

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**PAPEL DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ENDOTELINA-1C
(ECE-1C) EN TUMORIGÉNESIS Y METÁSTASIS DE CÉLULAS DE
CÁNCER DE COLON**

HERNÁN ANDRÉS HUERTA CASTRO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de tesis: Prof. Dr. Julio C. Tapia

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

HERNÁN ANDRÉS HUERTA CASTRO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Marzo de 2018

Prof. Dr. Julio C. Tapia Pineda
Director de Tesis Director de Tesis
Dpto. de Oncología Básico-Clinico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. GARETH OWEN

PROF. DR. JORGE MARTÍNEZ

PROF. DR. VICENTE TORRES
Presidente Comisión de Examen

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a todos los científicos que se han dedicado a develar los misterios de nuestro mundo, a aportar en el entendimiento de los procesos que nos rigen, las leyes físicas a las que estamos sujetos por el acto de existir. A todos ellos quienes sin un afán mayor que el placer del saber han dedicado sus vidas a abrir los ojos frente a los muros de la ignorancia, las religiones, y tantos otras vendas a las que estamos expuestos en nuestra sociedad. A todos ellos este trabajo.

Y por supuesto quiero dedicar esta tesis a mi mayor fuente de inspiración, mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres a quienes amo y admiro. Sin su dedicación como padres nada de esto habría sido posible. Gracias por enseñarme tanto y por todo su amor y esfuerzo.

A mi tutor de tesis Dr. Julio Tapia, por su apoyo y guía durante el desarrollo de este trabajo, por la confianza en mi trabajo y capacidades. Me llevo mucho en mi cabeza y en mi corazón.

A mi compañeros del Laboratorio de Transformación Celular Eduardo Silva, Paulina Villar, Roger Yefí, Osvaldo Galecio, Cristina Diaz, Ignacio Niechi, Valentina Silva, Christian Verdugo, Pablo Perez, Natalia Landeros, Camila Quezada, Isidora Mujica, Esteban Caamaño, Cesar Trigo, por su grata compañía, por su ayuda en momentos difíciles, y por llenar el laboratorio de alegría.

A mis colegas y amigos Héctor Araya, Claudio Cappelli, Claudia Jara, Denisse Sepúlveda, Juan Pablo Muñoz, Diego Carrillo, Claudia Muñoz, Nicolás Sandoval, Hery Urrea, Sergio Wehinger, Isabel Castro, por su ayuda y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

A los profesores Dr. Mario Galindo, Dr. Francisco Aguayo, Dr. Antonio García de Herreros por su confianza y apoyo en mi desarrollo científico.

A mi familia y amigos por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional y por ser mi mayor fuente de energía e inspiración.

RESUMEN

La enzima convertidora de Endotelina-1c (ECE-1c) es una metaloproteasa de zinc y participa en la síntesis de ET-1 (ET-1). En diversos tipos de cáncer, ET-1 promueve propiedades mitogénicas, promoviendo proliferación e invasión celular. Adicionalmente, ECE-1c se ha descrito como un mediador de la invasividad del cáncer, sin embargo se desconoce si este proceso es dependiente de los niveles de ET-1.

En base a esto decidimos estudiar el rol de ECE-1c y su dependencia con ET-1, en el desarrollo de características malignas en células de cáncer de colon. La proteína ECE-1c fue sobreexpresada en células DLD-1 mediante transfección lentiviral y esto fue confirmado mediante western blot y ELISA midiendo los niveles de ET-1. La viabilidad, migración e invasión celular fue evaluada mediante ensayos de MTS, transwell y matrigel respectivamente. La activación de las quinasas Akt y FAK fue evaluada mediante western blot. El crecimiento tumoral *in vivo* fue evaluado mediante inyección subcutánea de células tumorales en ratones NOD/SCID. ECE-1c aumentó la activación de Akt y FAK correlacionando con una aumentada proliferación, migración e invasión. Las células que sobreexpresan ECE-1c mostraron una resistencia al tratamiento con 5-Fluorouracilo en comparación al control. Interesante el bloqueo del receptor de ET-1 mediante BQ-123 no mostró un efecto significativo en los parámetros evaluados, sugiriendo que los efectos de ECE-1c no son mediados exclusivamente por los niveles de ET-1, sino que podría existir un mecanismo no canónico. El crecimiento tumoral *in vivo* fue significativamente mayor en las células que sobreexpresan ECE-1c.

ECE-1c promueve características malignas en células de cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*. Nuestros resultados sugieren un mecanismo independiente de ET-1 por el cual ECE-1c promueve una mayor viabilidad y migración celular.

ABSTRACT

Endothelin-Converting Enzyme-1c (ECE-1c) is a membrane Zn-metalloprotease that synthesizes Endothelin-1 (ET-1). In many cancers, ET-1 has mitogenic properties, promoting proliferation and invasion. In addition, ECE-1c has been observed as a mediator of cancer invasiveness, however, whether this process is ET-1-dependent is unknown. Thus, we studied the role of ECE-1c and its ET-1-dependency in the development of malignant characteristics in colon cancer cells.

ECE-1c was overexpressed in DLD-1 cells by lentiviral infection and this was confirmed by western blot and ELISA by measuring ET-1 levels. Cell viability, migration, invasion and anchorage-independent proliferation were evaluated by MTS, transwell, matrigel and soft agar, respectively. FAK and Akt activation were evaluated by western blot. Tumor growth was evaluated by subcutaneous tumor formation in NOD/SCID mice.

ECE-1c promoted activation of FAK and Akt, correlating with an increased migration, invasion and anchorage-independent proliferation. Cells overexpressing ECE-1c showed resistance to 5-Fluorouracil compared to control. Interestingly, the blockade of the ET-1 receptor by BQ-123 did not show a significant difference in the evaluated parameters compared to the control condition, suggesting that the effects of ECE-1c are not mediated exclusively by ET-1 levels, but there could be a non-canonical mechanism.

Tumor growth *in vivo* was significantly augmented by ECE-1c overexpression.

ECE-1c promotes malignant characteristics in colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Our findings suggest an ET-1-independent mechanism by which ECE-1c promotes colon cancer cell survival and migration.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 <i>Cáncer</i>	14
1.2 <i>Mecanismos de progresión del cáncer</i>	15
1.3 <i>Cáncer de colon y la vía Wnt/β-catenina</i>	16
1.4 <i>Eje Endotelina-1 (ET-1)</i>	17
1.5 <i>Eje-1 ET-1 y su relación con el cáncer de colon</i>	18
1.6 <i>Migración, invasión y metástasis</i>	20
1.7 <i>ECE-1c y su posible rol en invasión y metástasis</i>	22
1.8 <i>Rol de ECE-1c independiente de ET-1</i>	26
1.9 <i>Resumen de los antecedentes</i>	27
1.10 <i>HIPÓTESIS</i>	28
1.11 <i>OBJETIVOS</i>	28
2. RESULTADOS	29
2.1 <i>Objetivo 1: Estudiar in vitro si la sobreexpresión de ECE-1c activa las vías de señalización PI3K/AKT y FAK en células de cáncer de colon.</i>	29
2.2 <i>Objetivo 2: Evaluar in vitro el efecto de los niveles de ECE-1c en la tumorigenicidad e invasividad de células de cáncer de colon y su dependencia de ET-1.</i>	37
2.3 <i>Objetivo 3: Evaluar el efecto de ECE-1c en la formación de tumores y metástasis de células de cáncer de colon en un modelo in vivo.</i>	53
3. DISCUSIÓN	57
4. ANEXOS.....	64
5. MATERIALES Y MÉTODOS	75
5.1 <i>Cultivo celular y transfecciones</i>	75
5.2 <i>SDS-PAGE e Inmunoblot</i>	75
5.3 <i>Ensayo de viabilidad MTS</i>	76
5.4 <i>Ensayo de viabilidad por tinción vital con azul tripán</i>	77
5.5 <i>Ensayo de Migración por transwell</i>	77

5.6 Ensayo de cierre de herida.....	77
5.7 Actividad de metaloproteasas mediante zimografía.....	78
5.8 Ensayo de invasión por Matrigel	78
5.9 Formación de colonias en agar blando	79
5.10 Formación de tumores in vivo.....	79
5.11 Microscopía confocal.....	79
5.12 Análisis Estadístico	80
6. Referencias	80

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Mecanismo de señalización canónico del eje ET-1.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Modelo estructural de ECE-1.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 3. Esquema de las diferentes isoformas de la proteína ECE-1.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Localización sub-celular de las distintas isoformas de ECE-1 expresadas en células tumorales de ratón.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 5. La desglicosidación de ECE-1c modifica su patrón electroforético.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 6. La sobreexpresión de ECE-1c promueve activación de FAK y Akt en células de cáncer de colon DLD-1.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la proliferación celular en células de cáncer de colon DLD-1.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 8. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta los niveles de ET-1 en el medio de cultivo en células de cáncer de colon.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. ECE-1c promueve resistencia a la inhibición de PI3K y/o bloqueo de ET_AR.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10. La sobreexpresión de ECE-1c promueve crecimiento independiente de anclaje en agar blando.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 11. Expresión de GFP se mantiene luego de 21 días de cultivo en agar blando.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12. Inhibición de Akt y FAK.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. La inhibición de ET_AR no afecta el crecimiento de colonias en agar blando.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 14. La sobreexpresión de ECE-1c genera resistencia a la muerte por 5-fluoro uracilo en células de cáncer de colon sembradas sobre agar blando.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Evaluación de la capacidad migratoria de 3 líneas celulares de cáncer de colon.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la migración celular in vitro.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17. La migración celular inducida por ECE-1c no depende de la activación de la vía ET-1.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 18. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la actividad gelatinasa de MMP 2 y MMP 9 en células de cáncer de colon.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 19. ECE-1c promueve activación de MMP 9 de manera dependiente de su actividad catalítica y no de la activación de ET_AR.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 20. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la invasión in vitro en células de cáncer de colon.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de ECE-1c sobre el crecimiento tumoral in vivo en ratones NOD/SCID.</i>	<i>56</i>

Figura 22. Esquema del mecanismo propuesto para el rol de ECE-1c en tumorigénesis..... 63

Figura 23 Anexo. Esquema del subclonamiento de la región N-terminal de ECE-1c en el vector pEGFP-N1..... 65

Figura 24 Anexo. Efectos de la expresión de NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon DLD-1..... 68

Figura 25 Anexo. Caracterización de la construcción NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon..... 73

ABREVIATURAS

4 β -TPA: 12 - O -tetradecanoilforbol-13-acetato

ABC: Cassette de unión a ATP

Big-ET-1: Big-endotelina-1

BSA: Albúmina de suero bovino

CK2: Caseína kinasa-2

cm: centímetros

CMV: Citomegalovirus

COX-2: Ciclo oxigenasa-2

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECE-1: Enzima convertidora de endotelina-1

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ET-1: Endotelina-1

ET_AR: Receptor de endotelina-1 A

ET_BR: Receptor de endotelina-1B

FAK: Kinasa de adhesión focal

FAK14: Inhibidor de la Kinasa de adhesión focal 14

GFP: Proteína fluorescente verde

GTP: Guanosín trifosfato

h: Horas

HRPO: Peroxidasa de rábano

kDa: Kilodaltons

MEC: Matriz extracelular

mg: Milígramo

min: Minutos

min: Minutos

mL: Mililitro.

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MMP-2: Metaloproteasa-2

MMP-9: Metaloproteasa-9

MMPs: Metaloproteasas de matriz

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

NEP: Neprilisina

nm: Nanómetros

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehido

PI3K: Fosfoinositol-3 kinasa

PKC: Proteína kinasa C

ppET-1: Pre-pro-endotelina-1

PTEN: Fosfatasa y homologo de tensina

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SEM: Error estándar de la media

SFB: Suero fetal de bovino

TCN: Triciribine

TEM: Transición epitelio-mesenquima

TME: Transición mesénquima-epitelial

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µm: Micrómetro

µM: Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es la segunda casusa de muerte a nivel mundial, con una incidencia que aumenta año tras año. Se estima que una de cada 8 muertes en el mundo es causada por cáncer (American Cancer Society 2011). En Chile, al igual que en países desarrollados, las cifras son más alarmantes, ya que esta enfermedad fue responsable de 1 de cada 4 muertes que ocurrieron durante el año 2014 (DEIS, Ministerio de Salud, Chile).

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de células que han perdido la capacidad de responder correctamente a los estímulos del ambiente. Desde un punto de vista molecular, la carcinogénesis se entiende como un proceso en el que sucede principalmente ganancia de función por parte de genes que promueven proliferación celular (ie. sobreexpresión y/o hiperactivación de proteínas que regulan positivamente el ciclo celular o que inhiben la muerte celular) o una pérdida de función de genes supresores de tumores (ie. inhibición o silenciamiento de genes que detienen el ciclo celular y/o reparan el genoma) [1]. Factores ambientales, genéticos y/o epigenéticos al igual que organismos patógenos, pueden llevar a alteraciones en la expresión y actividad de estos genes, y en consecuencia gatillar el inicio y progresión del cáncer [2, 3].

Posteriormente, la proliferación aberrante de células tumorales puede alterar el funcionamiento del tejido u órgano afectado. En etapas avanzadas, estas mismas células pueden alcanzar otros órganos, migrando a través de la vía sanguínea y/o linfática, generando daños irreversibles en el organismo en un complejo proceso denominado metástasis. En la mayoría de los casos, la metástasis del tumor provoca un deterioro orgánico mayor del individuo, afectándolo de tal manera que su organismo no logra mantener el funcionamiento de todos los sistemas y el individuo finalmente muere [4].

1.2 Mecanismos de progresión del cáncer

Uno de los pasos iniciales para que las células cancerígenas adquieran un potencial migratorio e invasivo es la llamada “transición epitelio-mesénquima” (TEM), la cual se refiere a una reprogramación genética y epigenética durante la cual existe una pérdida de las uniones célula-célula que están presentes en la mayoría de los tejidos epiteliales. La pérdida de estas uniones causa una serie de cambios en las vías de señalización celular y en consecuencia la expresión de genes que controlan el fenotipo de la célula.

Muchos biomarcadores han sido propuestos como indicadores de TEM, como el “switch” de E-caderina, que se caracteriza por una disminución de los niveles de E-caderina, claudina, ocludina y otros marcadores epiteliales y una sobreexpresión de N-caderina, vimentina, fibronectina, así como otros marcadores mesenquimáticos. Además existen cambios significativos en la expresión de señales y componentes de la matriz extra celular (MEC) incluyendo un aumento en la expresión génica de metaloproteasas de matriz (MMP) [5, 6].

Interesantemente, la TEM ocurre en asociación con la activación de diversas cascadas de señalización de factores de crecimiento, alteración en la expresión de diversos miRNAs y factores de transcripción relacionados con la TEM como snail, slug, twist, entre otros. Además durante la TEM la alteración de la maquinaria transcripcional resulta en una alteración de la expresión de diversas proteínas intracelulares, receptores de superficie como las integrinas, y diversas enzimas como proteasas, kinasas y fosfatasa. Todos estos cambios provocan que la célula adquiera un fenotipo con una alta movilidad y capacidad de invadir tejidos, características que presentan los tumores malignos y que son responsables de la mayoría de los casos de muerte por cáncer en el mundo [7, 8]. El escape de células desde un tumor primario y posterior establecimiento en un tejido distante al inicial es denominado metástasis.

Finalmente el establecimiento de las metástasis a distancia es favorecido por un fenómeno inverso llamado transición mesénquima-epitelial (TME) en donde las células tumorales vuelven a adquirir la morfología epitelial revirtiendo el proceso descrito anteriormente. Este proceso ayuda a las células a sobrevivir y asentarse en un nuevo tejido [9].

1.3 Cáncer de colon y la vía Wnt/ β -catenina

Dentro de los cánceres más importantes que afectan a la población está el cáncer colorrectal (CCR), el cual presenta en Chile cerca de mil casos diagnosticados al año y tiene una mortalidad de 6,2 por cada cien mil habitantes (DEIS, Ministerio de Salud, Chile 2014). En la mayoría de los casos el diagnóstico de CCR se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad, estimándose en un 25% los pacientes que ya presentan metástasis al momento del diagnóstico. Particularmente, el CCR se considera como una enfermedad recurrente y los estudios estiman que cerca de la mitad de los pacientes con cirugía de CCR mueren dentro de los primeros 5 años debido a las metástasis del tumor inicial [10]. La ausencia de un tratamiento específico y efectivo para esta patología hace necesario el entendimiento de las bases moleculares que regulan su desarrollo y progresión, lo que podría llevar a la creación de nuevos métodos de detección y mejores tratamientos.

Diversos estudios realizados en CCR han establecido que la mayoría de los tumores se originan como pólipos (lesión benigna) en las células de las criptas del colon. Esta lesión puede progresar hasta convertirse en un carcinoma maligno con capacidad de metastizar a otros órganos, como hígado, pulmones y huesos principalmente. Se ha determinado que una serie de alteraciones en genes clave pueden explicar en parte el desarrollo y malignidad del CCR, dentro de los que se encuentran APC, K-RAS, Smad2/4, DCC y P53, siendo la mutación en el supresor de tumores APC la mutación fundacional que en general gatilla el desarrollo de la variante genética de la enfermedad [11, 12].

APC, en conjunto con GSK3 β , CK1 y Axina, forman parte de un complejo multiproteico represor que promueve la degradación de β -catenina, una proteína que actúa como cofactor transcripcional de genes involucrados en proliferación, migración y resistencia a la apoptosis [13-16]. Mutaciones en APC afectan su capacidad de regular la degradación de β -catenina y ésta se acumula en el citosol, donde puede ser fosforilada por la kinasa Akt en el residuo Ser552, favoreciendo su translocación al núcleo y en consecuencia el desarrollo de características tumorales malignas [17-19].

En nuestro laboratorio se han estudiado diversos genes que son regulados o regulan la vía β -catenina y que se han relacionado con el desarrollo de este cancer, entre ellos COX-2, survivina, CK2 y el eje endotelina. [18-21]. Este eje se ha estudiado en los últimos años y ha despertado el interés en el área del cáncer por nuevos antecedentes que lo relacionan con la aparición de características malignas en diversos tipos de cáncer, como una alta proliferación, angiogénesis y metástasis.[22].

1.4 Eje Endotelina-1 (ET-1)

Se llama “Eje Endotelina-1” a la vía de señalización que está compuesta por la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1), el ligando endotelina-1 (ET-1), y a sus receptores (ET_AR y ET_BR).

La señalización a través de este eje requiere la expresión del gen que codifica para ET-1, denominado EDN1. La expresión de este gen y posterior traducción del RNAm generan una proteína precursora denominada pre-pro-endotelina-1 (ppET-1) de un tamaño de 212 aminoácidos. Posteriormente una endopeptidasa reconoce y corta una secuencia rica en aminoácidos básicos presentes en la estructura de ppET-1, generando un nuevo péptido, denominado Big-endotelina-1

(Big-ET-1) de 38 aminoácidos, el cual carece de actividad biológica [23-25]. Big-ET-1 es posteriormente procesado por una metaloproteasa altamente específica, la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1), liberando el péptido biológicamente activo ET-1 de 21 aminoácidos. Existen 2 receptores para ET-1, denominados ET_A R y ET_B R, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G [26]. Finalmente, la señalización mediada por ET-1 puede ser terminada por la Endopeptidasa Neutral (NEP) que inactiva a ET-1 a través de un corte proteolítico [27, 28].

Este eje ha sido estudiado ampliamente en el contexto del sistema circulatorio por su rol en vasoconstricción y control de la presión sanguínea [29, 30]. Se descubrió en la década del 80 que ET-1 era liberado por células vasculares y funcionaba como un potente vasoconstrictor de la musculatura lisa, aumentando rápidamente la presión arterial en experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* [31, 32]. Posteriormente en modelos murinos se demostró que el knockout genético de cualquiera de los componentes del eje ET-1, genera fenotipos con alteraciones en diversas estructuras embrionarias, así como una deficiencia mayor en el desarrollo y funcionamiento del sistema circulatorio. Muchas de estas alteraciones resultaron ser letales en etapas embrionarias en diversos experimentos realizados en modelos murinos [33-36].

Diversos estudios han demostrado que la desregulación de este eje contribuye a la aparición y/o desarrollo de diversas enfermedades o trastornos como, hipertensión pulmonar y sistémica, aterosclerosis y diversos tipos de cáncer, como próstata, ovario y colon [37, 38].

1.5 Eje-1 ET-1 y su relación con el cáncer de colon

En los últimos años se ha estudiado el rol del eje ET-1 en cáncer, ya que evidencia clínica y molecular ha demostrado que la desregulación de este eje se asocia con la aparición y avance de diversos tipos de cáncer [22, 37]. Se ha observado que los niveles plasmáticos de ET-1 en pacientes con distintos cánceres, incluyendo colon, se encuentran elevados, correlacionando con cánceres más

agresivos. Además, los niveles de ECE-1 y ET_AR también se han visto aumentados en tejido tumoral en estudios realizados en cáncer de próstata y colon, contribuyendo en conjunto con la aparición de características tumorales malignas, tales como angiogénesis, proliferación y metástasis [39-41].

Particularmente en cáncer de colon, los niveles de ET_BR son reprimidos por mecanismos epigenéticos, en comparación al tejido normal, mientras que los niveles de ET_AR aumentan, siendo este último el más importante y más estudiado en la progresión del cáncer de colon [42, 43]. La activación de este receptor promueve la señalización a través de una serie de vías que incluyen a β -catenina, PI3K/Akt, FAK y β -arrestina, las que dependiendo del modelo de estudio, pueden gatillar diversos procesos como vasoconstricción, proliferación, resistencia a la apoptosis y migración [39, 44].

En el área clínica se ha visto el potencial que tiene el uso de drogas que modifiquen la actividad de componentes del eje ET-1 para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer [45, 46]. Una de las drogas más estudiadas a este respecto es Atrasentan (ABT-627) un inhibidor altamente específico de ET_AR que ha mostrado buenos resultados en diversos modelos de cáncer, usado como monoterapia y principalmente en combinación con otras drogas. Una característica interesante de esta droga es que por sí sola es capaz de inhibir la proliferación inducida por ET-1 en las células tumorales, y además el efecto de la inhibición de ET_AR es de vasodilatación en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, por lo que mejora la perfusión de esta y otras drogas hacia el interior de los tumores [47, 48].

Por otro lado, la importancia de ECE-1 no sólo radica en que realiza el corte proteolítico que activa a ET-1, sino que además su función es crucial para la señalización de esta vía ya que se ha determinado que el péptido ET-1 tiene una vida media corta, de aproximadamente 1 minuto, por lo que es necesaria la constante conversión de Big-ET-1 a ET-1 por parte de ECE-1 para la activación sostenida de la vía (Figura 1) [49, 50].

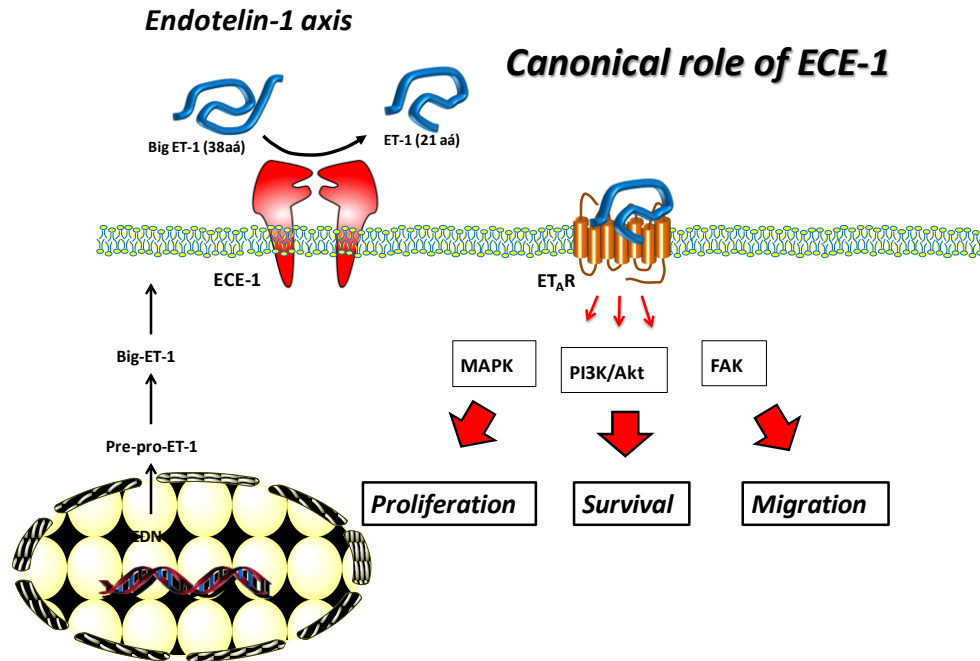


Figura 1. Mecanismo de señalización canónico del eje ET-1. La expresión del gen *EDN-1* da origen a la proteína Pre-pro-ET-1, la cual es procesada generando Big-ET-1. La enzima ECE-1 mediante un corte proteolítico corta a Big-ET-1 y genera el péptido bioactivo, ET-1. La unión de ET-1 a su receptor ET_AR gatilla la activación de diversas vías de señalización que en conjunto regulan diversos procesos en células tumorales como proliferación, sobrevivencia y migración, entre otros.

1.6 Migración, invasión y metástasis

La migración celular es un proceso integrado y dinámico, esencial en la morfogénesis embrionaria, regeneración de tejidos y otros procesos. Además, la migración celular es importante en la progresión de enfermedades como artritis, osteoporosis y cáncer, por lo que su estudio es de relevancia biomédica tanto en procesos fisiológicos y patológicos [51].

La migración celular es generalmente inducida por señales extracelulares, como factores de crecimiento, quimioquinas, daño tisular, entre otros. Sin embargo, estímulos mecánicos, proteínas

de matriz extracelular (MEC; e.g fibronectina y/o colágeno) o gradientes electroquímicos también pueden inducir migración direccional [52-54]. Para migrar, las células se polarizan es decir ocurre una reorientación del aparato de Golgi y del centro organizador de microtubulos (MTOC) quedando ambos orientados en la dirección de migración. Junto con esto la célula extienden protrusiones de la membrana plasmática hacia el estímulo, denominadas filopodios y lamelipodios, los cuales son estructuras bien definidas, dependientes principalmente de la polimerización de citoesqueleto de actina y la actividad de un grupo de GTPasas pequeñas de la familia Rho. De esta forma la célula es capaz de “empujarse” hacia adelante y moverse [55, 56].

El establecimiento de filopodios y lamelipodios depende de interacciones que vinculan el citoesqueleto de actina con proteínas de la MEC. Estas son mediadas por receptores de adhesión como sindecanos y otros proteoglicanos, cadherinas y la familia de las integrinas, el grupo de receptores de adhesión más estudiado y que juega un papel preponderante en migración celular [57, 58]. Las integrinas son receptores de transmembrana heterodiméricos que se unen a secuencias específicas de proteínas de la MEC. Esta unión genera un cambio conformacional que facilita la interacción de la cola citosólica intracelular de la integrina con el citoesqueleto de actina a través de un complejo multiproteico denominado Adhesión Focal [59, 60].

La kinasa de adhesiones focales (FAK) es una de las principales proteínas de las adhesiones focales, estudiada ampliamente por su potente actividad de promover migración e invasión celular. FAK es una proteína tirosina kinasa citosólica que normalmente se encuentra en un estado inactivo. La activación de las integrinas promueve la autofosforilación de FAK en Tyr397, esto rompe su autoinhibición y la activa. FAK en su estado activo es capaz de fosforilar una serie de proteínas que en conjunto promueven formación y dinámica de adhesiones focales, activación de Rho GTPasas y en consecuencia un cambio en la dinámica del citoesqueleto de actina y mayor migración celular [61-63].

La activación de FAK no sólo regula la dinámica del citoesqueleto de actina, sino que además influye en la actividad de una serie de metaloproteasas (MMP 2, 7 y 9 principalmente) que son enzimas capaces de degradar diversos sustratos proteicos [64-66]. Estas enzimas están directamente relacionadas con el proceso de invasión celular ya que son capaces de degradar proteínas de la MEC, como fibronectina, gelatina y colágeno, entre otros. De esta forma, las MMP rompen la integridad de los tejidos, pudiendo facilitar el escape de células cancerosas desde el tumor primario hacia el resto del organismo [67, 68].

1.7 ECE-1c y su posible rol en invasión y metástasis

Como se mencionó, ECE-1 cumple un rol fundamental en el eje ET-1. ECE-1 es una zinc-metaloproteasa de membrana de la familia de la endopeptidasa neutral NEP. Posee una región citosólica N-terminal y un ectodominio catalítico C-terminal (Figura 2). El gen de ECE-1 se encuentra en el cromosoma 1 y puede generar 4 isoformas (a, b, c y d) ya que posee 4 promotores funcionales a lo largo del gen [69, 70]. Las distintas isoformas de ECE-1 poseen la misma secuencia en su región catalítica y transmembrana, diferenciándose sólo en su región citosólica por unos pocos aminoácidos (Figura 3), lo que al parecer sería importante en su dimerización y localización subcelular [71]. Todas las isoformas de ECE-1 poseen un dominio de unión a zinc (HEXXH), el cual permite la estabilización de la estructura, y poseen un 40% de homología con NEP [72].

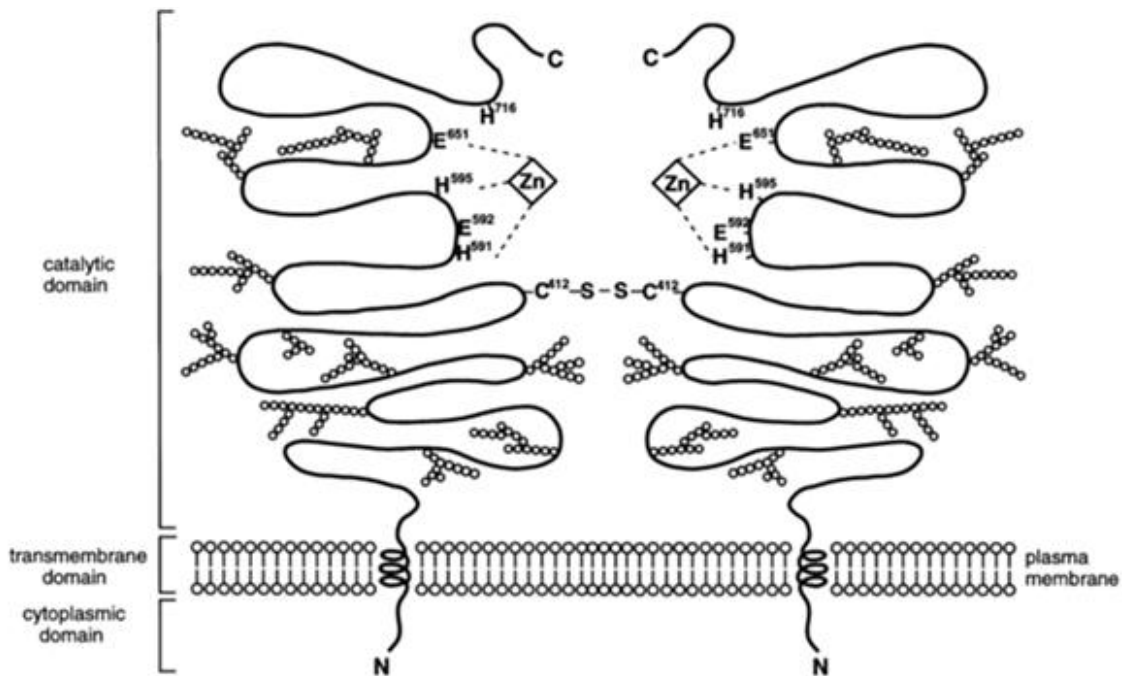


Figura 2. Modelo estructural de ECE-1. Se esquematiza su gran dominio catalítico extracelular, y sus dominios transmembrana y citosólico. Además, se muestra un enlace disulfuro que permite la formación de un dímero, y los diez sitios putativos de glicosilación. Cada subunidad coordina un átomo de zinc en el sitio catalítico de la enzima [73].

La ECE-1 se encuentran distribuidas en distintas regiones de la célula y mediante estudios de inmunofluorescencia se ha determinado que la isoforma ECE-1a se localiza principalmente en la membrana plasmática, la isoforma ECE-1b en vesículas intracelulares, y las isoformas ECE-1c y ECE-1d poseen una distribución ubicua (Figura 4). Todas estas observaciones fueron realizadas en células epiteliales [74-77]. Interesantemente, la distribución de las distintas isoformas de ECE-1 se modifica frente a estímulos como el éster de forbol 4β -TPA, un análogo de diacilglicerol usado ampliamente como un activador de PKC. La fosforilación de ECE-1c por PKC modifica fuertemente su localización, promoviendo su acumulación en la membrana plasmática, lo que favorece su actividad sobre big-ET-1 extracelular [76, 78]. Sin embargo, no existe evidencia que describa la localización de ECE-1c en células de cáncer de colon.

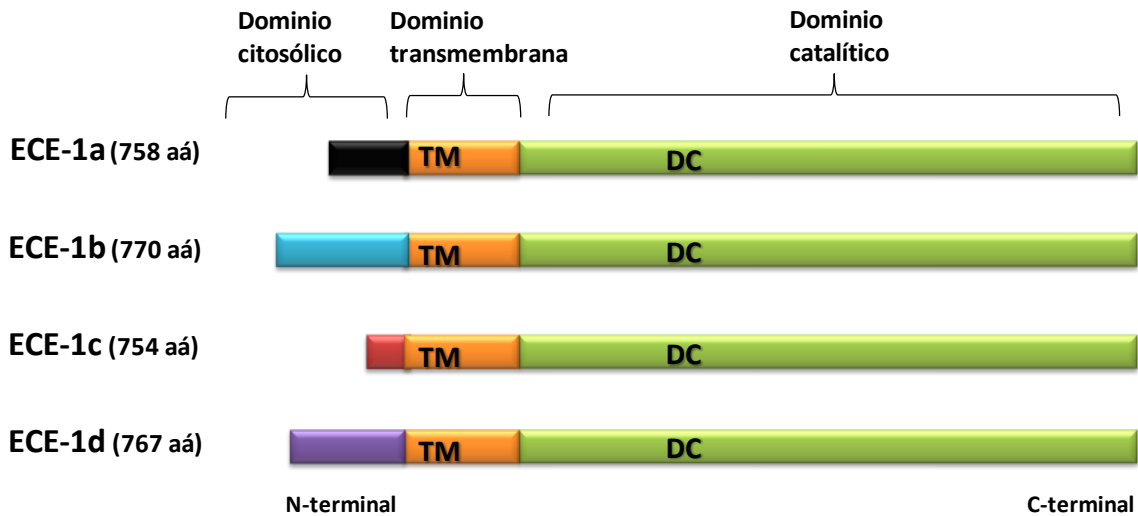


Figura 3. Esquema de las diferentes isoformas de la proteína ECE-1. Se muestran las 4 isoformas de la ECE-1, las cuales comparten exactamente el mismo dominio catalítico y dominio transmembrana. La diferencia entre las isoformas se encuentra en la secuencia de la región N-terminal, lo que determina su localización subcelular.

De las 4 isoformas de la enzima, ECE-1c es la más expresada a nivel proteico en líneas tumorales andrógeno-independientes de cáncer de próstata [79]. En relación a esto, en nuestro laboratorio decidimos evaluar si la sobreexpresión de ECE-1c, descrita previamente en diversos tipos de cáncer también ocurre en pacientes chilenos que presentan CCR. En este estudio se evaluó los niveles de mRNA de ECE-1 y ECE-1c en biopsias correspondientes a tejido tumoral y tejido sano del mismo paciente. Se encontró que todas las isoformas en conjunto (ECE-1) y específicamente la isoforma c (ECE-1c) se encontraban aumentadas en el tejido tumoral, mostrando una correlación entre los niveles de esta proteína y la presencia de un proceso tumoral [80].

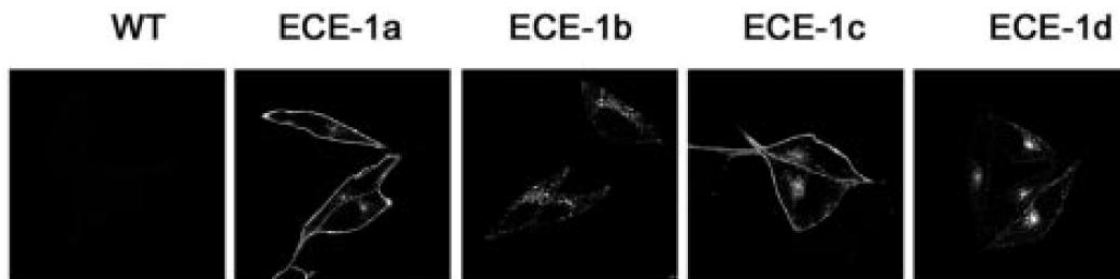


Figura 4. Localización sub-celular de las distintas isoformas de ECE-1 expresadas en células tumorales de ratón. Se estudió la localización sub-celular de las 4 isoformas de ECE-1 utilizando la línea celular AtT-20 que expresa niveles no detectables de ECE-1, mediante la generación de clones que expresan establemente las distintas isoformas de ECE-1. Se observa para ECE-1a una distribución principalmente en regiones cercanas a la membrana plasmática, mientras que ECE-1b se localiza principalmente en el citoplasma de la célula. Las isoformas ECE-1c y ECE-1d poseen una distribución intermedia, entre membrana plasmática y citoplasma celular [76].

La sobreexpresión de ECE-1c en la línea PC-3 promueve su invasión en un modelo *in vitro*. No obstante, la adición de ET-1 en células deficientes en ECE-1c, que manifiestan una disminución en su capacidad invasiva, no restablece la migración de las mismas [81]. Un efecto similar se observa en un modelo de glioblastoma, en donde la inhibición farmacológica de ECE-1 es capaz de inhibir la proliferación celular, sin embargo, la adición de ET-1 al sistema no restablece el comportamiento normal [82]. Por lo tanto, se ha propuesto que ECE-1c tendría un efecto en invasión independiente de la producción de ET-1.

1.8 Rol de ECE-1c independiente de ET-1

El rol ECE-1c en invasividad celular a través de un mecanismo independiente de ET-1 no ha sido estudiado, sin embargo, datos provenientes de su homóloga estructural NEP podrían dar luces de un posible mecanismo. Existe evidencia que NEP tiene una función independiente de su actividad canónica sobre el péptido ET-1, ya que la fosforilación por CK2 en el residuo Ser6 en la región citosólica N-terminal de NEP regula negativamente su interacción con PTEN. La interacción NEP/PTEN estabilizaría a esta última en la membrana plasmática, favoreciendo el paso de PIP₃(3,4,5) a PIP₂(4,5) y, de esta forma, controlando negativamente a Akt [83, 84]. En consecuencia, la fosforilación de NEP en su dominio N-terminal por CK2 activa la vía PI3K/Akt.

Como se mencionó anteriormente, NEP y ECE-1c pertenecen a la misma familia de proteínas y comparten un 40% de homología. Esto sugiere la posibilidad de que ECE-1c regula a Akt u otras vías de señalización a través de un mecanismo similar. Akt es una kinasa ampliamente estudiada en cáncer y es capaz de regular el proceso de invasión celular por diversos mecanismos, entre ellos promoviendo la expresión de MMPs. Así, un aumento en la expresión y actividad de esta kinasa puede repercutir directamente en un aumento de la capacidad invasiva de estas células [85-87].

Otra alternativa que podría dar cuenta de un rol de ECE-1c independiente de ET-1 es el aumento en la activación de FAK en células que sobreexpresan esta metaloproteasa. En un trabajo se demostró que células de cáncer prostático que sobreexpresan ECE-1c aumentan la actividad de FAK, evaluado por su fosforilación en tirosina [88]. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se promueve la activación de FAK no está claro, ni tampoco si este aumento en la actividad de FAK mediado por ECE-1c conlleva a la adquisición de un fenotipo invasivo en células de cáncer prostático.

1.9 Resumen de los antecedentes

I. Los niveles de ECE-1c se encuentran aumentados en varios tipos de cáncer, lo que se relaciona con el desarrollo de características más agresivas y metástasis. Se desconoce el mecanismo por el cual ECE-1c lleva a la aparición de estas características en células tumorales.

II. Se ha descrito que la sobreexpresión de ECE-1c en células de cáncer de próstata aumenta su capacidad invasiva *in vitro*, mientras que el silenciamiento disminuye la invasión. Sin embargo, la adición exógena de ET-1 en células deficientes en ECE-1c no restituye la capacidad invasiva, lo que sugiere que el aumento en la invasión sería a través de un mecanismo independiente de ET-1.

III. Existe un mecanismo descrito recientemente para NEP (metaloproteasa de la misma familia de ECE-1c y que comparte un 40% de homología) que explica una actividad independiente de ET-1, la cual involucra una interacción directa con PTEN, regulando en consecuencia la vía Akt. Sin embargo, no existe evidencia que ECE-1c regule la vía PI3K/Akt mediante un mecanismo similar.

IV. Resultados preliminares sugieren una mayor activación de FAK en células de cáncer de colon que sobreexpresan ECE-1c, sin embargo, no está claro si esto se correlaciona con una mayor capacidad migratoria de las mismas.

V. FAK y Akt son capaces de promover la expresión de MMPs importantes en invasión celular, por lo que su regulación vía ECE-1c podría tener importantes consecuencias invasión celular y metástasis.

En consecuencia, la hipótesis y los objetivos de este proyecto son:

1.10 HIPÓTESIS

“La ECE-1c promueve tumorigénesis y metástasis en células de cáncer de colon por un mecanismo independiente de la producción de ET-1”

1.11 OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar el rol de ECE-1c en la tumorigénesis y metástasis en células de cáncer de colon.

Objetivo específico 1: Determinar *in vitro* si la sobreexpresión de ECE-1c activa las vías de señalización PI3K/Akt y FAK en células de cáncer de colon.

Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de los niveles de ECE-1c en la clonogenicidad e invasividad de células de cáncer de colon y su dependencia de ET-1 *in vitro*.

Objetivo específico 3: Evaluar *in vivo* el efecto de ECE-1c en la formación de tumores y metástasis de células de cáncer de colon en un modelo murino.

2. RESULTADOS

2.1 Objetivo 1: Estudiar *in vitro* si la sobreexpresión de ECE-1c activa las vías de señalización PI3K/AKT y FAK en células de cáncer de colon.

Se estudió el efecto de la sobreexpresión de ECE-1c en células de cáncer de colon sobre la activación de las kinasas Akt y FAK. Células DLD-1 fueron transducidas con partículas lentivirales que contenían un plásmido codificante para la proteína ECE-1c (pLVX-ECE-1c). Este plásmido de expresión utiliza el promotor de CMV y genera un RNAm bicistronico que codifica para la proteína de interés y mediante un IRES se traduce la proteína fluorescente ZsGreen que permite la selección de las células transducidas mediante citometría de flujo (Figura 6A).

El particular patrón electroforético que presenta la ECE-1c ha sido documentado previamente [73, 81]. Se sugiere que estas múltiples bandas que aparecen en el gel, incluso al sobreexpresar solo una isoforma, se debe a que la secuencia de ECE-1 tiene 10 sitios putativos de glicosilación, modificaciones que pueden llevar a cambios en el patrón electroforético de una proteína. Para evaluar esta posibilidad se decidió interferir la glicosilación de proteínas mediante 2 aproximaciones: Las células fueron tratadas con tunicamicina durante 16 h, lo que inhibe la N-glicosilación, y por otra parte utilizamos una glicosidasa (también conocida como glucósido hidrolasa) para tratar los extractos proteicos y eliminar las glicosilaciones presentes en la muestra. Finalmente se realizó un SDS-PAGE y se evaluó el patrón electroforético en cada caso.

Como se observa en la figura 5, el tratamiento por 16 h con tunicamicina en las dos concentraciones usadas (0,5 µg/mL y 1 µg/mL) generó un cambio en el patrón electroforético de ECE-1, en donde se intensificó una banda de menor peso molecular que la principal banda en las células sin tratar. El mayor cambio se vio tras el tratamiento de los extractos con la glicosidasa PNGasa-F, en donde prácticamente solo se ve una banda correspondiente a la misma banda que se forma al inhibir la glicosilación con tunicamicina. Este resultado refuerza la idea de que las bandas corresponden a distintos grados de glicosilación de la ECE-1 en la célula, y que la eliminación de

estos grupos cambia el patrón electroforético de ECE-1c desde un bandeo múltiple a solo una banda de menor peso molecular.

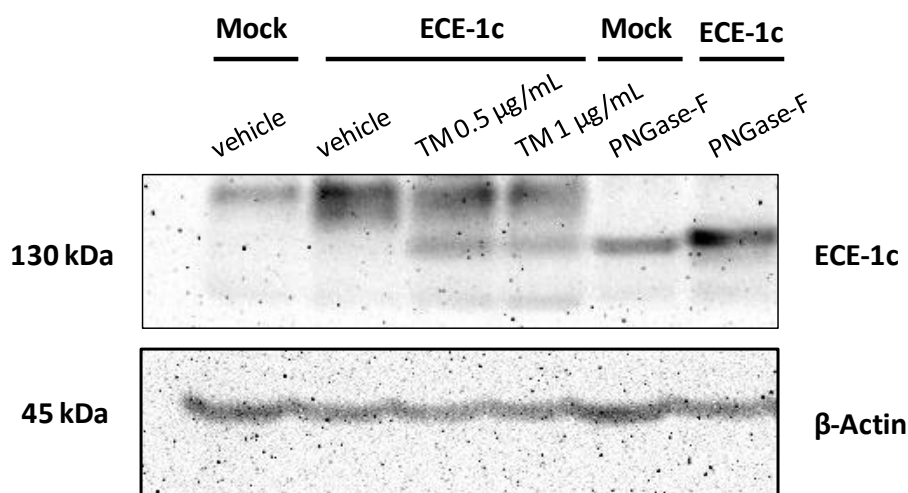


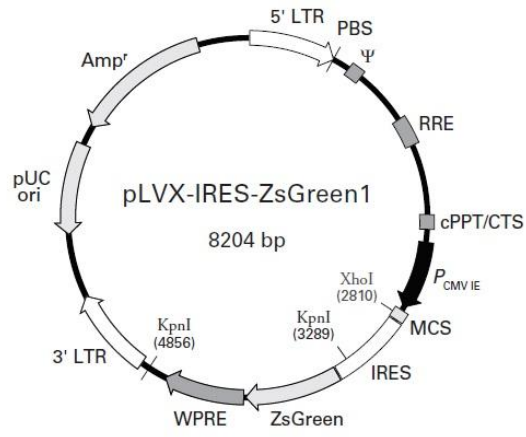
Figura 5. La desglicosidación de ECE-1c modifica su patrón electroforético. Las células fueron sembradas y 24 h después se trataron el vehículo o tunicamicina (TM) a las concentraciones indicadas durante 16 h. Posteriormente se realizó una extracción de proteínas y SDS-PAGE (carriles 1-4). A un grupo de células que no fue tratado, se le realizó una extracción de proteínas y posterior tratamiento con la glicosidasa PNGase-F durante una hora. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE (carriles 5-6).

Dos semanas después de la selección de las células transfectadas se evaluó el efecto de la sobreexpresión de ECE-1c en las células de cáncer de colon. La sobreexpresión de ECE-1c produjo un aumento en la activación de FAK, evaluado por su fosforilación en Tyr 397 mediante western blot (Figura 6B). De forma similar, los niveles de Akt activa (ie, fosforilada en Ser 473) aumentaron cuando se sobreexpresó ECE-1c en comparación a las células transfectadas con el vector vacío (Mock).

Survivina es una proteína ampliamente estudiada por su capacidad de generar resistencia a la apoptosis en células tumorales y sus niveles son regulados por el eje ET-1, por lo que se decidió evaluar si los niveles de ECE-1c tienen influencia en los niveles de esta proteína. Como se observa en la figura 6B, los niveles proteicos de survivina están elevados en las células que sobreexpresan ECE-1c.

Akt y FAK son kinasas que regulan, entre otros procesos, la proliferación celular, una característica que se encuentra aumentada en la mayoría de los cánceres, principalmente en las variantes más agresivas, por lo que se evaluó el efecto que tiene una alta expresión de ECE-1c en la viabilidad de las células DLD-1. La sobreexpresión de ECE-1c provocó un aumento en la proliferación celular evaluado mediante la técnica de MTS. Como se observa en la figura 7A, el aumento en la proliferación en las células que sobreexpresan ECE-1c fue estadísticamente significativo tras 72 h de cultivo. Lo anterior llevó a pensar que si el aumento en la proliferación es debido a la acumulación de ET-1 en el medio de cultivo, utilizando un número mayor de células y cambiando la técnica, se podría acelerar la acumulación de ET-1 en el medio y en consecuencia acelerar también la proliferación celular. Así, se evaluó la proliferación mediante el conteo vital con azul tripán utilizando 2 millones de células en el cultivo inicial. Como se observa en la figura 7B, el resultado es muy similar al obtenido anteriormente mediante MTS, obteniendo que las células que sobreexpresan ECE-1c tienen una proliferación aumentada en comparación al las células control, y este aumento fue estadísticamente significativo tras 72 h de cultivo. Este resultado sugiere que el aumento en la proliferación celular no depende de la acumulación de ET-1 en el medio de cultivo.

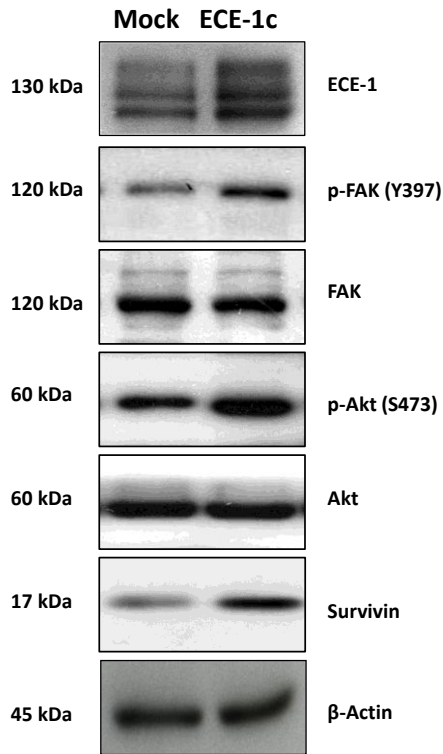
A



2801

EcoRI	XhoI	SpeI	XbaI	NotI	BamHI
GTGAATTCCT	CGAGACTAGT	TCTAGAGCGG	CCGCGGATCC		
CACTTAAGGA	GCTCTGATCA	AGATCTCGCC	GGCGCCTAGG		

B



C

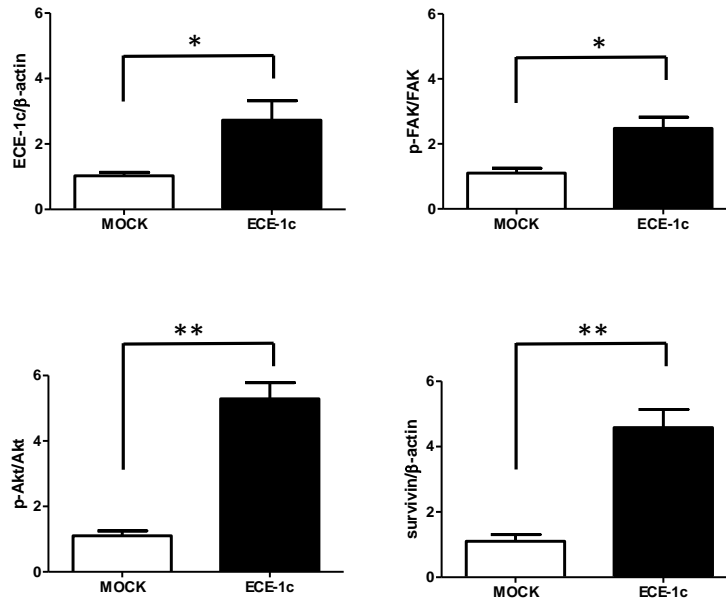


Figura 6. La sobreexpresión de ECE-1c promueve activación de FAK y Akt en células de cáncer de colon DLD-1. (A) Mapa del plásmido pLVX-IRESZsGreen1 usado para sobreexpresar ECE-1c en células DLD-1. Abajo se destaca la secuencia de la región múltiple de clonamiento. (B) La activación de FAK y Akt se evaluó mediante western blot. Células DLD-1 que expresan establemente el plásmidos codificante para ECE-1c fueron sembradas en placas de 6 cm y 24 h después se evaluaron los niveles de proteínas totales y fosforiladas mediante el uso de anticuerpos específicos para cada proteína. (C) Análisis densitométrico de las bandas mostradas en A. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas son destacadas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

Junto con un incremento en la proliferación celular, la sobreexpresión de ECE-1c provocó, como era de esperarse, un aumento en los niveles de ET-1 en el medio extracelular, evaluado mediante ELISA tras 48 h de cultivo (Figura 8). Esto confirma que además de existir un aumento en los niveles proteicos de ECE-1, también hay un aumento en su actividad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió evaluar si el aumento en la proliferación celular inducido por la sobreexpresión de ECE-1c era dependiente del aumento en la producción de ET-1, unión de éste a su receptor ET_AR y posterior activación de la ruta PI3K/Akt. Para esto se utilizó BQ-123, un antagonista específico del receptor ET_AR, y LY-294002 como inhibidor de PI3K. Como se observa en la figura 9, tras 48 h de tratamiento no hubo efectos significativos en ninguna condición. El bloqueo de ET_AR por 72 h con BQ-123 en las células Mock mostró una leve disminución en la viabilidad celular pero no significativa, mientras que la inhibición de PI3K con LY-294002 y/o el tratamiento combinado de BQ-123 mostró una baja estadísticamente significativa en la viabilidad celular. Notablemente, las células que expresaban altos niveles de ECE-1c no se vieron afectadas por los tratamientos anteriores (figura 7, abajo).

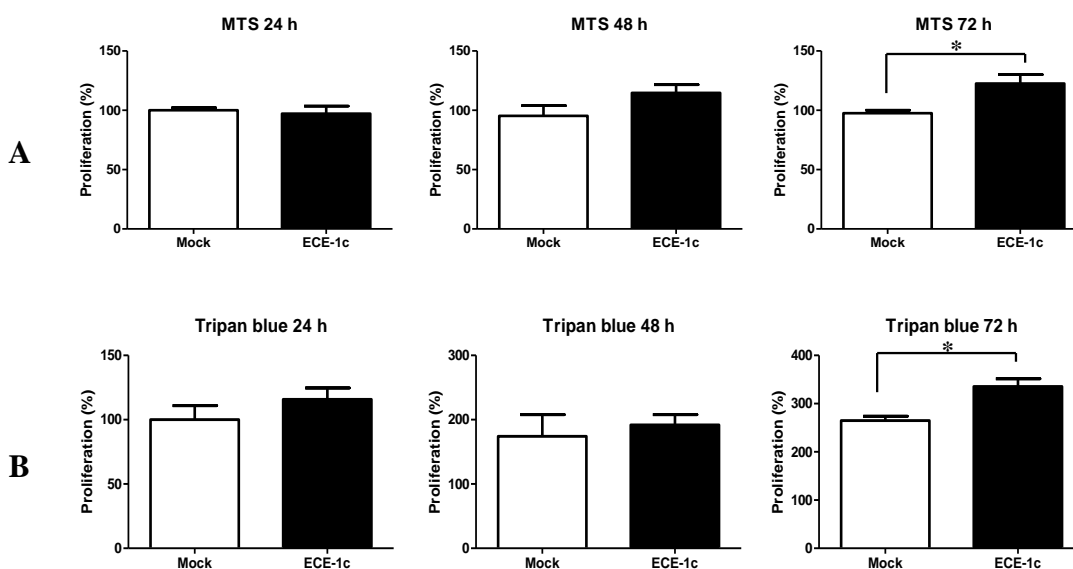


Figura 7. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la proliferación celular en células de cáncer de colon DLD-1. (A) Aproximadamente 1×10^4 células DLD-1 Mock y ECE-1c fueron sembradas en placas de 96 pocillos y la proliferación celular fue evaluada en los tiempos indicados mediante la técnica de MTS. (B) Aproximadamente 2×10^6 células DLD-1 Mock y ECE-1c fueron sembradas en placas de 10 cm y su proliferación fue evaluada en los tiempos indicados mediante tinción vital con azul tripán. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas son destacadas (* $P < 0.05$).

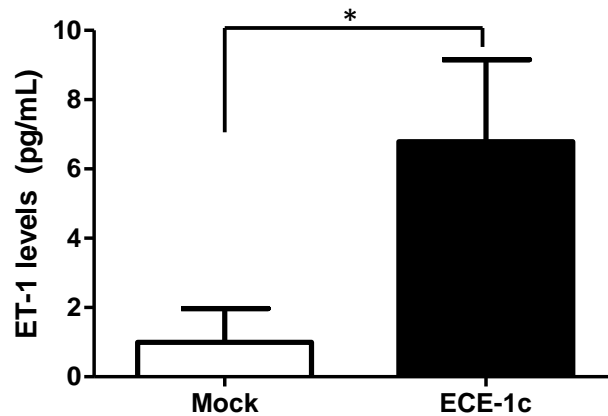


Figura 8. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta los niveles de ET-1 en el medio de cultivo en células de cáncer de colon. Se sembraron aproximadamente 2×10^6 células en una placa de 10 cm usando medio sin suero. 48 h después se recolectó el sobrenadante y se filtró usando un filtro de $0.22 \mu\text{m}$. Posteriormente mediante ELISA se evaluaron los niveles de ET-1 en el medio de cultivo. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas son destacadas (* $P < 0.05$).

En conjunto, estos resultados muestran que la sobreexpresión de ECE-1c en células de cáncer de colon promueve la activación de FAK y Akt. Además la proteína es funcional, ya que los niveles de ET-1 en el medio de cultivo aumentan 4 veces por sobre la condición Mock. Adicionalmente, el aumento en los niveles de ECE-1c provocó un aumento en la proliferación celular, el cual parece no ser dependiente de los niveles de ET-1, ya que la inhibición de su receptor ET_AR no revierte este aumento en la proliferación y solo afectó a las células Mock. Esto indica que habría un mecanismo independiente de la producción de ET-1 por el cual ECE-1c aumenta la proliferación celular y genera resistencia a la inhibición de ET_AR y PI3K.

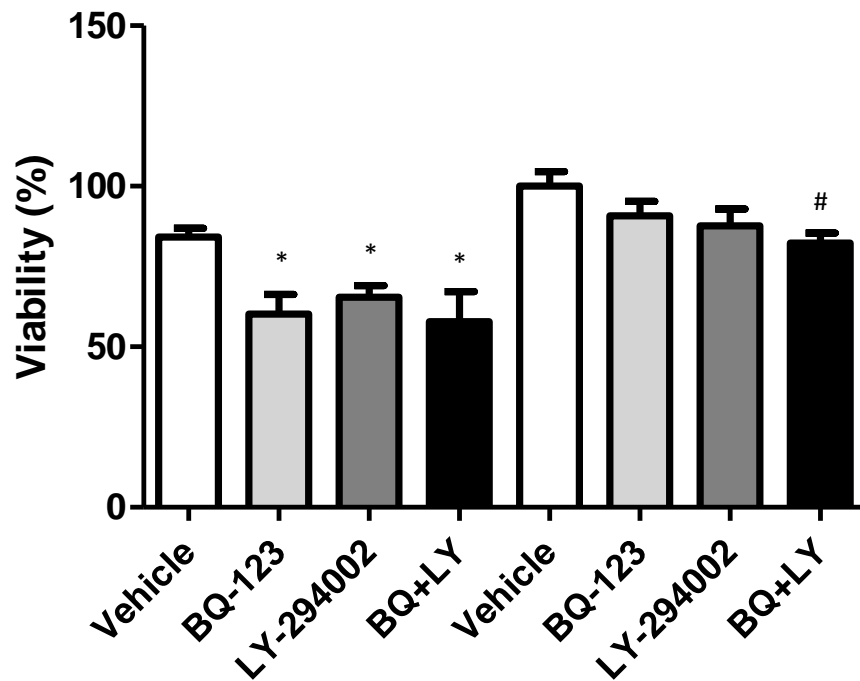


Figura 9. ECE-1c promueve resistencia a la inhibición de PI3K y/o bloqueo de ET_AR. Las células DLD-1 (Mock y ECE-1c) fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio completo. Al día siguiente se trataron con los inhibidores BQ-123 (5 μ M) y/o LY-294002 (25 μ M), y se evaluó la viabilidad celular a las 72 hrs mediante ensayo de MTS. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con la condición vehículo Mock (*) o vehículo ECE-1c (#; $P < 0.05$).

2.2 *Objetivo 2:* Evaluar *in vitro* el efecto de los niveles de ECE-1c en la tumorigenicidad e invasividad de células de cáncer de colon y su dependencia de ET-1.

Los resultados del OE1 sugieren que la activación de Akt y FAK por ECE-1c podrían regular una característica fundamental en las células transformadas, esto es su capacidad de proliferar en condiciones independientes de anclaje. Además, en particular para la isoforma ECE-1c se ha evaluado *in vitro* sólo su capacidad de promover invasión, pero no existe evidencia respecto a su capacidad de promover el crecimiento en células de cáncer de colon. Se ha definido el ensayo de formación de colonias en agar blando como un experimento que emula *in vitro* la formación tumoral *in vivo*, por lo que decidimos evaluar el efecto de un aumento en los niveles de ECE-1c sobre esta capacidad en células de cáncer de colon DLD-1.

Como se observa en la figura 10A, la sobreexpresión de ECE-1c en las células de cáncer de colon aumentó la capacidad de formar colonias en condiciones independientes de anclaje. El área de las colonias formadas mostró un aumento estadísticamente significativo en las células que sobreexpresan ECE-1c (Figura 10B), no así el número de las colonias que se formaron, el cual fue similar al comprar ambas condiciones (Figura 10C). Este resultado nos permite relacionar la activación de Akt y FAK (ver figura 6B) en células que sobreexpresan ECE-1c con la capacidad de proliferar en condiciones independientes de anclaje.

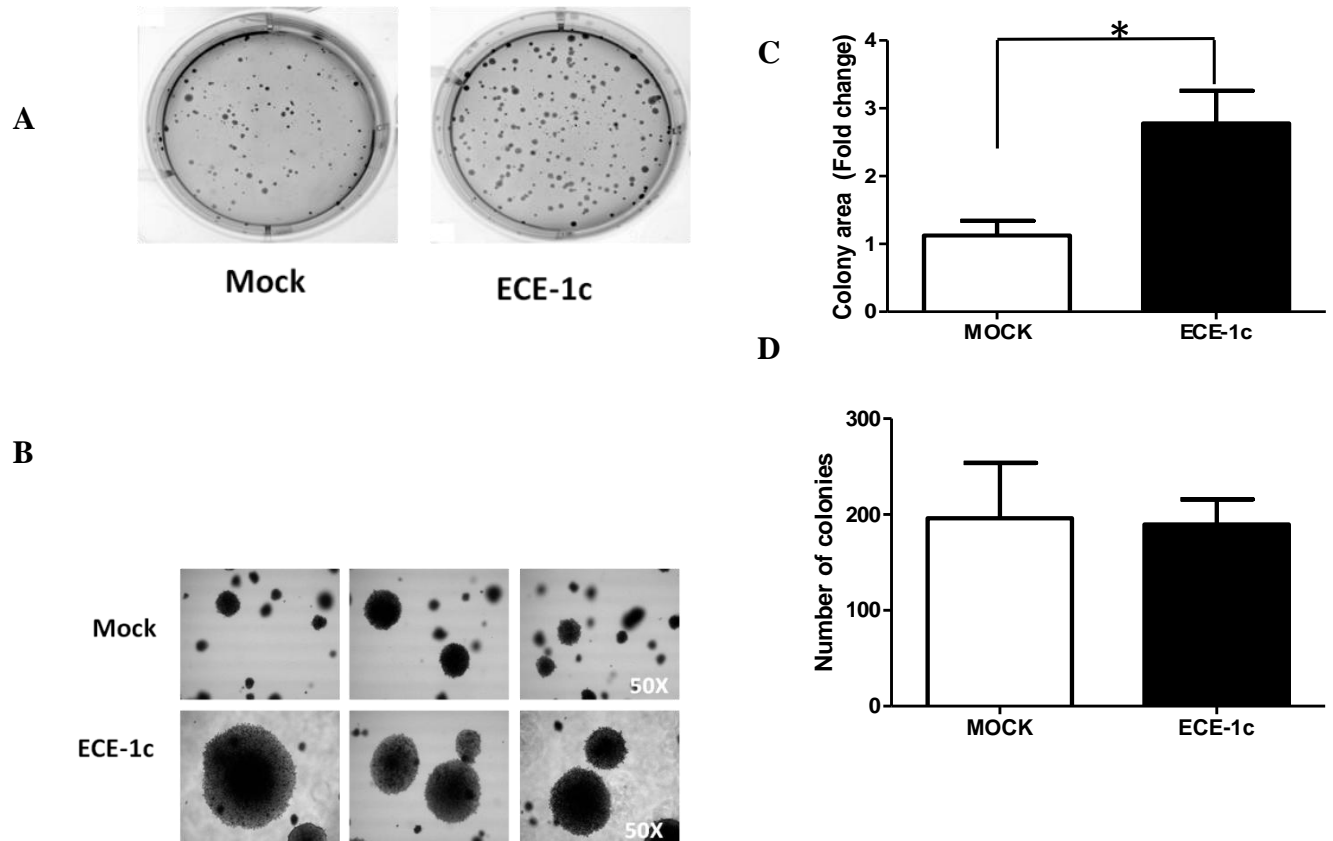


Figura 10. La sobreexpresión de ECE-1c promueve crecimiento independiente de anclaje en agar blando. (A) Se sembraron 2.5×10^3 células sobre la mezcla de agar en placas de 6 pocillos y fueron mantenidas en cultivo por 3 semanas, agregando medio de cultivo cada 3 días. Se muestra una fotografía representativa de las colonias teñidas con solución de cristal violeta 0.05% en la placa de 6 pocillos. (B) Imágenes representativas de las colonias formadas durante 3 semanas, por las células que expresan establemente ECE-1c o el vector Mock, obtenidas por microscopía de contraste de fases (50X). (C) Gráfica que representa la cuantificación del área total de las colonias en la placa. (D) Gráfica que muestra el número total de colonias por pocillo para cada condición. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

Para corroborar que la expresión de plásmido seguía estando activa a tiempo final del experimento (21 días) se decidió evaluar si las colonias formadas sobre el agar presentaban expresión de GFP. Para esto se realizó un análisis de las colonias vivas usando epifluorescencia para detectar la marca de GFP. Como se observa en la figura 11, las colonias mantienen activa la expresión de GFP tras 21 de cultivo en agar blando, lo que sugiere fuertemente que la expresión de ECE-1c en estas células a tiempo final también debería estar aumentada, ya que el vector pLVX genera la expresión de un mRNA bicistrónico.

Creemos que esta alta expresión y actividad de ECE-1c es lo que da cuenta de la diferencia de tamaño entre las colonias que expresan el vector Mock versus ECE-1c.

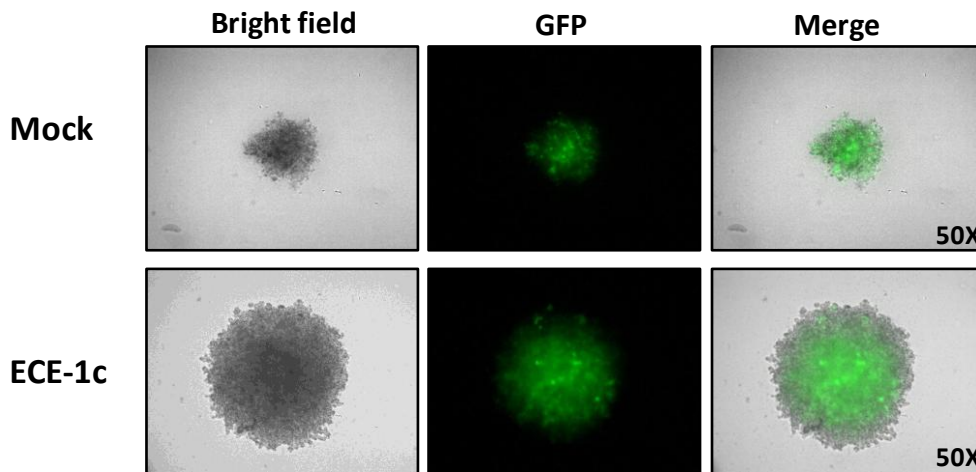


Figura 11. Expresión de GFP se mantiene luego de 21 días de cultivo en agar blando. La expresión de GFP en las colonias vivas fue evaluada mediante microscopía de epifluorescencia. Se seleccionaron colonias representativas para cada condición y se muestran las imágenes en campo claro (izquierda), GFP (centro) y la sobreposición de las imágenes anteriores (derecha) con un aumento de 50 veces. Se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes.

Dado que la sobreexpresión de ECE-1c llevó a una mayor activación de las kinasas Akt y FAK, surgió el interés por evaluar el efecto de la inhibición específica de ambas en el crecimiento de colonias. Previo a esto se controló que los inhibidores triciribine (TCN) y el inhibidor FAK14 (FAK14) mostraran el efecto esperado. Para esto se realizó un SDS-PAGE y posterior inmunodetección de las formas fosforiladas y totales de ambas kinasas. Las células DLD-1 fueron tratadas durante 16 h y posteriormente se evaluó la fosforilación de Akt en serina 473 y de FAK en tirosina 397 mediante anticuerpos específicos.

Como se observa en la figura 12, el tratamiento con TCN disminuyó completamente la fosforilación de Akt en serina 473. Asimismo el tratamiento con el inhibidor FAK14 disminuyó la forma fosforilada de FAK en tirosina 397. Este resultado permitió también comprobar la especificidad de estos inhibidores, ya que no se observan efectos cruzados entre el efecto de ambos inhibidores en nuestro modelo de estudio.

Una vez que se comprobó que la sobreexpresión de ECE-1c aumenta la capacidad de las células de cáncer de colon DLD-1 para formar colonias en agar blando y que la expresión del plásmido se mantiene durante toda la duración del experimento, se decidió evaluar si este efecto es dependiente de la señalización vía ET-1, es decir requiere activación del receptor ET_AR y su dependencia de la actividad de Akt y FAK. Para esto se realizó un tratamiento con el antagonista de ET_AR, BQ-123, y los inhibidores TCN y FAK14 cada 3 días, y se evaluó el número y tamaño de las colonias tras 3 semanas de crecimiento en agar blando. En la figura 13 se puede apreciar que el bloqueo de ET_AR con BQ-123 no afectó de manera significativa el tamaño ni el número de colonias formadas, indicando que la mayor producción de ET-1 no tuvo efecto en esta propiedad celular. Además se observa que la inhibición de las kinasas Akt con TCN y FAK con FAK14 fue catastrófica para el crecimiento de las colonias sobre agar blando, tanto en número como en tamaño de colonias, demostrando que la actividad de ambas kinasas es necesaria para los efectos de ECE-1c

sobre el crecimiento de colonias en agar blando. En conjunto estos resultados sugieren que ECE-1c promueve crecimiento independiente de anclaje a través de un mecanismo independiente de la activación de ET_AR, y dependiente de Akt y FAK.

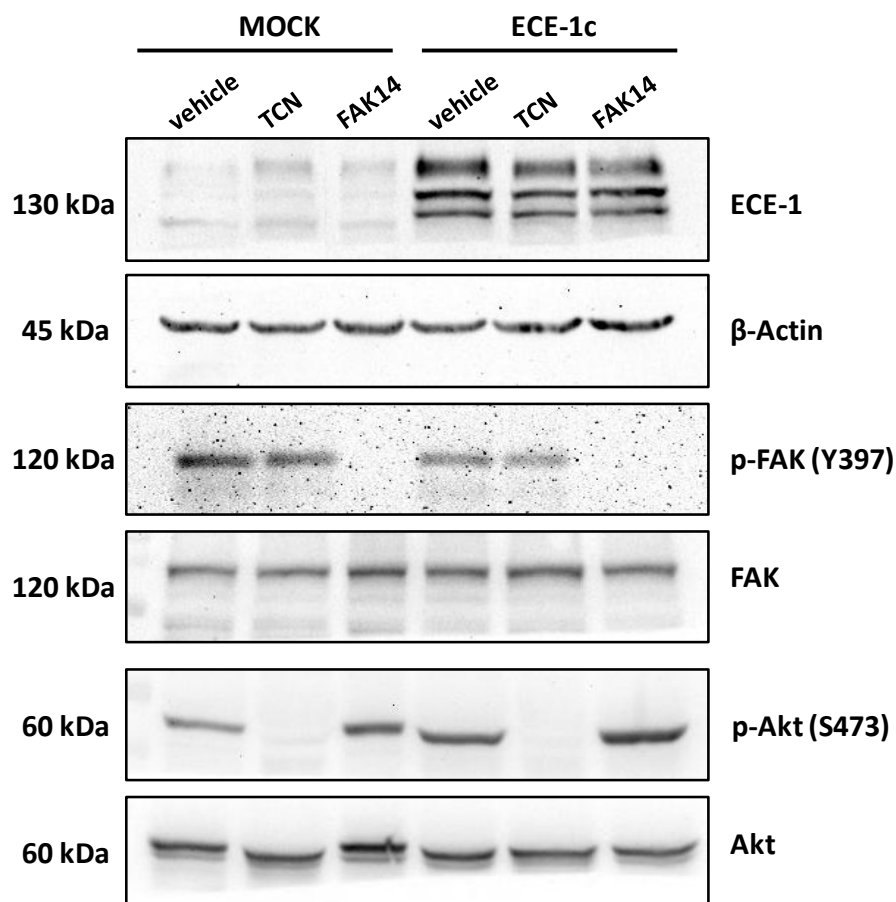
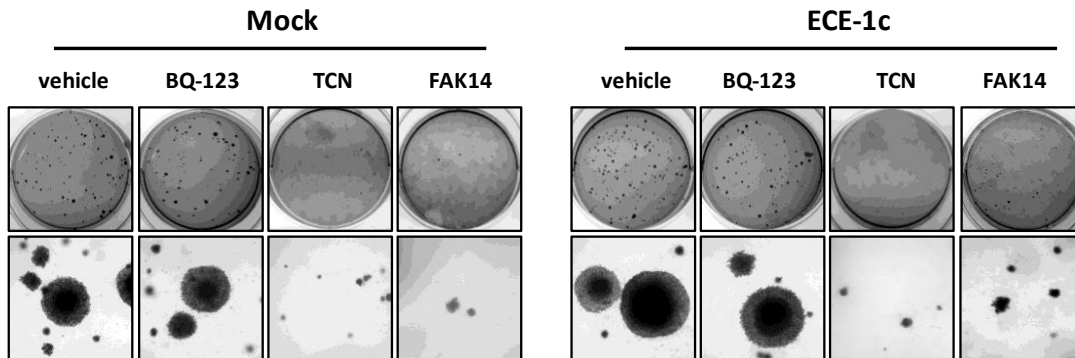
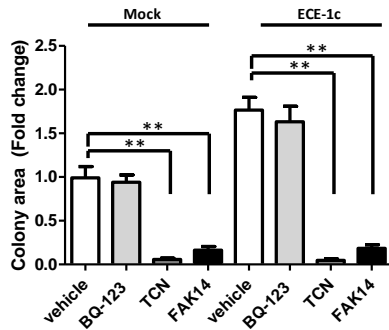


Figura 12. Inhibición de Akt y FAK. Se sembraron aproximadamente 6×10^5 células en placas de 6 cm, 24 h después las células fueron tratadas con el inhibidor de Akt, triciribine ($25 \mu\text{M}$) o el inhibidor de FAK, FAK14 ($5 \mu\text{M}$) por 16 h. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE y se detectó mediante anticuerpos específicos las formas totales y fosforiladas de ambas proteínas (N=1).

A



B



C

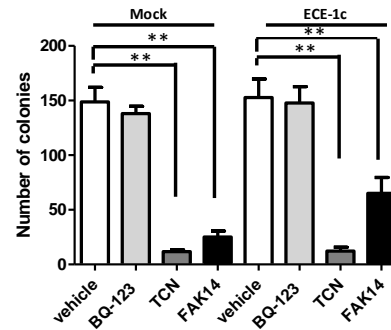


Figura 13. La inhibición de ET_A R no afecta el crecimiento de colonias en agar blando. Las células fueron sembradas como se explicó previamente. Cada 3 días se agregó medio completo conteniendo el vehículo, BQ-123 5 μ M, TCN 25 μ M o FAK14 5 μ M, según se indica en cada caso. (A) Se muestran imágenes representativas de cada placa con colonias (arriba) o fotografías de las colonias (abajo). (B) Cuantificación del área total de las colonias en cada condición. (C) Cuantificación del promedio de colonias en cada pocillo en cada condición.

Una de las drogas antineoplásicas más utilizadas en el tratamiento del cáncer de colon es el 5-Fluoro Uracilo (5-FU), un antimetabolito que interviene en la formación de timidina y genera muerte en células de cáncer [89, 90]. Dado que la elevada actividad de Akt está directamente relacionada con una alta resistencia a drogas quimioterapéuticas, decidimos probar si la expresión de

altos niveles de ECE-1c en células de cáncer de colon es capaz de generar resistencia al tratamiento con 5-FU. Como se observa en la figura 14, las colonias formadas por células que sobreexpresan ECE-1c resisten el tratamiento de 5-FU, mientras que las células control evidencian una disminución estadísticamente significativa del área de las colonias formadas tras 3 semanas de tratamiento. En ambos casos no hubo diferencias en el número total de colonias.

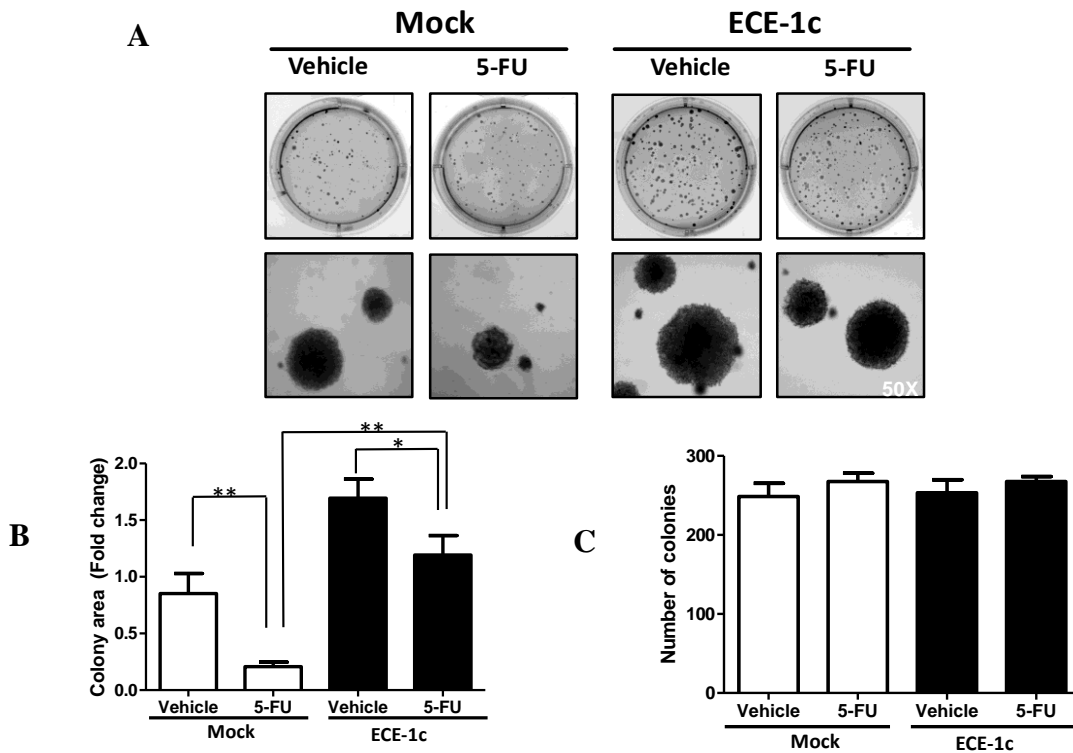


Figura 14. La sobreexpresión de ECE-1c genera resistencia a la muerte por 5-fluoro uracilo en células de cáncer de colon sembradas sobre agar blando. (A) Imágenes representativas de las colonias formadas por las células que expresan establemente ECE-1c o el vector Mock y tratadas con DMSO o 5-fluorouracilo (5 μ M) en la placa de 6 pocillos (arriba), u obtenidas por microscopía de contraste de fases (50X; abajo) **(B)** Gráfico de la cuantificación del área de las colonias en cada condición. **(C)** Gráfica que muestra el número total de colonias por pocillo para cada condición. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

Se estudió el efecto de ECE-1c en la migración celular, un proceso dinámico que involucra la activación de diversas vías de señalización que, en conjunto, pueden favorecer el desarrollo de un fenotipo maligno en células tumorales, promoviendo el desarrollo de metástasis en modelos *in vivo* [51]. En primer lugar se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida, en presencia o ausencia de suero fetal bovino (SFB), la capacidad migratoria de 3 líneas celulares de cáncer de colon que representan distintas etapas en la progresión de esta enfermedad (HT-29 ATCC < DLD-1 < HT29-US; Figura 15).

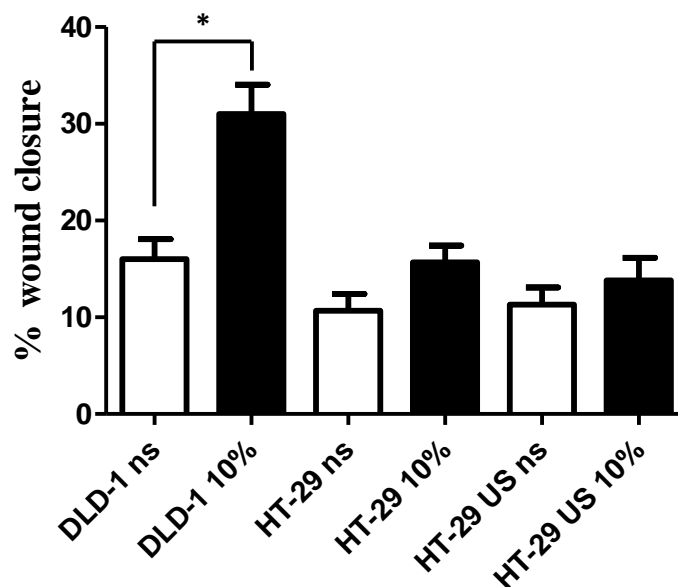


Figura 15. Evaluación de la capacidad migratoria de 3 líneas celulares de cáncer de colon. Para evaluar la capacidad migratoria de las diferentes líneas celulares, se realizó un ensayo de cierre de herida sobre una monocapa de células y se comparó su capacidad de cerrar la herida en ausencia (ns) o presencia de suero (10%) durante 6 horas. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (*P < 0.05).

Como se observa en la figura 15 las células DLD-1 fueron las que mostraron una mayor capacidad migratoria basal tras 6 h en comparación a HT29 US y HT-29 ATCC. Además se observa una alta capacidad de modulación de las células DLD-1 al estimular su migración con 10% SFB.

Luego se estudió el efecto de la señalización vía ET-1 en la migración celular inducida por ECE-1c. En primer lugar se evaluó cuál es el efecto de la sobreexpresión de ECE-1c sobre la migración *in vitro* mediante transwell, un ensayo que permite medir migración celular en 3 dimensiones. Como se observa en la figura 16, las células que expresan altos niveles de ECE-1c migraron más que las células control, en un tiempo de 8 horas.

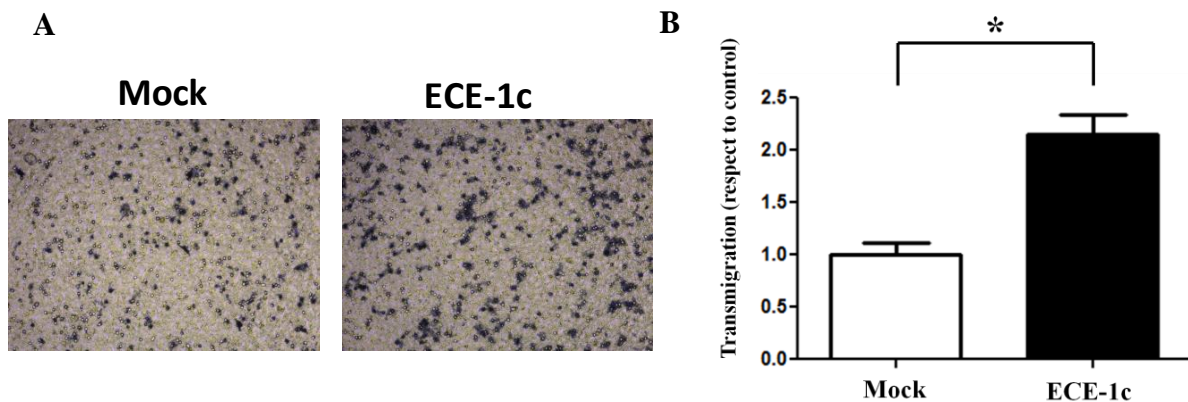
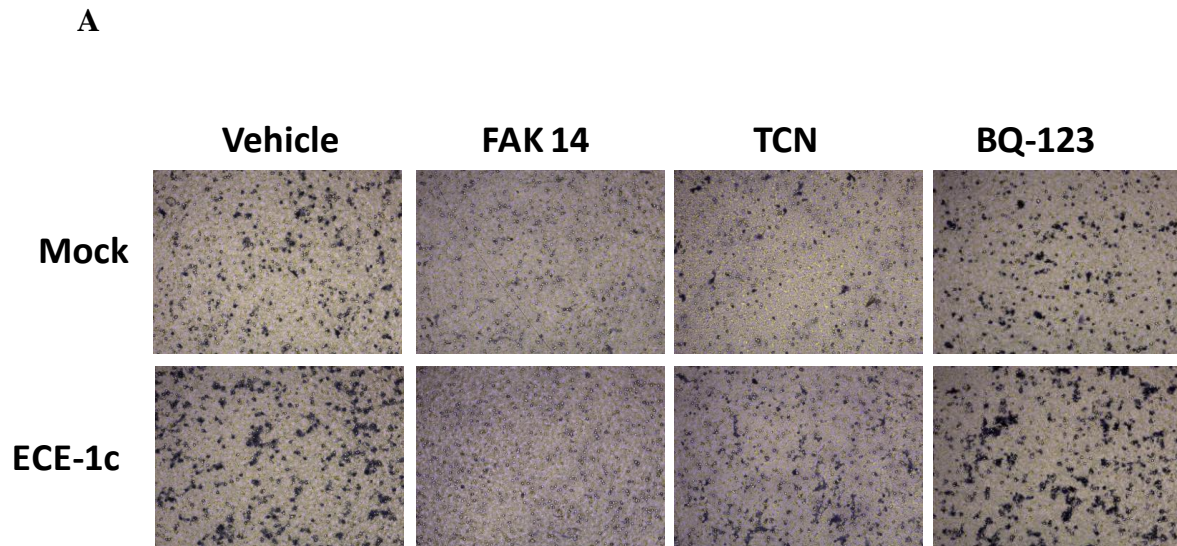


Figura 16. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la migración celular *in vitro*. (A) La migración celular fue evaluada mediante ensayo de transwell permitiendo la migración por 8 horas. Pasado el tiempo las células fueron teñidas con cristal violeta 0,5% en metanol. Se muestra un campo representativo. (B) Se contaron las células de 8 campos del transwell y se grafica el cambio respecto al control Mock. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

Para evaluar la dependencia de ET-1 en el proceso de migración celular, se bloqueó la señalización vía ET-1 y el receptor ET_AR con el antagonista BQ-123. La figura 17 muestra que el bloqueo de ET_AR en las células DLD-1 no tuvo efecto sobre la migración celular, lo que sugiere que la aumentada migración en células que sobreexpresan ECE-1c no se debe a la mayor síntesis de ET-1. Por otra parte, la inhibición de Akt (TCN) o FAK (FAK14) fue suficiente para bloquear el efecto positivo de ECE-1c sobre la migración, lo sugiere que ambas kinasas son necesarias para que ECE-1c pueda incrementar la migración de células de cáncer de colon.



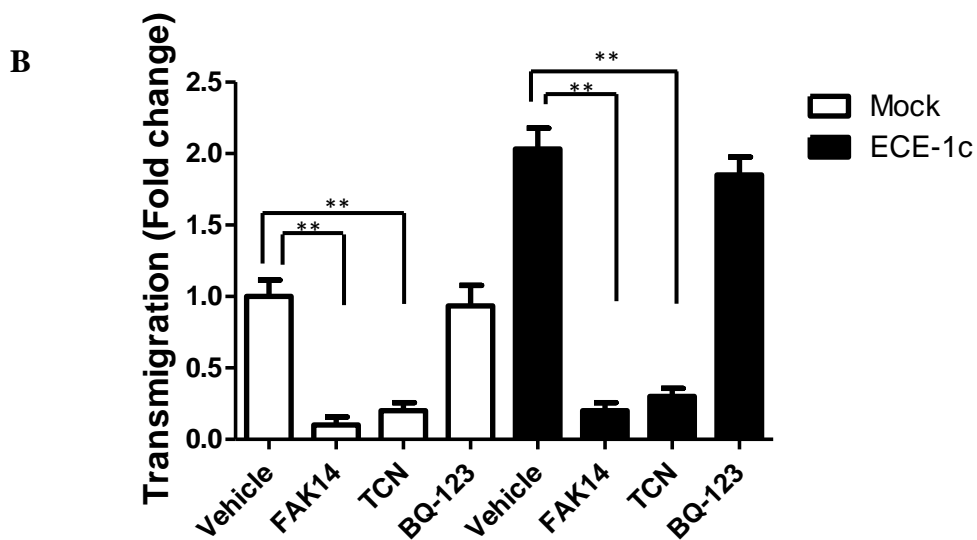


Figura 17. La migración celular inducida por ECE-1c no depende de la activación de la vía ET-1. (A) Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO), FAK14 (5 μ M), TCN (25 μ M) o BQ-123 (5 μ M) según se indica en la figura durante el proceso de migración por 8 horas. Se muestran las imágenes representativas de las células que lograron migrar en cada condición. **(B)** Se grafica el cambio en la migración respecto a la condición Mock sin tratamiento. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

Con la finalidad de evaluar el efecto de ECE-1c y ET-1 en la capacidad invasiva de nuestro modelo celular, decidimos evaluar la activación de MMP 2 y MMP 9. Ambas proteínas son importantes en la remodelación de la matriz extracelular y en el proceso de invasión *in vivo*. Para esto se realizó un ensayo de zimografía, que permite evaluar la actividad enzimática en gel, usando un sustrato copolimerizado con el gel de poli(acrilamida). En este caso se usó gelatina, para evaluar la actividad de MMP2 y MMP9.

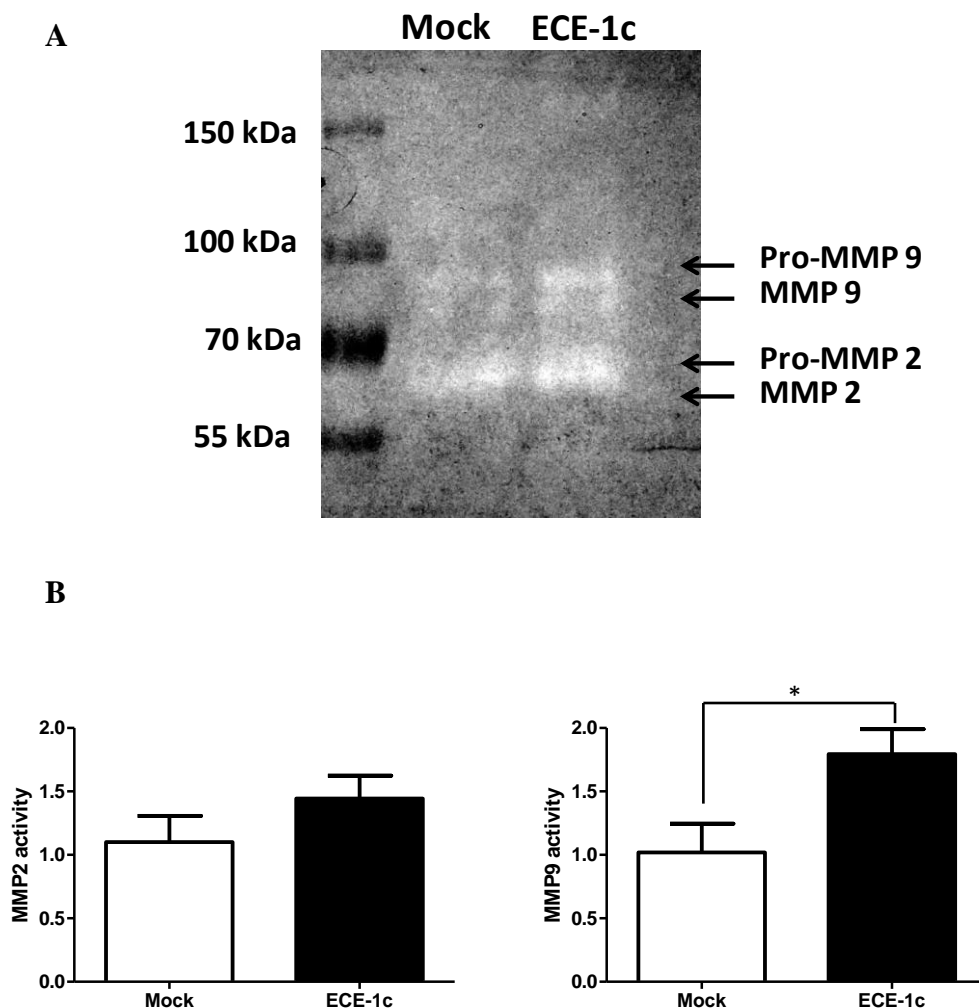


Figura 18. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la actividad gelatinasa de MMP 2 y MMP 9 en células de cáncer de colon. (A) 2×10^6 células fueron sembradas en placas de 10 cms y 48 horas después el sobrenadante de las células fue filtrado y concentrado. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina para evaluar la actividad gelatinasa. Las zonas claras muestran la degradación del sustrato en el gel. **(B)** Cuantificación densitométrica de las bandas mostradas en (A). Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

La figura 18 muestra por medio de un ensayo de zimografía que la sobreexpresión de ECE-1c aumenta la actividad de MMP 9 en las células que sobreexpresan ECE-1c en comparación al control Mock. La actividad de MMP 2 mostró también un aumento, sin embargo, es menor y no estadísticamente significativo.

Para determinar si este aumento en la actividad de las MMPs 2 y 9 es dependiente de los niveles de ET-1, se decidió tratar las células con un inhibidor de la actividad catalítica de ECE-1 (SM-19712) y el antagonista de ET_AR, BQ-123, y posteriormente se realizó un ensayo de zimografía para determinar la actividad gelatinasa de estas enzimas. Como se puede observar en la figura 19 el bloqueo de ET_AR por BQ-123 no mostró un efecto significativo sobre la actividad de las MMPs evaluadas, sin embargo, la inhibición de la actividad catalítica de ECE-1c por SM-19712 disminuyó la actividad de las MMPs de manera significativa en las células que sobreexpresan ECE-1c, lo que muestra una relación entre la activación de las MMPs y la actividad de ECE-1c en células de cáncer de colon.

En conjunto estos resultados sugieren que el incremento en la actividad enzimática de MMP2 y 9 al sobreexpresar la ECE-1c, depende de su actividad catalítica, pero no de la señalización vía ET_AR, en otras palabras no depende de la síntesis de ET-1 en el sistema.

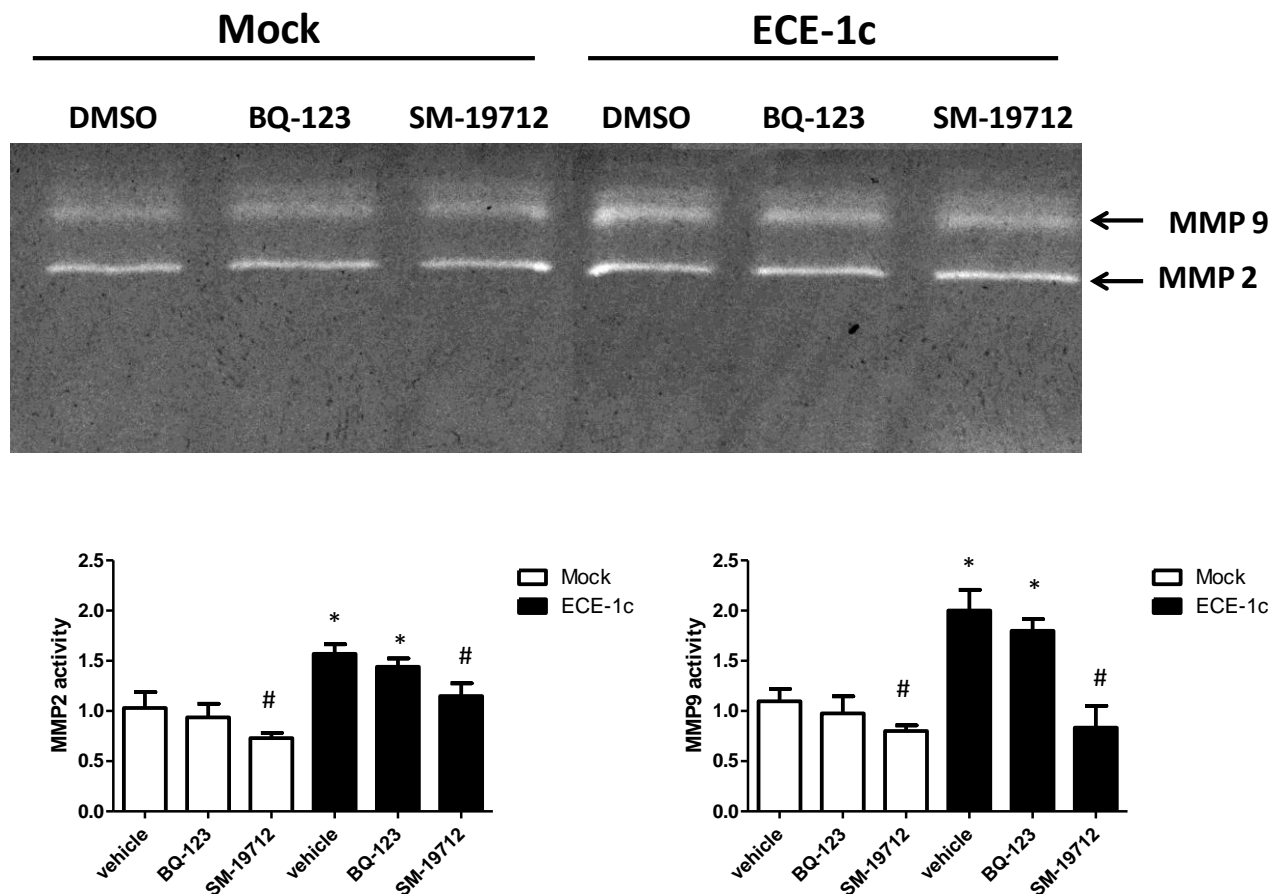
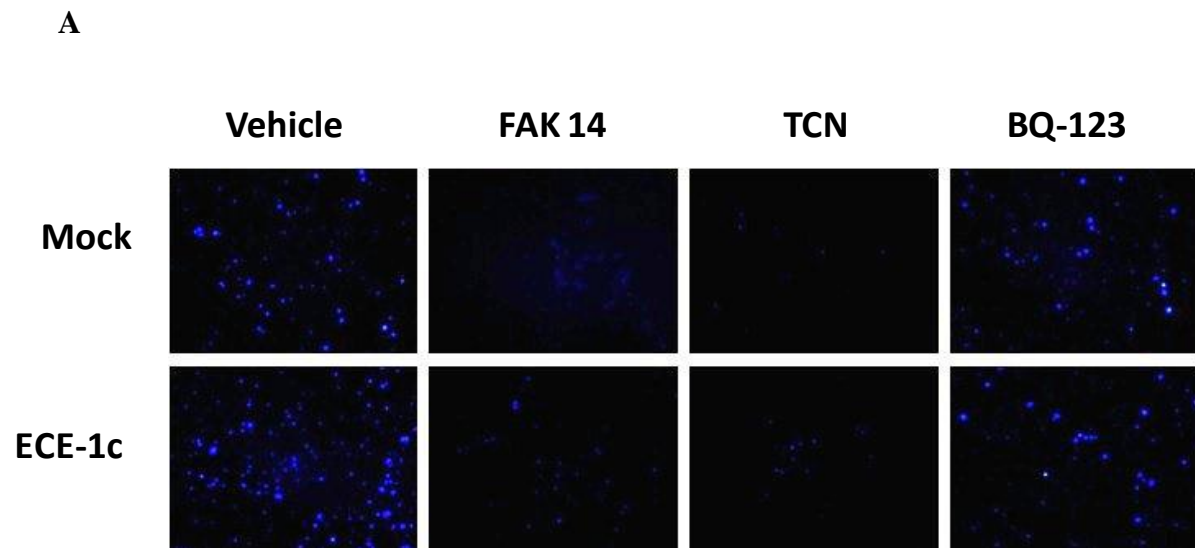


Figura 19. ECE-1c promueve activación de MMP 9 de manera dependiente de su actividad catalítica y no de la activación de ET_AR. Las células fueron sembradas como se explica previamente y 24 h después fueron tratadas con DMSO, BQ-123 (5μM) o SM-19712 (100nM) según se indica en la figura durante 24 h. A tiempo final el sobrenadante fue filtrado y concentrado, y posteriormente se realizó un ensayo de zimografía corriendo las muestras en un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina. **(B)** Cuantificación densitométrica de las bandas mostradas en (A). Los datos representan el promedio ± S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Simbología: * significancia estadística respecto a la condición Mock vehículo y # respecto a ECE-1c vehículo (P< 0.05).

Una vez comprobado el aumento en la actividad de MMP9 por la sobreexpresión de ECE-1 en las células DLD-1, se estudió su efecto en invasividad *in vitro* en matrigel. Como se observa en la figura 20A, y consecuentemente con el aumento en la actividad de MMP9, la sobreexpresión de ECE-1c incrementó la capacidad invasiva en las células DLD-1 en comparación a la condición control. Además, de manera muy similar a lo que ocurrió con la migración (figura18), la inhibición del receptor ET_AR con BQ-123 no tuvo efecto sobre la invasión de las células en el matrigel.



B

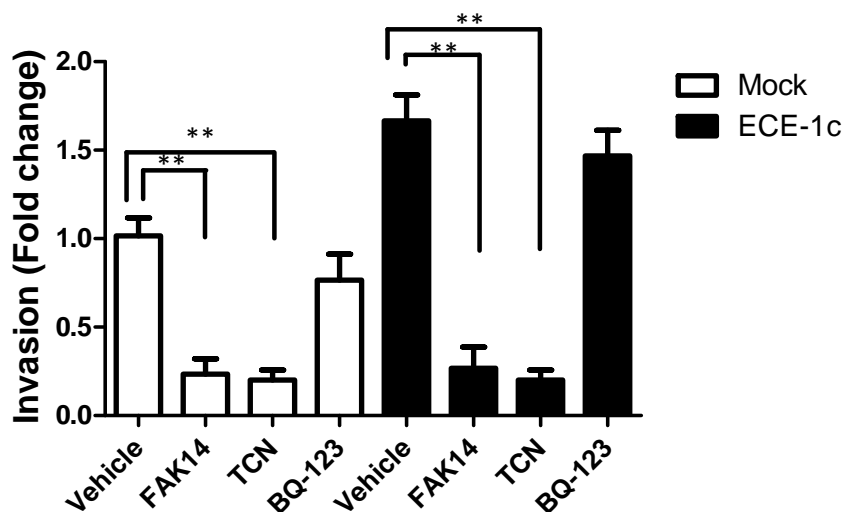


Figura 20. La sobreexpresión de ECE-1c aumenta la invasión *in vitro* en células de cáncer de colon. (A) 5×10^5 células fueron sembradas en la cámara de matrigel y se realizaron los tratamientos según indica la figura por 18 h. Una vez finalizado el tiempo las células fueron fijadas y teñidas con DAPI. Posteriormente se montaron en un porta objeto y se tomaron las imágenes mediante microscopía de epifluorescencia. Se muestra un campo representativo de cada condición. (B) Se contaron las células que atravesaron el matrigel y se grafica el cambio respecto al control. Los datos representan el promedio \pm S.E.M de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias estadísticamente significativas comparadas con su control (* $P < 0.05$).

Similarmente a hallazgos anteriores, la actividad de las kinasas Akt y FAK fue necesaria para la invasión celular en este modelo, ya que la inhibición de estas proteínas resultó en una gran disminución de la capacidad de las células para invadir matrigel tras 18 h de tratamiento.

En conjunto estos resultados muestran que la elevada expresión de ECE-1c promueve una mayor capacidad de migración, crecimiento independiente de anclaje e invasión, todas estas características de malignidad tumoral. Interesantemente el mecanismo por el cual ECE-1c promueve este fenotipo parece no depender de la producción de ET-1, ya que el bloqueo del receptor ET_AR, principal responsable de esta vía de señalización no disminuye el efecto de la alta

expresión de ECE-1c. Por otra parte la actividad de las kinasas Akt y FAK es fundamental para que se observe este fenómeno, sugiriendo que la señalización de ECE-1c se encuentra río arriba de estas proteínas.

2.3 *Objetivo 3*: Evaluar el efecto de ECE-1c en la formación de tumores y metástasis de células de cáncer de colon en un modelo *in vivo*.

Como una validación de nuestros resultados *in vitro*, se decidió realizar un ensayo de formación de tumores *in vivo* usando la cepa de ratones inmunodeficientes NOD/SCID. En la figura 21A se grafican las mediciones realizadas durante el tiempo que duró el experimento, para cada grupo Mock y ECE-1c. El grupo inoculado con células que sobreexpresan ECE-1c mostró un tamaño promedio mayor al grupo control, siendo estadísticamente significativa la diferencia en el último punto de la curva. La figura 21B muestra los tamaños finales de los tumores previo a la extracción. Se observa que el grupo de tumores de células que sobreexpresa ECE-1c es significativamente más grande que el grupo control. Finalizado el tiempo del experimento, los animales fueron sacrificados de acuerdo a las normas de bioética y bioseguridad vigentes, y los tumores fueron fotografiados (Figura 22C).

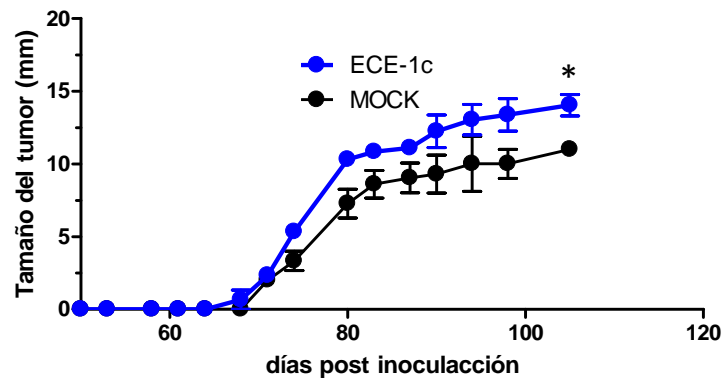
Posteriormente, realizamos un ensayo de western blot a partir de un extracto de proteínas de los tumores con la finalidad de evaluar los niveles de ECE-1 una vez finalizado el experimento y habiendo pasado cerca de 100 días desde la inoculación de las células. La figura 21C muestra que los niveles de ECE-1 en las células que sobreexpresan ECE-1c se mantiene alto en todos los tumores, comprobando así que la expresión del plásmido es sostenida en el tiempo.

Finalmente, se realizó una tinción hamatoxilina-eosina del tejido para un análisis histológico de los tumores. La figura 21D muestra imágenes representativas de cortes histológicos del tumor visto por microscopía óptica. En ambos casos se observa una estructura desorganizada,

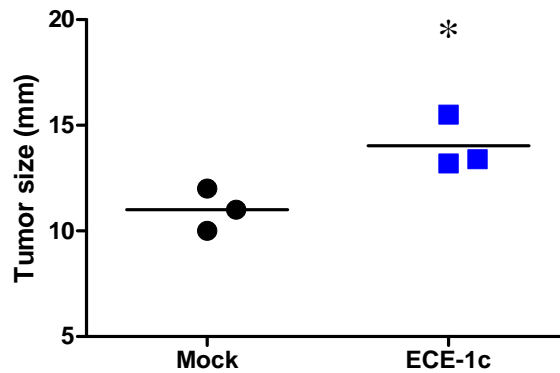
con focos necróticos hacia el interior del tumor, no habiendo mayores diferencias a nivel histológico.

La mayor diferencia entre los tumores fue el tamaño de los mismos al finalizar el experimento, concordando con los resultados anteriores que evidencian un efecto positivo de ECE-1c a través de un mecanismo dependiente de las actividades de Akt y FAK.

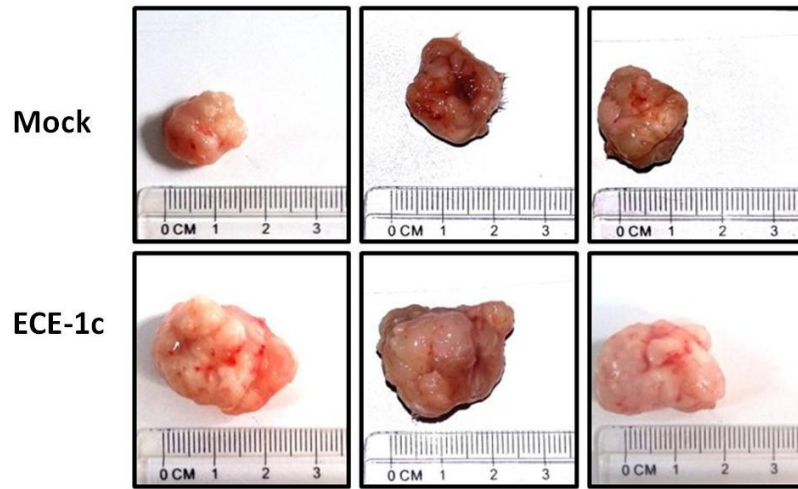
A



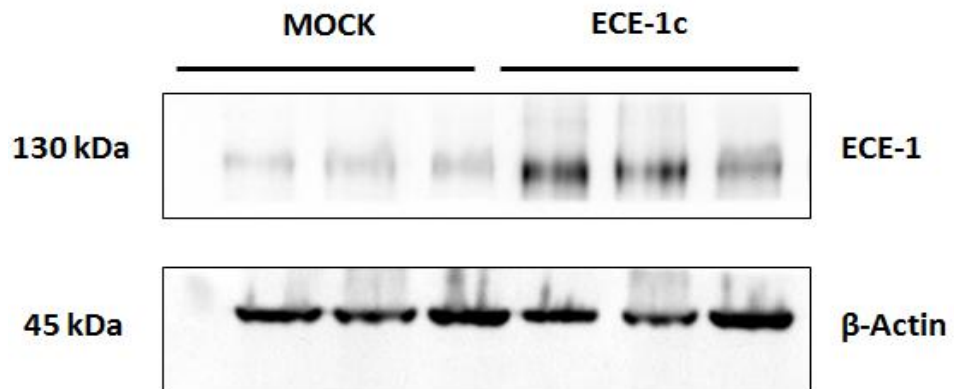
B



C



D



E

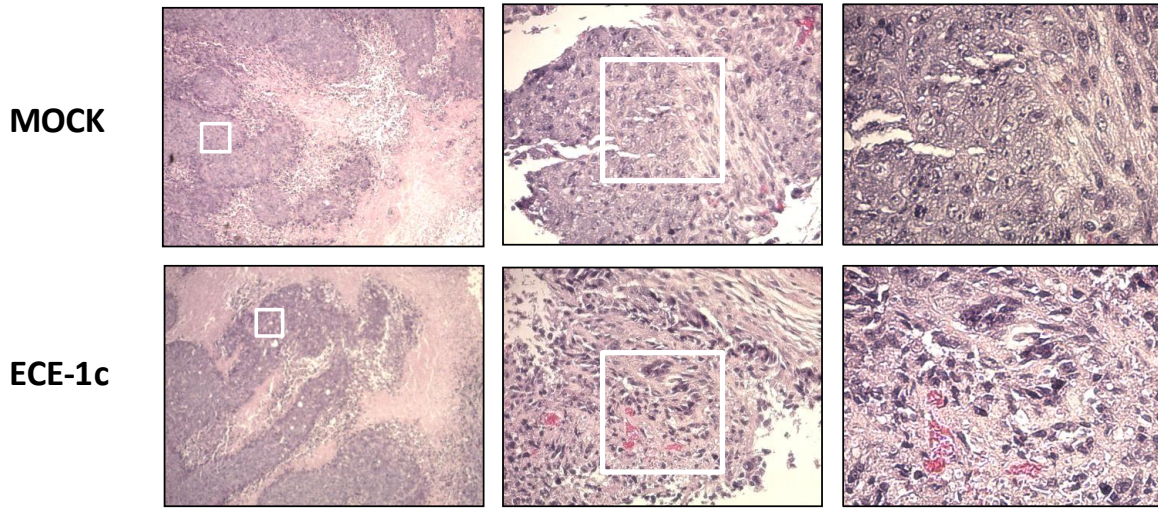


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de ECE-1c sobre el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones NOD/SCID. Se inocularon 2 millones de células que sobreexpresan ECE-1c o células con el vector Mock, de manera subcutánea en ratones NOD/SCID hembra de 6-8 semanas de edad. **(A)** El crecimiento tumoral fue registrado periódicamente midiendo el diámetro de los tumores y las mediciones se registran en el gráfico. **(B)** Se grafican los tamaños de los tumores a tiempo final del experimento. **(C)** Pasadas 4 semanas desde la primera medición los ratones fueron sacrificados y se recuperaron los tumores completos para su medición final y análisis molecular. Se muestra una foto de cada tumor luego de su extracción. **(D)** Se realizó una extracción de proteínas totales a partir de los tumores y posteriormente un SDS-PAGE para evaluar los niveles de ECE-1 y actina. **(E)** Luego de su extracción parte de los tumores fueron fijados con PFA y montados en tacos de parafina para la obtención de cortes histológicos. Utilizando tinción de hematoxilina-eosina se visualizaron cortes seriados de cada tumor para un análisis histológico (40X izquierda, 200X centro, 400X derecha).

3. DISCUSIÓN

La ECE-1c ha sido involucrada en la adquisición de un fenotipo invasivo en células de cáncer de próstata, ya que su sobreexpresión aumenta la capacidad invasiva en experimentos *in vitro*. Sin embargo, solo se había probado en una línea celular (PC-3) y hasta la fecha no existía información sobre su rol en otras características tumorales, ni su efecto específicamente en la progresión del cáncer de colon. Con respecto al mecanismo por el cual ECE-1c promueve invasión en células de cáncer de próstata existe controversia, ya que la capacidad invasiva de células cuya expresión de ECE-1c fue silenciada (ie, KD-ECE-1c) no se restituyó a niveles normales al adicionar ET-1 de manera exógena, sino que se mantuvo bajo el nivel control, lo que sugirió que ECE-1c tendría un posible rol en la invasión independiente de la producción de ET-1 [81, 82].

Se sabe entonces que ECE-1c promueve invasión y otras características tumorales malignas como una aumentada capacidad proliferativa e invasiva en algunos tipos de cáncer, sin embargo, en cáncer de colon no existía evidencia sobre su capacidad para desarrollar un fenotipo maligno, ni tampoco había consenso respecto de si sus efectos en células tumorales dependían directa y exclusivamente de su capacidad para sintetizar ET-1.

En esta tesis se evaluó si la aumentada expresión de ECE-1c lleva a la activación de Akt y FAK, ya que estas proteínas juegan un rol fundamental en procesos de proliferación celular, resistencia a la apoptosis y migración e invasión celular. Incluso se ha desarrollado y probado en la clínica, con relativo éxito, fármacos que inhiben directamente su actividad [61, 91-93]. Interesantemente, la sobreexpresión de ECE-1c aumentó la activación de ambas kinasas en células de cáncer de colon. Esto se puede explicar porque ET-1 puede llevar a la activación de Akt y FAK por un mecanismo que involucra el receptor ET_AR y posterior señalización vía proteína Gq, lo que lleva a la activación de ambas kinasas [44, 49]. No obstante, nuestros resultados usando el antagonista del receptor ET_AR sugieren que ECE-1c también promueve viabilidad, migración,

invasión y crecimiento independiente de anclaje por un mecanismo independiente de la activación del receptor (Figuras 9, 17, 19 y 20).

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de ECE-1c es capaz de promover el crecimiento independiente de anclaje en agar blando, incluso en células tratadas con la droga antineoplásica 5-FU, un fármaco utilizado actualmente para el tratamiento del cáncer de colon que induce apoptosis en células tumorales [89]. Se ha vinculado la activación de la vía Akt a la resistencia a la muerte celular por mecanismos que suprimen la activación de las caspasas, una de sus funciones más estudiadas en diversos tipos de cáncer, a través de la fosforilación e inactivación de diversas proteínas relacionadas con la apoptosis. Asimismo, FAK es capaz de generar resistencia a la muerte, ya que en condiciones de adhesión a una matriz, la unión de las integrinas en la membrana celular a proteínas de la MEC es capaz de activar vías de supervivencia como la vía de las MAPK, sin embargo, en ausencia de estas moléculas de adhesión las integrinas se encuentran en su estado inactivo y las células entran en apoptosis [57, 58].

Nuestros datos sugieren que la activación de Akt y FAK por la sobreexpresión de ECE-1c, promueve resistencia a la muerte y favorece proliferación celular. Incluso se ha relacionado altos niveles de survivina con una mayor resistencia a la muerte, lo que podría explicar por una parte el mayor crecimiento en agar blando, así como también la resistencia a 5-FU (Figura 14).

Datos no publicados de nuestro laboratorio han mostrado que la sobreexpresión de una mutante “super estable” de ECE-1c en células DLD-1 aumenta la expresión de genes relacionados con la adquisición de un fenotipo de célula troncal tumoral, como lo son NANOG, LGR5, CD133 y c-MYC. Estos hallazgos nos ayudan a entender en parte la resistencia de las células que sobreexpresan ECE-1c al tratamiento con 5-FU, ya que una de las características de las células troncales tumorales es una alta resistencia a drogas favorecida por una elevada expresión de los transportadores de tipo ABC [94].

Hasta la fecha no existen datos de la localización de la ECE-1c en células de cáncer de colon o de ningún otro tipo de cáncer humano. Es por esto que decidimos estudiar cual es la localización de esta proteína en las células de cáncer de colon DLD-1. Debido a que no existen anticuerpos que permitan identificar específicamente cada isoforma de ECE-1, se decidió realizar una proteína de fusión con GFP para poder reconocer específicamente esta isoforma. Datos previos de la literatura mostraron en células epiteliales que el uso de la ECE-1c completa fusionada a GFP, tanto en su N-terminal (GFP-ECE-1c) como en C-terminal (ECE-1c-GFP) afecta la actividad catalítica de la misma. Adicionalmente los autores demostraron que la construcción GFP-ECE-1c no se localiza en la membrana plasmática, que es su principal ubicación en células epiteliales [95]. En base a estos antecedentes se desarrolló una proteína de fusión denominada NT-ECE-1c-GFP que reemplaza el dominio catalítico C-terminal de ECE-1c por GFP, de esta forma se mantuvo la región N-terminal que es la que determina su localización sub-celular [71, 75] y por otra parte se generó una proteína de tamaño similar a la proteína completa, la cual es posible detectar de manera específica mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP.

Sorprendentemente, al expresar esta construcción se observó un efecto nocivo en las células, lo que se evidenció en una disminución en la viabilidad y capacidad migratoria, y a nivel molecular una disminución en los niveles proteicos de survivina y las formas activas de Akt y FAK (Figura 24 Anexos). Interesantemente, este efecto mostró ser dependiente de la dosis de plásmido transfectado. Por esta razón decidimos transfectar sólo una pequeña cantidad de plásmido para los experimentos de localización sub-celular (ie, 5µg) lo que resultó ser una dosis no letal para las células. Así, encontramos que la localización de NT-ECE-1c-GFP fue similar a la de la ECE-1 endógena y ECE-1c expresada en células epiteliales tumorales de ratón [74, 96]. Además, similarmente a lo que ocurre con la proteína endógena, la activación de PKC con el éster de forbol 4β-TPA, promovió una localización cercana a la membrana plasmática, lo cual fue corroborado por microscopía confocal (Figura 25 Anexos). Faltan experimentos para demostrar si la localización de

la construcción NT-ECE-1c-GFP es específicamente en la membrana plasmática o en las cercanías a esta. Para poder saber esto es necesario hacer una co-localización de la marca del GFP con algún marcador de membrana como Caveolina-1, Na⁺/K⁺ ATPasa, E-caderina, o mediante el uso de Faloidina para marcar los microfilamentos de actina ubicados en el borde de la célula. Consideramos realizar este tipo de ensayos en el futuro para determinar con más certeza la localización de esta construcción.

Otro antecedente que valida el uso de la construcción NT-ECE-1c-GFP, es que nuestro grupo demostró que la estabilidad de esta construcción y la de ECE-1c tenían un comportamiento similar al modular la actividad de la kinasa CK2, una proteína de expresión ubicua implicada en múltiples procesos celulares, y que es capaz de fosforilar la región N-terminal de ECE-1c [21].

Una posible explicación para este efecto nocivo en las células al expresar la construcción NT-ECE-1c-GFP es que al ser esta una proteína de transmembrana voluminosa y de síntesis en el RE, su sobreexpresión genera una sobrecarga en la maquinaria de síntesis proteica y en la vía secretora. Esto al ser sostenido en el tiempo, genera un estrés en la célula lo que lleva a la muerte. Esta hipótesis también fue sugerida por los autores de la investigación previamente mencionada, quienes vieron una alta marcación en el RE al expresar la construcción ECE-1c-GFP [95].

También es posible que esta construcción actúe como un “dominante negativo” sobre la proteína endógena lo que podría afectar su dimerización y/o posicionamiento en la membrana plasmática, alterando la señalización de la vía ET-1. Creemos que es necesario utilizar un “tag” o marca de menor tamaño que GFP, por ejemplo flag, His o HA, con la finalidad de estudiar el rol de la secuencia N-terminal de ECE-1c y así eliminar el posible efecto del GFP en la vía secretora de proteínas.

Hasta la fecha no existen datos publicados que relacionen a ECE-1c con las MMP 2 ó 9 en cáncer. Si bien, es posible que la sobreexpresión de ECE-1c y el consecuente aumento de ET-1 a

través de su receptor ET_AR promuevan la activación de estas MMPs, esta hipótesis no ha sido explorada experimentalmente. Nuestros resultados sugieren que existe participación de ET-1 en la mayor activación de las MMPs, ya que la inhibición de ET_AR mostró una leve disminución en la actividad de estas (Figura 19). Sin embargo, la mayor disminución de esta capacidad se vio tras la inhibición de la actividad catalítica de ECE-1c mediante el uso de SM-19712. Esto nos hace pensar en una regulación más directa de ECE-1c sobre MMP 2 y 9, lo que podría ser a través de una interacción con otras MMPs como 1 y 14 que se activan río arriba de MMP 2 y 9 y son requeridas para su completa activación [67, 97]. Un estudio *in silico* realizado en nuestro laboratorio no reveló interacciones proteína-proteína entre ECE-1c y las MMP 1 ó 14 (datos no mostrados), lo que no descarta que esta posibilidad suceda *in vivo*.

Otra alternativa, que requiere ser probada, es que ECE-1c, por medio de su dominio catalítico extracelular, sea capaz de degradar los componentes de la MEC y de esta forma favorecer directamente la invasión. Los primeros estudios sobre la especificidad de sustrato de la ECE-1 determinaron que esta enzima era altamente específica para Big-ET-1 con una Km de 2,0 μ M y que tenía una mínima actividad por sustratos más pequeños que hexapéptidos. Actualmente se sabe que ECE-1 es capaz de proteolizar otros sustratos además de Big-ET-1, como por ejemplo bradikinina (Km 340 μ M), sustancia P (Km 90 μ M) y neurotensina (Km 78 μ M) [98]. Incluso se ha visto que ECE-1 es capaz de hidrolizar el péptido β -amiloide A β ₁₋₄₀ A β ₁₋₄₂, dándole un nuevo rol a esta enzima en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [99]. Sin embargo, no existe evidencia experimental de que ECE-1 pueda proteolizar directamente componentes de la MEC como fibronectina o colágeno. Con respecto a esto, nuestro estudio *in silico* tampoco reportó componentes de la MEC como posibles sustratos para esta enzima (datos no mostrados).

Finalmente, los resultados de tumorigénesis *in vivo* en ratones NOD/SCID muestran por primera vez que ECE-1c es capaz de promover el crecimiento tumoral en un modelo animal, validando nuestros hallazgos *in vitro*. Aún queda por establecer si ECE-1c es capaz de promover la

metástasis utilizando una inyección de células tumorales en la vena de la cola en el mismo modelo animal.

No obstante, la participación de un mecanismo independiente de ET-1 no pudo ser demostrada en este tipo de ensayo y la evidencia a su favor proviene de los experimentos realizados *in vitro* en esta tesis. A este respecto un ensayo piloto realizado *in vivo* inoculando células que expresan un sh-RNA contra ET-1 no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar estas células con la condición control, por lo que aún no es posible concluir si un mecanismo independiente de ET-1 es capaz de promover crecimiento tumoral *in vivo*.

Como modelo de nuestros resultados planteamos que el eje ET-1 a través de ECE-1c es capaz de sintetizar el péptido ET-1 el cual a través de su receptor ET_AR promueve la activación de las kinasas AKt y FAK, en lo que denominamos mecanismo canónico de ECE-1c. Sin embargo en condiciones de una alta expresión de la ECE-1c, la activación del receptor ET_AR no es necesaria para la activación de las kinasas y la promoción de características tumorales malignas como lo son alta proliferación, migración, invasión y crecimiento independiente de anclaje (figura 22).

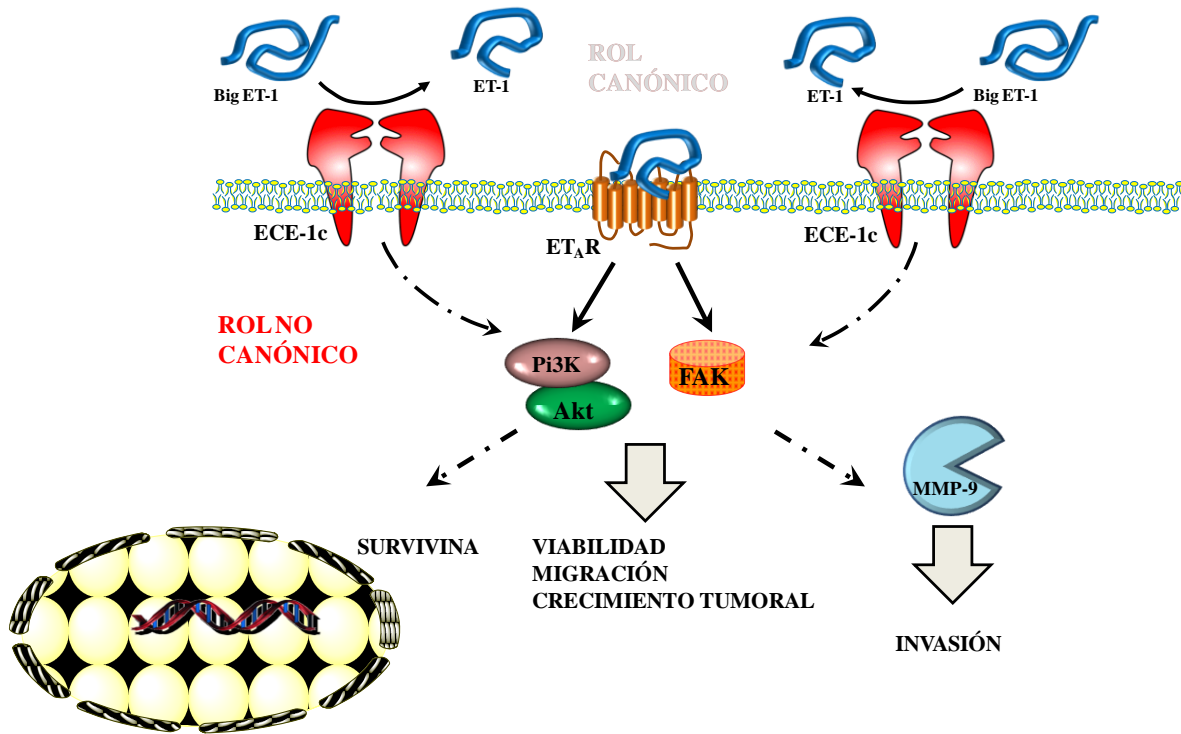


Figura 22. Esquema del mecanismo propuesto para el rol de ECE-1c en tumorigénesis. Ece-1c es capaz de sintetizar ET-1 y posteriormente gatillar la activación de ET_AR y su cascada de señalización río abajo. En condiciones de una alta expresión de ECE-1c la activación de las kinasas no requiere de la activación del receptor y se promueve un fenotipo altamente maligno con una mayor capacidad migratoria, invasiva y que es capaz de crecer en condiciones independientes de anclaje. Incluso en experimentos in vivo mostró una alta capacidad de promover crecimiento tumoral.

4. ANEXOS

Como se mencionó anteriormente, existen antecedentes de un mecanismo no canónico por el cual NEP, proteína que comparte un 40% de homología de secuencia con ECE-1 y que se encarga de degradar a ET-1, es capaz de regular la actividad de la vía PI3K/Akt. Se describió que la región N-terminal de NEP es capaz de interactuar directamente con PTEN y promover su degradación, de esta manera se favorece la acumulación de PIP₃ en la membrana y una mayor actividad de la vía PI3K/Akt [83]. En base a estos antecedentes se decidió probar el efecto que tendría la sobreexpresión de la región N-terminal de ECE-1c sobre la activación de la vía PI3K/Akt en células de cáncer de colon DLD-1. Para esto, se clonó la secuencia correspondiente a los primeros 300 nucleótidos de ECE-1c que codifican la región intracelular N-terminal y de transmembrana, en un vector que permite la expresión de una proteína de fusión en donde la región catalítica C-terminal de ECE-1c es reemplazada por la secuencia de GFP, formando la proteína NT-ECE-1c-GFP (Figura 23 Anexos).

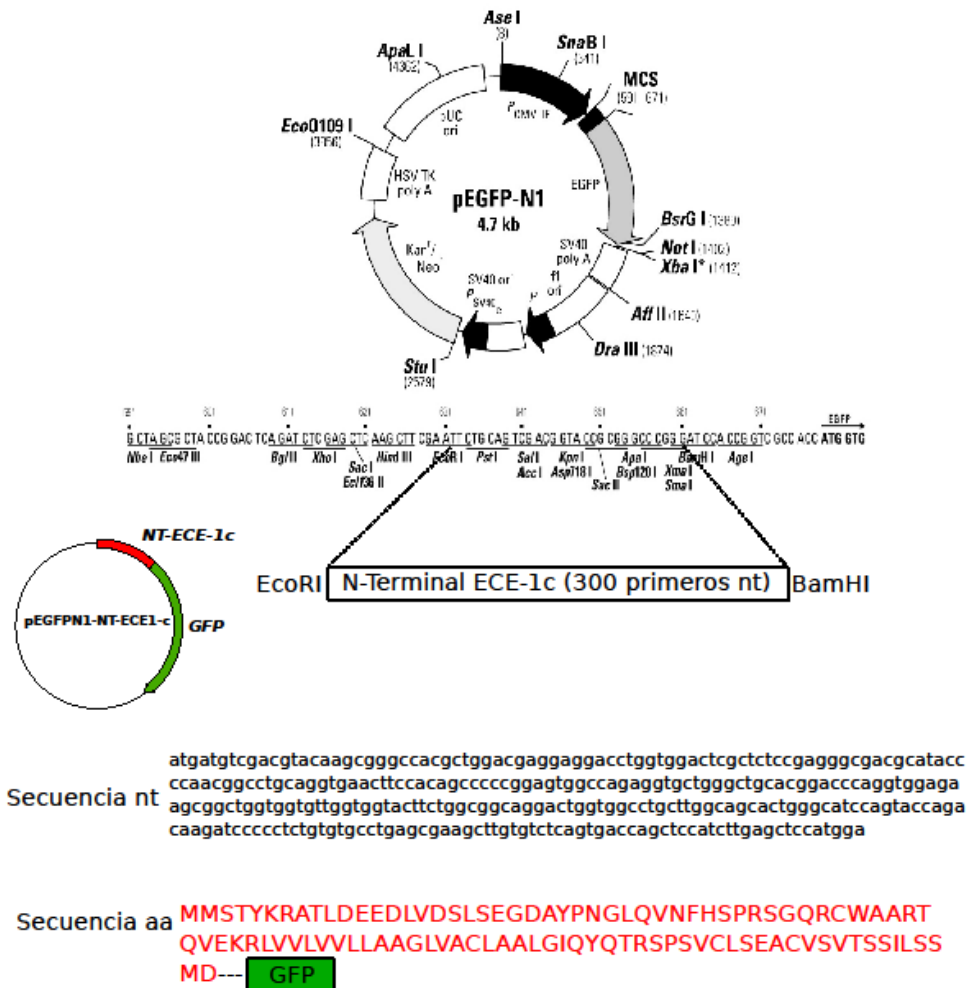


Figura 23 Anexo. Esquema del subclonamiento de la región N-terminal de ECE-1c en el vector pEGFP-N1. Los primeros 300 nucleótidos de la secuencia de ECE-1c fueron subclonados en el vector pEGFP-NT usando las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Esto permitió generar la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP. Se muestran las secuencias de nucleótidos (arriba) y la secuencia de aminoácidos (abajo) de la proteína ECE-1c.

Posteriormente, se expresó esta construcción mediante transfección transitoria en células de cáncer de colon DLD-1 y se evaluó el efecto sobre la activación de Akt y FAK. Como se observa en Figura 24A la sobreexpresión de NT-ECE-1c-GFP provocó una sorprendente disminución de las formas activas de Akt y FAK evaluadas mediante western blot. Adicionalmente, esta disminución en la actividad de las kinasas Akt y FAK se correlacionó con una fuerte disminución de la proteína

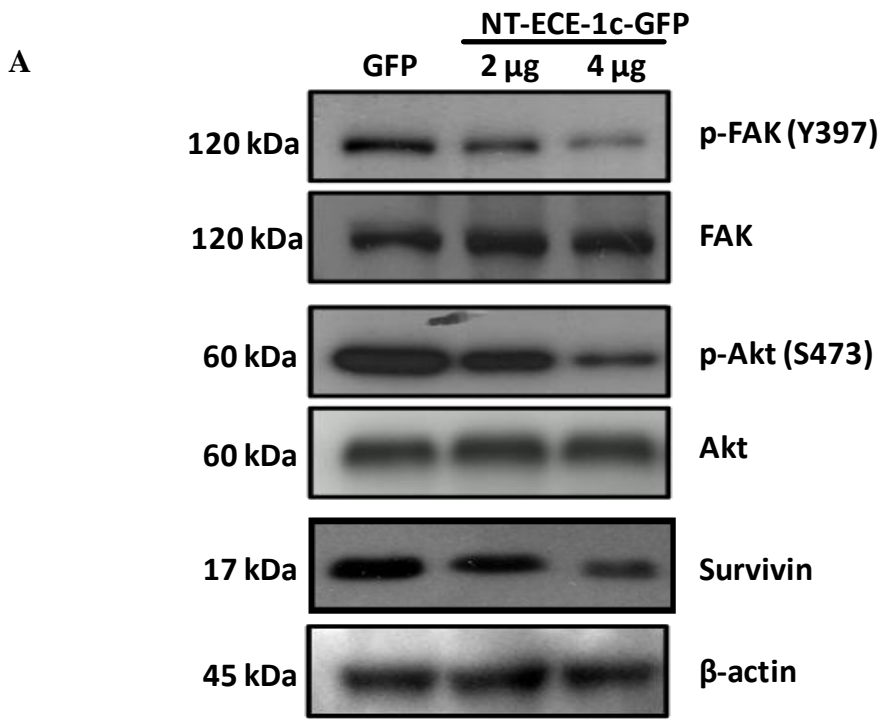
antiapoptótica survivina (Figura 24 Anexos) y una consiguiente disminución en la viabilidad celular evaluada a las 24 y 48 h post transfección (Figura 24B Anexos). También se evidenció que la sobreexpresión de esta construcción disminuyó la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon, evaluada mediante un ensayo de transwell (Figura 24C Anexos).

Como hasta la fecha no existen antecedentes sobre la localización subcelular de ECE-1c en células de cáncer de colon, se decidió utilizar esta construcción NT-ECE-1c-GFP y evaluar cual es su localización en las células de cáncer de colon DLD-1. Teniendo en consideración el efecto nocivo de la proteína de fusión sobre la viabilidad celular, se transfectó una mínima cantidad de plásmido (0,5 µg) y se evaluó su localización mediante microscopía confocal tras 24 h post transfección. En Figura 25 Anexos se esquematiza la organización de la proteína nativa en la membrana plasmática en donde la proteína se organiza con su región catalítica C-terminal hacia el espacio extracelular, mientras que en vesículas esta región queda hacia el interior de la misma, permitiendo que al fusionarse con la membrana plasmática la región catalítica se proyecte hacia el exterior de la célula.

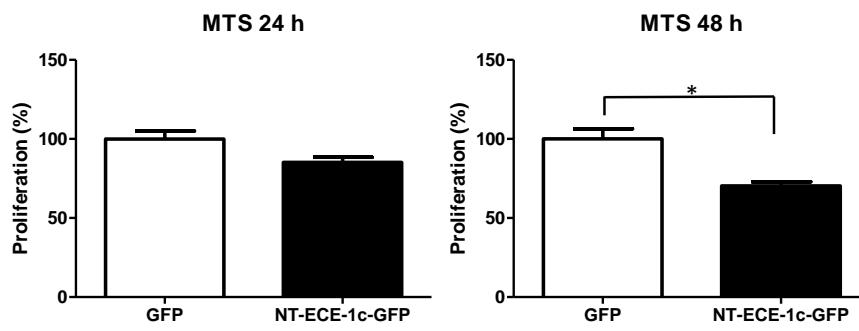
Como se observa en Figuras 24B y 24C Anexos, la localización de la construcción NT-ECE-1c-GFP fue principalmente perinuclear y citoplasmática, con un patrón vesiculado, muy similar a lo descrito para la proteína ECE-1c endógena en células epiteliales [71, 79].

Una vez corroborado que la construcción NT-ECE-1c-GFP posee la misma localización subcelular que la proteína endógena, decidimos evaluar si esta construcción es capaz de responder y cambiar su localización tal como lo hace la proteína completa.

Está descrito que la fosforilación de ECE-1 por PKC es capaz de generar un cambio en la localización, promoviendo que la proteína se destine hacia la membrana plasmática, lo que además genera una mayor secreción de ET-1 al medio extracelular [78, 96].



B



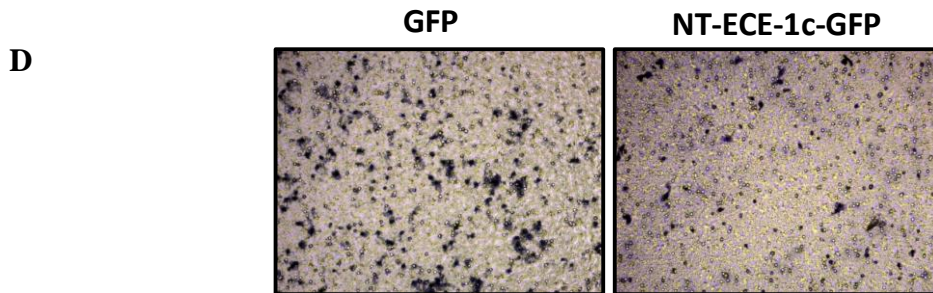
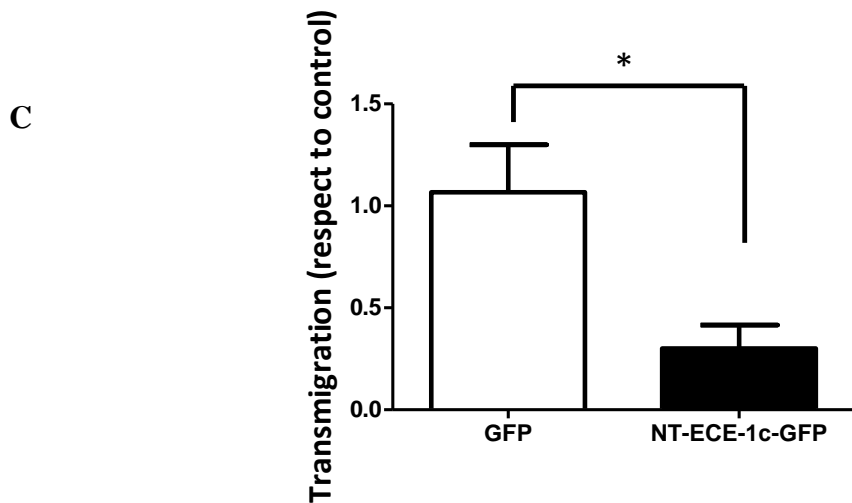
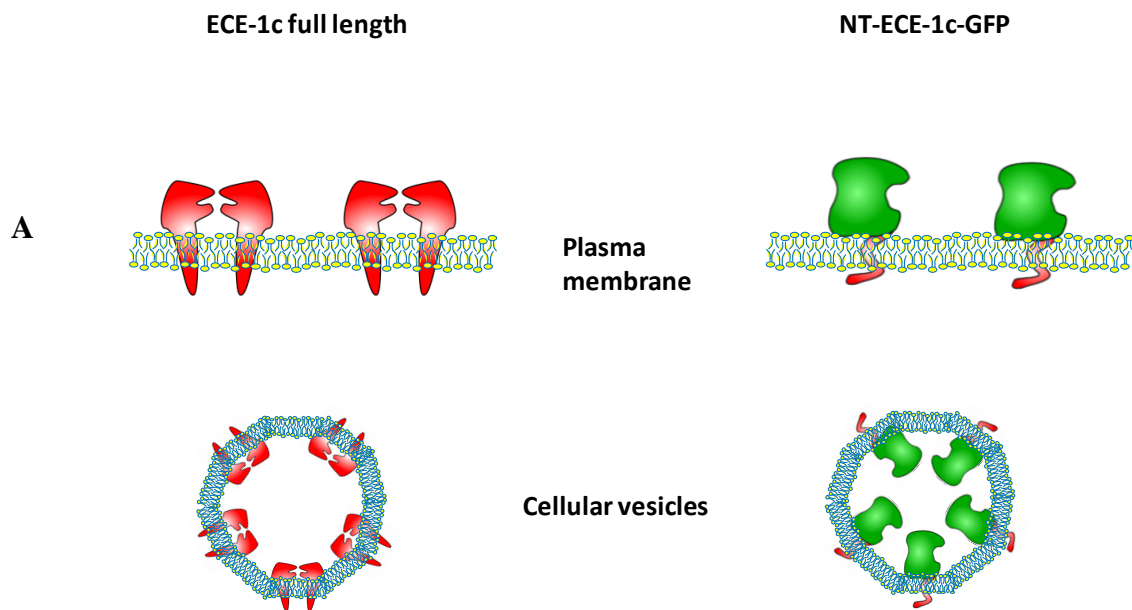
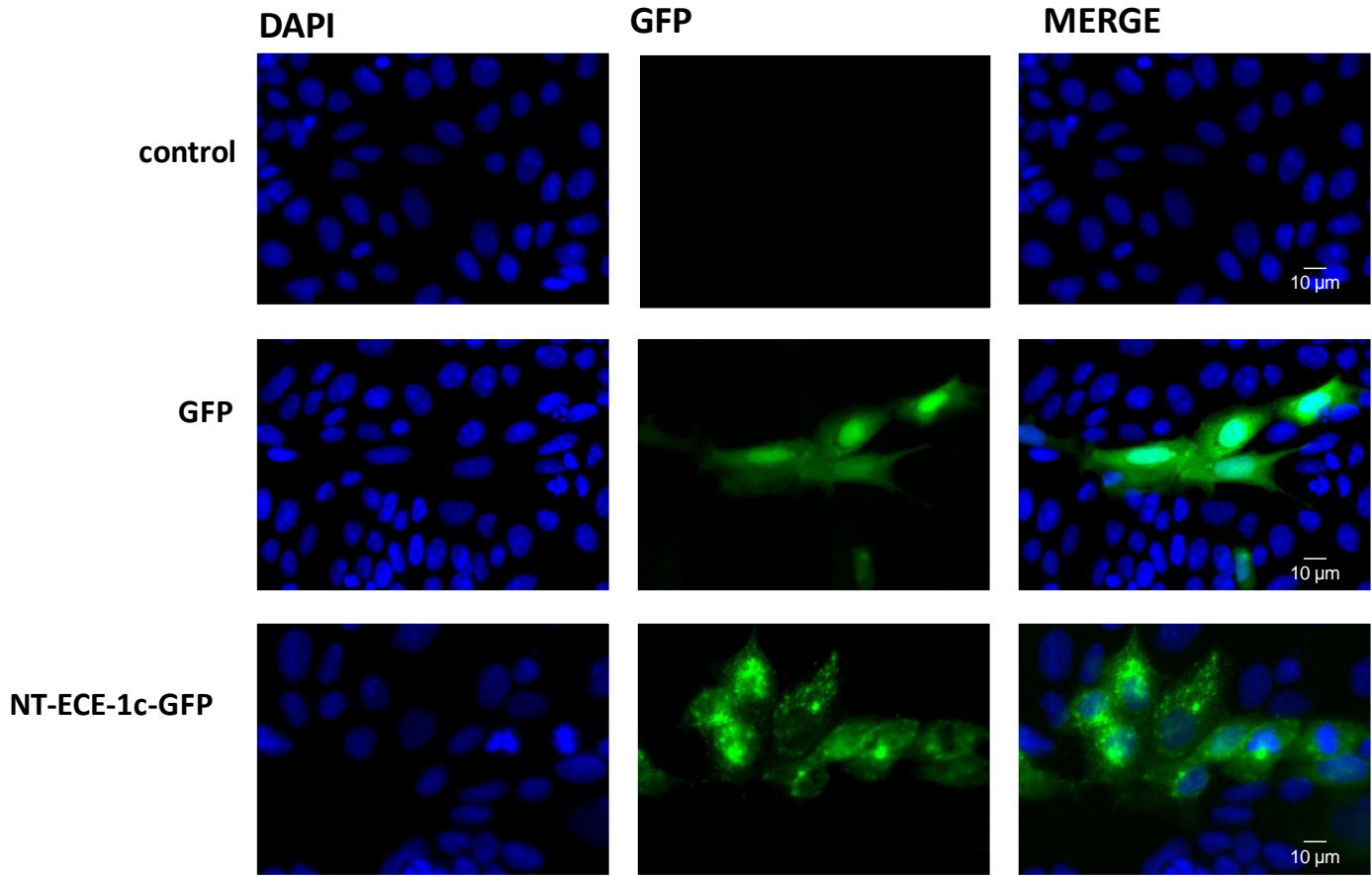


Figura 24 Anexo. Efectos de la expresión de NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon DLD-1 (A) Células DLD-1 fueron transfectadas de manera transitoria con el plásmido pEGFP-N1 codificante para GFP o la construcción NT-ECE-1c-GFP, y 24 h después se evaluó la activación de Akt y FAK, y los niveles de survivina mediante western blot. (B) Aproximadamente 6×10^5 células DLD-1 fueron sembradas en placas de 6 cm y 24 h después fueron transfectadas con el plásmido que codifica para la construcción NT-ECE-1c-GFP o el control GFP usando $2 \mu\text{g}$ de plásmido. 24 h después la proliferación celular fue evaluada en los tiempos indicados mediante la técnica de MTS. (C) Utilizando las mismas condiciones que en B se evaluó la migración celular mediante ensayo de transwell 24 h post transfección, permitiendo la migración por 8 horas. Pasado el tiempo las células fueron teñidas con cristal violeta 0,5% en metanol. Se contaron 8 campos del transwell y se grafica el cambio respecto al control Mock (GFP). (D) Se muestra un campo representativo para cada condición.

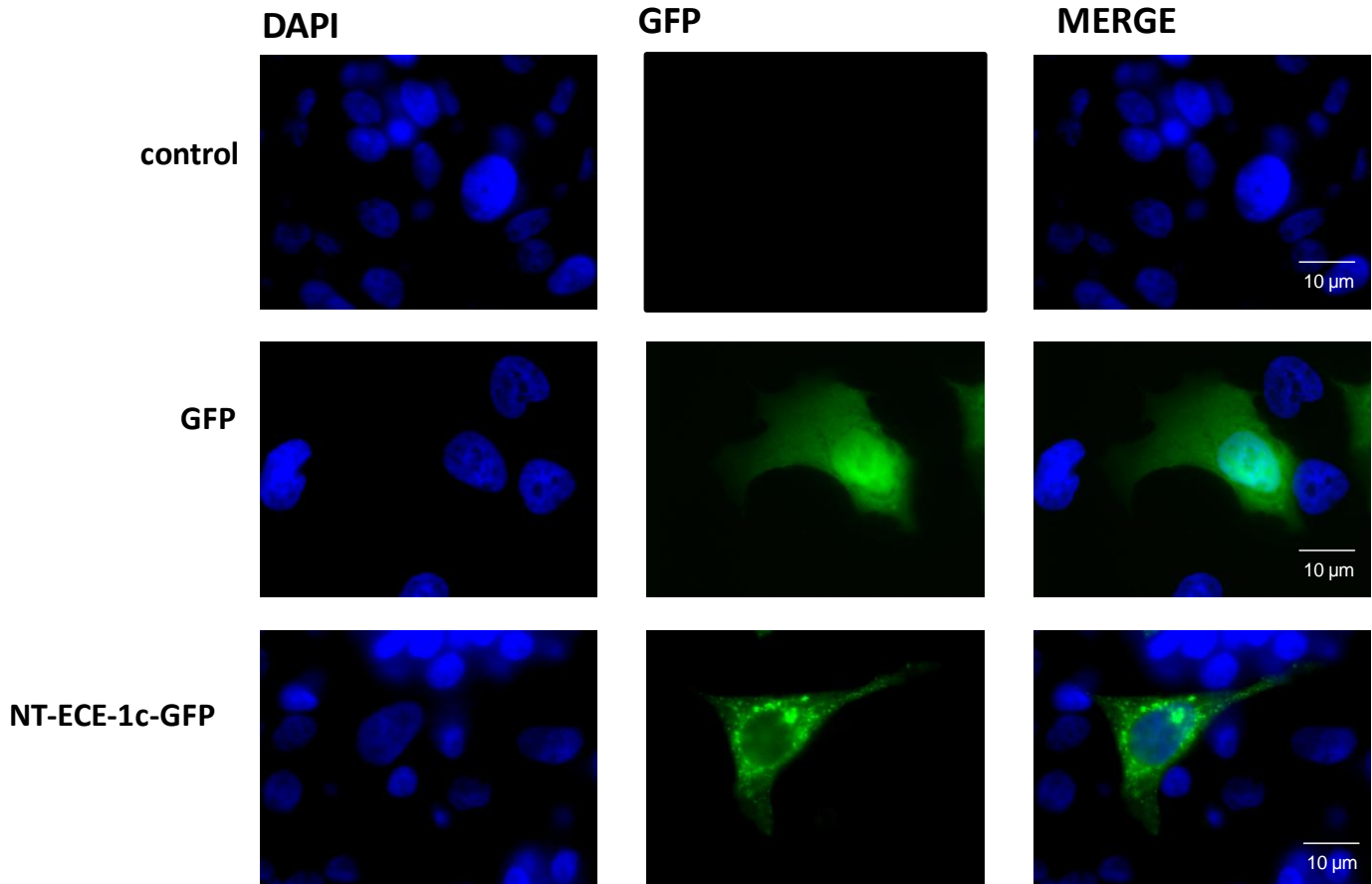
Se evaluó entonces la localización de la construcción NT-ECE-1c-GFP en las células de cáncer de colon luego de estimular la activación de PKC usando el éster de forbol 4β -TPA. Como se observa en la Figura 24D Anexos, el tratamiento con 4β -TPA genera un cambio en la localización de NT-ECE-1c-GFP, promoviendo una localización cercana a la membrana plasmática en comparación al control sin tratar. Esto se observó más claramente en los insertos en donde se pudo evidenciar una acumulación de la marca de GFP en la zona inmediatamente adyacente a la membrana plasmática. Utilizando el software Image J se cuantificó la marca de GFP en las células trazando una línea desde el núcleo hasta el límite de la célula. El análisis se muestra en Figura 25E Anexos, el cual sugiere que existe una mayor marcación de NT-ECE-1c en la zona cercana a la membrana plasmática en las células estimuladas con 4β -TPA, mientras que las células no estimuladas presentar una marcación preferentemente en las zonas cercanas al núcleo. Interesantemente, esta marca generalmente se encontró solo a un costado del núcleo y en una distribución vesiculada, lo que sugiere que esta marca se concentró en el RE y vías de destinación de proteínas a membranas.



B

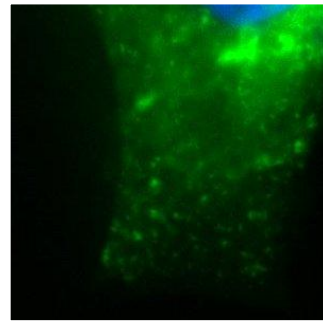
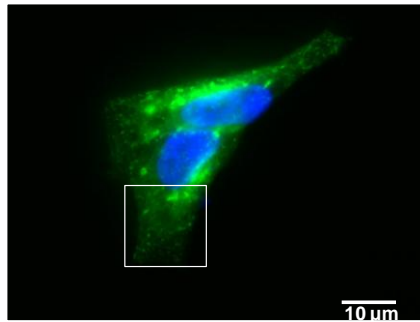
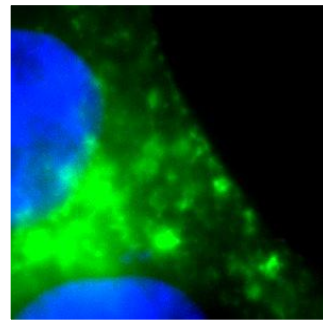
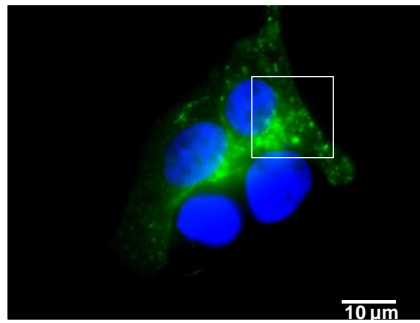


C

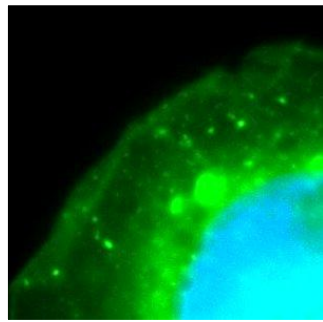
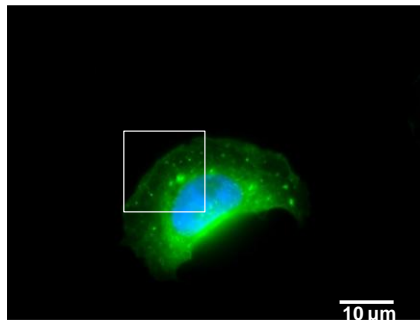
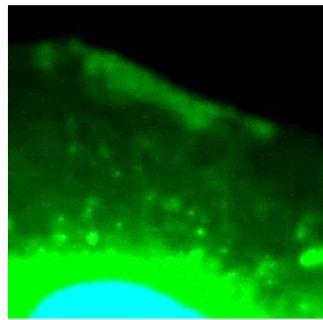
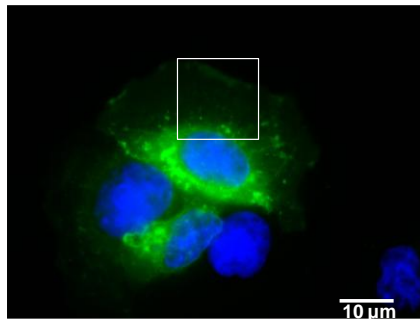


D

Untreated



4β-TPA



E

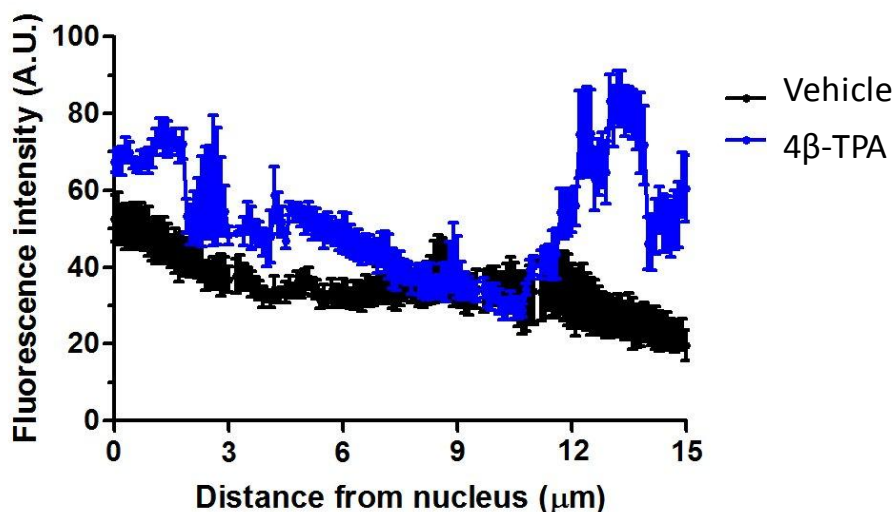


Figura 25 Anexo. Caracterización de la construcción NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon. (A) Dibujo esquemático de la organización de ECE-1c y la construcción NT-ECE-1c-GFP al ser expresado en células. Se muestra la localización esperada en la membrana plasmática (arriba) y en vesículas celulares (abajo). (B) Células DLD-1 fueron transfectadas con el plásmido codificante para GFP o para la construcción NT-ECE-1c-GFP, posteriormente las células se fijaron y se evaluó la localización de ambas proteínas a las 24 h utilizando microscopía confocal. (C) La misma configuración mostrada en (B), pero viendo una sola célula y a mayor aumento. (D) Células DLD-1 transfectadas con el plásmido codificante para NT-ECE-1c-GFP fueron tratadas con el éster de forbol 4 β-TPA por 15 min. Pasado el tiempo, las células fueron fijadas y la localización de la construcción NT-ECE-1c-GFP fue evaluada mediante microscopía confocal. (E) Análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia de GFP en las células en (D). Usando el software Image J se cuantificó la intensidad de marca del GFP a lo largo de la célula, desde el núcleo hasta el límite exterior de la membrana plasmática. La figura representa un promedio de 20 células de 2 experimentos independientes.

Si bien la localización subcelular de la construcción NT-ECE-1c-GFP responde de manera similar a la proteína endógena, de acuerdo a datos de la literatura, y resultados de nuestro laboratorio confirman que su estabilidad también responde de manera similar a la proteína endógena [21], es posible que el efecto negativo de NT-ECE-1c-GFP sobre los diversos parámetros celulares estudiados como activación de FAK y Akt, proliferación y migración celular no dependen de la región N-terminal de ECE-1c, sino de un efecto artefactual de la excesiva expresión de GFP y su localización en la membrana plasmática, lo cual podría tener efectos negativos sobre algunas vías de señalización relacionadas con proliferación celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular y transfecciones

Para el desarrollo de esta tesis se utilizarán como modelo la línea celular humana DLD-1. Estas células son derivadas de adenocarcinoma de colon y presentan un grado C de acuerdo a la clasificación de Duke (<http://www.atcc.org/>). Son células adherentes, con mediana capacidad migratoria y formación de tumores, lo que permite el desarrollo de experimentos que aborden esta capacidad en las células. Adicionalmente se utilizarán en casos específicos las líneas HT-29US y HT-29ATCC que representan respectivamente una etapa más avanzada, y una más temprana en el desarrollo tumoral, y la línea humana embrionaria HEK-293T para los experimentos de empaquetamiento de partículas virales.

Las línea celular DLD-1 fue mantenida en medio RPMI 1640, y las líneas HT29 US, HT-29 ATCC y HEK-293T en medio DMEM-HG suplementado al 10% con suero fetal de bovino (SFB, HyClone Laboratories Inc) en presencia de los antibióticos penicilina (100UI/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera húmeda y una presión parcial de CO₂ de 5%. Para las transfecciones se utilizó Lipofectamina 2000 (Life Technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los plásmidos usados fueron pLVX.Mock y pLVX.ECE-1c.

5.2 SDS-PAGE e Immunoblot

Extractos proteicos fueron obtenidos a partir de los cultivos celulares. Se comenzó por retirar el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) en frío y luego extraídas con 600 µl de PBS conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (Benzamidina 10 µg/mL, Antipaina 2 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y Caliculina A 50 µg/mL). Se centrifugó por 4 min a 2300 x g a 4°C, y se eliminó el sobrenadante. Las células fueron lisadas mediante sonicación en tampón de sonificado (Hepes 0.2 mM pH 7.4 SDS 0.1%, Benzamidina 10 µg/mL, Antipaina 2 µg/mL,

Leupeptina 1 µg/mL, PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50mM). Posteriormente, se midió la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Luego se tomó 50 µg de proteínas se denaturaron a 95°C por 5 min en tampón Laemmli (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 100 mM y azul de bromofenol 0.01%). Las muestras se separaron por electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida en tampón de corrida (Tris 25 mM pH 8.3, Glicina 0.23 M y SDS 0.1%). Después de la separación electroforética, las proteínas se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH 8.3, Glicina 0.23 M y Metanol 20%) a 100 V por 75 min. La membrana fue teñida con una solución de Rojo Ponceau (Ponceau 0.3% en ácido acético 0.5%) para verificar la correcta transferencia de las proteínas. Luego, todas las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con leche descremada (Svelty, Nestlé) al 5% en PBS, con excepción de aquellas en las que se analizaron proteínas fosforiladas que se bloquearon en BSA 5% en PBS-T (Tris 20.7 mM, pH 8.4, NaCl 72.3 mM y Tween 20 0.1%). Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpo anti β-actina (Santa Cruz), anti ECE-1 (Abcam), anti Akt y p-Akt (Cell Signaling), anti FAK y p-FAK (Santa Cruz) y anti Survivina (R&D systems) en agitación a 4°C. Se lavó 3 veces con PBS-T por 5 min y se incubó en agitación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conejo o cabra acoplado a HRPO (1:3500) en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS-T. La detección se realizó mediante el sistema EZ-ECL incubando por 5 min con el reactivo quimioluminiscente EZ-ECL (Biological Industries) y reveladas utilizando los film CL-Xposure™ Film (Thermo Scientific, Rockford).

5.3 Ensayo de viabilidad MTS

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^3 células por pocillo. Después de 24h las células fueron tratadas con ET-1, SM-19712, BQ-123, LY-294002 o vehiculo, a las concentraciones indicadas e incubadas por 24-72 h. La viabilidad fue medida utilizando el kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), según las

indicaciones del proveedor. Se agregaron 20µL del reactivo MTS® en cada pocillo y las células se incubaron durante 3h. Luego se midió la absorbancia del producto (sal de formazan) espectrofotométricamente a 490 nm. La absorbancia es proporcional al número de células vivas en cada pocillo.

5.4 Ensayo de viabilidad por tinción vital con azul tripán

2×10^6 células se sembraron en placa de 10 cm en medio completo. Pasado el tiempo de estudio las células se lavaron dos veces con pbs, luego se tripsinizaron y tiñeron por 1 minuto usando azul tripán. Posteriormente las células fueron contabilizadas usando el equipo LUNA automated cell counter de Logos Biosystems.

5.5 Ensayo de Migración por transwell

Se sembró 3.5×10^4 células en el transwell de 6.5 mm de diámetro que poseen una membrana de policarbonato con poros de 8 µm, previamente cubiertos por el lado exterior con 100 µl de fibronectina (2 µg/ml) por 16 h a 4°C. Se dejó migrar las células en ausencia de suero por 8 h en la estufa de cultivo, tiempo después del cual, las células se fijaron y tiñeron con una solución de cristal violeta (cristal violeta 0.1 % en metanol 20 %) diluida 1:5 en NaCl 0.15M durante 1 h. Luego, los transwell se lavaron 3 veces con agua destilada y se eliminaron las células que no migraron (células que se encuentran en la parte interior del transwell). Para el análisis de los resultados, se contaron sólo las células que migraron y lograron atravesar la membrana porosa. Se contaron 10 campos por cada transwell.

5.6 Ensayo de cierre de herida

Se sembraron 1×10^3 células en placa de 24 pocillos en medio completo por 24 h. Posteriormente con la ayuda de una punta de micropipeta se realizó una “herida” sobre la monocapa de células arrastrando la micropipeta a través del pocillo, formando un espacio sin células en el centro del pocillo. Se lavó una vez con PBS y se agregó medio completo. Posteriormente se tomaron 4

fotografías de cada pocillo para establecer el ancho de la herida a tiempo 0h. Se dejó a las células migrar por aproximadamente 16 h y finalmente se tomaron las fotografías a tiempo final. Las imágenes fueron procesadas usando el software ImageJ.

5.7 Actividad de metaloproteasas mediante zimografía

Las células se sembraron en placas de 10 cm a una confluencia de 60-70%, al día siguiente fueron privadas de suero por 16 hr. Posteriormente, se colectó el sobrenadante en tubos eppendorf de 1 mL, los cuales fueron concentrados en un SpeedVac. Las muestras fueron incubadas en tampón no reductor (Tris HCl 0,4 M [pH 6.8], conteniendo 5% de SDS, 20% de glicerol y 0,03% azul de bromofenol) por 30 min. Se cargó 30-50 µg de proteína en los geles de poliacrilamida al 8%, copolimerizado con gelatina (1 mg/mL). Luego de la electroforesis, se incubó el gel en Triton X-100 al 2,5% para retirar el SDS. Posteriormente, el gel fue incubado por 24 hr a 37°C en el tampón de activación (Tris HCl 150 mM [pH 7.5], NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM y NaN₃ 0,02%). Para visualizar la degradación de la gelatina, producto de la activación de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, se tiñó el gel con Azul de Coomassie al 2,5%. La degradación fue observada como una banda blanca que hace contraste con el azul de la tinción.

5.8 Ensayo de invasión por Matrigel

Se sembró 5×10^5 células en un pocillo de matrigel (Biocoat Matrigel Invasion Chamber, BD) y en el medio de cultivo se agregaron los tratamientos indicados previamente y se incubaron los pocillos por 18 h en la estufa de cultivo. Una vez finalizado el tiempo las células se lavaron con PBS frío y posteriormente fueron fijadas usando p-formaldehído al 4% en buffer PIPES 100mM pH 6,8 (40 mM KOH, 2 mM EGTA y 2 mM MgCl₂) por 30 min. Posteriormente los núcleos se tiñeron usando DAPI 0,5 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se cortaron las membranas del pocillo con bisturí y se montaron en portaobjetos usando el reactivo de

montaje Prolong (Thermo Fisher Scientific). Finalmente se obtuvieron las imágenes usando microscopia de epifluorescencia.

5.9 Formación de colonias en agar blando

En una placa de 6 pocillos se agregaron 3 mL de una solución de agar nutrientes, compuesta de 20% agar (Bacto agar al 2,5%) y 80% de mix nutrientes (25% Medio 2X, 12,5% Suero fetal bobino y 62,5% Medio 1X). Luego sobre esa capa se sembraron 2500 células en una solución de 0,25 mL de suspensión de células y 0,5 mL de agar nutrientes. Se les agregó medio cada 3 días hasta el momento de la tinción con cristal violeta al 0,005% en metanol.

5.10 Formación de tumores in vivo

Las células DLD-1 fueron sembradas en placas de 10 cm y medio completo hasta alcanzar una confluencia de 60-70%, luego fueron tripsinizadas y resuspendidas en suero fisiológico (NaCl 0,9% v/v). Una suspensión de 150 μ L conteniendo 2×10^6 células fue inoculada de manera subcutánea con una jeringa tuberculina, en un costado del lomo de ratones NOD/SCID hembras, de 6 a 8 semanas de vida. Los ratones fueron puestos en grupos de 3 ratones por jaula con agua y comida *ad libitum*. El crecimiento del tumor fue evaluado cada 3 o 4 días desde la primera medición, mediante el uso de un caliper digital. Pasadas 4 semanas desde la primera medición los ratones fueron sacrificados usando una mezcla de ketamina/xilasina y posterior dislocación cervical. Los tumores fueron extraídos y posteriormente fotografiados para su medición final.

5.11 Microscopía confocal

Luego de la transfección, se sembraron 10×10^3 células sobre covers en placas de 24 pocillos. Al día siguiente las células se lavaron con PBS frío y posteriormente fueron fijadas usando p-formaldehído al 4% en buffer PIPES 100mM pH 6,8 (40 mM KOH, 2 mM EGTA y 2 mM $MgCl_2$) por 30 min. Posteriormente los núcleos se tiñeron usando DAPI 0,5 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) y se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente los cover se montaron usando el reactivo de montaje

Prolong (Thermo Fisher Scientific), y se dejó secar en oscuridad. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Olympus-IX81 DSU Spinning Disk) y procesadas usando el programa ImageJ.

5.12 Análisis Estadístico

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces por separado. Los datos se representan como promedio \pm S.E.M. La significancia estadística se analizó por el test de Student no pareado para la comparación de dos grupos dados y el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones entre los distintos grupos, con un post-test de Dunn. Para el análisis de los datos, se consideró estadísticamente significativo un valor de $P \leq 0,05$.

6. Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
3. Chiang AC, Massague J: **Molecular basis of metastasis**. *N Engl J Med* 2008, **359**(26):2814-2823.
4. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W: **Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration**. *Mutat Res* 2011, **728**(1-2):23-34.
5. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression**. *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(6):442-454.
6. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies**. *Current opinion in cell biology* 2003, **15**(6):740-746.
7. Lamouille S, Xu J, Derynck R: **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition**. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014, **15**(3):178-196.
8. Zeisberg M, Neilson EG: **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions**. *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(6):1429-1437.
9. Yao D, Dai C, Peng S: **Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation**. *Molecular cancer research : MCR* 2011, **9**(12):1608-1620.
10. Grady WM: **Genetic testing for high-risk colon cancer patients**. *Gastroenterology* 2003, **124**(6):1574-1594.
11. Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I, Birchmeier W, Schlag PM: **MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis**. *Nat Med* 2009, **15**(1):59-67.

12. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW: **Hereditary and familial colon cancer.** *Gastroenterology* 2010, **138**(6):2044-2058.
13. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC: **Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways.** *Cancer Res* 2003, **63**(3):728-734.
14. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC: **Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer.** *Lancet* 2003, **362**(9379):205-209.
15. Mosimann C, Hausmann G, Basler K: **Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(4):276-286.
16. MacDonald BT, Tamai K, He X: **Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.** *Dev Cell* 2009, **17**(1):9-26.
17. Ruzzene M, Pinna LA: **Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells?** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1804**(3):499-504.
18. Ponce DP, Maturana JL, Cabello P, Yefi R, Niechi I, Silva E, Armisen R, Galindo M, Antonelli M, Tapia JC: **Phosphorylation of AKT/PKB by CK2 is necessary for the AKT-dependent up-regulation of beta-catenin transcriptional activity.** *J Cell Physiol* 2011, **226**(7):1953-1959.
19. Ponce DP, Yefi R, Cabello P, Maturana JL, Niechi I, Silva E, Galindo M, Antonelli M, Marcelain K, Armisen R *et al*: **CK2 functionally interacts with AKT/PKB to promote the beta-catenin-dependent expression of survivin and enhance cell survival.** *Mol Cell Biochem* 2011, **356**(1-2):127-132.
20. Yefi R, Ponce DP, Niechi I, Silva E, Cabello P, Rodriguez DA, Marcelain K, Armisen R, Quest AF, Tapia JC: **Protein kinase CK2 promotes cancer cell viability via up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and enhanced prostaglandin E2 production.** *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(11):3167-3175.
21. Niechi I, Silva E, Cabello P, Huerta H, Carrasco V, Villar P, Cataldo LR, Marcelain K, Armisen R, Varas-Godoy M *et al*: **Colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability.** *Oncotarget* 2015, **6**(40):42749-42760.
22. Rosano L, Spinella F, Bagnato A: **Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.** *Nature reviews Cancer* 2013, **13**(9):637-651.
23. Denault JB, Claing A, D'Orleans-Juste P, Sawamura T, Kido T, Masaki T, Leduc R: **Processing of proendothelin-1 by human furin convertase.** *FEBS Lett* 1995, **362**(3):276-280.
24. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R: **Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family.** *FEBS Lett* 2002, **524**(1-3):43-48.
25. Okada K, Miyazaki Y, Takada J, Matsuyama K, Yamaki T, Yano M: **Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **171**(3):1192-1198.
26. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: **Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.** *Nature* 1990, **348**(6303):732-735.
27. Turner AJ, Tanzawa K: **Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1997, **11**(5):355-364.
28. Skolovsky M, Galron R, Kloog Y, Bdolah A, Indig FE, Blumberg S, Fleminger G: **Endothelins are more sensitive than sarafotoxins to neutral endopeptidase: possible physiological significance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(12):4702-4706.
29. Masaki T: **Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems.** *Endocr Rev* 1993, **14**(3):256-268.

30. Rubanyi GM, Polokoff MA: **Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology.** *Pharmacol Rev* 1994, **46**(3):325-415.
31. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: **A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.** *Nature* 1988, **332**(6163):411-415.
32. Matsumura Y, Hisaki K, Takaoka M, Morimoto S: **Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1.** *European journal of pharmacology* 1990, **185**(1):103-106.
33. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S, Clouthier DE, Yanagisawa M: **Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development.** *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(10):1373-1382.
34. Barni T, Fantoni G, Gloria L, Maggi M, Peri A, Balsi E, Grappone C, Vannelli GB: **Role of endothelin in the human craniofacial morphogenesis.** *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* 1998, **18**(4):183-194.
35. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, Maemura K, Nagai R, Ishikawa T, Yazaki Y: **Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(1):293-300.
36. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M: **Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice.** *Development* 1998, **125**(5):813-824.
37. Rosano L, Bagnato A: **Endothelin therapeutics in cancer: Where are we?** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2016, **310**(6):R469-475.
38. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD: **Endothelin-1 gene regulation.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011, **25**(1):16-28.
39. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P: **The endothelin axis: emerging role in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(2):110-116.
40. McKenzie GA, Hinsley EE, Hunter K, Lambert DW: **The endothelin axis in head and neck cancer: a promising therapeutic opportunity?** *J Oral Pathol Med* 2013.
41. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F: **Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system.** *Am J Pathol* 2000, **157**(6):1863-1874.
42. Liakou P, Tepetes K, Germenis A, Leventaki V, Atsaves V, Patsouris E, Roidis N, Hatzitheophilou K, Rassidakis GZ: **Expression patterns of endothelin-1 and its receptors in colorectal cancer.** *J Surg Oncol* 2012, **105**(7):643-649.
43. Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA: **The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(9):903-910.
44. Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I, Loizidou M: **Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines.** *Br J Surg* 2007, **94**(1):106-112.
45. Maneenil G, Thatrimontrichai A, Janjindamai W, Dissaneevate S: **Effect of bosentan therapy in persistent pulmonary hypertension of the newborn.** *Pediatrics and neonatology* 2017.
46. Bakrania B, Duncan J, Warrington JP, Granger JP: **The Endothelin Type A Receptor as a Potential Therapeutic Target in Preeclampsia.** *International journal of molecular sciences* 2017, **18**(3).
47. Carducci MA, Manola J, Nair SG, Liu G, Rousey S, Dutcher JP, Wilding G: **Atrasentan in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma: A Phase 2 Trial of the ECOG-ACRIN**

- Cancer Research Group (E6800).** *Clinical genitourinary cancer* 2015, **13**(6):531-539 e531.
48. Oudard S: **Docetaxel: time to reassess combination strategies.** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(9):800-801.
 49. Bagnato A, Rosano L: **The endothelin axis in cancer.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(8):1443-1451.
 50. Yildirim Y, Gunel N, Coskun U, Sancak B, Bukan N, Aslan S, Cetin A: **Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer.** *Int Immunopharmacol* 2008, **8**(8):1119-1123.
 51. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR: **Cell migration at a glance.** *Journal of cell science* 2005, **118**(Pt 21):4917-4919.
 52. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD: **Environmental sensing through focal adhesions.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(1):21-33.
 53. Puklin-Faucher E, Sheetz MP: **The mechanical integrin cycle.** *Journal of cell science* 2009, **122**(Pt 2):179-186.
 54. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM: **Random versus directionally persistent cell migration.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(8):538-549.
 55. Small JV, Stradal T, Vignall E, Rottner K: **The lamellipodium: where motility begins.** *Trends Cell Biol* 2002, **12**(3):112-120.
 56. Pollard TD, Borisy GG: **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.** *Cell* 2003, **112**(4):453-465.
 57. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
 58. Guo W, Giancotti FG: **Integrin signalling during tumour progression.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, **5**(10):816-826.
 59. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ: **Focal adhesion regulation of cell behavior.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1692**(2-3):103-119.
 60. Wehrle-Haller B, Imhof B: **The inner lives of focal adhesions.** *Trends Cell Biol* 2002, **12**(8):382-389.
 61. Zhao X, Guan JL: **Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis.** *Adv Drug Deliv Rev* 2011, **63**(8):610-615.
 62. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT: **Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains.** *J Cell Biol* 1995, **130**(5):1181-1187.
 63. Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ: **Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase.** *Cell* 2007, **129**(6):1177-1187.
 64. Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, Schlaepfer DD: **Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells.** *Cancer Res* 2001, **61**(19):7079-7090.
 65. Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ: **Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion.** *Cancer* 2002, **95**(12):2508-2515.
 66. Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T, Hamaguchi M: **A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor-alpha-dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1.** *Cancer Res* 2006, **66**(13):6778-6784.
 67. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T: **Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.** *Mol Cell Biochem* 2003, **253**(1-2):269-285.
 68. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y: **Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**(23):3853-3868.

69. MacLeod KJ, Husain RD, Gage DA, Ahn K: **Constitutive phosphorylation of human endothelin-converting enzyme-1 isoforms.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(48):46355-46363.
70. Orzechowski HD, Gunther A, Menzel S, Zimmermann A, Funke-Kaiser H, Real R, Subkowski T, Zollmann FS, Paul M: **Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells.** *Mol Pharmacol* 2001, **60**(6):1332-1342.
71. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, Rohrbacher E, Mongiat F, Pinet F, Corvol P, Tougard C: **Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms.** *Journal of cell science* 1999, **112 Pt 18**:3115-3125.
72. Hoang MV, Sansom CE, Turner AJ: **Mutagenesis of Glu403 to Cys in rabbit neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) creates a disulphide-linked homodimer: analogy with endothelin-converting enzyme.** *Biochem J* 1997, **327 (Pt 3)**:925-929.
73. Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K: **Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11.** *Biochem J* 1996, **315 (Pt 3)**:863-867.
74. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB: **A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization.** *Eur J Biochem* 1999, **264**(2):341-349.
75. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM: **Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations.** *Biochem J* 1997, **328 (Pt 3)**:871-877.
76. Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougard C: **Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(1):545-555.
77. Azarani A, Boileau G, Crine P: **Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells.** *Biochem J* 1998, **333 (Pt 2)**:439-448.
78. Kuruppu S, Smith AI: **Endothelin Converting Enzyme-1 phosphorylation and trafficking.** *FEBS Lett* 2012, **586**(16):2212-2217.
79. Dawson LA, Maitland NJ, Berry P, Turner AJ, Usmani BA: **Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 in human prostate cancer.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, **231**(6):1106-1110.
80. Cataldo R: **Participación de la vía Wnt/B-catenina en la regulación de la expresión de la ECE-1c y su rol en el fenotipo tumoral invasivo en cancer de colon.** *Tesis Magister* 2010:
81. Lambert LA, Whyteside AR, Turner AJ, Usmani BA: **Isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) have opposing effects on prostate cancer cell invasion.** *Br J Cancer* 2008, **99**(7):1114-1120.
82. Berger Y, Dehmlow H, Blum-Kaelin D, KITAS EA, Loffler BM, Aebi JD, Juillerat-Jeanneret L: **Endothelin-converting enzyme-1 inhibition and growth of human glioblastoma cells.** *J Med Chem* 2005, **48**(2):483-498.
83. Siepmann M, Kumar S, Mayer G, Walter J: **Casein kinase 2 dependent phosphorylation of neprilysin regulates receptor tyrosine kinase signaling to Akt.** *PLoS One* 2010, **5**(10).

84. Sumitomo M, Iwase A, Zheng R, Navarro D, Kaminetzky D, Shen R, Georgescu MM, Nanus DM: **Synergy in tumor suppression by direct interaction of neutral endopeptidase with PTEN.** *Cancer Cell* 2004, **5**(1):67-78.
85. Daher Z, Noel J, Claing A: **Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity.** *Cell Signal* 2008, **20**(12):2256-2265.
86. Seo KW, Lee SJ, Kim YH, Bae JU, Park SY, Bae SS, Kim CD: **Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR-beta/Akt signaling pathway.** *PLoS One* 2013, **8**(8):e70437.
87. Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P: **Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(19):19683-19690.
88. Whiteside AR, Hinsley EE, Lambert LA, McDermott PJ, Turner AJ: **ECE-1 influences prostate cancer cell invasion via ET-1-mediated FAK phosphorylation and ET-1-independent mechanisms.** *Can J Physiol Pharmacol* 2010, **88**(8):850-854.
89. Li PL, Zhang X, Wang LL, Du LT, Yang YM, Li J, Wang CX: **MicroRNA-218 is a prognostic indicator in colorectal cancer and enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis by targeting BIRC5.** *Carcinogenesis* 2015.
90. Ligabue A, Marverti G, Liebl U, Myllykallio H: **Transcriptional activation and cell cycle block are the keys for 5-fluorouracil induced up-regulation of human thymidylate synthase expression.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e47318.
91. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M: **PI3K/Akt signalling pathway and cancer.** *Cancer Treat Rev* 2004, **30**(2):193-204.
92. Dunn KB, Heffler M, Golubovskaya VM: **Evolving therapies and FAK inhibitors for the treatment of cancer.** *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 2010, **10**(10):722-734.
93. Nitulescu GM, Margina D, Juzenas P, Peng Q, Olaru OT, Saloustros E, Fenga C, Spandidos D, Libra M, Tsatsakis AM: **Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review).** *International journal of oncology* 2016, **48**(3):869-885.
94. Del Re M, Arrigoni E, Restante G, Passaro A, Rofi E, Crucitta S, De Marinis F, Di Paolo A, Danesi R: **Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: The Role of Cancer Stem Cells.** *Stem cells* 2018.
95. Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI: **Applicability of green fluorescence protein in the study of endothelin converting enzyme-1c trafficking.** *Protein Sci* 2013, **22**(3):306-313.
96. Jafri F, Ergul A: **Phosphorylation of endothelin converting enzyme-1 isoforms: relevance to subcellular localization.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, **231**(6):713-717.
97. Xu J, E C, Yao Y, Ren S, Wang G, Jin H: **Matrix metalloproteinase expression and molecular interaction network analysis in gastric cancer.** *Oncology letters* 2016, **12**(4):2403-2408.
98. Johnson GD, Stevenson T, Ahn K: **Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(7):4053-4058.
99. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB: **Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(27):24540-24548.