

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“E-cadherina reduce la habilidad
promotora de migración y metástasis
de caveolina-1 por la disminución de
la fosforilación de caveolina-1 en
células metastásicas”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Bioquímica por:

NATALIA ISABEL DÍAZ VALDIVIA

Directores de Tesis

Dr. Andrew Quest M.

Dra. Lisette Leyton C.

SANTIAGO - CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

NATALIA DÍAZ VALDIVIA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día _____ de _____ de 2016.

Directora de Tesis:

Dr. Andrew Quest M.

Dra. Lisette Leyton C.

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Margarita Vega B. (Presidente)

Dra. María Paz Marzolo C.

Dr. Gareth Owen J.

Dr. Jorge Martínez W.

“A great discovery does not issue from a scientist’s brain ready-made, like Minerva springing fully armed from Jupiter’s head; it is the fruit of an accumulation of preliminary work”.

Marie Curie

Obsessive Genius, Barbara Goldsmith

A mis Padres.

Esta tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) y el Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest.

- Conicyt-FONDAP 15130011.
- Fondecyt 1130250.
- Anillo ACT 1111.

Financiamiento otorgado a la Dra. Lisette Leyton.

- Fondecyt 1110149.
- Iniciativa Científica Milenio (ICM) n° P09-015F.

Financiamiento otorgado a Natalia Díaz.

- Beca Conicyt para estudios de Doctorado Nacional n° 21110515, periodo 2011-2015.
- Beca de Gastos Operacionales para la realización de Tesis Doctoral n° 21110514, periodo 2013-2014.
- Beca de Extensión de Tesis n° 21110515.

- IUBMB-SBBq Young Scientist Program fellowship para la asistencia al congreso IUBMB-SBBq. Sao Paulo-Foz de Iguazu, Brasil 2015.
- American Society for Cell Biology Travel Award, para la asistencia a la reunión ASCB/IFCB. Filadelfia, Estados Unidos 2014.
- Beca Conicyt para la asistencia a eventos y cursos cortos en el extranjero para alumnos de Doctorado 2014.
- Beca Conicyt para la realización de pasantías en el extranjero para alumnos de Doctorado, 2014.
- Beca Conicyt para la asistencia a eventos y cursos cortos nacionales para alumnos de Doctorado , 2014
- Beca Conicyt para la asistencia a eventos y cursos cortos nacionales para alumnos de Doctorado n° 81130187, 2013.
- Beca Conicyt para la asistencia a eventos y cursos cortos para alumnos de Doctorado n° 81120086, 2012.
- Beca Conicyt de apoyo a la participación de estudiantes de Doctorado en reuniones de Sociedades Científicas Nacionales, 2011.

**PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA
TESIS**

Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis.

Rina Ortiz, Jorge Díaz, **Natalia Díaz**, Lorena Lobos-González, Areli Cárdenas, Pamela Contreras, María Díaz, Ellen Otte, Justin Cooper-White, Vicente Torres, Lisette Leyton, and AFG Quest.

Oncotarget 2016

Enhanced caveolin-1 expression increases migration, anchorage-independent growth and invasion of endometrial adenocarcinoma cells.

Díaz-Valdivia, N., Bravo, D., Huerta, H., Henríquez, S., Gabler, F., Vega, M., Romero, C., Calderón, C., Owen, G.I., Leyton, L., Quest, A.F.G.

BMC Cancer (2015) 15:463.

Down-regulation of Rab5 decreases characteristics associated with maintenance of cell transformation.

Silva, P., Soto, N., Díaz, J., Mendoza, P., **Díaz N.**, Quest, A.F.G., Torres, V.A.

Biochem Biophys Res Commun. 2015 Aug 21; 464(2): 642-6.

Molecular insights to a novel Caveolin-1-Rab5-Rac-1 signaling pathway important for metastatic cancer cell migration and invasión.

Díaz, J., **Díaz., N**, Leyton, L., Torres, V. A., Quest, A. F.G.

Cancer cell & Microenvironment (2014) 1:e332.

Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasión.

Díaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., **Díaz N.**, Leyton, L., Stupack, D., Quest, A.F.G., Torres, V.A.

Journal of Cell Science (2014) 127, 2401-2406.

Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced beta-catenin/Tcf-Lef dependent transcription.

Fernández, J. G., Rodríguez, D., Valenzuela, M., Urzúa, U., Munroe, D., Rosas, C., Lemus, D., **Díaz, N.**, Wright, M., Leyton, L., Tapia, J.C., Calderón, C., Andrew Quest, A.F.G.

Journal Molecular Cancer (2014), 13:209.

Caveolin-1 in cell migration and metastasis.

Nuñez, S., Ortiz, R.J., **Díaz, N.**, Díaz, J., Lobos-González, L., Quest, AFG.

Current Molecular Medicine 2014, 14 (2): 255-274.

E-cadherin synergizes with Caveolin-1 in tumor suppression and blocks Caveolin-1 enhanced metastasis of melanoma cells.

Lobos-Gonzalez, L., Aguilar, L., Díaz, J., **Díaz, N.**, Urra, H., Silva, V., Fitzpatrick, C., Lladser, A., Hoek, K., Leyton, L., Quest, AFG.

Pigment Cell and Melanoma Research 2013, 26 (4): 555-570.

Helicobacter Pylori induced loss of survivin and gastric cell viability is attributable to secreted bacterial gamma glutamyl transpeptidase activity.

Valenzuela, M., Bravo, D., Canales, J., Sanhueza, C., **Díaz, N.**, Toledo, H., Quest, AFG.

The Journal of Infectious Diseases 2013, 208 (7): 1131-1141.

Caveolin-1-Enhanced Motility and Focal Adhesion Turnover Require Tyrosine-14 but Not Accumulation to the Rear in Metastatic Cancer Cells.

Urra, H., Torres, VA., Ortiz, RJ., Lobos, L., Díaz, MI., **Díaz, N.**, Härtel, S., Leyton, L., Quest, AFG.

PlosOne 2012, 7 (4): e33085.

TRABAJOS EN PREPARACIÓN

Anti-neoplastic drugs at sub lethal doses augment caveolin-1 expression and caveolin-1-dependent migration and invasion of tumor cancer cells.

Díaz-Valdivia, N., Calderón C., Lobos-González, L., Ortíz, R., Silva, V., Díaz, J., Wehinger, S., Maldonado, H., Silva, P., Torres, VA., Leyton, L., Quest, AFG.

SH2-independent recruitment of p85 α to caveolin-1 activates in a PI3K independent fashion the rab5-rac1 axis leading to metastasis *in vivo*.

Díaz, J., Mendoza, P., Ortíz, R., **Díaz-Valdivia, N.**, Leyton, L., Stupack, D., Quest, AFG., Torres, VA.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

INTERNACIONALES

Díaz-Valdivia, N., Calderón, C., Díaz, J., Maldonado, H., Ortíz R., Leyton, L., Torres, V., Quest, AFG. “Increased caveolin-1 expression following exposure to sub-cytotoxic doses of anti-neoplastic drugs increases migration and invasion of cancer cells”. 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and

Molecular Biology & 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. 24-28 August 2015. Foz do Iguazu, Brasil.

Díaz-Valdivia, N., Calderón, C., Díaz, J., Maldonado, H., Ortíz R., Leyton, L., Torres, V., Quest, AFG. “Anti-neoplastic drugs at sub lethal doses augment caveolin-1 expresion and caveolin-1 dependent migration and invasion of cancer cells”. Young Scientist Program SBBq-IUBMB. 20-22 August 2015. Sao Paulo, Brasil.

Díaz-Valdivia, N., Calderón, C., Díaz, J., Maldonado, H., Castillo, J., Leyton, L., Torres, V., Quest, A.F.G. “Anti-neoplastic drugs at sub lethal doses augment caveolin-1 expression and caveolin-1 dependent migration and invasión of tumor cancer cells”. 2014 ASCB/IFCB Meeting. 6-10 Diciembre 2014. Filadelfia, Estados Unidos.

Díaz-Valdivia, N., Díaz J., Torres, V., Leyton, L., Quest, A.F.G. “E-cadherin expression reduced Caveolin-1-enhanced Rac1 activation and migration in metastatic cancer cells”. XII PABMB Congress. 9-14 Noviembre 2013. Puerto Varas, Chile.

Ortíz, R., **Díaz, N.**, Díaz, J., Torres, V., Cardenas, A., Mendoza, P., Leyton L., Quest, A.F.G. “ECM-specific caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14

promotes melanoma migration”. XII PABMB Congress. 9-14 Noviembre 2013.
Puerto Varas, Chile.

L Lobos-González, L Aguilar, J Diaz, **N Díaz**, H Urra, V Silva, C Fitzpatrick, A Lladser, K.S. Hoek, L Leyton, AFG Quest. “E-cadherin is a molecular switch for Caveolin-1 function in melanoma cells that synergizes in tumor suppression and blocks Caveolin-1-enhanced metastasis”. Annual Meeting of The American Society For Cell Biology. 15-19 Diciembre 2012. San Francisco, Estados Unidos.

NACIONALES

Cruz S., Oyarce C., Gálvez F., Díaz J., **Díaz N.**, Quest F. & Lladser A. “Caveolin-1 enables dendritic cells to generate tumor-protective cytotoxic CD8 T cell responses by promoting migration and antigen cross-presentation”. Chilean Society for Cell Biology XXIX Annual Meeting. 25-29 de Octubre 2015. Puerto Varas, Chile.

Díaz-Valdivia N, Leyton, L., Quest, AFG. “ Complex formation between E-cadherin and caveolin-1 blocks caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 and suppresses caveolin-1 enhanced migration and invasion of metastatic cancer cells”. Chilean Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting. 26-30 de Octubre

2014. Puerto Varas, Chile.

Díaz-Valdivia N, Bahamondes V, Castro I, Aguilera S, Brito M, Leyton L, Barrera MJ, Quest, A.F.G, González MJ. “Changes in localization of caveolin-1 in acini of salivary glands of Sjögren`s Syndrome patients”. Chilean Society for Cell Biology XXVI Annual Meeting. 23-27 de Octubre 2012. Puerto Varas, Chile.

Huerta, H., **Díaz, N.**, Quest, AFG. “ Rol de PKC δ en la re-expresión de Caveolina-1 en adenocarcinoma humano de colon”. Congreso Ciencia Joven 2012 ICBM, Universidad de Chile. 6 de Septiembre 2012. Santiago, Chile

Díaz-Valdivia, N., Leyton, L., Quest, AFG. “Acute treatment with anti-neoplastic drugs induced Caveolin-1 up-regulation and increased migration via a MEK/ERK-dependent pathway in colon cancer cells”. (Presentación Oral). Chilean Society for Cell Biology XXV Annual Meeting. 1-5 Noviembre 2011. Puerto Varas, Chile.

Huerta, H., **Díaz, N.**, Leyton, L., Quest, AFG. “Protein Kinase C delta (PKC δ) is required for re-expresion of Caveolin-1 induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (4 β -TPA) in colon adenocarcinoma cancer cells”. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 27-30 Septiembre 2011. Valdivia, Chile

PASANTÍAS EN EL EXTRANJERO

- Noviembre 2014-Marzo 2015

Pasantía Doctoral en el Linus Pauling Institute de la Oregon State University, Corvallis, Oregon, Estados Unidos. Bajo la dirección de la Dra. Viviana Pérez y el Dr. Balz Frei.

- Enero-Abril 2014

Pasantía Doctoral en el Linus Pauling Institute de la Oregon State University, Corvallis, Oregon, Estados Unidos. Bajo la dirección de la Dra. Viviana Pérez y el Dr. Balz Frei.

AGRADECIMIENTOS

Este tesis no hubiese sido posible sin el apoyo y ayuda de muchas personas que me han acompañado durante este largo proceso. Primero quisiera agradecer a mis Padres Sergio Díaz e Isabel Valdivia mis modelos y ejemplos a seguir, quienes me han enseñado que todo se puede conseguir con trabajo duro y perseverancia, que no hay mayor satisfacción que la que proviene de un trabajo bien hecho, muchas gracias por su infinito apoyo y paciencia, por darme la libertad de elegir mi propio camino, aunque muchas veces significó alejarme por largo tiempo de ellos. Gracias por el amor y cariño que me entregan cada día. A mi Dantito adorado, por su fiel compañía, por hacerme olvidar los problemas y alegrarme día a día.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, Dr. Andrew Quest y Dra. Lisette Leyton por aceptar dirigir una segunda tesis mía (pregrado y postgrado), transformándose en mis referentes científicos, todo lo que sé de ciencia se lo debo a ellos. Gracias por la paciencia y la confianza. A mi comisión de Doctorado, muchas gracias por sus críticas constructivas y guía en especial a la Dra. Margarita Vega por todo su apoyo.

Agradezco al Laboratorio de Comunicaciones Celulares, mi segunda casa y a todos los que forman parte de él, en especial a Lillian Corona por sus consejos y palabras de apoyo. Al *team migración*; Jorge Díaz, Rina Ortiz y América Campos grandes compañeros y amigos con los que hemos desarrollado una productiva camaradería. A la Dra. Lorena Lobos por su invaluable ayuda, voluntad y amistad. A mis amigas y ex compañeras de Laboratorio Alejandra Valdivia y Lorena Aguilar, testigos de mis comienzos científicos que pese a la distancia están siempre presentes. A mis grandes amigos y *partners in crime*, Pamela Contreras y Horacio Maldonado gracias por la alegría, compañía y el

apoyo dentro y fuera del Laboratorio, esta tesis no hubiese sido posible sin ustedes.

También quiero agradecer a mis amigas Daniela Ponce y Maritza Oñate, la ciencia nos juntó y los almuerzos y la vida nos reúnen a diario, gracias por escucharme, por sus consejos, su alegría y su maravillosa amistad.

Esta tesis me permitió conocer otros laboratorios en latitudes lejanas donde aprendí nuevas técnicas, conocí nuevos lugares, grandes personas y amigos. Quiero agradecer al Dr. Balz Frei y a la Dra. Viviana Pérez que me recibió en su laboratorio en el Linus Pauling Institute, con la mejor disposición para ayudarme y guiarme a las “Pérez Sisters” Steph Zhao, Kelsey Caples y Lynda Bradley las mejores compañeras de Laboratorio que se puede pedir a Yu Zhen y Rong Wang por toda su ayuda y paciencia, a Samanthi Wickeramasekara y Jaewoo Choi por su ayuda con los experimentos de espectrometría de masa y metabolomics. A mis grandes amigos, guías turísticos y familia por 7 meses Ellie Esfandiari, Barath Sunchu y Kartik Vijaysimha que me hicieron sentir como en casa al otro lado del mundo.

A mis amigos Maritza Alliende, Francisca Benavente, Carla Gutiérrez, Romina Carvajal, María José Romero y Rodrigo Rivero que empezamos juntos nuestro camino en la ciencia y ahora desde distintas partes de esta disciplina y del mundo seguimos juntos los logros y fracasos de cada uno, apoyándonos como desde el primer año de Universidad.

A mi amiga de la vida Natalia Manzano que desde el año 2000 ha sido mi compañera de banco aunque nos separen kilómetros de distancia, siempre escuchando, aconsejando y alegrándose de cada uno de mis logros.

A Mario Königsberger, el regalo que mis viajes y travesías me entregaron, la prueba de que la distancia es solo un número, gracias por tu apoyo, paciencia y amor.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	14
ÍNDICE DE FIGURAS	19
INDICE DE TABLAS	20
ABREVIATURAS	21
RESUMEN	23
SUMMARY	27
I. INTRODUCCIÓN	31
A. CÁNCER	31
B. CAVEOLINA-1	33
C. CAVEOLINA-1, E-CADHERINA Y CÁNCER	36
D. E-CADHERINA Y CAVEOLINA-1	39
E. MIGRACIÓN CELULAR Y METÁSTASIS	41
F. CAVEOLINA-1, MIGRACIÓN CELULAR Y METÁSTASIS	44
G. PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN TIROSINA 14 EN LA MIGRACIÓN CELULAR E INVASIÓN	46
H. CAVEOLINA-1, E-CADHERINA Y LA REPROGRAMACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO	47
I. REGULACIÓN DEL COMPLEJO CAVEOLINA-1/E-CADHERINA/ B -CATENINA POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINA	49
RESUMEN DE ANTECEDENTES	55
HIPÓTESIS	56
OBJETIVO GENERAL	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
II. METODOLOGÍA	58
1. LINEAS CELULARES	58
A) METASTÁSICAS	58
B) NO METASTÁSICAS	60
2. MATERIALES	61
A) CULTIVO CELULAR	61
B) REACTIVOS GENERALES	62
C) ANTICUERPOS	63
D) PLÁSMIDOS	63
3. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	64

4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y WESTERN BLOT	64
5. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN (MTS)	66
6. ENSAYOS DE MULTIHERIDA	67
7. ENSAYOS DE TRANSMIGRACIÓN EN CÁMARA DE BOYDEN	67
8. ENSAYOS DE INVASIÓN EN MATRIGEL	68
9. ENSAYO DE METÁSTASIS EN RATONES C57BL/6	69
10. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE ROS	69
11. PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD PARA RAB-5 Y RAC1	69
12. INMUNOPRECIPITACIÓN CON PROTEINA A/G AGAROSA	70
13. INMUNOPRECIPITACIÓN CON ESFERAS METÁLICAS ACOPLADAS A PROTEÍNA A PARA ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	71
14. ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITADOS POR ESPECTROSCOPIA DE MASA	72
15. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO DE CÉLULAS METASTÁSICAS	72
16. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD GLICOLÍTICA DE CÉLULAS METASTÁSICAS	73
17. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES	74
18. ANÁLISIS DEL METABOLOMA	75
19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
III. RESULTADOS	77
1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	77
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN LA TIROSINA 14 EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	77
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN LA TIROSINA 14 EN CÉLULAS NO METASTÁSICAS.</i>	83
<i>EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 Y E-CADHERINA SOBRE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN TIROSINA 654 DE B-CATENINA.</i>	85
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE EL AUMENTO EN LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDO POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	91
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE EL AUMENTO EN LA INVASIÓN CELULAR INDUCIDA POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	94
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA NO ES CAPAZ DE INHIBIR LA MIGRACIÓN E INVASIÓN INDUCIDA POR LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 FOSFOMIMÉTICA.</i>	97
2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	100
<i>LA ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE SRC NO SUPRIME LA INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN EJERCIDA POR E-CADHERINA.</i>	100
3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3	103
<i>E-CADHERINA INMUNOPRECIPITA CON CAVEOLINA-1 Y DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN LA TIROSINA 14 EN CÉLULAS B16F10.</i>	103
<i>LA FOSFATASA PTPN14 CO-INMUNOPRECIPITA CON CAVEOLINA-1 EN PRESENCIA DE E-CADHERINA</i>	106
<i>LA EXPRESIÓN DE LA FOSFATASA PTPN14 INHIBE EL AUMENTO DE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN INDUCIDO POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS B16F10.</i>	112
<i>LA EXPRESIÓN DE LA FOSFATASA PTPN14 SUPRIME EL ROL PROMOTOR DE METÁSTASIS DE CAVEOLINA-1 IN VIVO.</i>	114

4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4	116
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE LA ACTIVACIÓN DE RAB-5 POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	116
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA INHIBE LA ACTIVACIÓN DE RAC-1 POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	119
5. OBJETIVO ESPECÍFICO 5	122
<i>LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 AUMENTA LA GLICÓLISIS EN CONDICIONES AERÓBICAS EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	127
<i>LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 CAMBIA EL FENOTIPO ENERGÉTICO DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER METASTÁSICAS A UN FENOTIPO GLICOLÍTICO.</i>	131
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA DISMINUYE EL CONSUMO DE OXÍGENO EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	133
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA DISMINUYE LA ACIDIFICACIÓN EXTRACELULAR EN CÉLULAS METASTÁSICAS.</i>	136
<i>LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA RALENTIZA EL METABOLISMO DE CÉLULAS DE CÁNCER METASTÁSICAS A UN PERFIL METABÓLICO QUIESCENTE.</i>	139
<i>LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN LA TIROSINA 14 ES NECESARIA PARA LA MANTENCIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO INDUCIDO POR LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1.</i>	141
<i>CAVEOLINA-1 DISMINUYE EL CONSUMO DE OXÍGENO POR EL BLOQUEO DEL COMPLEJO MITOCONDRIAL IV EN CÉLULAS B16F10.</i>	144
<i>LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 INDUCE UN AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ROS LA CUAL ES INHIBIDA POR LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA.</i>	147
<i>EL TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES INHIBE EL AUMENTO EN LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDO POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS B16F10.</i>	149
<i>ANÁLISIS DEL METABOLOMA DE CÉLULA METASTÁSICAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE CAVEOLINA-1 Y QUE CO-EXPRESAN E-CADHERINA.</i>	151
IV DISCUSIÓN	160
A E-CADHERINA DISMINUYE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR POR LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN Y14.	160
B PTPN14: UN NUEVO COMPAÑERO DE E-CADHERINA EN LA INHIBICIÓN DEL ROL PROMOTOR DE METÁSTASIS DE CAVEOLINA-1.	165
C E-CADHERINA INHIBE EL EJE PROMOTOR DE MIGRACIÓN E INVASIÓN: CAVEOLINA-1 / RAB-5 / RAC-1.	167
D CAVEOLINA-1 Y SU ROL EN LA REPROGRAMACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS METASTÁSICAS.	169
E CAVEOLINA-1 Y LA MODIFICACIÓN DEL METABOLOMA DE CÉLULAS METASTÁSICAS.	176
V CONCLUSIÓN	179
VI REFERENCIAS	182
VII ANEXO	194
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	194

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura predicha para caveolina-1 y representación de sus distintos dominios. (Modificada de Williams et al., 2004).</i>	35
<i>Figura 2. Niveles de caveolina-1 durante la progresión del cáncer.</i>	37
<i>Figura 3. Modelo Propuesto.</i>	54
<i>Figura 4. Secuencia de la horquilla de shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 en células MDA-MB-231 clon # 1-5.</i>	59
<i>Figura 5. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10.</i>	80
<i>Figura 6. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células HT29(US).</i>	81
<i>Figura 7. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células MDA-MB-231.</i>	82
<i>Figura 8. En células que expresan E-cadherina, caveolina-1 no se fosforila luego de un estímulo migratorio.</i>	84
<i>Figura 9. β-catenina no se fosforila en Y654 en células metastásicas B16F10 y HT29(US).</i>	88
<i>Figura 10. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de β-catenina en la tirosina 654 en células MDA-MB-231.</i>	89
<i>Figura 11. En células que expresan E-cadherina, β-catenina no se fosforila luego de un estímulo migratorio.</i>	90
<i>Figura 12. La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la migración celular inducido por caveolina-1 en líneas celulares metastásicas.</i>	93
<i>Figura 13. La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la invasión celular inducida por caveolina-1 en líneas celulares metastásicas.</i>	96
<i>Figura 14. La expresión de E-cadherina no es capaz de inhibir la migración e invasión inducida por la expresión de caveolina-1 fosfomimética.</i>	99
<i>Figura 15. La activación constitutiva de Src no suprime la inhibición de la migración por E-cadherina.</i>	102
<i>Figura 16. E-cadherina co-inmunoprecipita con caveolina-1 y disminuye la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10.</i>	105
<i>Figura 17. Caveolina-1 co-inmunoprecipita con la fosfatasa PTPN14 en presencia de E-cadherina.</i>	111
<i>Figura 18. La expresión de la fosfatasa PTPN14 inhibe el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 en células B16F10.</i>	113
<i>Figura 19. La expresión de la fosfatasa PTPN14 suprime el rol promotor de metástasis de caveolina-1 in vivo.</i>	115
<i>Figura 20. La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rab-5 por caveolina-1 en células metastásicas.</i>	118
<i>Figura 21. La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rac-1 por caveolina-1 en células metastásicas.</i>	121
<i>Figura 22. Parámetros respiratorios.</i>	124
<i>Figura 23. La expresión de caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.</i>	126
<i>Figura 24. Parámetros glicolíticos.</i>	128
<i>Figura 25. La expresión de caveolina-1 aumenta la acidificación del medio extracelular en células metastásicas.</i>	130

<i>Figura 26. La expresión de caveolina-1 cambia el fenotipo energético de las células de cáncer metastásicas a un fenotipo glicolítico.</i>	132
Figura 27. La expresión de E-cadherina disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.	135
<i>Figura 28. La expresión de E-cadherina disminuye la acidificación extracelular en células metastásicas.</i>	138
<i>Figura 29. La expresión de E-cadherina ralentiza el metabolismo de células de cáncer metastásicas a un perfil metabólico quiescente.</i>	140
<i>Figura 30. La fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 es necesaria para la mantención del fenotipo metabólico inducido por la expresión de caveolina-1.</i>	143
<i>Figura 31. Caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno por el bloqueo del complejo mitocondrial IV en células B16F10.</i>	146
<i>Figura 32. La expresión de caveolina-1 induce un aumento de la producción de ROS, la cual es inhibida por la expresión de E-cadherina en células B16F10.</i>	148
<i>Figura 33. N-acetilcisteína inhibe el aumento en la migración inducido por caveolina-1 en células B16F10.</i>	150
<i>Figura 34. Metabolitos alterados por la expresión de caveolina-1 en células B16F10.</i>	157
<i>Figura 36. Modelo Propuesto.</i>	175
 <i>Figura Suplementaria 1. Viabilidad de células metastásicas transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina.</i>	 194

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Lista de reactivos utilizados en cultivo celular.</i>	61
<i>Tabla 2. Anticuerpos Primarios utilizados para Western blot.</i>	66
<i>Tabla 3. Reactivos utilizados para la preparación del medio de ensayo MAS</i>	75
<i>Tabla 4. Análisis de muestras de inmunoprecipitados de caveolina-1 en células B16F10 por espectrometría de masa.</i>	109
<i>Tabla 5. Análisis de intensidad de metabolitos en células B16F10.</i>	154

ABREVIATURAS

2-DG: 2-deoxiglucosa

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BAL: Benzamidina-antipaína-leupeptina

BCA: Ácido bicincoínico

BSA: Seroalbumina de bovino

CAV1: Caveolina-1

COX2: Ciclooxygenasa 2

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECAR: Tasa de acidificación extracelular

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

FBS: Suero fetal bovino

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos

GAP: Proteína activadora de GTPasa

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosin trifosfato

GST: Glutati3n S transferasa

H: Hora

HPLC: Cromatografía en fase líquida de alta resolución

HRPO: Peroxidasa de rábano

IPTG: Isopropil- β -D-1- tiogalactopiranosido

MEC: Matriz extracelular

MTS:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-
2H-tetrazolium

NAC: N-acetilcisteína

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NP-40 : Nonidet-p40

OCR: Tasa de consumo de oxígeno

PBS: Tampón fosfato salino

PMP: Permeabilizador de membrana plasmática

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfónilo

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

PTPN14: Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 14

ROS: Especies reactivas de oxígeno

shRNA: Horquilla corta de RNA

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

SEM: Error estándar de la media

TMPD: Tetrametil fenilenediamina

Y14: Tirosina 14

Y654: Tirosina 654

RESUMEN

El cáncer corresponde a la segunda causa de muerte en Chile y el mundo, pero los pacientes con cáncer no mueren debido al crecimiento del tumor primario, sino a la diseminación de las células tumorales y posterior colonización de éstas en nuevos órganos o metástasis. En términos generales, el cáncer es la consecuencia de un proceso multifactorial que lleva a la transformación progresiva de células normales en células altamente malignas. La amplia variedad de fenotipos del cáncer se debe a la manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología celular, las que colectivamente dictaminan el crecimiento maligno. Dos de las características adquiridas por las células tumorales en las que se enfocará esta tesis son; la invasión de tejidos y metástasis y la reprogramación del metabolismo energético.

Caveolina-1 es una proteína integral de membrana a la que se le ha atribuido un rol dual en la progresión tumoral, actuando como supresor de tumores, ya que la disminución de la expresión de caveolina-1 es suficiente para revertir el fenotipo transformado, o como promotor de metástasis en estadios tardíos del cáncer, donde la expresión de caveolina-1 aumenta sin revertir el fenotipo maligno y se correlaciona con un aumento en la migración celular y metástasis, multiresistencia a drogas y una mala prognosis para el paciente. Ambos roles de caveolina-1 se ven afectados por la presencia de la glicoproteína E-cadherina, la cual potencia su acción supresora de tumores y suprime la habilidad de caveolina-1 para promover metástasis *in vivo*. Sin embargo, el mecanismo por el cual E-cadherina suprime la habilidad de caveolina-1 para promover la metástasis no ha sido estudiado.

La habilidad de caveolina-1 para promover un aumento en la migración en células metastásicas se relaciona con un aumento en la activación de Rab-5 y Rac-1.

Ya que la reprogramación del metabolismo energético de las células, suple tanto las necesidades bioenergéticas como biosintéticas de las células cancerígenas para sostener una proliferación aumentada y una rápida migración e invasión celular, en este proyecto se caracterizó el fenotipo metabólico de las células metastásicas que expresan o no, caveolina-1 y estudiamos cómo la expresión de E-cadherina afecta el metabolismo.

Caveolina-1 sufre modificaciones post-traduccionales que participan en su función intracelular, como la fosforilación en el residuo de tirosina 14 (Y14), mediada por las proteínas tirosina quinasas no receptoras Src, Fyn y Abl en respuesta a varios estímulos como. En células metastásicas de cáncer de mama, se observan altos niveles de expresión de caveolina-1 y un alto grado de fosforilación de ésta en Y14, lo que promueve un aumento en la migración celular por un aumento en el recambio de la adhesiones focales, polarización, velocidad persistencia y direccionalidad de la migración. Todas estas funciones de caveolina-1 son bloqueadas por la inhibición de la fosforilación de caveolina-1 en Y14 tanto de manera farmacológica como por la utilización de una caveolina-1 que no es fosforilable (Y14F). Por lo tanto, el rol promotor de metástasis de caveolina-1, dependería de su fosforilación en Y14. La fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina y PTPN14 en células de melanoma murino e induce una disminución en la migración, formación de colonias y crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de colon.

Estos antecedentes nos llevaron a proponer la siguiente hipótesis: **En presencia de E-cadherina se recluta a la fosfatasa PTPN14 al complejo multiproteico formado con caveolina-1 lo que reduce la habilidad promotora de migración y metástasis de caveolina-1 por la disminución de la fosforilación de ésta en tirosina 14.** El objetivo principal de esta tesis es determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre la fosforilación en tirosina de caveolina-1 (Y14) y β -catenina (Y654) y la migración

e invasión celular en células cancerígenas. Para abordar la hipótesis de trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos: (1) Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre los niveles de fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina y la migración e invasión celular; (2) Estudiar la participación de Src en la fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina en presencia y ausencia de E-cadherina; (3) Determinar si los complejos proteicos formados con caveolina-1 en presencia de E-cadherina contienen PTPN14, la que contribuye a la desfosforilación de caveolina-1 en tirosina 14; (4) Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre la activación de Rab-5 y Rac-1; (5) Caracterización de los cambios metabólicos inducidos por la expresión caveolina-1 y la variación de éstos por la co-expresión con E-cadherina. Para el desarrollo de los objetivos mencionados se utilizaron líneas celulares metastásicas en las que se co-expresan caveolina-1 y E-cadherina. Se realizó ensayos de Western de blot, luego de ensayos de multiherida para determinar los niveles de fosforilación de caveolina-1 en Y14 y β -catenina en Y654, ensayos de migración por transwell, ensayos de invasión, ensayos de precipitación por afinidad para determinar la actividad de Rab-5 y Rac1 en células que expresan caveolina-1 en presencia o en ausencia de E-cadherina. Además, se caracterizaron los complejos multiproteicos formados por caveolina-1, mediante ensayos de inmunoprecipitación y espectrometría de masa en células que expresan o no E-cadherina y se caracterizó el fenotipo metabólico de células que expresan o no caveolina-1, estudiando cómo cambia éste en presencia de E-cadherina.

En resumen en esta tesis se buscó dilucidar el mecanismo mediante el cual E-cadherina reduce la habilidad promotora de migración, invasión y metástasis de caveolina-1 en células de cáncer metastásicas.

En este trabajo mostramos que la expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la migración, invasión y metástasis inducido por caveolina-1 por la

disminución de la fosforilación de caveolina-1 en Y14, además, de bloquear la activación del eje Rab-5/Rac1. La fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipitó con caveolina-1 en presencia de E-cadherina y su expresión fue capaz de inhibir el rol promotor de migración, invasión y metástasis de caveolina-1. Finalmente mostramos que la expresión y fosforilación de caveolina-1 induce un *switch* metabólico a un fenotipo glicolítico aeróbico por el bloqueo del complejo mitocondrial IV, generando cambios en el metaboloma de las células metastásicas congruentes con este *switch* metabólico. La expresión de E-cadherina bloquea el cambio metabólico inducido por caveolina-1 llevando a las células a un metabolismo quiescente.

SUMMARY

Cancer is the second leading cause of death in Chile and in the world. Cancer patients do not die due to the primary tumor growth, but rather due to the spread of the cancer cells from the primary tumor and subsequent colonization of new organs, a process known as metastasis. In general terms, cancer is the result of a multifactorial process that leads to the progressive transformation of normal cells into highly malignant cells. The wide variety of cancer phenotypes is due to alterations in cell physiology that collectively lead to the malignant cell behavior. Two of the characteristics acquired by tumor cells, on which this thesis will focus, are tissue invasion, as well as metastasis and reprogramming of energy metabolism.

Caveolin-1 is a membrane protein that has been attributed a dual role in cancer progression, acting at early stages as a tumor suppressor given that augmenting the expression of caveolin-1 is sufficient to reverse the transformed phenotype, or as a promoter of metastasis in late stages of cancer, where enhanced expression of caveolin-1 favors the malignant phenotype and correlates with an increase in cell migration and metastasis, multidrug resistance and poor prognosis of the patients. Both roles of caveolin-1 are affected by the presence of the glycoprotein E-cadherin, which enhances caveolin-1 function as a tumor suppressor and suppresses the ability of caveolin-1 to promote metastasis *in vivo*. However, the precise mechanism by which E-cadherin suppresses the malignant traits of caveolin-1 is unknown.

The ability of caveolin-1 to promote migration of metastatic cells is associated with increased activation of Rab-5 and Rac-1.

Bearing in mind that the reprogramming of energy metabolism in cancer cells, is required to supplement both the both the bioenergetic and biosynthetic needs of these cells to sustain increased proliferation, rapid migration and cell invasion,

this thesis also evaluated the metabolism of metastatic cells expressing or not caveolin-1 and how this was affected by the expression of E-cadherin.

Caveolin-1 is subjected to posttranslational modifications relevant to protein function, such as phosphorylation on tyrosine 14 (Y14), by the non-receptors protein tyrosine kinases non-receptor Src, Fyn and Abl. This may occur in response to a large variety of different stimulus. In metastatic breast cancer cells, high levels of caveolin-1 expression and phosphorylation on Y14 are observed and associated with increased cell migration by promoting focal adhesion turnover, polarization, persistence, speed and directionality of migration. All these functions of caveolin-1 are blocked by inhibition of caveolin-1 phosphorylation on Y14 either pharmacologically or by introducing a non-phosphorylatable caveolin-1 (Y14F) mutation. Therefore, the metastasis promoting role of caveolin-1 depends on Y14 phosphorylation. The PTPN14 phosphatase co-immunoprecipitated with caveolin-1 in the presence of E-cadherin and PTPN14 in murine melanoma cells and decreased migration, colony formation and anchorage-independent growth of colon cancer cells.

These results available in the literature led us to propose that **in the presence of E-cadherin PTPN14 is recruited to the multiprotein complex including caveolin-1 to reduce Y14 phosphorylation, cell migration and metastasis induced by caveolin-1**. The main objective of this thesis was to determine the effect of co-expression of caveolin-1 and E-cadherin on tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Y14) and β -catenin (Y654), as well as migration and invasion in cancer cells. To address the working hypothesis the following specific objectives were evaluated: (1) To determine the effect of the co-expression of caveolin-1 and E-cadherin on the levels of tyrosine phosphorylation 14 of caveolin-1 and on tyrosine 654 of β catenin and migration and cell invasion; (2) To study participation of Src in the phosphorylation of the tyrosine 14 of caveolin-1 and on tyrosine β -catenin 654 in the presence and absence of E-cadherin; (3) To determine whether the protein complexes formed with caveolin-1 in the

presence of E-cadherin contain PTPN14, and if this phosphatase contributes to dephosphorylation of tyrosine 14 of caveolin-1; (4) To determine the effect of co-expression of caveolin-1 and E-cadherin on the activation of Rab-5 and Rac-1; (5) To characterization of the metabolic changes induced by caveolin-1 expression and the effect of the co-expression with E-cadherin on cell metabolism. To address these objectives metastatic cell lines that co-expressed caveolin-1 and E-cadherin were used. Multiple wounding assays and Western blot analysis was used to determine the phosphorylation levels of caveolin-1 on Y14 and β -catenin on Y654 moreover migration assays, invasion assays, affinity precipitation assays were employed to determine the activity of Rab-5 and Rac1 in cells expressing caveolin-1 in the presence or absence of E-cadherin. Furthermore, protein composition the analysis of the multiprotein complex formed by caveolin-1 and E-cadherin was evaluated following immunoprecipitation assays by mass spectrometry analysis. The metabolic phenotype of cells expressing or not caveolin-1 was characterized using Seahorse extracellular analyzer and metabolic changes in presence of E-cadherin were determined.

In summary, this thesis sought to elucidate the mechanism by which E-cadherin reduces the ability of caveolin-1 to promote migration, invasion and metastasis as well as metabolic reprogramming of metastatic cancer cells.

In this study, we show that the expression of E-cadherin prevented caveolin-1-enhanced migration, invasion and metastasis by reducing caveolin-1 phosphorylation on Y14 and, as a consequence, blocking of the activation of the Rab-5/Rac-1 signaling axis. The PTPN14 phosphatase co-immunoprecipitated with caveolin-1 in the presence of E-cadherin and overexpression of this phosphatase was sufficient to prevent the migration, invasion and metastasis promoting role of caveolin-1, even in the absence of E-cadherin.

Finally we show that the expression caveolin-1 induced a metabolic *switch* to an aerobic glycolytic phenotype, likely by blocking the mitochondrial complex IV.

These effects coincided in metastatic melanoma cells with changes in the metabolome. Moreover, the expression of E-cadherin blocked the metabolic changes induced by caveolin-1 leading to a quiescent metabolic phenotype in metastatic cells.

I. INTRODUCCIÓN

A. CÁNCER

El cáncer es una de las enfermedades más importantes de la actualidad ya que tiene una alta tasa de incidencia, prevalencia y mortalidad, correspondiendo a la segunda causa de muerte en nuestro país (24%) (Deis-Minsal, 2009) y en el mundo. Se estima que el número de casos nuevos de cáncer es de 455 por cada 100.000 habitantes cada año, con una tasa de mortalidad del 38% (U.S National Cancer Institute, 2016). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con cáncer no mueren debido a las complicaciones locales del crecimiento del tumor primario, sino debido a la diseminación de las células tumorales, proceso que se conoce como metástasis (Harlozinska, 2005).

En términos generales, el cáncer es la consecuencia de un proceso multifactorial que involucra la acumulación secuencial de cambios genéticos y epigenéticos que llevan a la pérdida de una comunicación adecuada entre las células y su microambiente, y a la transformación progresiva de células normales en células altamente malignas (Hanahan et al., 2000). Las células cancerígenas muchas veces adquieren fenotipos de malignidad por la reactivación y modificación de programas celulares existentes, empleados por el organismo durante el desarrollo (Luo et al., 2009). La amplia variedad de fenotipos del cáncer se debe a la manifestación de alteraciones esenciales en la

fisiología celular, las que colectivamente dictaminan el crecimiento maligno. Estas características son: (1) Autosuficiencia en señales de crecimiento; (2) Pérdida de sensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento; (3) Evasión de la muerte celular programada; (4) Potencial replicativo ilimitado; (5) Angiogénesis sostenida; (6) Invasión de tejidos y metástasis; (7) Reprogramación del metabolismo energético y (8) Evasión del sistema inmune. Cada una de estas capacidades adquiridas durante la progresión tumoral representa el éxito de las células transformadas para evadir los mecanismos anti-cancerígenos presentes en las células y tejidos (Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011).

Se ha descrito una serie de genes involucrados en el desarrollo del cáncer, los cuales dependiendo de si ganan o pierden función, se denominan oncogenes o supresores de tumores, respectivamente. Sin embargo, existe evidencia creciente de genes o proteínas que pueden actuar tanto como oncogenes o supresores de tumores dependiendo del contexto celular. Algunos ejemplos de estas proteínas son: Wnt5A (Nishita et al., 2010), los factores de transcripción WT1 (Yang et al., 2007) y β -ZIP Maf (Pouponnot et al., 2006), la guía de la repulsión axónica Semaforina 2E y su receptor Plexina D1 (Casazza et al., 2010), el receptor de muerte de Fas (Chen et al., 2010), Caspasa-8 (Torres et al., 2010), SnoN (Deheuninck et al., 2009), la proteína de andamiaje Sprouty- 2 (Holgren et al., 2010) y la proteína integral de membrana, blanco de estudio de nuestro laboratorio, caveolina-1 (Lobos-González et al. 2013).

B. CAVEOLINA-1

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana de 21-24 kDa que han sido descritas como el principal componente funcional y estructural de las caveolas (Brown et al., 1998), con la participación de un grupo de proteínas citosólicas llamadas cavininas (Hill et al., 2008). La familia de las caveolinas está compuesta por tres isoformas en células de mamíferos, caveolina-1 y caveolina-2 que se expresan abundantemente en adipocitos, células endoteliales y fibroblastos, donde colocalizan, mientras que la expresión de caveolina-3 está restringida a células musculares y gliales (Okamoto et al., 1998; Williams et al., 2004; Quest et al., 2008). Además, dentro de la célula, caveolina-1 puede encontrarse en diferentes compartimentos, expresándose tanto en la membrana plasmática, citoplasma, mitocondria y núcleo, según el tipo celular (Li et al., 2001; Sanna et al., 2007).

Existen dos isoformas de caveolina-1 que derivan de dos sitios alternativos de inicio de la traducción de RNAm de caveolina-1, produciendo la isoforma 1 α que contiene los residuos aminoacídicos 1-178 o la isoforma 1 β que contiene los residuos aminoacídicos 32-178 (Schlegel et al., 2001).

Caveolina-1 sufre modificaciones post-traduccionales que participan en su función intracelular, tales como: palmitoilación en los residuos de cisteína 133, 143 y 156 de la región COOH-terminal, relevantes para su oligomerización (Scherer et al., 1997), transporte de colesterol a las caveolas y la interacción

con Src (Li et al., 1996; Boscher et al., 2012) fosforilación en el residuo de serina 80, involucrada en su retención en el retículo endoplasmático y posterior secreción (Schlegel et al., 2001). Además, existe la fosforilación en el residuo de tirosina 14 (Y14), solo en caveolina-1 1 α , mediada por las proteínas tirosina quinasas no receptoras Src, Fyn y Abl en respuesta a varios estímulos como: insulina, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno, hiperosmolaridad y por un esfuerzo cortante hemodinámico (Li et al., 1996; Cao et al., 2002; Cao et al., 2004; Volonte et al., 2001; Mastick et al., 1995; Mastick et al., 1997; Kimura et al., 2002; Rizzo et al., 2003; Jo et al., 2014). Esta fosforilación en Y14 permite a caveolina-1 interactuar con la quinasa del COOH-terminal de Src (Csk) e inactivarla (Radel et al., 2005) y cumpliría un papel fundamental en el proceso de migración celular (Parat et al., 2003; del Pozo et al., 2005; Grande-García et al., 2007; Goetz et al., 2008; Urra et al., 2012).

La fosforilación de caveolina-1 en Y14 podría ser un elemento importante en respuesta al estrés celular (Volonte et al., 2001; Cao et al., 2004), ya que ratones knock-out para caveolina-1 son viables, pero incapaces de responder frente a situaciones de estrés y presentan una menor expectativa de vida (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001; Park et al 2003; Fernández et al., 2006).

Caveolina-1 posee un dominio hidrofóbico central entre los residuos 102 y 134 que se inserta en la membrana plasmática adoptando una conformación similar a una horquilla. En la región NH₂-terminal, adyacente al dominio hidrofóbico, entre los residuos 82-101 se encuentra el dominio de andamiaje (CSD),

responsable de las interacciones entre caveolina-1 y numerosas proteínas de señalización celular que poseen un dominio de unión a caveolina (CBD) tales como proteínas G heterodiméricas, H-Ras, tirosinas quinasas de la familia Src, Proteína quinasa C (PKC), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) y componentes de la cascada p42/44 MAPK. Esta interacción frecuentemente conduce a la inactivación de estas proteínas de señalización (Figura 1) (Li et al., 1996; Okamoto et al., 1998; Bucci et al., 2000; Quest et al., 2008). Por lo tanto, como la activación constitutiva de muchas de estas moléculas puede favorecer la transformación celular, se propuso que caveolina-1 actuaría como una proteína supresora de tumores.

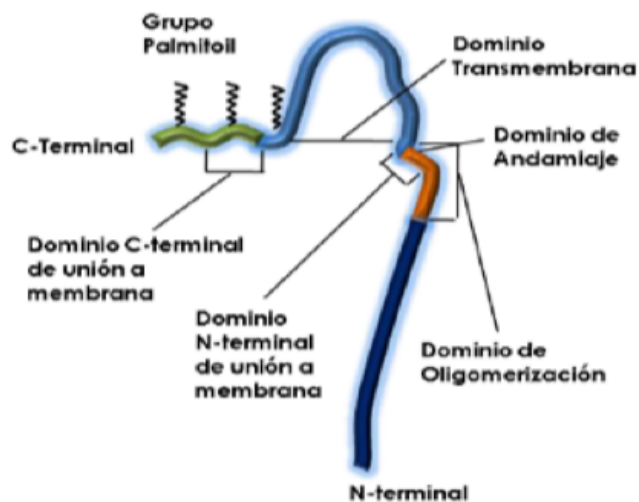


Figura 1. Estructura predicha para caveolina-1 y representación de sus distintos dominios. (Modificada de Williams et al., 2004).

C. CAVEOLINA-1, E-CADHERINA Y CÁNCER

Existen varios estudios que describen a caveolina-1 como una proteína supresora de tumores, ya que los niveles de proteína y ARNm de caveolina-1, disminuyen en fibroblastos NIH-3T3 transformados por varios oncogenes y en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Koleske et al., 1995; Lee et al., 1998) y en tumores humanos de colon. Además, la re-expresión de caveolina-1 en líneas celulares de carcinoma de colon HT29 y DLD-1 reduce significativamente la tumorigenicidad de estas células cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes, disminuyendo la formación de tumores en estos ratones (Bender et al., 2000).

Estudios comparativos entre tejidos normales y tumorales muestran que hay una reducción en la expresión de caveolina-1 que favorece el desarrollo neoplásico. Esta pérdida de la expresión de caveolina-1 puede ser considerada un evento permisivo, ya que la re-expresión de caveolina-1 en diferentes líneas celulares de cáncer es suficiente para revertir el fenotipo transformado. Sin embargo, en estadios tardíos del cáncer, la expresión de caveolina-1 puede aumentar sin revertir el fenotipo maligno. Esto se observó en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y colon. En cambio, en el cáncer de próstata, donde el tejido prostático normal no expresa caveolina-1, su expresión aumenta notablemente con el desarrollo del cáncer (Figura 2), y promueve la actividad metastásica de las células, asociándose con un fenotipo celular más maligno y

con una mala prognosis para el paciente (Revisado en Quest et al., 2004; Quest et al., 2008).

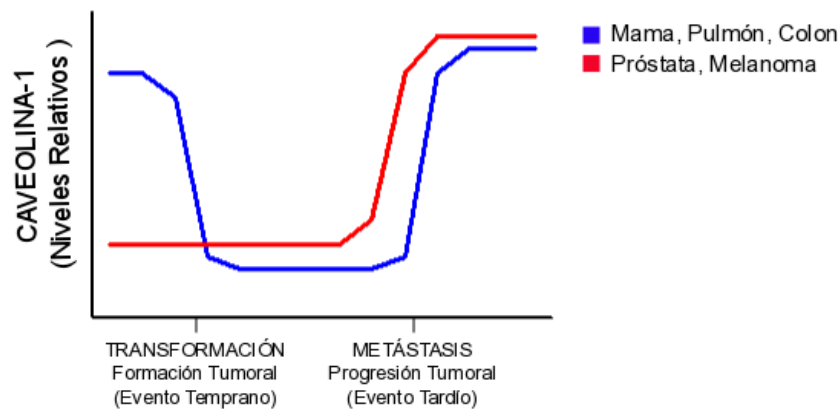


Figura 2. Niveles de caveolina-1 durante la progresión del cáncer.

Como evento temprano en la progresión (mama, pulmón y colon) y durante el proceso de transformación celular, hay una pérdida de la expresión de caveolina-1. Como evento tardío existe una re-expresión de caveolina-1 que coincide con un alto nivel de metástasis y una mala prognosis para el paciente. En el caso de próstata, el tejido normal no expresa caveolina-1, pero en etapas tardías de cáncer de próstata también se observan niveles elevados de caveolina-1 (Modificado de Quest et al., 2008).

Existen varios posibles blancos de caveolina-1 que podrían estar asociados a su acción supresora de tumores, por ejemplo caveolina-1 disminuye la expresión de proteínas que favorecen la sobrevivencia de células tumorales como la proteína inhibidora de la apoptosis survivina y ciclooxygenasa-2 (COX2) en células de cáncer de colon. La disminución de estas proteínas está asociada a la inhibición de su transcripción dependiente de β -catenina/Tcf-Lef por el secuestro de β -catenina en la membrana plasmática dependiente de caveolina-1 y E-cadherina (Torres et al., 2007; Rodríguez et al., 2009).

La re-expresión de caveolina-1 en células de adenocarcinoma pulmonar es suficiente para promover la formación de filipodios, la migración celular y un aumento en el potencial metastásico de estas células (Ho et al., 2002). Además, caveolina-1 promueve el recambio de adhesiones focales, la migración y metástasis de células de cáncer de mama y melanomas (Urrea et al., 2012).

Un estudio realizado en nuestro laboratorio con un modelo *in vivo* pre-clínico de melanoma murino, demostró que caveolina-1 puede actuar como supresora de tumores, ya que en ensayos de formación de tumores en ratones C57BL/6 a los cuales se les inyectaron de manera subcutánea, células B16F10, que no expresan caveolina-1, la re-expresión de ésta reduce el volumen tumoral en un 50-60 % en comparación con las células parentales. Sin embargo, cuando se realizaron ensayos de metástasis, inyectando células B16F10 en la vena de la cola, se observó que células B16F10 que expresan caveolina-1 ocupan 30 % de la masa pulmonar en comparación a las células que no expresan caveolina-1, que ocupan solo el 9 % del pulmón. Cuando se co-expresó E-cadherina junto con caveolina-1, el efecto supresor de tumores se vio potenciado y se abolió el efecto promotor de metástasis (Lobos-González et al., 2013).

En resumen, caveolina-1 dependiendo del contexto celular, funciona como **supresor de tumores** en la fase inicial del cáncer, pero en estadios más avanzados de la enfermedad, actúa como **promotor de metástasis** y ambos roles de caveolina-1 se ven afectados por la presencia de E-cadherina, la cual

potencia su acción supresora de tumores y suprime la habilidad de caveolina-1 para promover metástasis *in vivo*.

Ya que caveolina-1 tendría una doble función en la progresión cancerígena es muy importante determinar cuales serían los factores responsables de esta doble función y como E-cadherina está regulando ambas funciones.

D. E-CADHERINA Y CAVEOLINA-1

Las cadherinas son una gran familia de glicoproteínas transmembrana que forman y mantienen los contactos adhesivos entre las células de tejidos sólidos, de manera dependiente de calcio (Hatta et al., 1988). Las cadherinas mantienen la arquitectura tisular por el ensamblaje de uniones adherentes mediante interacciones homofílicas entre los dominios extracelulares de las cadherinas de la superficie de células vecinas. El dominio citoplasmático de las cadherinas se unen a las proteínas submembranales β -catenina o plakoglobina (γ -catenina), lo que las une al citoesqueleto de actina vía α -catenina (Conacci-sorrell et al., 2002). E-cadherina se expresa principalmente en células epiteliales y variaciones en su expresión se han relacionado con la progresión del cáncer. Mutaciones en el gen de E-cadherina que llevan a la pérdida de su expresión, predisponen al desarrollo de cáncer gástrico (Conacci-sorrell et al., 2002). La pérdida de la expresión de E-cadherina elimina la formación de uniones adherentes y está asociada con la transición desde adenoma a carcinoma y con

la adquisición de capacidades metastásicas, ya que permite el inicio del primer paso del proceso metastásico, la separación de las células cancerígenas entre si (Perl et al., 1998; Onder et al., 2008). En células de glioblastoma se ha observado que la pérdida de la expresión de E-cadherina se correlaciona con un fenotipo tumoral más agresivo (Lewis-Tuffin et al., 2010). La re-expresión de E-cadherina, restablece las uniones adherentes, disminuye la proliferación y movilidad celular, además de revertir el fenotipo metastásico. Por lo tanto E-cadherina corresponde a una proteína supresora de tumores (Conacci-sorrell et al., 2002).

Trabajos realizados en células pancreáticas, que normalmente no expresan caveolina-1, han mostrado que caveolina-1 es un importante modulador de la expresión de E-cadherina y de la diferenciación de estas células, en las cuales aumenta la expresión de E-cadherina en la membrana plasmática luego de la expresión ectópica de caveolina-1 (Salem et al., 2011). Sin embargo, en cáncer de tiroides se observó que existe un aumento de la expresión de caveolina-1 en estadios más avanzados de la enfermedad, en los cuales la expresión de E-cadherina se pierde, favoreciendo un aumento en la migración e invasión de las células tumorales (Kim et al., 2012). Esto sugiere que puede existir una estrecha regulación de la expresión de E-cadherina por caveolina-1 o viceversa dependiendo del contexto celular.

La actividad de Rac-1 es necesaria para la formación y mantención de las uniones adherentes en células epiteliales y es esencial para el reclutamiento de

las cadherinas a los sitios de contactos célula-célula (Hordijk et al., 1997), inhibiendo la invasión y migración de células de carcinoma renal (Engers et al., 2001). En células de melanoma un aumento de la actividad de Rac-1 es responsable del cambio de la expresión de N-cadherina por E-cadherina, disminuyendo su capacidad invasiva (Monaghan-Benson et al., 2013). Sin embargo, la activación de Rac-1 induce un aumento en la invasión y metástasis en numerosos tipos de cáncer (Michiels et al., 1999). Por lo tanto la relación entre la actividad de Rac-1 y la expresión de E-cadherina y su efecto sobre la migración e invasión depende del contexto celular.

E. MIGRACIÓN CELULAR Y METÁSTASIS

La migración celular es un proceso altamente integrado y dinámico, esencial en la morfogénesis embrionaria, reparación y regeneración de tejidos y en la respuesta inmune (Vicente-Manzanares et al., 2005). La migración celular también puede contribuir en la progresión de algunas enfermedades como artritis, aterosclerosis, osteoporosis, cáncer y anomalías congénitas del corazón y cerebro (Horwitz et al., 2003). De esta forma, la migración es un factor central para muchos procesos fisiológicos y patológicos.

En organismos multicelulares, la migración celular está regulada por señales extracelulares que pueden estar dadas por factores solubles endocrinos o autocrinos como también por señales no solubles de la matriz extracelular.

Trabajos donde se ha estudiado la migración celular en dos dimensiones sobre sustratos describen el proceso como un fenómeno de 5 etapas básicas: (1) Polarización morfológica de la célula; (2) Extensión de la membrana en el frente de avance generando lamelipodios y filipodios; (3) Formación de complejos multiprotéicos de anclaje al sustrato, llamados adhesiones focales; (4) Contracción celular que permite la translocación del cuerpo celular hacia la dirección del movimiento y (5) Liberación de las adhesiones celulares de la parte posterior de la célula lo que permite el desprendimiento de la cola y el avance de la célula. Las fuerzas responsables de estas actividades son la polimerización de actina y la contracción del citoesqueleto dirigida por la miosina (Henson et al., 1999; Kassis et al., 2001; Lauffenburger et al., 1996).

En cáncer, la migración celular está involucrada en dos procesos importantes: la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis y en la diseminación de células tumorales desde la lesión primaria hacia el tejido que rodea el tumor y posteriormente hacia otros órganos, proceso conocido como metástasis. La metástasis, es un proceso complejo que involucra la degradación de la matriz extracelular, invasión del estroma, intravasación a la circulación, extravasación, migración y proliferación en otros tejidos y órganos (Geho et al., 2005; Bohle et al., 1999). Para esto, la célula requiere receptores y moléculas de adhesión y activación de vías de transducción que llevan a la expresión y secreción de metaloproteasas, expresión de moléculas de adhesión y aumento de la migración celular (Sahai et al., 2005).

Durante la adhesión y el movimiento celular, la matriz extracelular (MEC) permite el anclaje de la célula al sustrato y funciona de manera haptotáctica para dirigir el movimiento celular. La formación de nuevos puntos de contacto focal está mediada por integrinas y ocurre en estrecha relación con la MEC. Estos contactos focales se transforman en adhesiones focales al formar grandes complejos que contienen proteínas, como talina, vinculina y α -actina, y moléculas adaptadoras, como paxilina, tensina y p130^{Cas}, además de proteínas tirosina quinasa no receptoras como la quinasa de adhesiones focales (FAK) y quinasas de la familia de Src. La maduración de las adhesiones focales y la formación de fibras de estrés (paquetes de filamentos de actina polimerizada, distribuidos en forma anti-paralela) son eventos que están controlados por proteínas G pequeñas de la familia de las Rho GTPasas, entre las que se encuentran Rho A/B, Rac 1/2 y Cdc42, reguladores estructurales de la dinámica del citoesqueleto (Hall et al., 2005). Todos estos componentes actúan sobre sus proteínas efectoras durante la migración celular, generando la fuerza necesaria para la contracción y el movimiento celular (Ridley et al., 2001).

La regulación de la migración celular está mediada por proteínas de la subfamilia Rho/Rac, que pertenecen a la superfamilia de Ras, que son proteínas G pequeñas que poseen actividad GTPasa intrínseca. Estas proteínas ciclan entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP) (Ridley et al., 2001). Este proceso es regulado por una serie de proteínas que interactúan con las Rho/Rac GTPasas. Los factores

intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) se encargan de intercambiar GDP por GTP y de esta manera activar las Rho/Rac GTPasas. Las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), promueven la actividad intrínseca GTPasa de Rho/Rac e hidrolizan el GTP a GDP inactivándolas. Existe otro tipo de proteínas, llamadas GDI que se encargan de secuestrar a las proteínas Rho/Rac GTPasas al citosol uniéndose a su tallo prenilado impidiendo su localización y anclaje a la membrana, manteniéndolas inactivas (Bishop et al., 2000).

F. CAVEOLINA-1, MIGRACIÓN CELULAR Y METÁSTASIS

Caveolina-1 interactúa con muchas proteínas involucradas en la migración celular como uno de los receptores de adhesión celular, la integrina $\beta 1$ (Carlin et al., 2005) y con proteínas del citoesqueleto de actina que regulan la formación de la red de microfilamentos en lamelipodios como filamina (Boscher et al., 2012). Adicionalmente, caveolina-1 está involucrada en el tráfico de vesículas entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, siendo importante en el reciclaje de la membrana y sus proteínas asociadas durante la migración celular (Navarro et al., 2004). En células endoteliales, caveolina-1 se encuentra altamente polarizada en la parte posterior y central de la célula, excluyéndose del frente de avance durante la migración celular en ensayos 2D (Beardsley et al., 2005). Por el contrario, durante la transmigración (3D),

caveolina-1 se localiza en el frente de avance de la célula donde tiene lugar la formación de invadopodios (Parat et al., 2003). En ambos casos, la disminución de los niveles de caveolina-1 lleva a una disminución en la migración celular. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), caveolina-1 promueve la movilidad celular favoreciendo la polarización celular y aumentando la velocidad y persistencia de la migración celular. Además, caveolina-1 disminuye la actividad de Rac1 y Cdc42, pero aumenta la actividad de RhoA por la inhibición de vía Src/p190RhoGAP (Grande-García et al., 2007; Grande-García et al., 2008).

Otras proteínas G implicadas en la migración celular son las proteínas Rab de la superfamilia de Ras que tienen un importante rol en la dinámica endosomal. Particularmente Rab-5, regulador de la vía endocítica temprana, ha llamado nuestra atención ya que activa a Rac1 por el reclutamiento de su GEF, Tiam1 a endosomas tempranos promoviendo la macropinocitosis de receptores de superficie (Pellinen et al., 2006) y también favorece la metástasis de células de neuroblastoma (Torres et al., 2010). Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que la expresión de caveolina-1 favorece la activación de Rab-5 en células metastásicas y se describió que la presencia de Rab-5 es necesaria para la activación de Rac-1 inducida por caveolina-1 y el posterior aumento de la migración e invasión (Díaz et al., 2014).

G. PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN TIROSINA 14 EN LA MIGRACIÓN CELULAR E INVASIÓN

La fosforilación en Y14 de caveolina-1 por Src quinasas parece ser un evento esencial para el aumento en la migración celular inducido por caveolina-1. En células metastásicas de cáncer de mama (MDA-MB-231), que expresan altos niveles de caveolina-1, se observa un alto grado de fosforilación de ésta en Y14 en comparación a células cancerígenas no metastásicas (Joshi et al., 2008). Resultados de nuestro laboratorio utilizando las células MDA-MB-231 y de melanoma murino B16F10, las cuales no expresan E-cadherina, muestran que caveolina-1 promueve un aumento en la migración celular de manera dependiente de la fosforilación de caveolina-1 en Y14. Todas estas funciones de caveolina-1 fueron bloqueadas por la inhibición de la fosforilación de caveolina-1 en Y14 tanto de manera farmacológica como por la utilización de caveolina-1 mutada que no es fosforilable (Y14F). La habilidad de caveolina-1 para promover un aumento en la migración celular en células metastásicas se relaciona con un aumento en la activación de Rac1, pero no requiere de la acumulación de caveolina-1 en la parte trasera de la célula (Urra et al., 2012). La fosforilación de caveolina-1 en Y14 se ha relacionado a eventos como aumento en el crecimiento independiente de anclaje y migración celular por un mecanismo dependiente de Grb7 (Lee et al., 2000), la activación de metaloproteasas de matriz y un aumento en la invasión celular (Labrecque et

al., 2004), la internalización de microdominios de membrana regulados por integrinas (del Pozo et al., 2005) y la formación de caveolas inducida por EGF (Orlichenko et al., 2006). Por lo tanto, es de gran importancia determinar cómo caveolina-1 y específicamente su fosforilación en Y14, aumenta la migración celular en células metastásicas y cómo la expresión de E-cadherina interfiere en este proceso.

H. CAVEOLINA-1, E-CADHERINA Y LA REPROGRAMACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

La proliferación crónica y descontrolada es una de las características principales de las células cancerígenas (Hanahan et al., 2011), y requiere de la reprogramación del metabolismo energético celular para proveer los intermediarios metabólicos necesarios para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Baenke et al., 2013). En condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa a piruvato a través de la glicólisis en el citosol y luego a CO₂ en la mitocondria; sin embargo, frecuentemente las células cancerígenas son capaces de reprogramar su metabolismo, a un metabolismo principalmente glicolítico en presencia de oxígeno, lo que es conocido como el efecto Warburg (Warburg, 1956a ; Warburg., 1956b). Esta reprogramación metabólica parece ser poco eficiente, ya que las células deben compensar una menor eficiencia en la producción de ATP, lo que se logra por una

sobreexpresión de transportadores de glucosa como GLUT1 y por un aumento en la captación de glucosa (Jones et al., 2009; DeBerardinis et al., 2008). Sin embargo una mayor tasa glicolítica permite a las células cancerígenas utilizar el nutriente extracelular más abundante, la glucosa, para producir grandes cantidades de ATP, lo que les permitiría migrar e invadir rápidamente, además, la degradación de la glucosa proveería a las células de intermediarios metabólicos necesarios para las vías biosintéticas (Han et al., 2013). Por lo tanto, el efecto Warburg suple tanto las necesidades bioenergéticas como biosintéticas de las células cancerígenas. Como consecuencia de este cambio metabólico, se observa un aumento de la producción de ácido láctico por las células de cáncer (Gatenby et al., 2003) lo cual induce la muerte de las células normales (Williams et al., 1999) y la degradación de la matriz extracelular lo que aumenta la capacidad de las células de cáncer para migrar e invadir (Lardner et al., 2001; Han et al., 2013).

Existen antecedentes que vinculan a caveolina-1 con la reprogramación metabólica de células estromales de mama, donde la pérdida de la expresión de caveolina-1 en estas células es suficiente para inducir un aumento en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), en la autofagia, la glicólisis y la disminución del metabolismo respiratorio mitocondrial, favoreciendo la progresión tumoral (Martinez-Outschoorn et al., 2014; Chen et al., 2014); sin embargo, poco se sabe acerca de cómo la expresión de caveolina-1 podría afectar el metabolismo de las células de cáncer.

La relación entre E-cadherina y la reprogramación del metabolismo es aún menos conocida. En muestras clínicas de cáncer colorectal se ha observado una relación entre la disminución de la expresión de E-cadherina con el aumento de la expresión de la enzima Piruvato quinasa M2. Esta enzima mantiene la glicólisis aeróbica en células madres cancerígenas, lo que se correlaciona con un aumento en la migración e invasión de células de cáncer de colon (Konno, et al., 2015). En *Drosophila* la Fat (Ft) cadherina funciona en la mitocondria, regulando directamente la integridad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, promoviendo la fosforilación oxidativa, y la pérdida de Ft lleva a la pérdida de la actividad del complejo mitocondrial I, aumentando la cantidad de ROS intracelulares, favoreciendo un cambio metabólico a glicólisis aeróbica (Sing, et al., 2014). Por lo tanto, la determinación del fenotipo metabólico de las células y cómo éste se ve afectado por la expresión de caveolina-1, E-cadherina o su co-expresión, puede dar luces del mecanismo por el cual caveolina-1 puede ejercer su rol dual en la progresión tumoral y como E-cadherina regularía ambas funciones.

I. REGULACIÓN DEL COMPLEJO CAVEOLINA-1/E-CADHERINA/ β - CATENINA POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINA

La interacción de β -catenina con el dominio intracelular de las cadherinas es regulada por la fosforilación en tirosina de β -catenina por varias proteínas

quinasas como: Fyn, Fer (Y142), cMet (Y489), Src y EGF-R (Y654) (Balsamo et al., 1996; Roura et al., 1999). La fosforilación de β -catenina en tirosina, resulta en la pérdida de la adhesión célula-célula en células neurales, principalmente por el desensamblaje del complejo formado por N-cadherina y β -catenina (Balsamo et al., 1996). La desfosforilación de β -catenina promueve la formación de los complejos E-cadherina- β -catenina y α -catenina en las adhesiones célula-célula en queratinocitos humanos (Roura et al., 1999; Patel et al., 2003). Resultados de nuestro laboratorio indican que el secuestro de β -catenina a la membrana plasmática con E-cadherina está favorecida por la expresión de caveolina-1. Postulamos entonces que la presencia de caveolina-1 en el complejo formado por E-cadherina y β -catenina puede contribuir a la disminución de la fosforilación de β -catenina en Y654 por Src, mediante alguno de los siguientes mecanismos: (1) La fosforilación de caveolina-1 en Y14 recluta a Csk al complejo formado por E-cadherina y β -catenina, Csk inhibiría a Src fosforilandola en Y527 (fosforilación inhibitoria de Src) lo que llevaría a una estabilización del complejo; (2) Caveolina-1 podría reclutar a una proteína fosfatasa al complejo E-cadherina/ β -catenina lo que disminuiría la fosforilación de β -catenina y de la misma caveolina-1.

Otros estudios realizados usando espectroscopía de masas de proteínas que co-inmunoprecipitan con caveolina-1 en células de cáncer de colon que expresan E-cadherina [HT29(ATCC)], revelaron la presencia de proteínas activadoras de fosfatasas de tirosina, Liprin-2 α y -4 α , las cuales pueden

interaccionar con el dominio fosfatasa de la familia LAR a través de su dominio COOH-terminal (Serra-Pages et al 1998). Sin embargo, en células de cáncer de colon que no expresan E-cadherina [HT29(US)], las cuales corresponden a una selección a partir de las células HT29(ATCC) por su mayor potencial metastásico, se observó un patrón distinto de las proteínas que co-inmunoprecipitaron con caveolina-1. Específicamente, no fue detectada la presencia de Liprin-2 α y -4 α , lo que sugiere que su presencia podría depender de la expresión de E-cadherina (tesis doctoral de D. Rodríguez, 2009).

La relación entre caveolina-1 y fosfatasas no ha sido muy estudiada, sin embargo, existen algunas posibles candidatas que podrían desfosforilar a caveolina-1 en Y14. Park et al., mostraron que el estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno, promueve la fosforilación de la tirosina fosfatasa SHP-2 endógena en astrocitos, donde forma un complejo proteico con caveolina-1 nativa y no con la mutante de caveolina-1 no fosforilable (Y14A), no permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre caveolina-1 y Csk, favoreciendo de esta forma la fosforilación de Src en Y419 y por lo tanto la activación de las vías de señalización mediadas por Src en astrocitos (Jo et., 2014; Park et al., 2015).

La tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) suprime la transformación celular inducida por los oncogenes *Neu* y *v-Src*, la activación de Src y la oncoproteína p210^{bcr-abl}. La sobre-expresión de PTP1B disminuye la fosforilación en Y14 de caveolina-1 en células COS-7, mientras que la inhibición de PTP1B induce la fosforilación de

caveolina-1 *in vitro* e *in vivo* (Lee et al., 2006). La interacción entre N-cadherina y β -catenina en células neuronales está regulada por PTP1B, lo que sugiere que PTP1B estaría desfosforilando a β -catenina (Sheth et al., 2007). Además, en células Caco2 la fosforilación de β -catenina en Y331, Y333, Y654 y Y670 disminuye la interacción con E-cadherina, lo mismo se observa cuando se sobreexpresa un dominante negativo de PTP1B (Sheth et al., 2007).

La tirosina fosfatasa no receptora tipo 14 (PTPN14), conocida también como Pez, PTP36 o PTPD2, que posee un dominio N-terminal FERM (4.1, ezrina, radixina, moesina) y un dominio C-terminal fosfatasa (Wyatt et al., 2008). PTPN14 regula la adhesión célula-célula y matriz-célula, la migración y el crecimiento celular (Zhang et al., 2013). Además existen antecedentes que indican que PTPN14 regula la expresión génica de TGF- β , modulando de esta forma la transición epitelio-mesénquima (Wyatt et al., 2007) y también regula la fosforilación de β -catenina (Wadham et al., 2003). El silenciamiento del homólogo de PTPN14 en Zebrafish resulta en defectos en el desarrollo (Wyatt et al., 2007). Además en células de cáncer colorectal, PTPN14, desfosforila a p130Cas en Y128, la cual es fosforilada por Src, induciendo una disminución en la migración, formación de colonias y crecimiento independiente de anclaje, lo que se comprobó utilizando una mutante de p130Cas que no puede ser fosforilada (Y128F) (Zhang et al., 2013).

Para determinar cual de estas fosfatasas podría ser una buena candidata, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de caveolina-1 en células de

melanoma murino, B16F10, que expresan caveolina-1 y en células que co-expresan caveolina-1 y E-cadherina, los inmunoprecipitados fueron analizados mediante espectrometría de masa y se observó que en células que co-expresan caveolina-1 y E-cadherina la tirosina fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 (Objetivo Específico 3).

Estos antecedentes sumados a que el aumento en la migración celular inducida por caveolina-1 requiere de su fosforilación en Y14 nos llevan a proponer el siguiente modelo. La co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina en las células metastásicas favorece el reclutamiento de una proteína fosfatasa (PTP), posiblemente PTPN14, al complejo E-cadherina/ β -catenina lo que induce la desfosforilación de β -catenina Y654 y caveolina-1 Y14, disminuyendo la actividad de Rab-5 y Rac1 con la consecuente disminución en la migración e invasión celular (Figura 3).

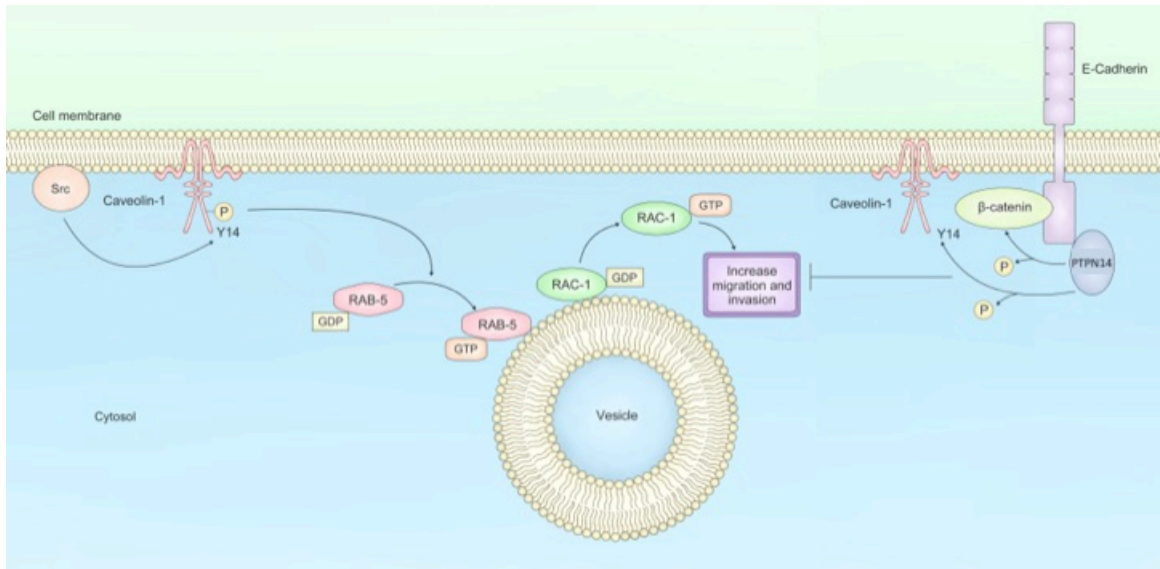


Figura 3. Modelo Propuesto.

En células metastásicas carentes de E-cadherina, la fosforilación en tirosina (Y14) de caveolina-1 favorece la activación de Rab-5 lo que induce la activación de Rac-1 promoviendo un aumento en la migración e invasión celular. En presencia de E-cadherina se forma un complejo multiproteico con β-catenina y caveolina-1 reclutando a la fosfatasa PTPN14, ésta desfosforila a caveolina-1 en la tirosina 14 y a β-catenina en la tirosina 654 reduciendo la habilidad de caveolina-1 para promover migración e invasión celular.

RESUMEN DE ANTECEDENTES

1. Caveolina-1 necesita de la expresión de E-cadherina y la posterior formación de un complejo proteico con ésta, para ejercer su función de proteína supresora de tumores condicional.
2. La expresión de E-cadherina en células de melanoma murino disminuye la capacidad de caveolina-1 para promover metástasis pulmonar *in vivo*.
3. Caveolina-1 en ausencia de E-cadherina, aumenta la migración, invasión y metástasis de células metastásicas de manera dependiente de su fosforilación en el residuo de tirosina 14.
4. Caveolina-1 es capaz de aumentar la migración de células cancerígenas metastásicas de manera dependiente de la activación de Rab-5 y Rac-1.
5. En células estromales de mama la pérdida de la expresión de caveolina-1 induce un aumento de ROS, de la glicólisis y la disminución del metabolismo respiratorio mitocondrial, favoreciendo la progresión tumoral. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo la expresión de caveolina-1 podría afectar el metabolismo de células de cáncer.
6. La fosforilación en tirosina de caveolina-1 mediada por Src kinasas puede disminuir por la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina en células metastásicas.

7. Caveolina-1 fosforilada en Y14 puede ser desfosforilada por distintas proteínas fosfatasas, dentro de las cuales PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina.

En base a los antecedentes mencionados, se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

En presencia de E-cadherina se recluta a la proteína tirosina fosfatasa PTPN14 al complejo multiproteico formado con caveolina-1 lo que reduce la habilidad promotora de migración y metástasis de caveolin-1 por la disminución de la fosforilación de ésta en tirosina 14.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre la fosforilación en la tirosina 14 de caveolina-1 (Y14) y la migración e invasión celular en células cancerígenas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre los niveles de fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina y la migración e invasión celular.
2. Estudiar la participación de Src en la fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina en presencia y ausencia de E-cadherina.
3. Determinar si los complejos proteicos formados con caveolina-1 en presencia de E-cadherina contienen PTPN14, la que contribuye a la desfosforilación de caveolina-1 en tirosina 14.
4. Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre la activación de Rab-5 y Rac-1.
5. Caracterizar de los cambios metabólicos inducidos por la expresión caveolina-1 y la variación de éstos por la co-expresión con E-cadherina.

II. METODOLOGÍA

1. LINEAS CELULARES

a) Metastásicas

B16F10: Línea celular de melanoma murino generada a partir de 10 ciclos de inoculación y recuperación en el pulmón de células B16F0 en ratones C57BL/6, éste último corresponde al modelo animal utilizado en este trabajo. Se caracteriza por ser una línea tumoral adherente y altamente metastásica que no expresa caveolina-1 por lo que fueron transfectadas establemente con los vectores pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1), para expresar caveolina-1 de manera inducible por IPTG y con los vectores pLacIOP-CAV1-Y14F (mutante no fosforilable), pLacIOP-CAV1-Y14E (mutante fosfomimética) para estudiar el efecto de la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 (Ortiz et al., 2016). Para generar líneas establemente transfectadas se seleccionó las células con 750 µg/ml de higromicina por 3 semanas y las líneas celulares fueron caracterizadas mediante Western blot.

HT29(US): Línea celular de adenocarcinoma de colon humano derivada de la línea celular HT29(ATCC) obtenidas directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Torres et al., 2007). Estas células fueron transfectadas

establemente con los vectores pLacIOP y pLacIOP-caveolina-1, para re-expresar CAV1, generando los clones M1 y C14 respectivamente (Bender et al., 2000).

MDA-MB-231: Línea celular humana de cáncer de mama, que expresa endógenamente altos niveles de caveolina-1, por lo que fue transducida con constructos shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) (Figura 4) o con un constructo shScramble (shC) como control (Sigma- Aldrich Co.) (Urrea et al., 2012).

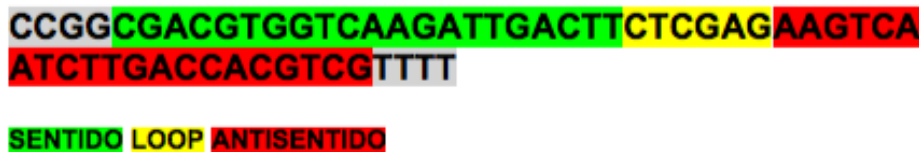


Figura 4. Secuencia de la horquilla de shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 en células MDA-MB-231 clon # 1-5.

Células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores de empaquetamiento viral (pMDL, pVSV y pREV) más el plásmido que contiene la secuencia de interés (pLKO.1) conteniendo la secuencia del shScramble o la secuencia contra caveolina-1. Las células se incubaron por 48-96 h en estufa de cultivo. Pasado el tiempo de incubación, se tomó el sobrenadante de la placa usando una jeringa, y el medio fue filtrado usando un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μm . Posteriormente, las células MDA-MB-231 fueron transducidas usando el sobrenadante diluido 1:5 con medio DMEM-F12 10% SFB y mantenidas en estufa de cultivo por 24-48 h. Pasado el tiempo de infección, las células fueron seleccionadas con puromicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 7 días antes de ser usadas.

Las líneas celulares metastásicas no expresan E-cadherina por lo que fueron transfectadas con el vector pBATEM2 para la expresión transitoria de E-cadherina (Torres et al., 2007).

b). No Metastásicas

HT29(ATCC): Línea celular de adenocarcinoma de colon humano obtenidas directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

DLD1: Línea celular humana de adenocarcinoma de colon.

Ambas líneas celulares expresan bajos niveles de caveolina-1 por los que fueron transfectadas establemente con los vectores pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1), para expresar caveolina-1 de manera inducible por IPTG.

Cada línea celular fue mantenida en el medio de cultivo respectivo, RPMI 1640 (B16F10 y DLD1), DMEM-F12 (MDA-MB-231) y DMEM High Glucosa (HT29(US) y HT29(ATCC)) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml) a 37 °C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.

2. MATERIALES

a) Cultivo celular

Tabla 1. Lista de reactivos utilizados en cultivo celular.

NOMBRE	ABREV.	DESCRIPCIÓN	FABRICANTE	No. CAT.
Medio Roswell Park Memorial Institute 1640	RPMI	Medio de cultivo	Gibco Life Technologies	23400-021
Medio Dulbecco's Modified Eagle High Glucose	DMEM-HG	Medio de cultivo	Gibco Life Technologies	12800-017
Medio Dulbecco's Modified Eagle-Nutrient Mixture F-12	DMEM-F12	Medio de cultivo	Gibco Life Technologies	12400-024
Penicilina/Estreptomina	PSN	Mezcla de antibióticos	Gibco Life Technologies	15640-055
Suero Fetal Bovino	SFB	Suplemento para medio de cultivo	Biological Industries	040011 ^a
Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	IPTG	Compuesto que imita a la alolactosa, inductor de la expresión proteica	US Biological	18500
Tampón Fosfato Salino	PBS	Tampón Fosfato Salino	Gibco Life Technologies	70013
Tripsina-EDTA	-	Tripsina recombinante	Gibco Life Technologies	25200072
Higromicina B	-	Antibiótico de selección	US Biological	H9700-0513

Tabla 1. Lista de reactivos utilizados en cultivo celular. En la tabla se muestran los reactivos utilizados en cultivo celular, su origen y número de catalogo.

b) Reactivos generales

Los reactivos para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (catálogo No. 23223 y 23224) y los Dynabeads® acoplados a proteína A (catálogo No. 10001D) fueron obtenidos en ThermoFisher Scientific. El EZ-ECL (catálogo No. 20-500-1000) proviene de Biological Industries. El kit para ensayos de proliferación MTS® (catálogo No. G3582) y la tripsina utilizada en espectrometría de masa (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, catálogo No. V5280) provienen de Promega (Madison, WI, USA). El reactivo de transfección Fugene 6 (catálogo No. 11814443001) fue comprado a Roche. La proteína A/G sefarosa (catálogo No. sc-2003) proviene de Santa Cruz. El antioxidante N-acetilcisteína (catálogo No. A8199), las tinciones para los ensayos de migración e invasión, Cristal violeta (catálogo No. HT90132) y Azul de Toluidina (catálogo No. 198161) respectivamente y los reactivos utilizados en las determinaciones metabólicas; Piruvato (catálogo No. P2256), FCCP (catálogo No. C2920), Rotenona (catálogo No. R8875), Oligomicina A (catálogo No. 75351), Glucosa (catálogo No. G8270), 2-DG (catálogo No. D8375), Glutamina (catálogo No. G3126), Succinato (catálogo No. W327700), Antimicina A (catálogo No. A8674), Ascorbato (catálogo No. A4034) y TMPD (catálogo No. 87890) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich. El permeabilizador de membrana XF (XF PMP, catálogo No. 102504-100) proviene de Seahorse Bioscience, Aligent Technologies.

c) Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal (catálogo No. C13620) y policlonal (catálogo No. C610060) anti caveolina-1, el anticuerpo anti pY14-caveolina-1 (catálogo No. 611339), el anticuerpo anti β -Catenina (catálogo No. 610154), el anticuerpo monoclonal anti E-cadherina (catálogo No. 610182), el anticuerpo anti Rac-1 (catálogo No. 610651) y el anticuerpo anti PTP1B (catálogo No. 610140) se obtuvieron en BD Transduction Laboratories. El anticuerpo policlonal anti β -Actina se obtuvo en Sigma-Aldrich (catálogo No. A5060). El anticuerpo policlonal anti E-cadherina (catálogo No. sc-7870) y el anticuerpo anti Rab-5 (catálogo No. Sc-46692) provienen de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo anti pY654- β -Catenina (catálogo No. ab24925) proviene de ABCAM. El anticuerpo anti pY416-Src (catálogo No. 2101) se obtuvo desde Cell Signaling y el anticuerpo anti PTPN14 (catálogo No. MAB4458) proviene de R&D Systems. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (catálogo No. 1706516) y anti-IgG de conejo (catálogo No. 1706515) acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (HRPO) provienen de Bio-Rad Laboratories.

d) Plásmidos

Los plásmidos pLacIOP para la expresión de caveolina-1 wild-type y las mutantes Y14F e Y14E y el plásmido pBATEM2 para la expresión de E-cadherina han sido descritos previamente por trabajos de nuestro laboratorio (Bender et al., 2000; Torres et al., 2007; Urra et al., 2012; Lobos-González et

al., 2013; Ortiz et al., 2016). Los plásmidos sensores de peróxido de hidrogeno (HyPer) mitocondrial (pHyPer-dMito, No. FP942) y citoplasmático (pHyPer-cyto, No. FP941) fueron obtenidos en EVROGEN (Moscú, Rusia). El plásmido para expresión de la fosfatasa PTPN14; wild-type (pcDNA3-V5-PTPN14-wt, No. 61003) proviene de Addgene (Cambridge, MA, USA).

3. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Se incubó 18 µl del reactivo de transcripción Fugene 6® (Roche) más 582 µl de OPTIMEM por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 6 µl de DNA plasmidial a esta mezcla, se homogenizó por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Las células fueron incubadas con tripsina por 5 min a 37 °C. 3×10^6 células se mezclaron con 600 µl de mezcla de transfección y se agregaron a una placa de cultivo de 10 cm más 5400 µl de medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB.

4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y WESTERN BLOT

Los extractos proteicos se obtuvieron arrastrando las células con 600 µl PBS frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 1 mM, Na_3VO_4 1mM, NaF 10 mM, Benzamida 100 µg/ml, Antipaina 10 µg/ml y Leupeptina 12,5 µg/ml). Se centrifugó el lisado por 6 min a 400 x g a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se sonicó en tampón (Hepes 0.2 mM pH 7.4, SDS 10 %, Benzamidina 10

$\mu\text{g/ml}$, Leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1mM). Se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando placas de 96 mm y se leyó la absorbancia de las muestras a 562 nm utilizando el equipo de ELISA VersaMax (Molecular Device, Sunnyvale, USA). El equivalente de 50 μg de proteína total se denaturó a 95 °C por 5 min en tampón Laemmli. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS al 12%. Después de la separación, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 75 min. Luego la membrana se bloqueó por 1 h en leche descremada al 5 % para proteínas no fosforiladas y en gelatina 10 % en PBS-Tween (PBS-T) para caveolina-1 y β -catenina fosforiladas a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios en agitación, como se describe en la Tabla 2 por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se incubaron en agitación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo acoplado a HRPO (1:5000) en PBS-T por 1 h a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante el sistema EZ-ECL (Biological Industries) y la señal fue capturada por un sistema de quimioluminiscencia modelo Discovery 12iC de Ultralum (Claremont, CA USA). Las bandas obtenidas en el inmunoblot fueron digitalizadas y analizadas densitométricamente, utilizando el programa ImageJ 1.34 software.

Tabla 2. Anticuerpos Primarios utilizados para Western blot.

ANTICUERPO	ISOTIPO	DILUCIÓN	
Caveolina-1	Policlonal /Conejo	1:5000	Leche 5% - PBS
Caveolina-1	Monoclonal/Ratón	1:3000	Leche 5% - PBS
pY14-Caveolina-1	Monoclonal/Ratón	1:3000	Gelatina 10% - PBS-Tween 0.1%
pY416-Src	Policlonal /Conejo	1:1000	Gelatina 10% - PBS-Tween 0.1%
β -Actina	Policlonal /Conejo	1:5000	Leche 5% - PBS
E-cadherina	Monoclonal/Ratón	1:3000	Leche 5% - PBS
E-cadherina	Policlonal /Conejo	1:3000	Leche 5% - PBS
β -Catenina	Monoclonal/Ratón	1:3000	Leche 5% - PBS
pY654- β - Catenina	Monoclonal/Ratón	1:200	Gelatina 10% - PBS-Tween 0.1%
PTP1B	Monoclonal	1:1000	Leche 5% - PBS
PTPN14	Monoclonal	2 μ g/ml	Leche 5% - PBS
Rac-1	Monoclonal/Ratón	1:3000	Leche 5% - PBS
Rab-5	Monoclonal/Ratón	1:3000	Leche 5% - PBS

Tabla 2. Anticuerpos Primarios utilizados para Western blot. En la tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados para Western blot, su origen, la dilución y matriz proteica utilizada.

5. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN (MTS)

Se sembró 1×10^4 células en placas de 96 pocillos y la proliferación celular fue evaluada usando el kit de proliferación MTS® (Promega), se agregó 20 μ l de la mezcla MTS:PMS en una razón de 20:1 a cada pocillo. Estos fueron incubados por 1 h y 2 h a 37 °C. Finalmente, se determinó la reducción del compuesto MTS en formazan por medición de la absorbancia a 490 nm (lector de ELISA VERSA Max, Molecular Devices).

6. ENSAYOS DE MULTIHERIDA

Este protocolo fue adaptado del descrito por Chiang (Chiang et al., 2007). Se sembró 6×10^5 células en placas de 6 cm. Cuando las células llegaron a una confluencia de 80% y formaron una monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con tampón fosfato salino (PBS). Luego del lavado se agregó medio sin o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 45 y 60 min) y posteriormente se realizaron los extractos proteicos los que fueron guardados a -20°C , para su posterior análisis por Western blot.

7. ENSAYOS DE TRANSMIGRACIÓN EN CÁMARA DE BOYDEN

Los ensayos fueron realizados en cámaras de Boyden (Transwell™ Costar, 6.5 mm de diámetro, 8 μm de tamaño de poro). Las cámaras fueron pretratadas con 100 μl de fibronectina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la parte inferior a 4°C 18 h antes del experimento. Al día siguiente se lavó los insertos con 500 μl de PBS para retirar el exceso de fibronectina y se agregó 500 μl de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Se sembró 1.5×10^4 células suspendidas en medio de cultivo en ausencia de suero, en la parte superior de cada inserto. Las células se dejaron migrar por 2 h en el caso de las células B16F10 y MDA-MB-231 o 5 h para las HT29(US) a 37°C tiempo después del cual se fijaron y tiñeron las

células capaces de migrar con 500 µl de una solución de cristal violeta (cristal violeta 0.1 % en metanol 20 %) durante 30 min. Se eliminó el exceso de colorante y cuidadosamente se eliminó las células que no migraron (las que quedaron en la cara superior del inserto), dejando solo las que migraron hacia la cara interior del inserto. Se contó el número de células que migraron en 6 campos diferentes utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40X.

8. ENSAYOS DE INVASIÓN EN MATRIGEL

Los ensayos de invasión fueron realizados en insertos cubiertos con Matrigel (BD Biosciences, # 354480). Previamente, los insertos fueron re-hidratados por 2 h a 37 °C, luego se agregó 500 µl de medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB a cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Se sembraron 1.5×10^4 células en 100 µl en medio de cultivo libre de suero en la cara superior de cada inserto y se evaluó la capacidad de las células de invadir por 22 h a 37 °C, para esto las células que quedaron en la cara superior del inserto (células que no invadieron) fueron eliminadas, y las que invadieron el matrigel fueron fijadas por 2 min en metanol frío, para luego ser teñidas con azul de toluidina al 1%. Se cortó cuidadosamente las membranas de cada inserto con un bisturí y se montaron con Mowiol. Se contó el número total de células invasivas en la membrana, utilizando un aumento de 40X en el microscopio óptico.

9. ENSAYO DE METÁSTASIS EN RATONES C57BL/6

Ratones C57BL/6 de 8-12 semanas de edad recibieron una inyección intravenosa (i.v) por la vena lateral de la cola de 2×10^5 células B16F10 (Mock), B16F10 (CAV1), B16F10 (CAV1-PTPN14-wt). Luego de 21 días post inyección los animales fueron sacrificados, para posteriormente extraer los pulmones, los cuales se fijaron en solución de Feketes (Ausubel et al., 1996). Una vez fijados los pulmones, se pesó el órgano completo y luego se separó y se pesó la masa tumoral (masa negra) y se determinó el porcentaje de ocupación tumoral. Simultáneamente se evaluó la presencia de metástasis en otros órganos.

10. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE ROS

Para determinar si existe un aumento en la producción de ROS, las células fueron transfectadas como se indicó en el punto 3 con los sensores de peróxido de hidrogeno (HyPer) mitocondrial (pHyPer-dMito) o citoplasmático (pHyPer-cyto) los que son excitables a 420 y 500 nm y emiten a 516 nm. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en un FACS Canto (Beckton Dickinson).

11. PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD PARA RAB-5 Y RAC1

Esta metodología permite enriquecer desde un extracto celular la fracción activa de Rab-5 (Rab-5-GTP) y Rac-1 (Rac-1-GTP) al incubar el homogenizado celular con una proteína de fusión constituida por la enzima Glutación-S-Transferasa

(GST) fusionada al motivo de unión a Rab-5 y Rac-1 en sus formas activas respectivamente. Los dominios de unión son PBD (dominio de unión a p21) para Rac-1 y R5BD (dominio de unión a Rab-5, de la proteína Rabptina5) para Rab-5 las que fueron producidas y purificadas en nuestro laboratorio (Torres et al., 2008).

12. INMUNOPRECIPITACIÓN CON PROTEINA A/G AGAROSA

Las células fueron recolectadas con PBS suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 10 mM, Benzamida 100 µg/ml, Antipaina 10 µg/ml y Leupeptina 12,5 µg/ml) en hielo, posteriormente fueron lisadas por 15 min con Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP40 1% y el coctel de inhibidores descritos anteriormente, el homogenizado se centrifugó a 16000 x g por 2 min y se determinó la concentración de proteínas mediante el método del BCA en el sobrenadante. Al menos 2 g de proteínas fueron inmunoprecipitadas con 2,5 µg de anticuerpo primario (anti caveolina-1 policlonal o anti E-cadherina policlonal) por 3 h a 4 °C con rotación. Luego se agregaron 25 µl de una mezcla 1:1 de proteína A/G agarosa, durante 12 h con rotación a 4°C. A continuación la suspensión se centrifugó a 1500 x g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en 70 µl tampón de carga para su posterior análisis por Western blot junto al sobrenadante como input.

13 INMUNOPRECIPITACIÓN CON ESFERAS METÁLICAS ACOPLADAS A PROTEÍNA A PARA ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se transfirieron 50 µl de las esferas metálicas (Dynabeads® Protein A, novex life technologies) acopladas a proteína A por condición, se colocaron en una gradilla magnética para separar las esferas de la solución y se removió el sobrenadante. Se agregó 2,5 µg de anticuerpo primario (anti caveolina-1 policlonal) diluido en 200 µl de PBS-Tween 0.1 % y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en rotación, posteriormente el tubo fue colocado en una gradilla magnética con el fin de separar las esferas metálicas de la solución, la cual fue eliminada.

Las células se recolectaron con Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP40 1% suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 10 mM, Benzamida 100 µg/ml, Antipaina 10 µg/ml y Leupeptina 12,5 µg/ml) en hielo, posteriormente fueron lisadas, el homogenizado se centrifugó a 16000 x g por 2 min y se determinó la concentración de proteínas mediante el método del BCA en el sobrenadante. Al menos 2 mg de proteínas en 500 µl de PBS-Tween 0.1 % fueron incubadas por 2 h a temperatura ambiente junto a las esferas metálicas acopladas al anticuerpo primario en rotación, posteriormente las esferas metálicas fueron separadas y lavadas tres veces con PBS e incubadas en 70 µl tampón de carga para su posterior análisis por Western blot o fueron digeridas con tripsina para su análisis por espectrometría de masa.

14 ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITADOS POR ESPECTROSCOPIA DE MASA

A 50 μ l de los inmunoprecipitados obtenidos como se mencionó anteriormente, se les agregó 44 μ l de NH_4HCO_3 50 mM y luego fueron incubadas con 1 μ l de DTT 0.5 M a 56°C por 20 min, posteriormente se agregó 2.7 μ l de iodoacetamida 0.55 M y las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente en oscuridad por 15 min. 5 μ l de las muestras fueron sometidas a digestión con 2 μ l de Tripsina 1 μ g/ μ l (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) a 37°C toda la noche. Los péptidos obtenidos fueron analizados en un equipo de cromatografía capilar de fase reversa con ionizador de electrospray acoplado a un espectrómetro de masa (MS/MS) con trampa de iones (LTQ) según lo descrito por Vaisar (Vaisar et al., 2007).

15.DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO DE CÉLULAS METASTÁSICAS

Se sembró 2×10^5 células B16F10, 1×10^5 células HT29(US) Mock o CAV1 y 4×10^5 células MDA-MB231 shCAV1 o shC las cuales fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, en placas de 24 pocillos XF24, luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio Seahorse Bioscience XF24 Calibrant pH 7.4, suplementado con piruvato 100 mM y glucosa 5.5 mM a 37°C. Se realizaron 4 mediciones cada 10 min. Posteriormente, las células fueron tratadas con Oligomicina 1 μ M, carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-

hidrazona (FCCP) 0.5 μ M y Rotenona 100 nM, después de cada tratamiento se realizaron 4 mediciones cada 10 min. El consumo de oxígeno, fue determinado por los cambios en la emisión de un fluoróforo sensible a oxígeno embebido en el sensor del analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse (Seahorse Bioscience, Aligent Technologies).

16. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD GLICOLÍTICA DE CÉLULAS METASTÁSICAS

Se sembró 2×10^5 células B16F10, 1×10^5 células HT29(US) Mock o CAV1 y 4×10^5 células MDA-MB231 shCAV1 o shC las cuales fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, en placas de 24 pocillos XF24, luego de 24 h se agregó 225 μ l de medio DMEM suplementado con NaCl 143 mM, L-glutamina 2 mM y glucosa 10 mM, pH 7.35, pre calentado a 37°C, se removió 25 μ l de medio desde cada pocillo y las células fueron lavadas dos veces con 300 μ l del medio mencionado anteriormente, finalmente se agregaron 225 μ l de medio por pocillo. Se realizaron 3 mediciones, cada 10 min. Posteriormente, las células fueron tratadas con glucosa 10 mM, Oligomicina 1 μ M y 2-Deoxiglucosa (2-DG) 100 mM, después de cada tratamiento se realizaron 3 mediciones cada 10 min. Se determinó la acidificación del medio extracelular como medida de la actividad glicolítica de las células, determinado por los cambios en la emisión de un fluoróforo sensible a protones embebido en el sensor del analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse el cual fue hidratado en PBS a 37°C por 12 h.

17. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS

RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES

Se sembró 2×10^5 células B16F10 (Mock) o (CAV1) las cuales fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, en placas de 24 pocillos XF24. Luego de 24 h, las células fueron permeabilizadas utilizando 1 nM del reactivo XF PMP (XF Plasma Membrane Permeabilizer, Seahorse Bioscience, Aligent Technologies) más ADP 4 mM en medio MAS 1X (ver tabla 3), suplementado con Piruvato 10 mM, como sustrato del complejo mitocondrial I. Inmediatamente después de la adición del reactivo permeabilizante se comenzó la medición del consumo de oxígeno, se realizaron 3 mediciones cada 4 min. Posteriormente, las células fueron tratadas con Rotenona 2 μ M, Succinato 10 mM, Antimicina A 2 μ M y Ascorbato 10 mM más TMPD 100 μ M; después de cada tratamiento se realizaron 3 mediciones cada 4 min. Se determinó el consumo de oxígeno por cambios en la emisión del fluoróforo sensible a oxígeno embebido en el sensor del analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse (Seahorse Bioscience, Aligent Technologies).

Tabla 3. Reactivos utilizados para la preparación del medio de ensayo MAS

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DE MEDIO DE ENSAYO MAS 3X
Manitol	660 mM
Sacarosa	210 mM
KH ₂ PO ₄	30 mM
MgCl ₂	15 mM
HEPES	6 mM
EGTA	3 mM
Fatty Acid Free BSA	0.6 % (m/v)

18. ANÁLISIS DEL METABOLOMA

Se sembró 6×10^5 células B16F10 (Mock) y (CAV1) en placas de 10 cm. Luego de 24 h se realizó la extracción de los metabolitos utilizando metanol : etanol (1:1), las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrometría de masa. Generando resultados de los metabolitos ionizados positiva y negativamente. Los resultados fueron analizados utilizando el software Markerlynx application manager que realiza la detección automática de los peaks seguido por el análisis de los componentes principales que determina los 100 componentes principales (masa y el tiempo de retención) que contribuyen significativamente a la varianza observada dentro de cada set de datos. Posteriormente se generó un Heat map utilizando un análisis de agrupación jerárquica sin supervisión; luego, los tiempos de retención obtenidos fueron comparados con la base de datos Metabosearch (Metabolome Analysis: An Introduction, by Villas-Bôas, S.G., et al 2007).

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces por separado. Los datos se presentan como promedio \pm S.E.M. La significancia estadística se analizó con el test no- paramétrico de Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones entre distintos grupos, con un post test de Dunn y con el test no-paramétrico de Mann-Whitney para comparación entre dos grupos. Para el análisis de los datos, un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo.

III. RESULTADOS

1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre los niveles de fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina y la migración e invasión celular.

La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células metastásicas.

La fosforilación de caveolina-1 en Y14 parece ser un evento esencial para el aumento en la migración, células metastásicas presentan niveles elevados de caveolina-1 fosforilada en Y14 en comparación a células cancerígenas no metastásicas (Joshi et ., 2008). Además la expresión de E-cadherina es capaz de bloquear el efecto promotor de la metástasis de caveolina-1 *in vivo* (Lobos-González et al., 2013). Estos antecedentes nos llevaron a preguntar si la expresión de E-cadherina tiene un efecto sobre la fosforilación de caveolina-1, para esto se realizaron ensayos de multiherida para inducir la migración en células metastásicas, las cuales no expresan E-cadherina. Se utilizaron las células de melanoma murino, B16F10, las células de adenocarcinoma de colon humano, HT29(US) las que fueron transfectadas con el vector pLacIOP-

caveolina-1 (CAV1) para la re-expresión de caveolina-1 y las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, las que expresan altos niveles de caveolina-1. Se realizaron ensayos de Western blot con muestras obtenidas luego de 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min de migración posterior a la multihierida, donde se observó que luego de 30 min de haber realizado la multihierida existe un aumento significativo en la fosforilación de caveolina-1 en Y14 en células B16F10 (Figura 5A) y MDA-MB-231 (Figura 7A) y luego de 15 min de inducida la migración en células HT29(US) (Figura 6A).

Las tres líneas celulares fueron transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina utilizando el plásmido pBATEM2, la viabilidad de las células metastásicas transfectadas con E-cadherina fue analizada como control y se observó que la transfección del plásmido pBATEM2 no produce cambios en la viabilidad celular (Figura Suplementaria 1). Posteriormente se analizó el estado de fosforilación de caveolina-1 en Y14 luego de la inducción de la migración y se observó que la transfección del plásmido pBATEM2 no produce cambios en la viabilidad celular (Figura suplementaria 1A, y B). Posteriormente se analizó el estado de fosforilación de caveolina-1 en Y14 luego del ensayo de multihierida mencionado anteriormente y se observó que en las tres líneas celulares metastásicas, la expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en Y14 inducida luego de un estímulo migratorio, disminuyendo incluso la fosforilación de caveolina-1 inducida por el tratamiento con peróxido de hidrogeno (utilizado como control positivo, 5 mM por 20 min) (Figura 5B, 6B y

7B). Por lo tanto en ausencia de E-cadherina existe un aumento significativo de la fosforilación de caveolina-1 en Y14 luego de un estímulo migratorio, sin embargo, en presencia de E-cadherina no se observa el aumento en la fosforilación de caveolina-1 en Y14.

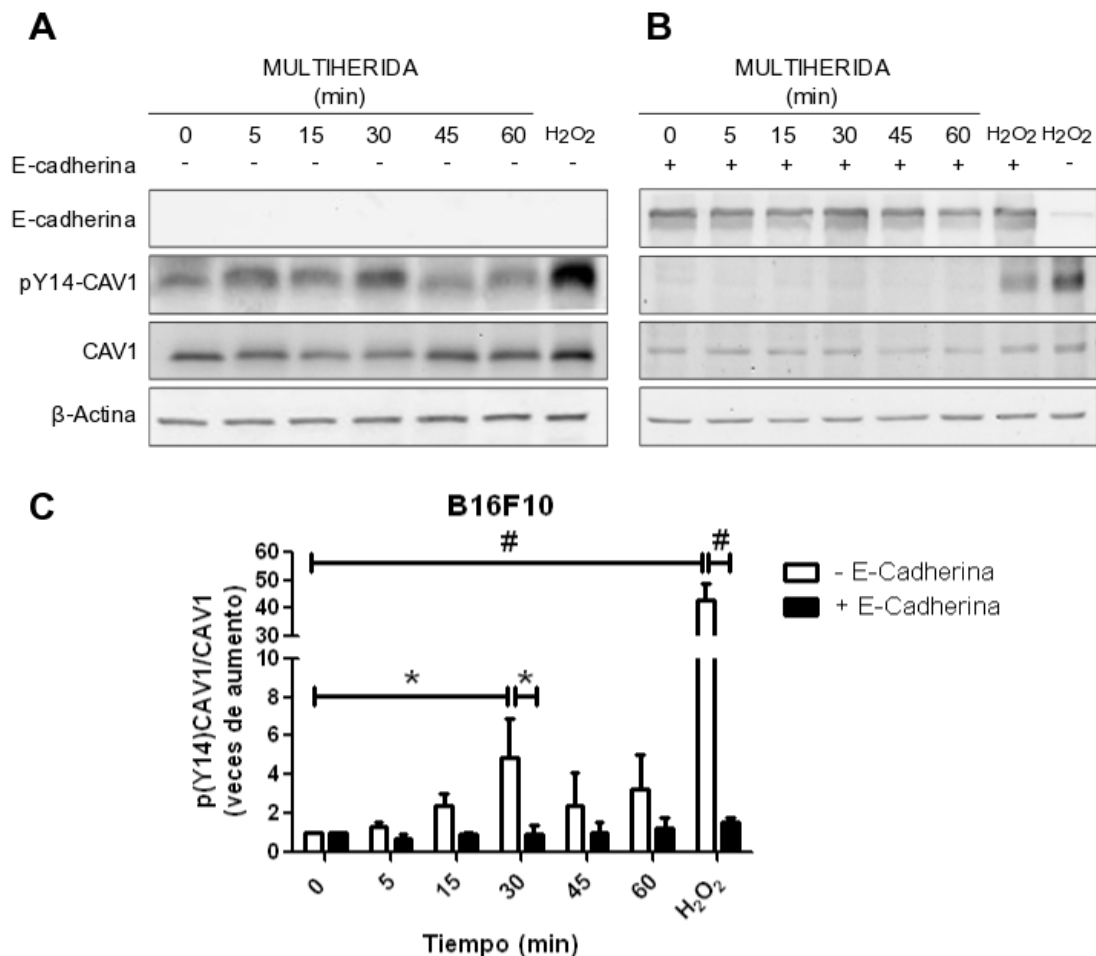


Figura 5. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10.

(A) Se sembraron 6×10^5 células B16F10 transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin suero (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Las células fueron incubadas por 20 min con H₂O₂ 5 mM, como control positivo. (B) Se realizó lo mencionado anteriormente con células B16F10 (CAV1) transfectadas con 2 µg del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de caveolina-1 fosforilada en Y14 (pY14-CAV1), caveolina-1 (CAV1), E-cadherina y β-actina. (C) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio ± SEM) de la relación pY14-CAV1 / CAV1 normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (# $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

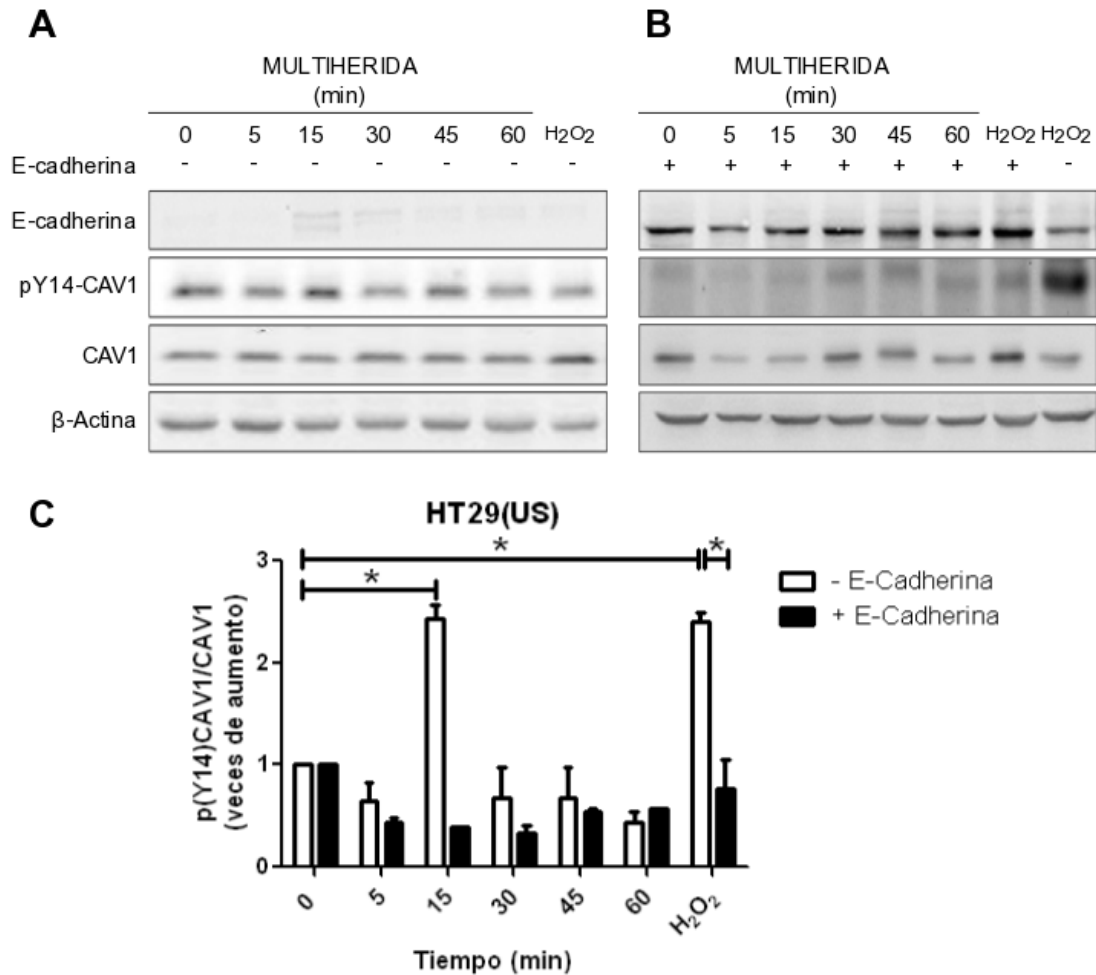


Figura 6. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células HT29(US).

(A) Se sembraron 6×10^5 células HT29(US) transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin suero (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Las células fueron incubadas por 20 min con H₂O₂ 5 mM, como control positivo. (B) Se realizó lo mencionado anteriormente con células HT29(US) (CAV1) transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de caveolina-1 fosforilada en Y14 (pY14-CAV1), caveolina-1 (CAV1), E-cadherina y β -actina (C) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) de la relación pY14-CAV1 / CAV1 normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (* p<0.05).

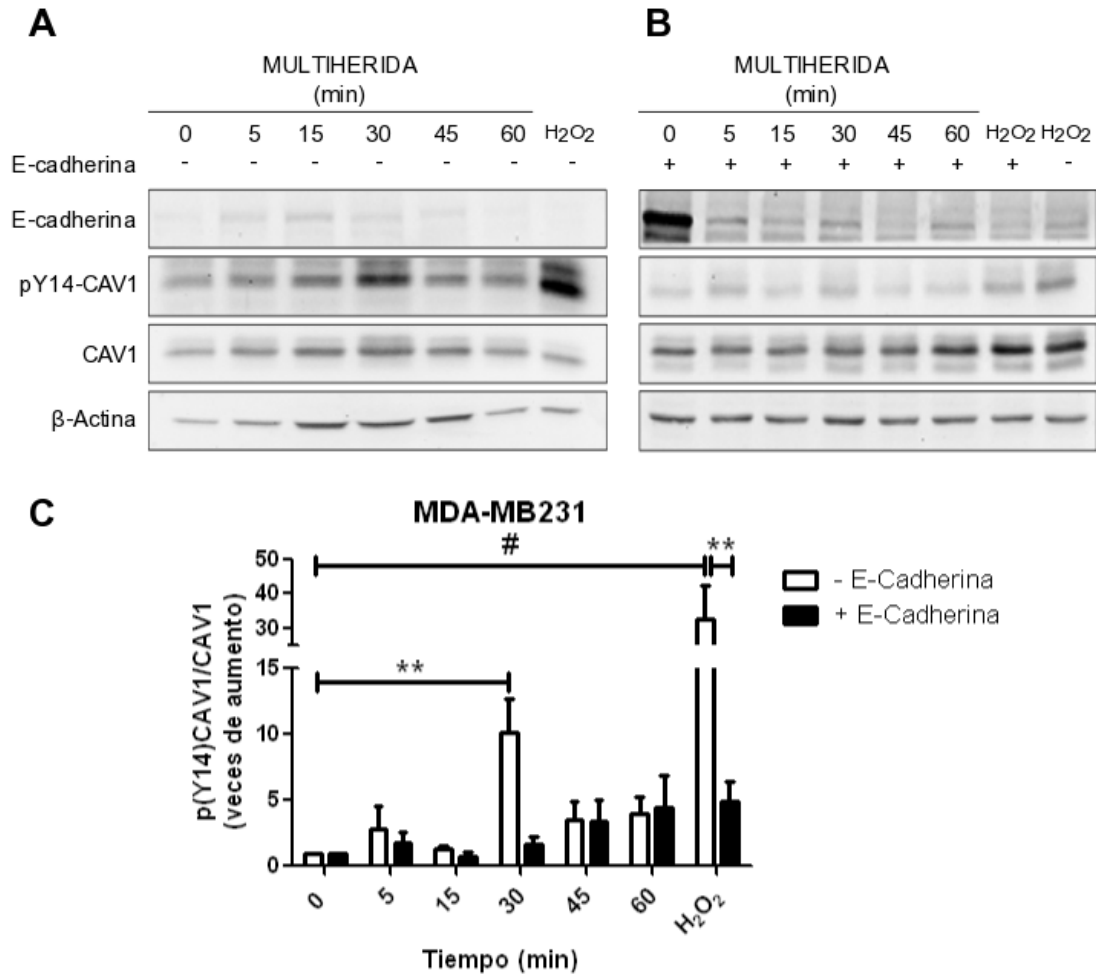


Figura 7. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células MDA-MB-231.

(A) Se sembraron 6×10^5 células MDA-MB-231 (shC) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin suero (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). (B) Se realizó lo mencionado anteriormente con células MDA-MB-231 (shC) transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de caveolina-1 fosforilada en Y14 (pY14-CAV1), caveolina-1 (CAV1), E-cadherina y β -actina. (C) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) de la relación pY14-CAV1 / CAV1 normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (# $p < 0.001$, ** $p < 0.005$).

La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células no metastásicas.

Debido a que la expresión de E-cadherina es capaz de inhibir la fosforilación de caveolina-1 en la Y14 en células metastásicas que normalmente no expresan E-cadherina, se quiso determinar qué ocurre con el estado de fosforilación de caveolina-1 en células de cáncer no metastásicas que expresan E-cadherina de manera endógena. Con este fin, se realizaron ensayos de multiherida para inducir la migración en células humanas de cáncer de colon DLD-1 las cuales expresan E-cadherina y bajos niveles de caveolina-1, fueron transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1). Se realizaron ensayos de Western blot con muestras obtenidas luego de 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min de migración posterior a la multiherida, donde se observó que si bien existen niveles basales de fosforilación de caveolina-1 en Y14, no existe un aumento de ésta luego de un estímulo migratorio (Figura 8). Por lo tanto, en células que normalmente expresan E-cadherina, caveolina-1 no se fosforila en Y14 luego de un estímulo migratorio.

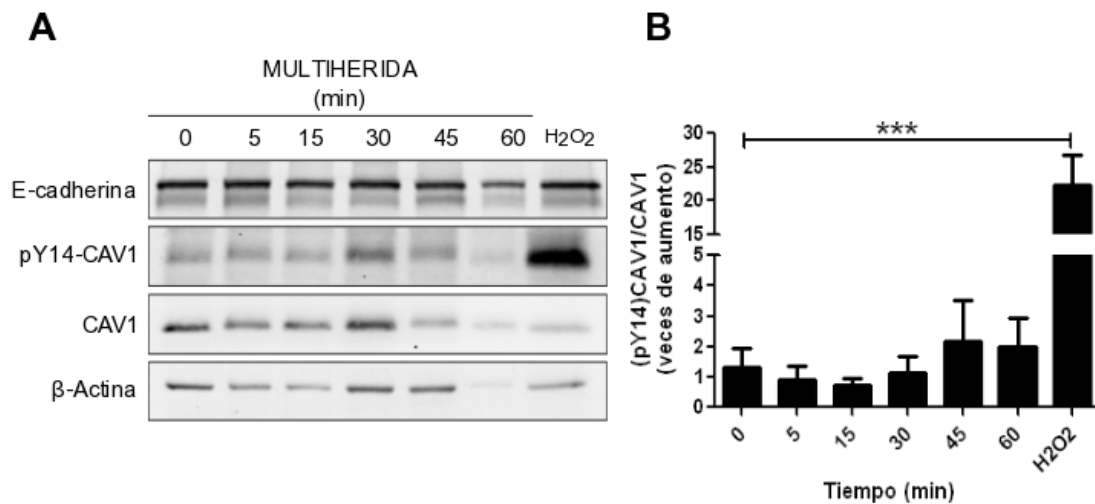


Figura 8. En células que expresan E-cadherina, caveolina-1 no se fosforila luego de un estímulo migratorio.

(A) Se sembraron 6×10^5 células DLD1 transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Las células fueron incubadas por 20 min con H₂O₂ 5 mM, como control positivo. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de caveolina-1 fosforilada en Y14 (pY14-CAV1), caveolina-1 (CAV1), E-cadherina y β-actina (B) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio ± SEM) de la relación pY14-CAV1 / CAV1 normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (***) $p < 0.001$).

Efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre los niveles de fosforilación en tirosina 654 de β -catenina.

La interacción de β -catenina con el dominio intracelular de las cadherinas es regulada por la fosforilación en tirosina de β -catenina, siendo una de las fosforilaciones más descritas, la fosforilación en la tirosina 654 (Y654) (Roura et al., 1999). La fosforilación de β -catenina en tirosina, resulta en la pérdida de la adhesión célula-célula principalmente por el desensamblaje del complejo formado por E-cadherina- β -catenina- α -catenina (Balsamo et al., 1996). Se quiso determinar el estado de fosforilación de β -catenina en Y654 en ausencia y en presencia de E-cadherina. Para esto se realizaron ensayos de multihierda con las células metastásicas B16F10 y HT29(US) que fueron transfectadas para la expresión de caveolina-1 utilizando el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1). Se realizaron ensayos de Western blot luego de 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min de migración posterior a la multihierda, donde se observó que en estas células metastásicas β -catenina no se encuentra fosforilada en Y654 (Figura 9A y 9C). Posteriormente se quiso determinar si la expresión de E-cadherina alteraría el estado de fosforilación de β -catenina en Y654, para esto las células B16F10 (CAV1) y HT29(US) (CAV1) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y se realizaron ensayos de multihierda como se mencionó anteriormente con un posterior análisis mediante Western blot donde se observó que en presencia de E-cadherina, β -catenina tampoco se encuentra

fosforilada en Y654 (Figura 9B y 9D). En base a estos resultados se puede concluir que en los modelos celulares metastásicos B16F10 y HT29(US), la fosforilación de β -catenina en Y654 no es la involucrada en la mantención de la integridad del complejo con E-cadherina.

Debido a que ambas líneas metastásicas utilizadas anteriormente no expresan caveolina-1 de manera endógena, se quiso investigar si existía una diferencia en el estado de fosforilación de β -catenina en células metastásicas que expresan caveolina-1 endógenamente, para esto se utilizaron las células MDA-MB-231 y se realizaron ensayos de multihierida como se mencionó anteriormente y se observó que luego de 60 min de inducida la migración existe un aumento significativo de la fosforilación de β -catenina en Y654 (Figura 10).

El siguiente paso fue determinar qué ocurría con la fosforilación de β -catenina en Y654 en células MDA-MB-231 que expresan E-cadherina, para esto las células MDA-MB-231 fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y se realizó un nuevo ensayo de multihierida y se observó que en células MDA-MB-231 la expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de β -catenina en Y654 (Figura 10B). Por lo tanto en ausencia de E-cadherina existe un aumento significativo de la fosforilación de β -catenina en Y654 en las células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231, que expresan caveolina-1 endógenamente, pero la expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de β -catenina en Y654.

Por último se quiso determinar que ocurría con el estado de fosforilación de β -catenina en células no metastásicas que normalmente expresan E-cadherina, para esto se utilizó la línea celular de cáncer de colon, DLD1 donde se expresó caveolina-1, mediante la transfección con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1), se realizaron ensayos de multiherida como se mencionó anteriormente (Figura 11) y se observó que no existe un aumento significativo en la fosforilación de β -catenina en Y654, luego de un estímulo migratorio (Figura 12A y B), lo cual es concordante con los antecedentes que mencionan que en éstas células caveolina-1, E-cadherina y β -catenina están formando un complejo (Torres et al., 2007; Rodríguez et al., 2009).

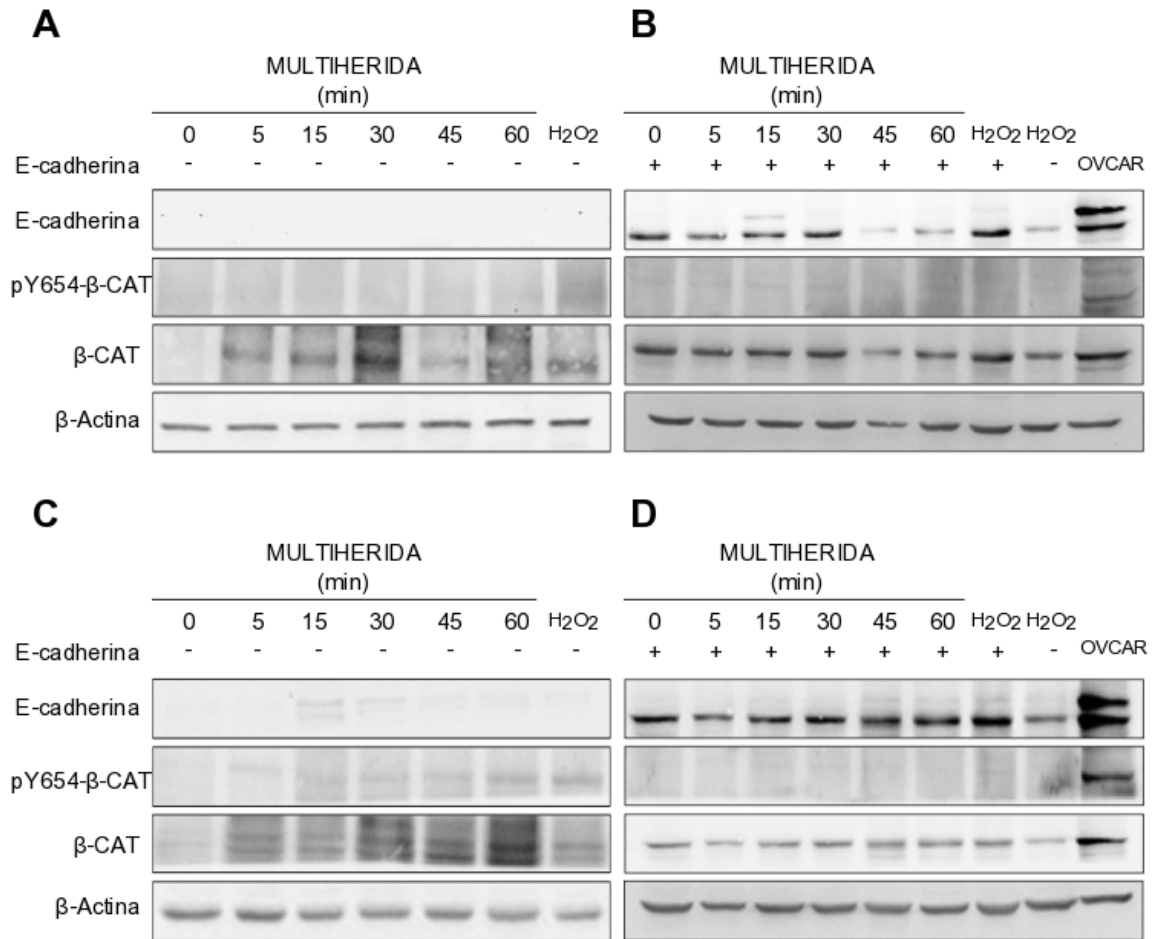


Figura 9. β-catenina no se fosforila en Y654 en células metastásicas B16F10 y HT29(US).

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10 y (C) HT29(US) transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Se realizó lo mencionado anteriormente con células (B) B16F10-CAV1 y (D) HT29(US)-CAV1 transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de β-catenina fosforilada en Y654 (pY654-β-CAT), β-catenina (β-CAT), E-cadherina y β-actina. Se muestran Western blot representativos de 3 experimentos independientes. Se utilizaron las células de cáncer de ovario, OVCAR como control positivo de la fosforilación de β-catenina en Y654.

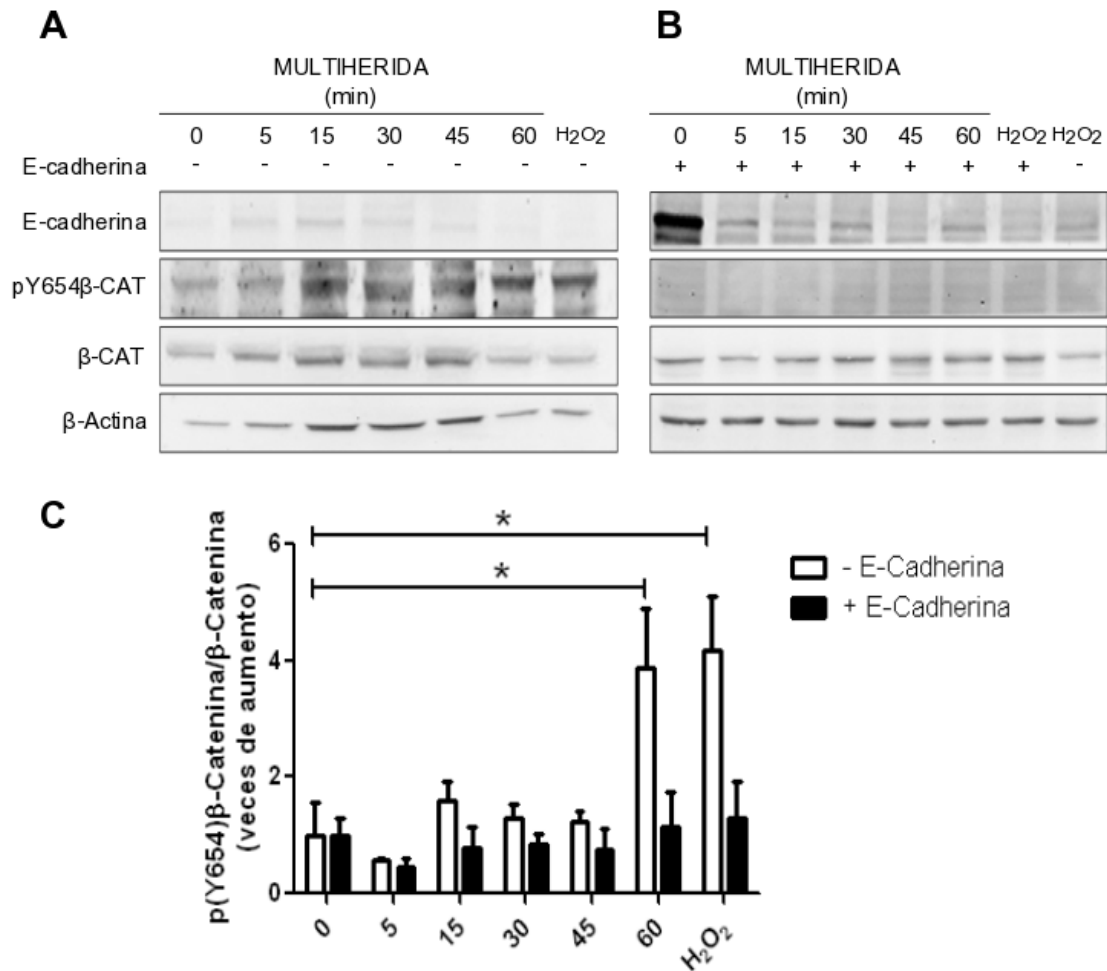


Figura 10. La expresión de E-cadherina inhibe la fosforilación de β-catenina en la tirosina 654 en células MDA-MB-231.

(A) Se sembraron 6×10^5 células MDA-MB-231 shScr en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Las células fueron incubadas por 20 min con H₂O₂ 5 mM, como control positivo. (B) Se realizó lo mencionado anteriormente con células MDA-MB-231 shScr transfectadas con 2 μg del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de β-catenina fosforilada en Y654 (pY654-β-catenina), β-catenina, E-cadherina y β-actina. (C) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio ± SEM) de la relación pY654-β-catenina / β-catenina normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (* p<0.0

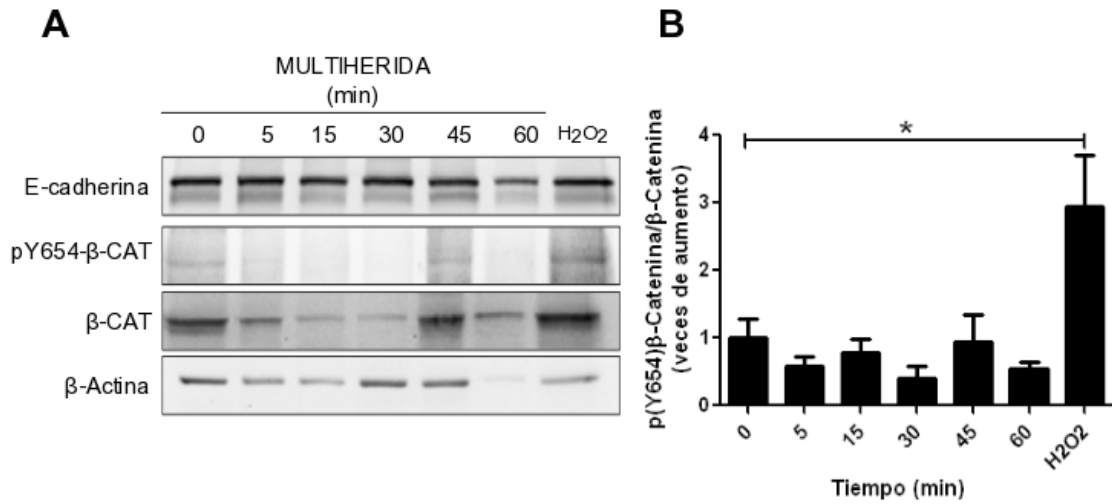


Figura 11. En células que expresan E-cadherina, β-catenina no se fosforila luego de un estímulo migratorio.

(A) Se sembraron 6×10^5 células DLD1 transfectadas con el vector pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 6 cm, una vez formada la monocapa se hizo múltiples heridas con un peine metálico con un ancho de la punta de 0.35-0.40 mm y una distancia entre puntas de 0.6-0.7 mm para cubrir una superficie mayor al 50% de la superficie total. La monocapa de células se lavó con PBS. Luego del lavado se agregó medio sin (tiempo 0) o con 3% de SFB para estimular la migración y a distintos tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Las células fueron incubadas por 20 min con H_2O_2 5 mM, como control positivo. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot β-catenina fosforilada en Y654 (pY654-β-CAT), β-catenina (β-CAT), E-cadherina y β-actina. (B) El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) de la relación pY654-β-CAT/β-CAT normalizada respecto a la condición control (tiempo 0). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (* $p < 0.05$).

La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la migración celular inducido por caveolina-1 en células metastásicas.

El rol de caveolina-1 en la migración celular es controversial y depende del contexto celular, ya que se le ha atribuido tanto un rol positivo como negativo. Trabajos de nuestro laboratorio han reportado que en células metastásicas B16F10 y MDA-MB-231 la expresión de caveolina-1 favorece la migración celular en 2D (Urrea et al., 2012; Lobos-González et al., 2013) y la expresión de E-cadherina es capaz de suprimir el aumento de la migración de células de melanoma murino B16F10 en ensayos de herida y de células de melanoma humano en 3D, además de suprimir la habilidad de caveolina-1 para promover metástasis *in vivo* (Lobos-González et al., 2013). Es por esto que se quiso determinar si en las líneas celulares metastásicas la expresión de caveolina-1 es capaz de inducir un aumento de la transmigración celular (3D) y además estudiar el efecto de la expresión de E-cadherina sobre la migración celular. Para esto se realizaron ensayos de migración en transwell con las células metastásicas; B16F10 y HT29(US) que no expresan caveolina-1 (Mock), como con las que expresan caveolina-1 (CAV1) y con células MDA-MB-231 que expresan caveolina-1 (shC) las que fueron transducidas con un shRNA para el silenciamiento de la expresión de caveolina-1 (shCAV1). Además se expresó de manera transitoria E-cadherina y se analizó la capacidad migratoria de las células por 2 h, en el caso de las células B16F10 y MDA-MB-231 y por 5 h para las células HT29(US).

La expresión de caveolina-1 indujo un aumento significativo en la migración celular en las tres líneas celulares metastásicas utilizadas y la expresión de E-cadherina fue capaz de suprimir este aumento (Figura 12). Por lo tanto, la expresión de E-cadherina es capaz de inhibir la migración celular, uno de los procesos más importantes involucrados en la metástasis.

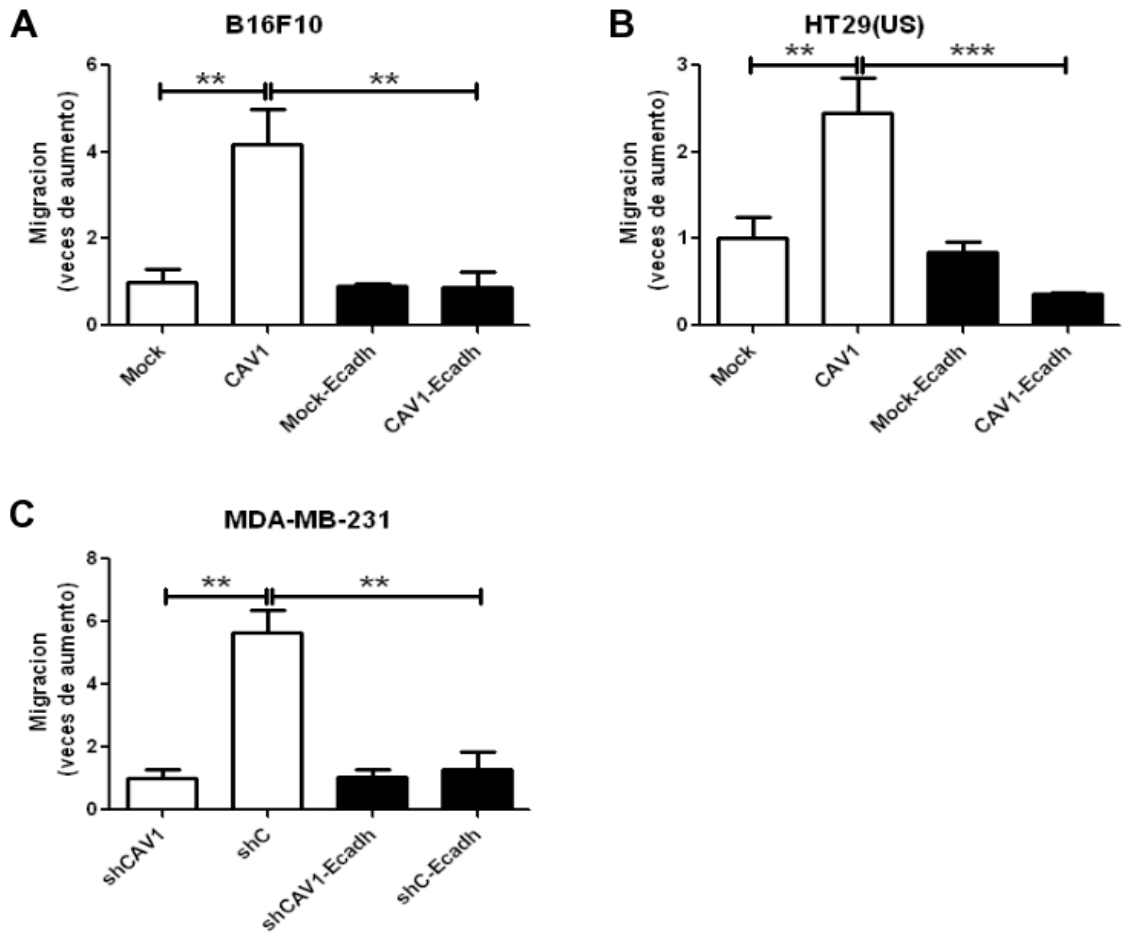


Figura 12. La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la migración celular inducido por caveolina-1 en líneas celulares metastásicas.

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10, (B) HT29(US) transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) o (C) células MDA-MB-231 transducidas con shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) o con un constructo control shScramble (shC) en placas de 6 cm, 24 h después fueron transfectadas con $2 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h en el caso de las B16F10 o 24 h para las HT29(US) con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se sembraron 1.5×10^4 células en transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de $8 \mu\text{m}$ cubiertos con fibronectina ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$), se agregó medio de cultivo con 10% SFB en el pocillo inferior, las células se dejaron migrar en ausencia de suero durante 2 h (B16F10 y MDA-MB-231) o 5 h (HT29(US)). Después de este tiempo, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta/metanol por 30 min. Las células que no migraron, y que se encuentran en la parte superior del transwell, fueron eliminadas. Se contó el número de células que migraron en 6 campos. Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) del número de células que migraron por campo en cada condición fue normalizado por el número de células sin CAV1 (Mock o shCAV1). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas en relación a las células Mock están indicadas (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la invasión celular inducida por caveolina-1 en células metastásicas.

Para evaluar el rol promotor de metástasis de caveolina-1 y el efecto de la expresión de E-cadherina sobre la capacidad metastásica, se analizó la capacidad invasiva de las células metastásicas B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231, en matrigel. Este ensayo se realizó tanto en las células que no expresan caveolina-1, B16F10 (Mock), HT29(US) (Mock) y MDA-MB-231 (sh-CAV1), como en las que expresan caveolina-1 B16F10 (CAV1), HT29(US) (CAV1) y MDA-MB-231 (shC). Además se expresó de manera transitoria E-cadherina utilizando el vector de expresión pBATEM2. En este ensayo las células que tienen la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular pueden atravesar los poros de las membranas de los insertos. Las células B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231 con y sin caveolina-1 que expresaron o no E-cadherina fueron sembradas en la parte superior del inserto en ausencia de suero y se dejaron invadir por 22 h, tiempo después del cual se cuantificó las células que atravesaron la membrana de los insertos con matrigel. Se observó que las células que expresaron caveolina-1 (B16F10 (CAV1), HT29(US) (CAV1) o MDA-MB-231 (sh-C)) tenían una mayor capacidad invasiva (Figura 13) de alrededor de 60 veces en el caso de las células B16F10 (CAV1) (Figura 13A), 2 veces en el caso de las células HT9(US) (CAV1) (Figura 13B) y 80 veces en el caso de las células MDA-MB-231 (shC) (Figura 13C) en relación a las células

que no expresan caveolina-1; sin embargo, la expresión de E-cadherina es capaz de bloquear este aumento en la invasión llegando a niveles similares a las células control (Mock o shCAV1) (Figura 13). Por lo tanto, caveolina-1 es capaz de potenciar otro de los pasos esenciales de la metástasis, la invasión, y la expresión de E-cadherina bloquea el aumento en la invasión inducido por caveolina-1, lo que se correlaciona con la inhibición del rol promotor de metástasis de caveolina-1, descrito por nuestro laboratorio (Lobos-González et al., 2013).

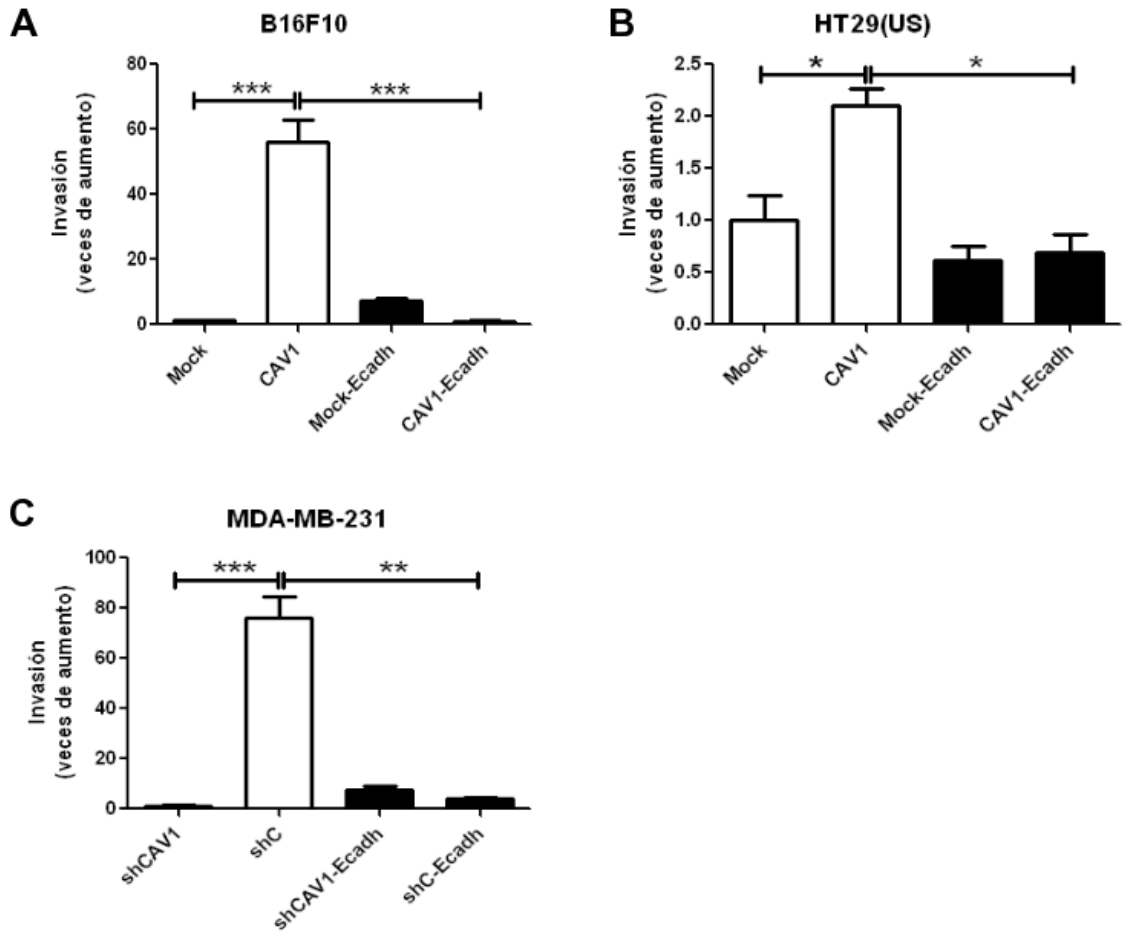


Figura 13. La expresión de E-cadherina inhibe el aumento en la invasión celular inducida por caveolina-1 en líneas celulares metastásicas.

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10, (B) HT29(US) transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) o (C) células MDA-MB-231 transducidas con shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) o con un constructo control shScramble (shC) en placas de 6 cm, 24 h después fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h en el caso de las B16F10 o 24 h para las HT29(US) con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se sembraron 1.5×10^4 células en insertos que contienen matrigel, se agregó medio de cultivo con 10% SFB en el pocillo inferior, las células se dejaron invadir en ausencia de suero durante 24 h. Después de este tiempo, las células fueron fijadas con metanol por 2 min y teñidas con azul de toluidina por 30 min. Se contó el número total de células que fueron capaces de invadir. Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) del número de células que invadieron en cada condición fue normalizado por el número de células que no expresan CAV1 (Mock o ShCAV1). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

La expresión de E-cadherina no es capaz de inhibir la migración e invasión inducida por la expresión de caveolina-1 fosfomimética.

Debido a que la expresión de E-cadherina es capaz de inhibir la fosforilación de caveolina-1 en Y14 y la promoción de la migración e invasión por caveolina-1 se quiso determinar el efecto de la expresión de E-cadherina sobre la migración e invasión de células B16F10 que expresan una caveolina-1 mutada que no puede ser fosforilada en la tirosina 14 (Y14F) o una fosfomimética (Y14E) (Ortiz et al., 2016) las cuales fueron transfectadas de manera transitoria para la expresión de E-cadherina y se analizó la capacidad migratoria de las células por 2 h (Figura 14A) y la capacidad invasiva por 24 h (Figura 14B).

La expresión de una caveolina-1 no fosforilable (Y14F) bloquea la capacidad de migrar e invadir de las células B16F10 (Figura 14 A y B), en cambio la expresión de una caveolina-1 donde el residuo de tirosina 14 fue cambiado por un residuo de ácido glutámico (Y14E) induce un aumento aun mayor en la migración e invasión (aproximadamente 10 y 130 veces, respectivamente) en relación a las células que no expresan caveolina-1 (Mock) (Figura 14 A y B).

La expresión de E-cadherina como se mostró en las Figuras 12A y 13A, es capaz de inhibir el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1, este no es el caso, cuando las células expresan una caveolina-1 fosfomimética de su fosforilación en Y14 (Y14E), donde la expresión de E-cadherina disminuye la migración e invasión en relación a las células B16F10 (CAV1-

Y14E) que no expresan E-cadherina, pero está significativamente aumentada en comparación a las células Mock y células CAV1. Por lo tanto, la fosforilación en Y14 de caveolina-1 es un evento esencial para la promoción de la migración e invasión inducida por caveolina-1.

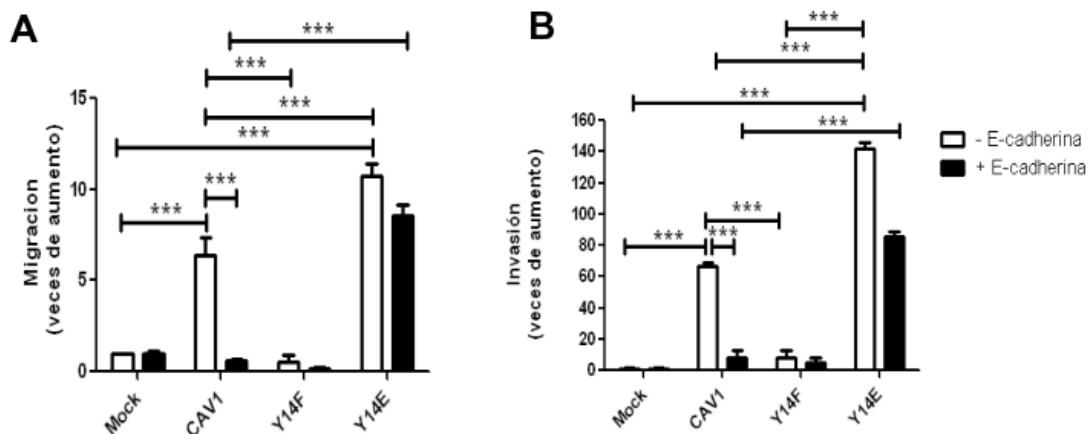


Figura 14. La expresión de E-cadherina no es capaz de inhibir la migración e invasión inducida por la expresión de caveolina-1 fosfomimética.

Se sembraron 6×10^5 células B16F10 (Mock), (CAV1), CAV1-Y14F (Y14F, mutante no fosforilable), CAV1-Y14E (Y14E, mutante fosfomimética) en placas de 6 cm, 24 h después fueron transfectadas con $2 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se sembraron 1.5×10^4 células en (A) transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de $8 \mu\text{m}$ cubiertos con fibronectina ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$), se agregó medio de cultivo con 10% SFB en el pocillo inferior, las células se dejaron migrar en ausencia de suero durante 2 h. Después de este tiempo, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta/metanol por 30 min. Las células que no migraron, y que se encuentran en la parte superior del transwell, fueron eliminadas. Se contó el número de células que migraron en 6 campos o en (B) insertos que contienen matrigel, las células se dejaron invadir en ausencia de suero durante 24 h. Después de este tiempo, las células fueron fijadas con metanol por 2 min y teñidas con azul de toluidina por 30 min. Se contó el número total de células que fueron capaces de invadir. Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) del (A) número de células que migraron por campo en cada condición fue normalizado por el número de células sin CAV1 (Mock) o (B) del número de células que invadieron en cada condición fue normalizado por el número de células que no expresan CAV1 (Mock). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (***) $p < 0.001$.

2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Estudiar la participación de Src en la fosforilación en tirosina 14 de caveolina-1 y en tirosina 654 de β -catenina en presencia y ausencia de E-cadherina.

La activación constitutiva de Src no suprime la inhibición de la migración ejercida por E-cadherina.

La fosforilación de caveolina-1 en Y14 cumple un rol fundamental en la migración celular y la expresión de E-cadherina es capaz de inhibirla frenando de esta manera el aumento tanto en la migración como en la invasión celular inducida por caveolina-1. Por ello, es importante determinar cual es la quinasa responsable de la fosforilación de caveolina-1 en Y14. Existen antecedentes de que caveolina-1 puede ser fosforilada por las proteínas quinasas no receptoras Src, Fyn y Abl en respuesta a varios estímulos (Mastik et al., 1995; Li et al., 1996; Mastik et al., 1997; Volonte et al., 2001; Cao et al., 2002; Kimura et al., 2002; Rizzo et al., 2003; Cao et al., 2004), estos sumados a antecedentes del laboratorio que muestran que en presencia del inhibidor de la familia de las Src quinasas PP2, el aumento de la migración celular inducida por caveolina-1 es reducida (Urra et al., 2012). Se quiso investigar si era Src la quinasa involucrada en la fosforilación de caveolina-1. Para esto, se co-transfectaron células B16F10 (Mock) y (CAV1) con E-cadherina y un plásmido que codifica para una proteína Src constitutivamente activa (Src Y527F) esperando que la

activación constitutiva de Src fuese capaz de bloquear el efecto inhibitorio de E-cadherina. Se realizaron ensayos de migración por transwell observándose que en presencia de Src constitutivamente activa, E-cadherina sigue inhibiendo el aumento en la migración celular inducida por caveolina-1 (Figura 15). Por lo tanto, en este modelo de estudio, podrían estar otras quinasa involucradas en la fosforilación de caveolina-1 en Y14, como lo indica la literatura, puede ser Abl. Por el otro lado con los resultados obtenidos de los análisis de los inmunoprecipitados de caveolina-1 por espectrometría de masa (objetivo específico 3), la quinasa Fes podría estar involucrada ya que inmunoprecipita con caveolina-1 en células B16F10 (CAV1) en ausencia de E-cadherina (Tabla 4).

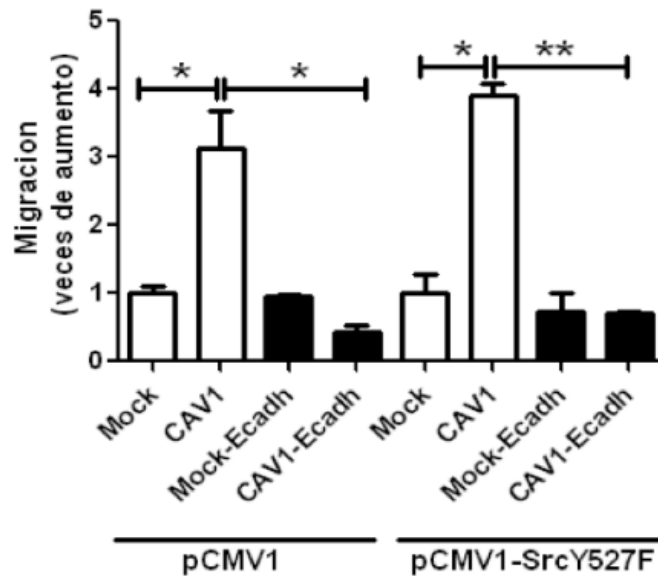


Figura 15. La activación constitutiva de Src no suprime la inhibición de la migración por E-cadherina.

Se sembraron 6×10^5 células B16F10 (Mock) y (CAV1) que fueron transfectadas o no, con el vector para la expresión de E-cadherina, pBATEM2, utilizando como medio de transfección FuGENE 6® fueron co-transfectadas con el plásmido que codifica para una proteína Src constitutivamente activa (pCMV1-SrcY527F) o con el vector vacío (pCMV1). 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se sembraron 1.5×10^4 células B16F10, en transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de 8 μm cubiertos con fibronectina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), las células se dejaron migrar en ausencia de suero durante 2 h (B16F10). Después de este tiempo, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta/metanol por 30 min. Las células que no migraron, y que se encuentran en la parte superior del transwell, fueron eliminadas. Se contó el número de células que migraron en 6 campos. El gráfico muestra el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos donde el número de células B16F10 que migraron en cada condición fue normalizado por el número de células Mock-pCMV1. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (** $p < 0.005$, * $p < 0.05$).

3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Determinar si los complejos proteicos formados con caveolina-1 en presencia de E-cadherina contienen PTPN14, la que contribuye a la desfosforilación de caveolina-1 en tirosina 14.

E-cadherina inmunoprecipita con caveolina-1 y disminuye la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10.

En este trabajo se ha mostrado que la expresión de E-cadherina es capaz de inhibir la fosforilación de caveolina-1 disminuyendo la migración e invasión celular inducida por la expresión de caveolina-1, pero el mecanismo por el cual la expresión de E-cadherina es capaz de suprimir la habilidad promotora de metástasis de caveolina-1 es desconocido. Antecedentes del laboratorio han mostrado que en presencia de E-cadherina caveolina-1 puede formar un complejo con ésta en la membrana (Torres et al., 2007). Es por esto que se quiso investigar si en células de melanoma murino B16F10 que fueron co-transfectadas para la expresión de caveolina-1 (B16F10 (CAV1)) y E-cadherina ambas proteínas co-inmunoprecipitan, para esto se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-caveolina-1 y los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos anti E-cadherina y caveolina-1. Como se observa en la Figura 16 en células B16F10 que co-expresan ambas proteínas, E-cadherina co-inmunoprecipitó con

caveolina-1. Además se observa que la caveolina-1 inmunoprecipitada se encuentra fosforilada en Y14 (Figura 16A) y cuando se expresó E-cadherina en células B16F10 (CAV1) la fosforilación de caveolina-1 en Y14 disminuyó en un 60 % en relación en células que no expresaban E-cadherina (Figura 16A). Por lo tanto en presencia de E-cadherina, caveolina-1 es capaz de formar un complejo con ésta lo cual estaría disminuyendo la fosforilación de caveolina-1 en Y14 lo que se correlacionaría con la disminución observada en la migración e invasión inducida por caveolina-1.

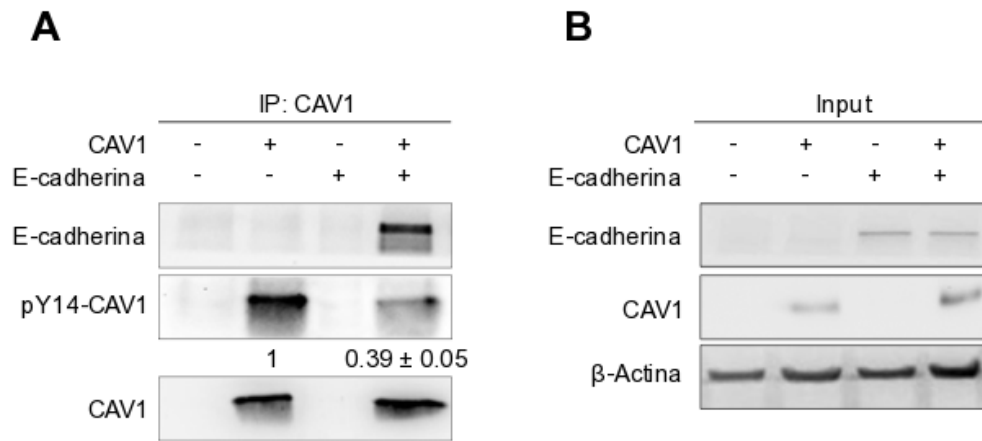


Figura 16. E-cadherina co-inmunoprecipita con caveolina-1 y disminuye la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10.

Se sembraron 1×10^6 células B16F10 transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) en placas de 10 cm, 24 h después fueron transfectadas con $6 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM), posteriormente se obtuvo los extractos celulares. (A) El extracto proteico total (2 mg) fue inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal para caveolina-1 ($2.5 \mu\text{g}$ por condición), se separó mediante SDS-PAGE y se detectó por inmunoblot la presencia de proteínas con el anticuerpo anti-E-cadherina y anti-caveolina-1 monoclonal o con el anticuerpo anti-pY14-CAV1. (B) Se muestra el inmunoblot del extracto proteico original (input) a partir del cual se realizó la inmunoprecipitación. Se muestran Western blots representativos y el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos independientes.

La fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina

En esta tesis se ha mostrado que la expresión de E-cadherina es capaz de inhibir la fosforilación de caveolina-1 disminuyendo la migración e invasión celular inducida por la expresión de caveolina-1, pero el mecanismo por el cual la expresión de E-cadherina es capaz de suprimir la habilidad promotora de metástasis de caveolina-1 es desconocido. Antecedentes del laboratorio han mostrado que en presencia de E-cadherina caveolina-1 puede formar un complejo con ésta en la membrana (Torres et al., 2007). Además en la Figura 16A se mostró que E-cadherina co-inmunoprecipita con caveolina-1 y disminuye la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 en células B16F10. Es por esto que se quiso investigar si este complejo formado por caveolina-1 y E-cadherina contiene una tirosina fosfatasa. Para esto se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de caveolina-1 utilizando un anticuerpo policlonal anti-caveolina-1 inmovilizados de manera covalente con esferas magnéticas con células de melanoma murino B16F10 que fueron co-transfectadas para la expresión de caveolina-1 (B16F10 (CAV1)) y E-cadherina. Las proteínas que co-inmunoprecipitan con caveolina-1 fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron en un equipo de cromatografía capilar de fase reversa con ionizador de electrospray acoplado a un espectrómetro de masa (MS/MS) con trampa de iones. Las proteínas y péptidos obtenidos fueron comparados

con la base de datos Mascot, utilizando el software Thermo Scientific Proteome Discoverer y se tabularon las proteínas y péptidos que solo se encontraron en células que expresan caveolina-1 (CAV1, Tabla 4, columna izquierda) y los que se encontraron solo en células que co-expresan caveolina-1 y E-cadherina (CAV1-E-Cadherina, Tabla 2, columna derecha). Luego del análisis de los inmunoprecipitados se puede observar que en células que co-expresan caveolina-1 y E-cadherina, la tirosina fosfatasa no receptora tipo 14 (PTPN14) co-inmunoprecipita con caveolina-1. No existen antecedentes previos en la literatura de que PTPN14 desfosforila a caveolina-1, sin embargo PTPN14 contiene dos motivos PPxY en su región central los que facilitan la unión a proteínas que contienen dominios WW (Barr et al., 2009). En la región aminoacídica x-y, caveolina-3, posee un dominio tipo-WW con 2 residuos de triptófano (W) separados por 29 aminoácidos y luego del segundo triptófano, se encuentra un residuo de Prolina (P) altamente conservado (W-(X)₁₈-Φ-X-Φ-W-(X)₃-P) que está implicado en la regulación de la degradación de distrofina por el proteasoma (Sotgia et al., 2000), esta región es altamente conservada en la familia de las caveolinas, por lo que caveolina-1 también posee este dominio tipo WW, por el cual podría unirse a PTPN14 y ser desfosforilada por esta fosfatasa.

Para corroborar estos resultados se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de caveolina-1 con células de cáncer de colon humano que expresan E-cadherina HT29(ATCC) y células de melanoma murino B16F10 que no

expresan E-cadherina, las que fueron transfectadas con el plásmido pBATEM2 para la expresión transitoria de E-cadherina (Figura 17). Además, se utilizaron células B16F10 que expresan caveolina-1 mutada en el residuo de tirosina 14 el que fue mutado por: (1) un residuo de fenilalanina, por lo que no puede ser fosforilada (Y14F) o (2) un residuo de ácido glutámico, por lo que actúa como una mutante fosfomimética (Y14E), las cuales también fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y mediante Western blot se buscó la presencia de las fosfatasa PTPN14 y/o PTP1B (Figura 17).

En células que expresan E-cadherina, tanto la fosfatasa PTPN14 como PTP1B co-inmunoprecipitan con caveolina-1, sin embargo en ausencia de E-cadherina solo PTP1B co-inmunoprecipita con caveolina-1, mientras que PTPN14 solo interacciona con la mutante de caveolina-1 que no puede ser fosforilada (Y14F) (Figura 17B). Por lo tanto, en células que expresan E-cadherina, esta forma un complejo con caveolina-1, lo que posiblemente es la responsable de disminuir la fosforilación de caveolina-1 en Y14, por la reclusión de la fosfatasa PTPN14. Además la fosfatasa PTP1B, también sería capaz de desfosforilar a caveolina-1 en Y14 independiente de la expresión de E-cadherina.

Tabla 4. Análisis de muestras de inmunoprecipitados de caveolina-1 en células B16F10 por espectrometría de masa.

B16F10 (CAV1)	B16F10 (CAV1/E-Cadherina)
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	Multidomain presynaptic cytomatrix protein
Histone acetyltransferase KAT6A	Titin
Tyrosine-protein kinase Fes/Fps	TopBP1-interacting checkpoint and replication regulator
Alpha-protein kinase 1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2
Protein 4732456N10Rik	Adenomatosis polyposis coli
Pleckstrin homology domain-containing family H member 2	Fatty acid synthase
Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 2	Smad1
Spermatogenesis-associated protein 17	S1 RNA-binding domain-containing protein 1
RNA exonuclease 1 homolog	Hydrocephalus-inducing protein
Kinectin	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial
Sorting nexin 14	RNA-binding protein 48
G-protein coupled receptor 75	Dennd4a, C-myc promoter-binding protein
Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1 ^a	Matrilin-3
Oog4 protein	Microtubule-actin cross-linking factor 1
Syntaxin-5	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
Nuclear envelope spectrin repeat protein 2	Serine/threonine-protein kinase WNK2
Magi3, Membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2
Protein Atp2b1	Protocadherin-17
Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3B
Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
Zinc finger CCCH domain-containing protein 6	Protein Cyp2j12
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Serine/arginine repetitive matrix protein 2
Nuclin	Protein Spindly
mRNA-decapping enzyme 1B	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C
Eukaryotic translation initiation factor 4E type 1B	PH-interacting protein
E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	MLX-interacting protein
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9	diaphanous homolog 3
Zinc finger protein 800	Centriolin
	Cyclin B3
	HEAT repeat-containing protein 3
	Kinesin-like protein KIF9
	Multiple PDZ domain protein
	FAM129C, Phospholipid binding
	Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, class B, member 9b
	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF
	Metabotropic glutamate receptor 1
	Latrophilin-1
	Afadin
	Bdh2, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2
	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase
	Protein Jumonji
	DNA repair and recombination protein RAD54B

	DnaJ homolog subfamily C member 7
	Nucleolar RNA helicase 2
	Citron Rho-interacting kinase
	BOD1L
	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14 (PTPN14)
	BAHD1, Bromo adjacent homology domain-containing 1 protein
	Focal adhesion kinase 1
	Scaffold attachment factor B1
	CAD protein
	Protein transport protein Sec16B
	Helicase with zinc finger domain 2
	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
	Elongation factor G, mitochondrial
	Serine/threonine-protein kinase D3
	Ataxin-2
	Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial
	FK506-binding protein 15
	Kinetochore-associated protein 1
	Regulator of G-protein-signaling 9
	FAST kinase domain-containing protein 5

Tabla 4. Análisis de muestras de inmunoprecipitados de caveolina-1 en células B16F10 por espectrometría de masas. Células B16F10 (Mock) o (CAV1), fueron transfectadas con 2 µg del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. Después de 24 h las células fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Luego se preparó extractos proteicos para ensayos de inmunoprecipitación de caveolina-1. La inmunoprecipitación de caveolina-1 se realizó utilizando un anticuerpo policlonal anti-caveolina-1 inmovilizados de manera covalente con esferas magnéticas. Posteriormente, se eluyó las proteínas que co-inmunoprecipitan con caveolina-1 y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron en un equipo de cromatografía capilar de fase reversa con ionizador de electrospray acoplado a un espectrómetro de masas (MS/MS) con trampa de iones. Se consideró posibles modificaciones como oxidación de péptidos en metionina y un corte incompleto por tripsina. La selección de datos fue realizada usando una probabilidad mayor que 0,9 para péptidos y valores mayores que 0,95 para proteínas. La tabla muestra los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes, en triplicado, además de un triplicado analítico, se tabularon las proteínas y péptidos que solo se encontraron en células que expresan caveolina-1 (CAV1, columna izquierda) y los que se encontraron solo en células que co-expresan caveolina-1 y E-cadherina (CAV1/E-Cadherina, columna derecha).

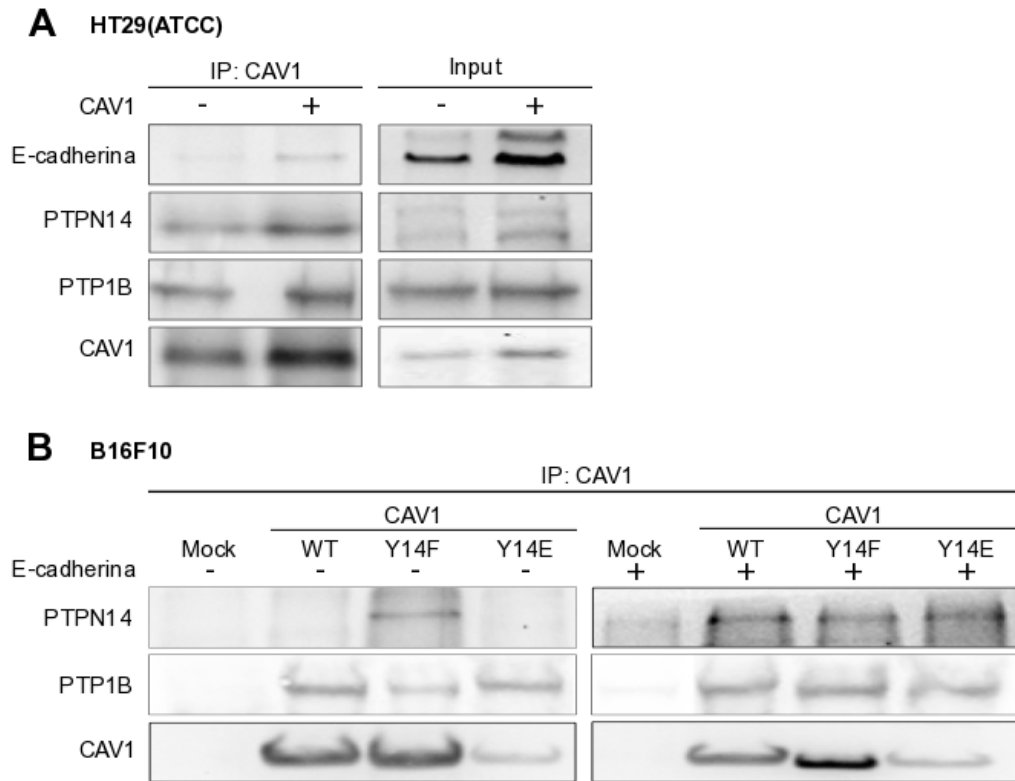


Figura 17. Caveolina-1 co-inmunoprecipita con la fosfatasa PTPN14 en presencia de E-cadherina.

Se sembraron 1×10^6 células (A) HT29(ATCC) (Mock) o (CAV1) o (B) B16F10 transfectadas con el vector pLacIOP (Mock), pLacIOP-caveolina-1 (CAV1), pLacIOP-CAV1-Y14F (Y14F) y pLacIOP-CAV1-Y14E (Y14E) en placas de 10 cm, 24 h después fueron transfectadas con 6 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM), posteriormente se obtuvo los extractos celulares. El extracto proteico total (2 mg) fue inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal para caveolina-1 (2.5 μ g por condición), se separó las proteínas mediante SDS-PAGE y se detectó por inmunoblot la presencia de proteínas con el anticuerpo anti-E-cadherina, anti-PTPN14, anti-PTP1B y anti-caveolina-1 monoclonal. Se muestran Western blots representativos de 3 experimentos independientes.

La expresión de la fosfatasa PTPN14 inhibe el aumento de la migración e invasión inducido por caveolina-1 en células B16F10.

En esta tesis encontramos un posible nuevo miembro del complejo multiproteico formado por caveolina-1 y E-cadherina, la fosfatasa PTPN14, la cual co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina (Figura 17, Tabla 4). Por lo que se quiso determinar si la expresión exógena de ésta fosfatasa afectaría el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 en células metastásicas y en la inhibición ejercida por E-cadherina sobre estos fenómenos. Para esto células B16F10 (Mock) y (CAV1) que no expresan E-cadherina y células B16F10 transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina (Mock-Ecadh) y (CAV1-Ecadh) fueron transfectadas con el vector pcDNA3-V5-PTPN14-wt (PTPN14-WT) para la expresión de la fosfatasa PTPN14 o con el vector vacío, como control (pcDNA) y se realizaron ensayos de migración por transwell (Figura 18A) y ensayos de invasión en matrigel (Figura 18B). Como se observa en la Figura 18 caveolina-1 induce un aumento en la migración e invasión el cual es inhibido por la expresión de E-cadherina, pero la expresión de la fosfatasa PTPN14 (Figura 18, barras negras) fue capaz de bloquear el aumento en la migración (Figura 18A) y en la invasión (Figura 18B) inducido por caveolina-1 en células B16F10.

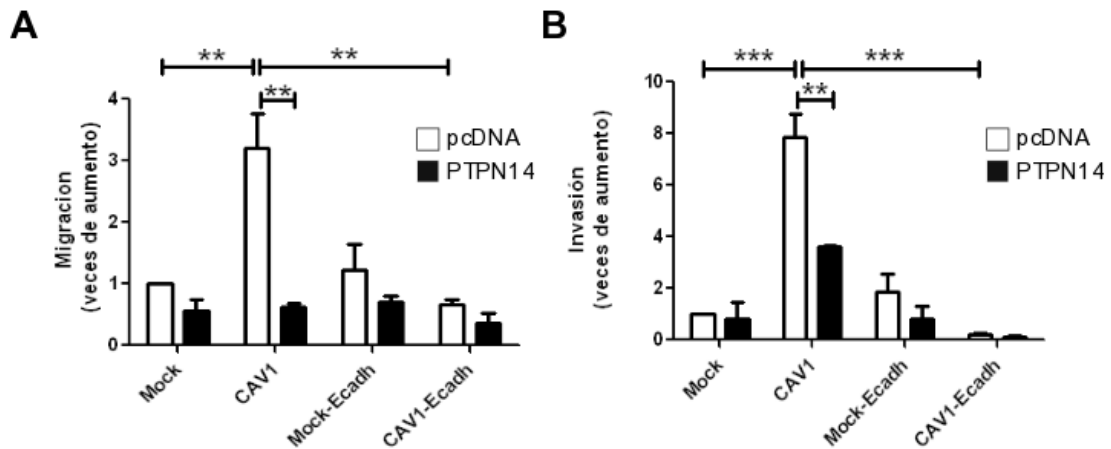


Figura 18. La expresión de la fosfatasa PTPN14 inhibe el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 en células B16F10.

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10 (Mock) o (CAV1) en placas de 6 cm, 24 h después fueron transfectadas con $2 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina y/o con $2 \mu\text{g}$ del plásmido pcDNA3-V5-PTPN14-wt (PTPN14-WT) para la expresión de la fosfatasa PTPN14 o con el vector vacío (pcDNA) utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se sembraron 1.5×10^4 células en (A) transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de $8 \mu\text{m}$ cubiertos con fibronectina ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$), las células se dejaron migrar en ausencia de suero durante 2 h. Después de este tiempo, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta/metanol por 30 min. Las células que no migraron, y que se encuentran en la parte superior del transwell, fueron eliminadas. Se contó el número de células que migraron en 6 campos. En (B) insertos que contenían matrigel, las células se dejaron invadir en ausencia de suero durante 24 h. Después de este tiempo, las células fueron fijadas con metanol por 2 min y teñidas con azul de toluidina por 30 min. Se contó el número total de células que fueron capaces de invadir. Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM) del (A) número de células que migraron por campo en cada condición normalizado por el número de células (Mock) o (B) del número de células que invadieron en cada condición normalizado por el número de células (Mock). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$).

La expresión de la fosfatasa PTPN14 suprime el rol promotor de metástasis de caveolina-1 in vivo.

Debido a que la sobre-expresión de la fosfatasa PTPN14 inhibe el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 in vitro, se quiso determinar si afectaría de alguna manera el rol promotor de metástasis de caveolina-1 in vivo (Lobos-González et al., 2013). Por lo que se realizaron ensayos de metástasis experimental, en el cual se inyectaron en la vena lateral de la cola de ratones C57BL/6, 2×10^5 células B16F10 (CAV1) o (Mock) o células que co-expresan caveolina-1 y la fosfatasa PTPN14 (CAV1 PTPN14 WT) (Figura 19). Luego de 21 días se cuantificó el porcentaje de ocupación tumoral de los pulmones por células de melanoma (B16F10). Como se ha descrito previamente, la expresión de caveolina-1 promueve un aumento en la metástasis en un 40 % en relación a células que no expresan caveolina-1 (Mock). Sin embargo, la expresión de PTPN14 es capaz de inhibir el rol promotor de metástasis de caveolina-1, disminuyendo la metástasis a un 10 % de la ocupación pulmonar (Figura 19B).

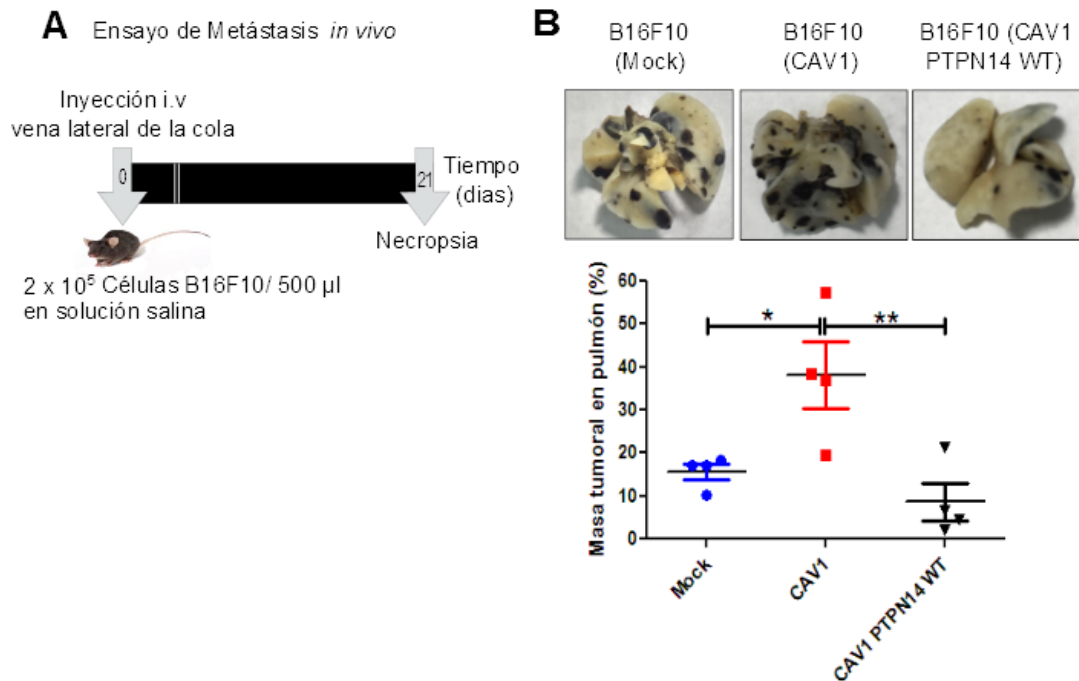


Figura 19. La expresión de la fosfatasa PTPN14 suprime el rol promotor de metástasis de caveolina-1 *in vivo*.

(A) Se inyectaron 2 x 10⁵ células B16F10 (Mock), B16F10 (CAV1) o B16F10 (CAV1) transfectadas con el plásmido pcDNA3-V5-PTPN14-wt (PTPN14 WT) para la expresión de la fosfatasa PTPN14. Las células se administraron vía i.v por la vena lateral de la cola de ratones C57BL/6. Luego de 21 días se sacrificó a los ratones, se extrajo los pulmones, los cuales fueron fijados en solución Feketes. (B) Imágenes de los pulmones de los ratones inoculados con células B16F10 (Mock), B16F10 (CAV1) o B16F10 (CAV1) que expresan PTPN14 (CAV1 PTPN14 WT). El gráfico muestra la cuantificación de la masa tumoral (células negras) en el pulmón (%) de 4 ratones por condición, promedio ± SEM. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (** p < 0.01; * p < 0.05).

4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4

Determinar el efecto de la co-expresión de caveolina-1 y E-cadherina sobre la activación de Rab-5 y Rac-1.

La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rab-5 por caveolina-1 en células metastásicas.

Como indican los resultados mostrados anteriormente caveolina-1 promueve un aumento en la migración e invasión celular, pero los mecanismos involucrados no están del todo claros. La GTPasa pequeña Rab-5, ha llamado nuestra atención ya que es capaz de activar a Rac-1 - GTPasa que ha sido involucrada en el aumento de la migración celular inducida por caveolina-1 (Urra et al., 2012)- por el reclutamiento de su GEF, Tiam1 a endosomas tempranos promoviendo la macropinocitosis de receptores de superficie (Pellinen et al., 2006). Rab-5 además favorece la metástasis de células de neuroblastoma (Torres et al., 2010) y se requiere para la activación de Rac-1 inducida por caveolina-1 en células metastásicas (Díaz et al., 2014). Por esto quisimos determinar si en las células metastásicas, caveolina-1 es capaz de activar a Rab-5 y evaluar el efecto de la expresión de E-cadherina sobre esta activación. Para esto se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para Rab-5 con la proteína de fusión GST-R5BD la cual se une específicamente a la forma activa

de Rab-5 en células que no expresan caveolina-1, B16F10(Mock) y HT29(US) (Mock) y células que expresan caveolina-1, B16F10(CAV1) y HT29(US)(CAV1). Se observó que en células que expresan caveolina-1 existe un aumento de la forma activa de Rab-5 en comparación a las células control (Mock) (Figura 20 A y B). Cuando estas células fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina se observó una disminución de la cantidad de Rab-5 activo tanto en células que no expresan caveolina-1 (B16F10(Mock) y HT29(US)(Mock) como en células que expresan caveolina-1 (B16F10(CAV1), HT29(US)(CAV1) (Figura 20 A y B). Por lo tanto la expresión de E-cadherina es capaz de bloquear la activación de Rab-5, lo que puede explicar el efecto inhibitorio de E-cadherina sobre la migración e invasión celular.

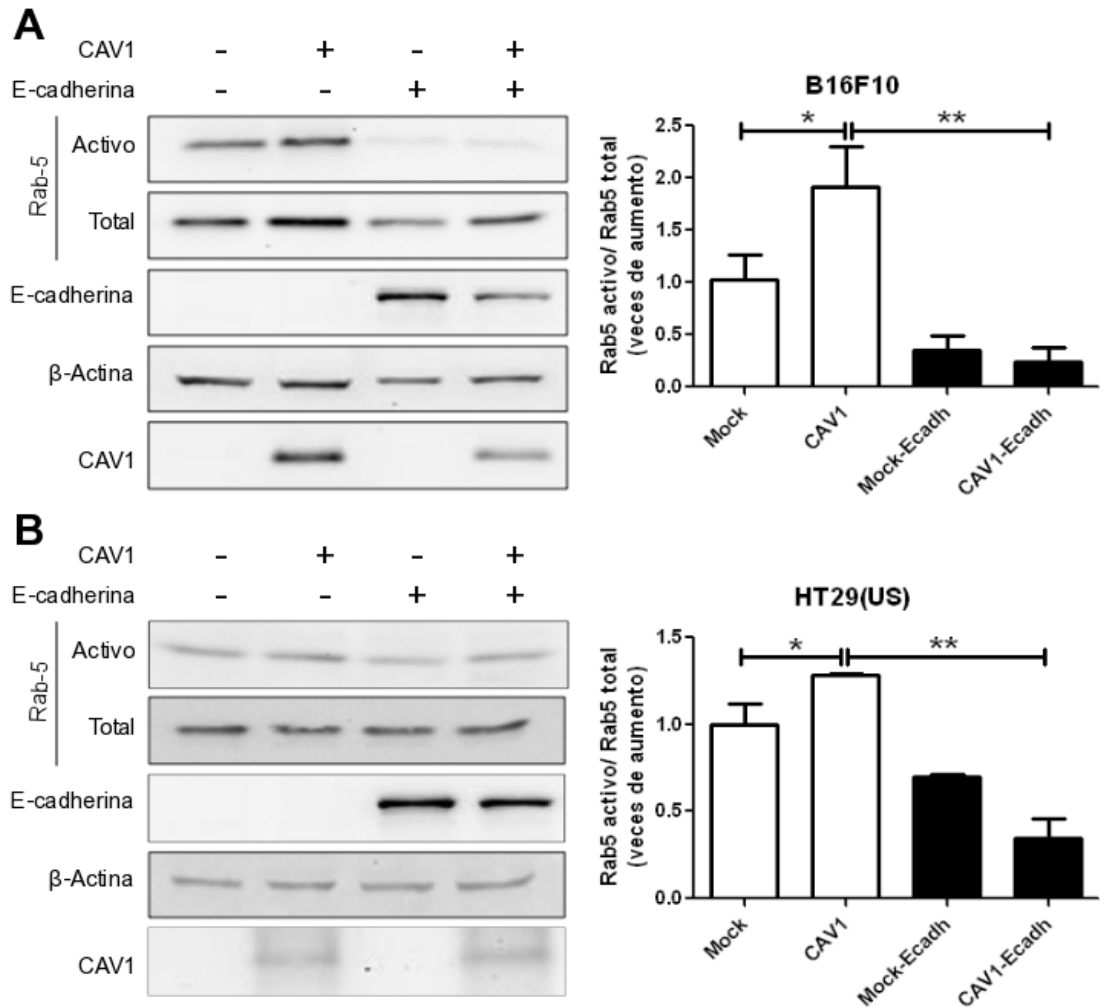


Figura 20. La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rab-5 por caveolina-1 en células metastásicas.

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10 (B) HT29(US) (Mock) y (CAV1) en placas de 10 cm, 24 h después fueron transfectadas con 6 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 o 24 h con IPTG (1 mM, B16F10 y HT29(US) respectivamente). Posteriormente se obtuvo los extractos celulares y se realizó un ensayo de precipitación por afinidad para Rab-5 con la proteína de fusión GST-R5BD. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot de Rab5, β -actina, E-cadherina y caveolina-1 (CAV1). Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes de los niveles de Rab5 activo normalizado respecto a las células Mock. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas en relación a las células Mock están indicadas (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rac-1 por caveolina-1 en células metastásicas.

Antecedentes de nuestro laboratorio han mostrado que la expresión de caveolina-1 induce la activación de Rac-1 en células metastásicas de cáncer de mama que son sometidas a ensayos de spreading y sería esta activación la responsable del aumento de la migración celular (Urra et al., 2012), además de que la expresión de caveolina-1 es necesaria para activar el eje Rab-5-Rac-1 que se correlaciona con un aumento en la migración e invasión en células metastásicas (Díaz et al., 2014). Es por esto que se quiso determinar si en las líneas celulares metastásicas utilizadas en esta tesis se observa el mismo fenómeno y si la expresión de E-cadherina es capaz de modular de alguna forma la actividad de Rac-1. Para esto se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para Rac-1 con la proteína de fusión GST-PBD que se une selectivamente a la forma activa de Rac-1 (Rac-1-GTP) con células B16F10, y HT29(US) que expresan y no caveolina-1 y en las dos líneas celulares metastásicas que expresan caveolina-1 se observó que existe un aumento de la activación de Rac-1 (Figura 21 A y B). Al expresar E-cadherina en células que no expresan caveolina-1 (B16F10(Mock) y HT29(US)(Mock) no se observaron cambios en la cantidad de Rac-1 activo en relación a la situación control. Sin embargo cuando se co-expresa E-cadherina y caveolina-1, se observa una disminución significativa de la activación de Rac-1 en relación a las células que

solo expresan caveolina-1 (Figura 21 A y B) (Lobos-González et al., 2013). Por lo tanto en células metastásicas la expresión de caveolina-1 induce la activación de Rac-1 la cual se ve inhibida por la expresión de E-cadherina lo que explicaría en parte la inhibición del rol promotor de metástasis de caveolina-1.

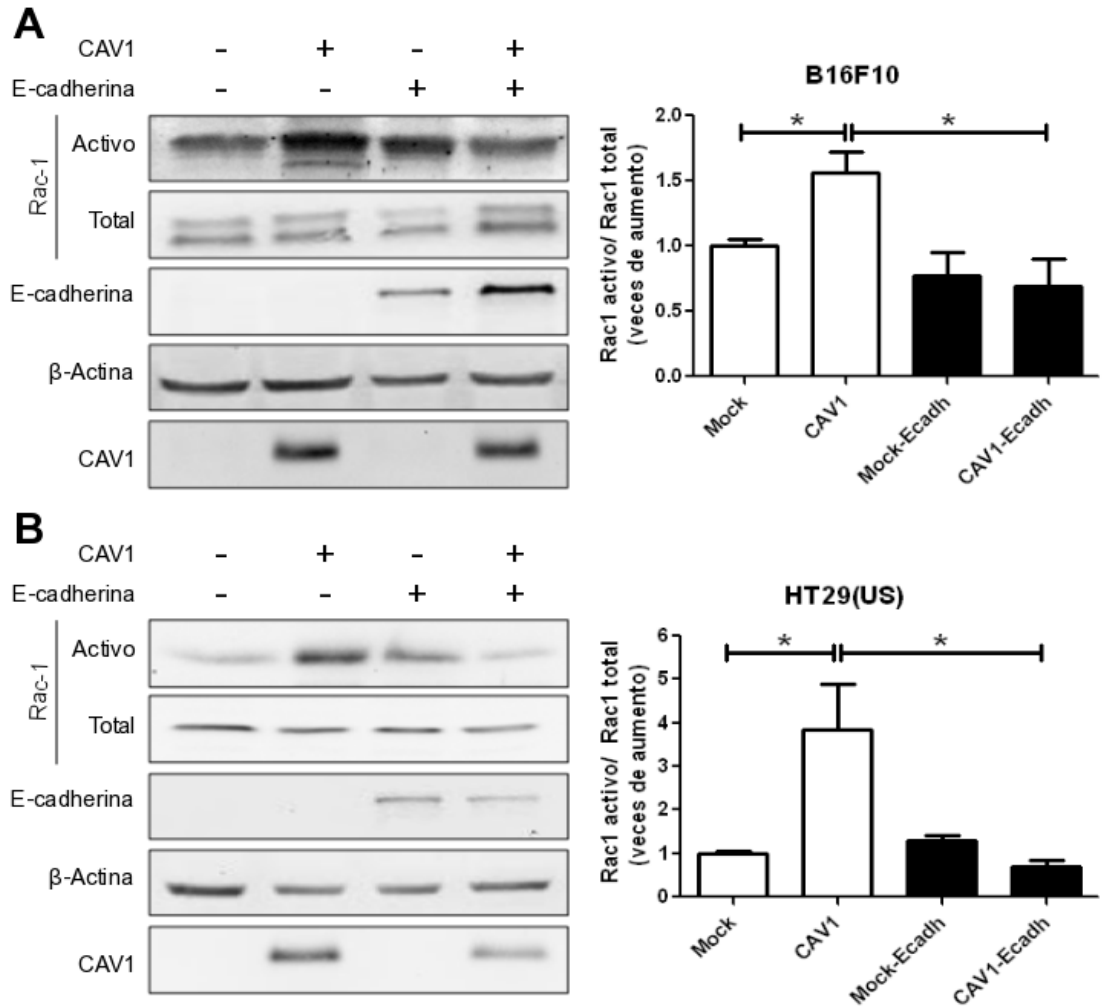


Figura 21. La expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rac-1 por caveolina-1 en células metastásicas.

Se sembraron 6×10^5 células (A) B16F10 y (B) HT29(US) (Mock) y (CAV1) en placas de 10 cm, 24 h después fueron transfectadas con $6 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h o 24 h con IPTG (1 mM) (para las B16F10 o HT29(US) respectivamente). Posteriormente se obtuvo los extractos celulares y se realizó un ensayo de precipitación por afinidad para Rac1 con la proteína de fusión GST-PBD. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en gels al 12% y se analizaron mediante Western blot de Rac1, β -actina, E-cadherina y caveolina-1 (CAV1). Los gráficos muestran el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos independientes de los niveles de Rac1 activo normalizado respecto a las células Mock. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas en relación a las células Mock están indicadas (* $p < 0.05$).

5. OBJETIVO ESPECÍFICO 5

Caracterización de los cambios metabólicos inducidos por la expresión caveolina-1 y la variación de éstos por la co-expresión con E-cadherina.

La expresión de caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.

Debido a que la reprogramación del metabolismo es una de las características que las células cancerígenas adquieren durante la progresión tumoral, se quiso determinar el estado fisiológico de las células metastásicas B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231 y cómo este varía por la expresión de caveolina-1. Para esto, las células B16F10 y HT29(US) fueron transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) y las células MDA-MB231 que expresan caveolina-1 fueron transducidas con un shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) o con un shRNA control (shC). Se determinó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células como un indicador de la respiración mitocondrial en un analizador de flujo extracelular.

Como se muestra en la Figura 22, primero las células fueron incubadas en un medio de cultivo suplementado con glucosa y piruvato, se realizaron 4 mediciones de OCR en condiciones basales para determinar la respiración basal. Posteriormente, las células fueron tratadas con Oligomicina, inhibidor la síntesis de ATP, lo que permite determinar el porcentaje de oxígeno consumido

dedicado a la síntesis de ATP y el porcentaje de oxígeno que se requiere para sobrepasar la fuga de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Se realizó además, una segunda inyección con Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), un agente desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que genera un colapso del potencial de la membrana mitocondrial, llevando a un rápido consumo de energía y oxígeno sin generar ATP. La diferencia en el consumo de oxígeno máximo luego del tratamiento con FCCP y el consumo de oxígeno basal corresponde a la capacidad respiratoria de reserva (Figura 22). La capacidad de las células para responder a estrés bajo condiciones de alta demanda energética está influenciada por la capacidad bioenergética de la mitocondria, la cual es un reflejo de la integridad de la cadena transportadora de electrones. Por último, las células fueron tratadas con Rotenona, un inhibidor del complejo I, lo que previene la conversión de la energía potencial de NADH a energía útil en forma de ATP, disminuyendo el consumo de oxígeno, permitiendo la determinación de la respiración no mitocondrial.

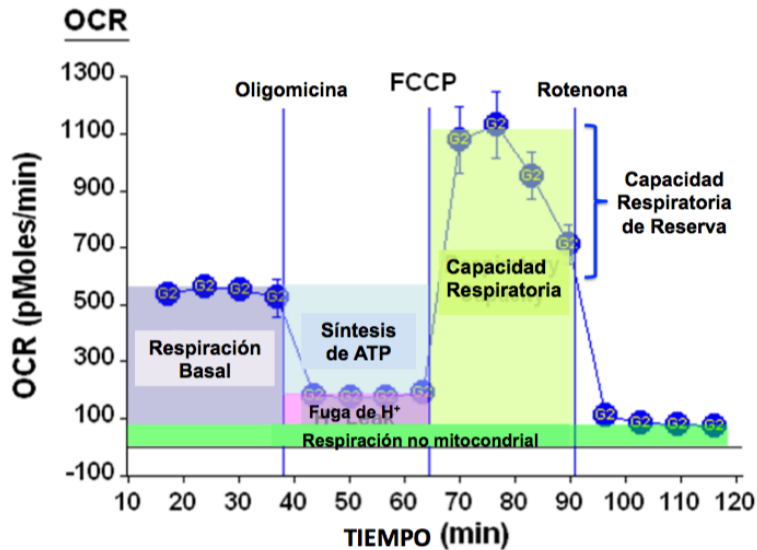


Figura 22. Parámetros respiratorios.

Parámetros respiratorios que se determinaron por la medición del consumo de oxígeno (OCR) en células metastásicas que fueron tratadas primero con Oligomicina, FCCP y por último con Rotenona.

Se determinó el consumo de oxígeno basal y como se observa en la figura 23, las células metastásicas B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231, que no expresaron caveolina-1 (Mock, shCAV1, línea azul) presentaron un consumo de oxígeno basal mayor que células que expresaron caveolina-1 (CAV1, shC, línea roja); por lo tanto, la expresión de caveolina-1 disminuyó significativamente el consumo de oxígeno en células metastásicas. Las células B16F10 (Figura 23 A) y MDA-MB-231 (Figura 23 C) que expresaron caveolina-1 presentaron una disminución en la cantidad de oxígeno utilizado en la síntesis de ATP y una disminución en la capacidad respiratoria de reserva en comparación a células que no expresaron caveolina-1. En el caso de las células de cáncer de colon HT29(US), la expresión de caveolina-1 se tradujo en una menor respiración

basal y una menor capacidad respiratoria (Figura 23 B). En las tres líneas celulares utilizadas, la respiración no mitocondrial, no varió significativamente por la expresión de caveolina-1. Juntos estos resultados podrían indicar que la expresión de caveolina-1 en células metastásicas, produce un impedimento mitocondrial, disminuyendo de esta forma el consumo de oxígeno debido a la respiración mitocondrial.

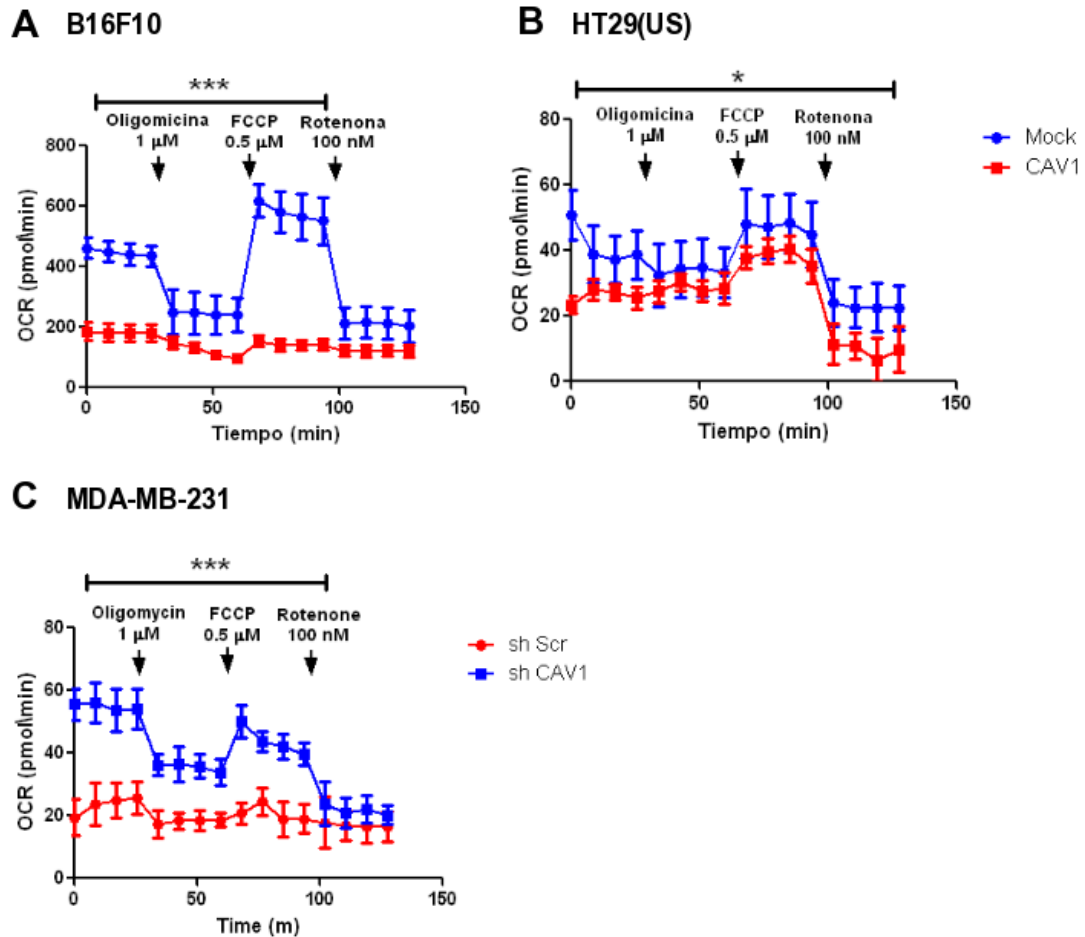


Figura 23. La expresión de caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.

Se sembraron (A) 2×10^5 células B16F10, (B) 1×10^5 células HT29(US) y (C) 4×10^5 células MDA-MB-231 que no expresan caveolina-1 (Mock or shCAV1, línea azul) y células que expresan caveolina-1 (CAV1 or shC, línea roja) en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio Seahorse Bioscience XF24 Calibrant pH 7.4, suplementado con piruvato 100 mM y glucosa 5.5 mM a 37°C. Las células fueron tratadas con Oligomycin 1 μ M, FCCP 0.5 μ M y Rotenona 100 nM. El consumo de oxígeno fue medido por los cambios en la emisión del fluoróforo de oxígeno embebido en la placa sensor Seahorse, utilizando un analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse. Los gráficos representan el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney. Diferencias significativas en relación a la condición Mock o sh CAV1 están indicadas (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$).

La expresión de caveolina-1 aumenta la glicólisis en condiciones aeróbicas en células metastásicas.

Debido a que la expresión de caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas (Figura 23) se quiso determinar si en estas células la expresión de caveolina-1 induce la reprogramación metabólica a un metabolismo glicolítico aeróbico, más conocido como el efecto Warburg. Para esto, las células B16F10 y HT29(US) fueron transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) y las células MDA-MB-231 que expresan caveolina-1 fueron transducidas con un shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) o con un shRNA control (shC) y se determinó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en un analizador de flujo extracelular, como medida de la tasa glicolítica de las células metastásicas, ya que mide la acidificación del medio por la liberación de protones al medio extracelular debido a la producción de lactato que proviene del catabolismo de la glucosa.

Las células fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con NaCl, L-glutamina y glucosa y se determinó la ECAR basal, luego las células fueron tratadas con una concentración saturante de glucosa (10 mM), lo que produjo un rápido aumento de la ECAR, esta respuesta inducida por glucosa corresponde al flujo glicolítico en condiciones basales. Posteriormente, las células fueron tratadas con Oligomicina, lo que produjo la inhibición la producción de ATP mitocondrial, derivando la producción de energía a la glicólisis, seguido de un aumento en la ECAR. Esto permite determinar la

capacidad glicolítica máxima de las células. Por último, las células fueron tratadas con el análogo de glucosa, 2-Deoxiglucosa (2-DG), el que inhibe la glicolisis por la unión competitiva a la hexoquinasa, la primera enzima de la vía glicolítica, produciendo una disminución en la ECAR. Este hecho confirma que la ECAR producida en este experimento es debida a la glicolisis. La diferencia entre la capacidad glicolítica y el flujo glicolítico define la reserva glicolítica de las células (Figura 24).

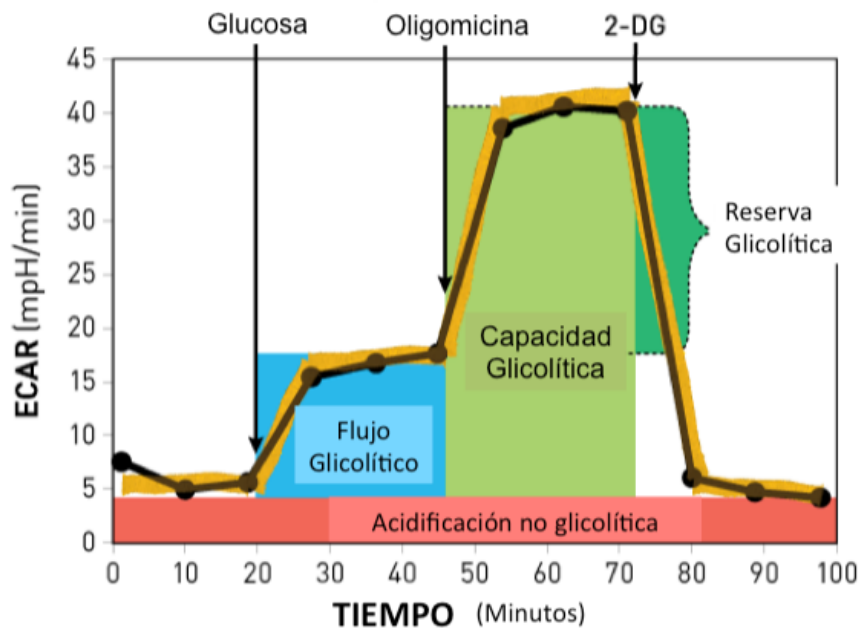


Figura 24. Parámetros glicolíticos.

Parámetros glicolíticos determinados mediante la medición de la acidificación del medio extracelular (ECAR) en células metastásicas que fueron tratadas primero con Glucosa, Oligomicina y por último con 2-Deoxiglucosa (2-DG).

Como se observa en la Figura 25 en células B16F10 (Figura 25 A) y MDA-MB-231 (Figura 25 C) la glicólisis basal no muestra diferencia entre las células que no expresan caveolina-1 (Mock, shCAV1, línea azul) y las células que expresan caveolina-1 (CAV1, shC, línea roja). Sin embargo, en células HT29(US) (Figura 25 B), la expresión de caveolina-1, induce un aumento de la glicólisis basal. Luego del tratamiento con una concentración saturante de glucosa, el flujo glicolítico de las tres líneas celulares que expresan y que no expresan caveolina-1 aumentó, pero la expresión de caveolina-1 indujo un aumento significativo en relación a las células que no expresaron caveolina-1. Lo mismo ocurrió con la capacidad glicolítica máxima, por lo tanto la expresión de caveolina-1 aumentó el metabolismo de las células metastásicas en condiciones aeróbicas.

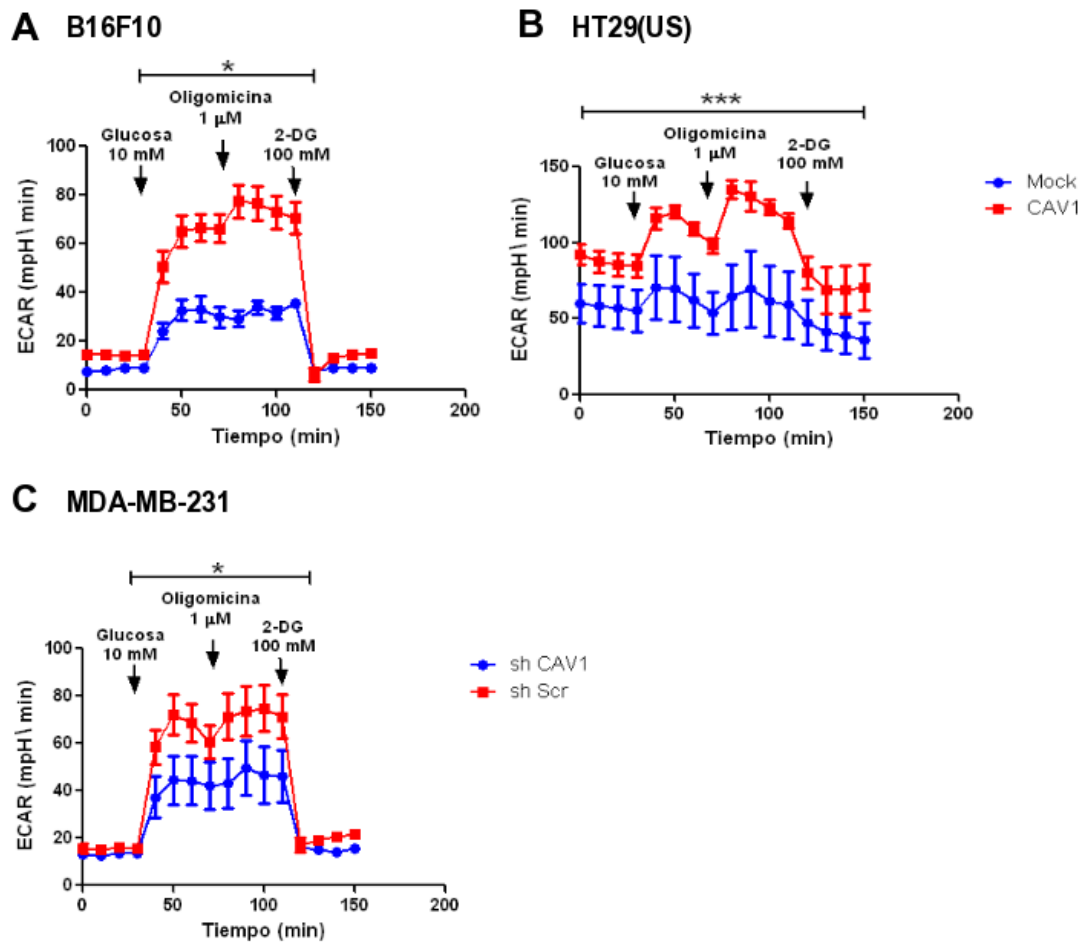


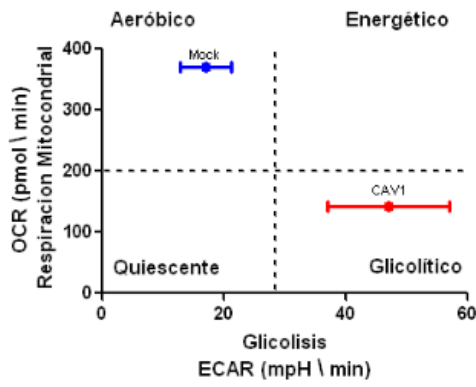
Figura 25. La expresión de caveolina-1 aumenta la acidificación del medio extracelular en células metastásicas.

Se sembraron (A) 2×10^5 células B16F10, (B) 1×10^5 células HT29(US) y (C) 4×10^5 células MDA-MB231 que no expresan caveolina-1 (Mock or shCAV1, línea azul) y células que expresan caveolina-1 (CAV1 or shC, línea roja) en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio DMEM , pH 7.35 suplementado con NaCl 143 mM, L-glutamina 2 mM y glucosa 10 mM a 37°C. Las células fueron tratadas con glucosa 10 mM, Oligomicina 1 μ M y 2-Deoxiglucosa (2-DG) 100 mM. La acidificación extracelular fue determinada por cambios en la emisión del fluoróforo de protones embebido en la placa sensor Seahorse, utilizando un analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse. Los gráficos representan el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney. Diferencias significativas en relación a la condición Mock o sh CAV1 están indicadas (* $p < 0.05$, *** $p \leq 0.001$).

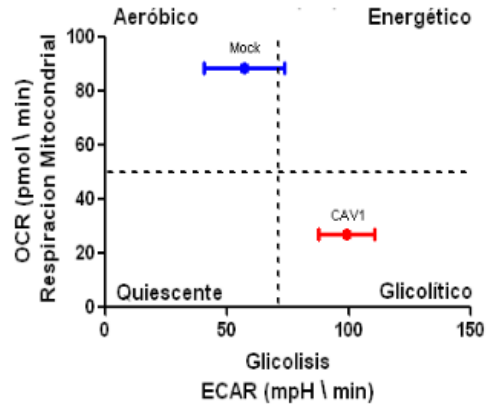
La expresión de caveolina-1 cambia el fenotipo energético de las células de cáncer metastásicas a un fenotipo glicolítico.

En base a los resultados obtenidos anteriormente para el consumo de oxígeno y la acidificación extracelular de células metastásicas que expresan o no caveolina-1, se quiso determinar el fenotipo metabólico de cada una de las células metastásicas e investigar si la expresión de caveolina-1 cambia este fenotipo. Para esto se graficaron los resultados de OCR versus ECAR utilizando el software XF Cell Energy Phenotype Test (seahorse Bioscience). Los resultados muestran que en las células metastásicas B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231 la expresión de caveolina-1 indujo un cambio desde un metabolismo aeróbico a un metabolismo glicolítico (Figura 26), lo que podría explicar el aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células metastásicas inducida por caveolina-1 ya que si bien la utilización aeróbica de la glucosa es energéticamente menos eficiente que la fosforilación oxidativa, les confiere a las células una ventaja, ya que le permite a las células utilizar el nutriente extracelular más abundante, la glucosa, para producir grandes cantidades de ATP, lo que les permitiría migrar e invadir rápidamente (Han et al., 2013).

A B16F10



B HT29(US)



C MDA-MB-231

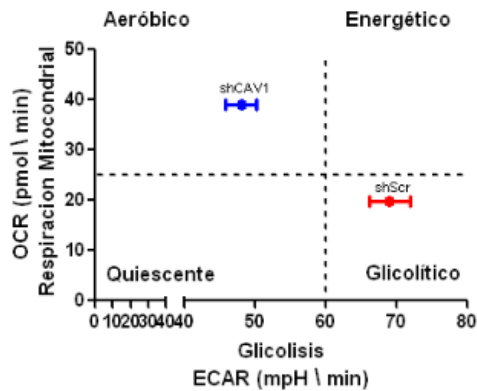


Figura 26. La expresión de caveolina-1 cambia el fenotipo energético de las células de cáncer metastásicas a un fenotipo glicolítico.

Comparación de los fenotipos metabólicos de células (A) B16F10, (B) HT29(US) y (C) MDA-MB231 que no expresan caveolina-1 (Mock or sh CAV1, punto azul) y células que expresan caveolina-1 (CAV1 or sh Scr, punto rojo). Los gráficos muestran el consumo de oxígeno (OCR) versus la acidificación extracelular (ECR) en condiciones basales del promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM).

La expresión de E-cadherina disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.

Ya que existen antecedentes que relacionan la expresión de E-cadherina con la mantención de la integridad mitocondrial y un metabolismo principalmente oxidativo, se quiso determinar si la co-expresión de E-cadherina y caveolina-1 produce algún cambio en la tasa de consumo de oxígeno de las células metastásicas. Para esto células B16F10, HT29(US) y MDA-MB-231 que no expresan caveolina-1 (Mock, shCAV1) y que expresan caveolina-1 (CAV1) fueron transfectadas para expresión transitoria de E-cadherina y se realizó la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) como se describió anteriormente.

En células B16F10 (Figura 27 A), HT29(US) (Figura 27 B) y MDA-MB-231 (Figura 27 C) la sola expresión de E-cadherina (Mock-E-cadh, shCAV1-E-cadh, línea celeste) produjo una disminución del OCR basal y general, pero las células mantuvieron la capacidad para responder al tratamiento con cada uno de los inhibidores, lo que podría sugerir que la integridad mitocondrial se mantuvo, pero el metabolismo mitocondrial fue ralentizado por la expresión de E-cadherina. En células metastásicas que co-expresaron caveolina-1 y E-cadherina (CAV1-E-cadh, shC-E-cadh, Figura 27, línea rojo claro) la respiración mitocondrial basal disminuye significativamente en relación a células Mock,

CAV1 o incluso a células Mock que expresaron E-cadherina sola, lo mismo ocurrió con la capacidad respiratoria de reserva.

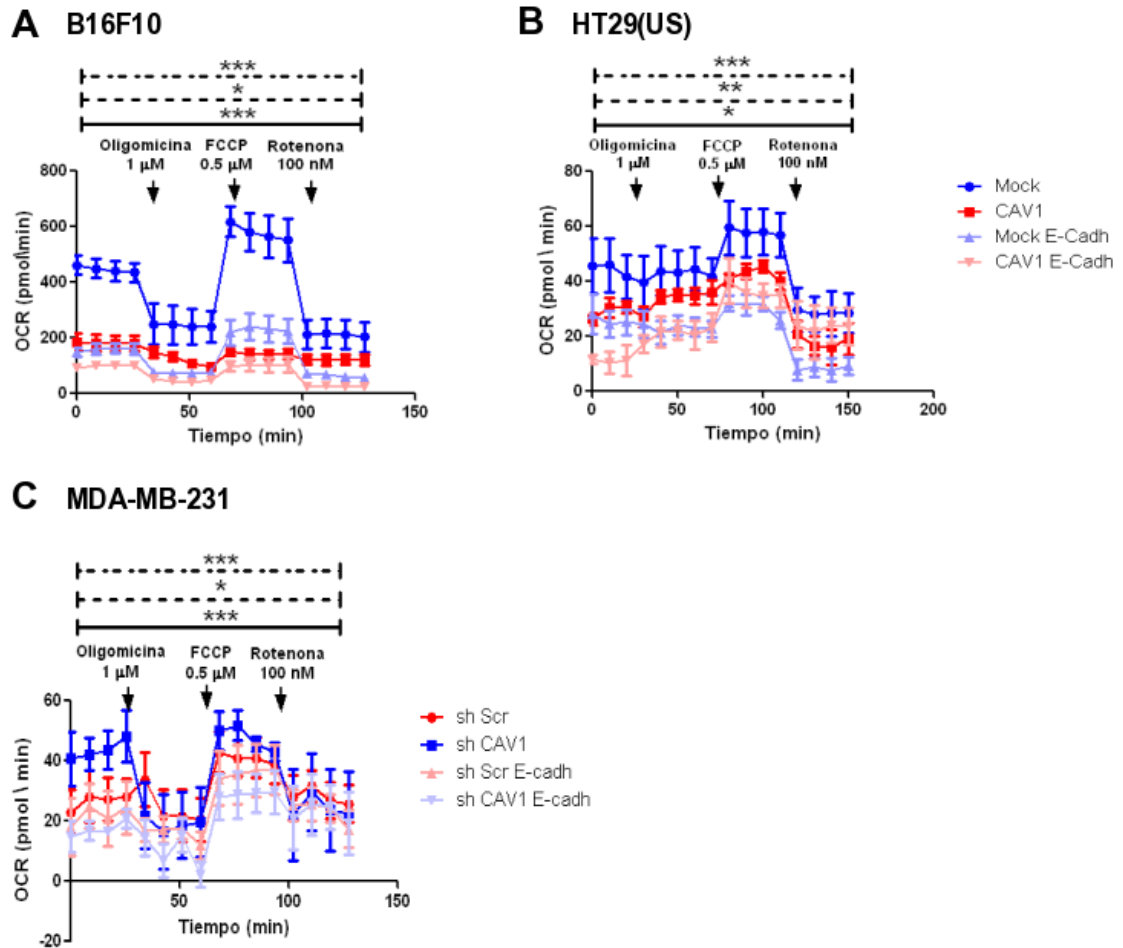


Figura 27. La expresión de E-cadherina disminuye el consumo de oxígeno en células metastásicas.

Células **(A)** B16F10, **(B)** HT29(US) and **(C)** MDA-MB-231 que no expresaron caveolina-1 (Mock o sh CAV1, línea azul) y células que expresaron caveolina-1 (CAV1 o sh Scr, línea roja) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y 24 h después se sembraron 2×10^5 células B16F10, 1×10^5 células HT29(US) y 4×10^5 células MDA-MB231 en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio Seahorse Bioscience XF24 Calibrant pH 7.4, suplementado con piruvato 100 mM y glucosa 5.5 mM a 37°C. Las células fueron tratadas con Oligomicina 1 μ M, FCCP 0.5 μ M y Rotenona 100 nM. El consumo de oxígeno fue medido por los cambios en la emisión del fluoróforo de oxígeno embebido en la placa sensor Seahorse, utilizando un analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse. Los gráficos representan el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunn. Diferencias significativas entre la condición; Mock o sh CAV1 y CAV1 o shC (línea sólida), CAV1 o sh Scr y CAV1 E-cadherina o shC E-cadherina (línea entrecortada) y Mock o sh CAV1 y Mock E-cadherina o shCAV1 E-cadherina (línea entrecortada con puntos) están indicadas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$).

La expresión de E-cadherina disminuye la acidificación extracelular en células metastásicas.

Existen antecedentes en muestras clínicas de cáncer colorectal donde se ha observado una correlación entre la disminución de la expresión de E-cadherina con el aumento de la expresión de la enzima Piruvato quinasa M2, la cual mantiene la glicólisis aeróbica en células madres cancerígenas, lo que se correlaciona con un aumento en la migración e invasión de células de cáncer de colon (Konno, et al., 2015). Es por esto que se quiso investigar si la expresión de E-cadherina en células metastásicas tenía alguna influencia en el metabolismo glicolítico. Para esto células B16F10 y HT29(US) fueron transfectadas con el vector pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1) y las células MDA-MB-231 que expresaron caveolina-1 fueron transducidas con un shRNA para el silenciamiento de caveolina-1 (shCAV1) o con un shRNA control (shC) y luego fueron transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina y se determinó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en un analizador de flujo extracelular, como medida de la tasa glicolítica.

En células B16F10 (Figura 28 A) y MDA-MB-231 (Figura 28 C) la sola expresión de E-cadherina (Mock-E-cadh y shCAV1-E-cadh, respectivamente) disminuyó la capacidad glicolítica de las células y la co-expresión de E-cadherina y caveolina-1 disminuyó de mayor manera la capacidad glicolítica de las células B16F10; por lo tanto, el efecto de la co-expresión de ambas proteínas modificó

el metabolismo glicolítico de estas células de manera sinérgica. En células MDA-MB-231, la co-expresión de E-cadherina y caveolina-1 disminuyó significativamente la capacidad glicolítica de las células en comparación a las células que solo expresaron caveolina-1 (shC).

En células HT29(US) (Figura 28 B) la sola expresión de E-cadherina (Mock-E-cadh) indujo un aumento de la capacidad glicolítica de las células en comparación a las células Mock. La co-expresión de E-cadherina y caveolina-1 disminuyó significativamente la capacidad glicolítica en comparación a células que solo expresaron caveolina-1 (CAV1).

Por lo tanto, la expresión de E-cadherina tenía efectos contrarios dependiendo de la línea celular, disminuyendo la capacidad glicolítica en las células B16F10 y MDA-MB-231 que no expresaron caveolina-1 y aumentando la capacidad glicolítica de células HT29(US)(Mock). Sin embargo, la co-expresión de E-cadherina y caveolina-1 disminuyó la capacidad glicolítica de las tres líneas celulares metastásicas en comparación a las células que solo expresaron caveolina-1.

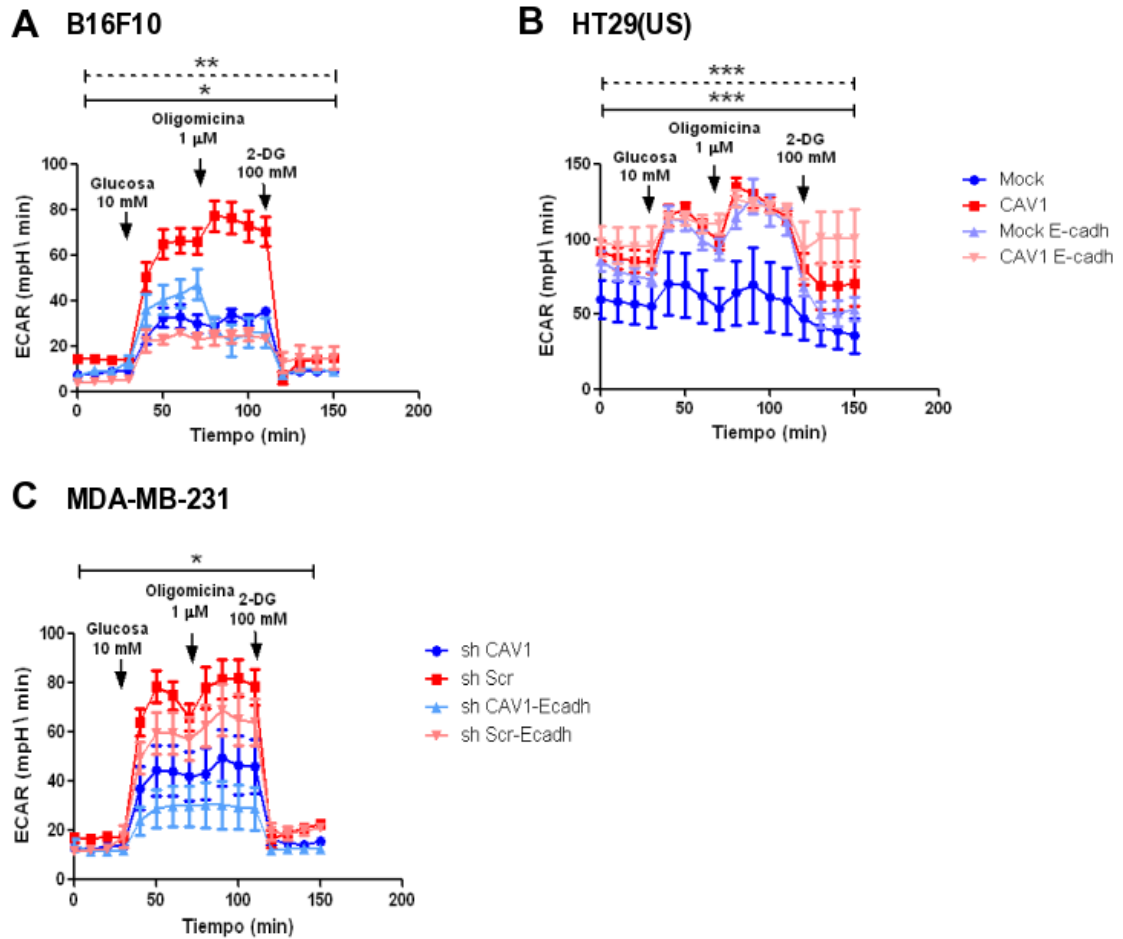


Figura 28. La expresión de E-cadherina disminuye la acidificación extracelular en células metastásicas.

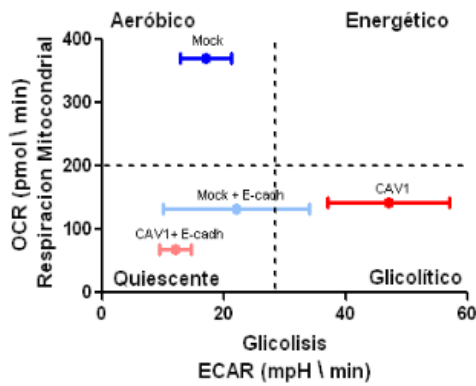
Células (A) B16F10, (B) HT29(US) and (C) MDA-MB-231 que no expresaron caveolina-1 (Mock or sh CAV1, línea azul) y células que expresaron caveolina-1 (CAV1 or sh Scr, línea roja) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y 24 h después se sembraron 2×10^4 células B16F10, 10×10^4 células HT29(US) y 40×10^4 células MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio DMEM, pH 7.35 suplementado con NaCl 143 mM, L-glutamina 2 mM y glucosa 10 mM a 37°C. Las células fueron tratadas con glucosa 10 mM, Oligomicina 1 µM y 2-Deoxiglucosa (2-DG) 100 mM. La acidificación extracelular fue determinada por cambios en la emisión del fluoróforo de protones embebido en la placa sensor Seahorse, utilizando un analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse. Los gráficos representan el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas entre la condición; Mock o sh CAV1 y CAV1 o sh Scr (línea sólida), Mock o sh CAV1 y Mock E-cadherina o sh CAV1 E-cadherina (línea entrecortada) están indicadas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$).

La expresión de E-cadherina ralentiza el metabolismo de células de cáncer metastásicas a un perfil metabólico quiescente.

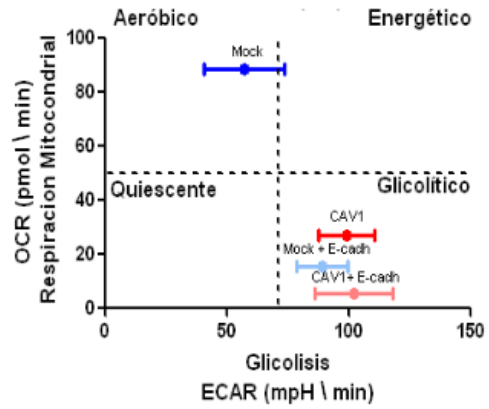
En base a los resultados obtenidos anteriormente para el consumo de oxígeno y la acidificación extracelular de células metastásicas que expresaron o no E-cadherina, se quiso determinar el fenotipo metabólico de cada una de las células metastásicas e investigar si la expresión de E-cadherina, cambiaba este fenotipo. Para esto se graficaron los resultados de OCR versus ECAR utilizando el software XF Cell Energy Phenotype Test (Seahorse Bioscience). Los resultados muestran que en las células metastásicas B16F10 y MDA-MB231 la expresión de E-cadherina indujo un cambio desde un metabolismo aeróbico a un metabolismo quiescente (Figura 29 A y C). En el caso de células B16F10 y MDA-MB-231 que expresaron caveolina-1, la expresión de E-cadherina indujo un cambio en el fenotipo metabólico desde un metabolismo glicolítico a un metabolismo quiescente, lo que podría explicar la inhibición por E-cadherina del aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células metastásicas inducida por caveolina-1.

En células HT29(US) (Figura 29 B) la expresión de E-cadherina tanto en células que no expresan caveolina-1 (Mock) y células que expresan caveolina-1 (CAV1) indujo un cambio metabólico desde un metabolismo aeróbico (células Mock) y un metabolismo glicolítico (células CAV1) a un metabolismo glicolítico ralentizado en comparación al fenotipo metabólico de las células que expresaron caveolina-1 (CAV1).

A B16F10



B HT29(US)



C MDA-MB-231

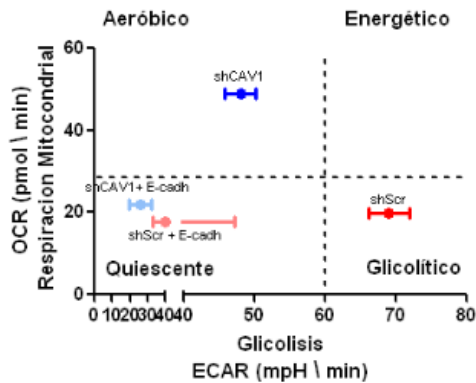


Figura 29. La expresión de E-cadherina ralentiza el metabolismo de células de cáncer metastásicas a un perfil metabólico quiescente.

Comparación de los fenotipos metabólicos de células (A) B16F10, (B) HT29(US) y (C) MDA-MB231 que no expresaron caveolina-1 (Mock or sh CAV1, punto azul) y células que expresaron caveolina-1 (CAV1 or sh Scr, punto rojo) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina. Los gráficos se obtuvieron graficando el consumo de oxígeno (OCR) versus la acidificación extracelular (ECR) en condiciones basales del promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM).

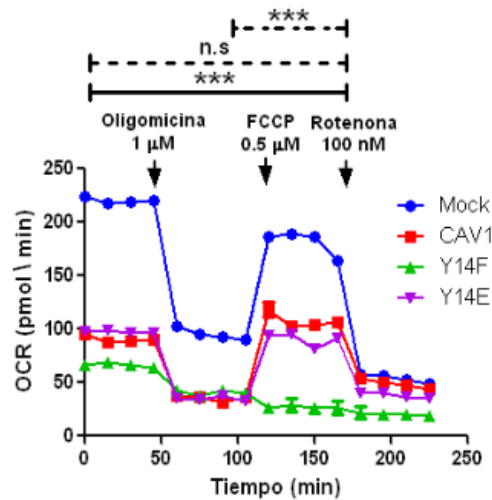
La fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 es necesaria para la mantención del fenotipo metabólico inducido por la expresión de caveolina-1.

En los resultados anteriores mostramos que la expresión de caveolina-1 induce una disminución del consumo de oxígeno y un aumento de la capacidad glicolítica de células metastásicas, cambiando el fenotipo metabólico a un metabolismo principalmente glicolítico en presencia de oxígeno y que la co-expresión de E-cadherina en estas células ralentiza tanto el metabolismo aeróbico como el metabolismo glicolítico. Por lo que se quiso determinar, si específicamente la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 cumple algún rol en los cambios metabólicos inducidos por caveolina-1. Para esto, se trabajó con las células B16F10 que expresaron la mutante no fosforilable de caveolina-1 (Y14F) o la mutante fosfo-mimética de caveolina-1 (Y14E) y se determinó el consumo como se explicó en la figura 22. Las células B16F10 que no expresaron caveolina-1 (Mock, línea azul) presentaron un consumo de oxígeno basal mayor que células que expresaron caveolina-1 (CAV1, línea roja) y así también un mayor consumo de oxígeno utilizado en la síntesis de ATP y una mayor capacidad respiratoria de reserva en comparación a células que expresaron caveolina-1 (Figura 23A; Figura 30A). La expresión de una caveolina-1 fosfo-mimética (Y14E) produjo la misma disminución del consumo de oxígeno que la expresión de caveolina-1 *wild type* (CAV1) (Figura 30A, línea

violeta), sin embargo, las células que expresaron caveolina-1 que no puede ser fosforilada en Y14 (Y14F) no fueron capaces de responder al estímulo con el desacoplante de la de la cadena respiratoria mitocondrial (FCCP) disminuyendo de esta forma la capacidad respiratoria total y de reserva de las células en comparación a células que expresaron caveolina-1 *wild type* (CAV1) (Figura 30A, línea verde). Por lo tanto, la fosforilación de caveolina-1 en Y14 parece tener un importante rol en el cambio metabólico energético inducido por caveolina-1.

Posteriormente se quiso determinar como afecta la expresión de E-cadherina a células B16F10 (Y14F) e (Y14E), para esto estas células fueron transfectadas con el plásmido pBATEM2 para la expresión transitoria de E-cadherina y se determinó el consumo de oxígeno (Figura 30B). Se observó que la expresión de E-cadherina disminuyó el consumo de oxígeno tanto de las células B16F10 que expresaron caveolina-1 (CAV1, Y14F e Y14E) como de las que no (Mock) y que las células que expresaron caveolina-1 *wild type* (CAV1) como la mutante fosfo-mimética (Y14E) se comportaron de la misma manera. Sin embargo, la expresión de una mutante no fosforilable disminuyó significativamente el consumo de oxígeno en comparación a las células (CAV1), lo cual no cambió mayormente por la expresión de E-cadherina (Figura 30B).

A -E-CADHERINA



B +E-CADHERINA

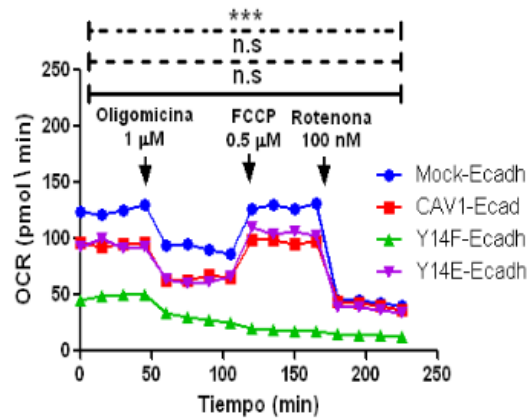


Figura 30. La fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 es necesaria para la mantención del fenotipo metabólico inducido por la expresión de caveolina-1.

Células (A) B16F10 que no expresaron caveolina-1 (Mock, línea azul) y células que expresaron caveolina-1; *wild type* (CAV1, línea roja), mutación no fosforilable (Y14F, línea verde) o mutación fosfo-mimética (Y14E, línea violeta) (B) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina. Se sembraron 2×10^4 células en placas de 96 pocillos. Luego de 24 h las células fueron incubadas por 1 h en 1 ml de medio Seahorse Bioscience XF96 Calibrant pH 7.4, suplementado con piruvato 100 mM y glucosa 5.5 mM a 37°C. Las células fueron tratadas con Oligomicina 1 μ M, FCCP 0.5 μ M y Rotenona 100 nM. El consumo de oxígeno fue medido por los cambios en la emisión del fluoróforo de oxígeno embebido en la placa sensor Seahorse, utilizando un analizador de flujo extracelular XF96 Seahorse. Los gráficos representan el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunn. Diferencias significativas entre la condición; Mock y CAV (línea sólida), CAV1 e Y14E (línea entrecortada) y CAV1 e Y14F (línea entrecortada con puntos) están indicadas (n.s = no significativo, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$).

Caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno por el bloqueo el complejo mitocondrial IV en células B16F10.

Debido a que se observó que las células B16F10 (Figura 23A) y MDA-MB-231 (Figura 23C) que expresaron caveolina-1 presentaron una disminución en la capacidad respiratoria de reserva en comparación a células que no expresaron caveolina-1, se quiso investigar si la expresión de caveolina-1 afectaba la actividad de los complejos mitocondriales, y si la co-expresión con E-cadherina podría afectar de alguna forma la integridad mitocondrial. Para esto se trabajó con células B16F10 (Mock) y (CAV1) que fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina. Las células fueron permeabilizadas utilizando el reactivo XF PMP (XF Plasma Membrane Permeabilizer, Seahorse bioscience), que permite la permeabilización transitoria de la membrana mitocondrial, sin generar daños permanentes en las células más ADP 4 mM en medio MAS 1X (ver tabla 3), suplementado con Piruvato, como sustrato del complejo mitocondrial I. Inmediatamente después de la adición del reactivo permeabilizante se comenzó la medición del consumo de oxígeno. Posteriormente, las células fueron tratadas con Rotenona, inhibiendo el complejo I, lo que detuvo la respiración mitocondrial asociada a NADH, luego las células fueron tratadas con Succinato, lo que conduce la respiración de los electrones que entraron al pool de ubiquinona por la succinato deshidrogenasa (complejo II), evitando la inhibición del complejo I. Posteriormente se trató las

células con Antinomina A, inhibiendo el complejo III, deteniendo la respiración mitocondrial. Para evitar la inhibición del complejo III se agregó Ascorbato más TMPD 100, como sustratos directos del complejo IV, entregando los electrones directamente a la citocromo c oxidasa (Figura 31A). Como se puede observar en la Figura 31B las células que no expresaban caveolina-1 (Mock, línea azul) fueron capaces de evitar la inhibición de cada complejo mitocondrial cuando estaban en presencia de los sustratos adecuados para continuar con la respiración mitocondrial en el siguiente complejo, sin embargo, las células que expresaron caveolina-1 (CAV1, línea roja), presentaron menores niveles de consumo de oxígeno como se describió previamente (Figura 23) y no son capaces de recuperar la respiración mitocondrial luego de la inhibición del complejo III por Antinomina A, lo que sugiere que la expresión de caveolina-1 bloquea el complejo IV mitocondrial. Esto podría explicar por qué las células que expresaban caveolina-1, presentaron un menor consumo de oxígeno y realizaron el cambio metabólico a una glicolisis aeróbica.

La expresión de E-cadherina disminuyó y casi bloqueó el consumo de oxígeno tanto en células (Mock) (Figura 31B, línea celeste) como en células (CAV1) (Figura 31B, línea roja claro), lo cual concuerda con lo descrito en la Figura 29, que la expresión de E-cadherina al menos en células B16F10 y MDA-MB-231, induce un fenotipo metabólico quiescente.

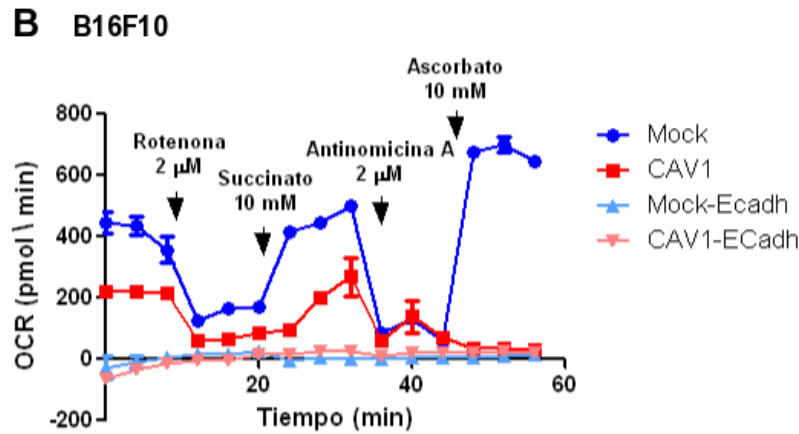
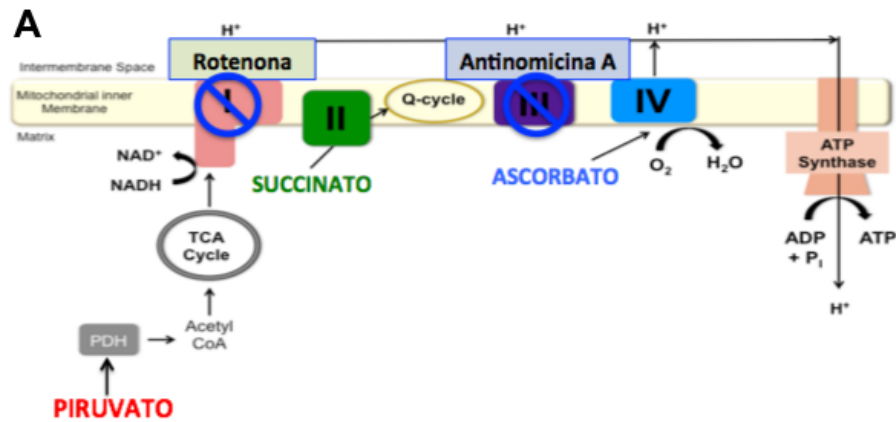


Figura 31. Caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno por el bloqueo del complejo mitocondrial IV en células B16F10.

Se sembraron 2×10^5 células B16F10 Mock o CAV1 las cuales fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, en placas de 24 pocillos XF24. Luego de 24 h, las células fueron permeabilizadas utilizando 1 nM del reactivo XF PMP (XF Plasma Membrane Permeabilizer, Seahorse bioscience) más ADP 4 mM en medio MAS 1X (ver tabla 3), suplementado con Piruvato 10 mM (como sustrato del complejo mitocondrial I), Succinato 10 mM (sustrato del complejo II), Antinomicina A 2 μ M (inhibidor del complejo III) y Ascorbato 10 mM más TMPD 100 μ M (sustrato complejo IV). Después de cada tratamiento se realizaron 3 mediciones cada 4 min. Se determinó el consumo de oxígeno por cambios en la emisión de un fluoróforo sensible a oxígeno embebido en el sensor del analizador de flujo extracelular XF24 Seahorse. El gráfico representa el promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM).

La expresión de caveolina-1 induce un aumento de la producción de ROS la cual es inhibida por la expresión de E-Cadherina.

Los resultados obtenidos anteriormente mostraron que la expresión de caveolina-1, bloquea el complejo mitocondrial IV de la cadena transportadora de electrones, lo cual puede traducirse en una fuente de acumulación de ROS intracelulares. Es por esto que se quiso determinar si la expresión de caveolina-1 es capaz de inducir un aumento en la producción de ROS tanto a nivel del citoplasma celular como en la mitocondria, para esto las células de melanoma murino B16F10 Mock y CAV1 fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y luego fueron transfectadas con el plásmido sensor fluorescente de peróxido de hidrogeno, HyPer, que tiene una señal de destinación a la mitocondria, pHyPer-dMito, o con un plásmido HyPer citoplasmático, pHyPer-cyto, los que son excitables a 420 y 500 nm y emiten a 516 nm y se realizaron ensayos de citometría de flujo (Figura 32).

La expresión de caveolina-1 en células B16F10 indujo un aumento de la producción de ROS intracelular a nivel mitocondrial (Figura 32, barras negras), lo que concuerda con el bloqueo del complejo IV mitocondrial, que se observó en la Figura 31, y a nivel del citoplasma (Figura 32, barras blancas), los que pueden ser consecuencia del aumento de ROS mitocondrial. La expresión de E-cadherina inhibe la producción de ROS tanto en células que no expresan caveolina-1 (Mock-E-Cadh) como en células que expresan caveolina-1 (CAV1-

E-Cadh), siendo esta inhibición estadísticamente significativa en el caso de la producción de ROS mitocondrial (Figura 32), lo que confirma los resultados observados tanto en la Figura 28 y Figura 29 los que muestran que la expresión de E-cadherina produjo un bloqueo de la respiración mitocondrial e indujo un fenotipo metabólico quiescente, respectivamente.

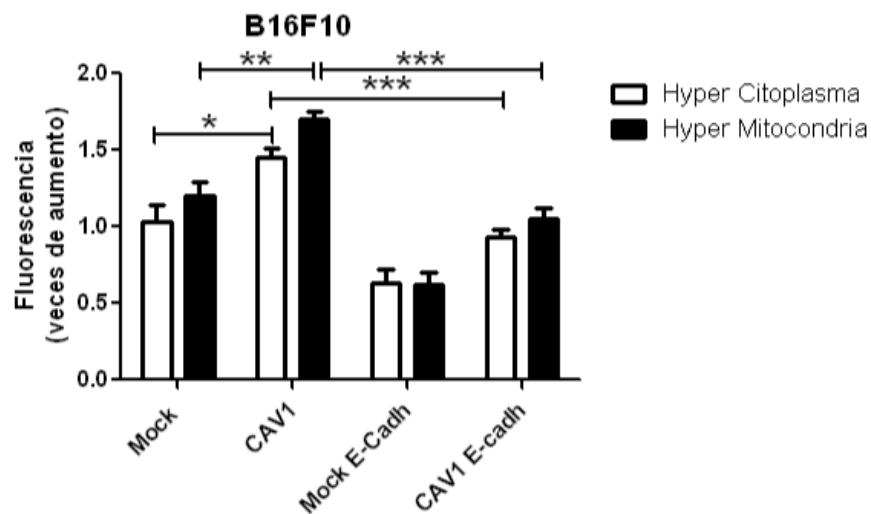


Figura 32. La expresión de caveolina-1 induce un aumento de la producción de ROS, la cual es inhibida por la expresión de E-cadherina en células B16F10.

Se sembraron 2×10^5 células B16F10 (Mock) y (CAV1) en placas de 24 pocillos 24 h después fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina y con los plásmidos fluorescentes, sensores de H_2O_2 , mitocondrial pHyPer-dMito (HyPer Mitocondria) o citoplasmático, pHyPer-cyto (HyPer citoplasma), utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Al término del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. El gráfico muestra el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos donde la intensidad de fluorescencia en cada condición fue normalizada con respecto a la condición control (Mock). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (*** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

El tratamiento con antioxidantes inhibe el aumento en la migración celular inducido por caveolina-1 en células B16F10.

Los resultados obtenidos anteriormente mostraron que la expresión de caveolina-1, bloquea el complejo mitocondrial IV de la cadena transportadora de electrones, lo cual puede traducirse en una fuente de acumulación de ROS intracelulares. Es por esto que se quiso determinar si este aumento de ROS debido a la expresión de caveolina-1 podría ser el responsable del aumento de la migración celular inducido por caveolina 1. Para esto se trabajó con células B16F10 Mock y CAV1 las que fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina y se realizaron ensayos de migración por transwell en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 4 mM) por el tiempo en el que las células se dejaron migrar (2 h).

El tratamiento con NAC es capaz de inhibir el aumento de la migración celular inducido por la expresión de caveolina-1 (Figura 33), por lo tanto un aumento intracelular de ROS, inducido por la inhibición del complejo IV mitocondrial por caveolina-1, podría estar induciendo un aumento en la migración de células metastásicas.

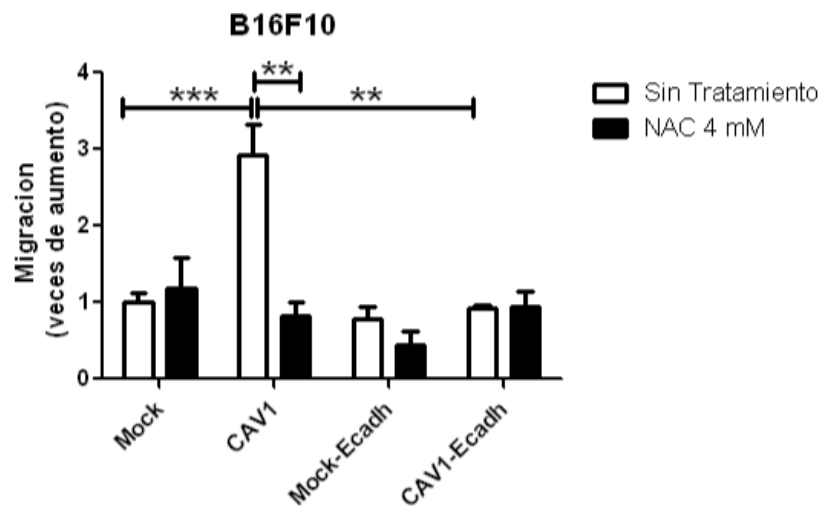


Figura 33. N-acetilcisteína inhibe el aumento en la migración inducido por caveolina-1 en células B16F10.

Se sembraron 6×10^5 células B16F10 (Mock) y (CAV1) en placas de 6 cm, 24 h después fueron transfectadas con $2 \mu\text{g}$ del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®. 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y tratadas con N-acetilcisteína (NAC, 4 mM) durante el tiempo que se dejaron migrar las células (2 h). Se sembraron 5×10^4 células B16F10, en transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de $8 \mu\text{m}$ cubiertos con fibronectina ($2 \mu\text{g/ml}$), las células se dejaron migrar en ausencia de suero durante 2 h (B16F10). Después de este tiempo, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta/metanol por 30 min. Las células que no migraron, y que se encuentran en la parte superior del transwell, fueron eliminadas. Se contó el número de células que migraron en 6 campos. El gráfico muestra el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos donde el número de células B16F10 que migraron en cada condición fue normalizado por el número de células (Mock). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$).

Análisis del metaboloma de célula metastásicas en presencia o ausencia de caveolina-1 y que co-expresan E-cadherina.

Ya que la expresión de caveolina-1 induce cambios en el metabolismo de las células metastásicas, decidimos estudiar si existían cambios en el metaboloma de estas células por la expresión de caveolina-1. El metaboloma se define como todos los metabolitos formados por la célula en asociación con su metabolismo (Metabolome Analysis: An Introduction, by Villas-Bôas, S.G., et al 2007). Para esto se utilizaron las células B16F10 (Mock) y (CAV1) se realizó la extracción de los metabolitos utilizando una mezcla 1:1 de metanol:etanol, las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase líquida de alta resolución y por espectrometría de masa, generando resultados de los metabolitos ionizados positiva y negativamente. Los resultados fueron analizados utilizando el software Markerlynx application manager que realiza la detección automática de los peaks seguido por el análisis de los componentes principales que determina los 100 componentes principales (masa y el tiempo de retención) que contribuyen significativamente a la varianza observada dentro de cada set de datos. Posteriormente se generó un Heat map utilizando un análisis de agrupación jerárquica sin supervisión. Los metabolitos presentes en células que no expresan caveolina-1 y los presentes en células que expresan caveolina-1 pueden ser separados en dos grupos y aquellos que presentan una mayor intensidad en células Mock, presentan una menor intensidad en células CAV1 y

los que presentan una mayor intensidad en células CAV1 presentan una menor intensidad en células Mock. Posteriormente, los tiempos de retención de los metabolitos obtenidos fueron comparados con la base de datos Metabosearch y se consideraron aquellos que poseían un error < 5 ppm entre el tiempo de retención obtenido experimentalmente y el tiempo de retención disponible en la base de datos Metabosearch,, ver tabla 5.

También se quiso determinar si la expresión de E-cadherina induciría algún cambio en el metaboloma de células que expresaban o no caveolina-1, para esto las células B16F10 (Mock) y (CAV1) fueron transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina utilizando el plásmido pBATEM2, y se realizó la comparación del metaboloma de cada línea celular como se mencionó anteriormente. Luego del análisis y comparación con la base de datos Metabosearch de los metabolitos obtenidos ionizados positiva y negativamente se pudieron determinar 69 metabolitos (Tabla 5).

En células B16F10 (CAV1) se determinó que existen 4 metabolitos que se encuentran aumentados en comparación a las células (Mock) (Figura 34A), Metionina, Arginina, Noradrenalina y Dieatonolamina y dos metabolitos que disminuyen por la expresión de caveolina-1; Aspartato y Creatina (Figura 34B). Por lo tanto la expresión de caveolina-1 en células metastásicas de melanoma murino genera cambios en los metabolitos en relación a células que no expresan caveolina-1.

La expresión de E-cadherina parece tener un mayor efecto sobre el metaboloma de las células B16F10 ya que se encontraron 48 metabolitos que cambian de manera diferencial en presencia de E-cadherina (Figura 35).

Por lo tanto, la expresión de caveolina-1 y la co-expresión con E-cadherina genera cambios en el metaboloma de las células metastásicas B16F10, el siguiente paso es un estudio de Interactoma, para determinar las interacciones entre los metabolitos encontrados y diferentes proteínas.

Tabla 5. Análisis de intensidad de metabolitos en células B16F10.

Metabolitos	Intensidad			
	Mock	CAV1	Mock E-Cadherina	CAV1 E-Cadherina
NAD	1185.2 ± 112	1128.6 ± 119	10581 ± 2693	11243 ± 3734
GLUTAMINE	1177.8 ± 147	1391.2 ± 158	264.2 ± 93	347.8 ± 34
HYPOTAURINE	0.0	0.0	657.4 ± 77	746.8 ± 168
THREONINE	233.6 ± 26	262.6 ± 34	1764.6 ± 327	2361.5 ± 618
ASPARTATE	239.8 ± 102	0.0	1825.6 ± 170	0.0
GLYCINE	0.0	0.0	212.6 ± 36	230 ± 27
METHIONINE	0.0	423.8 ± 46	1009.6 ± 128	1314.2 ± 298
ADENINE	1198.8 ± 113	1291.6 ± 110	2321 ± 433	2653.5 ± 524
ALANINE	3682.0 ± 408	2910.8 ± 168	15233 ± 1257	16008 ± 1632
NORADRENALINE	1330.2 ± 250	2222.2 ± 239	1291 ± 196	2180.2 ± 261
GALACTITOL	229.3 ± 22	235.8 ± 12	366.3 ± 116	665 ± 93
TRANS-CYCLOHEXANE-1,2-DIOL	2526.4 ± 529	1229.4 ± 115	807 ± 170	994.2 ± 457
L-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	396.0 ± 31	357.0 ± 64	1501.8 ± 142	1192.8 ± 273
ARGININE	26307.6 ± 3873	33115.0 ± 3243	43855 ± 10112	53534 ± 7026
AGMATINE SULFATE	360.0 ± 20	311.4 ± 27	332.8 ± 26	310 ± 18
GLUTATHIONE	11042.6 ± 915	15473.4 ± 1164	79759 ± 10087	83846 ± 20388
HISTIDINE	1134.8 ± 167	1567.6 ± 81	3661.6 ± 509	3892.2 ± 537
OPHTHALMIC ACID	205.2 ± 20	179.6 ± 19	1151.8 ± 114	843.5 ± 208
URIDINE 5'-DIPHOSPHATE	641.4 ± 64	629.4 ± 67	5983.4 ± 1766	6769 ± 2483
BIS(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE	3799.4 ± 545	3810.0 ± 139	3264.6 ± 277	2466 ± 304
LITHIUM POTASSIUM ACETYL PHOSPHATE	198.8 ± 21	204.5 ± 11	194 ± 17	194.8 ± 13
TAURINE	4407.4 ± 320	4717.2 ± 273	26902 ± 2501	26676 ± 5558
4-AMINOBUTANOATE	113.2 ± 32	30.4 ± 3	116.4 ± 49	161.2 ± 64
CYTOSINE	186.0 ± 9	270.2 ± 32	908.4 ± 163	1195 ± 279
ISOLEUCINE	1298.4 ± 170	1494.0 ± 129	4239.2 ± 679	4169.7 ± 753
5'-METHYLTHIOADENOSINE	2652.8 ± 132	4898.0 ± 250	6608.4 ± 1350	9853.5 ± 1967
TRYPTOPHAN	255.750 ± 27	274.8 ± 40	732.8 ± 87	970.8 ± 287
URIDINE-5-	0.0	0.0	167.5 ± 12	180 ± 49

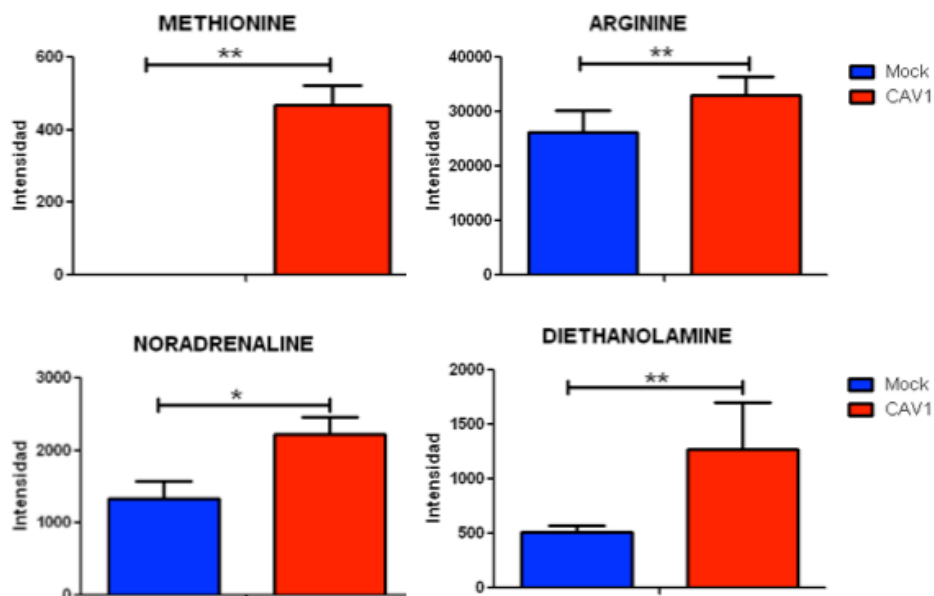
MONOPHOSPHATE				
PROLINE	1072.6 ± 200	1299.6 ± 211	6416.2 ± 1768	10943 ± 2154
SUCCINATE	162.2 ± 69	0.0	0.0	473.3 ± 122
PHENYLALANINE	946.6 ± 138	1074.2 ± 157	3383.8 ± 679	4307.2 ± 1088
HOMOCYSTEINE	1298.4 ± 170	1494.0 ± 129	4239.2 ± 679	4169.7 ± 753
CINNAMALDEHYDE	1387.2 ± 224	1292.8 ± 111	0.0	0.0
PUTRESCINE	342.6 ± 46	186.8 ± 31	473.6 ± 72	361.5 ± 55
N-METHYL-D-ASPARTIC ACID	3328.4 ± 271	3484.2 ± 288	14324 ± 1404	10608 ± 2383
ADENOSINE 5'-MONOPHOSPHATE	159.6 ± 13	79.6 ± 33	841.8 ± 88	714.3 ± 201
DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE	1935 ± 50	4028 ± 167	5558.8 ± 1218	8653.7 ± 1817
NE,NE,NE-TRIMETHYLLYSINE	137.2 ± 57	126.4 ± 52	1326.4 ± 164	1512.5 ± 420
PHOSPHOCREATINE	2840.4 ± 225	3369.4 ± 311	29565 ± 4587	35209 ± 9645
ADENINE HYDROCHLORIDE	1198.8 ± 113	1291.6 ± 110	2321 ± 433	2653.5 ± 524
NORLEUCINE	1298.4 ± 170	1494 ± 129	4239.2 ± 679	4169.7 ± 753
ALLOTHREONINE	233.6 ± 26	262.6 ± 34	1764.6 ± 327	2361.5 ± 618
TRIGONELLINE	0.0	0.0	418.2 ± 103	522.3 ± 118
GLYCEROL 2-PHOSPHATE	0.0	0.0	297 ± 56	339.8 ± 61
SPHINGOMYELIN	2231.0 ± 72	2480.8 ± 239	30621 ± 2768	34880 ± 7672
HYPOXANTHINE	104.6 ± 77	414.2 ± 114	1082.6 ± 203	526.7 ± 145
CREATINE	69609.4 ± 6852	56628 ± 2973	284564 ± 29881	289217 ± 30413
LYSINE	603.6 ± 126	524.8 ± 59	786.4 ± 223	888.2 ± 133
ASPARAGINE	788.0 ± 45	1050.2 ± 87	7644.6 ± 1130	11490.3 ± 2770
BUTANOATE	493.8 ± 70	629.8 ± 60	440.5 ± 35	472.2 ± 54
HOMOSERINE	233.6 ± 26	262.6 ± 34	1764.6 ± 327	2361.5 ± 618
THIOUREA	520.8 ± 160	401.6 ± 64	483.8 ± 84	378.5 ± 71
DIETHANOLAMINE	511.6 ± 57	1268.4 ± 433	856.6 ± 220	570 ± 90
PYRIDOXINE	1330.2 ± 250	2222.2 ± 239	1291 ± 196	2180.2 ± 261
CYS-GLY	430.4 ± 49	640 ± 36	2712.8 ± 321	3023.5 ± 851
CREATININE	2520.8 ± 223	4678.2 ± 901	10873 ± 1140	16645 ± 1182
DEOXYCYTIDINE	0.0	0.0	535.8 ± 88	4411 ± 3773
LEUCINE	1298.4 ± 170	1494 ± 129	4239.2 ± 679	4169.7 ± 753
PHOSPHONOACETATE	198.8 ± 21	163.6 ± 42	194 ± 17	194.8 ± 13

HISTIDINE	1134.8 ± 167	1567.6 ± 81	3661.6 ± 509	3892.2 ± 537
DEOXYCARNITINE	802.8 ± 91	703 ± 86	4773.4 ± 933	7521.3 ± 1341
PHOSPHOCHOLINE CHLORIDE	2967.8 ± 347	2651.2 ± 228	56523 ± 8242	44984 ± 1111
CARNITINE	7210.6 ± 251	9510.2 ± 1251	57061 ± 7138	85762 ± 15089
NORMETANEPHRINE	279.2 ± 44	521.6 ± 31	2055.8 ± 85	2743 ± 281
O-ACETYL-L-CARNITINE	17741.4 ± 1830	12798 ± 1165	114046 ± 29772	194578 ± 48636
CREATINE PHOSPHATE DIBASIC TETRAHYDRATE	2840.4 ± 225	3369.4 ± 311	29565 ± 4587	35209 ± 9645
N-ACETYL-DL-SERINE	3328.4 ± 271	3484.2 ± 288	14324.4 ± 1404	10608 ± 2383
ANTHRANILATE	0.0	0.0	418.2 ± 103	522.3 ± 118
SPHINGANINE	257.3 ± 54	278.8 ± 63	1993.3 ± 581	4198.7 ± 1039

Tabla 5. Análisis de intensidad de metabolitos en células B16F10.

Células B16F10 (Mock) o (CAV1), fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Luego se realizó la extracción de los metabolitos utilizando metanol:etanol (1:1), las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrometría de masa, generando resultados de los metabolitos ionizados positiva y negativamente. Los tiempos de retención obtenidos para cada metabolito fueron comparados con la base de datos Metabosearch, aquellos que poseen un error < 5 ppm en relación a la base de datos, fueron considerados y se utilizó la intensidad de la señal como determinación de la cantidad de cada uno en cada condición. La tabla muestra el promedio de la intensidad de 5 experimentos independientes (promedio ± SEM).

A Metabolitos que aumentan en células B16F10 que expresan caveolina-1



B Metabolitos que disminuyen en células B16F10 que expresan caveolina-1

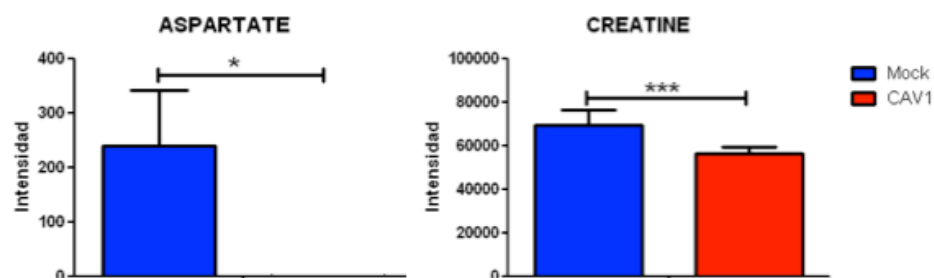


Figura 34. Metabolitos alterados por la expresión de caveolina-1 en células B16F10.

Se sembró 1×10^6 células B16F10 (Mock) o (CAV1) en placas de 10 cm, 24 h después fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Luego se realizó la extracción de los metabolitos utilizando metanol:etanol (1:1), las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrometría de masas. Los tiempos de retención obtenidos para cada metabolito fueron comparados con la base de datos Metabosearch, aquellos que poseen un error < 5 ppm, en relación a la base de datos, fueron considerados y se utilizó la intensidad de la señal como determinación de la cantidad de cada uno en cada condición. Los gráficos muestran (A) los metabolitos cuya expresión aumenta en presencia de caveolina-1 y (B) los metabolitos cuya expresión disminuye en presencia de caveolina-1. Se graficó el promedio de la intensidad de 5 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney, diferencias significativas en relación a las células Mock están indicadas (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

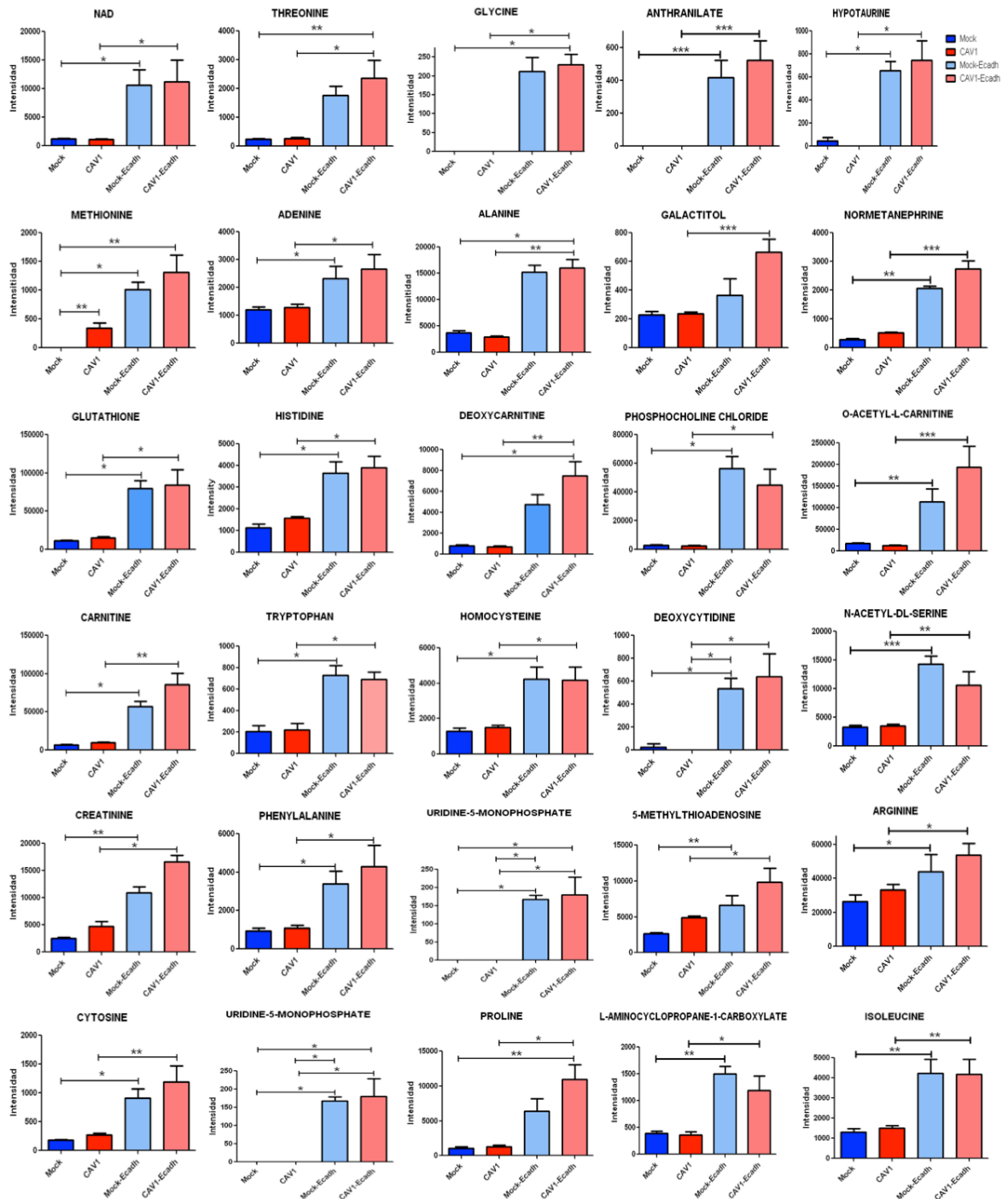


Figura 35. Metabolitos alterados por la expresión de E-cadherina en células B16F10.

Figura 35. Metabolitos alterados por la expresión de E-cadherina en células B16F10.

Células B16F10 (Mock) o (CAV1) fueron transfectadas para la expresión de E-cadherina, 24 h después, fueron tratadas por 48 h con IPTG (1 mM). Luego se realizó la extracción de los metabolitos utilizando metanol:etanol (1:1), las muestras fueron analizadas por cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrometría de masas. Se tabularon aquellos metabolitos cuya intensidad aumenta de manera significativa ($p < 0.05$) en células B16F10 en las que se expresó E-cadherina. Los gráficos muestran el promedio de la intensidad de 5 experimentos independientes (promedio \pm SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney, diferencias significativas en relación a las células Mock están indicadas (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

IV DISCUSIÓN

Trabajos de nuestro Laboratorio mostraron que E-cadherina es capaz de inhibir el rol promotor de metástasis *in vivo* de caveolina-1 en un modelo singénico de melanoma murino (Lobos-González et al., 2013). En células humanas de cáncer de colon que co-expresan E-cadherina y caveolina-1, ambas proteínas forman un complejo proteico, que secuestra a β -catenina en la membrana plasmática lo que disminuye la expresión de las proteínas survivina (Torres et al., 2007) y ciclooxigenasa-2 (Rodríguez et al., 2009) las cuales favorecen la sobrevivencia celular, por la inhibición de su transcripción dependiente de β -catenina/Tcf-Lef. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual E-cadherina es capaz de inhibir el rol promotor de metástasis de caveolina-1 no ha sido descrito. Por lo que objetivo principal de esta tesis fue determinar de que manera E-cadherina es capaz de bloquear el efecto promotor de metástasis de caveolina-1 en células metastásicas.

A E-CADHERINA DISMINUYE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR POR LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN Y14.

La fosforilación de caveolina-1 en Y14 se ha relacionado a eventos como aumento en el crecimiento independiente de anclaje y migración celular por un

mecanismo dependiente de Grb7 (Lee et al., 2000), la activación de metaloproteasas de matriz y un aumento en la invasión celular (Labrecque et al., 2004), la internalización de microdominios de membrana regulados por integrinas (del Pozo et al., 2005), la formación de caveolas inducida por EGF (Orlichenko et al., 2006) y con un aumento en la migración en células MDA-MB-231 y B16F10 (Urra et al., 2012), el cual es bloqueado por la inhibición de la fosforilación en Y14 tanto de manera farmacológica como por la utilización de una mutante no fosforilable de caveolina-1 (Y14F) (Ortiz et al., 2016). En esta tesis mostramos que la expresión de caveolina-1 indujo un aumento en la migración e invasión de células (Figura 12 y 13, respectivamente) y que la expresión de la mutante de caveolina-1 Y14F, no fue capaz de inducir este aumento y por el contrario una mutante fosfomimética de caveolina-1, Y14E indujo un aumento aún mayor en la migración e invasión celular (Figura 14). La expresión de E-cadherina en todas las líneas celulares metastásicas utilizadas en este trabajo fue capaz de bloquear el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 *wild type* y por caveolina-1 Y14E, (Figura 12, 13 y 14) y este bloqueo lo realizó por la inhibición de la fosforilación de caveolina-1 en Y14, como mostramos en células metastásicas (B16F10, HT29(US) y B16F10) que fueron sometidas a un estímulo migratorio (Figura 5, 6 y 7), además en células de cáncer de colon no metastásicas (DLD-1), que normalmente expresan E-cadherina, caveolina-1 no se fosforila en Y14 (Figura 8). La pérdida de la diferenciación celular y de las adhesiones célula-célula es un evento que

favorece la progresión tumoral, conocido como la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Thiery et al., 2006). El complejo de unión apical, formado por las uniones adherentes y las uniones estrechas, es el responsable de la mantención de las adhesiones célula-célula, define la polaridad celular, está involucrado en la señalización celular (Cereijido et al., 2008) y se encuentra desregulado durante EMT (Gavert et al., 2008). La pérdida de la expresión de E-cadherina se correlaciona con un fenotipo tumoral más agresivo (Lewis-Tuffin et al., 2010). La re-expresión de E-cadherina, restablece las uniones adherentes, disminuye la proliferación y movilidad celular, además de revertir el fenotipo metastásico (Conacci-sorrell et al., 2002). La integridad de las uniones adherentes está regulada por la fosforilación de β -catenina en tirosina por diferentes quinasas, Fyn, Fer (Y142), cMet (Y489), Src y EGF-R (Y654) (Balsamo et al., 1996; Roura et al., 1999). La fosforilación de β -catenina, resulta en la pérdida de la adhesión célula-célula, principalmente por el desensamblaje del complejo formado por E-cadherina y β -catenina. La desfosforilación de β -catenina promueve la formación de los complejos E-cadherina- β -catenina y α -catenina en las adhesiones célula-célula en queratinocitos humanos (Roura et al., 1999; Patel et al., 2003). En esta tesis quisimos determinar el estado de fosforilación de β -catenina en Y654. En células B16F10 y HT29(US), β -catenina no se encuentra fosforilada en la Y654 en ausencia o en presencia de E-cadherina (Figura 9). Por lo tanto en estas líneas celulares la fosforilación involucrada en la mantención de la integridad de las uniones adherentes no es

la Y654. Sin embargo, en las células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 que no expresaron E-cadherina, un estímulo migratorio, indujo la fosforilación de β -catenina en Y654, la cual fue inhibida por la expresión de E-cadherina (Figura 10). Por otra parte en células no metastásicas que expresan E-cadherina endógena (DLD-1), β -catenina no se fosforiló en Y654 luego de un estímulo migratorio (Figura 11). Por lo tanto en base a nuestros resultados podemos concluir que en células B16F10 y HT29(US) la fosforilación en Y654 de β -catenina no está involucrada en la regulación de la integridad de las uniones adherentes.

Se ha descrito que β -catenina es fosforilada en Y654 por la tirosina quinasa Src (Roura et al., 1999) a la cual también se le ha atribuido la fosforilación de caveolina-1 en Y14 (Li et al., 1996; Volonte et al., 2001; Cao et al., 2004) es por esto que se quiso determinar si Src era la quinasa involucrada en la fosforilación de caveolina-1. En células B16F10, la activación constitutiva de Src, no fue capaz de bloquear el efecto inhibitorio de E-cadherina en el aumento de la migración inducido por caveolina-1 (Figura 15). Por lo tanto, en este modelo de estudio Src no estaría involucrada.

La gran diferencia entre las células metastásicas donde β -catenina no se encuentra fosforilada en Y654 en ausencia de E-cadherina (B16F10 y HT29(US)) y en las que sí (MDA-MB-231) es que estas últimas expresan caveolina-1 endógenamente, en hepatocitos se ha descrito que la expresión de caveolina-1 es necesaria para la activación de Src, ya que en hepatocitos

CAV1^{-/-}, la fosforilación de Src en Y419 disminuye en comparación a hepatocitos que expresan caveolina-1, en los cuales además se observa un aumento de la producción de ROS y de la actividad de NOX1 (Moreno-Cáceres et al., 2016). Lo que nos lleva a pensar que en células metastásicas que no expresan caveolina-1 la actividad de Src se encuentra disminuida y posiblemente no es, esta quinasa la involucrada en la fosforilación de caveolina-1 en Y14 y/o β -catenina en Y654. Otros posibles candidatos son; la quinasa Fyn, la cual fosforila a caveolina-1 en Y14 en respuesta al estrés oxidativo e hiperosmolaridad (Sanguinetti et al., 2003b); Abl, la cual fosforila a caveolina-1 en Y14 en respuesta al estrés oxidativo (Sanguinetti et al., 2003a; Takeuchi et al., 2013); Fes, la que co-inmunoprecipita con caveolina-1 en células B16F10 y fue detectada mediante espectrometría de masa en esta tesis (Ver Tabla 4), no existen antecedentes previos que relacionen a esta quinasa con caveolina-1, pero se ha descrito que regula el citoesqueleto de actina, el ensamblaje de microtubulos y la adhesión celular (Laurent et al., 2004), además su rol en la progresión tumoral es controversial (Sangrar et al., 2005), pero la disminución de la expresión de Fes inhibe la proliferación de células de adenocarcinoma renal (Kanda et al., 2009), por lo que es un buen posible candidato para fosforilar a caveolina-1 en Y14, favoreciendo de esta forma un aumento en la migración, invasión y metástasis.

B PTPN14: UN NUEVO COMPAÑERO DE E-CADHERINA EN LA INHIBICIÓN DEL ROL PROMOTOR DE METÁSTASIS DE CAVEOLINA-1.

La proteína tirosina fosfatasa PTPN14, tiene un conocido rol durante el desarrollo (Smith et al., 1995). Una deficiencia o pérdida de PTPN14 induce defectos en el desarrollo en Zebrafish (Wyatt et al., 2007) y *Drosophila*, como regulador de la vía de señalización Hippo, mediante la activación de LATS1, dependiente del dominio C-terminal de PTPN14 y el silenciamiento de PTPN14, induce un aumento en la migración y en la morfogénesis (Poernbacher et al., 2012; Wilson et al., 2014) y se asocia a linfedema en ratones y humanos (Au et al., 2010). PTPN14, regula la adhesión célula-célula, matriz-célula, la migración y el crecimiento celular en células de cáncer de colon humanas (Zhang et al., 2013) y la transición epitelio-mesénquima, por la desfosforilación de β -catenina en la tirosina 654 y por un aumento de la secreción de TGF- β en células MDCK (Wadham et al., 2003; Wyatt et al., 2007). En células HeLa, la sobreexpresión de PTPN14 altera la morfología celular y el citoesqueleto de actina, reduciendo la adhesión célula-matriz (Ogata et al., 1999a; Ogata et al., 1999b). El silenciamiento de PTPN14 en células de cáncer de mama o la inyección intraperitoneal de ratones con medio condicionado de células deficientes en PTPN14, promueve el crecimiento y metástasis de xenografts de cáncer de mama (Belle et al., 2015). Sumado estos antecedentes PTPN14, tendría un rol

supresor de tumores y de metástasis. Sin embargo, en la actualidad existe poca información acerca de las funciones de PTPN14 y especialmente de sus sustratos. A la fecha se han identificado cinco sustratos de PTPN14; β -catenina (Wadham et al., 2003), YAP (Liu et al., 2013), p130Cas (Zhang et al., 2013), RIN1 (GEF de Rab-5) y PKC- δ (Belle et al., 2015), los cuales están involucrados en la progresión tumoral y metástasis, por lo que es de real importancia la identificación de nuevos sustratos de esta fosfatasa e indagar a profundidad en el rol que PTPN14 podría cumplir en la progresión del cáncer.

En esta tesis se mostró que caveolina-1 podría ser un sustrato de PTPN14, ya que ésta co-inmunoprecipita con caveolina-1 en células de melanoma murino B16F10 y de cáncer de colon humano HT29(ATCC), que expresan E-cadherina (Figura 17, Tabla 4), donde se observa una disminución significativa de la fosforilación de caveolina-1 en Y14 (Figura 16). PTPN14 podría interactuar con caveolina-1 a través de su motivo PPxY y el dominio tipo-WW de caveolina-1 (Sotgia et al., 2000; Barr et al., 2009). La presencia de PTPN14 en el complejo formado por E-cadherina y caveolina-1, podría explicar también, la disminución de la fosforilación de β -catenina en la tirosina 654, observada en células MDA-MB-231 que expresan E-cadherina (Figura 10), células que expresan PTPN14 (Belle et al., 2015).

En tejido de cáncer de mama invasivo, se ha observado una disminución de la expresión de PTPN14 y la disminución de la supervivencia de pacientes de cáncer de mama cuyos tumores expresan niveles elevados de dos de los sustratos de

PTPN14 descritos recientemente, RIN1 o PKC- δ (Belle et al., 2015), lo que sugiere que PTPN14 actuaría como un supresor de metástasis. Esta tesis reafirmó la idea de que la fosfatasa PTPN14 tendría un rol supresor de migración, invasión y metástasis, ya que en células B16F10, la sobre-expresión de PTPN14 inhibe el aumento en la migración e invasión inducido por caveolina-1 *in vitro* (Figura 18) y es capaz de inhibir el rol promotor de metástasis de caveolina-1 *in vivo* (Figura 19).

Por otra parte no podemos descartar la acción de la fosfatasa PTP1B, la cual disminuye la fosforilación en Y14 de caveolina-1 en células COS-7, mientras que la inhibición de PTP1B induce la fosforilación de caveolina-1 *in vitro* e *in vivo* (Lee et al., 2006). En esta tesis mostramos que PTP1B, co-inmunoprecipita con caveolina-1, independiente de la expresión de E-cadherina en células B16F10 y HT29(ATCC) (Figura 17), por lo que no podemos descartar el efecto de la expresión de esta fosfatasa en el bloqueo de la acción promotora de migración, invasión y metástasis de caveolina-1.

C E-CADHERINA INHIBE EL EJE PROMOTOR DE MIGRACIÓN E INVASIÓN: CAVEOLINA-1 / RAB-5 / RAC-1.

Trabajos de nuestro laboratorio han descrito, que caveolina-1 favorece la activación de la proteína GTPasa pequeña Rac-1 en células de cáncer colon, mama y melanoma, lo que induciría un aumento en el spreading y migración

celular (Urrea et al., 2012; Lobos-González et al., 2013; Díaz et al., 2014a; Díaz et al 2014b). Recientemente se propuso un novedoso mecanismo por el cual caveolina-1 activaría a Rac-1, favoreciendo el aumento del reclutamiento del GEF de Rac-1, Tiam1, a endosomas tempranos positivos para la proteína Rab-5, miembro de la superfamilia de Ras, cuya actividad aumenta por la expresión de caveolina-1 en células metastásicas (Díaz et al., 2014a; Díaz et al., 2014b).

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar si la expresión de E-cadherina era capaz de intervenir el eje de señalización caveolina-1 / Rab-5 / Rac-1, explicando en parte como E-cadherina inhibe el rol promotor de migración y metástasis de caveolina-1. Como resultado de esta tesis se demostró que en células metastásicas de cáncer de colon, HT29(US) y melanoma, B16F10, la expresión de E-cadherina inhibe la activación de Rab-5 y Rac-1 inducida por caveolina-1 (Figura 20 y 21).

Como se mencionó anteriormente uno de los sustratos descritos para PTPN14 es un GEF para Rab-5, RIN1, el cual es fosforilado en la tirosina 36 por la quinasa Abl, lo que crea un sitio de unión para Abl, a través su dominio SH2, liberando la auto-inhibición de la actividad quinasa de Abl promoviendo su activación (Hu et al., 2005; Cao et al., 2008), favoreciendo la migración celular y metástasis (Khusial et al., 2010; Sun et al., 2014), posiblemente por la fosforilación de caveolina-1 en la tirosina 14 (Galvagni et al., 2007). Por lo tanto en células que expresan E-cadherina, PTPN14 desfosforila a RIN1 en la tirosina 16 (Belle et al., 2015), reclutándolo posiblemente al complejo multiproteico

formado con caveolina-1, no permitiendo que RIN1 actúe como GEF de Rab-5, manteniéndolo en su forma inactiva (Rab-5-GDP), promoviendo el paso de endosomas tempranos a endosomas tardíos, los cuales son degradados por la vía lisosomal (Belle et al., 2005), manteniendo Rac-1 inactivo (Rac-1-GDP), inhibiendo de esta forma el aumento en la migración, invasión y metástasis inducido por caveolina-1.

D CAVEOLINA-1 Y SU ROL EN LA REPROGRAMACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS METASTÁSICAS.

La glicólisis aeróbica es un componente indispensable del metabolismo de células metastásicas, siendo crítico para su crecimiento y esencial para la migración celular, además de ser un proceso que permite distinguirlas de células sanas en el cuerpo. El cambio metabólico que sufren las células cancerígenas desde una glicólisis anaeróbica y posterior procesamiento del piruvato a CO_2 en la mitocondria a un metabolismo principalmente glicolítico en presencia de oxígeno fue descrito por primera vez por Warburg en 1956 (Warburg, 1956a ; Warburg., 1956b). La glicólisis aeróbica es ineficiente en la generación de ATP, lo cual es compensado por un aumento del flujo glicolítico, lo que le permite a las células cancerígenas utilizar el nutriente extracelular más abundante, la glucosa, para producir grandes cantidades de ATP, lo que les permitiría migrar e invadir rápidamente, además, la degradación de la glucosa

proveería a las células de intermediarios metabólicos necesarios para las vías biosintéticas (Han et al., 2013).

Existen antecedentes que vinculan a caveolina-1 con la reprogramación metabólica de células estromales de mama, donde la pérdida de la expresión de caveolina-1 en estas células es suficiente para inducir un aumento en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), en la autofagia, la glicólisis y la disminución del metabolismo respiratorio mitocondrial, favoreciendo la progresión tumoral (Martinez-Outschoorn et al., 2014; Chen et al., 2014). En células de cáncer de mama, que expresan bajos niveles de caveolina-1, la re-expresión de ésta, disminuye la glicólisis y aumenta la producción de ATP mitocondrial, de manera dependiente de la supresión de la sobre-expresión de MnSOD mediada por Nrf2 (Hart et al., 2015). Trabajos previos del laboratorio y esta tesis en particular han mostrado que la expresión de caveolina-1 en estadios tardíos de la progresión tumoral se relaciona con un aumento en la migración (Figura 12), invasión (Figura 13) en tres líneas celulares cancerígenas metastásicas de distintos orígenes y con un aumento en la metástasis *in vivo* (Figura 19), lo que nos llevó a preguntarnos si la expresión de caveolina-1 también podría incidir en la reprogramación metabólica de estas líneas celulares metastásicas y a diferencia de lo publicado por Hart, la expresión de caveolina-1, tanto en la línea de melanoma murino B16F10 como en las líneas celulares humanas de cáncer de colon y mama (HT29(US) y MDA-MB-231, respectivamente), disminuye el consumo de oxígeno (Figura 23) y

aumenta la glicólisis aeróbica (Figura 25), induciendo de esta forma un cambio metabólico, a un metabolismo glicolítico en presencia de oxígeno (Figura 26) como el descrito por Warburg. Creemos que esta reprogramación metabólica, puede explicar en parte el aumento observado en la migración e invasión inducido por caveolina-1 en células metastásicas, como se ha descrito para células de cáncer de mama altamente metastásicas (4T1) en comparación con células de cáncer de mama no metastásicas (67NR) (Simoes et al., 2015). Ésta reprogramación metabólica inducida por caveolina-1, dependería de su fosforilación en Y14, ya que en células que expresaron una mutante no fosforilable para caveolina-1 (Y14F), se observó una completa disminución de la actividad mitocondrial en células B16F10 (Figura 30).

Más interesante aún, en esta tesis hemos descrito un posible mecanismo mediante el cual caveolina-1 favorecería un metabolismo glicolítico, bloqueando al complejo IV mitocondrial, ya que en células que expresaron caveolina-1 la inhibición del complejo IV, no pudo ser recuperada al entregarle a las células sustratos específicos para este complejo (Figura 31). Una fracción del oxígeno mitocondrial consumido por la mitocondria es reducido por la filtración prematura de electrones para formar el radical superóxido en vez de ser reducido completamente hasta agua. La mayoría del radical superóxido generado en la mitocondria, se forma en la matriz a partir de los complejos mitocondriales I y III (Roelofs et al., 2015), por lo que el bloqueo del complejo IV favorecería una acumulación de ROS mitocondriales, como mostramos

mediante la utilización de un plásmido fluorescente sensible a peróxido de hidrogeno, la expresión de caveolina-1 en células B16F10, induce un aumento de ROS en la mitocondria y en el citoplasma (Figura 32) lo que generaría un aumento en la migración celular tal como se mostró en la Figura 33, el cual es inhibido por la exposición de las células al antioxidante N-acetylcisteína (Figura 33). El aumento en la migración e invasión de células cancerígenas, mediado por ROS ha sido ampliamente descrito en la literatura (Cave et al., 2006; Flores-López et al., 2016; Kamiya et al., 2016), pero esta tesis relaciona por primera vez a caveolina-1 con la generación de una disfunción mitocondrial y reprogramación del metabolismo energético de células metastásicas (Figura 36).

La relación entre E-cadherina y la reprogramación del metabolismo es aún menos conocida. En muestras clínicas de cáncer colorectal se ha observado una relación entre la disminución de la expresión de E-cadherina con el aumento de la expresión de la enzima Piruvato quinasa M2. (Konno, et al., 2015). En *Drosophila* la Fat (Ft) cadherina funciona en la mitocondria, regulando directamente la integridad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, promoviendo la fosforilación oxidativa, y la pérdida de Ft lleva a la pérdida de la actividad del complejo mitocondrial I, aumentando la cantidad de ROS intracelulares, favoreciendo un cambio metabólico a glicólisis aeróbica (Sing, et al., 2014). En este trabajo se mostró que la expresión de E-cadherina disminuye tanto el consumo de oxígeno (Figura 27) como la glicólisis aeróbica

en células metastásicas (Figura 28), ralentizando el metabolismo glicolítico inducido por caveolina-1 en células HT29(US) y conduciendo a las células B16F10 y MDA-MB-231 a un metabolismo quiescente (Figura 29). En células epiteliales la expresión de E-cadherina favorece la inhibición de la transcripción mediada por YAP1 y bloquea la re-entrada de la células al ciclo celular y la progresión a través de la fase G1, manteniendo un fenotipo celular quiescente (Benham-Pyle et al., 2015). Dado que demostramos que la fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina y recientemente se ha descrito que PTPN14 desfosforila e inactiva a YAP (Liu et al., 2013), este podría ser el mecanismo por el cual la expresión de E-cadherina favorece un fenotipo quiescente en células que expresan caveolina-1.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis hemos generado un nuevo modelo (Figura 36). En células metastásicas carentes de E-cadherina (Figura 36A), la fosforilación de en tirosina (Y14) de caveolina-1 favorece la activación de Rab-5 lo que induce la activación de Rac-1 promoviendo un aumento en la migración e invasión celular. La expresión de caveolina-1 induce un cambio metabólico, un aumento de la glicólisis aeróbica y una disminución de la respiración mitocondrial, por la inhibición del complejo IV, aumentando la acumulación de ROS mitocondriales y citosólicos lo cual también induciría un aumento de la fosforilación de caveolina-1 en Y14, mientras que en células metastásicas que expresan E-cadherina (Figura 36B) se forma un complejo

multiproteico entre E-cadherina y caveolina-1 que recluta a la fosfatasa PTPN14, la que desfosforila a caveolina-1 en Y14, inhibiendo la activación de Rab-5 y Rac-1 inducida por caveolina-1, inhibiendo de esta forma la habilidad de caveolina-1 para promover migración, invasión y metástasis, además la expresión de E-cadherina ralentiza el metabolismo celular, disminuyendo el consumo de oxígeno y la glicólisis, conduciendo a las células a un metabolismo quiescente.

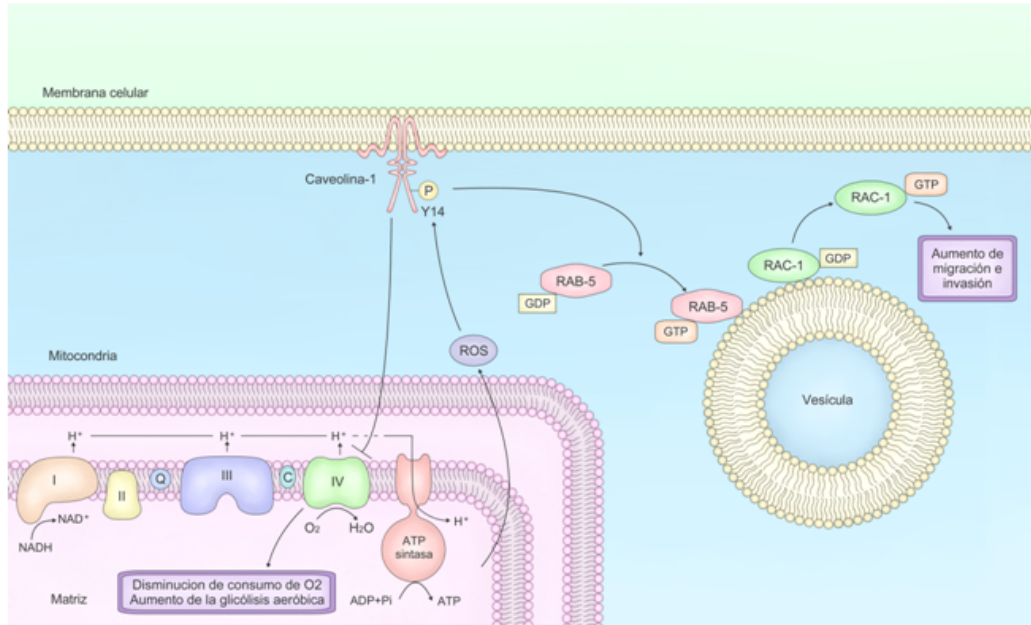
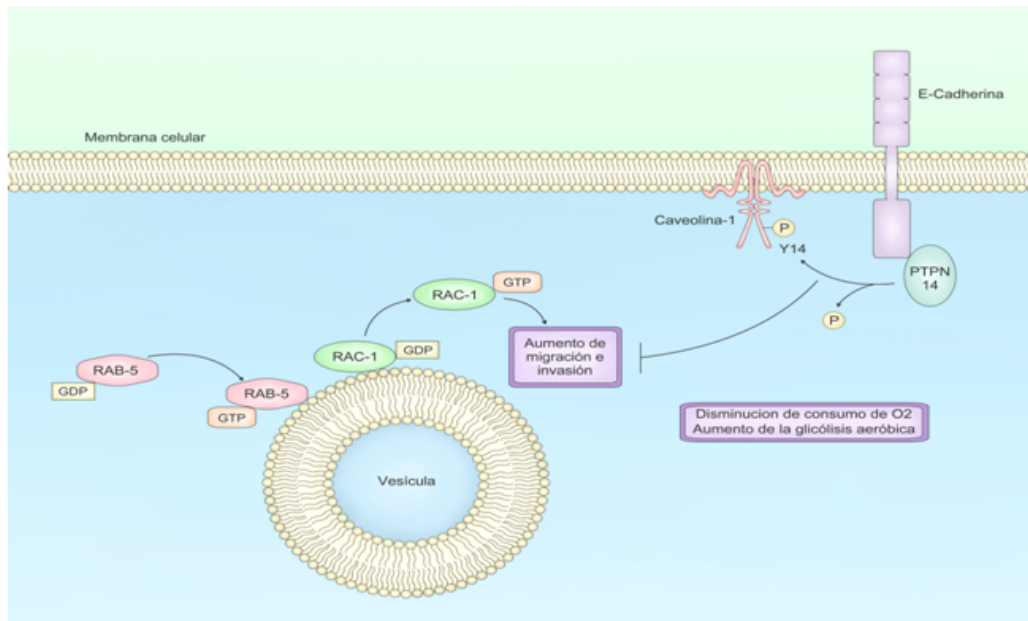
A**B**

Figura 36. Modelo Propuesto.

Figura 36. Modelo Propuesto. (A) En células metastásicas carentes de E-cadherina, la fosforilación en tirosina 14 (Y14) de caveolina-1 favorece la activación de Rab-5 que induce la activación de Rac-1 promoviendo un aumento en la migración e invasión celular y metástasis. La expresión de caveolina-1 induce un cambio metabólico, un aumento de la glicólisis aeróbica y una disminución de la respiración mitocondrial-dependiente de su fosforilación en Y14- por la inhibición del complejo IV mitocondrial, aumentando los ROS intracelulares lo cual también induciría un aumento de la fosforilación de caveolina-1 en Y14. (B) En presencia de E-cadherina se forma un complejo multiproteico con caveolina-1 que recluta a la fosfatasa PTPN14, la que desfosforila a caveolina-1 en Y14, inhibiendo la activación de Rab-5 y Rac-1 inducida por caveolina-1, inhibiendo de esta forma la habilidad de caveolina-1 para promover migración e invasión celular y metástasis, además la expresión de E-cadherina ralentiza el metabolismo celular, disminuyendo el consumo de oxígeno y la glicólisis, conduciendo a las células a un metabolismo quiescente.

E CAVEOLINA-1 Y LA MODIFICACIÓN DEL METABOLOMA DE CÉLULAS METASTÁSICAS.

El metaboloma se define como todos los metabolitos formados por la célula en asociación con su metabolismo (Metabolome Analysis: An Introduction, by Villas-Bôas, S.G., et al 2007). Nos pareció interesante estudiar si existían cambios en el metaboloma de células metastásicas por la expresión de caveolina-1, dado el cambio del fenotipo del metabolismo energético inducido por caveolina-1, descrito en esta tesis. En células que expresaban caveolina-1 se observó un aumento en la cantidad de metionina. Metionina es un aminoácido esencial necesario para el crecimiento y normal funcionamiento de las células, contribuye a la síntesis de proteínas y es el precursor de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metil en las células (Borrego et al., 2016). SAM es necesaria para la metilación del DNA, RNA, proteínas y

lípidos, además de la formación de 1-metilnicotinamida, factor involucrado en; la pluripotencialidad de las células madres (Sperber et al., 2015), la biosíntesis de poliamina (Hu et al., 2004) y la vía de rescate de metionina (Tang et al., 2000). Existe una importante dependencia de la células cancerígenas por la metionina, conocida como el “fenotipo dependiente de metionina”. La mayoría de las células cancerígenas no pueden proliferar en un medio de cultivo donde metionina ha sido reemplazada por su precursor metabólico homocisteína en cambio no afecta a células sanas (Halpern et al., 1974). Células de cáncer de mama que presentan un fenotipo dependiente de metionina, el metabolismo de SAM depende de la disponibilidad de metionina (Borrego et al., 2016). En base a nuestros resultados podemos postular que células que expresaron caveolina-1 presentan una mayor disponibilidad de metionina, lo que se podría correlacionar con una mayor metilación del DNA.

Otro de los metabolitos que se encontró aumentado en células que expresaron caveolina-1 fueron: (1) Arginina, conocido sustrato de las enzimas; oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), arginasa y arginina metiltransferasas, todas estas involucradas en la regulación de la proliferación celular y progresión tumoral (Felley-Bosco et al., 2000; Xu et al., 2016; Hernández et al., 2016). (2) Dietanolamina aumenta en hepatocarcinomas de ratón (National Toxicology Program, 1999) y (3) Noradrenalina, existen varios estudios que han relacionado un aumento en el crecimiento tumoral, migración, angiogénesis y metástasis en cáncer de mama a la activación de receptores β - adrenérgicos

(Chakroborty et al., 2009; Cole et al., 2012; Childers et al., 2015). Por lo tanto, los metabolitos aumentados por la expresión de caveolina-1 se relacionan con un aumento en el crecimiento tumoral, migración y metástasis. Por otro lado se encontraron dos metabolitos que disminuyeron por la expresión de caveolina-1, aspartato y creatina. Variaciones en los niveles de aspartato, se ha relacionado con variaciones en la actividad del transportador de malato-aspartato, el que provee de equivalentes reductores (NADH) a la mitocondria, en células de glioblastoma se ha asociado una mayor actividad de este transportador con una disminución del ratio NADH/NAD^+ en el citosol, lo que favorecería un aumento en la glicólisis (Wang et al., 2016), lo que se relaciona con el cambio metabólico hacia un fenotipo metabólico glicolítico aeróbico inducido por caveolina-1. La suplementación con creatina de un tratamiento con la droga antineoplásica metigloixal en células de cáncer de mama MCF7, aumentó la apoptosis y citotoxicidad de esta droga en comparación al tratamiento solo con la droga (Pal et al., 2016), por lo que una disminución en los niveles de creatina en células que expresan caveolina-1 podría relacionarse con multiresistencia a drogas quimioterapéuticas que se ha asociado a un aumento en la expresión de caveolina-1

V CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis, nos permiten formular un posible mecanismo mediante el cual E-cadherina estaría inhibiendo el rol promotor de migración y metástasis de caveolina-1 en células metastásicas (Figura 36). En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la fosforilación de caveolina-1 en Y14 es un evento importante para la migración e invasión de células metastásicas y que la expresión de E-cadherina estaría inhibiendo la capacidad migratoria e invasiva de la células por la inhibición de la fosforilación de caveolina-1 en Y14. En células metastásicas que normalmente no expresan caveolina-1 y en células que expresan E-cadherina, β -catenina no se fosforila en Y654- residuo que es normalmente fosforilado por Src- además la activación constitutiva de Src no fue capaz de sobrepasar la inhibición de E-cadherina sobre la promoción de la migración e invasión inducida por caveolina-1, por lo tanto en presencia de E-cadherina en estas células, Src no sería capaz ni de aumentar la fosforilación de caveolina-1 en Y14 o ni alterar la integridad de las uniones adherentes.

Además, estudiamos este mecanismo más en detalle, postulando a que hubiese una fosfatasa en el complejo multiproteico formado por E-cadherina y caveolina-1 que podría desfosforilar a caveolina-1 y β -catenina. En esta tesis mostramos que la fosfatasa PTPN14 co-inmunoprecipita con caveolina-1 en presencia de E-cadherina, disminuyendo la fosforilación de caveolina-1 en Y14.

Además, la sobre-expresión de PTPN14 es capaz de inhibir el aumento en la migración, invasión y metástasis *in vivo* inducido por caveolina-1. PTPN14 tiene un conocido rol en el desarrollo, pero su implicancia en la progresión del cáncer es controversial y poco estudiada. En este trabajo se generó nueva evidencia de que PTPN14 actuaría como una proteína supresora de tumores y describimos a caveolina-1 como un nuevo posible sustrato para esta fosfatasa. Además, la fosfatasa PTP1B también co-inmunoprecipita con la mutante caveolina-1(Y14F) independiente de la expresión de E-cadherina, por lo que no podemos sugerir su participación en la desfosforilación de caveolina-1 en Y14 también independiente de E-cadherina.

También analizamos el efecto de la expresión de E-cadherina sobre el eje de señalización, descrito previamente por nuestro laboratorio, caveolina-1/ Rab-5/ Rac-1 mostrando que E-cadherina es capaz de inhibir la activación de Rab-5 y Rac-1 y el fenotipo metastásico inducido por caveolina-1.

Por otro lado, evaluamos el efecto de la expresión de caveolina-1 sobre el fenotipo metabólico de las células cancerígenas, demostrando que la expresión de caveolina-1 disminuye el consumo de oxígeno de las células metastásicas, por el bloqueo del complejo mitocondrial IV, e induce un aumento de ROS a nivel mitocondrial y citoplasmático. Además, la expresión de caveolina-1 aumenta la acidificación extracelular, indicando un aumento de la tasa glicolítica, induciendo de esta forma un cambio metabólico desde un metabolismo oxidativo aeróbico a un metabolismo glicolítico aeróbico, más

conocido como el efecto Warburg, lo que puede explicar en parte, la mayor tasa migratoria e invasiva de las células que expresan caveolina-1. Interesantemente, la fosforilación de caveolina-1 en Y14 es un evento necesario para la inducción de este *switch* metabólico por caveolina-1, indicando la importancia de la expresión de caveolina-1 y su fosforilación para la mantención del fenotipo metabólico.

La co-expresión de E-cadherina con caveolina-1 en las células metastásicas de cáncer de colon, mama y melanoma también generó cambios en el metabolismo, disminuyendo el consumo de oxígeno y la capacidad glicolítica. Además, la expresión de E-cadherina favoreció un metabolismo quiescente en las células de cáncer de mama y melanoma.

Finalmente, observamos que la expresión de caveolina-1 indujo el aumento de metabolitos que favorecen el crecimiento tumoral, migración celular y metástasis lo que es consistente con el rol promotor de metástasis de caveolina-1 e indujo la disminución de metabolitos que pueden explicar en parte el cambio metabólico promovido por la expresión de caveolina-1 y la adquisición de multiresistencia a drogas quimioterapéuticas asociada a un aumento de la expresión de caveolina-1, sugiriendo por primera vez la participación de caveolina-1 en la regulación del metaboloma de células cancerígenas.

VI REFERENCIAS

- Au, A.C., Hernandez, P.A., Lieber, E., Nadroo, A.M., Shen, Y.M., Kelley, K.A., Gelb, B.D., and Diaz, G.A. (2010). Protein tyrosine phosphatase PTPN14 is a regulator of lymphatic function and choanal development in humans. *Am J Hum Genet* 87, 436-444.
- Ausubel, L.J., Kwan, C.K., Sette, A., Kuchroo, V., and Hafler, D.A. (1996). Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15317-15322.
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., and Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* 6, 1353-1363.
- Balsamo, J., Leung, T., Ernst, H., Zanin, M.K., Hoffman, S., and Lilien, J. (1996). Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 134, 801-813.
- Barr, A.J., Ugochukwu, E., Lee, W.H., King, O.N., Filippakopoulos, P., Alfano, I., Savitsky, P., Burgess-Brown, N.A., Muller, S., and Knapp, S. (2009). Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* 136, 352-363.
- Beardsley, A., Fang, K., Mertz, H., Castranova, V., Friend, S., and Liu, J. (2005). Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 280, 3541-3547.
- Belle, L., Ali, N., Lonic, A., Li, X., Paltridge, J.L., Roslan, S., Herrmann, D., Conway, J.R., Gehling, F.K., Bert, A.G., *et al.* (2015). The tyrosine phosphatase PTPN14 (Pez) inhibits metastasis by altering protein trafficking. *Sci Signal* 8, ra18.
- Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 60, 5870-5878.
- Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and beta-catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* 348, 1024-1027.
- Bishop, P. (2000). Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Br J Ophthalmol* 84, 1087-1088.
- Bohle, A.S., and Kalthoff, H. (1999). Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch Surg* 384, 133-140.
- Borrego, S.L., Fahrman, J., Datta, R., Stringari, C., Grapov, D., Zeller, M., Chen, Y., Wang, P., Baldi, P., Gratton, E., *et al.* (2016). Metabolic changes associated with methionine stress sensitivity in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Cancer Metab* 4, 9.
- Boscher, C., and Nabi, I.R. (2012). Caveolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol* 729, 29-50.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., *et al.* (2011). Increased ER-mitochondrial

coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci* 124, 2143-2152.

Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.

Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., and Sessa, W.C. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6, 1362-1367.

Cao, H., Courchesne, W.E., and Mastick, C.C. (2002). A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277, 8771-8774.

Cao, H., Sanguinetti, A.R., and Mastick, C.C. (2004). Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Exp Cell Res* 294, 159-171.

Cao, X., Tanis, K.Q., Koleske, A.J., and Colicelli, J. (2008). Enhancement of ABL kinase catalytic efficiency by a direct binding regulator is independent of other regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 283, 31401-31407.

Carlin, S.M., Resink, T.J., Tamm, M., and Roth, M. (2005). Urokinase signal transduction and its role in cell migration. *FASEB J* 19, 195-202.

Casazza, A., Finisguerra, V., Capparuccia, L., Camperi, A., Swiercz, J.M., Rizzolio, S., Rolny, C., Christensen, C., Bertotti, A., Sarotto, I., *et al.* (2010). Sema3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J Clin Invest* 120, 2684-2698.

Cave, A.C., Brewer, A.C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D.J., Walker, S., and Shah, A.M. (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8, 691-728.

Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., and Larre, I. (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1778, 770-793.

Chakroborty, D., Sarkar, C., Basu, B., Dasgupta, P.S., and Basu, S. (2009). Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res* 69, 3727-3730.

Chen, D., and Che, G. (2014). Value of caveolin-1 in cancer progression and prognosis: Emphasis on cancer-associated fibroblasts, human cancer cells and mechanism of caveolin-1 expression (Review). *Oncol Lett* 8, 1409-1421.

Chen, F., Barman, S., Yu, Y., Haigh, S., Wang, Y., Black, S.M., Rafikov, R., Dou, H., Bagi, Z., Han, W., *et al.* (2014). Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 73, 201-213.

Chen, L., Park, S.M., Tumanov, A.V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J.R., Fu, Y.X., Romero, I.L., Lengyel, E., *et al.* (2010). CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465, 492-496.

Chiang, W.F., Liu, S.Y., Fang, L.Y., Lin, C.N., Wu, M.H., Chen, Y.C., Chen, Y.L., and Jin, Y.T. (2008). Overexpression of galectin-1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 44, 325-334.

Childers, W.K., Hollenbeak, C.S., and Cheriya, P. (2015). beta-Blockers Reduce Breast Cancer Recurrence and Breast Cancer Death: A Meta-Analysis. *Clin Breast Cancer* 15, 426-431.

Cole, S.W., and Sood, A.K. (2012). Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 18, 1201-1206.

Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., and Ben-Ze'ev, A. (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109, 987-991.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.

Deheuninck, J., and Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res* 19, 47-57.

del Pozo, M.A., Balasubramanian, N., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Grande-Garcia, A., Anderson, R.G., and Schwartz, M.A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7, 901-908.

Diaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., Diaz, N., Leyton, L., Stupack, D., Quest, A.F., and Torres, V.A. (2014a). Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *J Cell Sci* 127, 2401-2406.

Diaz, J., Mendoza, P., Silva, P., Quest, A.F., and Torres, V.A. (2014b). A novel caveolin-1/p85alpha/Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion. *Commun Integr Biol* 7.

Diaz-Valdivia, N., Bravo, D., Huerta, H., Henriquez, S., Gabler, F., Vega, M., Romero, C., Calderon, C., Owen, G.I., Leyton, L., *et al.* (2015). Enhanced caveolin-1 expression increases migration, anchorage-independent growth and invasion of endometrial adenocarcinoma cells. *BMC Cancer* 15, 463.

Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., *et al.* (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.

Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J.G., and Gabbert, H.E. (2001). Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 276, 41889-41897.

Felley-Bosco, E., Bender, F.C., Courjault-Gautier, F., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14334-14339.

Fernandez, M.A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S.J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R.G., and Pol, A. (2006). Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 313, 1628-1632.

Flores-Lopez, L.A., Martinez-Hernandez, M.G., Viedma-Rodriguez, R., Diaz-Flores, M., and Baiza-Gutman, L.A. (2016). High glucose and insulin enhance uPA

expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell Oncol (Dordr)*.

Galvagni, F., Anselmi, F., Salameh, A., Orlandini, M., Rocchigiani, M., and Oliviero, S. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-3 activity is modulated by its association with caveolin-1 on endothelial membrane. *Biochemistry* *46*, 3998-4005.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 493-504.

Gatenby, R.A., and Gawlinski, E.T. (2003). The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res* *63*, 3847-3854.

Gavert, N., and Ben-Ze'ev, A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* *14*, 199-209.

Geho, D.H., Bandle, R.W., Clair, T., and Liotta, L.A. (2005). Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)* *20*, 194-200.

Goetz, J.G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S.S., Scudamore, T., Kojic, L.D., and Nabi, I.R. (2008). Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* *180*, 1261-1275.

Grande-Garcia, A., and del Pozo, M.A. (2008). Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *Eur J Cell Biol* *87*, 641-647.

Grande-Garcia, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., and del Pozo, M.A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* *177*, 683-694.

Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* *33*, 891-895.

Halpern, B.C., Clark, B.R., Hardy, D.N., Halpern, R.M., and Smith, R.A. (1974). The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 1133-1136.

Han, T., Kang, D., Ji, D., Wang, X., Zhan, W., Fu, M., Xin, H.B., and Wang, J.B. (2013). How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? *Cell Adh Migr* *7*, 395-403.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Harlozinska, A. (2005). Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* *25*, 3327-3333.

Hart, P.C., Mao, M., de Abreu, A.L., Ansenberger-Fricano, K., Ekoue, D.N., Ganini, D., Kajdacsy-Balla, A., Diamond, A.M., Minshall, R.D., Consolaro, M.E., *et al.* (2015). MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nat Commun* *6*, 6053.

Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* *106*, 873-881.

Henson, J.H. (1999). Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation. *Microsc Res Tech* 47, 155-162.

Hernandez, M.V., Wehrendt, D.P., and Arregui, C.O. (2010). The protein tyrosine phosphatase PTP1B is required for efficient delivery of N-cadherin to the cell surface. *Mol Biol Cell* 21, 1387-1397.

Hernandez, S., and Dominko, T. (2016). Novel Protein Arginine Methyltransferase 8 Isoform is Essential for Cell Proliferation. *J Cell Biochem*.

Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M., Martin, S., *et al.* (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.

Ho, C.C., Huang, P.H., Huang, H.Y., Chen, Y.H., Yang, P.C., and Hsu, S.M. (2002). Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 161, 1647-1656.

Holgren, C., Dougherty, U., Edwin, F., Cerasi, D., Taylor, I., Fichera, A., Joseph, L., Bissonnette, M., and Khare, S. (2010). Sprouty-2 controls c-Met expression and metastatic potential of colon cancer cells: sprouty/c-Met upregulation in human colonic adenocarcinomas. *Oncogene* 29, 5241-5253.

Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C., and Collard, J.G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278, 1464-1466.

Horwitz, R., and Webb, D. (2003). Cell migration. *Curr Biol* 13, R756-759.

Hu, H., Bliss, J.M., Wang, Y., and Colicelli, J. (2005). RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Curr Biol* 15, 815-823.

Hu, X., Washington, S., Verderame, M.F., Demers, L.M., Mauger, D., and Manni, A. (2004). Biological activity of the S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor SAM486A in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 25, 1831-1838.

Jo, A., Park, H., Lee, S.H., Ahn, S.H., Kim, H.J., Park, E.M., and Choi, Y.H. (2014). SHP-2 binds to caveolin-1 and regulates Src activity via competitive inhibition of CSK in response to H₂O₂ in astrocytes. *PLoS One* 9, e91582.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.

Joshi, B., Strugnell, S.S., Goetz, J.G., Kojic, L.D., Cox, M.E., Griffith, O.L., Chan, S.K., Jones, S.J., Leung, S.P., Masoudi, H., *et al.* (2008). Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res* 68, 8210-8220.

Kamiya, T., Goto, A., Kurokawa, E., Hara, H., and Adachi, T. (2016). Cross Talk Mechanism among EMT, ROS, and Histone Acetylation in Phorbol Ester-Treated Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1284372.

Kanda, S., Miyata, Y., Kanetake, H., and Smithgall, T.E. (2009). Downregulation of the c-Fes protein-tyrosine kinase inhibits the proliferation of human renal carcinoma cells. *Int J Oncol* 34, 89-96.

Kassis, J., Lauffenburger, D.A., Turner, T., and Wells, A. (2001). Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol* 11, 105-117.

Khusial, P.R., Vadla, B., Krishnan, H., Ramlall, T.F., Shen, Y., Ichikawa, H., Geng, J.G., and Goldberg, G.S. (2010). Src activates Abl to augment Robo1 expression in order to promote tumor cell migration. *Oncotarget* 1, 198-209.

Kim, D., Kim, H., and Koo, J.S. (2012). Expression of caveolin-1, caveolin-2 and caveolin-3 in thyroid cancer and stroma. *Pathobiology* 79, 1-10.

Kimura, A., Mora, S., Shigematsu, S., Pessin, J.E., and Saltiel, A.R. (2002). The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J Biol Chem* 277, 30153-30158.

Koleske, A.J., Baltimore, D., and Lisanti, M.P. (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1381-1385.

Konno, M., Doki, Y., Mori, M., and Ishii, H. (2015). [Metabolism enzyme controls cancer stemness]. *Nihon Rinsho* 73, 745-750.

Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R. (2004). Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279, 52132-52140.

Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* 69, 522-530.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.

Laurent, C.E., and Smithgall, T.E. (2004). The c-Fes tyrosine kinase cooperates with the breakpoint cluster region protein (Bcr) to induce neurite extension in a Rac- and Cdc42-dependent manner. *Exp Cell Res* 299, 188-198.

Lee, H., Volonte, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D.M., Bregman, D.B., Wilson, M.T., Campos-Gonzalez, R., Bouzahzah, B., Pestell, R.G., *et al.* (2000). Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14, 1750-1775.

Lee, H., Xie, L., Luo, Y., Lee, S.Y., Lawrence, D.S., Wang, X.B., Sotgia, F., Lisanti, M.P., and Zhang, Z.Y. (2006). Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry* 45, 234-240.

Lee, S.W., Reimer, C.L., Oh, P., Campbell, D.B., and Schnitzer, J.E. (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 1391-1397.

Lewis-Tuffin, L.J., Rodriguez, F., Giannini, C., Scheithauer, B., Necela, B.M., Sarkaria, J.N., and Anastasiadis, P.Z. (2010). Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One* 5, e13665.

Li, L., Yang, G., Ebara, S., Satoh, T., Nasu, Y., Timme, T.L., Ren, C., Wang, J., Tahir, S.A., and Thompson, T.C. (2001). Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated

survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 61, 4386-4392.

Li, S., Seitz, R., and Lisanti, M.P. (1996). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271, 3863-3868.

Liu, X., Yang, N., Figel, S.A., Wilson, K.E., Morrison, C.D., Gelman, I.H., and Zhang, J. (2013). PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP. *Oncogene* 32, 1266-1273.

Lobos-Gonzalez, L., Aguilar, L., Diaz, J., Diaz, N., Urra, H., Torres, V.A., Silva, V., Fitzpatrick, C., Lladser, A., Hoek, K.S., *et al.* (2013). E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 555-570.

Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823-837.

Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2014). Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol* 41, 195-216.

Mastick, C.C., Brady, M.J., and Saltiel, A.R. (1995). Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol* 129, 1523-1531.

Mastick, C.C., and Saltiel, A.R. (1997). Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 272, 20706-20714.

Michiels, F., and Collard, J.G. (1999). Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion. *Biochem Soc Symp* 65, 125-146.

Monaghan-Benson, E., and Burridge, K. (2013). Mutant B-RAF regulates a Rac-dependent cadherin switch in melanoma. *Oncogene* 32, 4836-4844.

Moreno-Caceres, J., Mainez, J., Mayoral, R., Martin-Sanz, P., Egea, G., and Fabregat, I. (2016). Caveolin-1-dependent activation of the metalloprotease TACE/ADAM17 by TGF-beta in hepatocytes requires activation of Src and the NADPH oxidase NOX1. *FEBS J* 283, 1300-1310.

Navarro, A., Anand-Apte, B., and Parat, M.O. (2004). A role for caveolae in cell migration. *Faseb J* 18, 1801-1811.

Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., and Minami, Y. (2010). Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* 20, 346-354.

Ogata, M., Takada, T., Mori, Y., Oh-hora, M., Uchida, Y., Kosugi, A., Miyake, K., and Hamaoka, T. (1999a). Effects of overexpression of PTP36, a putative protein tyrosine phosphatase, on cell adhesion, cell growth, and cytoskeletons in HeLa cells. *J Biol Chem* 274, 12905-12909.

Ogata, M., Takada, T., Mori, Y., Uchida, Y., Miki, T., Okuyama, A., Kosugi, A., Sawada, M., Oh-hora, M., and Hamaoka, T. (1999b). Regulation of phosphorylation level and distribution of PTP36, a putative protein tyrosine phosphatase, by cell-substrate adhesion. *J Biol Chem* 274, 20717-20724.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273, 5419-5422.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 68, 3645-3654.

Orlichenko, L., Huang, B., Krueger, E., and McNiven, M.A. (2006). Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J Biol Chem* 281, 4570-4579.

Ortiz, R., Diaz, J., Diaz, N., Lobos-Gonzalez, L., Cardenas, A., Contreras, P., Diaz, M.I., Otte, E., Cooper-White, J., Torres, V., *et al.* (2016). Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget*.

Pal, A., Roy, A., and Ray, M. (2016). Creatine supplementation with methylglyoxal: a potent therapy for cancer in experimental models. *Amino Acids*.

Parat, M.O., Anand-Apte, B., and Fox, P.L. (2003). Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell* 14, 3156-3168.

Park, D.S., Cohen, A.W., Frank, P.G., Razani, B., Lee, H., Williams, T.M., Chandra, M., Shirani, J., De Souza, A.P., Tang, B., *et al.* (2003). Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry* 42, 15124-15131.

Park, H., Ahn, K.J., Lee Kang, J., and Choi, Y.H. (2015). Protein-protein interaction between caveolin-1 and SHP-2 is dependent on the N-SH2 domain of SHP-2. *BMB Rep* 48, 184-189.

Patel, S.D., Chen, C.P., Bahna, F., Honig, B., and Shapiro, L. (2003). Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13, 690-698.

Patterson, H.C., Gerbeth, C., Thiru, P., Vogtle, N.F., Knoll, M., Shahsafaei, A., Samocha, K.E., Huang, C.X., Harden, M.M., Song, R., *et al.* (2015). A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5679-5688.

Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* 119, 3723-3731.

Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.

Poernbacher, I., Baumgartner, R., Marada, S.K., Edwards, K., and Stocker, H. (2012). *Drosophila* Pez acts in Hippo signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Curr Biol* 22, 389-396.

Pouponnot, C., Sii-Felice, K., Hmitou, I., Rocques, N., Lecoin, L., Druillennec, S., Felder-Schmittbuhl, M.P., and Eychene, A. (2006). Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 25, 1299-1310.

Quest, A.F., Gutierrez-Pajares, J.L., and Torres, V.A. (2008). Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med* 12, 1130-1150.

Quest, A.F., Leyton, L., and Parraga, M. (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol* 82, 129-144.

Radel, C., and Rizzo, V. (2005). Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H936-945.

Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G., *et al.* (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276, 38121-38138.

Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.

Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J.E., and Davies, P.F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1720-1729.

Rodriguez, D.A., Tapia, J.C., Fernandez, J.G., Torres, V.A., Munoz, N., Galleguillos, D., Leyton, L., and Quest, A.F. (2009). Caveolin-1-mediated suppression of cyclooxygenase-2 via a beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcriptional mechanism reduced prostaglandin E2 production and survivin expression. *Mol Biol Cell* 20, 2297-2310.

Roelofs, B.A., Ge, S.X., Studlack, P.E., and Polster, B.M. (2015). Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radic Biol Med* 86, 250-258.

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274, 36734-36740.

Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15, 87-96.

Salem, A.F., Bonuccelli, G., Bevilacqua, G., Arafat, H., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Caveolin-1 promotes pancreatic cancer cell differentiation and restores membranous E-cadherin via suppression of the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 10, 3692-3700.

Sangrar, W., Zirgnibl, R.A., Gao, Y., Muller, W.J., Jia, Z., and Greer, P.A. (2005). An identity crisis for fps/fes: oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res* 65, 3518-3522.

Sanguinetti, A.R., Cao, H., and Corley Mastick, C. (2003). Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 376, 159-168.

Sanguinetti, A.R., and Mastick, C.C. (2003). c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 15, 289-298.

Sanna, E., Miotti, S., Mazzi, M., De Santis, G., Canevari, S., and Tomassetti, A. (2007). Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* 313, 1307-1317.

Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific

expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. In *J Biol Chem*, pp. 29337-29346.

Schlegel, A., Arvan, P., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 4398-4408.

Serra-Pages, C., Medley, Q.G., Tang, M., Hart, A., and Streuli, M. (1998). Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem* 273, 15611-15620.

Sheth, P., Seth, A., Atkinson, K.J., Gheyi, T., Kale, G., Giorgianni, F., Desiderio, D.M., Li, C., Naren, A., and Rao, R. (2007). Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem J* 402, 291-300.

Simoes, R.V., Serganova, I.S., Kruchevsky, N., Leftin, A., Shestov, A.A., Thaler, H.T., Sukenick, G., Locasale, J.W., Blasberg, R.G., Koutcher, J.A., *et al.* (2015). Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment. *Neoplasia* 17, 671-684.

Sing, A., Tsatskis, Y., Fabian, L., Hester, I., Rosenfeld, R., Serricchio, M., Yau, N., Bietenhader, M., Shanbhag, R., Jurisicova, A., *et al.* (2014). The atypical cadherin fat directly regulates mitochondrial function and metabolic state. *Cell* 158, 1293-1308.

Smith, A.L., Mitchell, P.J., Shipley, J., Gusterson, B.A., Rogers, M.V., and Crompton, M.R. (1995). Pez: a novel human cDNA encoding protein tyrosine phosphatase- and ezrin-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 959-965.

Sotgia, F., Lee, J.K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T.C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F.D., Minetti, C., Sudol, M., *et al.* (2000). Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275, 38048-38058.

Sperber, H., Mathieu, J., Wang, Y., Ferreccio, A., Hesson, J., Xu, Z., Fischer, K.A., Devi, A., Detraux, D., Gu, H., *et al.* (2015). The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat Cell Biol* 17, 1523-1535.

Sun, Y., Chen, C., Zhang, P., Xie, H., Hou, L., Hui, Z., Xu, Y., Du, Q., Zhou, X., Su, B., *et al.* (2014). Reduced miR-3127-5p expression promotes NSCLC proliferation/invasion and contributes to dasatinib sensitivity via the c-Abl/Ras/ERK pathway. *Sci Rep* 4, 6527.

Takeuchi, K., Morizane, Y., Kamami-Levy, C., Suzuki, J., Kayama, M., Cai, W., Miller, J.W., and Vavvas, D.G. (2013). AMP-dependent kinase inhibits oxidative stress-induced caveolin-1 phosphorylation and endocytosis by suppressing the dissociation between c-Abl and Prdx1 proteins in endothelial cells. *J Biol Chem* 288, 20581-20591.

Tang, B., Li, Y.N., and Kruger, W.D. (2000). Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer Res* 60, 5543-5547.

- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- Torres, V.A., Mielgo, A., Barbero, S., Hsiao, R., Wilkins, J.A., and Stupack, D.G. (2010). Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell* 21, 369-376.
- Torres, V.A., Mielgo, A., Barila, D., Anderson, D.H., and Stupack, D. (2008). Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *J Biol Chem* 283, 36280-36289.
- Torres, V.A., Tapia, J.C., Rodriguez, D.A., Lladser, A., Arredondo, C., Leyton, L., and Quest, A.F. (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7703-7717.
- Urta, H., Torres, V.A., Ortiz, R.J., Lobos, L., Diaz, M.I., Diaz, N., Hartel, S., Leyton, L., and Quest, A.F. (2012). Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One* 7, e33085.
- Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P.S., Gharib, S.A., Hoofnagle, A.N., Cheung, M.C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., *et al.* (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 117, 746-756.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-4919.
- Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 276, 8094-8103.
- Wadham, C., Gamble, J.R., Vadas, M.A., and Khew-Goodall, Y. (2003). The protein tyrosine phosphatase Pez is a major phosphatase of adherens junctions and dephosphorylates beta-catenin. *Mol Biol Cell* 14, 2520-2529.
- Wang, C., Chen, H., Zhang, M., Zhang, J., Wei, X., and Ying, W. (2016). Malate-aspartate shuttle inhibitor aminooxyacetic acid leads to decreased intracellular ATP levels and altered cell cycle of C6 glioma cells by inhibiting glycolysis. *Cancer Lett.*
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Williams, A.C., Collard, T.J., and Paraskeva, C. (1999). An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18, 3199-3204.
- Williams, T.M., and Lisanti, M.P. (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol* 5, 214.

Wilson, K.E., Li, Y.W., Yang, N., Shen, H., Orillion, A.R., and Zhang, J. (2014). PTPN14 forms a complex with Kibra and LATS1 proteins and negatively regulates the YAP oncogenic function. *J Biol Chem* 289, 23693-23700.

Wyatt, L., and Khew-Goodall, Y. (2008). PTP-Pez: a novel regulator of TGFbeta signaling. *Cell Cycle* 7, 2290-2295.

Wyatt, L., Wadham, C., Crocker, L.A., Lardelli, M., and Khew-Goodall, Y. (2007). The protein tyrosine phosphatase Pez regulates TGFbeta, epithelial-mesenchymal transition, and organ development. *J Cell Biol* 178, 1223-1235.

Xu, X.D., Hu, J., Wang, M., Peng, F., Tian, R., Guo, X.J., Xie, Y., and Qin, R.Y. (2016). Circulating myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 15, 99-105.

Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F., and Minden, M.D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 21, 868-876.

Zhang, P., Guo, A., Possemato, A., Wang, C., Beard, L., Carlin, C., Markowitz, S.D., Polakiewicz, R.D., and Wang, Z. (2013). Identification and functional characterization of p130Cas as a substrate of protein tyrosine phosphatase nonreceptor 14. *Oncogene* 32, 2087-2095.

VII ANEXO

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Viabilidad de células metastásicas transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina.

Debido a que la transfección para la expresión transitoria de E-cadherina es una herramienta ampliamente utilizada en esta tesis se quiso determinar si tanto el proceso de transfección, como la expresión produciría cambios en la viabilidad de las células metastásicas B16F10 y HT29(US). Se observó que en ambas líneas celulares la viabilidad celular no cambia luego de la transfección (Figura Suplementaria 1 A y B).

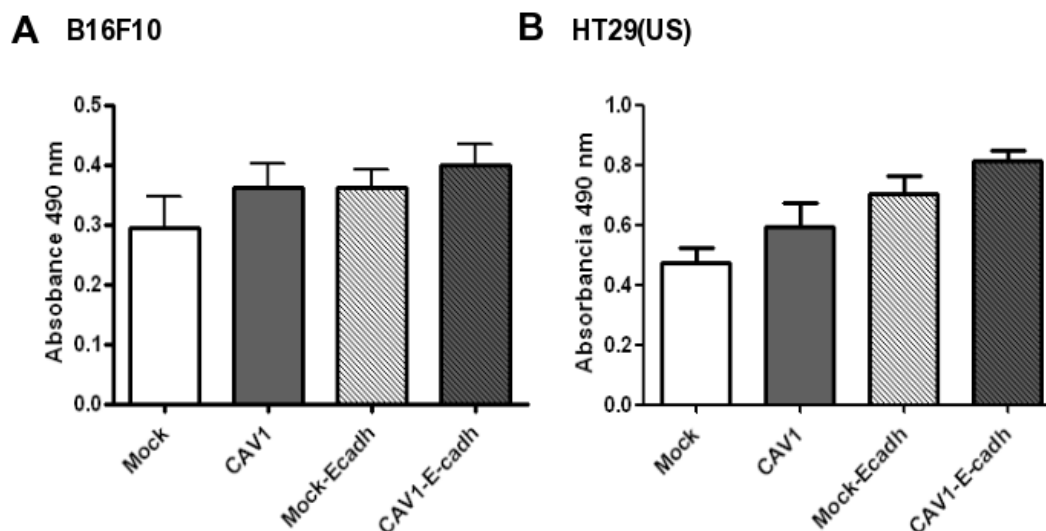


Figura Suplementaria 1. Viabilidad de células metastásicas transfectadas para la expresión transitoria de E-cadherina.

Células (A) B16F10 (Mock) y (CAV1) o (B) HT29(US) (Mock) y (CAV1) fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pBATEM2, para la expresión de E-cadherina, utilizando como medio de transfección FuGENE 6®, posteriormente se sembraron en placas de 96 pocillos, 24 h después se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS® según las instrucciones del fabricante. Los gráficos muestran la medición de absorbancia a 490 nm promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm SEM). No se observaron diferencias significativas.

