de ARNm de Hakai en el blastodermo y en endodermo (tejido que no expresa E-cadherina) donde se distribuye por el citoplasma, la región perinuclear y la membrana plasmática (129). Existen otros tejidos humanos que expresan Hakai pero no contienen E-cadherina como son el bazo, el músculo esquelético o los centros germinales de los ganglios linfáticos (91, 109). Estos datos sugieren la posibilidad de que existan nuevos y múltiples sustratos de Hakai en estos tejidos humanos, y en la morfogénesis embrionaria temprana de *Drosophila melanogaster* (129). En este sentido, se ha descrito que Hakai es capaz de regular la proliferación de un modo independiente de E-cadherina. Se ha demostrado que Hakai interacciona con la proteína PSF de unión a ARN en células que no contienen E-cadherina, aunque no se ha demostrado que Hakai induzca su ubiquitinización. La proteína PSF se une a moléculas de ARN y está implicada en procesos celulares tales como transcripción, procesamiento de ARNm, retención nuclear o procesos de empaquetamiento de ADN (130). Hakai altera la unión de PSF a los ARNm diana que codifican para proteínas asociadas con cáncer (109, 110). Así, se ha propuesto que Hakai regula la proliferación celular de una manera independiente a la modulación de los niveles de expresión de E-cadherina. La sobreexpresión de Hakai promueve la proliferación celular de

varias líneas celulares en cultivo, mientras que al reducir sus niveles de expresión, empleando técnicas de ARN pequeño de interferencia (ARNsi), se inhibe la proliferación a través de su acción sobre PSF y Ciclina D1. Además, Hakai colocaliza en el núcleo con PSF, lo que sugiere un papel funcional de Hakai en el núcleo. Se ha demostrado que Hakai tiene funciones nucleares en células tumorales de mama, donde Hakai actúa como co-represor de receptor de estrógenos α ($ER\alpha$), observándose que Hakai compite por los sitios de unión de co-activadores de $ER\alpha$, como son el co-activador del receptor esteroide-1, o la proteína de interacción del receptor de glucocorticoides-1, inhibiendo mediante unión directa la actividad transcripcional de $ER\alpha$. Para ejercer este efecto como co-represor, no se requiere el dominio ubiquitina-ligasa de Hakai. Además, la sobreexpresión de Hakai reprime la activación de $ER\alpha$, disminuyéndose la proliferación y la migración celular en cultivo *in vitro* de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama dependiente de $ER\alpha$ (131). Estos datos contrastan con numerosos estudios previos donde se demuestra que el incremento de expresión de Hakai induce proliferación celular en las células MDCK (109). Por otro lado, también se ha identificado que a través de su dominio *RING-finger*, Hakai interacciona, junto con otras proteínas como RBM15, KIAA0853 o BCLAF1/THRAP3, con la proteína asociada al tumor de Wilms (132). Dicho complejo de proteínas es necesario para la proliferación celular. Por todo ello, es posible que Hakai pueda ejercer un control negativo o positivo sobre la proliferación celular en función de las condiciones, siendo necesario una mayor comprensión sobre la función de Hakai en el crecimiento celular dependiente de estrógeno. Finalmente, mencionar que la sobreexpresión de Hakai reduce las adhesiones célula-sustrato e incrementar la capacidad invasiva de células epiteliales *in vitro*. Se ha visto que Paxilina, una proteína importante del complejo de adhesión célula-matriz, desaparece completamente al sobreexpresar Hakai en células epiteliales normales no transformadas MDCK de un modo independiente a la vía de proteasoma. Además, la expresión de Paxilina se regula por un mecanismo independiente al proteasoma (111).

Recientemente se han elucidado dos nuevas funciones de Hakai independiente a su función como E3 ubiquitina-ligasa. En primer lugar, se ha observado que Hakai media la estabilización de la proteína δ -catenina, la cual se

une a la región de juxtamembrana de E-cadherina. Hakai estabiliza la expresión de Src, lo que impide la unión entre la glucógeno sintasa quinasa 3- β y la δ -catenina, y en consecuencia se produce una menor ubiquitinización y degradación de δ -catenina vía proteasoma. Estos resultados sugieren que la estabilización de δ -catenina por Hakai es dependiente de Src (133). Por otro lado, se ha sugerido una nueva función de Hakai *in vivo* independiente de su actividad E3 ubiquitina-ligasa durante el procesamiento de ARNm en la planta *Arabidopsis thaliana* (134). En este modelo, la disminución de la expresión proteica de Hakai provoca alteraciones en el patrón de desarrollo de la planta, como por ejemplo una formación vascular aberrante en la raíz. Estas alteraciones o defectos durante el desarrollo de la planta se han asociado con proteínas como Hakai, MTA, MTB, FIP37 y VIR. Estas proteínas, en su conjunto, regulan uno de los procesos más importantes de modificación de ARNm que ocurren en eucariotas denominado N6-metiladenosina (m^6A) (135-137). m^6A está implicada en múltiples procesos biológicos como la exportación de ARNm desde el núcleo, regulación de su procesamiento y estabilidad, elección de un sitio alternativo de poliadenilación y otros mecanismos de maduración de ARNm (138-141). Por ello, la m^6A es esencial en los estadios iniciales del desarrollo de plantas, y se ha asociado a enfermedades humanas incluyendo la alteración del ciclo circadiano y la diferenciación de células madre hacia una línea celular concreta. Hakai juega un papel en el complejo m^6A junto con las proteínas MTA, MTB, FIP37 y VIR. En *Arabidopsis thaliana*, Hakai se localiza principalmente en el núcleo, al igual que en *Drosophila melanogaster* y en humanos. Debido a la letalidad embrionaria por la inhibición total de la expresión de Hakai, y la extrema severidad observada en los fenotipos de crecimiento de los mutantes de la planta en los que el porcentaje de metilación está por debajo del 10%, se concluyó que Hakai es un miembro funcional esencial en la formación del complejo m^6A , por lo que la alteración de su expresión provoca cambios en el proceso de metilación m^6A , proponiéndose la posibilidad de que tenga un papel similar en mamíferos. Además, el establecimiento de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para cada una de las proteínas asociadas con el complejo m^6A ha permitido estudiar sus respectivos efectos sobre el desarrollo post-embrionario (134), elucidándose nuevos mecanismos de acción de Hakai, independiente de su actividad como E3

ubiquitina-ligasa, pudiendo tener un importante papel en procesos fisiológicos y/o patológicos.

Finalmente, mencionar que otras publicaciones sugieren nuevas funciones biológicas para Hakai. Mediante un cribado de ARN de interferencia para genes humanos asociados a la infección del virus del Nilo Occidental, se identificó a Hakai, proponiéndose que a través de la ubiquitinización de E-cadherina se favorecía el proceso de infección mediado por *Listeria monocytogenes*, causante de la listeriosis. Sin embargo, estos resultados no fueron corroborados, y estudios posteriores indican que Hakai no es indispensable durante la entrada del flavivirus (142, 143), por tanto nuevos estudios deberían profundizar en el posible efecto de Hakai sobre la internalización de los virus. Por otro lado, se ha observado una modulación de los niveles de expresión de Hakai durante la diferenciación eritroide de células murinas de eritroleucemia, proponiendo a Hakai como un marcadores de eritropoyesis (144). También se ha propuesto como un marcador para inmunosupresión, abriéndose la posibilidad de que pueda ser un mecanismo de acción de inmunosupresores químicos (145). No obstante, todos estos resultados son muy preliminares, y es necesario su validación y nuevos estudios para corroborar la implicación de Hakai en otros procesos biológicos.

8.5. Hakai como diana terapéutica

En base a las diversas funciones descritas ejercidas por Hakai en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, y su impacto sobre diferentes rutas de señalización celular y sobre la TEM, se comenzó a proponer a Hakai como una potencial diana terapéutica contra el cáncer. Se ha demostrado que la expresión de Hakai está marcadamente incrementada en adenocarcinoma humano gástrico y de colon, comparado con los tejidos normales adyacentes, reforzando su potencial como diana terapéutica (109, 146, 147). En la actualidad, existen pocos datos sobre los mecanismos de regulación de Hakai. El micro-ARN (miARN) 203 se ha descrito como un regulador post-transcripcional de Hakai (147). Los miARNs son hebras de ARN monocatenarias no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que juegan un papel en el desarrollo y progresión tumoral mediante la regulación post-transcripcional del

ARNm diana, bien induciendo su degradación o reduciendo su traducción a proteína. Generalmente, los miARNs se unen a la región 3' no traducida (3'-UTR) del ARNm diana (148, 149). Los miARNs juegan un papel fundamental en la carcinogénesis, ya que se ha observado una expresión aberrante o función alterada durante el desarrollo y la progresión tumoral (150, 151). Mediante transfecciones transitorias del miARN-203 se ha demostrado que es un regulador negativo de la expresión de Hakai, ya que se une a la secuencia 3'-UTR del ARNm de Hakai disminuyendo así la expresión proteica de Hakai, y en consecuencia reduciendo la proliferación celular (147). Sin embargo, el bloqueo total de la expresión de Hakai no parece ser la mejor estrategia terapéutica, ya que mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, empleando *Drosophila melanogaster* y modelos de ratón, se ha demostrado que Hakai es una proteína importante para la supervivencia celular, de modo que la ausencia total de la misma resulta letal (109, 129). Todo ello sugiere que una mejor estrategia en el diseño de fármacos sería bloquear el sitio de unión específico de Hakai a sus sustratos fosforilados, como el de la E-cadherina.

La ruta ubiquitina-proteasoma es el proceso más habitual para la degradación selectiva de proteínas a nivel celular. Este sistema se ha propuesto una vía para regular los niveles o la actividad de sustratos específicos. Desde que se identificó la ruta ubiquitina-proteasoma, numerosos estudios la han propuesto como buena diana terapéutica, y se han diseñado compuestos contra dianas moleculares específicas implicadas en dicha ruta. De hecho, la Agencia Reguladora del Medicamento de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) ha aprobado diversos fármacos específicos diseñados contra subunidades del proteasoma, como son el bortezomib (2003), el carfilzomib (2012), y recientemente el ixazomib (2015). El bortezomib se aprobó para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple o con linfoma de células del manto; el carfilzomib está indicado para el tratamiento en segunda línea con mieloma múltiple, en aquellos pacientes en los que la enfermedad no ha evolucionado bien después de ser tratada con otros fármacos, como bortezomib y talidomida. Finalmente, el ixazomib se aprobó para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple en combinación con otras drogas. Sin embargo, aunque muchos pacientes con neoplasias malignas hematopoyéticas responden a dichos inhibidores, los ensayos clínicos en tumores sólidos han sido decepcionantes hasta ahora (152,

153). De acuerdo con estos datos, una reciente publicación demuestra que en las células epiteliales se produce una disminución de la actividad del proteasoma durante la TEM y que, de hecho, los inhibidores del proteasoma inducen la TEM (154). Los resultados que los autores también sugieren es la posibilidad de que la inhibición farmacológica del proteasoma puede no sólo inducir TEM en las células de cáncer de mama, si no también puede dotarlas de una mayor capacidad de supervivencia. Además, un reciente estudio proteómico publicado por nuestro grupo, empleando células epiteliales que sobreexpresan Hakai, ha demostrado que dichas células presentan una profunda disminución de la expresión de diversas subunidades de proteasoma 26S durante la TEM mediada por Hakai (155). Estos hallazgos apoyan los ensayos clínicos llevados a cabo en tumores sólidos, elucidándose el riesgo potencial del empleo de inhibidores de proteasoma como estrategia terapéutica en el carcinoma, ya que las células epiteliales podrían desarrollar estrategias de escape a esta degradación.

Por tanto, se han propuesto otras enzimas de la ruta ubiquitina-proteasoma como son las E3 ubiquitina-ligasas como mejores dianas terapéuticas en tumores sólidos. Además, pensar que la inhibición de las subunidades del proteasoma daría lugar a la inhibición de numerosas proteínas que son degradadas vía proteasoma, proceso que ocurre de forma natural en las células para mantener la homeostasis celular, lo que provocaría una mayor citotoxicidad. Dado que las E3 ubiquitina-ligasas son las que confieren la especificidad a sustrato, y por tanto sólo degradan un subconjunto de proteínas específicas en la célula, cabe esperar que el efecto de dicha inhibición provoque una menor toxicidad, incrementándose la posibilidad de uso terapéutico en clínica. Además, en el caso de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai, la identificación del dominio HYB como un dominio estructuralmente único, la convierte en una potencial diana terapéutica excelente, que permitiría bloquear únicamente la actividad E3 ubiquitina-ligasa, responsable de la degradación de E-cadherina, lo que bloquearía la inducción de la TEM. Por todo ello, se ha propuesto a la E3 ubiquitina-ligasa Hakai como una excelente diana terapéutica eficaz en aquellos subtipos de tumores donde tiene lugar la TEM, pudiendo tener un gran impacto en el tratamiento de carcinomas en los estadios iniciales de la enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dada la crucial importancia de la pérdida de la proteína E-cadherina y su regulador post-traducciona, Hakai, durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), y en base a los antecedentes descritos anteriormente, se plantea como hipótesis global:

- Que la acción del inhibidor de microtúbulos, vinflunina, tiene un efecto *in vitro* sobre la diferenciación celular a través de las uniones adherentes dependientes de E-cadherina, y de su regulador post-traducciona Hakai.
- Que la proteína Hakai juega un papel crucial *in vitro* e *in vivo* en la progresión tumora.

Para demostrar nuestra hipótesis, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Testar el efecto de un fármaco inhibidor de microtúbulos, vinflunina (VFL), como posible modulador de la transición epitelio-mesénquima utilizando células tumorales epiteliales de vejiga.
 - 1.1. Analizar el efecto de la vinflunina (VFL) sobre la inducción de posibles cambios fenotípicos, y la diferenciación epitelial.
 - 1.2. Evaluar el efecto de la vinflunina (VFL) sobre los contactos célula-célula mediados por E-cadherina, sobre su regulador post-traducciona Hakai, y sobre la transición epitelio-mesénquima (TEM).
2. Testar el efecto de la E3 ubiquitina-ligasa Hakai en un modelo *in vitro* e *in vivo* sobre la progresión tumora.
 - 2.1. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de Hakai en células epiteliales no transformadas (MDCK) sobre la transición epitelio-mesénquima (TEM), la proliferación, la apoptosis, la invasión celular y el potencial oncogénico.
 - 2.2. Evaluar el efecto de la línea celular MDCK que sobreexpresa Hakai (Hakai-MDCK) sobre la progresión tumora utilizando un modelo *in vivo* de ratones atímicos desnudos.

- 2.2.1. Determinar el efecto de la sobreexpresión de Hakai en células epiteliales no transformadas (MDCK) sobre la capacidad tumorigénica, la proliferación y los marcadores de transición epitelio-mesénquima (TEM).
- 2.2.2. Determinar el papel de Hakai sobre la capacidad invasiva y metastásica *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Las líneas celulares epiteliales humanas de cáncer de vejiga (HT1376, UMUC3, SW780, 5637, T24) fueron utilizadas para el desarrollo del presente trabajo. La línea celular HT1376 fue obtenida de *American Type Culture Collections* (ATCC). UMUC3 y SW780 fueron cedidas por el Dr. García F (PharmaMar), y las líneas 5637 y T24 por el Dr. Real F (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO). Las líneas celulares HT1376 y UMUC3 fueron cultivadas en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), la línea celular 5637 fue cultivada en *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640, SW780 fue cultivada en *Leibovitz's* L-15, y la línea T24 fue cultivada en *McCoy's* 5A, todos los medios de cultivo fueron suministrados por Thermo Fisher Scientific.

La línea celular epitelial MDCK fue suministrada por ATCC. La línea celular MDCK que sobreexpresa de forma estable la proteína Hakai fue cedida por el Dr. Fujita Y (*MCR Laboratory for Molecular Cell Biology*). Para obtenerla, las células MDCK se transfectaron con el plásmido pcDNA-HA-Hakai, cedido por el Dr. Birchmeier W (*Max Delbrück Center for Molecular Medicine*), utilizando Lipofectamina® 2000 (Thermo Fisher Scientific), y seleccionadas en DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con el antibiótico G418 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 800 µg/ml. A partir de dos transfecciones independientes, se obtuvieron más de 10 clones estables con sobreexpresión de Hakai que presentaron fenotipos comparables (109). Para la realización de esta tesis se seleccionaron dos clones representativos, a los que se denominaron Hakai-MDCK clon 4 y Hakai-MDCK clon 11 en base a sus características genotípicas (sobreexpresión de la proteína Hakai respecto a la línea parenteral MDCK) y fenotípicas (cambio en la morfología celular hacia un fenotipo mesenquimal caracterizado por la presencia de protrusiones de la membrana celular, comparado con el fenotipo epitelial clásico de las células MDCK).

Todos los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con 10% suero bovino fetal (SBF), 1% penicilina 5000 U/ml y estreptomicina 5000 µg/ml y 1% GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific), y los cultivos de las líneas celulares

utilizadas se mantuvieron en un incubador a 37°C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación.

2. Reactivos y anticuerpos

El fármaco VFL, que actúa como inhibidor de microtúbulos, fue cedido por el laboratorio Pierre Fabre que lo comercializa bajo el nombre de Javlor®. Partiendo de un stock de 25 mg/ml, se realizaron diluciones en medio de cultivo para administrar la concentración de fármaco descrita para cada uno de los ensayos celulares *in vitro* descritos más adelante.

La línea celular MDCK se transfectó con el plásmido pcDNA 3.1 (+) donde se clonó la secuencia que codifica para la proteína Hakai bajo el mismo promotor que el epítipo hemaglutinina (HA) para diferenciar entre la expresión proteica endógena y exógena.

El inhibidor de proteasoma MG132 (Sigma-Aldrich) se utilizó a una concentración de 20 µM durante 2 horas (h). La tripsina utilizada en el desarrollo de este trabajo varió en función de las líneas celulares empleadas. Para las líneas tumorales epiteliales de vejiga HT1376, UMUC3, SW780, 5637 y T24, y para la línea Hakai-MDCK clon 4 y Hakai-MDCK clon 11 se utilizó una solución 0.05% tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Thermo Fisher Scientific). Para la línea celular MDCK se utilizó una dilución 2X a partir del stock 10X (5 gramos (g) de tripsina porcina y 2 g EDTA por litro) de tripsina (Thermo Fisher Scientific).

Las diluciones realizadas con el fármaco VFL se llevaron a cabo en medio de cultivo celular, por lo que la condición control de los experimentos realizados con VFL no se trató con ningún vehículo.

Los anticuerpos, así como su especie animal de origen y dilución, utilizados en las técnicas de western-blot, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se detallan en tabla 1, tabla 2 y tabla 3, respectivamente.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en western-blott.

Anticuerpo	Casa comercial	Animal de origen	Dilución
Anti-E-cadherina	BD Bioscience	Ratón	1:1000
Anti-Hakai	ThermoFisher Scientific	Conejo	1:1000
Anti-Cortactina	Millipore	Ratón	1:1000
Anti-Ciclina D1	Santa Cruz	Ratón	1:1000
Anti-N-cadherina	Abcam	Ratón	1:1000
Anti-Vimentina	Cell Signalling	Conejo	1:1000
Anti-GAPDH	ThermoFisher Scientific	Ratón	1:10 000
Anti-Tubulina	Sigma-Aldrich	Mouse	1:1000
Anti IgG de ratón-HRP	GE Healthcare	Oveja	1:2000
Anti IgG de conejo-HRP	GE Healthcare	Asno	1:2000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Casa comercial	Animal de origen	Dilución
Anti-Ecadherina	BD Bioscience	Ratón	1:100
Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor®-488	ThermoFisher Scientific	Cabra	1:200

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Casa comercial	Animal de origen	Dilución
Anti-Ki67	Dako	Ratón	1:150
Anti-N-cadherina	Abcam	Ratón	1:200
Anti-Cortactina	Millipore	Ratón	1:50
Anti-Hakai	-	Conejo	1:250
Anti-E-cadherina	Cell Signalling	Conejo	1:400

3. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó utilizando un ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5 dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). La reducción metabólica de la sal MTT a través de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa únicamente tiene lugar en las células vivas, y el producto de reacción resultante es un compuesto coloreado e insoluble denominado formazán, de forma que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de

formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 (156) siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (157).

Para llevar a cabo el estudio de la viabilidad celular, las células se cultivaron en placa de cultivo de noventa y seis pocillos (Corning) a una concentración de 1×10^4 células/pocillo. Transcurridas 24 h desde la siembra, las células se trataron durante 48 h con las concentraciones de fármaco indicadas para cada caso, excepto la condición control que se trató con el vehículo correspondiente.

Transcurridas 48 h tras la administración del fármaco, las células se co-cultivaron con 5 mg/ml de MTT, y se incubaron a 37°C durante 2 h. La sal de formazán se disolvió con 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos (min) a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a la longitud de onda (λ) de 570 nanómetros (nm), y tomando el valor a 630 nm como referencia en el espectrofotómetro NanoQuant Infinite M200 (Tecan). La medida del control negativo se llevó a cabo en medio de cultivo con ausencia de células, durante el mismo tiempo de incubación. Se calculó el valor de IC50 que permite determinar la concentración de fármaco necesaria para reducir el crecimiento de la población celular en un 50%, y su valor se corresponde con la concentración de fármaco a la cual se obtiene la mitad de la máxima respuesta del fármaco sobre el cultivo celular utilizado (158). El valor de IC50 se obtuvo a través de curvas dosis-respuesta mediante el software *GraphPad Prism*.

4. Caracterización fenotípica

Se cultivaron 2×10^5 células/pocillo en placa de cultivo de seis pocillos (Corning) en DMEM al 10% SBF. Tras 24 h de crecimiento en estufa, se trataron durante el tiempo y las concentraciones de fármaco indicadas, excepto la condición control que se trató con el vehículo. Tras el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) (MP Biomedicals), se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) en PBS (USB Corporation) durante 10 min. Se lavaron con suero salino para eliminar los restos de PFA, y se mantuvieron en PBS para tomar imágenes con el microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse-Ti). Las imágenes adquiridas se contrastaron con el *software* Photoshop.

5. Extracción y análisis de proteínas mediante western-blot

5.1. Extracción y cuantificación de la concentración de proteínas

Las células se cultivaron en placa de cultivo de seis pocillos (Corning) con una densidad celular de 2×10^5 células/pocillo. Tras el tratamiento con los compuestos a las concentraciones crecientes y tiempos indicados, se realizó un lavado de las células con suero salino, se añadió 1 ml de PBS en cada pocillo de la placa de cultivo celular, se levantaron las células con la ayuda de una espátula, y se recogió la suspensión celular a un tubo de 1.5 ml (Eppendorf). Los precipitados celulares obtenidos se incubaron durante 20 min con 100 μ l de tampón de lisis 1% TritonX-100, cuya composición se indica en la tabla 4, a 4°C, suplementado con 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), y una dilución 1X de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) cuyo stock 100 X está compuesto por:

- a) 104 mM de hidrocloreuro de 4-(2-Aminoetil) benceno sulfonil fluoruro que inhibe serina proteasas.
- b) 80 μ M de aprotinina, un inhibidor natural de proteinasa obtenido de los pulmones bovinos.
- c) 4 mM de bestatina, un inhibidor competitivo de unión lenta para la mayoría de las aminopeptidasas.
- d) 1.4 mM de E-64, un inhibidor de las cisteína proteasas.
- e) 2 mM de leupeptina, que inhibe plasmina, tripsina, papaína, calpaína y catepsina B.
- f) 1.5 mM pepstatina A, inhibidor de aspártico proteasas tales como pepsina, catepsina D y E.

Tabla 4. Composición del tampón de lisis utilizado para la extracción de proteínas.

Tampón lisis 1% TritonX-100	Volumen
20mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma-Aldrich)	1 ml stock 1 M

150mM NaCl (Sigma-Aldrich)	1.5 ml stock 5 M
1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)	0.5 ml stock 100%
H ₂ O	47 ml

A continuación, los lisados se centrifugaron a 12000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante, y se midió la concentración de proteína.

La concentración de proteína se determinó mediante el método colorimétrico basado en ácido bicinonónico (BCA). Este método de basa en que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen el ión Cu⁺⁺ a Cu⁺. Los iones Cu⁺ producidos, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo, varían su estructura electrónica absorbiendo luz a 562 nm. En las condiciones de la reacción, la absorbancia del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. Se siguió el protocolo según las indicaciones del kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific). Para ello, en una placa de 96 pocillos se realizó una curva patrón con concentraciones de proteína albúmina sérica bovina (BSA) conocidas, en un rango de 0 a 10 mg/ml. En la misma placa, se introdujeron por duplicado 2 µl de cada una de las muestra a analizar. Se preparó una mezcla de los reactivos A y B suministrados por el kit en proporción 50:1, se añadieron 200 µl a cada uno de los pocillos, incluido los pocillos de la recta patrón, y se incubaron a 37°C durante 30 min. Tras el tiempo se incubación, se midió la absorbancia a una λ de 570 nm en el espectrofotómetro NanoQuant InfiniteM200 (Tecan). A continuación, se obtuvo la ecuación de la recta de la curva patrón, al representar en el eje X la concentración conocida de BSA para cada punto, y en el eje Y los valores de absorbancia. Las absorbancias de las muestras se analizaron y se interpolaron en la ecuación de la recta, obteniéndose la concentración (µg/µl) de cada una de las muestras.

5.2. Preparación de las muestras para Western-Blot

Tras realizar la cuantificación de proteínas de las muestras, se tomaron 20 µg de proteína por muestra, y se añadió tampón de carga Laemmli 5X (Sigma-Aldrich), cuya composición se detalla en la tabla 5, a una concentración final de 1X. Las muestras se calentaron a 95°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas.

La desnaturalización proteica implicó la pérdida de conformación tridimensional, adquiriendo únicamente estructura primaria, lo que permitió resolver las proteínas en un gel unidimensional según su tamaño molecular. De esta forma, las muestras quedaron listas para cargarlas en un gel, o bien para ser congeladas a -20°C y usarlas posteriormente.

Tabla 5. Composición del tampón de carga Laemmli 5x.

Tampón de carga Laemmli 5x
10% de dodecilsulfato sódico (SDS)
50% de glicerol
10% de β -mercaptoetanol
0.1% de azul de bromofenol
200mM de Tris-HCl pH 6.8

5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Para analizar el patrón de expresión de las proteínas se utilizó la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). SDS-PAGE es un tipo de electroforesis desnaturalizante, en la que las proteínas se desnaturalizan en presencia de calor por la acción combinada de beta-mercaptoetanol y SDS. Por un lado, el β -mercaptoetanol actúa reduciendo los puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína. Por otro lado, el SDS rompe las interacciones no covalentes responsables de la estructura terciaria y cuaternaria, desnaturalizando por completo las proteínas. Las proteínas desnaturalizadas y acomplejadas con el SDS adquieren carga negativa, de forma que los complejos SDS-proteína migran desde el ánodo hasta el cátodo proporcionalmente a la masa, pudiéndose determinar el peso molecular de la proteína si lo comparamos con un marcador de tamaño molecular.

La electroforesis se llevó a cabo en la cubeta de electroforesis (BioRad), con tampón de electroforesis (Trizma base 0.25 M, glicina 1.92 M y 1% de SDS), utilizando como condiciones de carrera 80 voltios (V) durante 20 min y 200 V durante 1 h.

Los geles utilizados para realizar las electroforesis fueron de poliacrilamida al 10%. Cada uno de los geles tiene dos partes diferenciadas, que

se denominaron gel concentrador y gel separador, cuya composición se especifica en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados en SDS-PAGE.

Reactivo	Casa comercial	Gel concentrador	Gel separador
0.5M Tris-HCl pH 6.8	Sigma-Aldrich	625 μ l	-
1.5M Tris-HCl pH 8.8	Sigma-Aldrich	-	2.5 ml
40% acrilamida/bisacrilamida (29:1)	NZYTech	250 μ l	2.5 ml
10% SDS	Sigma-Aldrich	25 μ l	100 μ l
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich	2.5 μ l	15 μ l
Persulfato de amonio (APS)	BioRad	25 μ l	30 μ l
50% de glicerol	Sigma-Aldrich	-	2 ml
H ₂ O		1.6 ml	3 ml

5.4. Transferencia de las proteínas a la membrana de inmunodetección

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas migradas en el gel se transfirieron a membranas de polivinilideno de difluorido (PVDF) (Millipore), previamente activadas con metanol y humedecidas en agua. Para llevar a cabo la transferencia se siguieron las indicaciones de uso descritas por el fabricante del equipo Mini Trans-Blot (BioRad), utilizando tampón de transferencia (Trizma base 0.25 M, glicina 1.92 M y 20% de metanol en agua), y 200 miliamperios (mA) durante 1 h como condiciones de transferencia.

Para la inmunodetección de las proteínas, se incubaron las membranas en la solución de bloqueo [5% de leche en tampón Tris-salino (TBS)], durante 1 h a temperatura ambiente. En primer lugar, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario, específico frente a las proteínas de interés que se quisieron detectar en cada caso (Tabla 1), diluido en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 5 min a las membranas con tampón de lavado Tris-salino con detergente Tween 20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) al 0.05% en agitación.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, adecuado para cada caso, diluido 1:2000 en la solución de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios están marcados con la peroxidasa de rábano (HRP). Tras la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 5 min en agitación con el tampón de lavado TBS-T. Por último, las proteínas inmunoreactivas se detectaron con el kit de revelado de quimioluminiscencia *Amersham ECL™ Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). La reacción se fundamenta en que la peroxidasa de rábano ligada al anticuerpo secundario, unido a la membrana, es capaz de transformar el sustrato luminol en 3-aminofalato. Este producto enzimático emite luz a 428 nm, lo que permite su visualización utilizando la cámara de revelado LAS3000 (Fujifilm).

6. Microscopía electrónica

El análisis del efecto del fármaco VFL sobre los contactos célula-célula se realizó por microscopía electrónica de transmisión. La línea celular 5637 se cultivó en insertos con tamaño de poro de 0.4 micras (μm) (Corning), que se colocaron en una placa de cultivo de veinticuatro pocillos (Corning) con una densidad de 5×10^4 células/inserto durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con una concentración de 5 μM de VFL durante 48 h. Tras este tiempo de incubación, las células se fijaron en una solución de 2.5% glutaraldehído (Panreac) en 0.1 M de tampón cacodilato sódico pH 7.4 (Sigma-Aldrich) durante 16 h a 4°C. Posteriormente, los insertos se fijaron por segunda vez, durante 1 h y a temperatura ambiente, en una solución de 1% de tetraóxido de osmio en 0.1 M de tampón cacodilato sódico pH 7.4, seguido de múltiples lavados con tampón de cacodilato sódico y agua destilada. Los insertos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de acetona, y embebidos en resina Spurr (Tabb). Finalmente, se realizaron ultra-cortes con un grosor de 70-80 nm con el ultra-microtomo *Ultracut-E* (Leica). Los cortes se depositaron sobre una malla de rejillas de cobre, y se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (Jeol) a 80 kV.

Los estudios ultraestructurales y morfométricos se realizaron en el *Servizo de Apoio á Investigación (SAI)* de la *Universidade da Coruña (UDC)*.

7. Ensayos de apoptosis

7.1. Detección por TUNEL

El ensayo TUNEL se utilizó el kit *Click-it TUNEL Alexa Fluor® 594 Imaging Assay* para evaluar el efecto de VFL sobre la apoptosis celular. Este método se basa en la incorporación del nucleótido modificado desoxiuridina trifosfato (dUTP) por la enzima deoxinucleotil transferasa terminal en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado. El ADN fragmentado es característico de las células apoptóticas, por lo que el nucleótido modificado únicamente se incorporará, y será detectado en las mismas mediante la excitación de la muestra a una λ de 591 nm, y recogiendo la emisión de fluorescencia a una λ de 614 nm.

Para ello, se sembraron 3×10^4 células/pocillo en una placa de cultivo desmontable de 8 pocillos (Millipore) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con el fármaco VFL a una concentración de 5 μ M durante 48 h, excepto la condición control a la únicamente se le cambió el medio de cultivo. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y las células se fijaron en una solución de PFA 4%-PBS durante 15 min. A continuación, se llevaron a cabo dos lavados con PBS, se incubó con tampón de bloqueo BSA 3%-PBS durante 1 h, y se permeabilizó con una solución de 0.5% Triton X-100-PBS durante 15 min. Posteriormente, se evaluó la muerte celular siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-E-cadherina durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 5 min con PBS, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad con el anticuerpo secundario Alexa Fluor®-488. Tras el tiempo de incubación, la preparación se lavó con PBS y se incubó con una dilución 1:1000 de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) en PBS durante 10 min en oscuridad para marcar los núcleos de las células. Por último, se realizó un lavado con PBS y se montó en medio de montaje *Prolong Gold Antifade* (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se observaron en el microscopio de fluorescencia *Monitorized reflected Fluorescence System* (Olympus), realizando fotografías representativas de cada una de las muestras.

7.2. Detección por Anexina V-FITC

La detección de apoptosis temprana se realiza mediante la localización de fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en las células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular, mientras que en el proceso de apoptosis, migra a la capa externa donde se puede detectar mediante su unión específica a anexina V en una reacción dependiente de calcio. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, que tiene afinidad por fosfatidilserina, y por lo tanto se une a los restos de las células apoptóticas ya que la fosfatidilserina está accesible en el exterior de la membrana celular, permitiendo discriminar entre células viables y células apoptóticas.

Por otro lado, en los estadios tardíos de apoptosis, cuando la membrana plasmática pierde su integridad, y el núcleo es accesible, se emplea yoduro de propidio (IP) que actúa como agente intercalante de ADN de doble cadena.

Para evaluar el porcentaje de muerte celular se utilizó el kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Immunostep), donde la anexina V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), permitiendo detectar esta fluorescencia por citometría de flujo. Las células se cultivaron en placa de cultivo de seis pocillos (Corning) con una concentración de 2×10^5 células/pocillo en DMEM 10% SBF durante 72 h. Como control positivo de apoptosis, las células se incubaron en presencia de estaurosporina (Sigma-Aldrich) a una concentración de $2 \mu\text{M}$ durante 2 h. La estaurosporina actúa mediando la inhibición de la proteína quinasa C, induciendo así apoptosis celular. Finalizado el tiempo de incubación de las células, se retiró el medio de cultivo, y tras lavado con suero salino las células se tripsinizaron. Tras parar la reacción con DMEM 10% SBF, la suspensión celular se centrifugó en tubos de citómetro (Corning) a 1500 r.p.m. durante 5 min. Transcurrido el tiempo, el precipitado celular se resuspendió en $100 \mu\text{l}$ de tampón de anexina V al 1X en suero salino (partiendo de un stock comercial al 10X), se añadieron $5 \mu\text{l}$ de Anexina V-FITC y $5 \mu\text{l}$ de IP. Posteriormente, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, tras lo cual se añadieron $400 \mu\text{l}$ de tampón de anexina V al 1X. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Por condición experimental se

analizaron 10×10^3 células excitando la muestra de forma simultánea a 495 nm para Anexina V marcada con FITC, y 536 nm para IP, y recogiendo la emisión de fluorescencia a 519 nm mediante el canal FL-1 y 617 nm mediante el canal FL-3 respectivamente, utilizando el *software* CellQuest (Becton Dickinson). El marcaje simultáneo de las células con anexina V-FITC y IP permite discriminar cuatro estadios celulares diferentes: 1) células intactas, negativas para anexina V-FITC y IP; 2) células apoptóticas tempranas, positivas para anexina V-FITC y negativas para IP; 3) células apoptóticas tardías, positivas para anexina V-FITC y para IP; 4) células necróticas, positivas para IP. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para cada marcaje, y se representó la media de tres experimentos independientes (media \pm DS).

8. Extracción de ARN y PCR en tiempo real

8.1. Extracción y cuantificación de la concentración de ARN

Las células se cultivaron en placa de cultivo de seis pocillos (Corning) con un número inicial de 3×10^5 células/pocillo. Transcurridas 24 h desde la siembra, las líneas celulares 5637, HT1376, y UMUC3 se trataron a una concentración 5 μ M de VFL, y se incubaron durante 48 h. Pasado este tiempo, se inició el protocolo de extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó con el reactivo *TriPure Isolation* (Roche). Este reactivo consiste en una solución a base de fenol e isotiocianato de guanidina, que estabiliza el ARN e impide su degradación por acción de ARNasas. Se añadió 1 ml de PBS en cada pocillo de la placa de cultivo celular, se levantaron las células con la ayuda de una espátula, y se recogió la suspensión celular a un tubo de 1.5 ml (Eppendorf). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se añadió 1 ml de *TriPure* en cada tubo, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, y se añadieron 300 μ l de cloroformo a cada tubo. Tras una centrifugación a 12 500 r.p.m. durante 15 min a 4°C, se obtuvieron dos fases, una fase superior acuosa, y una fase inferior orgánica, con una interfase. Para la extracción de ARN se recogió la fase superior acuosa incolora que contiene ARN a un nuevo tubo de 1.5 ml. Se añadieron 500 μ l de isopropanol por tubo, y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente,

se centrifugaron a 12 500 r.p.m. durante 10 min a 4°C para precipitar el ARN, y se realizó un lavado con etanol al 70%. El precipitado que contiene el ARN se dejó secar, y se resuspendió en 15 µl de agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (Applied Biosystems), un agente inhibidor de ARNasas.

Una vez extraído el ARN, se realizó una cuantificación en el equipo *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific) para determinar su concentración, utilizando una λ de 260 nm. Al mismo tiempo, se evaluó la pureza de la extracción de ARN, así como el nivel de degradación de la muestra, que viene determinado por el ratio entre la absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm respectivamente, seleccionando aquellas muestras cuyos ratios fueron ≥ 1.7 para su posterior retrotranscripción.

8.2. Retrotranscripción

El ARN extraído se sometió a un proceso de retrotranscripción para obtener ADN complementario (ADNc), y analizar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) en las condiciones experimentales indicadas en cada caso.

Para llevar a cabo la retrotranscripción, se utilizaron 500 ng de ARN de cada una de las muestras, calculados a partir de los valores obtenidos en las cuantificaciones, y se utilizó el kit *First-Strand cDNA Synthesis* (NZYTech), para obtener el ADNc utilizando oligos denominados hexámeros aleatorios (*random hexamers*).

En primer lugar, se preparó la mezcla de la reacción según se indica en la tabla 7. Las muestras se incubaron a 25°C durante 10 min, produciéndose la desnaturalización del ARN. Después, se incubaron 30 min a 50°C, produciéndose la retrotranscripción. Tras este tiempo, la reacción se detuvo mediante inactivación de la enzima transcriptasa reversa (*Enzyme Mix*) a 85°C durante 5 min. Las muestras se mantuvieron en hielo, y se añadió 1µl de ARNasa H por tubo, y se incubó 20 min a 37°C, para conseguir eliminar el ARN que no había sido retrotranscrito. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización para realizar la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Tabla 7. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para llevar a cabo la retrotranscripción de las muestras de ARN.

Reactivo	Volumen por reacción
NZYRT 2x <i>Master Mix</i>	10 μ l
NZYRT <i>Enzyme Mix</i>	2 μ l
ARN (500 ng)	-
H ₂ O-DEPC	hasta 20 μ l

8.3. PCR cuantitativa (qPCR)

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes a estudio se realizó con el kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) en el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El *SYBR Green I Master* contiene el tampón, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), una ADN polimerasa termoestable, y SYBR® Green. Los reactivos y volúmenes de la mezcla para cada reacción de qPCR, se detallan en la tabla 8. El SYBR® Green es un colorante fluorescente capaz de unirse al surco menor de la doble cadena de ADN, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución. El producto de reacción de cada ciclo completo de PCR es una nueva molécula de ADN de doble cadena, a la que se une SYBR® Green, por lo que el incremento de la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN recién sintetizado como producto de PCR. La cuantificación se basa en los valores de ciclo umbral (Ct de sus siglas en inglés *cycle threshold*) de las muestras, que se define como el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia sea superior a la fluorescencia de fondo (*background*). Cuánto menor sea el valor de Ct, indicará un menor número de ciclos necesarios para captar la fluorescencia emitida por el SYBR® Green, lo que supone un mayor número de moléculas de ADN de doble cadena presente en la muestra a analizar. Los datos obtenidos se analizaron, y se calcularon los niveles relativos de expresión por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (159).

Tabla 8. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para qPCR a partir de ARNm.

Reactivo	Volumen por reacción
<i>Master Mix (2x)</i>	5 μ l

Oligo sentido (5 μ M)	0,7 μ l
Oligo antisentido (5 μ M)	0,7 μ l
ADNc	1 μ l
H ₂ O-DEPC	hasta 10 μ l

Puesto que el SYBR® Green se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, fue necesario llevar a cabo las curvas de *melting* o fusión, que son características del producto de PCR, ya que dependen del tamaño y de la composición del amplicón. Para ello, se llevó a cabo una desnaturalización a 95°C durante 5 segundos (seg), seguida de otra etapa a 65°C durante 1 min para permitir de nuevo la hibridación de todas las hebras, alcanzando así el máximo de fluorescencia. A continuación, se subió la temperatura hasta 97°C, para obtener la temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentren disociadas, lo que se denomina temperatura de *melting* o fusión (T_m). La T_m debe mantenerse constante para cada uno de los genes utilizados. Las variaciones en los valores de T_m pueden deberse a uniones inespecíficas de los oligos y dímeros de oligos, entre otras causas, y aquellas muestras que presenten estas variaciones deben ser descartadas ya que el producto de amplificación es diferente al amplicón de interés.

Las condiciones de qPCR fueron las siguientes:

- a) Activación de la ADN polimerasa: 95°C durante 10 min.
- b) Amplificación. Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación que incluyen las siguientes etapas:
 - Desnaturalización: 95°C durante 10 seg para permitir la desnaturalización de la doble cadena de ADNc.
 - Anillamiento: bajada de la temperatura a 60°C para permitir el anillamiento de los oligos con la secuencia diana de ADNc de cadena sencilla.
 - Extensión: 72°C durante 10 seg en los que la ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de una nueva hebra de ADN.

- c) Curvas de fusión o *melting*. Debido a que el SYBR® Green se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena como se describió anteriormente, fue necesario llevar a cabo las curvas de *melting* o fusión, que dependen del tamaño y la composición del amplicón, y son características del producto de PCR. Para ello, se llevó a cabo una desnaturalización a 95°C durante 5 seg, seguida de 1 min a 65°C para que todas las hebras hibridasen de nuevo, alcanzándose así el máximo de fluorescencia. A continuación, se elevó progresivamente la temperatura hasta alcanzar los 95°C, de forma que a medida que aumenta la temperatura y la muestra va desnaturalizándose, el equipo capta la fluorescencia del SYBR® Green (λ absorción 480 nm, y λ emisión 520 nm) (160). Todo esto, nos permite calcular la Tm, que tiene que ser la misma para cada uno de los genes analizados, permitiendo así el descarte de aquellas muestras donde se haya obtenido una amplificación diferente a la del amplicón de interés.
- d) Enfriamiento: 1 ciclo de 40°C durante 10 seg.

Para analizar los niveles de expresión tanto del gen de interés (Hakai) como del gen de referencia *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase* (HPRT) se utilizaron los oligos detallados en la tabla 9, que fueron diseñados con la herramienta informática *Universal ProbeLibrary* (Roche), y fueron manufacturados por Sigma-Aldrich. El diseño fue optimizado para longitudes comprendidas entre los 18 y 22 nucleótidos y unas temperaturas de anillamiento de 59-60°C, con un contenido en guanina/citosina de aproximadamente 50%, y una longitud de amplicón no superior a 120 nucleótidos.

Tabla 9. Oligos utilizados para el análisis de los genes de interés.

Nombre	Especie	Oligo sentido (5'-3')	Oligo antisentido (5'-3')
Hakai	Humana	cgcagacgaattcctataaagc	ccttctcatcaccagggtgg
HPRT	Humana	tgaccttgattatattgcatacc	cgagcaagacggtcagtcct

9. Inmunofluorescencia

Para realizar inmunofluorescencias, las células se sembraron en placas de cultivo desmontables de 8 pocillos (Millipore) con una densidad de 3×10^4 células/pocillo tanto de células MDCK como Hakai-MDCK clon 4. Transcurridas 72 h, se realizaron dos lavados con PBS, y se fijaron las células en una solución de PFA 4%-PBS durante 15 min. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se incubaron con tampón de bloqueo BSA 3%-PBS durante 1 h. Tras eliminar el tampón de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5 min con PBS, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario marcado con fluoróforo adecuado para cada caso en función de la reactividad entre especies (Tabla 2). Tras el tiempo de incubación, las preparaciones se lavaron con PBS y se incubaron con una dilución 1:1000 de Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) en PBS durante 10 min en oscuridad para marcar los núcleos de las células. Finalmente, se realizó un lavado con PBS y se montó en medio de montaje *Prolong Gold Antifade* (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se observaron en el microscopio de fluorescencia *Monitorized reflected Fluorescence System* (Olympus), realizando 5 fotografías representativas de cada una de las muestras. La intensidad de fluorescencia se cuantificó mediante el *software* ImageJ, y se representó la media de tres experimentos independientes (media \pm DS).

10. Ensayos de proliferación celular

La cuantificación de la proliferación celular se realizó mediante la incorporación de análogos de nucleósidos en el ADN recién sintetizado. Tradicionalmente, se utilizó como análogo la molécula 5-Bromo-2'-Deoxiuridina (BrdU), que es capaz de incorporarse al ADN de nueva síntesis tras someter a la muestra a un proceso de desnaturalización de la doble cadena de ADN, obteniendo como producto dos cadenas monocatenarias de ADN. La estructura helicoidal del ADN se mantiene a través de interacciones no covalentes: 1) interacciones hidrofóbicas entre bases adyacentes, y 2) puentes de hidrógeno entre bases complementarias. La desnaturalización del ADN conlleva la ruptura de estas interacciones no covalentes, que se puede realizar mediante diferentes métodos: 1) temperatura:

alrededor de 90°C se produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios, y por lo tanto la desnaturalización del ADN bicatenario, 2) pH: valores de pH>11 son capaces de romper los puentes de hidrógeno, y desestabilizar la estructura helicoidal del ADN, 3) agentes químicos: urea y formamida, entre otros. El proceso de desnaturalización es intenso y de larga duración, lo que puede disminuir la integridad y la calidad de las muestras, afectando negativamente a los resultados obtenidos. Actualmente, y para evitar los problemas derivados del proceso de desnaturalización del ADN, existe un método alternativo para la cuantificación de la proliferación celular que utiliza la molécula 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) como análogo de la timidina, acoplado a el colorante Alexa Fluor® 488 que nos permite detectar la fluorescencia emitida por la muestra en el canal FL-1 mediante citometría.

Las principales ventajas de utilizar EdU frente a BrdU son las siguientes: 1) eficacia: no es necesario llevar a cabo la desnaturalización de estructura helicoidal del ADN, basta con una permeabilización con detergente y una fijación suave para que la molécula EdU sea capaz de acceder al ADN, 2) preservación de la morfología celular, 3) integridad del ADN, y 4) digestión enzimática con ADNasa.

Por todas las razones anteriores, el análisis del estado de proliferación celular se completó con el kit *Click-iT EdU Alexa Fluor® 488* (ThermoFisher Scientific) en lugar de utilizar el marcaje con BrdU. Para ello, 2×10^5 células/pocillo se cultivaron en placas de cultivo de seis pocillos (Corning) en DMEM 10% SBF durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se trataron con EdU a una concentración final de 5 μ M, y se incubaron durante 2 h en un incubador a 37°C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación. Tras el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, y tras lavado con suero salino se tripsinizaron las células. Se detuvo la reacción con DMEM 10% SBF, y la suspensión celular se centrifugó en tubos de citómetro (Corning) a 1500 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 100 μ l de 4% PFA en PBS, incubándolas durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 min para eliminar los restos de PFA, y se incubaron durante 20 min en 200 μ l de 0.5% Tritón X-100 en PBS. Transcurrido este tiempo, se incubaron durante 30 min, y protegido de la

luz, en 100 μ l de tampón de reacción por muestra, cuya composición se refleja en la tabla 10.

Tabla 10. Tampón de reacción para analizar la proliferación celular.

Compuesto	Volumen
Agua	75.8 μ l
Tampón de reacción (10 X)	10 μ l
Solución de catálisis	4 μ l
Azida (10 mM)	0.2 μ l
Tampón aditivo (10x)	10 μ l
Volumen total	100 μl

Posteriormente, se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 min, y tras descartar el sobrenadante, se realizó un lavado con 200 μ l de 3% BSA-PBS. Finalmente las células se resuspendieron en 300 μ l de PBS, y fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Por muestra se analizaron 10×10^3 células excitando la muestra a una longitud de onda de 485 nm y recogiendo la emisión de fluorescencia a 519 nm mediante el canal FL-1, utilizando el programa *CellQuest* (Becton Dickinson).

Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para la incorporación de EdU en el ADN de nueva síntesis, y se representó la media de tres experimentos independientes (media \pm DS).

11. Ensayo de invasión celular

La capacidad de invasión celular se evaluó con el kit *QCMTM ECMatrix Cell Invasion Assay* (Millipore). El fundamento de esta técnica se basa en el principio de Boyden (161), en el que cada inserto tiene una membrana de policarbonato recubierta con *ECMatrixTM* con un tamaño de poro de 8 μ m, que únicamente son capaces de atravesar aquellas células con capacidad de migrar e invadir, pudiendo degradar la estructura análoga a la matriz extracelular presente en los tejidos *in vivo*. Se creó un gradiente de SBF entre la parte superior del inserto, donde se utilizó medio DMEM al 2%, y la parte inferior, en la que se utilizó DMEM al 30%, para favorecer la quimio-atracción celular.

Las células se cultivaron en placa de cultivo de seis pocillos (Corning) con una concentración de 2×10^5 células/pocillo en DMEM 1% SBF durante 24 h. Después de este tiempo, se lavaron las células con suero salino, se tripsinizaron, y se paró la reacción con DMEM 10% SBF. La suspensión celular se centrifugó en tubos de polipropileno (Falcon) a 1100 r.p.m. durante 5 min, el precipitado celular se resuspendió en medio DMEM 2% SBF, y se realizó el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Se cultivaron 3×10^5 células/inserto en medio DMEM 2% SBF en el interior del inserto de invasión. En el pocillo de la placa de cultivo de 24 pocillos (Corning) donde se coloca el inserto de invasión, se puso medio DMEM 30% SBF, de modo que se genera un gradiente de SBF que sirve a las células de atrayente, y se incubaron durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio del interior del inserto, y las células que no fueron capaces de atravesar la membrana del inserto, se eliminaron con la ayuda de un algodón. Las células que atravesaron la membrana del inserto, presentes en la cara inferior del inserto, se tiñeron con cristal violeta (Merck) durante 20 min. A continuación, se lavó el exceso de cristal violeta con PBS, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min, se recortó la membrana de los insertos, y se colocó sobre un portaobjetos, en el que se montó en medio *GlycerGel* (Dako). Las preparaciones se observaron en el microscopio Olympus BX61 (Olympus Biosystem) con la cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems) acoplada al mismo, donde se llevó a cabo el recuento de células capaces de invadir.

Los resultados se expresaron como el número de células que invadieron el análogo a la matriz extracelular en cada una de las condiciones experimentales para tres experimentos independientes (media \pm DS).

12. Ensayo de capacidad de formación de colonias en agar blando

Para evaluar el potencial oncogénico de las células se utilizó el ensayo de capacidad de formación de colonias en agar blando. Para ello, se preparó medio DMEM suplementado con 20% SBF, 2% penicilina 5000 U/ml estreptomicina 5 000 μ g/ml y 2% GlutaMAX™, al que se denominó medio DMEM-2X. Se preparó una solución de agar (BD Biosciences) al 1.6% en medio DMEM sin implementar (0% SBF, 0% penicilina-estreptomicina, 0% GlutMAX™) que se esterilizó en el

autoclave para mantener las condiciones de esterilidad requeridas para su uso posterior en cultivo celular. La solución de agar se calentó por encima de los 40°C para facilitar la disolución del agar, que se diluye en DMEM-2X en proporción 1:1, para obtener una solución final compuesta por 0.8% agar en medio DMEM 10% SBF, 1% penicilina 5000 U/ml estreptomycin 5000 µg/ml y 1% GlutaMAX™. Se depositó 1.5 ml de este medio en placas de cultivo de doce pocillos, manteniendo la solución a 40°C para evitar la solidificación de la solución, y evitando la formación de burbujas. La placa de cultivo se dejó a temperatura ambiente durante 2 h para la completa solidificación del agar.

Por otro lado, se preparó una solución de agar al 0.8% en medio DMEM sin suplementar, que también se esterilizó, y posteriormente, se calentó a 40°C para facilitar su disolución en medio DMEM-2X en proporción 1:1, para obtener una solución final de 0.4% agar en medio DMEM 10% SBF, 1% penicilina 5000 U/ml estreptomycin 5000 µg/ml y 1% GlutaMAX™.

Se preparó una suspensión celular en la solución de 0.4% agar preparada anteriormente, con una concentración celular de 1×10^4 células/ml. Se depositaron 0.5 ml de suspensión celular sobre la base de 0.8% agar ya solidificada en la placa de cultivo de doce pocillos.

Las células fueron cultivadas durante tres semanas, tiempo necesario para que las células sean capaces de formar colonias sobre agar blando. Después de las tres semanas de tratamiento, se añadió 1 ml/pocillo de una solución de cristal de violeta (Merck) al 0.05% preparada en PBS, y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente, con el objetivo de teñir las colonias formadas y facilitar su observación y contaje. El contaje del número de colonias formadas se realizó con el microscopio invertido de contraste de fases Nikon Eclipse Ti. Los resultados se expresaron como la media del número de colonias formadas para cada una de las condiciones experimentales de tres experimentos independientes (media±DS).

13. Ensayos de formación de tumores en ratones inmunodeprimidos

13.1. Animales, grupos experimentales y desarrollo del modelo: estudio piloto

Para llevar a cabo los experimentos de formación de tumores en ratones, se emplearon ratones atímicos desnudos hembra con un peso medio de entre 19-24 g, y de 2 meses de edad (Harlan Interfauna Ibérica). Debido a la inmunodeficiencia que presentan estos animales, el cuidado, tratamiento y seguimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Los animales permanecieron estabulados en el animalario del Centro Tecnológico de Formación de la Xerencia de Xestión Integrada A Coruña (CTF-XXIAC) en condiciones libres de patógenos bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h con agua estéril (B. Braun) suplementada con oxilab ciclina retard 200 mg/ml (Labiana) a una concentración de 0.8 mg/ml, y dieta normal (SAFE) *ad libitum*, con temperatura $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad 70-80%.

Todos los procedimientos realizados en el estudio cumplen la normativa vigente en la Unión Europea (2010/63/EU) y España (RD 53/2013), y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la CTF-XXIAC (Código CEEA 15002/2015/04).

Desde la llegada de los animales a las instalaciones, se esperó una semana, en la que los animales se aclimataron a las nuevas condiciones de estabulamiento, antes de realizar cualquier manipulación o experimento. Los ratones atímicos desnudos fueron distribuidos en diferentes grupos experimentales en función de la línea celular inyectada, y del tratamiento recibido (Tabla 11).

Los grupos experimentales fueron inyectados subcutáneamente con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4, resuspendidas en 100 μl de DMEM sin suplementar (0% SBF, 0% penicilina-estreptomicina) en el flanco. En la tabla 11 se detalla la línea celular, el número de células inoculadas, y los días de tratamiento. Los ratones atímicos inoculados con MDCK y Hakai-MDCK clon 4 se mantuvieron durante 19 días (d) para evaluar el potencial oncogénico *in vivo* de la sobreexpresión de la proteína Hakai. Los ratones que se inocularon con una

densidad celular de 1×10^6 (para evaluar otra densidad celular y establecer el número óptimo de células para inyectar) se mantuvieron durante 47 d para evaluar la progresión tumoral y metástasis, y la supervivencia en un periodo de tiempo más largo.

Tabla 11. Nomenclatura y condiciones del modelo animal. Se detalla la línea celular utilizada así como el número de células, y el tiempo de experimento expresado en días.

LÍNEA CELULAR	NÚMERO CÉLULAS	TIEMPO (Días)
MDCK	5×10^6	19
		19
Hakai-MDCK clon 4	5×10^6	19
		19
		19
Hakai-MDCK clon 4	1×10^6	47
		47

El tamaño del tumor se midió con un calibre digital (ATM Enterprises) una vez a la semana durante el tiempo que duró el experimento, tomando como última medida del tamaño del tumor el día del sacrificio. El volumen del tamaño del tumor, expresado en centímetros cúbicos (cm^3), se calculó con la fórmula $(\pi \cdot \text{ancho}^2 \cdot \text{longitud})/6$ (162). Durante todo el periodo de duración del experimento, se llevó a cabo un control semanal de los ratones con el objetivo de mantener el bienestar animal, en el que se procedió a su pesado, y la medición del tamaño de los tumores. Si durante el experimento, el tamaño del tumor superó un volumen comprendido entre $0.52\text{-}1.77 \text{ cm}^3$, el ratón se eutanasió.

13.2. Sacrificio y recogida de muestras

Los ratones se eutanasiaron por dislocación cervical, que causa lesiones a nivel del tronco encefálico y causa la muerte instantánea. Inmediatamente después del sacrificio se extrajeron las piezas, y se procesaron tal y como se detalla a continuación:

- a) Tumor en los ratones inoculados con células Hakai-MDCK clon 4, y lesión subcutánea en aquellos inoculados con MDCK. El tumor se dividió en tres secciones para su posterior procesamiento en inclusión en parafina (Merck), congelación en *optimum cutting temperature* (OCT™) (Sakura) y *RNA later* (Ambion).
- b) Pulmones. Se incluyeron en parafina.
- c) Hígado. Se dividió en tres secciones para su posterior procesamiento en inclusión en parafina, congelación en nitrógeno líquido y *RNA later*.
- d) Riñones. Se incluyeron en parafina.

Las técnicas de procesamiento de las muestras que se utilizaron variaron en función de la técnica de estudio posterior a la que se sometió cada una de las piezas, y se detallan a continuación:

- a) Inclusión en parafina. Las muestras se fijaron durante 24h en un volumen de formol al 4% (Panreac) ± 20 veces superior al de la pieza. Después de 24h, las piezas se tallaron, y se introdujeron en una solución de etanol al 70% (Alcomon) hasta su inclusión en parafina en el inclusor Myr (Leica), siguiendo el protocolo descrito (Tabla 12). El resultado final es el tejido de interés incluido en un bloque de parafina.
- b) Congelación en Tissue-Tek® OCT™. Las piezas se incluyeron en medio OCT™, cuya composición es <11% de alcohol de polivinilo, <5% de CARBOWAX™, y >85% de compuestos no reactivos. Seguidamente, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta su empleo en técnicas histológicas.
- c) Congelación en nitrógeno líquido. Las muestras se introdujeron en crioviales, y se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.
- d) Solución para almacenaje y estabilización de ARN (RNA later®). La pieza se mantuvo a 4°C en la solución de *RNA later®* (Ambion) durante 24h. Transcurrido este tiempo, se descartó la solución, y las muestras se almacenaron a -80°C.

Tabla 12. Programa utilizado por el inclusor de parafina Myr.

REACTIVO	TIEMPO
Etanol 70%	1 h
Etanol 96%	1 h 30 min
Etanol 96%	1 h 30 min
Etanol 100%	1 h
Etanol 100%	1 h 30 min
Etanol 100%	1 h 30 min
Xilol	1 h
Xilol	1 h
Xilol	1 h
Parafina	3 h
Parafina	3 h

13.3. Análisis histopatológico

13.3.1. Procesamiento histológico de las muestras incluidas en parafina

Para el estudio histopatológico se realizaron cortes de los bloques de parafina en secciones seriadas de 4 μm de grosor en un microtomo Leica RM2155 (Leica Biosystems). Los cortes obtenidos se colocaron sobre portaobjetos pretratados adhesivos con carga positiva *Superfrost plus* (Thermo Fisher Scientific), y se almacenaron en una estufa a 37°C, al menos durante una semana, para secar el corte y lograr su completa fijación al portaobjetos. En el momento de su utilización, los cortes se colocaron en la estufa a 37°C la noche anterior, y al día siguiente, se realizó el desparafinado y rehidratación de los tejidos, que consiste en los siguientes pasos: 1) Desparafinado por calor durante 30 min a 60°C en estufa, 2) Xilol 10 min, para eliminar completamente los restos de parafina, 3) Hidratación en soluciones decrecientes de alcoholes (100° 10 min y 96° 10 min), y 4) Hidratación final en agua destilada durante 10 min.

Una vez completados los procesos de desparafinación y rehidratación del tejido, los cortes están listos para ser utilizados en las tinciones histológicas.

13.3.2. Tinciones histológicas: Hematoxilina-Eosina (H&E)

La hematoxilina es una sal neutra de origen natural que se considera como colorante básico, ya que su componente cromógeno reside en el complejo catiónico o básico. Este producto de carácter basófilo se utiliza en histología para teñir los componentes ácidos de los tejidos, proporcionándoles una color morada. Tiñe los núcleos de las células, ya que éstos contienen ácidos nucleicos. La eosina, por su parte, es un colorante ácido de origen artificial, que tiñe las estructuras básicas de los tejidos proporcionándoles una coloración rosa. Tiñe el citoplasma de las células, y se utiliza como colorante de contraste de la hematoxilina en las tinciones hematoxilina-eosina. La tinción hematoxilina-eosina permite, por lo tanto, valorar la estructura y morfología general de los tejidos. Además, también permite identificar y diferenciar las partes de los mismos.

Una vez que los tejidos se desparafinaron y se rehidrataron, se sumergieron 5 min en hematoxilina de Harris (Panreac), seguido de un lavado con un flujo de agua corriente hasta obtener el viraje crómico que intensifica la coloración morada de la hematoxilina. La hematoxilina de Harris es una tinción regresiva, en la que se sobretiene la muestra, y después con los lavados se elimina el exceso de color. A continuación, se realizó la contratinción con eosina (Merck) durante 5 min, seguida de la deshidratación del tejido en pases por soluciones crecientes de alcohol (96°, 100°), y el paso final por xilol denominado aclarado, donde se eliminan los restos de alcohol absoluto. Las preparaciones se montaron con la resina sintética DePex (VWR), se dejaron secar y se observaron en el microscopio. Las fotos de las tinciones histoquímicas se realizaron en un microscopio Olympus BX61 (Olympus Biosystem) con la cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems) acoplada a este mismo. El conteo del número de mitosis se realizó en 10 campos de alta magnificación (400X) por cada condición experimental analizada, tal y como se describió en publicaciones previas (163).

13.3.3. Tinciones inmunohistoquímicas

Los cortes histológicos obtenidos de desparafinaron y rehidrataron según se describió previamente. A continuación, las muestras se sometieron a un pretratamiento térmico en una olla a presión (Retriever 2100) con tampón citrato pH 6 (Dako) o tampón Tris/EDTA pH 9 (Dako) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este proceso se llevó a cabo para desenmascarar el antígeno, y permitir el reconocimiento y el acceso para la unión antígeno-anticuerpo. Tras el pretratamiento térmico, las muestras se dejaron enfriar y se lavaron con agua destilada, y se les realizó un lavado con tampón de lavado (PBS/Tween-20 0.1%) durante 10 min, antes de tratarlas con un inhibidor de la acción de la peroxidasa endógena (Dako) durante 10 min. Posteriormente, se realizó un lavado con el tampón de lavado durante 10 min, y después las muestras se bloquearon con una solución de BSA/0.1% TX-100 durante 30 min para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Finalmente, las preparaciones se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos indicados. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados de 10 min con el tampón de lavado, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa (Dako) durante 30 min. Después de tres lavados de 5 min con tampón de lavado, se incubó con una dilución 1:50 del cromógeno diaminobencidina (DAB) (Dako), que actúa como sustrato de la peroxidasa (conjugada con el anticuerpo secundario), dando un producto de color marrón que pone de manifiesto la presencia de anticuerpo secundario unido, y por lo tanto la presencia de proteína en los cortes de tejido estudiados. La reacción enzimática de la DAB se frenó con agua destilada. Por último, para ubicar las reacciones anticuerpo-proteína dentro del contexto celular, se realizó una contratinción con hematoxilina de Gill III (Merck) durante 2 min. La hematoxilina de Gill III es una tinción progresiva, en la que se juega con el tiempo de incubación para definir la coloración final, para evitar que la tinción de los núcleos no interfiera con el marcaje de los marcadores analizados mediante la inmunohistoquímica. Las preparaciones se deshidrataron, y se montaron con resina DePex (VWR).

La cuantificación de las preparaciones se realizó con el programa informático ImageJ, analizando cinco fotos representativas de cada una de las preparaciones histológicas, donde se cuantificó el porcentaje de tejido que

presentaba señal positiva (marrón) en relación al área total del tejido estudiado. Los resultados se representaron como la media de cuantificaciones de los cinco campos analizados de cada una de las preparaciones analizadas (media \pm DS).

14. Cuantificación de micrometástasis en pulmón en un modelo de ratón *in vivo*

Para la detección de células tumorales en pulmón se extrajo el ADN del tejido pulmonar, fijado en formol y embebido en parafina, con el kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo un proceso de desparafinado, a partir de cinco cortes de 5-10 μ m de cada una de las muestras, utilizando aceite mineral (Sigma-Aldrich) que se calentó a 95°C durante 2 min, tras lo que se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 3 min, y se eliminó el sobrenadante compuesto con la mezcla de parafina-aceite mineral. A continuación, se comenzó la extracción de ADN, según las recomendaciones del fabricante (164), sometiendo a las muestras a un proceso de lisis añadiendo 180 μ l del tampón ATL, seguido de una centrifugación a 12 000 r.p.m. durante 3 min, que permitió eliminar la capa superior formada por la mezcla parafina-aceite mineral. Se añadieron 25 μ l de proteinasa K, y las muestras se incubaron a 450 r.p.m. a 56°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se añadieron 500 μ l del tampón de lisis AL, y el ADN se precipitó con 500 μ l de etanol (96-100%). Posteriormente, las muestras se cargaron en el dispositivo de columna-reservorio del kit, que presenta una membrana de sílica que permite la retención del ADN. Finalmente, se llevaron a cabo lavados con los tampones AW1 y AW2 que permiten eliminar posibles impurezas retenidas en la membrana de la columna. El ADN retenido en la membrana de sílica se eluyó con 150 μ l de agua estéril.

Una vez extraído el ADN, se realizó una cuantificación en el equipo *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific) para determinar su concentración, utilizando una λ de 260 nm. Al mismo tiempo, se evaluó la pureza de la extracción de ADN, así como el nivel de degradación de la muestra, que viene determinado por el ratio entre la absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm respectivamente, seleccionando aquellas muestras cuyos ratios fueron ≥ 1.7 para su posterior amplificación por qPCR.

Una vez obtenido el ADN, para determinar la presencia de células tumorales en el pulmón de los ratones del modelo animal, se analizaron los niveles de expresión de HA-Hakai, dado que Hakai ectópico se encuentra ligado a HA en las células Hakai-MDCK, y Apolipoproteína B de ratón se utilizó como control endógeno (165) (tabla 13). Los oligos fueron diseñados con la herramienta informática *Universal ProbeLibrary* (Roche), y fueron manufacturados por Sigma-Aldrich. El diseño fue optimizado para longitudes comprendidas entre los 18 y 22 nucleótidos y unas temperaturas de anillamiento de 59-60°C, con un contenido en guanina/citosina de aproximadamente 50%, y una longitud de amplicón no superior a 120 nucleótidos.

Tabla 13. Oligos utilizados para el análisis de los genes de interés.

Nombre	Especie	Oligo sentido (5'-3')	Oligo antisentido (5'-3')
HA-Hakai	Canina	tctgggacgtcgtatgggta	ttctcatcaccttgcggg
Apolipoproteína B	Murina	cgtgggctccagcattcta	tcaccagtcatttctgccttg

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes a estudio se realizó con el kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) en el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante (165). Los reactivos y volúmenes de la mezcla para cada reacción de qPCR, se detallan en la tabla 14.

Tabla 14. Reactivos y volúmenes de la mezcla de reacción para qPCR a partir de ADN.

Reactivo	Volumen por reacción
<i>Master Mix (2x)</i>	5 µl
Oligo sentido (5 µM)	0,7 µl
Oligo antisentido (5 µM)	0,7 µl
ADN	1 µl
H ₂ O-DEPC	hasta 10 µl

Las líneas celulares MDCK y Haki-MDCK se utilizaron como control negativo y positivo, respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron, y se calcularon los niveles relativos de expresión por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (159).

15. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó mediante un test *t-Student* no pareado y paramétrico para evaluar las diferencias entre las condiciones experimentales para los niveles de significancia indicados. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad PRISM versión 6 (*GraphPad Software*). Los análisis con $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

A. PAPEL DE LA VINFLUNINA SOBRE LAS UNIONES CELULARES EN CÉLULAS TUMORALES EPITELIALES DE VEJIGA

1. Efecto de la vinflunina sobre la viabilidad celular de células epiteliales humanas de cáncer de vejiga

La VFL es un fármaco que actúa como inhibidor de microtúbulos, y que se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de carcinoma avanzado o metastático de células transicionales del tracto urotelial resistente a un tratamiento de primera línea con derivados de platino. Dado que existen importantes evidencias científicas en las que se relaciona la red de microtúbulos con los contactos de adhesión célula-célula (68), se decidió investigar el posible impacto de la VFL sobre los contactos celulares en células tumorales epiteliales de vejiga. Para ello, primero se analizó su efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo MTT que permitió determinar el valor de IC50 definido como la concentración necesaria de fármaco para reducir el crecimiento de la población celular en un 50%. De esta forma, se establecieron las concentraciones de VFL que se tomaron en consideración para el tratamiento de las líneas celulares en los ensayos posteriores.

El efecto de la citotoxicidad de VFL se estudió en diferentes líneas celulares de cáncer de vejiga: HT1376, 5637, SW780, UMUC3 y T24, que se corresponden con diferentes estadios tumorales de cáncer de vejiga y presentan diferentes fenotipos celulares (Figura 18). Las células HT1376 provienen de un carcinoma grado III, 5637 es un carcinoma grado II, mientras que SW780, UMUC3 y T24 se obtuvieron a partir de un carcinoma en estadio muy temprano, que todavía no había invadido el músculo adyacente.

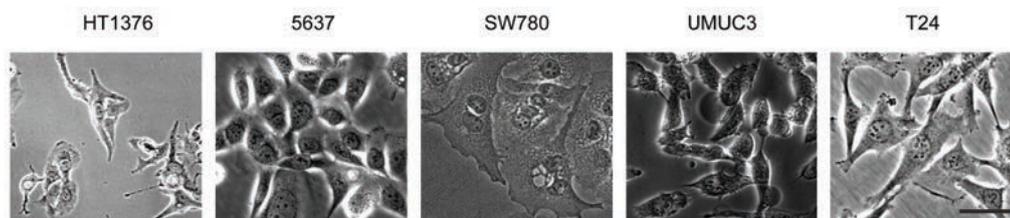


Figura 18. Fenotipo de las líneas celulares HT1376, 5637, SW780, UMUC3 y T24. Imágenes de contraste de fases de las líneas celulares indicadas. Aumento 200 X. Barra de escala 100 μm .

Dichas líneas celulares se trataron con concentraciones crecientes del fármaco en un rango de 0-100 μM durante 48 h. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de viabilidad celular para cada una de las concentraciones testadas, y su análisis permitió determinar una curva de inhibición dosis-dependiente del crecimiento celular en todas las líneas celulares estudiadas. El análisis de la representación gráfica de los datos de porcentaje de viabilidad celular frente a las concentraciones de fármaco testadas en escala logarítmica, permitió establecer el valor de IC₅₀ para cada línea celular (Figura 19). El valor de IC₅₀ para HT1376 fue de 4.677 μM (Figura 19A), para 5637 fue de 3.478 μM (Figura 19B), para SW780 fue de 1.734 μM (Figura 19C), para UMUC3 fue de 0.277 μM (Figura 19D), y para T24 fue de 0.068 μM (Figura 19E), siendo estas dos últimas líneas epiteliales las que presentan una mayor sensibilidad al fármaco.

Los valores de IC₅₀ variaron notablemente en función de la línea celular testada. Tal y como se observó, en las líneas correspondientes a estadios tempranos se necesitó una menor concentración de fármaco para reducir el crecimiento de la población celular en un 50%, mientras que en aquellas líneas que se corresponden con desarrollo tumoral en grado II y III presentaron un valor de IC₅₀ mucho mayor, ya que las células son más resistentes a bajas concentraciones del fármaco.

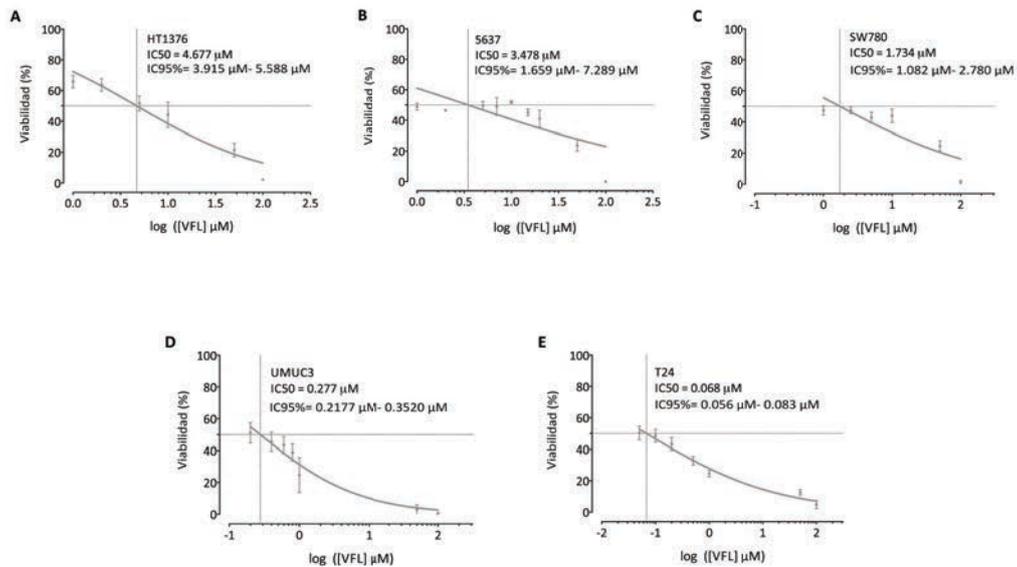


Figura 19. Efecto de la vinflunina sobre la viabilidad celular de líneas tumorales de vejiga. A, HT1376. B, 5637. C, SW780. D, UMUC3. E, T24. Las cinco líneas humanas epiteliales de cáncer de vejiga se trataron con concentraciones crecientes de VFL (0-100 μM) durante 48 h. Los datos representados se corresponden con la media±DS de tres experimentos independientes realizando en cada caso seis medidas. Se representó en el eje X las concentraciones de fármaco en escala logarítmica (log [VFL] μM), y en el eje Y el porcentaje de viabilidad celular (%). El valor de IC50 y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) se indicaron para cada una de las líneas celulares.

2. La vinflunina induce un fenotipo epitelial en las células tumorales de vejiga

Una vez determinados los valores de IC50 para cada una de las líneas celulares epiteliales de cáncer de vejiga, se analizó el efecto de la VFL sobre el fenotipo celular. Para ello, las líneas celulares se trataron durante 48 h con tres concentraciones diferentes de VFL, elegidas considerando cada valor de IC50. Se analizó el efecto de la VFL sobre el fenotipo en las líneas celulares HT1376, 5637 y UMUC3, estando así representados diferentes estadios de progresión tumoral. Las células HT1376, con un valor IC50 más elevado, se trataron con concentraciones de 2, 10 y 20 μM, mientras que las líneas celulares 5637 y UMUC3 se trataron con dosis más bajas de 1, 2 y 10 μM.

El análisis de las imágenes de microscopía de contraste de fases permitió observar que todas las líneas celulares presentan, en la condición control (sin

tratamiento con el fármaco), un fenotipo mesenquimal con débiles contactos célula-célula, y presencia de protrusiones de la membrana celular (Figura 20).

Tras el tratamiento con VFL durante 48 h, las líneas celulares HT1376 y 5637 sufrieron un importante cambio fenotípico caracterizado por una morfología más epitelial y unos contactos célula-célula más estrechos (Figura 20), comparado con la condición control. Sin embargo, no se observó ningún cambio fenotípico en la línea celular UMUC3 tras el tratamiento con VFL, pero sí una elevada muerte celular incluso a bajas concentraciones de fármaco (Figura 20). Estos resultados indican que la VFL ejerce un efecto sobre el fenotipo fibroblástico en las líneas celulares HT1376 y 5637 pero no en la línea UMUC3.

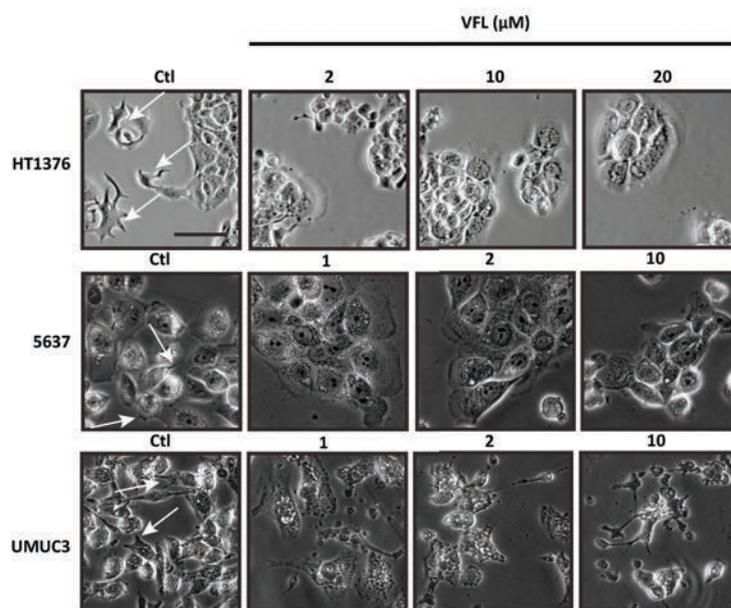


Figura 20. Efecto de la vinflunina sobre el fenotipo celular de las líneas celulares HT1376, 5637 y UMUC3. Imágenes de contraste de fases de las líneas celulares tras 48 h de tratamiento con el fármaco a concentraciones crecientes comparadas con la condición control. Las flechas muestran la presencia de protrusiones. Aumento 200 X. Barra de escala 100 μm .

3. Efecto de la vinflunina sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima

Dado el importante efecto de la VFL observado sobre los contactos celulares, se decidió examinar si estos cambios iban acompañados por la regulación de

marcadores de TEM como son E-cadherina, N-cadherina y Vimentina en las líneas tumorales de vejiga HT1376, SW780, UMUC3, T24 y 5637. La línea celular HT1376 expresa el marcador epitelial E-cadherina, y sin embargo no expresa los marcadores mesenquimales N-cadherina y Vimentina (Figura 21A). Las líneas SW780 y 5637 expresan bajos niveles del marcador epitelial E-cadherina, y altos niveles del marcador mesenquimal N-cadherina (Figura 21A). Las líneas celulares UMUC3 y T24 no expresan el marcador epitelial E-cadherina, pero sí expresan marcadores mesenquimales (Figura 21A). De modo interesante, en las líneas celulares que expresan E-cadherina (HT1376 y 5637) (Figura 21A), se observó un cambio a fenotipo epitelial más importante en presencia de VFL (Figura 20), mientras que las líneas UMUC3 y T24, que no expresan E-cadherina (Figura 21A), son más sensibles (Figura 19D y 19E), y no sufren cambio fenotípico con el tratamiento (Figura 20). Estos resultados sugieren que las líneas epiteliales tumorales de vejiga que expresan E-cadherina son más resistentes a la VFL, y responden mejor a los cambios de fenotipo mesenquimal a epitelial inducidos por el fármaco.

La VFL presenta propiedades antimetastásicas *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado, mediante ensayos de invasión *in vitro* que la VFL ejerce un efecto inhibitorio de la capacidad de invasión en células transicionales de carcinoma de vejiga. Además, se ha observado un potente efecto antitumoral de la VFL en modelos murinos artópicos utilizando células transicionales de carcinoma de vejiga (166). Dado que durante la progresión de carcinomas, la TEM tiene lugar en estadios tempranos del proceso de invasión y metástasis, se estudió si la VFL era capaz de regular la expresión de marcadores de TEM. Uno de los cambios clave en el proceso de TEM es el intercambio de cadherinas, donde la expresión normal del marcador epitelial E-cadherina es reemplazada por la expresión anormal del marcador mesenquimal N-cadherina (167, 168). Al analizar el efecto de la VFL sobre la expresión proteica de los marcadores de TEM en diferentes líneas celulares, se observó que en la línea celular HT1376, que únicamente expresa E-cadherina y no marcadores mesenquimales como N-cadherina o Vimentina, se incrementaron los niveles de expresión de E-cadherina (Figura 21B). Este incremento iba acompañado de una reducción de los niveles de la proteína E3 ubiquitina-ligasa Hakai (Figura 21B). Dado que previamente se demostró que Hakai induce la ubiquitinización y posterior degradación de E-cadherina, estos resultados sugieren que la desaparición de la proteína Hakai podría influir sobre la recuperación de los niveles de expresión de E-cadherina.

Por otro lado, el tratamiento con VFL durante 48 y 72 h de la línea celular 5637, a una concentración de 5 μ M indujo una ligera recuperación de los niveles de expresión de E-cadherina, acompañada de una reducción drástica de Hakai y N-cadherina (Figura 21C). Dado que Hakai, además de estar implicada en la modulación de los contactos celulares, ejerce un control sobre la proliferación celular, se decidió extender el análisis del efecto de la VFL sobre los niveles de Ciclina D1, miembro de la familia de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, y descrita como una proteína efectora a través de la que Hakai modula la proliferación celular (109). Los niveles proteicos de ciclina D1 disminuyen tras el tratamiento con VFL a 48 y 72 h (Figura 21D). Finalmente, el tratamiento con VFL de la línea celular UMUC3, que no expresa E-cadherina pero sí N-cadherina y Vimentina, mostró una disminución de los niveles de expresión de Hakai, N-cadherina y Vimentina a dos concentraciones de VFL diferentes (Figura 21E). En conclusión, todos estos resultados sugieren que la VFL induce diferenciación celular epitelial en las líneas celulares tumorales epiteliales de vejiga analizadas.

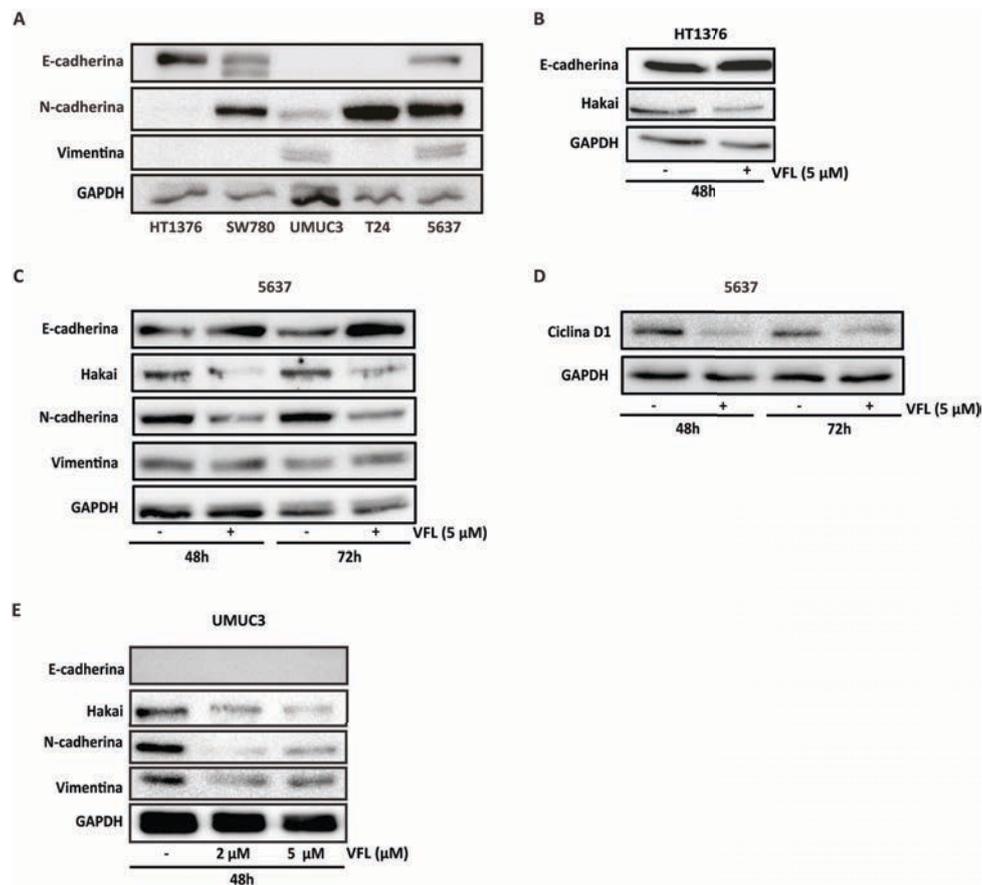


Figura 21. Efecto de la vinflunina sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima. **A**, Niveles de expresión endógenos de los marcadores de transición epitelio-mesénquima indicados en las líneas celulares epiteliales de cáncer de vejiga HT1376, SW780, UMUC3, T24 y 5637. **B**, Efecto del tratamiento con 5 μ M de VFL durante 48 h sobre la expresión de E-cadherina y Hakai en la línea celular HT1376. **C**, Efecto del tratamiento con 5 μ M de VFL durante 48 y 72 h sobre la expresión de marcadores indicados en la línea celular 5637. **D**, Efecto del tratamiento con 5 μ M de VFL durante 48 y 72 h sobre la expresión de Ciclina D1 en la línea celular 5637. **E**, Efecto del tratamiento con 2 μ M y 5 μ M de VFL sobre la expresión de los marcadores indicados tras 48 h de tratamiento en la línea celular UMUC3. Todos los experimentos fueron analizados mediante western-blot, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. GAPDH se utilizó como control de carga.

4. Efecto de la vinflunina sobre las uniones célula-célula mediante microscopía electrónica de transmisión

A continuación, se decidió analizar mediante microscopía electrónica de transmisión el efecto de la VFL sobre las uniones célula-célula. Para ello, se empleó la línea celular 5637, que respondía a un cambio fenotípico inducido por VFL, y se

trató con una concentración de VFL de 5 μM durante 48 h. Como se observa en la imagen de microscopía electrónica, en presencia de VFL se reducen los espacios intercelulares amplios y laxos presentes en la condición control, observándose unas uniones célula-célula más estrechas (Figura 22). Estos resultados sugieren que la VFL podría fortalecer las uniones célula-célula a través del incremento de la expresión de E-cadherina.

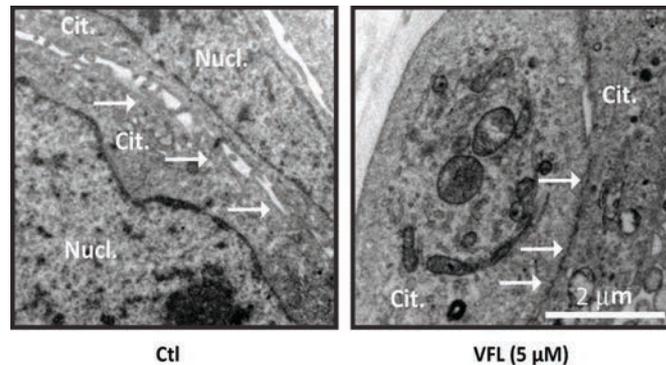


Figura 22. Análisis del efecto de la vinflunina sobre los contactos célula-célula mediante microscopía electrónica de transmisión. La línea celular 5637 tratada con 5 μM de VFL durante 48 h (panel derecho) en comparación con las células sin tratar (panel izquierdo) se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Nucl: núcleo celular, Cit: citoplasma. Ctl: control (sin tratamiento con el fármaco). Los puntos de contacto célula-célula se indicaron con flechas. Barra de escala, 2 μm .

5. Efecto de la vinflunina sobre la diferenciación epitelial y la apoptosis

En base a los resultados previos obtenidos sobre el efecto de la VFL en la expresión del marcador epitelial E-cadherina, se decidió determinar si el incremento de dichos niveles de expresión se detectaba en los contactos célula-célula. Para llevar a cabo este análisis, se empleó la línea celular HT1376, en la que mediante western-blot se observó un ligero incremento de la expresión proteica de E-cadherina tras el tratamiento con la VFL, en comparación con la condición control (Figura 21B). Además, dado que se ha descrito que la VFL ejerce un efecto sobre la apoptosis celular (169), se decidió determinar si el incremento de la proteína E-cadherina tenía lugar en contactos celulares, y si dicho incremento se observaba o no en aquellas células en las que la VFL causaba muerte celular.

Para ello, se llevó a cabo el análisis de la apoptosis mediante un ensayo TUNEL con el fin de observar *in situ* las células apoptóticas, y se combinó con la inmunofluorescencia de E-cadherina, permitiendo analizar paralelamente el efecto de la VFL sobre la diferenciación epitelial y la apoptosis, en la línea tumoral de vejiga HT1376. El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia realizadas tras el tratamiento durante 48 h de la línea celular HT1376 a una concentración de 5 μ M de VFL permitió observar un incremento de la expresión del marcador epitelial E-cadherina en los contactos célula-célula en comparación con las células en la condición control (Figura 23A). Además, al realizar el ensayo TUNEL se detectaron células apoptóticas tras la administración del fármaco, en contraposición a la condición control donde no se detectó apoptosis. La tinción de las células apoptóticas junto con la inmunofluorescencia de E-cadherina y la tinción nuclear con DAPI permitió determinar que el incremento de los niveles de E-cadherina en los contactos celulares tuvo lugar en células viables, mientras que se observó una reducción de dichos niveles en las células apoptóticas (Figura 23B), sugiriendo que la VFL induce muerte celular programada y diferenciación epitelial en células epiteliales tumorales de cáncer de vejiga que expresan E-cadherina.

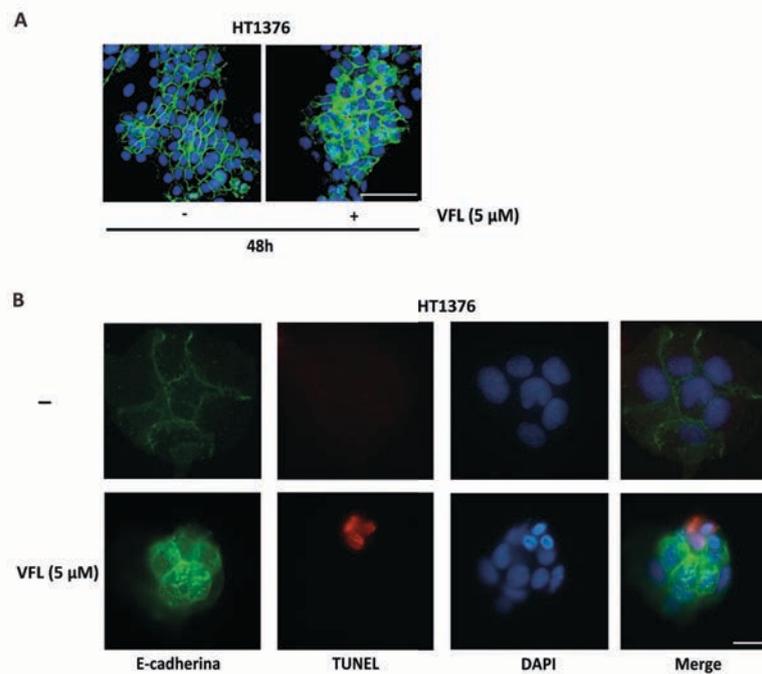


Figura 23. Efecto de la vinflunina sobre diferenciación epitelial y la apoptosis. **A**, Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de E-cadherina en la línea celular HT1376 tratada con 5 μ M de VFL durante 48 h. Barra de escala, 200 μ m. **B**, Ensayo TUNEL para analizar apoptosis (rojo) se realizó tras la inmunofluorescencia con E-cadherina (verde) en las células tratadas durante 48 h con 5 μ M de VFL. Tinción nuclear con DAPI (azul). Barra de escala, 50 μ m.

6. La vinflunina promueve la degradación de Hakai mediada por proteasoma

Los resultados descritos anteriormente reflejaron que el tratamiento de las líneas celulares HT1376, 5637 y UMUC3 con VFL durante 48 h reduce los niveles de expresión proteica de Hakai. Para determinar si la VFL afecta a los niveles de ARNm de Hakai, se analizaron sus niveles de expresión génica llevando a cabo una transcripción reversa seguida de una PCR cuantitativa a tiempo real.

Para ello, las líneas celulares HT1376, 5637 y UMUC3 se trataron con una concentración de 5 μ M de VFL durante 48 h. El análisis de los niveles de expresión relativa del ARNm de Hakai de las células tratadas con VFL permitió determinar que los niveles de ARNm no disminuyeron por acción del fármaco en las células 5637, HT1376 y UMUC3 con respecto a la condición control (Figura 25). Estos datos

indican que la VFL disminuye los niveles de proteína Hakai sin disminuir sus niveles de ARNm (Figura 21B-E y 24).

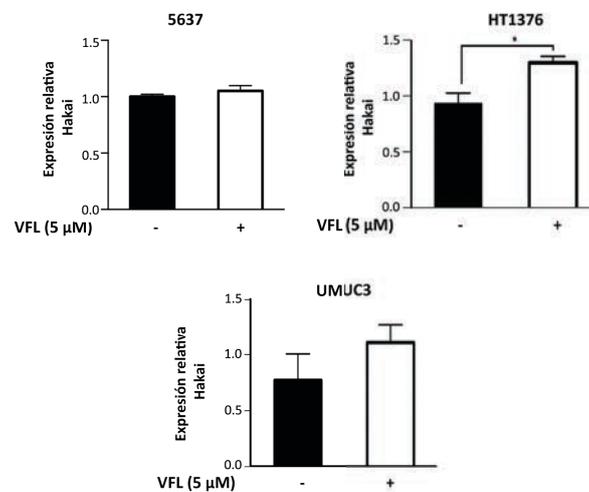


Figura 24. Efecto de la vinflunina sobre los niveles de expresión de ARNm de Hakai. Los niveles de ARNm de Hakai en las líneas celulares 5637 (panel superior izquierdo), HT1376 (panel superior derecho) y UMUC3 (panel inferior) se analizaron tras el tratamiento con VFL a 5 µM durante 48 h mediante qPCR. Los niveles de ARNm de HPRT se emplearon para normalizar la expresión relativa de Hakai. Los datos representados se corresponden con la media±DS de tres experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

Estudios previos demuestran que la mayoría de las proteínas intracelulares se degradan principalmente vía ubiquitín-proteasoma (170). Sin embargo, las proteínas extracelulares y algunas proteínas de superficie celular se internalizan por endocitosis y son degradadas vía lisosoma. Dado que Hakai es una proteína intracelular, y sus niveles de ARNm no varían por acción de la VFL pero sí se modula su expresión proteica, se estudió si la disminución de sus niveles de expresión proteica tras la administración de VFL podría ser debida a un incremento de la degradación vía proteasoma de dicha proteína. Para ello, se empleó la línea celular 5637 que se trató con una concentración de 5 µM de VFL durante 48 h, y durante 2 h con 20 µM de MG132, un inhibidor de proteasoma. Se observó una reducción de los niveles proteicos de Hakai por acción de la VFL, que se recuperaron con la administración de MG132 (Figura 25). Además, con esta recuperación de los niveles de Hakai, se produjo una disminución de los niveles de E-cadherina (Figura 25). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles

de expresión proteica de Hakai mediado por VFL puede estar controlado, al menos en parte, por un mecanismo dependiente de proteasoma.

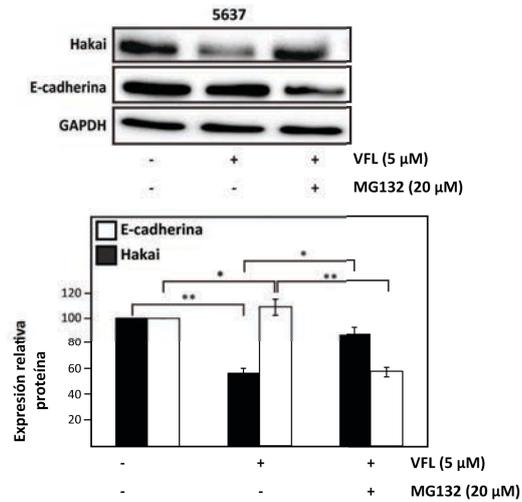


Figura 25. La vinflunina induce la degradación de Hakai vía proteasoma en la línea celular 5637. Efecto del inhibidor de proteasoma, MG132, sobre los niveles de expresión a nivel de proteína de E-cadherina y Hakai tras el tratamiento con 5 μ M de VFL durante 48 h. Tras el tratamiento con VFL, las células se incubaron en presencia o ausencia del inhibidor de proteasoma (MG132) a 20 μ M durante 2 h, y los lisados celulares se analizaron mediante western-blot (panel superior). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los datos representados para la densitometría se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos independientes (panel inferior) (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01).

B. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA E3 UBIQUITINA-LIGASA HAKAI *IN VITRO* E *IN VIVO*

En el año 2002 se descubrió el primer regulador post-traducciona de la proteína E-cadherina, que se denominó Hakai por su significado de “destrucción” en japonés, ya que Hakai es una E3 ubiquitina-ligasa que media la ubiquitinización y su posterior degradación vía lisosoma de la proteína E-cadherina fosforilada en los residuos de tirosina tras la activación de la proteína quinasa Src (91, 117). La E-cadherina es el prototipo mejor caracterizado de las uniones adherentes que mantienen a las células epiteliales adheridas entre sí mediante uniones célula-célula, lo que en consecuencia influye en el mantenimiento de la polaridad apico-basal y la estratificación por capas, características propias del tejido epitelial (67). Además, se ha demostrado que la degradación y desaparición de E-cadherina en los contactos célula-célula está asociada a la transición de adenoma a carcinoma, y es marcador de TEM, lo que implica que las células adquieren una morfología fibroblastoide, sufren una reorganización del citoesqueleto perdiendo su polaridad apico-basal, expresan marcadores mesenquimales en detrimento de marcadores epiteliales, y adquieren capacidad de migración e invasión (81). Por otro lado, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que la sobreexpresión de Hakai no solo induce un fenotipo mesenquimal en células epiteliales, si no que también induce la proliferación celular e incrementa el potencial oncogénico y la capacidad invasiva en células epiteliales no transformadas (109, 111). Además, en adenocarcinomas gástrico y de colon se observó un incremento de los niveles de expresión de Hakai con respecto al tejido sano adyacente (109, 147). Basándose en las funciones descritas para Hakai, y su importante papel durante la progresión tumoral, se empezó a proponer como una potencial diana terapéutica contra el cáncer. Con todos estos antecedentes, en primer lugar, se decidió profundizar en el papel de Hakai sobre la progresión tumoral *in vitro*, y analizar el efecto *in vivo* empleando como modelo animal ratones atímicos desnudos (*Nu/Nu*).

1. Efecto de la sobreexpresión de Hakai en células MDCK *in vitro*

Previamente, se demostró el efecto de la sobreexpresión de la proteína Hakai en la línea epitelial MDCK sobre la reducción de los niveles de expresión de su sustrato específico E-cadherina y su implicación en la pérdida de contactos célula-célula y de

la polaridad apico-basal de la célula (109), que se traduce en un cambio de fenotipo epitelial en MDCK a mesenquimal en las células que sobreexpresan Hakai (Figura 26). Recientemente, la Cortactina se ha identificado como un nuevo sustrato de la acción de la proteína E3 ubiquitina-ligasa Hakai. Dicha proteína regula la formación de microtúbulos de actina del citoesqueleto celular (171), y es un sustrato de la tirosina quinasa Src (172). Tras la fosforilación por Src, la E3 ubiquitina-ligasa Hakai interacciona con la Cortactina fosforilada, y media su ubiquitinización y degradación (115).

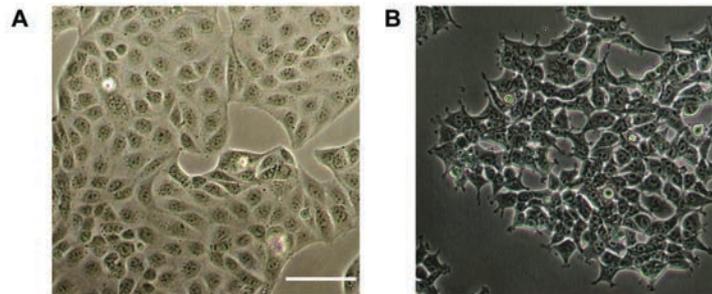


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre el fenotipo celular. Imágenes de contraste de fases. **A**, MDCK. **B**, Hakai-MDCK clon 4. Aumento 200X. Barra de escala, 100 μ m.

Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una caracterización de la expresión proteica de los sustratos de Hakai, y marcadores de TEM en el modelo celular MDCK establecido de sobreexpresión de Hakai, denominado en este trabajo Hakai-MDCK. Mediante western-blot confirmamos que, tal y como se esperaba, Hakai se encuentra incrementado en células que sobreexpresan Hakai respecto a la línea control MDCK, confirmado mediante el empleo de los anticuerpos de Hakai y HA (epítipo unido a la proteína sobreexpresada), y esto iba acompañado de una disminución de E-cadherina y Cortactina (Figura 27A), y un incremento de N-cadherina (Figura 27C), lo que sugiere que, tal y como se ha demostrado previamente, Hakai puede estar actuando como una E3 ubiquitina-ligasa sobre E-cadherina y Cortactina, induciendo la degradación de dichos sustratos.

En base a estos resultados, se decidió llevar a cabo mediante inmunofluorescencia una caracterización de la expresión y la localización subcelular del marcador E-cadherina a nivel basal en dichas líneas celulares. Se observó la

localización de E-cadherina en los contactos célula-célula de la línea celular MDCK, ya que no se observa marcaje para E-cadherina en aquellas células que se encuentran en los márgenes de la colonia, donde no hay presencia de células adyacentes (Figura 27B). En la línea celular Hakai-MDCK clon 4 se observa una desaparición total del marcaje de E-cadherina con respecto a MDCK (Figura 27B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Hakai induce la degradación de E-cadherina y su desaparición de contactos celulares.

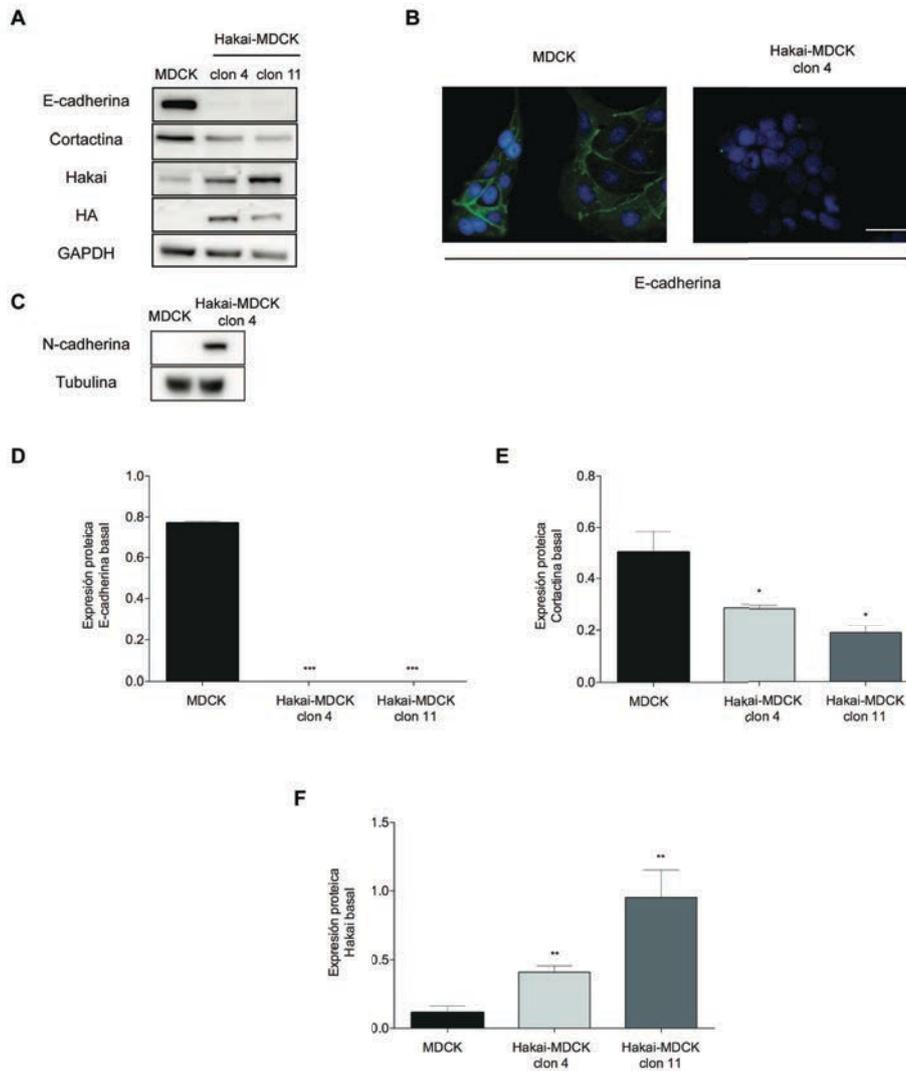


Figura 27. Caracterización proteica de marcadores en las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK. **A**, Imágenes de western-blot para los marcadores E-cadherina, Cortactina, Hakai y HA en células MDCK y en dos clones de MDCK que sobreexpresan Hakai (clon 4 y clon 11). **B**, Expresión y localización de E-cadherina mediante inmunofluorescencia. Aumento 200X. Barra de escala, 100 μ m. **C**, Imágenes de western-blot para el marcador N-cadherina en células MDCK y Hakai-MDCK clon 4. **D**, Cuantificación relativa de la expresión proteica de

E-cadherina. **E**, Cuantificación relativa de la expresión proteica de Cortactina. **F**, Cuantificación relativa de la expresión proteica de Hakai. Los datos representados para la densitometría se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos independientes (* $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$). Se utilizó GAPDH como control de carga.

Debido a que en la línea celular Hakai-MDCK clon 4 se observó una desaparición total de E-cadherina presente en los contactos celulares (Figura 27B), se quiso analizar si existía una localización citoplasmática de la misma. Para corroborar que el marcaje citoplasmático era específico para E-cadherina y no se correspondía con punteado inespecífico, se realizó una prueba en la que no se permeabilizó la membrana celular con el detergente Triton X-100, de tal forma que el anticuerpo no alcanzó la región intracelular y no se observó ningún tipo de marcaje (Figura 28, panel izquierdo), en comparación con la muestra en la que sí se permeabilizó la membrana celular con detergente (Figura 28, panel derecho). Por lo tanto, el análisis de las imágenes de inmunofluorescencia para E-cadherina permitió observar un punteado citoplasmático específico que se corresponde con la distribución citoplasmática de E-cadherina tras la endocitosis de la misma de la membrana celular en la condición control.

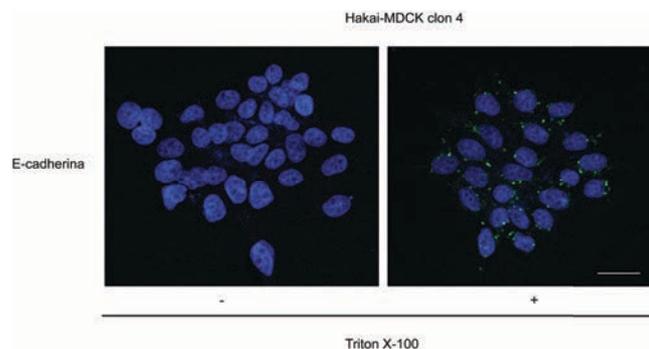


Figura 28. Especificidad de marcaje citoplasmático para E-cadherina mediante inmunofluorescencia. Condiciones de no permeabilización (panel izquierdo), frente a la permeabilización con Triton X-100 (panel derecho). Aumento 400X. Barra de escala, 50 μ m.

Anteriormente, se había descrito que la sobreexpresión de la proteína Hakai incrementa la proliferación celular en la línea celular NIH3T3 que no expresa E-cadherina endógena, sugiriendo que la regulación de la proliferación celular mediada por Hakai es independiente de E-cadherina. La relación directa entre los niveles de expresión de Hakai y Ciclina D1 en comparación con otras proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, sugirieron a la Ciclina D1 como una proteína efectora a

través de la que Hakai modula la proliferación celular. También se describió que el mutante de Hakai en este dominio reducía fuertemente la proliferación celular, sugiriendo que la actividad E3 ubiquitina-ligasa de Hakai juega un papel importante en la proliferación celular (109). Por ello, se corroboró mediante citometría de flujo que la sobreexpresión de la proteína Hakai incrementa la proliferación celular de forma estadísticamente significativa respecto a la línea MDCK control (Figura 29). Estos resultados indican que la sobreexpresión de la proteína Hakai incrementa la proliferación celular.

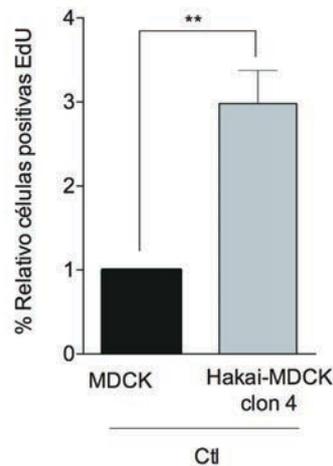


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de la proteína Hakai sobre la proliferación celular. El porcentaje de células positivas para el marcaje de EdU en Hakai-MDCK clon 4 se relativizaron a la condición control de MDCK. Los datos representados se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos diferentes (** $p \leq 0.01$).

La evasión de apoptosis es un rasgo característico de las células tumorales que les permite dividirse continuamente y seguir proliferando. El mecanismo de acción de algunos de los tratamientos quimioterápicos que se utilizan actualmente en clínica consiste en inducir apoptosis celular desencadenando señales de inducción de muerte celular, causando daño en el ADN o creando situaciones de estrés celular (6). Por esta razón, se decidió analizar el efecto la sobreexpresión de Hakai sobre la apoptosis celular en las líneas celulares objeto de estudio. El análisis de los porcentajes de apoptosis temprana y tardía (apoptosis total) de la población celular de cada una de las muestras, mostró que el la sobreexpresión de Hakai no ejerció ningún efecto sobre la apoptosis celular en las condiciones estudiadas (Figura 30).

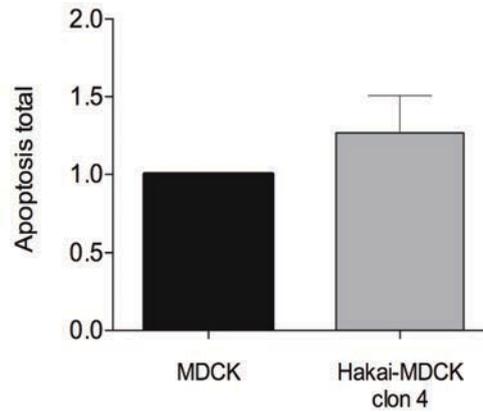


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre la apoptosis celular de las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4. Se representó la suma de la apoptosis temprana y la apoptosis tardía. Los datos representados se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos independientes.

Tal y como se ha comentado, algunas de las células presentes en el tumor primario son capaces de desprenderse del mismo, invadir el tejido adyacente y viajar por el torrente sanguíneo hasta sitios distantes donde son capaces de colonizar y formar tumores secundarios metastásicos. Dado que las metástasis son las responsables de alrededor del 90% de muertes por cáncer, este campo de investigación se ha incrementado y consolidado en los últimos años (16). Por ello, se decidió analizar si la sobreexpresión de Hakai era capaz de proporcionar la capacidad de invasión a las células MDCK no transformadas. El análisis de invasividad permitió demostrar que las células Hakai-MDCK clon 4 son capaces de invadir la matriz extracelular de una forma estadísticamente significativa, en comparación con la línea celular MDCK (Figura 31). Estos resultados indican que la sobreexpresión de Hakai es capaz de inducir la capacidad invasiva en las células MDCK.

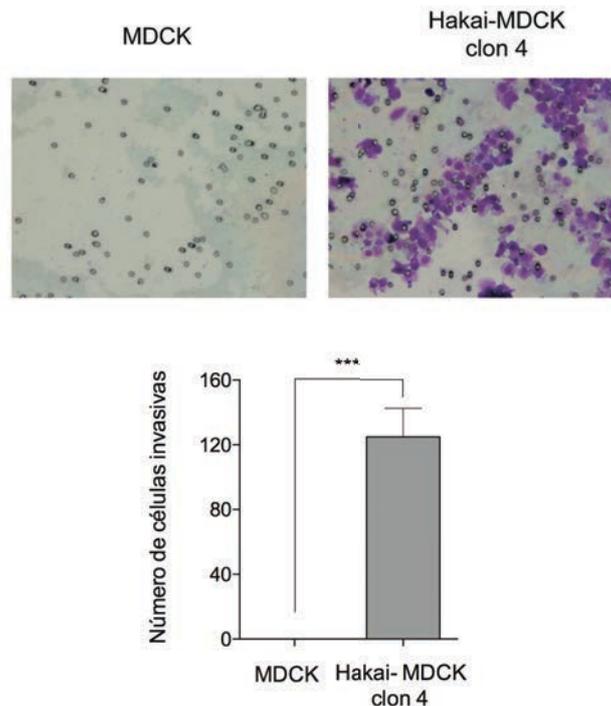


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de Hakai en la línea celular MDCK sobre la invasión celular. Las células que sobreexpresan Hakai (Hakai-MDCK clon 4) son capaces de invadir, mientras que las células MDCK no son invasivas. Aumento 200 X. Barra de escala, 100 μm (panel superior). Los datos representados se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado (panel inferior) (***) $p \leq 0.001$.

Las líneas celulares epiteliales necesitan adhesión a sustrato para poder crecer, mientras que el crecimiento de las células tumorales es independiente de adhesión a sustrato. El mejor modelo *in vitro* para evaluar el potencial oncogénico es mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando, que se realiza en un sustrato semi-líquido en el que sólo pueden crecer las células tumorales, capaces de crecer independientemente del anclaje al sustrato (109, 111). Para evaluar la posible acción de Hakai sobre el potencial oncogénico se llevó a cabo el conteo de las colonias que crecieron sobre el sustrato de agar blando. Tal y como se demostró previamente (109), las células Hakai-MDCK fueron capaces de crecer y formar colonias, mientras que la línea epitelial MDCK (no transformada) no fue capaz de crecer y formar colonias sobre un sustrato blando de agar (Figura 32). Estos resultados corroboran que Hakai es un potencial oncogén.

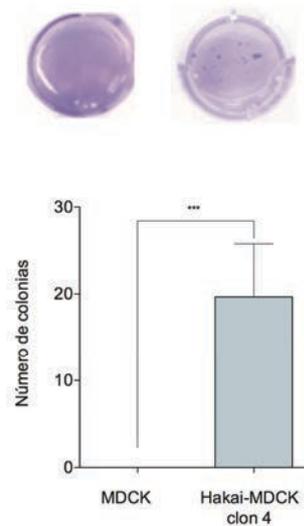


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de Hakai en la línea celular MDCK sobre la formación de colonias en agar blando. La línea celular Hakai-MDCK clon 4 es capaz de formar colonias sobre un sustrato de agar blanco, con respecto a las células MDCK que no es capaz de crecer (panel superior). Los datos representados se corresponden con la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado (panel inferior) (** $p \leq 0.001$).

2. Hakai induce la formación de tumores *in vivo*

Para evaluar el posible efecto de Hakai sobre la capacidad de formación de tumores *in vivo*, se emplearon las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4, previamente descritas, que se inyectaron de forma subcutánea en el flanco de ratones atímicos desnudos (*Nu/Nu*). Primero se llevó a cabo un análisis piloto para establecer las condiciones de número de células inoculadas, para lo que los ratones atímicos desnudos fueron inoculados subcutáneamente en el flanco con dos concentraciones diferentes de la línea celular Hakai-MDCK clon 4: 1×10^6 y 5×10^6 células. De este modo, se estudió el tiempo que tardaron en aparecer los tumores, así como el crecimiento de los mismos. La línea celular MDCK no es capaz de formar tumores *in vivo*, mientras que la inyección subcutánea de las células Hakai-MDCK clon 4 forma tumores en ratones inmunodeprimidos (Figura 33A). Con la inoculación de 5×10^6 células de Hakai-MDCK clon 4 se evidenció la formación de tumores macroscópicamente alrededor de los 19 d, y su tamaño fue incrementado progresivamente a lo largo del tiempo, siendo la diferencia de volumen estadísticamente significativa con respecto a las células MDCK. Sin embargo, la formación de tumores observables macroscópicamente tras la inoculación de 1×10^6

células de Hakai-MDCK clon 4 tardó más tiempo, alrededor de 22 d, y su tamaño no experimentó grandes cambios a lo largo del tiempo analizado en el experimento (Figura 33B). Estos resultados indican que la sobreexpresión de la proteína Hakai es capaz de inducir la formación de tumores *in vivo*, actuando como oncogén.

El análisis de la supervivencia mediante el estimador de Kaplan-Meier, expresado como porcentaje de animales libres de tumor con respecto al tiempo, determinó que el 100% de los ratones inmunodeprimidos inoculados con la línea celular MDCK estuvieron libres de tumor durante los 40 d de duración del experimento. Los ratones inoculados con 1×10^6 células Hakai-MDCK clon 4 tardaron aproximadamente 22 d en formar tumores en comparación con los inoculados con 5×10^6 de Hakai-MDCK clon 4 que tardaron unos 19 d. A los 40 d todos los ratones inoculados con células Hakai-MDCK habían formado tumores (Figura 33C).

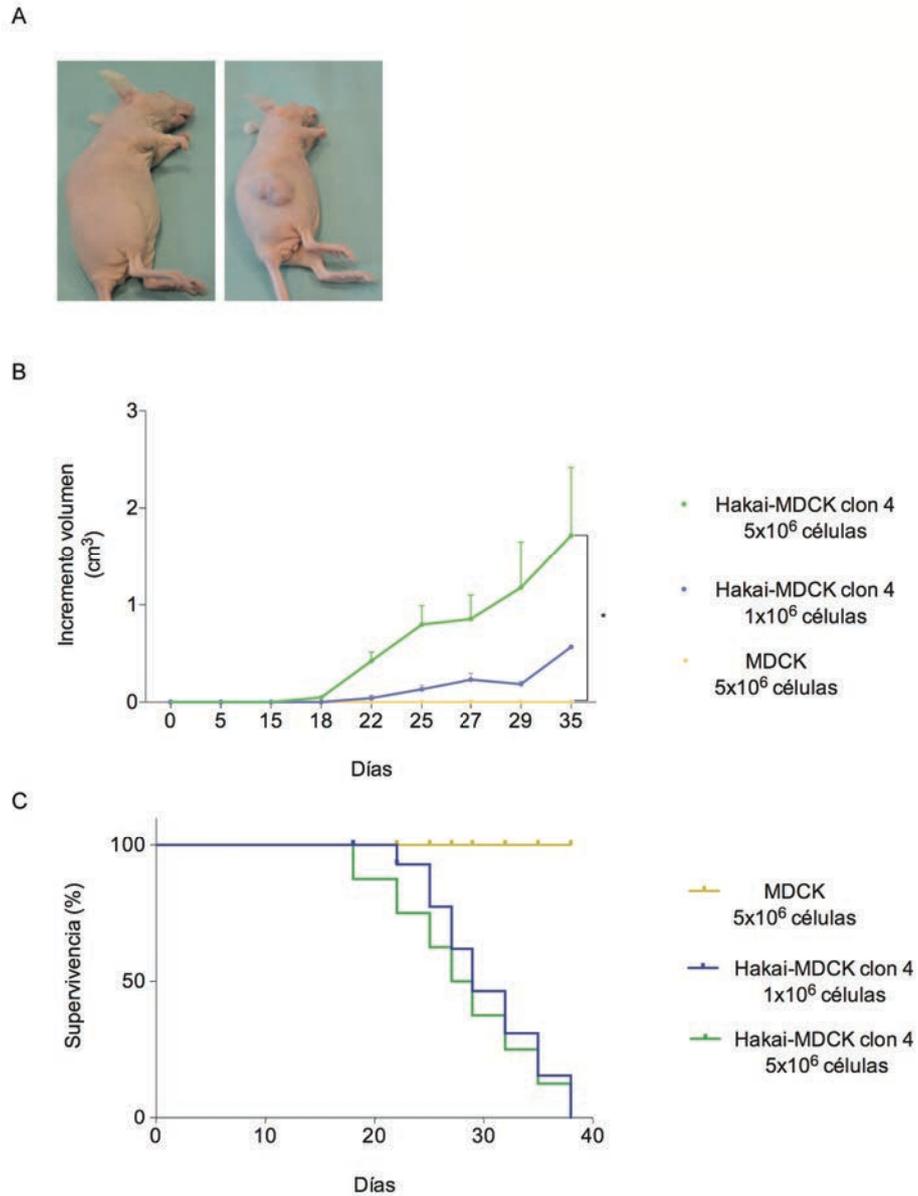


Figura 33. Formación de tumores en ratones atímicos desnudos (*Nu/Nu*). A, Capacidad tumorigénica *in vivo* de las células Hakai-MDCK clon 4 (panel derecho), en comparación con la línea celular epitelial no transformada MDCK (panel izquierdo). **B,** Incremento del volumen del tumor (cm³) con respecto al tiempo (días) tras una inoculación con 5x10⁶ células de la línea celular MDCK, y 5x10⁶ y 1x10⁶ células para Hakai-MDCK clon 4. Los datos representados se corresponden con la media±EE (*p≤0.05). **C,** Curva Kaplan-Meier para la supervivencia (%) con respecto al tiempo (días) de los ratones inmunodeprimidos inoculados con 5x10⁶ células de la línea MDCK, y 1x10⁶ y 5x10⁶ células para Hakai-MDCK clon 4.

3. Hakai incrementa la proliferación, la invasión y modula marcadores de transición epitelio-mesénquima *in vivo*

Una vez analizada la formación de tumores *in vivo*, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores, además de diferentes órganos como el hígado, el pulmón y el riñón, que se sometieron a un análisis microscópico de la estructura de los tejidos mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Como se puede observar mediante H&E, los tumores originados por las células Hakai-MDCK clon 4 (para la densidad celular de 5×10^6) presentan un fenotipo muy desdiferenciado, caracterizado por la disminución del tamaño del citoplasma como consecuencia del incremento del tamaño del núcleo, y una elevada desorganización celular adyacente a la capa muscular subcutánea, así como una morfología fusiforme (Figura 34). Al analizar los ratones inoculados con las células MDCK no transformadas, se pudo observar, en algunos ratones inoculados con 5×10^6 células, la formación de un teratoma monodérmico renal adyacente a la piel, observándose túbulos renales que recuerdan a la estructura de un riñón, adyacente a la piel en los ratones inoculados con la línea celular MDCK no transformada (Figura 34). Además, al analizar los tumores originados por las células Hakai-MDCK clon 4 se observó la extravasación de las células desde el tumor primario hacia vasos sanguíneos que están totalmente infiltrados de células tumorales (Figura 35A), así como infiltración tumoral del músculo (Figura 35B), y metástasis local (Figura 35C). Por otro lado, el análisis macroscópico mediante H&E permitió observar una estructura y morfología celular y del tejido totalmente normal, sin ningún tipo de alteraciones ni lesiones metastásicas, en los pulmones (Figura 36A), el hígado (Figura 36B) y los riñones (Figura 36C) de los ratones inoculados tanto con células MDCK como Hakai-MDCK clon 4. Estos resultados indican una elevada agresividad de los tumores generados por la inyección de las células Hakai-MDCK clon 4, y su capacidad de migración e invasión.

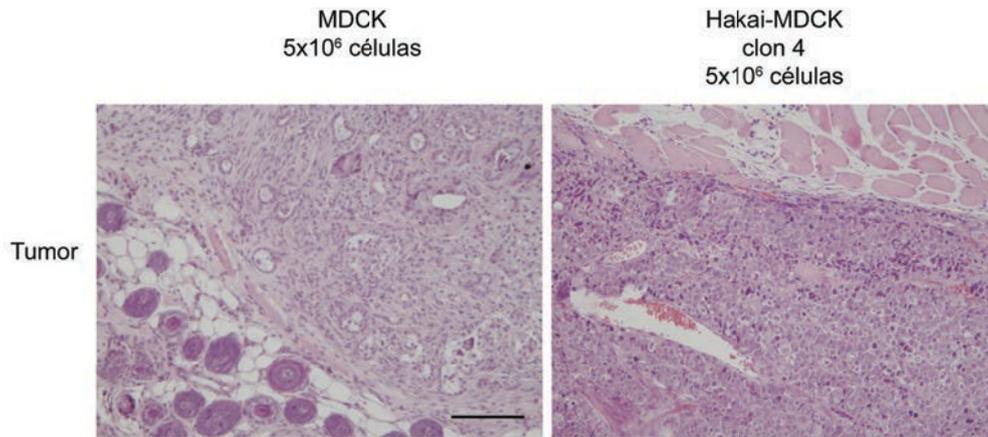


Figura 34. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina de los tumores extraídos de ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4. Aumento 100X. Barra de escala, 500 μ m.

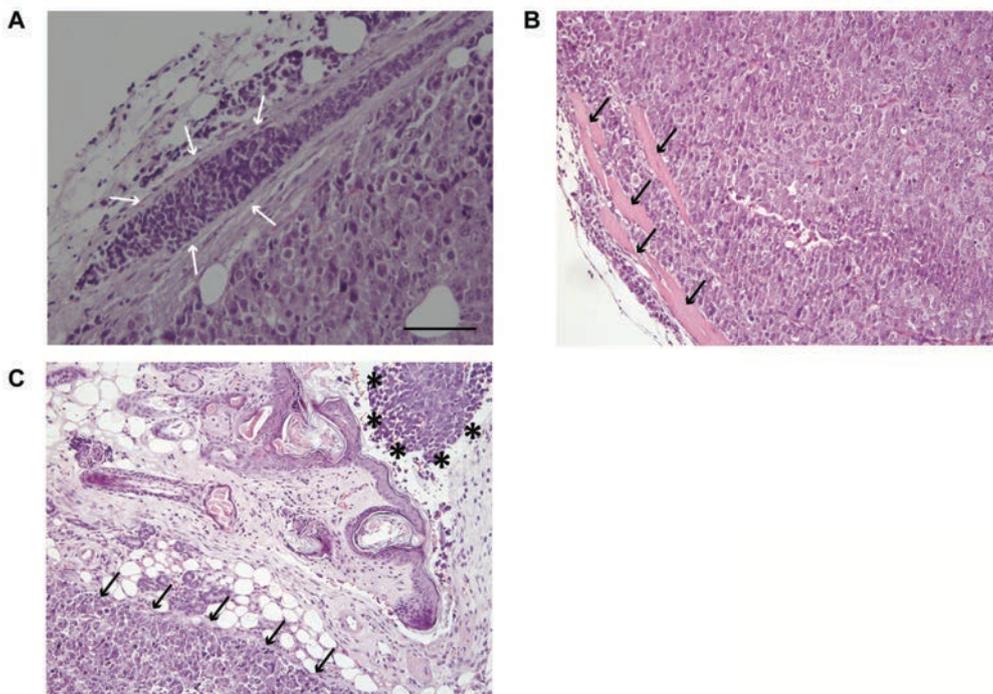


Figura 35. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina del tumor extraído de ratones atímicos desnudos inoculados con células Hakai-MDCK clon 4. A, Infiltración celular en un vaso sanguíneo del tumor, indicado con flechas. B, Infiltración tumoral de músculo (indicado con flechas). C, Metástasis local. Tumor primario indicado con flechas, y tumor secundario señalado con asteriscos. Aumento 100X. Barra de escala, 500 μ m.

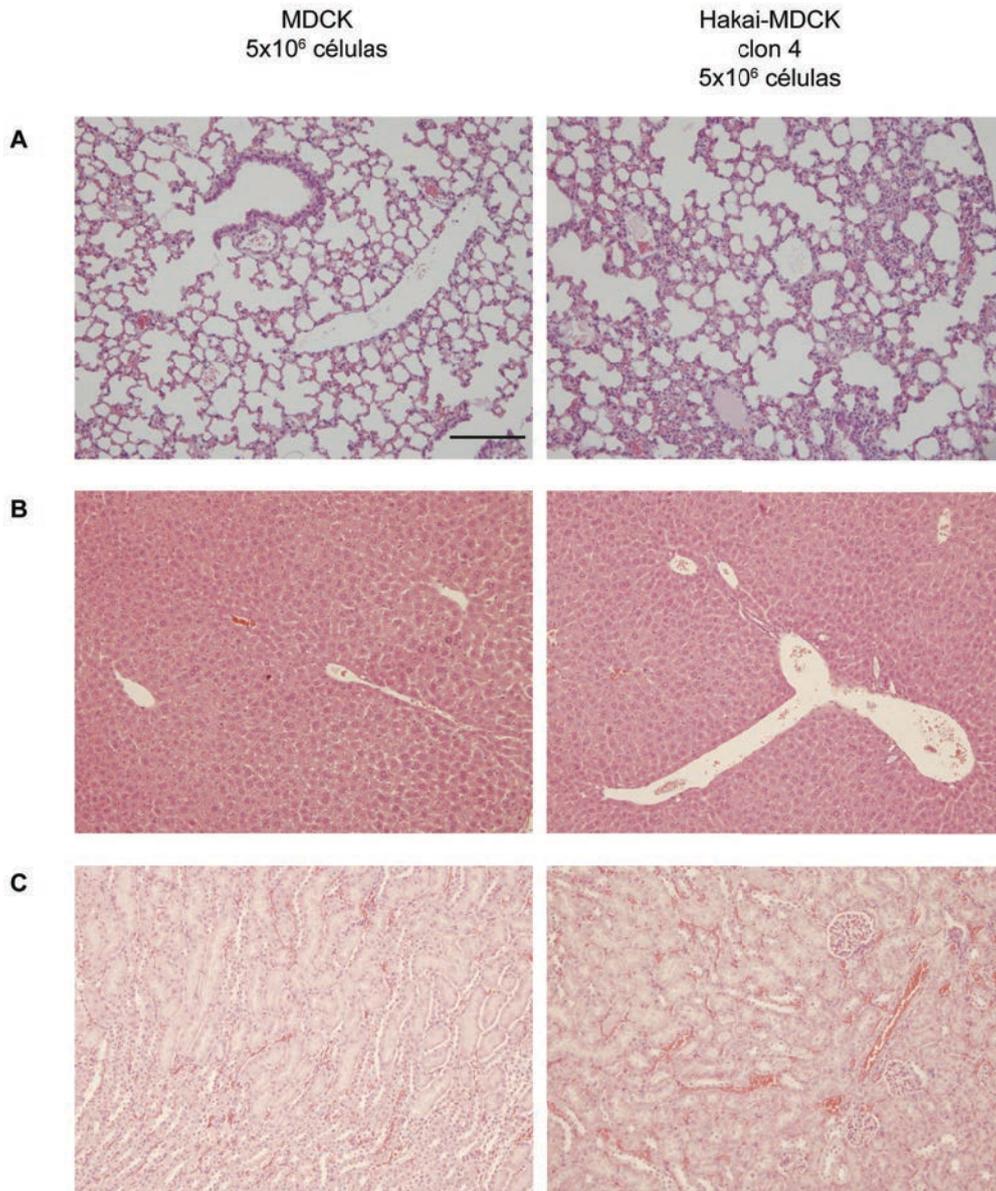


Figura 36. Análisis mediante tinción de hematoxilina-eosina de los tejidos extraídos de ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4. A, Pulmón. B, Hígado. C, Riñón. Aumento 100X. Barra de escala, 500 μ m.

A continuación, se decidió analizar mediante inmunohistoquímica la expresión de diferentes marcadores de interés. En este caso, se seleccionaron: 1) Ki67 como marcador de crecimiento tumoral, cuyo uso está estandarizado y se utiliza de rutina en la práctica clínica como factor pronóstico en cáncer, en base al papel descrito de Hakai sobre la proliferación celular *in vitro* (173, 174), 2) N-

cadherina y E-cadherina, marcadores del proceso de TEM. La TEM es un proceso clave en la progresión tumoral que se caracteriza por la disminución en la expresión de las proteínas de adhesión como E-cadherina (sustrato de Hakai), y la re-expresión de proteínas mesenquimales, como N-cadherina (45), 3) Cortactina, otro de los sustratos específicos descritos para la E3 ubiquitina-ligasa Hakai, aparte de E-cadherina. Hakai media su degradación tras la fosforilación por la activación de la quinasa Src (115).

Tal y como se esperaba, se observó un incremento de la expresión de Hakai (Figura 37A), y una disminución de la expresión de su sustrato específico, E-cadherina (Figura 37B), con la inoculación de células Hakai-MDCK clon 4 con respecto a la inoculación de la línea celular MDCK. Además, también se observó un incremento de N-cadherina (Figura 38A), una disminución de la expresión de Cortactina (Figura 38B), y al analizar el marcador de proliferación Ki67, un incremento de la expresión con la inoculación de Hakai-MDCK clon 4, con respecto a la inoculación con la línea celular MDCK (Figura 38C). Puesto que se observó un incremento de la proliferación celular, se decidió analizar el número de mitosis en los tejidos del tumor mediante tinción de H&E, lo que permitió observar un incremento de la mitosis celular en las muestras correspondientes a ratones atímicos desnudos (*Nu/Nu*) inoculados con las células Hakai-MDCK clon 4, en comparación con la línea celular MDCK donde no se observaron mitosis (Figura 39). Todos estos resultados sugieren que Hakai forma tumores de una elevada agresividad como consecuencia de una alta tasa de proliferación celular, y un incremento del marcador mesenquimal N-cadherina y una disminución de E-cadherina, característicos de TEM, acompañados de la disminución del sustrato de Hakai, Cortactina.

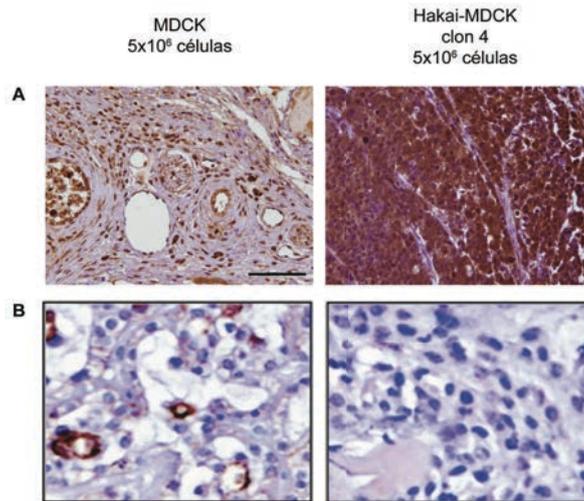


Figura 37. Expresión del marcador epitelial E-cadherina, y Hakai en ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4. A, Hakai. B, E-cadherina. Aumento 200X. Barra de escala, 500 μ m.

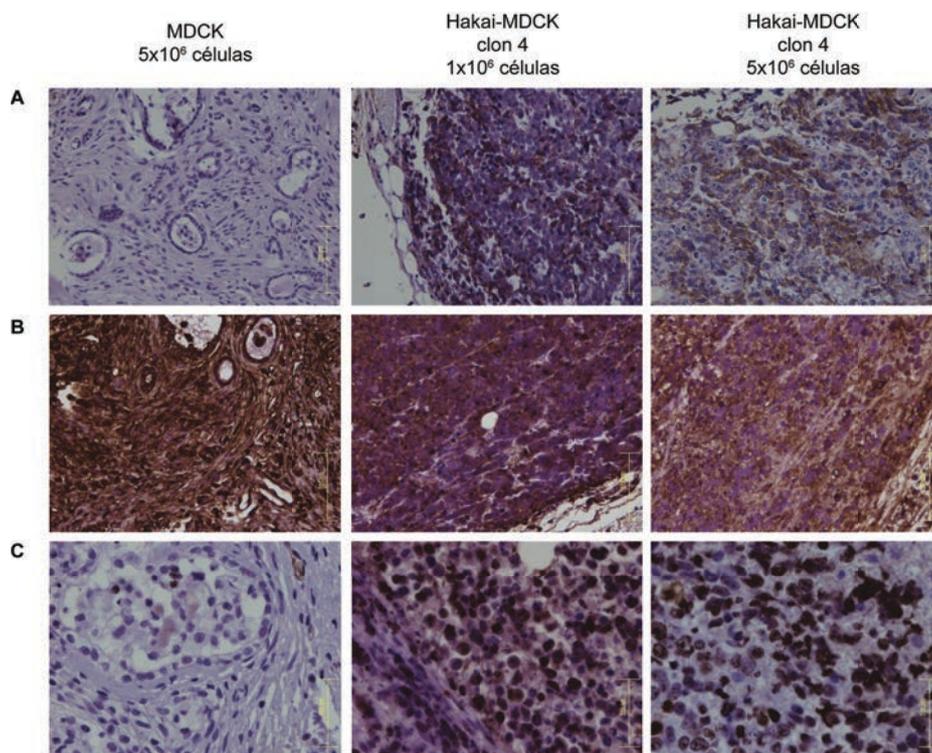


Figura 38. Expresión de los marcadores de transición epitelio-mesénquima y de proliferación en ratones atímicos desnudos inoculados con las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4. A, N-cadherina, 200X. B, Cortactina, 200X. C, Ki67, 400X. Barra de escala, 500 μ m.

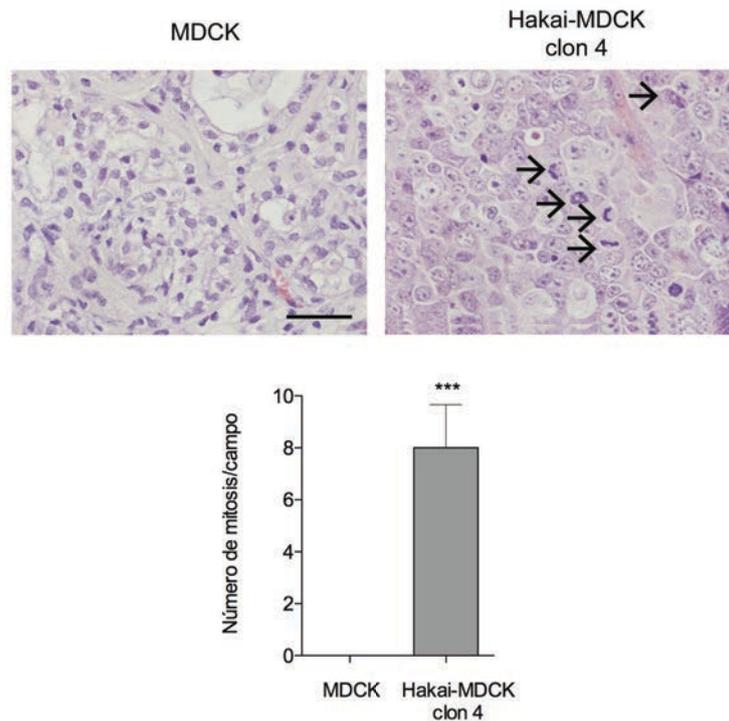


Figura 39. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre la mitosis celular en tejido tumoral de ratones atímicos desnudos mediante tinción de hematoxilina-eosina. Células mitóticas (indicadas con flechas) en imágenes representativas. Aumento 400X. Barra de escala, 500 μ m (panel superior). Cuantificación del número de mitosis por campo en tejido tumoral de ratones inoculados con la línea celular Hakai-MDCK clon 4, en comparación con aquellos inoculados con las células MDCK. Los datos representados se corresponden con la media \pm EE (panel inferior) (***) $p \leq 0.001$).

4. Hakai induce micrometástasis en pulmón *in vivo*

Tal y como se ha descrito anteriormente, mediante el análisis con tinción de H&E del pulmón, el hígado y el riñón, no se observaron lesiones metastásicas distantes en ninguno de estos tejidos analizados de los ratones atímicos desnudos inoculados con la línea celular Hakai-MDCK ni con las células MDCK (Figura 36). Este resultado se debe probablemente al corto tiempo de análisis del estudio *in vivo*, solamente 38 d tras la inoculación de células puede no ser suficiente para permitir a las células establecerse y formar metástasis. Por ello, se decidió llevar a cabo un método de detección más sensible, qPCR, para determinar la posible presencia de micrometástasis en pulmón. Con esta finalidad, se utilizaron dos oligos específicos para llevar a cabo la detección: uno de ellos diseñado para el epítipo HA, y el segundo oligo para Hakai. Después de 38 d tras la inyección de las células, se

detectaron micrometástasis en el pulmón de los ratones atímicos desnudos inoculados con la línea celular Hakai-MDCK clon 4, mientras que no se observaron micrometástasis en pulmón de aquellos inoculados con células MDCK (Figura 40), confirmando así la inducción de micrometástasis en pulmón por las células Hakai-MDCK.

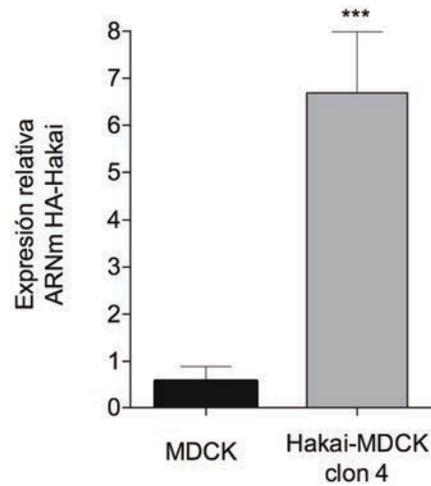


Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de Hakai sobre micrometástasis en tejido pulmonar de ratones atímicos desnudos mediante PCR cuantitativa. Tras 38 d de la inoculación de 5×10^6 células de las líneas celulares MDCK y Hakai MDCK clon 4, se analizó la expresión del epítipo HA y de Hakai mediante PCR cuantitativa en tejido pulmonar de ratones atímicos desnudos. Los datos representados se corresponden con la media \pm DS (** $p \leq 0.001$).

DISCUSIÓN

A. ACCIÓN DE LA VINFLUNINA SOBRE LAS UNIONES ADHERENTES DE CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES DE VEJIGA: IMPLICACIÓN SOBRE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

Los carcinomas de células transicionales de vejiga que invaden el músculo se asocian con una elevada tasa de metástasis y, como ya se ha mencionado, dichas metástasis son las causantes de alrededor de un 90% de muertes por cáncer. Actualmente, cuando estos pacientes progresan tras el tratamiento quimioterápico con platino, se les administran drogas que inhiben la dinámica de microtúbulos, siendo ésta la opción más recomendada en la práctica clínica. Uno de los fármacos más empleados para el tratamiento de dichos pacientes es la VFL, que actúa despolimerizando los microtúbulos e inhibiendo la formación del huso mitótico, lo que bloquea la mitosis celular e induce la apoptosis de las células tumorales (73). Dada la relevante asociación descrita entre los microtúbulos y las uniones adherentes dependientes de E-cadherina, y el papel bien establecido de la E-cadherina en la TEM durante la progresión tumoral y la metástasis en cáncer de vejiga, se decidió analizar la posible acción de la VFL sobre las adhesiones celulares mediadas por E-cadherina empleando células epiteliales tumorales de vejiga. Los resultados muestran que el tratamiento con VFL induce la muerte celular en las células tumorales de vejiga, y activa la diferenciación epitelial en las células remanentes, induciéndose en éstas últimas células un aumento de los niveles de E-cadherina, acompañado de una reducción de marcadores mesenquimales, como son N-cadherina o Vimentina. Además, se ha demostrado que Hakai, regulador post-traducciona l de la estabilidad de E-cadherina, reduce drásticamente los niveles de expresión tras el tratamiento de VFL en la línea celular 5637, y se observó que la vía de proteasoma está implicada, al menos parcialmente, en dicha disminución. En conclusión, se ha demostrado un nuevo mecanismo molecular por el cual la VFL podría influir en su efecto anti-invasivo.

Las líneas epiteliales tumorales de vejiga empleadas en este estudio (HT1376, 5637, SW780, UMUC3 y T24) presentan diferencias en su valor de IC50 (concentración de VFL necesaria para reducir el crecimiento de la población celular en un 50%), lo cual era de esperar dado que cada línea celular presenta diferentes características. Así por ejemplo, las líneas celulares HT1376 y 5637, con el valor

IC50 más alto, derivan de un carcinoma grado III y II, respectivamente, mientras que las células SW780, UMUC3 y T24 se corresponden con carcinomas de células transicionales en estadio muy temprano, que todavía no habían invadido el músculo adyacente. Además, se ha demostrado que el proceso de TEM juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a drogas (175). En los últimos años, se ha propuesto la inducción de la diferenciación como una estrategia terapéutica adecuada en el tratamiento del cáncer. Este enfoque se basa en el concepto de que las células cancerosas surgen de las células madre del tejido en el que se originan, compartiendo capacidad embrionaria y presentado gran plasticidad (176, 177). La mayoría de los agentes de diferenciación celular pueden inhibir la proliferación e inducir a las células a diferenciarse para luego sufrir apoptosis (178, 179). Está bien establecido que la VFL bloquea la mitosis en la transición de metafase a anafase, induciéndose la apoptosis (180). Sin embargo, aún es necesario elucidar cómo podría modular la diferenciación de las células epiteliales y la muerte celular; dado que parece ser una estrategia terapéutica importante en los carcinomas de células transicionales dada la influencia en estos procesos. Por ello, profundizar sobre los mecanismos de diferenciación y el destino de las células tratadas podría ahondar sobre los beneficios de la terapia del cáncer basada en la diferenciación.

Tal y como se ha descrito, la evasión de la apoptosis es un rasgo característico de las células tumorales (6). La alteración de la apoptosis se traduce en una descompensación entre la mitosis y la muerte celular que cambia totalmente la homeostasis del tejido promoviendo un exceso de células desreguladas que contribuyen a la aparición de procesos tumorales (181). Además, la apoptosis también puede bloquear el proceso de metástasis en aquellas células diseminadas en el torrente sanguíneo desde el tumor primario (182). De ahí la importancia de tratamientos capaces de inducir muerte celular para intentar recuperar, al menos en parte, la homeostasis del tejido. Los resultados obtenidos en el trabajo con VFL van en la línea de los datos obtenidos por otros autores (169), sugiriendo que el fármaco induce apoptosis celular, y activa la diferenciación epitelial en las células que permanecen vivas, incrementando los niveles de E-cadherina presente en los contactos célula-célula. *Pourroy et al* han descrito que a bajas concentraciones de VFL se observó una sobreexpresión de p53 y p21 acompañado de su translocación al núcleo en células de neuroblastoma (SK-N-SH), que se traduce en activación de apoptosis y arresto de la mitosis en fase G1. Mientras que a elevadas concentraciones ocurre un despolimerización que suprime completamente la

dinámica de microtúbulos y se bloquea directamente la mitosis (183). Otros compuestos de origen natural como la quercetina es capaz de inducir apoptosis celular *in vitro* utilizando líneas celulares tumorales humanas al igual que *in vivo* (184). Sería por tanto interesante estudiar el posible efecto de otros fármacos sobre la modulación de la apoptosis y la diferenciación celular.

El cambio fenotípico que sufren las células epiteliales polarizadas normales durante los procesos tumorales, de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal, es característico en las primeras etapas de la progresión tumoral. Por ello, revertir el proceso de mesenquimal a epitelial en etapas tempranas sería una buena diana para evitar procesos de migración, invasión y finalmente metástasis. Tal y como se ha descrito, la administración de VFL revierte el proceso de TEM en líneas celulares que todavía expresan E-cadherina, aunque hayan sufrido un proceso de dediferenciación, mientras que las líneas que únicamente expresan marcadores mesenquimales no son capaces de adquirir una morfología más epitelial, y son más sensibles a la toxicidad provocada por el fármaco. Las cadherinas son mediadores clave de la adhesión célula-célula en tejidos epiteliales. El papel de estas proteínas en la TEM durante la progresión tumoral en vejiga ha sido enormemente investigado. En el urotelio normal, P-cadherina, pero no N-cadherina, se expresa en la capa basal. Sin embargo, durante la TEM, la expresión de P-cadherina en las células cancerosas se regula positivamente junto con la expresión de N-cadherina; estos eventos ocurren independientemente o de modo sincrónico. La expresión de E-cadherina en las células de cáncer de vejiga se pierde después de cambios en los niveles de expresión de P-cadherina y/o N-cadherina, evento asociado a una mayor invasión y metástasis. Aunque el cambio de cadherinas es un proceso tardío que tiene lugar durante la progresión tumoral del cáncer de vejiga, se desconoce aún el mecanismo molecular preciso implicado en su regulación (47). Por otro lado, la Vimentina, marcador mesenquimal asociado a filamentos intermedio, a menudo aumenta su expresión en células de carcinoma que han sufrido TEM. Sin embargo, bajo el tratamiento con VFL, la disminución de la Vimentina se observa en la línea celular UMUC3, pero no en las células 5637, poniendo de manifiesto que los niveles de Vimentina no se ven siempre alterados durante la TME. De hecho, se ha visto que el tratamiento con determinados fármacos en algunos cánceres metastásicos tiene lugar una TEM parcial. Por ejemplo, la silibinina, nutraceutico que induce la TEM, no siempre revierte los niveles de Vimentina, y lo hace en función del tipo de células tumorales epiteliales de próstata del que se trate (185-187). La inducción de

la TEM está asociada a una mayor agresividad, recurrencia, progresión y metástasis del cáncer de vejiga, poniéndose de manifiesto la importancia de TEM como diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. Además, en el cáncer de vejiga, la pérdida de expresión de E-cadherina es un marcador de mala respuesta al cetuximab, que bloquea al receptor de EGF y reprime la proliferación de dichas células, resaltándose así la importancia de la búsqueda de terapias complementarias que regulen el proceso de TEM (188, 189). Además, los niveles de E-cadherina podrían representar un marcador predictivo de respuesta a la terapia con VFL. Por otro lado, se ha observado una correlación inversa entre la expresión proteica de E-cadherina y sus represores ZEB-1, ZEB-2 en células humanas tumorales de cáncer urotelial y tumores primarios humanos, que se relacionó con invasión tumoral a nivel de músculo (190). El análisis de la expresión de los reguladores transcripcionales de E-cadherina como ZEB-1, ZEB-2, Slug, Snail y Twist podrían realizarse en un futuro para describir más concretamente el mecanismo molecular por el cual VFL ejerce su función sobre la TEM. Del mismo modo, tras la administración de VFL se observó una disminución de los niveles proteicos de Hakai (191), así como de los niveles de la proteína Ciclina D1, cuya expresión se encuentra modulada por Hakai (109, 110). Por otro lado, la homeostasis celular, y el balance entre regulación y síntesis de proteínas, está regulada mayoritariamente mediante la ubiquitinización y degradación vía proteasoma para las proteínas citosólicas. Se comprobó que la regulación de los niveles de E-cadherina por VFL podría estar regulada, al menos en parte, por la inducción de la degradación vía proteasoma de Hakai, aunque sería necesario llevar a cabo nuevos abordajes para corroborarlo. Teniendo en cuenta todo esto, la VFL es capaz de revertir el proceso de TEM además de modular el ciclo celular, resultados que concuerdan con la función de VFL en el bloqueo de la mitosis en la transición metafase-anafase y la inducción de apoptosis (180).

Diversos estudios han demostrado la influencia de los microtúbulos sobre las adhesiones célula-célula dependiente de E-cadherina (192). En primer lugar, la función de E-cadherina en las uniones célula-célula se altera con la administración de drogas inhibitoras de microtúbulos, como VFL y nocodazole. En segundo lugar, también existen proteínas diana de unión a microtúbulos que alteran la expresión, función y localización de la E-cadherina. Así, por ejemplo la proteína Nezha se une al extremo negativo de los microtúbulos facilitando su unión a las uniones adherentes, ya que media la unión de los microtúbulos con p120 que forma un

complejo de unión con E-cadherina y β -catenina. Mediante estudios *in vitro*, deplecionando Nezha en células epiteliales de mamífero se impide la localización de E-cadherina en los contactos celulares (193). Además, puesto que los microtúbulos están implicados directamente en el transporte intracelular de vesículas, se plantea la posibilidad de que regule la biología de las cadherinas mediante este mecanismo molecular. Sin embargo, la influencia de los microtúbulos sobre la biología de las cadherinas es compleja y poco comprendida hasta el momento.

En base a los interesantes estudios publicados, ha surgido un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer con los denominados nutraceuticos sobre la TEM. El término nutraceutico fue acuñado en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice como una combinación de “nutrición” y “farmaceutico”, y que se definen como alimentos o partes de alimentos que proporcionan beneficios para la salud. Así por ejemplo, la silibinina, un flavonoide que se extrae del cardo, es efectivo en el tratamiento de cáncer de próstata. Además, se ha descrito que la silibinina está implicada en el proceso de TEM, en la inducción de apoptosis, y en bloqueo de la proliferación en células tumorales de cáncer de vejiga (194). Los estudios publicados sobre silbinina demuestran un incremento de E-cadherina en la membrana plasmática, una inhibición de la localización nuclear de β -catenina, una disminución de los niveles de Hakai y de la forma fosforilada de Src, en líneas celulares metastáticas tras su administración a concentraciones no tóxicas (186). Otros autores han descrito en la línea epitelial tumoral de cáncer de vejiga T24-L, altamente metastásica, que la silibinina reduce la migración e invasión celular *in vitro*. Además, estudios *in vivo* demuestran que la silibinina produce una disminución de las metástasis pulmonares y un incremento del porcentaje de supervivencia del animal inyectado con células tumorales, inhibiendo la translocación al núcleo de β -catenina y la expresión de ZEB-1, regulador transcripcional de E-cadherina, bloqueándose así el proceso de TEM (195). La curcumina, otro compuesto de origen natural, bloquea la proliferación provocando el arresto el ciclo celular en la fase G2/M, e induciendo apoptosis, tanto en modelos *in vitro* utilizando las células T24, como *in vivo* utilizando un modelo animal de rata (196). El bloqueo de la proliferación celular por curcumina es tiempo- y dosis-dependiente, tal y como se pone de manifiesto en las líneas celulares T24 y 5637; además también revierte el proceso de TEM al incrementar los niveles de expresión proteica de E-cadherina, y reducir los marcadores mesenquimales N-cadherina y Vimentina (197). Por ello, se propone

el potencial uso de la curcumina como un agente protector frente a la progresión del cáncer de vejiga, y como un quimioterápico frente al cáncer de vejiga. Todos estos estudios ponen de manifiesto el importante efecto de diferentes nutraceuticos sobre el proceso de TEM.

La diferenciación epitelial se propone como una posible diana terapéutica, puesto que las resistencias a los tratamientos quimioterápicos estandarizados en la práctica clínica, y la progresión tumoral que puede derivar en metástasis, se asocian con las células madre tumorales caracterizadas por su plasticidad y su capacidad de auto-regeneración. Por ello, las terapias basadas en la diferenciación pretenden reducir la capacidad de renovación y proliferación de dichas células para conseguir disminuir su potencial agresivo (198). La mayoría de los compuestos que inducen diferenciación epitelial median inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular mediante arresto de ciclo celular (199, 200). La administración de fármacos capaces de revertir el proceso de TEM fortaleciendo las uniones celulares sería útil en estadios iniciales de la enfermedad, ya que cuando las células acceden al torrente sanguíneo y colonizan órganos distales sufren un proceso reverso, TME, para formar micrometástasis o tumores secundarios (201). Por un lado, la TEM como diana puede ser útil como medicina complementaria al tratamiento convencional con quimioterapia del cáncer de vejiga. Sin embargo, la inducción de TME sería contraproducente cuando ya existen metástasis, al activar la proliferación de células ya diseminadas. Por tanto, es posible que los enfoques terapéuticos dirigidos contra la TEM puedan beneficiar a pacientes con cáncer diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad inhibiendo procesos de invasión y diseminación, mientras que los medicamentos anti-TME beneficiarían a los pacientes que ya ha desarrollado metástasis. De todos modos, una mejor comprensión sobre los mecanismos implicados en la TEM-TME en el cáncer de vejiga es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra este tipo de cáncer (30, 202).

B. EFECTO DE HAKAI *in vivo*

1. La sobreexpresión de Hakai induce transición epitelio-mesénquima *in vitro*

Las células epiteliales MDCK presentan un fenotipo polarizado, con características que se asocian a funciones típicas del epitelio tubular renal, y que han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la TEM durante la progresión tumoral. Tal y como se ha descrito previamente en la literatura científica, la sobreexpresión de Hakai en células MDCK transforma el fenotipo epitelial normal hacia una morfología mesenquimal (109). Como era de esperar, se observó un cambio fenotípico mesenquimal en las células que sobreexpresan Hakai, ya que las células pierden las adhesiones célula-célula, lo que es consistente con la acción descrita de Hakai sobre la degradación de su sustrato específico, E-cadherina (91). Por otro lado, mediante western-blot se ha confirmado la pérdida de expresión del marcador epitelial E-cadherina, y un incremento del marcador mesenquimal N-cadherina, en las células MDCK que sobreexpresan Hakai (Hakai-MDCK). Este intercambio de cadherinas, entre E-cadherina y N-cadherina, inducido por la sobreexpresión de Hakai en las células MDCK, es un evento clásico que tiene lugar durante la TEM asociada a cáncer. Además, la capacidad de las células Hakai-MDCK de invadir, proceso clave durante la TEM, junto con el potencial oncogénico, dada su capacidad para crecer sobre un sustrato blando de agar, confirman el papel de Hakai sobre la progresión tumoral. Todos estos resultados sugieren que Hakai es responsable de la inducción del proceso de TEM durante la progresión tumoral. Por otro lado, se han llevado a cabo intentos para obtener una línea celular epitelial estable que no exprese Hakai, sin embargo no se ha conseguido hasta ahora, lo que pone de manifiesto su importancia clave en la supervivencia celular. De hecho, analizando el papel funcional de la proteína homóloga Hakai en *Drosophila melanogaster*, Kaido *et al* han demostrado que aquellos mutantes que no expresan Hakai no llegan a desarrollarse totalmente, bloqueando el desarrollo en el estadio larvario (129).

2. Hakai induce la formación de tumores y la proliferación celular *in vivo*

Para evaluar el posible efecto de Hakai durante la progresión tumoral *in vivo*, las líneas celulares MDCK y Hakai-MDCK clon 4, se inocularon en el flanco de ratones

atímicos desnudos. Tal y como se ha descrito, la inyección de células MDCK no es capaz de inducir la formación de tumores, mientras que todos los ratones inoculados con Hakai-MDCK clon 4 presentan un tumor local. Mediante el análisis histológico del tejido tumoral con tinción de H&E, se analizó el efecto biológico de la sobreexpresión de Hakai. De modo interesante, la inyección de 5×10^6 células MDCK indujo la formación de un teratoma, mientras que para la densidad celular de 1×10^6 células no se observó el mismo resultado. Estos resultados están en la línea de estudios previos en los cuales la línea celular MDCK mantiene la habilidad de regenerar estructuras similares a túbulos renales *in vivo* utilizando ratones atímicos desnudos, manteniendo las uniones celulares y la diferenciación celular (203).

El potencial de crecimiento de los tumores se evaluó mediante el análisis inmunohistoquímico del marcador Ki67, y del índice mitótico, un marcador utilizado comúnmente en el diagnóstico clínico, mediante la tinción de H&E. El incremento de ambos marcadores de proliferación en los tumores originados por la inoculación de las células Hakai-MDCK, sugiere que la sobreexpresión de Hakai induce tumores con una tasa de proliferación extremadamente elevada. Nuestro grupo, ha publicado previamente que la disminución de la expresión de Hakai, utilizando ARNsi, bloquea la proliferación en las líneas celulares MCF7 y HEK-293, acompañado de una reducción de la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular, Ciclina D1. Además, utilizando un mutante del dominio RING-finger para la proteína Hakai (Hakai- Δ RING), necesario para la actividad E3 ubiquitina-ligasa, se demostró que este dominio es necesario para el efecto de Hakai sobre la proliferación celular. Con el fin de demostrar el papel de la actividad E3 ubiquitina-ligasa de Hakai sobre la proliferación *in vivo*, se estudió la expresión de Hakai en dos tipos de tejidos humanos diferentes donde el proceso de proliferación es clave. De esta forma, el incremento de la expresión de Hakai se detectó en los centros germinales del nódulo linfático, donde los linfocitos proliferan activamente, y en la fase proliferativa del endometrio, mientras que en la fase secretora se detectó una baja expresión (109). Además, se ha publicado que la proteína asociada al tumor de Wilms (WTAP) forma un complejo con múltiples proteínas, incluyendo Hakai, corroborándose que es necesaria para la progresión del ciclo celular. De hecho, el silenciamiento de la expresión de Hakai en este modelo, empleando un ARNsi, reduce la proliferación en esta fase G2/M (132).

3. Hakai induce invasión local observándose un fenotipo mesenquimal en las células tumorales

Para evaluar el papel de Hakai *in vivo* durante la invasión y la metástasis, se llevó a cabo la tinción de H&E sobre secciones del tejido tumoral, que pusieron de manifiesto su capacidad invasiva al observarse células tumorales en el interior de vasos sanguíneos y en tejido muscular adyacente al tumor, así como una extensión local del tumor primario, lo que pone de manifiesto el comportamiento extremadamente agresivo de las células Hakai-MDCK, ya que los ratones con invasión tumoral local son más susceptibles de desarrollar metástasis, y tienden a tener un peor pronóstico. Además, se estudió la influencia de Hakai sobre el proceso de TEM *in vivo*, fundamental en la invasión y metástasis celular. Tal y como se ha descrito, se observó una desaparición de la expresión de E-cadherina en ratones inoculados con células Hakai-MDCK, siendo la pérdida de expresión de E-cadherina un requisito clave y un marcador del proceso de TEM, además de ser crítico para la adquisición de un fenotipo maligno e invasivo (85, 204). Además, los tumores expresan fuertemente el marcador mesenquimal N-cadherina. La observación de este intercambio de cadherinas confirma que el programa de TEM también tiene lugar *in vivo*. De modo interesante, se ha sugerido que la proteína Hakai puede ser relevante en estadios tempranos de la TEM. Janda *et al* publicaron que la cooperación entre Ras y TGB- β para activar la TEM incrementa la endocitosis de E-cadherina y su degradación lisosomal. Demostraron que los niveles de expresión de E-cadherina disminuyen en las fases iniciales de la TEM a través de un mecanismo post-traducciona, mientras que la pérdida de E-cadherina vía represión transcripcional es un evento más tardío durante la TEM (124). Por otro lado, en *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado que la función de Hakai es vital en los estadios tempranos de la embriogénesis, y su contribución disminuye en los estadios tardíos (129), y en *Arabidopsis thaliana*, Hakai es necesaria para la metilación de ARNm (m6A) (134), descrito como un proceso esencial para el patrón de formación en estadios tempranos de plantas (140, 205, 206). Todas estas publicaciones ponen de manifiesto que Hakai podría actuar en estadios tempranos de la TEM durante la progresión tumoral mediante su acción como un regulador post-traducciona de E-cadherina. Sin embargo, son necesarias nuevas investigaciones para determinar si Hakai podría actuar sobre otros sustratos nuevos no identificados hasta ahora, o como un regulador post-transcripcional por su influencia sobre la estabilidad de ARNm, el procesado de m6A u otros, dado que Hakai se localiza principalmente en

el núcleo en diferentes modelos de estudio (109, 129, 134). Por lo tanto, investigaciones futuras relativas al mecanismo molecular por el cual Hakai influye sobre la progresión tumoral contribuirían a abrir una vía de investigación para determinar su posible uso como diana terapéutica contra el cáncer.

Finalmente, se analizó la expresión de otro sustrato descrito *in vitro* de Hakai, Cortactina. Tal y como se esperaba, la expresión de Cortactina se reduce en los tumores de aquellos ratones inoculados con Hakai-MDCK clon 4, en comparación con los teratomas formados al inocular las células MDCK, lo que corrobora *in vivo* los datos previos descritos *in vitro* de la acción de Hakai sobre la ubiquitinización y degradación de Cortactina (115). De modo interesante, Cortactina se localiza únicamente en el citoplasma de las células presentes en los tumores inducidos por las células Hakai-MDCK, mientras que en los teratomas inducidos por la inyección de células MDCK muestran una localización de Cortactina enriquecida en el núcleo. Cortactina es una proteína del citoesqueleto y uno de los principales sustratos de la quinasa Src. Es necesaria para la migración celular, y está presente en las estructuras asociadas a movilidad celular como son lamelipodios e invadopodios, abriendo así un gran interés en el estudio de la invasión tumoral. Aunque Cortactina está sobreexpresada en muchos tipos de cánceres, como el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinoma escamoso oral, cáncer de mama o melanoma (207-210), se ha descrito que su localización subcelular y su actividad es determinante para la migración celular mediada por Cortactina. De hecho, se ha demostrado que Cortactina está regulada por varias modificaciones post-traduccionales, tales como acetilación. *Ito et al* demostraron que la forma acetilada de Cortactina se localiza principalmente en el núcleo, y que dicha acetilación disminuye la migración celular al bloquear la unión de Cortactina con la proteína Keap1 en el citoplasma (211, 212). Estos resultados ponen de manifiesto, por primera vez, el efecto opuesto sobre la migración celular en función de la localización subcelular de la Cortactina. Por lo tanto, es posible que Hakai pueda influir sobre la capacidad de migración celular, un proceso importante para la diseminación de las células tumorales, a través de la regulación de la localización de Cortactina durante el proceso de TEM.

4. Hakai induce micrometástasis en pulmón *in vivo*

Se detectó presencia de micrometástasis en el tejido pulmonar de ratones atómicos desnudos inoculados con la línea celular Hakai-MDCK clon 4, después de 38 d tras

la inoculación de dichas células, mientras que no se observaron micrometástasis en los pulmones de ratones atímicos desnudos inoculados con las células MDCK. Los resultados ponen de manifiesto el papel clave de Hakai durante la TEM y la metástasis *in vivo*. Debido al importante papel que juega la E3 ubiquitina-ligasa Hakai durante la TEM, y la metástasis tumoral *in vitro* e *in vivo*, el desarrollo de nuevos inhibidores contra la E3 ubiquitina-ligasa Hakai se postula como una vía estratégica para su posible utilización terapéutica. De hecho, la Agencia Reguladora del Medicamento de EE UU (Food and Drug Administration, FDA) ha aprobado la utilización de múltiples drogas que actúan inhibiendo la ruta de ubiquitinización, como por ejemplo inhibidores de proteasoma tales como Bortezomib, Carfilzomib y Ixazomib. Sin embargo, la aplicación de estas drogas se encuentra limitada al tratamiento de alteraciones malignas hematopoyéticas. Sin embargo, los ensayos clínicos que testaron la eficacia de dichas drogas para el tratamiento de tumores sólidos han resultado fallidos (152, 153). Además, una publicación reciente ha demostrado que las células epiteliales sometidas a un proceso de TEM disminuyen la actividad de proteasoma, y que la administración de inhibidores de proteasoma induce el proceso de TEM (154). Por otro lado, de acuerdo con estos resultados, nuestro grupo ha demostrado recientemente una regulación específica de la pérdida de actividad de múltiples subunidades de proteasoma en las células que sobreexpresan Hakai (Hakai-MDCK), en comparación con las células no transformadas MDCK (155). Todos estos resultados, junto con el incremento de expresión de la proteína Hakai detectada durante la progresión tumoral en adenocarcinoma de colon humano, apoyan la teoría de que los inhibidores de proteasoma podrían no ser un tratamiento efectivo para tumores sólidos de origen epitelial que sufren el proceso de TEM, y por ello se propone a la E3 ubiquitina-ligasa Hakai como una buena diana para el desarrollo de terapias contra el cáncer en aquellos subtipos moleculares definidos específicos de cáncer colorrectal donde la TEM tiene lugar (213, 214).

CONCLUSIONES

1. Vinflunina (VFL) induce un fenotipo fibroblástico en las líneas celulares epiteliales tumorales de vejiga HT1376 y 5637, pero no en las células UMUC3.
2. Vinflunina (VFL) induce muerte celular programada y diferenciación epitelial en células epiteliales tumorales de vejiga que expresan E-cadherina.
3. Vinflunina (VFL) fortalece las uniones célula-célula e incrementa la expresión de E-cadherina.
4. Vinflunina (VFL) disminuye los niveles proteicos de Hakai sin disminuir sus niveles de ARNm, al menos en parte, mediante un mecanismo dependiente de proteasoma.
5. La sobreexpresión de Hakai en células epiteliales MDCK induce un fenotipo mesenquimal.
6. La sobreexpresión de Hakai en células MDCK reduce la expresión de E-cadherina en contactos célula-célula, favoreciendo su distribución citoplasmática.
7. La sobreexpresión de Hakai en células MDCK incrementa la proliferación celular.
8. La sobreexpresión de Hakai en células MDCK no tiene efecto sobre la apoptosis celular en las condiciones testadas.
9. La sobreexpresión de Hakai en células MDCK induce capacidad invasiva y potencial oncogénico.
10. Hakai induce formación de tumores y proliferación *in vivo*.
11. Hakai induce invasión local, y las células tumorales presentan un fenotipo mesenquimal.
12. La presencia de micrometástasis pulmonares se detectó *in vivo* en un modelo animal de ratón inyectado con células MDCK que sobreexpresan Hakai.

CONCLUSIONS

1. Vinflunine (VFL) induces a fibroblast phenotype in HT1376 and 5637 epithelial bladder tumor epithelial cells, but not in UMUC3 cells.
2. Vinflunine (VFL) induces programmed cell death and epithelial differentiation in bladder tumor epithelial cells expressing E-cadherin.
3. Vinflunine (VFL) forms strong cell-cell junctions and increases E-cadherin expression.
4. Vinflunine (VFL) decreases Hakai protein levels without decreasing mRNA levels, at least in part, by a proteasome-dependent mechanism.
5. Hakai overexpression in epithelial MDCK cells induces a mesenchymal phenotype.
6. Hakai-overexpressing MDCK cells reduce E-cadherin expression at cell-cell contacts, favoring its cytoplasmic distribution.
7. Hakai-overexpressing MDCK cells increases cell proliferation.
8. Hakai-overexpressing MDCK cells have no effect on apoptosis under the tested conditions.
9. Hakai-overexpressing MDCK cells induce invasive capacity and oncogenic potential.
10. Hakai promotes tumor formation and proliferation *in vivo*.
11. Hakai induces local invasion, and tumour cells exhibit a mesenchymal phenotype.
12. Lung micrometastasis is detected in a mouse model *in vivo* injected by Hakai overexpressing MDCK cells.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(1):16-27.
3. Goldstraw P. New TNM classification: achievements and hurdles. *Transl Lung Cancer Res*. 2013;2(4):264-72.
4. Boeker M, Franca F, Bronsert P, Schulz S. TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. *J Biomed Semantics*. 2016;7(1):64.
5. Fleming ID. AJCC/TNM cancer staging, present and future. *J Surg Oncol*. 77. United States 2001. p. 233-6.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
8. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(2):85-101.
9. Engel BE, Cress WD, Santiago-Cardona PG. THE RETINOBLASTOMA PROTEIN: A MASTER TUMOR SUPPRESSOR ACTS AS A LINK BETWEEN CELL CYCLE AND CELL ADHESION. *Cell Health Cytoskelet*. 2015;7:1-10.
10. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*. 2015;161(7):1539-52.
11. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:87.
12. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-46.
13. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med*. 2016;8(1):69.
14. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res*. 2010;31(1):158-75.
15. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011;17(11):1359-70.
16. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S244-s75.
17. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell*. 2016;27(21):3233-44.
18. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):9-22.
19. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12).

20. Knights AJ, Funnell AP, Crossley M, Pearson RC. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res.* 2012;8:61-9.
21. Kaminska K, Szczylik C, Bielecka ZF, Bartnik E, Porta C, Lian F, et al. The role of the cell-cell interactions in cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):283-96.
22. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 7. England2007. p. 800-8.
23. Pezzella F, Harris AL, Tavassoli M, Gatter KC. Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis. *Cell Death Discov.* 2015;1:15064.
24. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.* 2011;728(1-2):23-34.
25. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(12):858-70.
26. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1714-26.
27. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-42.
28. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
29. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development.* 2012;139(19):3471-86.
30. Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(5-6):361-8.
31. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45.
32. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20.
33. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005;233(3):706-20.
34. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:567305.
35. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014;27:20-9.
36. Owusu BY, Galembo R, Janetka J, Klampfer L. Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2017;9(4).
37. Farrell J, Kelly C, Rauch J, Kida K, Garcia-Munoz A, Monsefi N, et al. HGF induces epithelial-to-mesenchymal transition by modulating the mammalian hippo/MST2 and IGF1R pathways. *J Proteome Res.* 2014;13(6):2874-86.

38. Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(51):85021-32.
39. Wu Q, Hou X, Xia J, Qian X, Miele L, Sarkar FH, et al. Emerging roles of PDGF-D in EMT progression during tumorigenesis. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(6):640-6.
40. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(1):76-84.
41. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):155-66.
42. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9.
43. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76-83.
44. Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene*. 2010;29(24):3490-500.
45. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2000;60(13):3650-4.
46. Yan X, Yan L, Liu S, Shan Z, Tian Y, Jin Z. N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2999-3006.
47. Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol*. 2010;184(2):423-31.
48. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):118-32.
49. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):645-54.
50. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(3-4):673-87.
51. Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:291-7.
52. Greco FA, Hainsworth JD. Introduction: unknown primary cancer. *Semin Oncol*. 2009;36(1):6-7.
53. Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 15. England 2016. p. 311-25.
54. Yang D, Sun Y, Hu L, Zheng H, Ji P, Pecot CV, et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(2):186-99.

55. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012;22(6):709-24.
56. Nantajit D, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(10):1697-713.
57. Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(10):16445-55.
58. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4571-6.
59. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):285-93.
60. Niessen CM, Leckband D, Yap AS. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*. 2011;91(2):691-731.
61. Miranda KC, Joseph SR, Yap AS, Teasdale RD, Stow JL. Contextual binding of p120^{ctn} to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43480-8.
62. Lien WH, Klezovitch O, Vasioukhin V. Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):499-506.
63. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756-88.
64. Biswas KH, Zaidel-Bar R. Early events in the assembly of E-cadherin adhesions. *Exp Cell Res*. 2017;358(1):14-9.
65. Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 2000;299(3):551-72.
66. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):622-34.
67. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 2003;112(4):535-48.
68. 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(Pt 9):1801-11.
69. Meng W, Mushika Y, Ichii T, Takeichi M. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell*. 2008;135(5):948-59.
70. Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbens SJ, Verma S, Kovacs EM, et al. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):4531-42.
71. Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep*. 2015;3(5):603-10.

72. Oyanagi J, Ogawa T, Sato H, Higashi S, Miyazaki K. Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. *PLoS One*. 2012;7(12):e53209.
73. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2(1):1-17.
74. Lamberth C, Kessabi FM, Beaudegnies R, Quaranta L, Trah S, Berthon G, et al. Synthesis and fungicidal activity of quinolin-6-yloxyacetamides, a novel class of tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(15):3922-30.
75. Sharma A, Saez-Calvo G, Olieric N, de Asis Balaguer F, Barasoain I, Lamberth C, et al. Quinolin-6-Yloxyacetamides Are Microtubule Destabilizing Agents That Bind to the Colchicine Site of Tubulin. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
76. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):253-65.
77. Miller JC, Gutowski GE, Poore GA, Boder GB. Alkaloids of *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus* G. Don). 38. 4'-Dehydrated derivatives. *J Med Chem*. 1977;20(3):409-13.
78. Jordan MA, Horwitz SB, Lobert S, Correia JJ. Exploring the mechanisms of action of the novel microtubule inhibitor vinflunine. *Semin Oncol*. 2008;35(3 Suppl 3):S6-s12.
79. Aparicio LM, Pulido EG, Gallego GA. Vinflunine: a new vision that may translate into antiangiogenic and antimetastatic activity. *Anticancer Drugs*. 2012;23(1):1-11.
80. Shtutman M, Chausovsky A, Prager-Khoutorsky M, Schiefermeier N, Boguslavsky S, Kam Z, et al. Signaling function of alpha-catenin in microtubule regulation. *Cell Cycle*. 2008;7(15):2377-83.
81. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1198(1):11-26.
82. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):151-66.
83. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*. 2002;109(8):987-91.
84. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998;153(2):333-9.
85. Vlemingckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 1991;66(1):107-19.
86. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402-5.
87. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer*. 2016;15:18.

88. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, et al. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.* 1993;120(3):757-66.
89. Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, et al. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol.* 2007;27(10):3804-16.
90. Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Bruyneel E, Laronze JY, Bonnet N, et al. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer.* 2003;105(6):790-5.
91. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):222-31.
92. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 1994;125(6):1327-40.
93. Miranda KC, Khromykh T, Christy P, Le TL, Gottardi CJ, Yap AS, et al. A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22565-72.
94. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* 2010;25(1):99-112.
95. Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:58-66.
96. Liu W, Kovacevic Z, Peng Z, Jin R, Wang P, Yue F, et al. The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets. *Oncotarget.* 2015;6(34):35522-41.
97. Nagathihalli NS, Merchant NB. Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:2059-69.
98. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 2007;315(5809):201-5.
99. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82(2):373-428.
100. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):104-15.
101. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 2016;26(4):399-422.
102. Cooper JA, Kaneko T, Li SS. Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases. *Mol Cell Biol.* 2015;35(11):1886-97.
103. Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* 2005;41:15-30.
104. Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, et al. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 2000;10(10):429-39.

105. Lipkowitz S, Weissman AM. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(9):629-43.
106. Sun Y. E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia*. 2006;8(8):645-54.
107. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(4):1783-6.
108. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(7):3107-10.
109. Figueroa A, Kotani H, Toda Y, Mazan-Mamczarz K, Mueller EC, Otto A, et al. Novel roles of Hakai in cell proliferation and oncogenesis. *Mol Biol Cell*. 2009;20(15):3533-42.
110. Figueroa A, Fujita Y, Gorospe M. Hacking RNA: Hakai promotes tumorigenesis by enhancing the RNA-binding function of PSF. *Cell Cycle*. 2009;8(22):3648-51.
111. Rodriguez-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.
112. Pece S, Gutkind JS. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol*. 4. England2002. p. E72-4.
113. Frame MC, Fincham VJ, Carragher NO, Wyke JA. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(4):233-45.
114. Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:19-57.
115. Mukherjee M, Chow SY, Yusoff P, Seetharaman J, Ng C, Sinniah S, et al. Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *Embo j*. 2012;31(5):1308-19.
116. Mukherjee M, Jing-Song F, Ramachandran S, Guy GR, Sivaraman J. Dimeric switch of Hakai-truncated monomers during substrate recognition: insights from solution studies and NMR structure. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25611-23.
117. Palacios F, Tushir JS, 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(1):389-402.
118. Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo j*. 2001;20(17):4973-86.
119. Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA, Wu WJ. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(8):5127-37.
120. Chang BY, Harte RA, Cartwright CA. RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene*. 2002;21(50):7619-29.

121. Swaminathan G, Cartwright CA. Rack1 promotes epithelial cell-cell adhesion by regulating E-cadherin endocytosis. *Oncogene*. 2012;31(3):376-89.
122. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-72.
123. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*. 2002;156(2):299-313.
124. Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, Grieco M. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene*. 2006;25(54):7117-30.
125. Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell*. 2003;4(1):19-29.
126. Zhou WJ, Geng ZH, Chi S, Zhang W, Niu XF, Lan SJ, et al. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell Res*. 2011;21(4):609-26.
127. Chen KH, Tung PY, Wu JC, Chen Y, Chen PC, Huang SH, et al. An acidic extracellular pH induces Src kinase-dependent loss of beta-catenin from the adherens junction. *Cancer Lett*. 2008;267(1):37-48.
128. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol*. 2011;226(2):299-308.
129. Kaido M, Wada H, Shindo M, Hayashi S. Essential requirement for RING finger E3 ubiquitin ligase Hakai in early embryonic development of *Drosophila*. *Genes Cells*. 2009;14(9):1067-77.
130. Shav-Tal Y, Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett*. 2002;531(2):109-14.
131. Gong EY, Park E, Lee K. Hakai acts as a coregulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2010;101(9):2019-25.
132. Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, Ohashi R, Naito M, Kodama T, et al. Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem*. 2013;288(46):33292-302.
133. Shrestha H, Ryu T, Seo YW, Park SY, He Y, Dai W, et al. Hakai, an E3-ligase for E-cadherin, stabilizes delta-catenin through Src kinase. *Cell Signal*. 2017;31:135-45.
134. Ruzicka K, Zhang M, Campilho A, Bodi Z, Kashif M, Saleh M, et al. Identification of factors required for m6 A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol*. 2017;215(1):157-72.
135. Meyer KD, Jaffrey SR. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(5):313-26.
136. Fray RG, Simpson GG. The *Arabidopsis* epitranscriptome. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;27:17-21.
137. Yue Y, Liu J, He C. RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*. 2015;29(13):1343-55.

138. Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*. 2013;155(4):793-806.
139. Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, et al. A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*. 2015;29(19):2037-53.
140. Bodi Z, Bottley A, Archer N, May ST, Fray RG. Yeast m6A Methylated mRNAs Are Enriched on Translating Ribosomes during Meiosis, and under Rapamycin Treatment. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132090.
141. Zhou J, Wan J, Gao X, Zhang X, Jaffrey SR, Qian SB. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*. 2015;526(7574):591-4.
142. Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfooy FD, Uchil PD, Sultana H, et al. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature*. 2008;455(7210):242-5.
143. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Bonazzi M, Cossart P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. Appraising the roles of CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication. *J Virol*. 2011;85(6):2980-9.
144. Heo HS, Kim JH, Lee YJ, Kim SH, Cho YS, Kim CG. Microarray profiling of genes differentially expressed during erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells. *Mol Cells*. 2005;20(1):57-68.
145. Oshida K, Maeda A, Kitsukawa M, Suga S, Iwano S, Miyoshi T, et al. Novel gene markers of immunosuppressive chemicals in mouse lymph node assay. *Toxicol Lett*. 2011;205(1):79-85.
146. Rodriguez-Rigueiro T, Valladares-Ayerbes M, Haz-Conde M, Blanco M, Aparicio G, Fernandez-Puente P, et al. A novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Proteomics*. 2011;11(12):2555-9.
147. Abella V, Valladares M, Rodriguez T, Haz M, Blanco M, Tarrío N, et al. miR-203 regulates cell proliferation through its influence on Hakai expression. *PLoS One*. 2012;7(12):e52568.
148. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*. 435. England2005. p. 745-6.
149. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
150. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle*. 2008;7(17):2643-6.
151. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-11.
152. Aghajanian C, Blessing JA, Darcy KM, Reid G, DeGeest K, Rubin SC, et al. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2009;115(2):215-20.
153. Rosenberg JE, Halabi S, Sanford BL, Himelstein AL, Atkins JN, Hohl RJ, et al. Phase II study of bortezomib in patients with previously treated advanced urothelial tract transitional cell carcinoma: CALGB 90207. *Ann Oncol*. 2008;19(5):946-50.

154. Banno A, Garcia DA, van Baarsel ED, Metz PJ, Fisch K, Widjaja CE, et al. Downregulation of 26S proteasome catalytic activity promotes epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016;7(16):21527-41.
155. Diaz-Diaz A, Casas-Pais A, Calamia V, Castosa R, Martinez-Iglesias O, Roca-Lema D, et al. Proteomic Analysis of the E3 Ubiquitin-Ligase Hakai Highlights a Role in Plasticity of the Cytoskeleton Dynamics and in the Proteasome System. *J Proteome Res*. 2017;16(8):2773-88.
156. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
157. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89(2):271-7.
158. Litchfield JT, Jr., Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 1949;96(2):99-113.
159. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
160. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29(3):151-9.
161. Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*. 2005;294:15-22.
162. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518-24.
163. Meijer GA, Baak JP. Quantification of proliferative activity in colorectal adenomas by mitotic counts: relationship to degree of dysplasia and histological type. *J Clin Pathol*. 1995;48(7):620-5.
164. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem*. 2009;395(2):265-7.
165. Fujiki Y, Tao K, Bianchi DW, Giel-Moloney M, Leiter AB, Johnson KL. Quantification of green fluorescent protein by in vivo imaging, PCR, and flow cytometry: comparison of transgenic strains and relevance for fetal cell microchimerism. *Cytometry A*. 2008;73(2):11-118.
166. 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. *Urol Oncol*. 2002;7(4):159-66.
167. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(3):481-94.
168. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):15-33.
169. Braguer D, Barret JM, McDaid H, Kruczynski A. Antitumor activity of vinflunine: effector pathways and potential for synergies. *Semin Oncol*. 2008;35(3 Suppl 3):S13-21.

170. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78(5):761-71.
171. Higgs HN. Actin nucleation: cortactin caught in the act. *Curr Biol*. 2002;12(17):R593-5.
172. Wu H, Reynolds AB, Kanner SB, Vines RR, Parsons JT. Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol*. 1991;11(10):5113-24.
173. Del Gobbo A, Ferrero S. Immunohistochemical Markers as Predictors of Histopathologic Response and Prognosis in Rectal Cancer Treated with Preoperative Adjuvant Therapy: State of the Art. *Gastroenterol Res Pract*. 2017;2017:2808235.
174. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539-52.
175. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-92.
176. Zhang Z, Zhou Y, Qian H, Shao G, Lu X, Chen Q, et al. Stemness and inducing differentiation of small cell lung cancer NCI-H446 cells. *Cell Death Dis*. 2013;4:e633.
177. Guichet PO, Bieche I, Teigell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V, et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia*. 2013;61(2):225-39.
178. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16(10):2715-28.
179. Seigel GM. Differentiation potential of human retinoblastoma cells. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(2):213-6.
180. Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(5):427-36.
181. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem*. 2008;104(4):1124-49.
182. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14:48.
183. Pourroy B, Carre M, Honore S, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Briand C, et al. Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest and a mitochondrial pathway. *Mol Pharmacol*. 2004;66(3):580-91.
184. Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2017;38(2):819-28.
185. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):675-88.

186. Deep G, Gangar SC, Agarwal C, Agarwal R. Role of E-cadherin in antimigratory and antiinvasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(8):1222-32.
187. Wu K, Zeng J, Li L, Fan J, Zhang D, Xue Y, et al. Silibinin reverses epithelial-to-mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by targeting transcription factors. *Oncol Rep*. 2010;23(6):1545-52.
188. Black PC, Brown GA, Inamoto T, Shrader M, Arora A, Siefker-Radtke AO, et al. Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-cadherin expression in urothelial carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1478-86.
189. Culine S. Cetuximab in advanced bladder cancer. *J Clin Oncol*. 31. United States 2013. p. 1614-5.
190. 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 Rev*. 2009;28(3-4):335-44.
191. Aparicio LA, Castosa R, Haz-Conde M, Rodriguez M, Blanco M, Valladares M, et al. Role of the microtubule-targeting drug vinflunine on cell-cell adhesions in bladder epithelial tumour cells. *BMC Cancer*. 2014;14:507.
192. Briehner WM, Yap AS. Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(1):39-46.
193. Maiden SL, Petrova YI, Gumbiner BM. Microtubules Inhibit E-Cadherin Adhesive Activity by Maintaining Phosphorylated p120-Catenin in a Colon Carcinoma Cell Model. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148574.
194. Singh RP, Raina K, Sharma G, Agarwal R. Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7773-80.
195. Wu K, Ning Z, Zeng J, Fan J, Zhou J, Zhang T, et al. Silibinin inhibits beta-catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. *Cell Signal*. 2013;25(12):2625-33.
196. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. *Cancer Lett*. 2008;264(2):299-308.
197. Shi J, Wang Y, Jia Z, Gao Y, Zhao C, Yao Y. Curcumin inhibits bladder cancer progression via regulation of beta-catenin expression. *Tumour Biol*. 2017;39(7):1010428317702548.
198. Emhemmed F, Ali Azouaou S, Zhao Q, Appert-Collin A, Bennisroune A, Schini-Kerth VB, et al. Pro-differentiating effects of a synthetic flavagline on human teratocarcinoma cancer stem-like cells. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(3):295-306.
199. Venkatadri R, Iyer AKV, Kaushik V, Azad N. A novel resveratrol-salinomycin combination sensitizes ER-positive breast cancer cells to apoptosis. *Pharmacol Rep*. 2017;69(4):788-97.
200. Aouad P, Saikali M, Abdel-Samad R, Fostok S, El-Houjeiri L, Pisano C, et al. Antitumor activities of the synthetic retinoid ST1926 in two-dimensional and three-dimensional human breast cancer models. *Anticancer Drugs*. 2017;28(7):757-70.

201. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 2006;66(23):11271-8.
202. Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell.* 2012;22(6):699-701.
203. Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH, Jr. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J Cell Biol.* 1979;81(3):635-48.
204. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54.
205. Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, et al. MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell.* 2008;20(5):1278-88.
206. Shen L, Liang Z, Gu X, Chen Y, Teo ZW, Hou X, et al. N(6)-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis. *Dev Cell.* 2016;38(2):186-200.
207. MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 7):1621-6.
208. Ni QF, Yu JW, Qian F, Sun NZ, Xiao JJ, Zhu JW. Cortactin promotes colon cancer progression by regulating ERK pathway. *Int J Oncol.* 2015;47(3):1034-42.
209. Weaver AM. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett.* 2008;265(2):157-66.
210. Clark ES, Weaver AM. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol.* 2008;87(8-9):581-90.
211. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell.* 2007;27(2):197-213.
212. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, et al. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal.* 2015;8(404):ra120.
213. Isella C, Brundu F, Bellomo SE, Galimi F, Zanella E, Porporato R, et al. Selective analysis of cancer-cell intrinsic transcriptional traits defines novel clinically relevant subtypes of colorectal cancer. *Nat Commun.* 2017;8:15107.
214. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.