



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**ROL DEL PÉPTIDO RELACIONADO A LA
HORMONA PARATIROIDEA (PTHrP) EN LA
ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y EN LA TRANSICIÓN
EPITELIO-MESÉNQUIMA DE CÉLULAS
TUMORALES INTESTINALES**

Pedro Matías Carriere

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**ROL DEL PÉPTIDO RELACIONADO A LA HORMONA
PARATIROIDEA (PTHrP) EN LA ANGIOGÉNESIS
TUMORAL Y EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-
MESÉNQUIMA DE CÉLULAS TUMORALES
INTESTINALES**

Pedro Matías Carriere

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

Prefacio

Esta Tesis Doctoral se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre 2017 y 2022. Con el aval de su directora, la Dra. Claudia Gentili, profesora de esta Universidad e investigadora independiente del Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y de su Co-directora, la Dra. Natalia Calvo, también docente de esta Universidad e investigadora adjunta del CONICET, esta tesis presenta resultados de investigación que no han sido presentados para otra titulación.

Lic. En Cs. Biológicas Pedro Matías Carriere

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)</p>
---	---

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por ofrecerme sus recursos humanos y técnicos necesarios para desarrollar este trabajo.

Al Dr. Ricardo Boland y a la Dra. Ana Russo de Boland, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de investigar.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la posibilidad de comenzar mi formación doctoral.

A la Dra. Emma Casanave por su apoyo en todo momento como directora del INBIOSUR.

A la Dra. Claudia Gentili por ser mi guía y consejera no solo en lo académico. Por toda su dedicación y compromiso de trabajo a la par de sus becarios. Por entender mis dificultades y fortalezas, escuchar mis propuestas y dudas con respeto, y permitirme analizar juntos cada paso hacia adelante.

A la Dra. Natalia Calvo por todo. Por su paciencia y por sus palabras. Por su escucha activa y siempre estar atenta a mis inquietudes. Por poder contar con su vasta experiencia en todo momento. Le estoy profundamente agradecido.

A Belén por haber conocido juntos personas, lugares y situaciones, por las charlas necesarias, las no necesarias y las pendientes. Por habernos puesto en el lugar del otro más de una vez, y darme ánimo cuando más lo necesité.

A la Dra. Julia Martin por sus consejos y apoyo en el inicio del doctorado.

Al Dr. Héctor Contreras por recibirme en su laboratorio y darme la posibilidad de aprender de todo su conocimiento y de un gran equipo como es el LOCyM.

Al Dr. Ariel Zwenger y a la Dra. Graciela Gigola por su predisposición con sus consejos y experiencia.

A las investigadoras y becarios del laboratorio de Química Biológica por lo ameno de lo cotidiano, la predisposición a la colaboración y el aprendizaje compartido.

A todo el equipo que conforma la cátedra de EyFCH por permitirme desarrollarme como docente.

A mis amigos, que están siempre a pesar de las ausencias y distancias, por aquellas charlas que sin pensarlo, han derivado en poder sobreponerme a los obstáculos y han construido en mí nuevas formas de ver.

A mis padres por ser mis mejores ejemplos de esfuerzo y amor. Por acompañarme en lo académico y en lo personal.

A mis dos hermanos Juan y Lucio, que como siempre, sepan que soy y seré incondicional con ellos en todo momento que me necesiten.

A Gise mi compañera, por su fortaleza y cariño, por el día a día, por los sueños juntos, por su amor...por vivir este tiempo de su hermosa vida conmigo.

A mi hijo Fausto, gracias por darme la motivación para ser cada día mejor y recordarme a diario la importancia y la belleza del descubrir.

A todos aquellos que destinen su tiempo para leer este trabajo con la intención de entender y también a todos aquellos que tal vez sin desear entenderlo, han contribuido sustancialmente para que pueda llevarse a cabo. A todos ellos... gracias.

*“Un comportamiento fenotípico
universal de todas las criaturas no es
sobresalir del entorno, sino mantenerse
lo más parecido posible a él”.*

Qin JH et al. Genes Dis. 2016, 4(1):16-18.

Resumen

El péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) está involucrado en la iniciación y progresión de distintos tumores. El rol de PTHrP en células de cáncer colorrectal (CCR) fue abordado en estos últimos años por las Dras. Gentili y Calvo directora y co-directora, respectivamente, de esta Tesis y a partir de los antecedentes generados, en este Trabajo se propuso investigar los efectos de PTHrP en la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (TEM) evaluando el comportamiento de las células tumorales y también su comunicación con su microambiente. Los resultados obtenidos revelan que PTHrP aumenta la expresión de los factores pro-angiogénicos VEGF, HIF-1 α , MMP-7 y MMP-9 en las células Caco-2 y HCT116 de CCR y promueve la angiogénesis asociada al tumor a través de VEGF. Estos efectos son mediados por las vías PI3K/Akt y ERK1/2. Previo al inicio de este Trabajo de Tesis se había confirmado que PTHrP induce la activación de β -catenina en estas células de CCR, evento vinculado a la plasticidad celular, por lo que se procedió seguidamente a explorar si PTHrP modula el programa de la TEM. Se observó que en las células HCT116, PTHrP disminuye la expresión de los marcadores epiteliales CK-18 y E-cadherina y aumenta la expresión de N-cadherina y ZEB-1, proteínas asociadas a un estado mesenquimal. Además el péptido favorece cambios morfológicos asociados a este estado. El medio condicionado proveniente de las células endoteliales HMEC-1 tratadas con PTHrP (MCE) disminuye la expresión de E-cadherina en las células HCT116 y favorece también un fenotipo mesenquimal sugiriendo que estos MCEs podrían participar de la TEM en las células de CCR. En este Trabajo de Tesis se halló que PTHrP modula la expresión de SPARC, una proteína asociada al fenotipo agresivo de CCR, en las células HCT116. El tratamiento de las células HMEC-1 con PTHrP incrementa la expresión de esta proteína y su secreción al medio extracelular. Además, SPARC exógeno en las células tumorales acentúa el efecto de PTHrP en la disminución de la expresión de E-cadherina y en el incremento de la migración celular. También PTHrP induce cambios en la expresión de microARNs relevantes en la TEM. El péptido administrado a un modelo *in vivo* promueve cambios morfológicos y moleculares que validan lo observado *in vitro*. Finalmente mediante un análisis bioinformático en muestras de pacientes con CCR se

observó que los marcadores modulados por PTHrP tanto *in vitro* como *in vivo* se vinculan con la progresión de la enfermedad. Los datos presentados en esta Tesis revelan los efectos de PTHrP en la modulación de la angiogénesis y la TEM del CCR y evidencian la importancia de los marcadores estudiados, provenientes del tumor y de su microambiente, en el desarrollo del fenotipo agresivo en los modelos experimentales de CCR empleados. Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto global que pretende aportar conocimientos con el fin de orientar en la identificación de marcadores en muestras de pacientes de CCR con potencial valor pronóstico, predictivo y/o con aplicabilidad en el diagnóstico precoz de esta enfermedad.

Abstract

Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) is involved in the initiation and progression of different tumors. The role of PTHrP in cells from colorectal cancer (CRC) has been addressed in the last years by Dr. Gentili and by Dr. Natalia Calvo director and co-director, respectively, of this Thesis and based on the background information generated, this Thesis work aimed to investigate the effects of PTHrP on angiogenesis and the epithelial-mesenchymal transition (EMT), evaluating the behavior of tumor cells and also their communication with tumor microenvironment. The results obtained reveal that PTHrP increases the expression of the pro-angiogenic factors VEGF, HIF-1 α , MMP-7 and MMP-9 in Caco-2 and HCT116 cells from CRC and also promotes tumor-associated angiogenesis through VEGF. These effects are mediated by PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. Before to start this Thesis, it had been confirmed that PTHrP induces the activation of β -catenin in these CRC cells, and since this event is linked to cell plasticity, then we explored whether PTHrP modulates the EMT program. We observed that in HCT116 cells, PTHrP decreases the expression of the epithelial markers CK-18 and E-cadherin and increases the expression of N-cadherin and ZEB-1, which are proteins associated with a mesenchymal state. In addition, the peptide favors morphological changes associated with this state. Conditioned medium from PTHrP-treated HMEC-1 endothelial cells (ECM) decreases E-cadherin expression in HCT116 cells and favors a mesenchymal phenotype, suggesting that these ECMs could participate in the EMT in CRC cells. In this Thesis Work it was found that in HCT116 cells PTHrP modulates the expression of SPARC, a protein associated with CRC aggressive phenotype. The treatment of HMEC-1 cells with PTHrP increases the expression of this protein and its secretion to the extracellular medium. Furthermore, exogenous SPARC treatment on tumor cells accentuates PTHrP effect on the downregulation of E-cadherin expression and in the increment of cell migration. PTHrP also induces changes in the expression of relevant microRNAs in EMT. The peptide administered to an *in vivo* model promotes morphological and molecular changes that validate the findings obtained *in vitro*. Finally, through a bioinformatic analysis in samples from CRC patients, we observed that the markers modulated by PTHrP both *in vitro* as *in*

vivo are linked to the progression of the disease. The data showed in this Thesis reveal the effects of PTHrP in the modulation of the angiogenesis and EMT program of CRC and show the importance of the studied markers from the tumor and its microenvironment in development of the aggressive phenotype in the experimental models of CRC employed. This work is part of a global project that aims to provide knowledge to help in the identification of markers in samples from CRC patients as potential candidates to be used in the detection of CRC at early stages and/or with prognostic/predictive value of this disease.

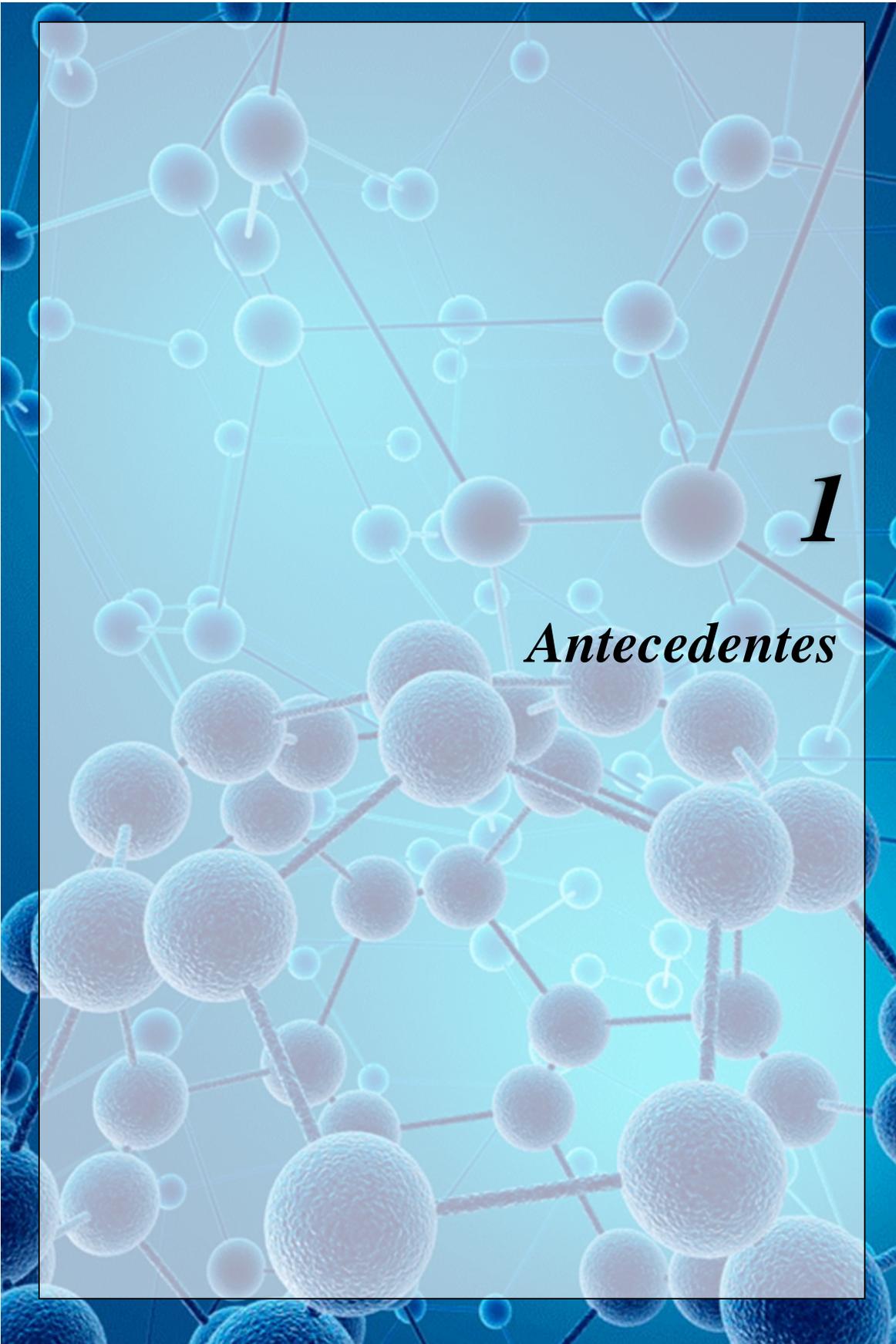
Índice

1. Antecedentes	16
1.1 PTHrP: su descubrimiento y acciones fisiológicas	16
1.2 Rol de PTHrP en el cáncer.....	21
1.3 El cáncer colorrectal	23
1.4 Progresión del cáncer colorrectal	26
1.5 El proceso de Angiogénesis	33
1.6 La transición epitelio-mesénquima.....	38
1.7 Vías de señalización asociadas a procesos protumorales	43
1.7.1. La vía de señalización de las MAPK.....	43
1.7.2 La vía de señalización de PI3K/Akt	46
1.7.3 microARNs como reguladores del cáncer	49
1.8 Antecedentes previos del tema al comenzar el Trabajo de Tesis Doctoral.....	52
2. Objetivos	57
2.1. Objetivo general	57
2.2 Objetivos específicos	57
3. Hipótesis	60
4. Materiales y Métodos	62
A- Modelos experimentales	62
A.1-Modelos <i>in vitro</i>: células tumorales intestinales y células endoteliales. Cultivo y tratamiento.....	62
A.2-Modelo <i>in vivo</i> de xenotrasplante de células HCT116.....	65
B- Métodos experimentales	66
B.1 Obtención de medios condicionados tumorales (MCT).....	66
B.2 Obtención de medios condicionados endoteliales (MCE)	67
B.3 Ensayos en células endoteliales para evaluar la angiogénesis <i>in vitro</i>	68
B.3.1 Tinción con cristal violeta.....	68
B.3.2 Prueba de exclusión del colorante azul de Tripano	68
B.3.3 Ensayo CellTiter-Blue®	68
B.3.4 Ensayo de migración de células endoteliales.....	69
B.3.5 Ensayo de formación de tubos.....	70

B.4-Tecnica de Western blot	71
B.4.1 Obtención de lisado celular	71
B.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	71
B.4.3 Electrotransferencia e Inmunoblotting.....	72
B.4.4 Remoción de anticuerpos de las membranas.....	73
B.4.5 Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.....	74
B.5 Inmunocitoquímica (ICQ)	74
B.6 Ensayo de cierre de herida y seguimiento morfológico en células tumorales	75
B.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	75
B.8 Inmunohistoquímica (IHQ)	76
B.9 Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc	77
B.10 RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real	78
B.11 Extracción de ARNs pequeños y síntesis de ADNc	79
B.12 RT-PCR cuantitativa con sondas TaqMan	80
B.13 Análisis estadístico	80
B.14 Analisis Bioinformático	81
5. Resultados	85
Capítulo 1: Rol de PTHrP en la Angiogénesis asociada al tumor	85
Sección 1: Estudio del efecto de PTHrP en la modulación de la expresión de factores proangiogénicos en células tumorales intestinales	87
1.1 PTHrP aumenta los niveles de ARNm de los factores implicados en la angiogénesis, VEGF, HIF-1 α , MMP-9 y MMP-7 en las líneas celulares Caco-2 y HCT 116.....	87
Sección 2: Estudio de eventos en las células endoteliales asociados a la angiogénesis tumoral bajo la acción de PTHrP	90
2.1 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan el número de células endoteliales	90
2.2 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan la capacidad migratoria de las células endoteliales	95
2.3 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP inducen la formación de estructuras tubulares en las células endoteliales	97
Sección 3: Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la angiogénesis tumoral modulada por PTHrP	99
3.1 PTHrP promueve la angiogénesis tumoral principalmente a través de VEGF	99

3.2 PTHrP aumenta los niveles de ARNm de VEGF, HIF-1 α y MMP-9 en las líneas celulares Caco-2 y HCT116 a través de las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/Akt	106
Sección 4: Estudio de la acción directa de PTHrP sobre las células endoteliales	111
4.1 El tratamiento directo con PTHrP aumenta la fosforilación de ERK1/2 y el número de células pero no estimula la migración ni la formación de tubos de células endoteliales... 111	
Sección 5: Ensayos <i>in vivo</i>	120
5.1 PTHrP aumenta la expresión de VEGF y el número de estructuras con características de vasos neoformados en xenoinjertos tumorales.....	120
Discusión del Capítulo 1	125
Capítulo 2: Rol de PTHrP en la Transición epitelio-mesénquima de células tumorales intestinales	131
Sección 1: Estudio de la modulación por PTHrP de la TEM en células tumorales intestinales	133
1.1 PTHrP modula la expresión de CK-18, E-cadherina, ZEB1, N-cadherina y favorece cambios morfológicos asociados con la TEM en células HCT116	133
1.2 PTHrP modula la expresión de SPARC y de E-cadherina de forma dependiente de la agresividad de las líneas de CCR	142
Sección 2: Estudio de la participación del microambiente tumoral en la modulación por PTHrP de la TEM en células tumorales intestinales	148
2.1 PTHrP actúa en las células endoteliales HMEC-1 modulando la expresión de SPARC y su liberación.....	148
2.2 El MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP induce cambios tempranos asociados al proceso de TEM en las células HCT116	150
2.3 SPARC potencia el efecto de PTHrP sobre la modulación de E-cadherina y la migración celular de las células HCT116.	155
Sección 3: Estudio del efecto de PTHrP en la modulación de microARNs vinculados a la TEM en el CCR	159
Sección 4: Ensayos <i>in vivo</i>	164
4.1. <i>PTHrP modula la expresión de marcadores de la TEM y cambios morfológicos asociados a este programa en xenotrasplantes de células HCT116</i>	164
Discusión del Capítulo 2	169
Capítulo 3: Análisis mediante la exploración de bases de datos de la implicancia clínica de los marcadores modulados por PTHrP y vinculados con la angiogénesis y la TEM del CCR	179
Sección 1: Estudio de genes sobreexpresados en pacientes con CCR asociados a la angiogénesis y a la TEM	180

Sección 2: Estudio mediante bases de datos clínicos de la correlación de PTHrP con los eventos y marcadores evaluados y hallados de relevancia en este Trabajo de Tesis.....	190
Sección 3: Estudio mediante biología de redes de la interacción entre PTHrP y los marcadores de la angiogénesis y de la TEM	196
Discusión del Capítulo 3	207
6. Reflexiones finales	212
7. Conclusión	215
8. Actividades académicas, de gestión y de docencia realizadas durante el período de desarrollo de este Trabajo de Tesis.....	223
9. Bibliografía	236



1

Antecedentes

1. Antecedentes

1.1 PTHrP: su descubrimiento y acciones fisiológicas

Ante el caso de un paciente de 51 años con un tumor y además con hipercalcemia e hipofosfatemia no debida a hiperparatiroidismo primario, en 1941 Fuller Albright fue el primero en postular que un tumor puede producir en exceso una hormona que actúa de manera similar a la hormona paratiroidea (PTH). Luego del análisis del Dr. James B. Collip, se determinó que la causa no se relacionaba con PTH sino posiblemente con una molécula ectópica similar a PTH (Albright, 1941). Más tarde, en 1987, este factor fue caracterizado como el péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) y se ha asociado al síndrome de hipercalcemia humoral maligna (HHM) que acompaña a complicaciones clínicas de varios tipos de cáncer (Martin y Atkins, 1979). La clonación de su ADNc mostró que esta proteína de 18 kDa posee ocho de los primeros 13 residuos idénticos a los de PTH y que su actividad biológica principal se asociaba a los primeros 34 aminoácidos (Kemp et al., 1987).

La homología estructural entre PTH y PTHrP sugiere que esta similitud resultó de un proceso de duplicación génica. Sin embargo, a diferencia del gen de PTH el cual se encuentra en el cromosoma 11, el gen de PTHrP (PTHLH) se encuentra en el cromosoma 12 y se extiende por más de 15 kb incluyendo nueve exones y tres promotores, que experimentan empalme alternativo dando lugar a tres isoformas de ARNm que codifican para 139, 141 y 173 aminoácidos (Sourbier y Massfelder, 2006). Las tres isoformas de PTHrP, si bien se consideran específicas de determinados tejidos, aún se desconoce si presentan funciones diferenciales, ya que además, experimentan un procesamiento postraducciona que genera varias formas secretadas (Schlüter, 1999; Wysolmerski, 2012). La estructura de PTHrP está constituida por un dominio N-terminal (1-36) asociado al receptor de PTH tipo 1 (RPTH1) que está implicado en la resorción ósea, una región media (38-94) que presenta una secuencia de localización nuclear y un dominio C-terminal (107-

139) que posee la región denominada osteostatina asociada a la inhibición de la osteólisis (Soki et al., 2012). Este último dominio funcional no posee su homólogo en PTH por lo que esta función es única para PTHrP (Schlüter, 1999). En cambio, la región N-terminal de PTHrP (1-34) es similar a la región N-terminal de PTH y ambos se unen al receptor RPTH1 (Wysolmerski, 2012) (**Figura 1**).

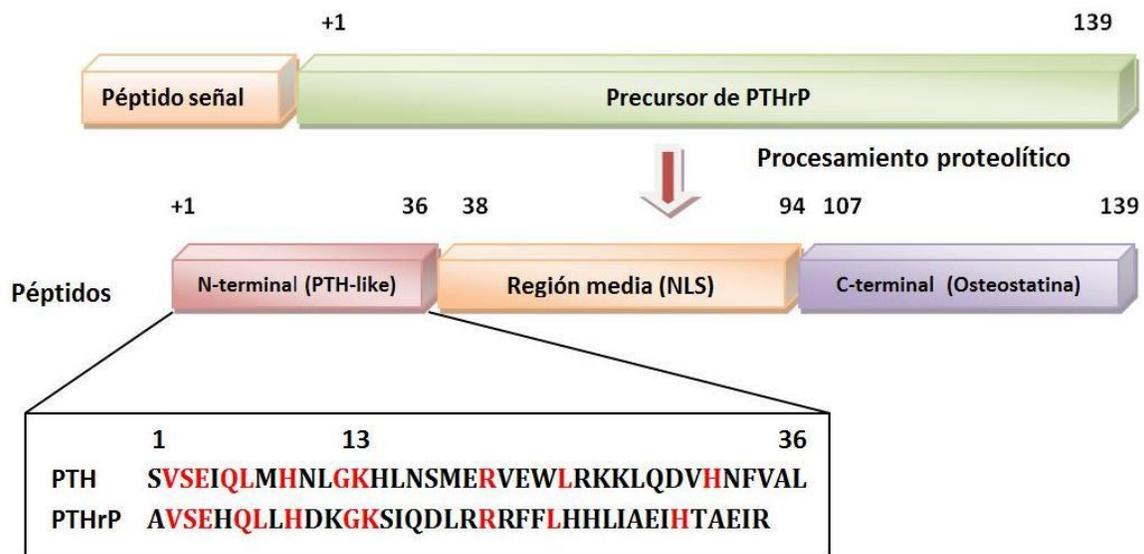


Figura 1. Estructura de la isoforma de 139 aminoácidos de PTHrP. Este péptido sufre un complejo proceso postraduccion, obteniéndose varias formas secretadas. Los primeros 13 residuos de la proteína madura, de los cuales ocho residuos son los mismos que en PTH, participan en los efectos agonistas de PTH y PTHrP al unirse al receptor RPTH1, mientras que los siguientes residuos de PTHrP (14-36) son cruciales para la unión a RPTH1, pero no tienen una alta homología con PTH y su secuencia no se parece a ninguna otra proteína conocida (Martin, 2016). NLS: secuencia de localización nuclear, denominada así por sus siglas en inglés.

Años más tarde se descubrió en el cerebro un receptor homólogo, el receptor de PTH tipo 2 (RPTH2) (Usdin et al., 2000). PTH (1–34) se une a RPTH2 y lo activa, pero PTHrP (1–34) no es capaz de unirse a este receptor (Gensure et al., 2005). Se consideró que las diferencias dentro de la secuencia de PTH (1-14) y PTHrP (1-14), en particular la presencia de histidina en la posición 5 de PTHrP, contribuía en gran medida a la capacidad de RPTH2 para discriminar entre PTH y PTHrP (Behar et al., 1996).

PTHrP es producido por muchos tejidos como cartílago, músculo liso y hueso, actuando de manera autocrina, intracrina y paracrina, siendo esta última la más frecuentemente observada (Maioli y Fortino, 2004). Solo se ha visto en circulación y actuando de manera endocrina durante la lactancia (donde actúa en la resorción ósea), en el feto (donde media el transporte de calcio transplacentario) y en la HHM (McCauley y Martin, 2012) (**Figura 2**). En tejidos extraesqueléticos fetales de rata se ha observado que el ARNm de PTHrP se expresa principalmente en las células de revestimiento de la superficie, mientras que el ARNm de RPTH1 se expresa principalmente en las células mesenquimales adyacentes. La relación temporal entre la expresión de PTHrP y del receptor RPTH1 apoya la hipótesis de que PTHrP es un factor de diferenciación/crecimiento con un modo de acción autocrino/paracrino durante el desarrollo fetal, que participa en interacciones epiteliales-mesenquimales en muchos tejidos además de sus funciones en el desarrollo esquelético (Lee et al., 1995). El receptor RPTH1 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés) con 7 dominios transmembrana. La comprensión de las funciones fisiológicas, las acciones moleculares y celulares de PTH y PTHrP comenzó cuando se clonó por primera vez el RPTH1 en la década de 1990. La región amino terminal de PTH (1-34) y PTHrP (1-34) interactúan con el dominio J, que es la porción funcional del receptor que contiene las siete hélices transmembrana y los bucles de conexión (Mannstadt et al., 1999). La porción carboxilo terminal de PTH y PTHrP se une al dominio N extracelular del receptor que promueve la asociación de la región amino terminal biológicamente activa del ligando al dominio J (Bergwitz et al., 1996; Hoare et al., 2001).

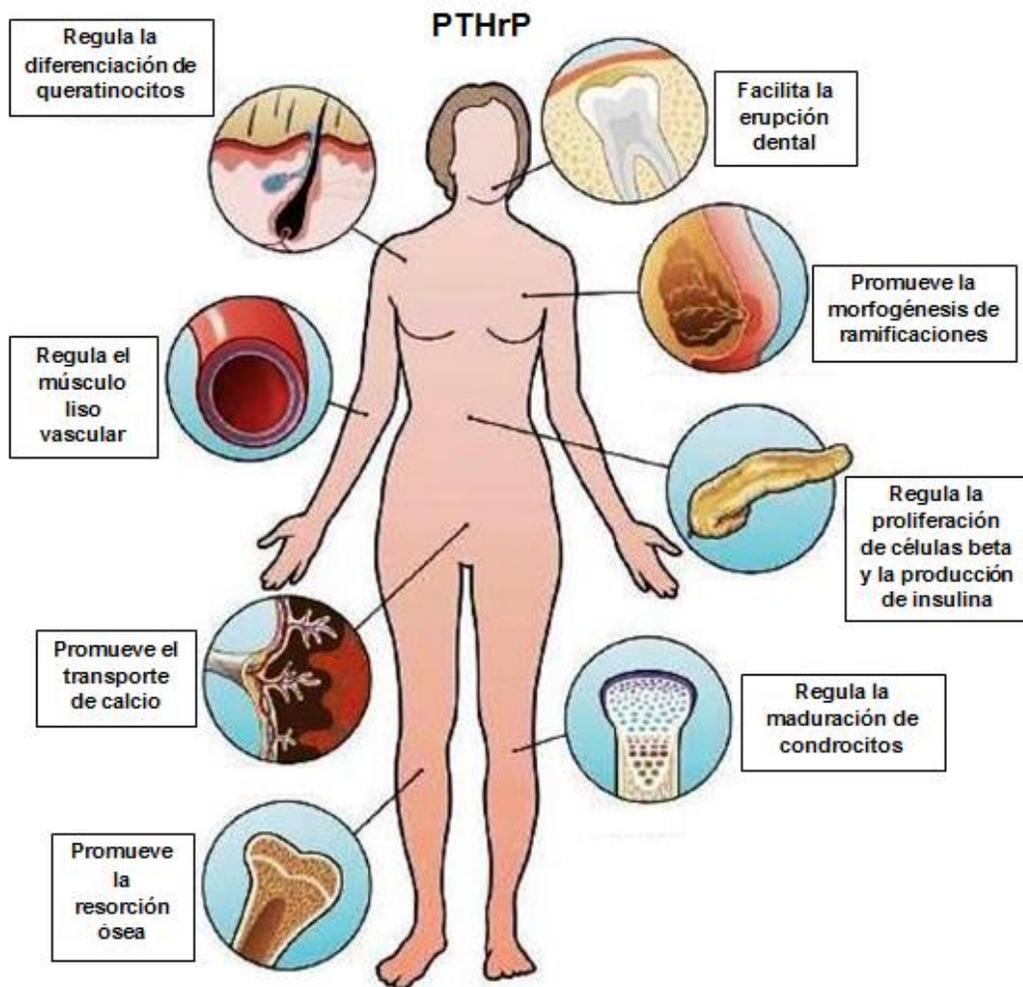


Figura 2. Tejidos y funciones fisiológicas de PTHrP. Adaptado de McCauley y Martin, 2012.

1.2 Rol de PTHrP en el cáncer

Además de las investigaciones sobre la fisiología de PTHrP en el desarrollo fetal y posnatal, su estudio en los últimos años ha demostrado que aquella predicción de Fuller Albright sobre su relación con el cáncer renal no se limitaba a promover la HHM, sino que PTHrP podría encontrarse participando activamente en el desarrollo y progresión de distintos tipos de tumores. Los primeros hallazgos del efecto de PTHrP en este sentido fueron informados por Sourbier y Massfelder en el año 2006 ya que encontraron un incremento de su expresión en tejido de cáncer renal y una regresión en tumores *in vivo* ante el bloqueo de PTHrP (Sourbier y Massfelder, 2006). Luego Li y colaboradores establecieron en el año 2011 su participación en distintas etapas del cáncer de mama siendo posteriormente este rol ampliamente caracterizado (Li et al., 2011). En una completa revisión realizada en el año 2012 por Soki y colaboradores se compiló la información hasta ese momento existente de la función de PTHrP en las metástasis óseas y su contribución a eventos que promueven el desarrollo tumoral concluyendo que en metástasis esqueléticas PTHrP tiene la capacidad de actuar en las células tumorales “nutriendo la semilla” y/o en el microambiente óseo “preparando el suelo” en palabras de Stephen Paget (Ribatti et al., 2006; Soki et al., 2012). Por otro lado estudios clínicos de tumores de mama invasivos detectaron la presencia de PTHrP en el 60% de los tumores y en el 90% de las metástasis óseas pero no se observó expresión en los tejidos mamarios normales (Powell et al., 1991).

Si bien PTHrP se expresa en diferentes tumores de órganos como mama, próstata, pulmón, riñón y piel (Soki et al., 2012), su rol en otros tipos de cáncer que no están asociados directamente con hipercalcemia y/o metástasis ósea frecuente, como es el caso del cáncer colorrectal (CCR), no ha sido totalmente elucidado. Esto evidencia la dependencia del contexto en la acción de PTHrP. Se ha demostrado que los genes que codifican para PTHrP y RPTH1 están expresados en el epitelio de las vellosidades

intestinales (Watson et al., 2000), lo que sugiere que en el intestino PTHrP ejercería un papel regulador local a través de una vía autocrina/ paracrina. Malakouti y colaboradores observaron por inmunohistoquímica que la expresión de PTHrP está aumentada en el tejido del cáncer de colon en comparación con la mucosa normal y los pólipos colorrectales. Además, la expresión parece ser mayor en los pólipos que en el colon normal (Malakouti et al., 1996).

1.3 El cáncer colorrectal

De acuerdo a estadísticas del Observatorio Global del Cáncer (Globocan 2020) y como se puede apreciar en la **Figura 3**, el CCR representa el tercer cáncer con mayor incidencia luego del cáncer de mama y el de pulmón, con 15.895 casos nuevos en el año 2020, representando el 12,1% del total de tumores en ambos sexos (Sung et al., 2021). Si bien ha disminuido relativamente su mortalidad en los últimos 20 años debido a los avances en el tratamiento de la enfermedad, aún se sitúa segundo en tasa de mortalidad (9,4%), y la falta de acceso a estudios y de métodos confiables para su detección sigue afectando el diagnóstico clínico temprano y el pronóstico de los pacientes (Keum y Giovannucci, 2019; Rawson y Bapat, 2012).

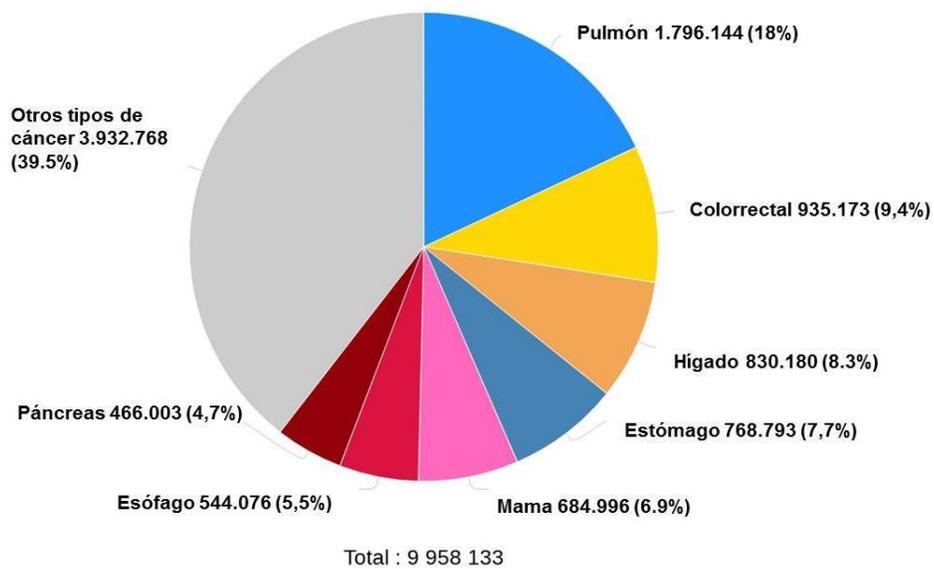
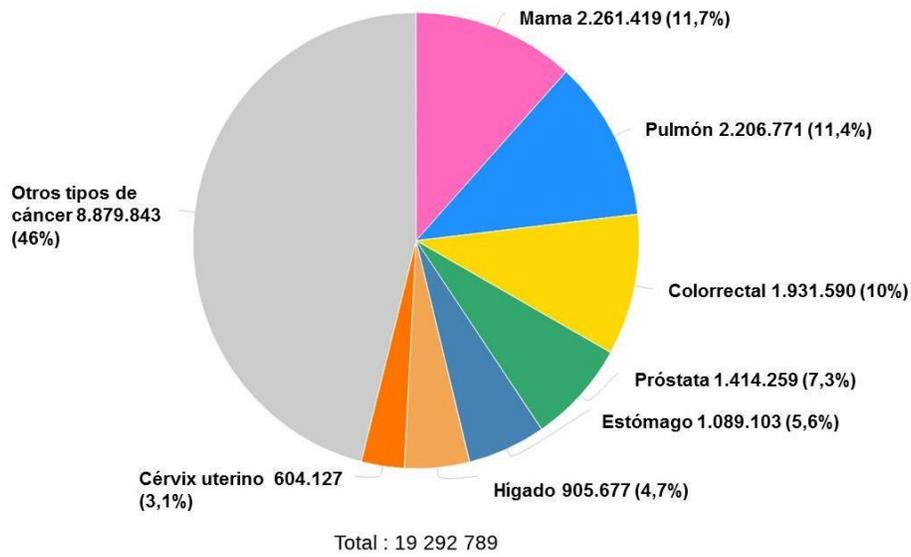


Figura 3. Estadística mundial de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer (GLOBOCAN 2020). Se presenta el número estimado de casos nuevos (arriba) y de fallecimientos (abajo) por CCR en ambos sexos y en todas las edades en el 2020.

Como se ha observado en pacientes con CCR en comparación con controles sanos, el estilo de vida tiene un papel relevante en la causa del CCR independientemente del riesgo genético de cada persona. El consumo excesivo de alcohol, la obesidad, la inactividad física y una dieta poco saludable son factores de riesgo independientes, y la puntuación de riesgo combinada de estos factores se asocia fuertemente con el aumento de la probabilidad de aparición de la patología (Cho et al., 2019).

La mayoría de los casos de CCR (más del 90%) son adenocarcinomas, una neoplasia maligna que se desarrolla a partir de células epiteliales glandulares del colon y el recto; otros tipos raros incluyen carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células fusiformes y carcinoma indiferenciado (Fleming et al., 2012). Aproximadamente del 60 al 65% de los casos de CCR surgen esporádicamente (es decir, ocurren en individuos sin antecedentes familiares de CCR o debido a mutaciones genéticas heredadas que aumentan el riesgo) a través de aberraciones epigenéticas y genéticas somáticas adquiridas. Solo el 5% se atribuye a síndromes de cáncer hereditario, como el CCR no poliposo, también conocido como síndrome de Lynch, o la poliposis adenomatosa familiar (PAF), causada por mutaciones hereditarias de la línea germinal en genes de susceptibilidad poco frecuentes, pero de alta penetrancia como MLH1 y APC.

1.4 Progresión del cáncer colorrectal

El CCR es una de las patologías en la que mejor se han caracterizado las mutaciones que dan lugar a la transformación celular. El modelo molecular de la secuencia de adenoma a carcinoma (**Figura 4**) se caracteriza por una delección del gen supresor tumoral APC (siglas derivadas del inglés: “Adenomatous Polyposis Coli”), de K-RAS (siglas derivadas del inglés “Kirsten-rat sarcoma oncogen homolog”) y de p53 (proteína específica de 53 kDa)(Kanthan et al., 2012). Esta vía está implicada en la formación de criptas aberrantes displásicas con mutaciones de K-RAS. Una minoría de estos focos con criptas aberrantes displásicas evoluciona de pólipos adenomatosos simples a avanzados para finalmente producir un cáncer invasivo. Las mutaciones somáticas de APC se observan en el 60-80% de los casos de CCR, así como en un gran porcentaje de las lesiones precursoras colorrectales (adenomas), lo que indica que la mutación de APC es un evento temprano en el proceso de oncogénesis. La proteína APC se une a la proteína β -catenina e induce su degradación, actuando de este modo como un regulador negativo de la expresión y función de β -catenina. La pérdida de la función del gen APC provoca la acumulación de β -catenina citoplasmática libre que transloca hacia el núcleo, donde activa la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular (Behrens, 2005). Los genes blanco de la señal Wnt/ β -catenina afectan a múltiples funciones celulares, incluyendo los reguladores de la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (TEM), tal como se describirá posteriormente. Se estima que estos eventos siguen la Hipótesis de Knudson de acumulación de mutaciones “conductoras” como la mutación del gen APC, para continuar con una hiperplasia por fenómenos de hipometilación. Luego, mutaciones ampliamente reconocidas en colon como en KRAS y p53, con la complejidad que le suma las mutaciones “pasajeras” (debidas a la alta tasa de proliferación), convierte al CCR en una patología difícil de caracterizar.

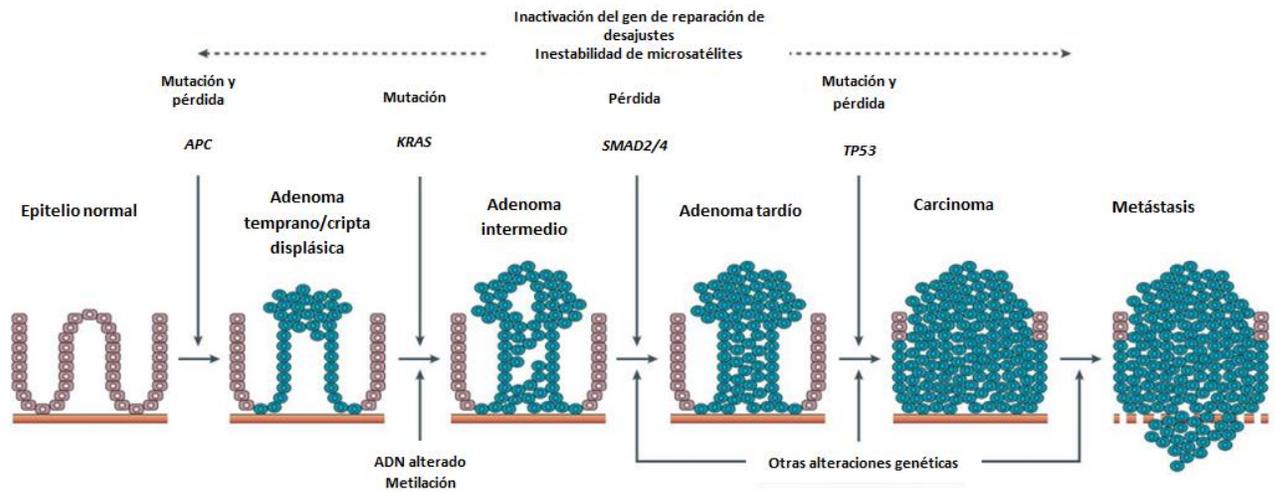


Figura 4. Secuencia de adenoma a carcinoma según modelo de eventos mutacionales.

Adaptado de Davies et al., 2005.

Debido a que es una patología que en la etapa clínica se presenta como molecularmente heterogénea, en el año 2015 un Comité Internacional demostró que los sistemas de clasificación existentes para el CCR se fusionan en cuatro subtipos moleculares de consenso (en inglés CMS) que, como se observa en la **Figura 5**, presentan características distintivas: CMS1 (Inmune, 14% de los casos): con elevadas mutaciones, inestabilidad microsatelital y fuerte activación inmune; CMS2 (Canónica, 37% de los casos): epitelial, cromosómicamente inestable y marcada activación de señalización de Wnt y MYC; CMS3 (Metabólico, 13% de los casos): epitelial con una desregulación metabólica evidente; y CMS4 (Mesenquimal, 23% de los casos): activación prominente del factor de crecimiento transformante β (TGF- β por sus siglas en inglés), invasión del estroma y angiogénesis (Guinney et al., 2015).

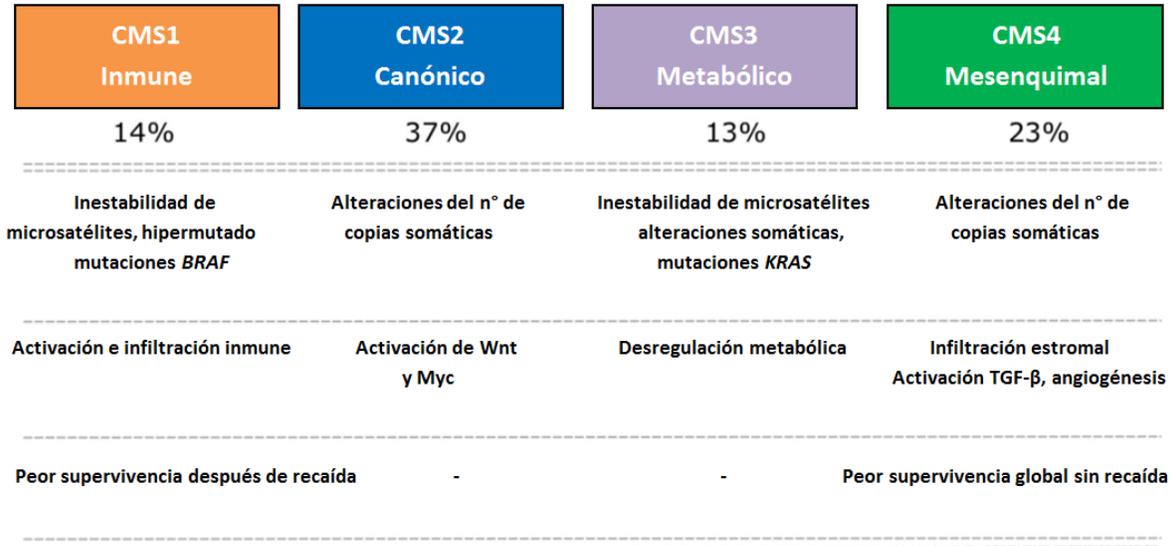


Figura 5. Diferencias biológicas significativas en los distintos subtipos moleculares del CCR basados en la expresión génica. Adaptado de Guinney et al., 2015.

En particular los cánceres de tipo CMS4, a menudo diagnosticados en estadios avanzados (III y IV), tienen un pronóstico desfavorable con peor supervivencia general a 5 años (62% de los pacientes) y supervivencia sin recaída (60% de los pacientes) frente a los otros subtipos moleculares (Guinney et al., 2015). Si bien recientemente se han desarrollado estrategias terapéuticas de anticuerpos monoclonales dirigidos a los estadios avanzados, los cánceres CMS4 son resistentes a varias de ellas como a la terapia contra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, por su sigla en inglés), independientemente del estado de mutación de KRAS, y a la terapia anti-angiogénesis como bevacizumab en el estadio IV (Thanki et al., 2017).

Esto plantea la necesidad de comprender los factores que impulsan la progresión del CCR hacia su fenotipo mesenquimal, un fenómeno que se comentará seguidamente. Existe consenso en considerar que el proceso metastásico consta de los siguientes pasos secuenciales (**Figura 6**). El escape inicial del sitio primario (que posibilita la invasión) requiere que las células tumorales epiteliales pierdan sus uniones intercelulares para volverse móviles (**paso 1**) degradando la membrana basal y la matriz extracelular (MEC) subyacente; la ruptura de estas barreras físicas permite que las células migren e invadan los tejidos normales cercanos (**paso 2**). El siguiente paso de la metástasis se denomina "intravasación", durante el cual las células tumorales invaden la lámina endotelial, penetran en los vasos vasculares o linfáticos ingresando en la circulación sistémica (**paso 3**). Solo una pequeña cantidad de las células neoplásicas liberadas sobreviven a la anoikis (una forma de muerte celular programada que ocurre cuando las células se desprenden de la MEC circundante) provocada por la pérdida de anclaje. Finalmente, algunas de las células migratorias pueden salir a través del endotelio capilar en órganos distantes hacia el parénquima de estos órganos ("extravasación") (**paso 4**). En el nuevo entorno estromal, un subconjunto logra establecerse (**paso 5**) y proliferar desde micrometástasis hasta tumores secundarios que son clínicamente detectables (**paso 6**). La activación de la TEM puede proporcionar a las células tumorales la capacidad de migrar, invadir, intravasarse y

extravasarse. Una vez que alcanzan los órganos distantes, estas células mesenquimales vuelven a una identidad más epitelial a través de la transición mesénquima-epitelio (TME) para recuperar la capacidad de proliferación y formar un crecimiento secundario en los órganos distantes (Yang et al., 2020).

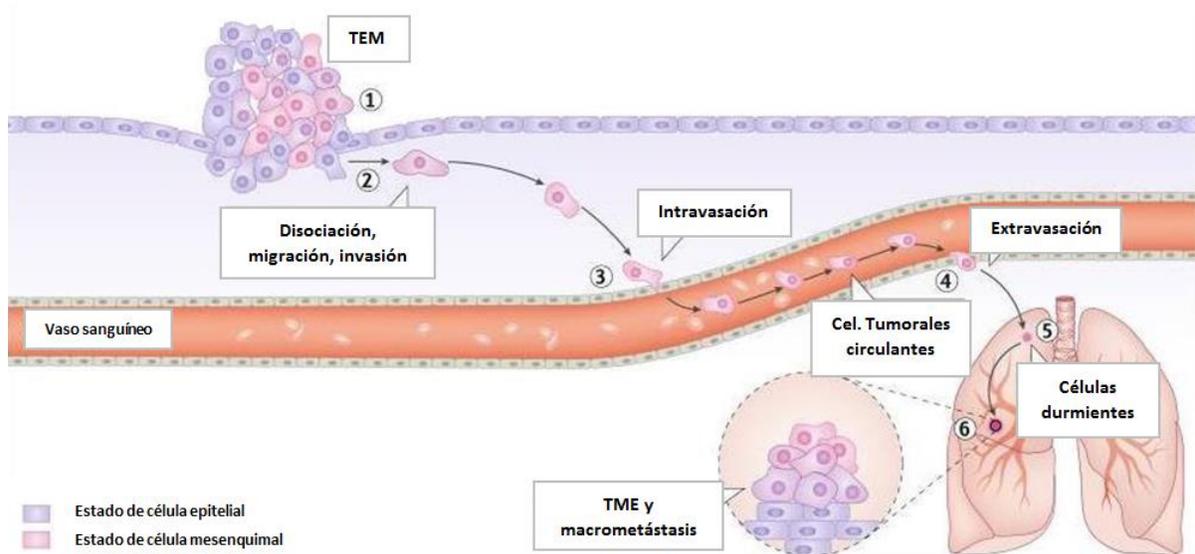


Figura 6. Eventos de la diseminación tumoral. Adaptado de Yang et al., 2020.

1.5 El proceso de Angiogénesis

En el año 1989 Ferrara y Henzel informaron la existencia de un factor de crecimiento de 45 kDa con un efecto específico en células endoteliales capilares que era capaz de estimular la formación de vasos sanguíneos, al cual denominaron factor de crecimiento vascular endotelial (conocido como VEGF por sus siglas en inglés) (Ferrara y Henzel, 1989). En el año 1996, el grupo de investigación dirigido por Ferrara y colaboradores demostró un rol esencial de este factor proangiogénico en la vasculogénesis embrionaria y la angiogénesis en el ratón. La inactivación de un solo alelo de VEGF dio como resultado la letalidad embrionaria entre los días 11 y 12. Los embriones VEGF+/- exhibieron una serie de anomalías en el desarrollo, como malformaciones coronarias, malformaciones en el plexo vascular del saco vitelino y defectos significativos en la vasculatura de otros tejidos, incluyendo la placenta y el sistema nervioso (Ferrara et al., 1996).

Más tarde se encontró que este factor es capaz de interactuar con tres subtipos de su receptor (conocidos como VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 por sus siglas en inglés), que son quinasas capaces de fosforilar residuos de tirosina, y que median una amplia gama de las acciones fisiológicas de VEGF mediante la activación de vías de señalización como ERK1/2 MAPK, c-Src, Akt, óxido nítrico endotelial y p38 MAPK (Greenberg et al., 2008; Koch et al., 2011). Mientras que la vasculogénesis se refiere a la formación *de novo* (o sea de nuevos vasos sanguíneos) a partir de células progenitoras endoteliales (Patenaude et al., 2010), la angiogénesis se refiere a la formación de vasos a partir de una red vascular preexistente (Viallard y Larrivéé, 2017). De esta forma la angiogénesis fue reconocida como un proceso a través del cual se forman vasos sanguíneos y que implica necesariamente la activación, proliferación y migración de las células endoteliales junto a un efecto coordinado de factores proangiogénicos y antiangiogénicos, que resulta en la formación de las estructuras vasculares (**Figura 7**) (Kong et al., 2017; Loizzi et al., 2017).

En el 1971, Folkman postuló por primera vez que el crecimiento de los tumores depende de la angiogénesis (Folkman, 1971). A partir de sus investigaciones numerosas evidencias han señalado que los tejidos tumorales presentan una mayor vascularización en comparación con los tejidos normales adultos y que el mecanismo angiogénico es fundamental en la progresión tumoral (Carmeliet, 2005; Goel y Mercurio, 2013; Matsumoto y Ema, 2014).

La alta tasa metabólica de las células tumorales demanda un mayor aporte de nutrientes y oxígeno, además de facilitar la invasión de las células tumorales promoviendo la diseminación a órganos distantes. La vasculatura tumoral resultante es estructural y funcionalmente anormal y los vasos sanguíneos son de morfología irregular, tortuosos, más permeables y hemorrágicos, lo que conduce a una alta presión intersticial (Mander y Finnie, 2018; Morikawa et al., 2002). A su vez, estas características resultan en un flujo sanguíneo tumoral subóptimo, en donde estímulos como la hipoxia, la secreción de citoquinas y el estrés oxidativo pueden aumentar la expresión del VEGF en las células tumorales.

Debido a esto, la alta tasa de proliferación y en respuesta a la consecuente disminución de la concentración de oxígeno en los tejidos, las células tumorales intentan restaurar la homeostasis metabólica a través de la activación de un sistema regulador central para la hipoxia, compuesto de factores inducibles por hipoxia (conocido como HIF por sus siglas en inglés) (Giaccia et al., 2004). El factor de transcripción HIF-1 alfa además de intervenir en cambios metabólicos protumorales regula genes implicados en el proceso angiogénico, promoviendo la expresión de VEGF en el CCR (Cao et al., 2009). Sin embargo, la liberación proteolítica de VEGF de la matriz tumoral y su disponibilidad para unirse a su receptor, como sucede con otros factores del microambiente tumoral, depende de la degradación de la MEC, motivo por el cual se ha identificado como clave el rol de las metaloproteasas de la matriz (conocidas como MMP por su siglas en inglés) (Deryugina y Quigley, 2015; Niland et al., 2021; Quintero-Fabián et al., 2019). Además de su reconocimiento como mediadoras de la invasión celular, en particular, está reportado que la metaloproteasa 9

(MMP-9) posee una actividad directa en la angiogénesis en la que degrada la membrana basal permitiendo la proliferación y migración de las células tumorales del CCR, y que además puede actuar a través de mecanismos indirectos desencadenando un cambio estructural que libera al VEGF de la MEC. El VEGF queda así disponible para interactuar con su receptor VEGFR y activar la angiogénesis en el tumor (Araújo et al., 2015; Barillari, 2020; Bergers et al., 2000). Junto a MMP-9 se reconocen otras metaloproteasas como MMP-7, que es un objetivo de la vía de señalización de β -catenina y del factor de transcripción que se une a β -catenina conocido en inglés como TCF y que se asocia a estadios avanzados del CCR. MMP-7 ha sido evaluada por estudios como el de Huo y colaboradores que observaron que es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales y generar angiogénesis (Huo et al., 2002). Además, es capaz de liberar al VEGF del secuestro del inhibidor endógeno VEGFR-1 soluble (sVEGFr1) para promover la angiogénesis en las células endoteliales HUVEC (Ito et al., 2009).

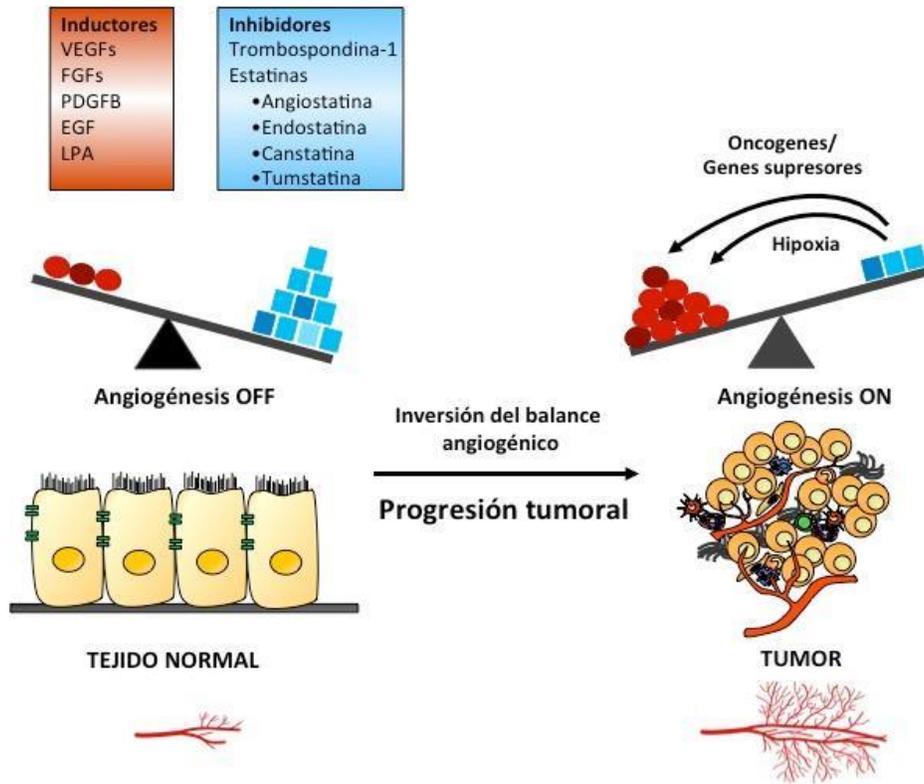


Figura 7. Balance angiogénico. Los niveles de factores pro-angiogénicos (rojo) y anti-angiogénicos (celeste) determinan si una célula endotelial permanece en un estado quiescente o en un estado angiogénico activado, de esta forma los cambios en el balance angiogénico determinan la formación de nuevos vasos. Copyright ©2022 Eli Lilly and Company.

Dado el contexto, el microambiente hipóxico favorece la selección de células anormales que pueden resistir estas condiciones (Jain et al., 2014). Además, las células tumorales hipóxicas a menudo muestran un fenotipo más agresivo, activando oncogenes y experimentando un mayor potencial metastásico (Reymond et al. 2013).

Un aspecto a tener en cuenta es que la liberación de factores no sólo por las células tumorales sino también por el microambiente provoca cambios en las células endoteliales que recubren la vasculatura tumoral anormal. Actualmente está ampliamente aceptada la heterogeneidad y anormalidad de estas células endoteliales, así como su rol en el microambiente, a través de la expresión de factores secretados y unidos a la membrana. De esta manera también contribuyen al fenotipo agresivo de las células tumorales, la TEM, la inmunosupresión, la remodelación de la matriz extracelular y la intravasación en el torrente sanguíneo (Alsina-Sanchis et al., 2021).

A pesar del uso de agentes terapéuticos dirigidos a la inhibición de la angiogénesis en el tratamiento del CCR metastásico (Battaglin et al., 2018), se ha observado la resistencia en muchos pacientes que conduce al fracaso del tratamiento y a la progresión de la patología (Hubbard y Grothey, 2010). Más aun, las anomalías de la vasculatura tumoral que dificultan la llegada de agentes terapéuticos, junto a la observada falta de respuesta del endotelio tumoral a la inflamación causada por los factores proangiogénicos, disminuye el reclutamiento de células inmunitarias contribuyendo a un microambiente inmunosupresor, que dificulta las terapias inmunológicas actuales (Tamura et al., 2019).

1.6 La transición epitelio-mesénquima

En la primera mitad del siglo XIX, algunos investigadores observaron que los tejidos tumorales se parecían más a los tejidos embrionarios que a los tejidos adultos (Recamier, 1829; Remak, 1854). Estas observaciones condujeron a la teoría del reposo embrionario del cáncer propuesta por Franco Durante y Julius Cohnheim: "*Elementos que han conservado sus características embrionarias en el organismo adulto o los han recuperado a través de alguna desviación químico-fisiológica, representan los elementos generativos de cada variedad tumoral*" (Cohnheim, 1875; Durante, 1874). En el año 1968 la investigación de Elizabeth Hay en la gastrulación de vertebrados mostró que las células embrionarias adoptan una morfología mesenquimal que les permite la migración lo que se denominó "transformación epitelial-mesenquimal" y que estaría mediada principalmente por la señalización del TGF- β y la vía de Wnt/ β -catenina (Hay, 2005). Años más tarde, se definió como transición epitelio-mesénquima (que en este Trabajo de Tesis se denominará TEM) y no sólo se ha hallado en tejidos normales durante el desarrollo y la cicatrización de heridas, sino también como un impulsor en la fibrosis tisular que acompaña a algunas enfermedades y en la patogénesis del cáncer.

Por este motivo este proceso puede clasificarse dependiendo del momento y contexto en el que ocurre. Se reconoce como TEM tipo 1 al que ocurre durante la gastrulación embrionaria y que da lugar al mesodermo, endodermo y a las células móviles de la cresta neural. Allí, el mesénquima primario puede formar epitelios secundarios mediante una reversión hacia una transición mesénquima-epitelio (TME). La TEM se puede volver a activar en el tejido adulto en el contexto de la inflamación y la fibrosis lo que se denomina TEM tipo 2. A diferencia de la TEM tipo 1, la TEM tipo 2 se expresa durante largos períodos de tiempo y eventualmente puede destruir un órgano afectado si el agente inflamatorio primario no se elimina o se atenúa (Marconi et al., 2021). Finalmente, los epitelios secundarios de muchos órganos pueden transformarse en células cancerosas que

luego experimentan la TEM de tipo 3 que permite la invasión y la metástasis (Kalluri y Weinberg, 2009).

Como se observa en la **Figura 8**, durante este proceso las células pierden progresivamente sus características epiteliales y adquieren propiedades mesenquimales en respuesta a las señales propias y del microambiente (Aiello y Kang, 2019). El estado normal de un epitelio consiste en células que se caracterizan por poseer uniones estables entre sí, una polaridad apical-basal e interacciones con la membrana basal. Durante la TEM, los cambios en la expresión génica y los mecanismos de regulación postraduccional conducen a la represión de estas características epiteliales y la consecuente adquisición de características mesenquimales (Stemmler et al., 2019).

Estos cambios moleculares hacia el estado mesenquimal son acompañados de una morfología y cambios en el citoesqueleto similares a las de los fibroblastos, así como un incremento en las capacidades migratorias e invasivas (Yang et al., 2020). Sin embargo, no constituye sólo un estado binario en el que las células tienen una identidad mesenquimal o epitelial, sino que comprende un espectro dinámico y reversible donde las células se pueden encontrar en cualquier etapa de ese espectro, a menudo compartiendo ciertas características epiteliales y mesenquimales. Incluso las células que se consideran en un estado híbrido epitelial/mesenquimal son más resistentes a la apoptosis y a esquemas quimioterapéuticos (Brabletz et al., 2018; Nieto et al., 2016).

Los controles genéticos y los mecanismos bioquímicos subyacentes a la adquisición del fenotipo invasivo y la posterior diseminación de la célula tumoral han sido áreas de intensa investigación. En muchos de estos estudios, se ha propuesto la activación de un programa TEM como el mecanismo crítico para la adquisición de fenotipos malignos por parte de las células tumorales epiteliales (Thiery, 2002). Durante la invasión de un carcinoma, la TEM provee a las células tumorales la capacidad de disociarse una de otra, degradar y migrar dentro de la membrana basal e invadir el tejido conectivo circundante (Chou y Yang, 2015). Interesantemente, el proceso inverso, la TME, es también esencial en

la embriogénesis y juega un rol determinante en el establecimiento de células tumorales en nuevos órganos durante la metástasis tumoral (Kalluri y Weinberg, 2009). Esto refuerza el concepto de que la TEM puede considerarse como un proceso reversible durante la progresión tumoral y no regido solo por eventos mutacionales. Las reglas que controlan la TEM en el desarrollo embrionario muestran paralelismos con los que subyacen a su reactivación durante la progresión del cáncer.

Las células epiteliales poseen la glicoproteína transmembrana de la superfamilia de cadherinas tipo I E-cadherina (codificada por el gen CDH1) como molécula principal en las uniones adherentes. El dominio extracelular de E-cadherina consta de cinco regiones implicadas en la formación de dímeros de E-cadherina, que interactúan con la membrana celular de una célula contigua (Stemmler, 2008). El dominio intracelular de E-cadherina está unido a un complejo proteico que contiene a β -catenina, alfa-catenina y p120, que interactúan con la red de filamentos de actina intracelulares. Estos eventos moleculares crean una asociación entre el contacto celular, la regulación del citoesqueleto y la forma celular, necesaria para mantener las células epiteliales inmóviles (Birchmeier y Behrens, 1994). Durante la TEM, la actividad de las uniones adherentes se modifica mucho debido principalmente a la sustitución de E-cadherina por N-cadherina, un proceso denominado "cambio de cadherina" (Cavallaro et al., 2002; Christofori, 2003). De hecho, a diferencia de las células epiteliales, las células mesenquimales expresan varias cadherinas, incluidas la N-cadherina, la R-cadherina y la cadherina 11. Como E-cadherina tiene un rol esencial en la homeostasis epitelial, la disminución en su expresión inicia el descenso en la expresión y/o organización de una serie de marcadores epiteliales adicionales, como proteínas desmosomales (plakoglobina, desmoglobinas, desmoplaquinas), uniones ocluyentes (ZO-1) y componentes de la polaridad celular (proteínas dlg o lgl) (Vu y Datta, 2017). Por su parte, la expresión aberrante de N-cadherina parece tener un efecto dominante en la interacción célula-célula, ya que incluso en presencia de E-cadherina aumenta la motilidad de las células tumorales mediante una desestabilización de los complejos de adhesión celular (Nieman et al., 1999).

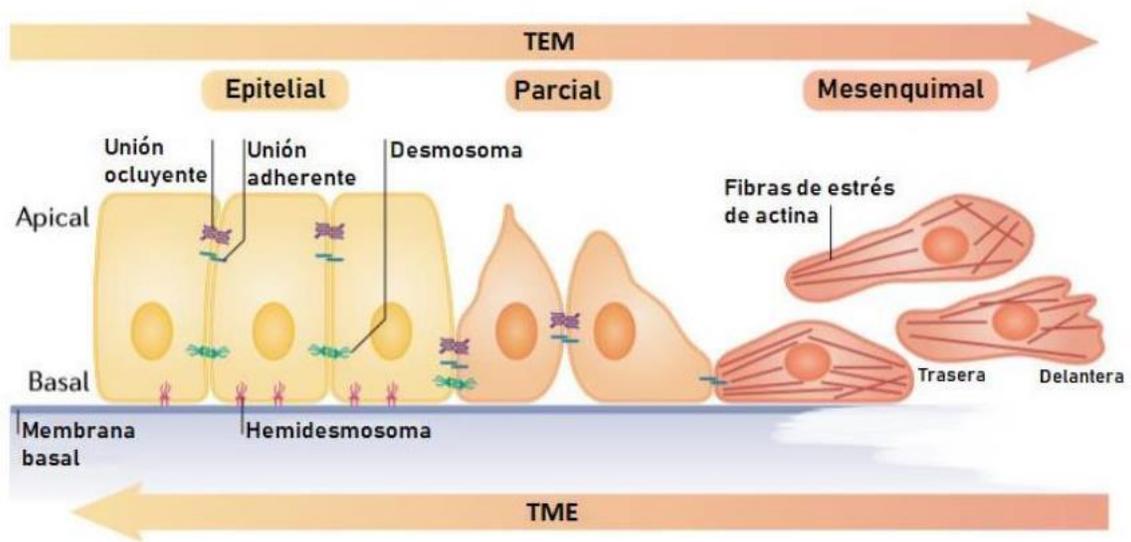


Figura 8. Transición epitelio-mesénquima (TEM). Adaptado de Dongre y Weinberg, 2019.

En este proceso de cambio hacia el estado mesenquimal la célula experimenta una reorganización drástica del citoesqueleto con cambios de expresión en proteínas estructurales como integrinas y filamentos intermedios. Simultáneamente, existe un aumento en la expresión de proteínas características de células mesenquimales como vimentina y fibronectina junto a un incremento de la expresión de factores de transcripción como TWIST, ZEB1/2 y Snail que se ha identificado como represores transcripcionales de la E-cadherina (Peinado et al., 2004, 2007). Entre ellos, ZEB1 posee un rol crucial en la progresión de los carcinomas como el CCR, lo que sugiere que puede ser el principal contribuyente al programa de TEM en tumores de tejidos de origen endodérmico (Burk et al., 2008).

Así, estos cambios que conducen al fenotipo agresivo pueden desencadenarse por cambios moleculares en la célula tumoral y la influencia mediada por células del microambiente del tumor como macrófagos y otras células inmunitarias infiltrantes que conducen a la inducción de la TEM (Toh et al., 2011). Esta importancia del microambiente también es respaldada por estudios tal como aquel desarrollado por Robinson y colaboradores en donde se halló mediante imágenes de seguimiento intravital que la aparición de metástasis está dada por la proximidad espacial entre células tumorales, macrófagos y células endoteliales (Robinson et al., 2009).

1.7 Vías de señalización asociadas a procesos protumorales

1.7.1. La vía de señalización de las MAPK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de serina-treonina quinasas altamente conservadas que regulan diversos procesos fisiopatológicos que promueven respuestas a diversos estímulos. Éstas se activan por fosforilación en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares que interaccionan con receptores GPCR, o receptores que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca activados por fosforilación en tirosina (RTK por sus siglas en inglés), o por activación de tirosina quinasas citosólicas como Src (Schaeffer y Weber, 1999; Seger y Krebs, 1995). Como se observa en la **Figura 9**, la superfamilia de las MAPKs está formada por cuatro familias principales: las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs, específicamente ERK1 y ERK2, por sus siglas en inglés), las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs por sus siglas en inglés), la familia de las quinasas p38 (formada por varias isoformas de 38 kDa) y ERK5 (de peso molecular más grande que el resto de las familias y también conocida como proteína quinasa 1 activada por mitógeno grande, BMK1, por sus siglas en inglés). Cada familia participa en la regulación del metabolismo intracelular y expresión de genes involucrados en diferentes respuestas celulares como el crecimiento y desarrollo, apoptosis, respuesta celular a estrés y migración celular.

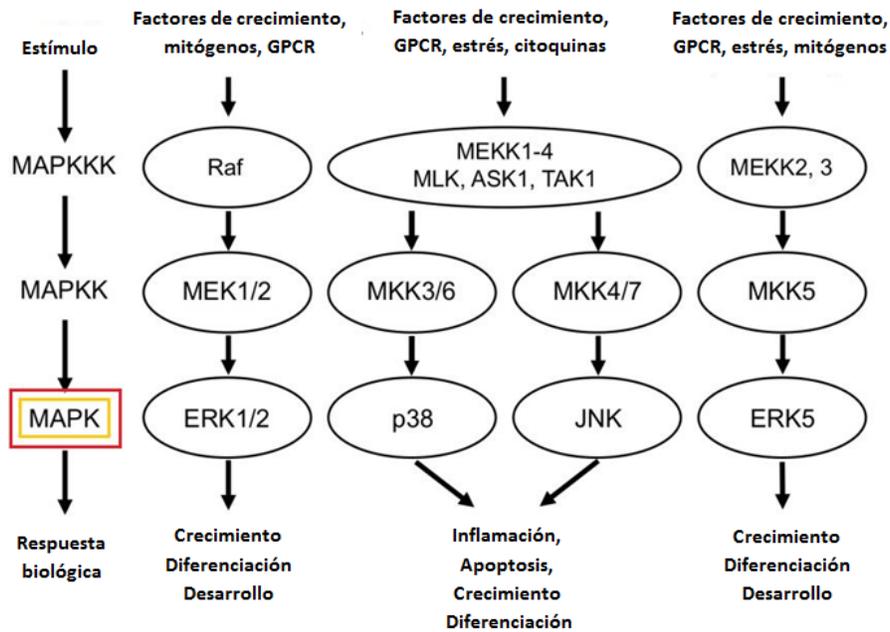


Figura 9. Componentes de la vía de señalización de la familia MAPKs. La activación de estas vías se produce por múltiples factores y la respuesta puede variar dependiendo del tipo celular. Adaptado de Morrison, 2012.

La desregulación de estas cascadas y su efecto posterior, usualmente, conduce a enfermedades como el cáncer, la diabetes y la respuesta inmune inflamatoria, entre otras (Keshet y Seger, 2010). Se ha reportado que la vía de señalización de ERK 1/2 MAPK, activada usualmente por estímulos mitogénicos, regula la migración y la invasión de células tumorales a través de múltiples factores, incluyendo: 1) GTPasas de la familia Rho, que controlan la regulación del citoesqueleto, 2) integrinas y proteínas de adhesión (como FAK, paxilinas y caspaínas), 3) proteasas extracelulares que degradan la matriz extracelular, 4) complejos de adhesión célula-célula, 5) factores de transcripción como AP1 y Ets2 que regulan la expresión de proteínas que controlan la migración/polaridad, incluyendo MMP y cadherinas, 6) proteínas de la familia RSK, asociada a algunas de sus isoformas, y a otras que se mantienen en discusión (Sever y Brugge, 2015). Por su parte, estudios muestran que las vías de p38 MAPK y JNK están generalmente involucradas en respuestas anti-apoptóticas y en la inflamación, y que la vía de ERK5 transmite señales mitogénicas y de estrés, aunque el mecanismo de acción de esta última quinasa aún sigue en estudio (Yao et al., 2010). Al igual que otros procesos regulados por estas vías de señalización, el resultado de la activación de las MAPKs en el cáncer es también dependiente del entorno. En este sentido, se ha observado que la activación de p38 MAPK en células endoteliales tiene un rol central en el control de la proliferación, migración y supervivencia de estas células lo que favorece la angiogénesis (Corre et al., 2017).

Incluso se ha reportado que los eventos protumorales pueden depender de una comunicación cruzada entre las MAPKs y otras vías de señalización como la vía de PI3K/Akt, la vía de Wnt/ β -catenina y la vía de TGF- β /Smad, entre otras, modulando procesos como la TEM (Gonzalez y Medici, 2014; Tse y Kalluri, 2007). Estas vías son activadas por diversos estímulos dinámicos del microambiente local, incluidos factores de crecimiento, citoquinas, la hipoxia y el contacto con la matriz extracelular.

1.7.2 La vía de señalización de PI3K/Akt

La Fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) es una familia de quinasas de lípidos que se activan por numerosos estímulos como factores de crecimiento y receptores de hormonas, regulando así el crecimiento celular, la supervivencia, la movilidad y las respuestas a los cambios en las condiciones nutricionales. Esta quinasa puede ser dividida en tres clases (I, II y III) en base a su selectividad por los sustratos, su estructura y su modo de regulación (Hawkins y Stephens, 2015). La clase I se divide en: a) clase IA, que comprende heterodímeros formados por una subunidad regulatoria (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ o p50 α) y una subunidad catalítica de 110KDa (p110 α , β o δ) y b) clase IB, compuesta por heterodímeros con una subunidad regulatoria (p101 o p87) y una subunidad catalítica (p110 γ). Numerosos estudios indican que la PI3K clase IA está desregulada durante el desarrollo tumoral (Yuan y Cantley, 2008), constituyendo un potencial objetivo de los tratamientos del cáncer (Osaki et al., 2004). Como se muestra en la **Figura 10**, la clase PI3K IA es activada por receptores RTK o quinasas capaces de fosforilar residuos de tirosina pero que son no receptoras tales como c-Src mientras que la clase IB es activada por GPCR (Fruman y Rommel, 2014). Las interacciones de la subunidad regulatoria con varias proteínas afectan la localización y activación de la subunidad catalítica. Además, la interacción directa de la subunidad catalítica con Ras (una GTPasa) puede estimular la actividad de la clase I de PI3K (Castellano y Downward, 2011). Una vez activada, PI3K cataliza la adición de un grupo fosfato a la posición 3'-OH del anillo de inositol de fosfatidilinositoles (Fruman y Rommel, 2014). El fosfatidilinositol 3'-fosforilado resultante actúa como segundo mensajero que media el reclutamiento a la membrana plasmática y la activación de moléculas efectoras que poseen un dominio de homología de plekstrina (PH por su sigla en inglés), entre las que se encuentra la quinasa Akt (Vanhaesebroeck et al., 2012).

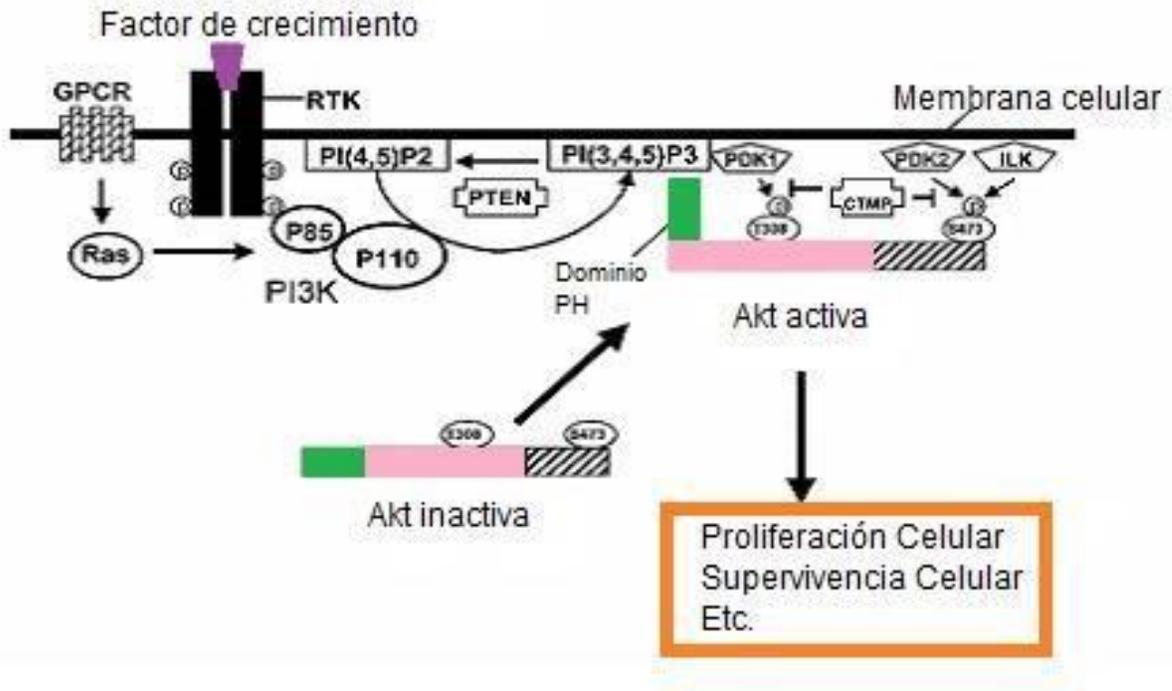


Figura 10. Modelo para la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt. La unión de factores de crecimiento a los receptores RTK o a receptores GPCR estimulan la activación de PI3K clase IA compuesto de una subunidad reguladora y una subunidad catalítica p110. PI3K activado convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI (4, 5) P2) en PI (3, 4, 5) P3, mientras que la fosfatasa PTEN (por su sigla en inglés, referida un fenómeno de deleción en el cromosoma 10) revierte esta acción. Akt es traslocada a la membrana celular e interactúa con PI (3, 4, 5) P3 mediante el dominio PH, siendo fosforilada en dos residuos (Thr308 y Ser473) por las quinasas dependientes de fosfatidilinositol PDK1 y PDK2 (por sus siglas en ingles) y la quinasa unida a integrina (ILK por su sigla en inglés). La proteína moduladora de la región carboxilo terminal (CTMP por su sigla en inglés) inhibe dicha fosforilación. Una vez activa, Akt controla procesos celulares fundamentales como el ciclo celular y la supervivencia. Adaptada de Osaki et al., 2004.

La vía de señalización de PI3K/Akt está asociada con el CCR humano participando en la transformación de la mucosa del colon a un fenotipo menos diferenciado y más maligno. Se cree que los efectos de PI3K sobre el crecimiento y progresión del tumor están mediados principalmente por Akt (Pandurangan, 2013). Akt se encuentra sobre-expresada en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, de páncreas, de ovario, y de mama. Además, la sobre-estimulación de la fosforilación de Akt y la consecuente sobre-activación de esta enzima en los carcinomas de colon humano se correlaciona con el aumento de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, así como diferentes parámetros clínico-patológicos de etapas avanzadas como el grado invasivo, infiltración de vasos y metástasis de ganglios linfáticos (Khaleghpour et al., 2004).

1.7.3 microARNs como reguladores del cáncer

Como se comentó en esta sección de Antecedentes, tanto la TEM como la angiogénesis son procesos que contribuyen a la progresión tumoral y están regulados por distintos mecanismos; uno de ellos recientemente conocido involucra a los microARNs (miRs) (Pan et al., 2021). Éstos son una clase de ARNs endógenos, no codificantes y de hebra única de aproximadamente 20-25 nucleótidos, capaces de regular la expresión génica postranscripcionalmente al unirse a la región 3' no traducida (UTR) del ARN mensajero (ARNm) diana (He y Hannon, 2004) (**Figura 11**). Desde su descubrimiento, se ha visto que aproximadamente el 30% de todos los genes humanos son regulados por miRs (Erson y Petty, 2008; Lewis et al., 2005). Los miRs pueden regular la expresión génica tanto degradando como bloqueando la traducción de ARNm dianas al unirse a la región 3'-UTR. Se ha propuesto que dependiendo del apareamiento de bases entre el miR y el ARNm diana, el efecto regulador negativo puede variar desde represión débil de la traducción de la proteína al clivaje completo del ARNm. Posterior al descubrimiento de los miRs, la investigación se ha centrado en buscar evidencias que apunten a sus diversos roles en vías moleculares y procesos biológicos durante el desarrollo normal y su participación en diversas patologías (Bhaskaran y Mohan, 2014).

Entre las enfermedades humanas, se ha demostrado que los miRs están mutados o se expresan en forma aberrante en el cáncer. Cada vez hay más evidencias que muestran que los miRs pueden actuar como oncogenes cuando su blanco son moléculas oncosupresoras o como supresores tumorales cuando su blanco son oncogenes (Negrini et al., 2009). Además, un miR puede funcionar dualmente como oncogén y supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer y del entorno celular. Estudios de expresión genómica de miRs, han demostrado que casi todos los tipos de cáncer presentan perfiles específicos de expresión con aumento y/o disminución de miRs específicos (Calin y Croce, 2006). En particular, se ha reportado que los miRs pueden regular varias vías de señalización

involucradas en la progresión del CCR (Shirafkan et al., 2018), pudiendo modular diferentes reguladores de la angiogénesis (Tiwari et al., 2018) y de la TEM (Pan et al., 2021) , como revela la investigación de Zhu y colaboradores en donde hallaron que miR-1 inhibe la angiogénesis en el CCR suprimiendo la expresión del VEGF a través de las vías de las MAPKs y de PI3K/Akt (Zhu et al., 2018) . Además se ha demostrado que las vías de las MAPKs regulan la acción de miRs, ya que estas quinasas modulan la fosforilación de TRBP, un componente del complejo de la biogénesis de miRs (Paroo et al., 2009), por lo que la desregulación de la actividad de miRs específicos se ha asociado a la influencia de diferentes citoquinas del microambiente que promueven la activación anómala de estas vías de señalización.

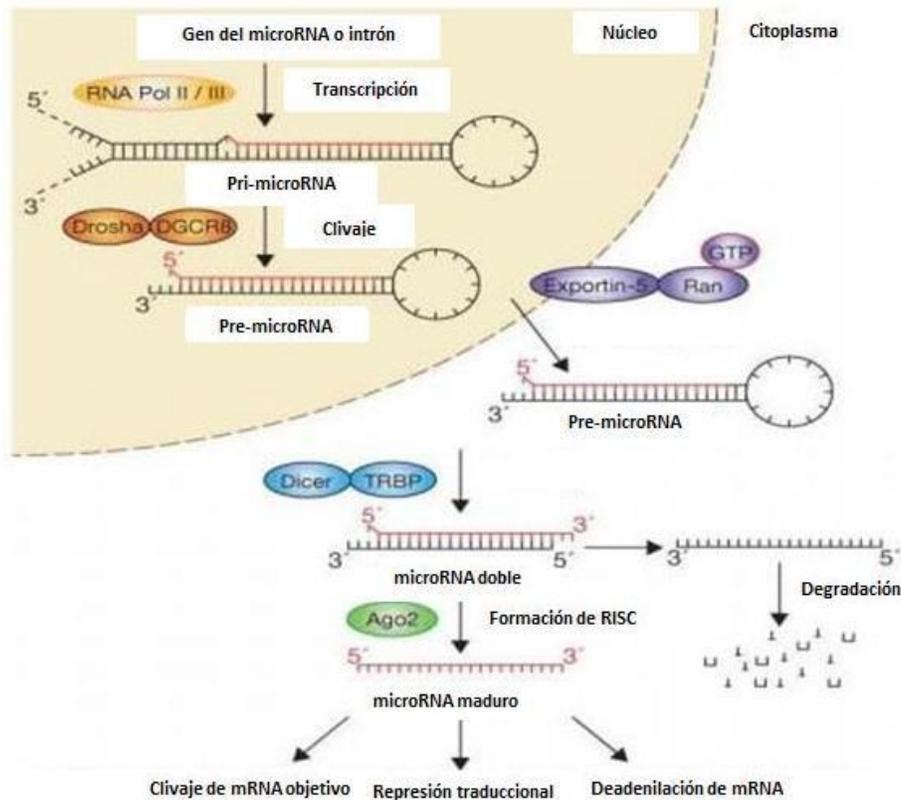


Figura 11. Procesamiento y función de miRNAs. La vía de procesamiento de miRs incluye la producción de la transcripción primaria de miRs (primiARN) por la ARN polimerasa II o III y escisión del primiARN por el complejo microprocesador Drosha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo. El precursor de la horquilla resultante, el pre-miARN, se exporta desde el núcleo al citoplasma por Exportin-5-Ran-GTP. En el citoplasma, la ARNasa Dicer forma un complejo con la proteína de unión a ARN bicatenario TRBP y escinde la horquilla pre-miARN a su longitud madura. La cadena funcional del miARN maduro (roja) se une a la proteína Argonauta 2 (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde guía a RISC para silenciar a los ARNm diana a través de la escisión del ARNm, la represión traduccional o la deadenilación, mientras que la hebra pasajera (negra) se degrada. Adaptado de Winter et al., 2009.

1.8 Antecedentes previos del tema al comenzar el Trabajo de Tesis Doctoral

Al inicio de esta Tesis Doctoral ya se habían generado antecedentes en el tema que permitieron el diseño de la hipótesis de trabajo. Mediante la implementación de diferentes ensayos, se halló que PTHrP (1-34) a la dosis de 10^{-8} M favorece la supervivencia y estimula la progresión del ciclo celular y la proliferación de células Caco-2 derivadas de CCR (Lezcano et al., 2013; Calvo et al., 2014; Martín et al., 2014). En línea con estos resultados, se observó efectos similares inducidos por la citoquina en células HCT116, una línea celular derivada de CCR más indiferenciada y agresiva con respecto a la línea Caco-2, que también expresa al RPTH1 (Martín et al., 2018). A pesar de las notables diferencias entre los fenotipos de las células Caco-2 y las células HCT116, los mecanismos moleculares que conducen a estas respuestas al péptido en ambas células de CCR fueron similares e implicaron la activación de vías frecuentemente desreguladas en el CCR. Específicamente, y como se observa en la **Figura 12**, se halló que PTHrP activa a Src, a la proteína quinasa C (PKC), a PI3K, a Akt, a dos miembros de la familia de las MAPKs, las ERK1 /2 y p38, a la proteína quinasa S6 ribosomal (RSK) y a la vía de señalización de β -catenina en las células de CCR (Calvo et al., 2017; Calvo et al., 2014; Martín et al., 2014, 2018). Empleando los inhibidores de PKC, Src y PI3K, se encontró que la actividad de estas tres quinasas converge en la fosforilación/activación de Akt en células de CCR expuestas a PTHrP. Además, la inhibición de Akt suprimió la fosforilación/activación de ERK1/2 MAPK inducida por PTHrP, lo que sugiere un rol de Akt en la activación de esta MAPK (Martín et al., 2014, 2018). Los datos experimentales demostraron que RSK, una quinasa que fosforila residuos de serina y treonina y que está asociada con varios tipos de cáncer, es activada por PTHrP y el empleo de inhibidores específicos reveló que esta activación es mediada por la vía de señalización de ERK1/2 MAPK pero no ocurre a través de p38 MAPK (Calvo et al., 2017).

Además, como se muestra en la **Figura 12**, las vías de señalización reguladas por PTHrP son responsables de modular la expresión de varios reguladores del ciclo celular. Se demostró que PTHrP aumenta los niveles proteicos de ciclina D1, de la quinasa 6 dependiente de ciclina D y de c-Myc. Dado que c-Myc es un gen diana de β -catenina y como el tratamiento con PTHrP en células de CCR aumenta la expresión de β -catenina y su posterior translocación nuclear (Martín et al., 2014), es probable que la modulación positiva de c-Myc por PTHrP pueda ser a través de la vía de la β -catenina en los modelos celulares de CCR estudiados. Por otro lado, la acción paracrina de PTHrP disminuye la expresión de los siguientes reguladores negativos del ciclo celular: p27Kip1, p15INK4B y p53. Otros factores de transcripción relacionados con la proliferación celular también fueron activados por el tratamiento con PTHrP, como la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB por sus siglas en inglés) y el factor de transcripción activador 1 (ATF-1 por sus siglas en inglés). La preincubación de células de CCR con inhibidores específicos de las MAPKs suprimió la activación de estos factores de transcripción inducidos por PTHrP (Martín et al., 2014). En conjunto, los resultados demostraron que en las células de CCR, PTHrP favorece la progresión del ciclo celular y la proliferación a través de la modulación positiva de varias vías mitogénicas como PI3K, Akt, ERK1/2 MAPK, p38 MAPK y RSK.

Se profundizó el estudio de otras respuestas de las células de CCR al tratamiento con PTHrP, tal como la migración celular y la quimiorresistencia, ya que varias de las vías de señalización halladas de ser moduladas por la citoquina también están involucradas en estos procesos. PTHrP incrementa la motilidad de las líneas celulares derivadas de CCR; contrariamente a los resultados obtenidos al estudiar la proliferación tumoral, el efecto de esta citoquina sobre la migración fue mayor en la línea celular más agresiva, HCT116, que en la línea Caco-2. Además, las investigaciones revelaron que bajo la acción de PTHrP, las vías ERK 1/2 MAPK y RSK tienen un papel relevante en el aumento de la expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK por sus siglas en inglés) y en el efecto migratorio observado de las células derivadas de CCR (**Figura 12**) (Calvo et al., 2017). Con respecto a

los efectos relacionados a la quimiorresistencia, PTHrP disminuye la sensibilidad en ambas líneas de CCR a Irinotecán o CPT-11 (droga ampliamente empleada en el tratamiento del CCR) mediante ERK1/2 MAPK (Martín et al., 2018).

Para evaluar los efectos de PTHrP en un modelo de CCR más complejo, también se realizaron investigaciones *in vivo*. Los estudios con xenoinjertos subcutáneos de células HCT116 en un modelo murino revelaron que la administración intratumoral de PTHrP también estimula la expresión de ERK 1/2 MAPK y de otros reguladores asociados a eventos tumorigénicos tales como Ki67, ciclina D1, CREB/ATF-1 y RSK. Estos datos validaron parte de los resultados que se observaron *in vitro* (Calvo et al., 2017; Martín et al., 2018).

A pesar de estos hallazgos que revelaban diversos efectos de PTHrP en modelos de CCR tanto *in vitro* como *in vivo*, al momento de comenzar con el desarrollo de este Trabajo de Tesis se desconocía si la citoquina era capaz de modular la angiogénesis tumoral y la TEM, ambos procesos asociados a la capacidad migratoria y característicos del fenotipo invasivo que permite la progresión y metástasis del CCR.

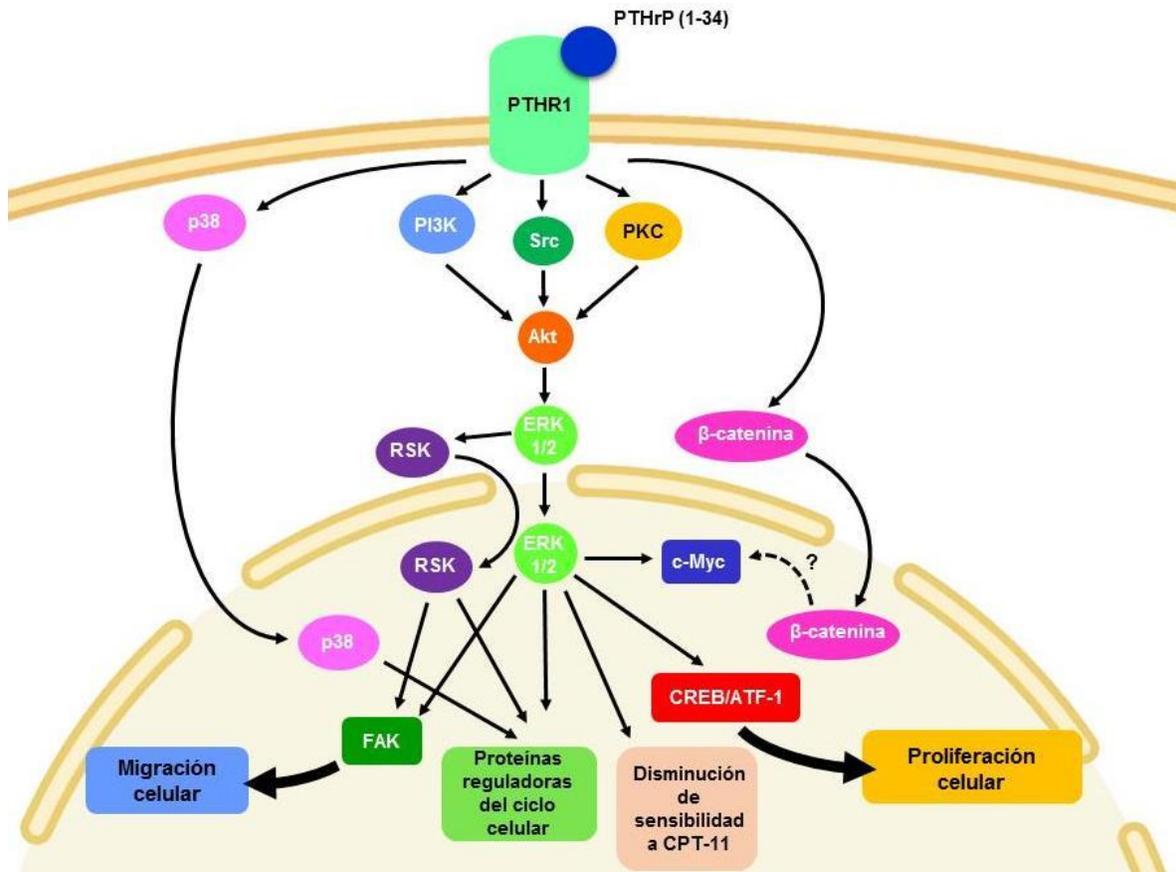
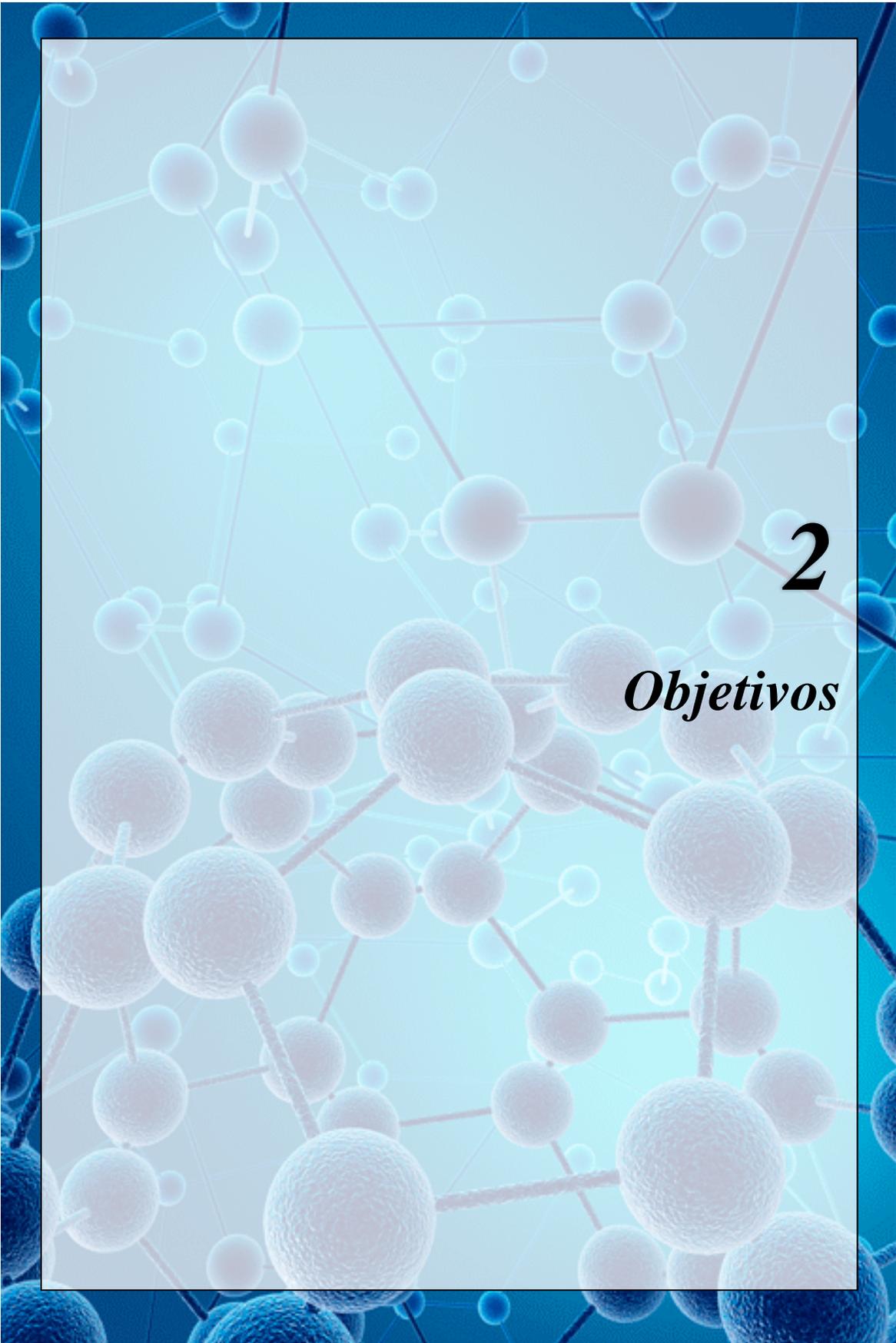


Figura 12. Mecanismos moleculares implicados en los efectos de PTHrP en las células de CCR. PTHrP induce la progresión del ciclo celular y la proliferación de células derivadas de CCR a través de Src, ERK 1/2 y p38, ambos miembros de la familia de las MAPKs, PI3K/Akt, RSK y la vía de señalización de β -catenina. PTHrP promueve la expresión de FAK y la migración de células de CCR a través de la vía de señalización ERK/RSK. PTHrP además disminuye la sensibilidad en ambas líneas de CCR a CPT-11 mediante ERK1/2 (Calvo et al., 2014; Martín et al., 2014; Calvo et al., 2017; Martín et al., 2018). Adaptado de Novoa Díaz et al., 2021.



2

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

A partir de los antecedentes previos en el tema, en este trabajo de Tesis se planeó aumentar el conocimiento respecto a los efectos que ejerce PTHrP sobre células de CCR. Para tal fin se propuso investigar si esta citoquina es capaz de modular otros eventos asociados al comportamiento agresivo de células de CCR tales como la angiogénesis tumoral y el programa TEM evaluando los mecanismos moleculares involucrados. Para cumplir con este objetivo general se utilizaron las líneas celulares Caco-2, HCT116 y HMEC-1 derivadas de adenocarcinoma de colon humano, carcinoma de colon humano y de endotelio de la microvasculatura humana respectivamente. Además se empleó un modelo murino de xenoinjerto subcutáneo de la línea tumorigénica HCT116 como modelo *in vivo*. Los análisis *in silico* se ejecutaron para validar los hallazgos obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

A-En los ensayos *in vitro* se propuso:

1. Investigar el proceso de la angiogénesis asociada al tumor analizando:

- El rol de PTHrP en la modulación de factores pro-angiogénicos en las células tumorales intestinales Caco-2 y HCT116.
- El rol de PTHrP sobre las células endoteliales HMEC-1 mediante su acción directa y los mecanismos moleculares involucrados.
- El rol de PTHrP sobre las células endoteliales HMEC-1 mediante su acción a través de las células tumorales y los mecanismos moleculares involucrados.

2- Investigar el proceso de la TEM explorando:

- Si el tratamiento con PTHrP en las células Caco-2 y HCT116 modula cambios moleculares y morfológicos asociados a este programa.

- Si células del microambiente tales como las células endoteliales HMEC-1 tratadas con PTHrP ejerce cambios asociados a la TEM.
- Si PTHrP induce cambios en la expresión de microARNs que participan en este proceso.

B- En los ensayos *in vivo* se propuso:

- Estudiar si la administración intratumoral de PTHrP en ratones inmunosuprimidos N:NIH(S)_nu (“nude”) corrobora lo observado en los modelos *in vitro*.

C- En el análisis *in silico* se propuso:

De acuerdo a lo observado *in vitro* e *in vivo*, explorar mediante análisis bioinformático bases de datos de muestras de pacientes con CCR con el fin de determinar la implicancia clínica de PTHrP y de los marcadores evaluados en estos procesos.



3

Hipótesis

3. Hipótesis

En base al estado de conocimiento y a los resultados previos del grupo de investigación en lo referido a modos de acción y vías de señalización implicadas, se postula que PTHrP *in vitro* puede promover características que son propias de un fenotipo agresivo de las células tumorales intestinales. Se presume que los cambios moleculares y fenotípicos conferidos por PTHrP podrían asociarse a eventos tales como los procesos de angiogénesis y TEM. Al tratarse de un péptido de acción predominantemente paracrina se estima que su acción exógena, junto a la de otras citoquinas, podría estar mediada por células endoteliales y otras del microambiente. Se plantea que su acción intratumoral en el modelo *in vivo* reflejará lo observado *in vitro* y además permitirá evidenciar otras respuestas debido a la mayor complejidad del modelo.

Con respecto a los análisis *in silico*, se postula que la exploración de datos genómicos y proteómicos en repositorios públicos respaldará los hallazgos previos en modelos *in vitro* e *in vivo* de CCR y reforzará la relevancia de evaluar ciertos marcadores en muestras humanas de CCR.



4

Materialles y Métodos

4. Materiales y Métodos

A- Modelos experimentales

A.1-Modelos *in vitro*: células tumorales intestinales y células endoteliales. Cultivo y tratamiento.

Células Caco-2

Las células Caco-2 (Cancer coli-2) corresponden a una línea celular derivada de adenocarcinoma colorrectal de un hombre de 72 años, desarrollada por el Instituto Sloan-Kettering de Investigación del Cáncer de Estados Unidos a través de los estudios llevados a cabo por el Dr. Jorgen Fogh (Fogh, 1977). Si bien derivan de un adenocarcinoma colorrectal, cuando se cultivan en condiciones específicas y de confluencia alta durante 14 a 21 días, las células muestran características de diferenciación a enterocitos. Las células Caco-2 presentan uniones estrechas, microvellosidades y expresan enzimas y transportadores propios de este tipo de enterocitos como peptidasas, esterasas, P-glicoproteína y transportadores de captación de aminoácidos, entre otros. La mayoría de las células son cúbicas y cuando confluyen, parecen tener un borde muy definido (**Figura 13A**). Al tener una tasa de duplicación más lenta que otras líneas celulares (3 a 4 días) requiere un cambio de medio a las 48 hs.

Células HCT116

La línea tumoral intestinal HCT116 es derivada de un carcinoma colorrectal de un hombre adulto; las células presentan morfología epitelial (**Figura 13B**) y se caracterizan por una alta inestabilidad microsatelital debido a que poseen más del 30 % de sus secuencias microsatélites mutadas (Lengauer et al., 1997). Los estudios muestran que las células HCT116 provienen de un tumor primario, expresan un perfil genético asociado al colon derecho (Ahmed et al., 2013) y tienen capacidad tumorigénica cuando son inyectadas en

ratones inmunodeprimidos (Brattain et al., 1981), por lo que fueron utilizadas en el modelo *in vivo* empleado que se describe posteriormente.

Células HMEC-1

Al igual que las células tumorales intestinales empleadas, las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas inmortalizadas HMEC-1 son adherentes y crecen en monocapa (**Figura 13C**). Fueron originadas a partir de la transfección de células endoteliales microvasculares aisladas de prepucios humanos neonatos con el vector pSVT, un plásmido que contiene la región codificante para el gen de la proteína del SV40, antígeno T grande, y su expresión está impulsada por la repetición terminal del virus del sarcoma de Rous. Poseen características morfológicas y funcionales de las células endoteliales normales, como la expresión de marcadores característicos como CD31 y CD36, y la formación de estructuras capilares (Ades et al., 1992).

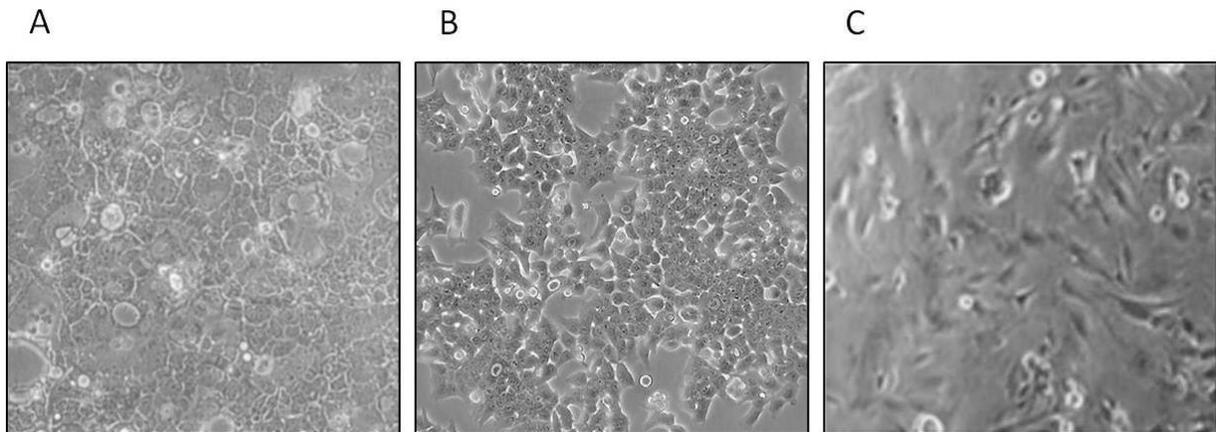


Figura 13. Microfotografías de las líneas celulares empleadas como modelos experimentales *in vitro*. Cultivo en confluencia alta de (A) Células Caco-2 (ATCC), (B) Células HCT116 (ATCC) y (C) Células HMEC-1. Adaptado de Muñoz-Vega et al., 2018. Contraste de fase, 100 X.

Las líneas celulares Caco-2 y HCT116, y la línea celular HMEC-1 proveniente de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU (ATCC), se cultivaron a 37 °C en medio de cultivo alto en glucosa de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE. UU.), adicionado con: suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor e irradiado (Natocord, Córdoba, Argentina), 1% de aminoácidos no esenciales, 100 UI / ml de penicilina, 100 mg / ml de estreptomina y 50 mg / ml de gentamicina en una atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ en aire.

Todos los experimentos se realizaron utilizando cultivos con menos de 15 pasajes. Considerando que los tiempos de duplicación son de 72-96 horas y 25-35 horas para las líneas Caco-2 y HCT116, respectivamente, y de 24-30 hs para la línea HMEC-1, se mantuvieron los cultivos experimentales con una confluencia de 70-80% (como máximo) en medio de cultivo con 10% de SFB.

Para iniciar los experimentos las tres líneas celulares fueron lavadas con buffer PBS estéril (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; pH: 7,2-7,4) y se privaron de SFB para sincronizar la población celular en fase quiescente G₀/G₁ y establecer condiciones experimentales reproducibles (van der Valk et al., 2010). Las células HCT116 y HMEC-1 se privaron de suero por 2 horas y las células Caco-2 por 24 horas antes del tratamiento correspondiente. Estos tiempos fueron seleccionados de acuerdo a trabajos previos (Calvo et al., 2014; Prigozhina et al., 2011). Luego, y dependiendo del objetivo de los ensayos experimentales, las células fueron incubadas directamente con PTHrP (1-34) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU) que fue vehiculizada en DMEM con o sin SFB (según experimento) y utilizada a una dosis de 10⁻⁸ M o las células fueron incubadas con medios condicionados obtenidos como se describe posteriormente. También se realizaron experimentos de co-cultivo entre las células endoteliales y las tumorales usando filtros transwell, tal como se detallan en la Sección B.3.3. La dosis de exposición de PTHrP (1-34) se seleccionó en base a los resultados previamente obtenidos en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis que demostraron que tanto en las células Caco-2 como en las células HCT116 esta citoquina a una concentración de 10⁻⁸

⁸M ejerce varios efectos los cuales fueron mencionados en la Introducción (Lezcano et al., 2013; Calvo et al., 2014; Martín et al., 2014; Calvo et al., 2017; Martín et al., 2018).

En los experimentos donde se inhibieron vías de señalización, las células fueron preincubadas con los inhibidores correspondientes por 30 minutos y los controles fueron tratados con el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración menor a 0,1%. Los inhibidores empleados fueron PD98059 (20 μ M) (un inhibidor de MEK, que es la quinasa activadora de ERK1/2 MAPK), LY294002 (50 μ M) (un inhibidor de PI3K) (ambos de Calbiochem, San Diego, California, EE. UU.) y GSK690693 (50 μ M) (un inhibidor de la quinasa Akt) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE. UU.). Las dosis de los inhibidores se seleccionaron según estudios previos (Calvo et al., 2014; Lezcano et al., 2013; Martín et al., 2014). En las condiciones en las que se agregó SPARC exógeno, se empleó la proteína SPARC humana recombinante (Novus Biologicals, EE.UU) NBP2-35270 - 50 μ g a una concentración de 750 ng/ml de acuerdo con Drev y colaboradores (Drev et al., 2019).

A.2-Modelo *in vivo* de xenotrasplante de células HCT116

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones inmunodeficientes (“nude”: N:NIH(S)_nu) que poseen alterado tanto la diferenciación como la proliferación de células epiteliales tímicas y progenitores de linfocitos T debido a la ausencia de la proteína Foxn1 originada por la mutación recesiva nu/nu (Sun et al., 2014). Esta limitación inmunológica permite el crecimiento de células de xenotrasplante. Los ratones fueron proporcionados por el Bioterio apto para este tipo de ratones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). La crianza y el manejo de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas institucionales de dicha Facultad. Los experimentos fueron realizados en el Bioterio de FCV-UNLP.

Se inyectaron 1×10^6 de células HCT116 por vía subcutánea en los flancos dorsales derechos de ratones N:NIH (S) _nu machos de 6 semanas de edad y de entre 25 y 30 gramos de peso. Cuatro días después de la inoculación, los animales fueron asignados al azar a grupos de control o tratamiento ($n=6$ / grupo). A los ratones se les administró diariamente mediante inyección intratumoral PTHrP ($40 \mu\text{g} / \text{kg}$ en $100 \mu\text{l}$ de PBS) o el mismo volumen de PBS como control. Se respetó el mismo esquema de administración de estudios previos del laboratorio donde se realizó este Trabajo de Tesis (Calvo et al., 2017; Martín et al., 2018). La forma diaria de administración tuvo como objetivo mantener constante el nivel del péptido en el área del tumor. Después de 20 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron utilizando como agente químico CO_2 . El método de eutanasia se eligió de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council ("Guid. Care Use Lab. Anim.," 2011). Los tumores se extirparon y se pesaron. Una parte de cada tumor se fijó con solución de formaldehído neutro al 4% para el análisis inmunohistoquímico mientras que otra parte se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el análisis correspondiente mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, tal como se detalla posteriormente. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur y por el Consejo Departamental de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS según resoluciones CDBByF 429/14-CDBByF 296/16, con renovación de vigencia según resolución DBByF 074/17.

B- Métodos experimentales

B.1 Obtención de medios condicionados tumorales (MCT)

Se obtuvieron medios condicionados tumorales (MCT) a partir de medios de cultivo de células Caco-2 o HCT116 después de 24 horas de incubación con PTHrP (1-34) 10^{-8}M o con el vehículo de PTHrP como control manteniendo siempre la misma relación

células/volumen. En los experimentos donde se inhibieron vías de señalización, las células fueron preincubadas con los inhibidores correspondientes como se detalló previamente. Los MCT se recolectaron y centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Cada experimento se llevó a cabo con MCT obtenido de forma independiente.

B.2 Obtención de medios condicionados endoteliales (MCE)

Se obtuvieron medios condicionados endoteliales (MCE) de medios cultivados de células HMEC-1 después de 16 horas de incubación con 10^{-8} M de PTHrP (1-34) o con el vehículo de PTHrP, tal como se describió previamente en las células tumorales. Luego de la centrifugación, los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta su uso para el tratamiento de células HCT116 o para su análisis por ELISA en el laboratorio de Oncología Celular y Molecular (LOCyM) de la Universidad de Chile (como se describe en *Métodos B.12*). Cada experimento se llevó a cabo con MCE obtenido de forma independiente. Se cuantificó el contenido de las proteínas de las células a partir de las cuales se obtuvieron los MCT o los MCE por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) para normalizar los resultados. Para ello, se tomaron alícuotas del lisado celular por duplicado; se agregó 2,5 ml de reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L; etanol 4,75% y ácido fosfórico 8,5%), se incubó durante 5 minutos y las absorbancias se midieron a 595 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU530. Como estándar de concentración conocida se empleó 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés).

B.3 Ensayos en células endoteliales para evaluar la angiogénesis *in vitro*

La angiogénesis *in vitro* se evaluó en las células HMEC-1 mediante el análisis de los cambios en el número de células, la migración y la formación de tubos, como se detalla a continuación.

B.3.1 Tinción con cristal violeta

Las células HMEC-1 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (20.000 células/pocillo) por triplicado y tratadas con los MCT correspondientes o el péptido a 37 °C durante 24 horas. Luego las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol durante 10 minutos a -20 °C y se tiñeron con una solución de 0,1 % de cristal violeta (MERCK Argentina) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se solubilizó el colorante que tiñe las células con ácido acético al 10% y se midió la absorbancia de la solución, que es proporcional al número de células, a 595 nm.

B.3.2 Prueba de exclusión del colorante azul de Tripano

Luego del tratamiento, las células endoteliales se lavaron con PBS, se tripsinizaron para separarlas de las placas a las cuales estaban adheridas y se tiñeron con una solución 0,4 % del colorante azul de Tripano (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE. UU.). Se visualizaron las células empleando un microscopio y una cámara de Neubauer y se contaron aquellas viables que excluyeron el colorante.

B.3.3 Ensayo CellTiter-Blue®

Se empleó el kit comercial CellTiter-blue® Assay (Promega, Estados Unidos). Este método colorimétrico se basa en que las células viables, metabólicamente activas, retienen la habilidad de reducir resazurina a resorufina. La máxima absorción de resazurina (azul) es a 605 nm y la de resorufina (rosa) es a 573 nm. Además, la resorufina es un producto

fluorescente siendo su longitud de onda de excitación de 530nm y su longitud de onda de emisión de 590nm. Las células endoteliales fueron sembradas en placas de 96 pocillos (20.000 células/pocillo) por triplicado. Luego del tratamiento con los MCT o el péptido, las células fueron incubadas con 10 µl de reactivo durante 1 hora a 37°C, después fueron lisadas empleando una solución de 3% de dodecil sulfato de sodio (SDS), el medio fue recolectado y la fluorescencia emitida por la resorufina se leyó a 590 nm empleando un lector de placas. Se realizó en forma paralela un blanco de reactivos en un pocillo libre de células. Los resultados fueron expresados como el porcentaje del valor promedio respecto al valor control.

B.3.4 Ensayo de migración de células endoteliales

Para los ensayos de migración de las células endoteliales se emplearon insertos de cultivo celular (tamaño de poro de 8 µm) en el que se sembraron 20.000 células HMEC-1 en medio sin SFB en la cámara superior de filtros Transwell de 24 pocillos. Luego, en las cámaras inferiores se agregaron MCT obtenido como se describió anteriormente para evaluar el efecto indirecto de PTHrP. El agregado de MCT fue para promover la migración de las células HMEC-1 desde la parte superior de los filtros Transwell hacia la cámara inferior. En otros estudios, para analizar el efecto directo de PTHrP, el medio del inserto superior (donde estaban las células HMEC-1 sembradas) se reemplazó por medio libre de SFB con o sin PTHrP y se agregó en la cámara inferior medio que contenía 5 % de SFB como quimioattractante (para promover la migración de las células HMEC-1 desde la parte superior de los filtros Transwell hacia la cámara inferior). En forma paralela se procesó controles negativos que contenían en la cámara inferior medio sin SFB.

Para los ensayos de co-cultivo las células Caco-2 o HCT116 (15.000 células por pocillo) se sembraron durante 48 horas en la cámara inferior de los filtros Transwell, luego se privaron de suero durante 24 o 2 horas respectivamente, y se procedió al tratamiento con o sin PTHrP para inducir la secreción de factores angiogénicos. A continuación, los insertos superiores con células HMEC-1 se colocaron en los pocillos donde las células tumorales

estaban sembradas. Después de 16 horas, las células endoteliales se lavaron con PBS 1X y se fijaron con metanol durante 10 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tiempo de 16 horas se seleccionó de acuerdo con los resultados previos de los experimentos piloto utilizando como control negativo medio libre de SFB y como control positivo medio con 5% de SFB. Luego de la fijación, se retiró con un hisopo de algodón las células de la parte superior del inserto y se tiñeron las células de la parte inferior del inserto (o sea células migradas) con cristal violeta (0,1 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para bloquear el efecto del factor proangiogénico VEGF en algunos ensayos de migración los MCT se preincubaron durante 2 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un anticuerpo neutralizante específico dirigido contra VEGF (0,1 $\mu\text{g/ml}$) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU), o con el control de isotipo coincidente IgG de conejo. La concentración de anticuerpos se eligieron de acuerdo con los datos de la literatura (Shtivelband et al., 2003).

Finalmente, en todos los experimentos las células HMEC-1 que migraron se contaron empleando un microscopio.

B.3.5 Ensayo de formación de tubos

Para evaluar la capacidad de las células endoteliales para formar una red tubular organizada se empleó el ensayo de formación de tubos utilizando una matriz de Geltrex reducida en factores de crecimiento (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU) de acuerdo a estudios previos (Chim et al., 2011). La matriz de Geltrex se descongeló a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añadió a placas de 96 pocillos (50 $\mu\text{l/pocillo}$) y se dispuso a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora para permitir la gelificación. Luego, se sembraron 20.000 células HMEC-1 por pocillo sobre la matriz de Geltrex y se incubaron con los MCT correspondientes o medio sin SFB (con o sin PTHrP) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 24 horas, las células se examinaron y fotografiaron empleando un microscopio de luz invertida con un aumento de 100x (NIKON Eclipse TieS). La formación de tubos se evaluó cuantificando el número de nodos, uniones, puntos de ramificación y la

longitud de la ramificación utilizando el programa de procesamiento de imagen del Instituto Nacional de Salud de EE.UU (NIH por sus siglas en inglés), Image J y su herramienta para analizar angiogénesis “Angiogenesis Analyzer” de acuerdo a lo descrito por Carpentier y colaboradores (Carpentier et al., 2020). En algunos experimentos, y para bloquear el efecto de VEGF, los MCT se preincubaron durante 2 horas a 37 °C con un anticuerpo neutralizante específico dirigido contra el VEGF (0,1 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU), o con el control de isotipo coincidente IgG de conejo y luego se usaron en el ensayo de Geltrex.

B.4-Técnica de Western blot

B.4.1 Obtención de lisado celular

Luego del tratamiento celular el medio de cultivo fue removido, las cajas de cultivo se colocaron en hielo y se lavaron 2 veces con PBS frío conteniendo inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM). A continuación, las células fueron lisadas en un buffer compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH: 7,4), NaCl 150 mM, KCl 3 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1%, Nonidet P-40 1%, aprotinina 20 µg/ml, leupeptina 20 µg/ml, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 1 mM, NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM y los lisados fueron colectados en tubos eppendorf, mantenidos en hielo por 10 minutos, agitados por 45 segundos y colocados nuevamente en hielo por 10 minutos. A continuación, los lisados fueron centrifugados a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C para descartar restos celulares. Se colectaron los sobrenadantes y se tomaron alícuotas para cuantificar las proteínas por el método colorimétrico de Bradford como se describió previamente.

B.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas de los lisados celulares se desnaturalizaron en buffer muestra de electroforesis 5X (Tris 0,4 M pH: 6,8; SDS 10%; glicerol 50%; ditioneitol (DTT) 7,7% y azul de bromofenol como indicador del frente de corrida) y se calentaron en baño de agua a

100°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron sembradas (30 µg proteína /calle) y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) discontinuos (gel de "stacking": 4% acrilamida, gel de separación: 10% acrilamida) según la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). SDS es un detergente que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias no unidas por disulfuro y las recubre con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, lo que permite estimar los pesos moleculares. En paralelo, se sembró un marcador coloreado de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 voltios) utilizando como buffer de corrida Tris 25 mM pH: 8,8; glicina 195 mM; SDS 0,1%.

B.4.3 Electrotransferencia e Inmunoblotting

A continuación, las proteínas separadas por SDS-PAGE según su peso molecular fueron electrotransferidas a membranas de polivinilideno bifluoruro (PVDF) de 0,45 µm (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). Las membranas se hidrataron en metanol durante 50 segundos y se equilibraron en buffer de transferencia Towbin (Tris 0,25 M pH: 8,3; glicina 0,192 M; metanol 20%) durante 5 minutos al igual que los geles. La transferencia se realizó en una cámara semi seca aplicando 125 mA por gel durante 1 ó 2 horas y embebiendo la membrana y el gel en buffer de transferencia (Towbin et al., 1992). Posteriormente los geles se tiñeron con el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 para constatar la eficiencia de la transferencia, según se detalla posteriormente.

Los sitios de ligado inespecíficos de las membranas fueron bloqueados usando el buffer TBS-T 0,1% (Tris 50 mM pH: 7,4; NaCl 200 mM; 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche descremada durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas se incubaron con la dilución apropiada de anticuerpo primario (específico para la detección de la proteína de interés y preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche descremada ó BSA) durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas con

TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y fueron incubadas con la dilución apropiada de anticuerpo secundario (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) conjugado a peroxidasa (preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche descremada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y finalmente fueron incubadas con un kit comercial de electroquimioluminiscencia (GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, EE.UU) y expuestas a placas radiográficas (Amersham Hyperfilm ECL, EE.UU) para visualizar las proteínas de interés. Las bandas obtenidas fueron digitalizadas densitométricamente y se cuantificaron usando el programa Image J.

Los anticuerpos para Western blot utilizados en esta Tesis fueron anti-fosfo ERK1/2 (1:1000), anti-E-cadherina (1:1000), anti-ZEB1 (1:750), anti-N-cadherina (1:750) de Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EE. UU. Los anticuerpos anti-CK18 (1:1000), anti-SPARC (1:500), anti-GAPDH (1:10000), anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (“HRP” por sus siglas en inglés) anti-conejo de cabra (1:5000) y anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (“HRP” por sus siglas en inglés) anti-ratón de cabra (1:10000) fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE. UU.). El anticuerpo anti-actina (1:5000) proviene de MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE. UU. El anticuerpo monoclonal de ratón contra el RPTH1 es de BAbCo (Richmond, California, EE.UU).

B.4.4 Remoción de anticuerpos de las membranas

Para remover el anticuerpo primario y secundario de las membranas y poder exponerlas a anticuerpos diferentes (“stripping”), las membranas se sumergieron en buffer stripping (Tris-HCl 62,5 mM pH: 6,8; SDS 2% y β -mercaptoetanol 50 mM) a 55°C durante 30 minutos con agitación y luego se lavaron con TBS-T 1% por 10 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo continuando con el protocolo descrito previamente.

B.4.5 Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250

Para poner en evidencia las bandas proteicas resueltas en los geles de poliacrilamida-SDS, los geles se tiñeron (2-5 minutos) con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,125%, metanol 50% y ácido acético 10% y luego el exceso de colorante se eliminó por lavados sucesivos en solución de desteñido I (metanol 50%, ácido acético 10%), desteñido II (metanol 5%, ácido acético 7%) y PBS.

B.5 Inmunocitoquímica (ICQ)

Para complementar los datos respecto a la expresión de un determinado marcador y obtener información de su localización celular, las células tumorales sembradas en cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con PBS-Triton durante 10 minutos. Después de los lavados con PBS 1X, los sitios de unión a proteínas no específicas se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las muestras se incubaron en presencia o ausencia (control negativo) del anticuerpo primario correspondiente durante la noche a 4 °C. Después de los lavados con PBS, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con los fluoróforos Cy3 (1:200) o Alexa Fluor 594 (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células también se tiñeron con el colorante nuclear específico 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (1:500), durante los últimos 30 minutos de incubación con el anticuerpo secundario para visualizar núcleos y la ubicación nuclear del marcador en estudio. Finalmente, las preparaciones se montaron con una solución de glicerol al 95% en PBS y las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia NIKON TE 2000S y un microscopio confocal láser de barrido Leica TCS SP2 AOBS.

B.6 Ensayo de cierre de herida y seguimiento morfológico en células tumorales

Una vez alcanzada la confluencia, se realizó una herida en forma de cruz manualmente en la monocapa celular con un tip y se realizaron dos lavados con PBS 1X estéril para eliminar los restos producto del procedimiento. Luego, los tratamientos se realizaron en DMEM sin SFB, como se describe en Sección A.1. Finalmente, se visualizaron las heridas al microscopio invertido y se fotografió cada una de ellas, según los tiempos programados. De esta forma, las primeras fotografías se tomaron al inicio del tratamiento, a las 5 y a las 24 horas, donde se fotografiaron los mismos campos. Para cada condición se analizó el cierre de la herida con respecto al control mediante el programa Image J-MRI Wound Healing Tool, que permite cuantificar el área que permanece libre de células.

Para evaluar los cambios morfológicos potencialmente asociados con la TEM, las células se trataron con los MCE o con medio (en ausencia o presencia de PTHrP) en un rango de tiempo comprendido entre 0 a 24 horas y los mismos campos se observaron con un microscopio y se fotografiaron para visualizar los cambios morfológicos que luego fueron analizados mediante el programa Image J. Los parámetros morfológicos cuantificados fueron área, perímetro, forma redonda, eje mayor, eje menor y relación de aspecto (AR por sus siglas en inglés) que representa la relación entre el eje mayor y el eje menor que denota el grado de elongación celular de acuerdo a estudios previos (Goto et al., 2017; Zhou et al., 2020).

B.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La proteína SPARC presente en los MCE se determinó utilizando el kit Human SPARC SimpleStep ELISA® (ab220654, Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. A diferencia del ensayo ELISA tradicional, este ensayo utiliza un anticuerpo de captura que se conjuga a la proteína de interés y un anticuerpo detector

que se conjuga con peroxidasa (HRP). El complejo formado se une a un anticuerpo monoclonal anti-tag altamente específico adherido a la superficie del pocillo. Se incubaron 50 μ L del MCE con 50 μ L de solución de anticuerpos por pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con solución de lavado y se incubaron con 100 μ L del sustrato de HRP 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de agregar la solución de detención, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placa (Biotek EL800, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.).

B.8 Inmunohistoquímica (IHQ)

Los tumores de los ratones se incluyeron en parafina y las secciones se desparafinizaron, rehidrataron y pretrataron utilizando la técnica de recuperación de antígeno mediada por calor (vapor) con solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 30 minutos a 95 °C. Luego, las secciones se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con BSA al 2% y se agregó el anticuerpo primario correspondiente durante la noche a 4 °C. Después de dos lavados con PBS, la peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ al 30 % durante 30 minutos y el anticuerpo secundario (contra la especie del anticuerpo primario y conjugado con peroxidasa) se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La tinción inmunohistoquímica se realizó manualmente con el kit comercial “ABCAM Detection IHC Kit” (ABCAM, Cambridge, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego de monitorear mediante visualización con el microscopio, la reacción de la diaminobencidina (DAB) catalizada por la peroxidasa (conjugada al complejo proteína de interés-anticuerpo primario-anticuerpo secundario) se detuvo con agua destilada, se contrastó con hematoxilina, se deshidrató y se cubrió con un cubreobjetos. Para cada muestra, la inmunotinción (por el DAB precipitado y de color marrón) se visualizó con un microscopio óptico y se analizó con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji del programa Image J (Schindelin et al., 2012).

B.9 Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Con el fin de evaluar los niveles de ARNm de los genes de interés, el ARN total fue aislado a partir de las células tumorales expuestas a los tratamientos, empleando el kit comercial “High Pure RNA Isolation kit” de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ARN de las secciones del tumor de xenotrasplante se empleó el kit de ARN “EasyPure®” (TRANS, Beijing, China) teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. Los kits utilizados permitieron realizar un método simple y rápido basado en columnas para aislar el ARN total de cada condición experimental. Las células y los tejidos fueron lisados enzimáticamente y el ARN se unió a una membrana de sílice. El ADN se digirió con ADNasa I. Después de varios lavados, el ARN de alta calidad fue eluido de la columna y recolectado en tubos eppendorf. La cantidad y calidad del ARN aislado se determinó espectrofotométricamente. Esta determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg /ml de ARN.

- Cantidad de ARN µg/ml= 40 x DO 260nm x factor de dilución.

Se consideró la ausencia de contaminación por proteínas y/o compuestos fenólicos, considerando que la relación entre las absorbancias a 260 nm/280 nm estaba comprendida entre 1,8 y 2,0. Las muestras de ARN fueron guardadas a -80 °C hasta su utilización. Luego, del ARN obtenido se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg del ARN previamente purificado utilizando el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, EE.UU) provisto de “random primers” como cebadores, y de la enzima “MultiScribe™ Reverse Transcriptase”. Se preparó en hielo la “mastermix” que incluyó 2 µl de “RTBuffer” 10X; 4,2 µl de agua libre de nucleasa; 0,8 µl de “dNTPMix” 25X (100 mM); “RTRandom Primers” 10X y 1 µl de “MultiScribe™ Reverse Transcriptase”. Luego se mezclaron 10 µl de la “mastermix” con 10 µl de ARN para cada condición experimental. A continuación, la retrotranscripción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Personal, de acuerdo al siguiente protocolo: 10

minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. La concentración de ADNc, que debe ser similar en todas las muestras, se determinó por espectrofotometría, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 33 µg/ml de ADNc:

-Cantidad de ADN hebra simple ug/ml: $33 \times \text{DO } 260\text{nm} \times \text{factor de dilución}$.

El ADNc obtenido, correspondiente a cada condición, se almacenó a -20°C hasta su utilización.

B.10 RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real (RT-qPCR) (Applied Biosystems, modelo 7500). Las reacciones de RT-qPCR se prepararon utilizando "SYBR Green master Mix" (Applied Biosystems, EE.UU). El ADNc de GAPDH se amplificó en paralelo para todos los genes como control endógeno. Para cada experimento, una reacción donde se añadió agua como muestra, sirvió como control negativo. Definido como el número de ciclos fraccionarios de qPCR en los que la fluorescencia alcanza una línea umbral fija, el valor CT se calculó para cada gen a partir del promedio de tres mediciones. La variación respecto al control endógeno (ΔCT) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{gen de interés}} - \text{CT}_{\text{gen de GAPDH}}$$

Los niveles de ARNm se calcularon de acuerdo a la fórmula $2^{-\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001) Los primers utilizados fueron los siguientes: 5'-CACCTCTGGACTTGCCTTTC-3' (forward) y 5'-GGCTGCATCTCGAGACTTTT-3' (reverse) para HIF-1 α ; 5'-TGCAGATTATGCGGATCAAACC-3' (forward) y 5'-TGCATTACATTTGTTGTGCTGTAG-3' (reverse) para VEGF; 5'-CCTTCACTTTCCTGGGTAAG-3' (forward) y 5'-CCATTCACGTCGTCCTTATG-3'(reverse) para MMP-9; 5'-AGATGTG-GAGTGCCAGATGT-3' (forward) y 5'-TAGACTGCTACCATCCGTCC-3' (reverse) para MMP-7; 5'-

TTCACAGTGGAGAGAAGCCA-3' (forward) y 5'-GCCTGGTGATGCTGAAAGAG -3' (reverse) para ZEB1; 5'-GAACGCATTGCCACATACAC-3' (forward) y 5'-ATTCGGGCTTGTTCATTC-3'(reverse) para E-cadherina; 5'-ACAGAGTGAGGAGCCTGGAGACCGA-3' (forward) y 5'-CAGTATTTGCGAAGA TCTGAGCCCTC-3'(reverse) para Citoqueratina 18; 5'-AACCGAAGAGGAGGTGG-3' (forward) y 5'- GCA AAG AAG TGG CAG GAA GA -3' (reverse) para SPARC; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3' (forward) y 5'-TCCACCACCTTGTGCTGTA-3'(reverse) para GAPDH.

B.11 Extracción de ARNs pequeños y síntesis de ADNc

Para el análisis de miRs, se realizó la extracción de ARN utilizando el kit de extracción mirVana (Thermo Fisher, EE.UU). El protocolo utilizado fue el indicado por el fabricante para células en adhesión. Luego de la lisis celular con el "Lysis/Binding Buffer", se realizó una extracción de ARN total con fenol ácido:cloroformo pH:4.5 (con alcohol isoamílico, 125:24:1) (AM9720, Thermo Fisher, EE.UU) y mediante centrifugación a 10000 x g por 5 minutos a 4°C se recuperó la fase acuosa (fase en la que se encuentra el ARN). Posteriormente, se agregaron 1/3 de etanol del volumen recuperado de la fase acuosa y la mezcla se cargó en una primera columna con un filtro de fibra de vidrio obteniendo los ARNs pequeños (<200 pb) en la elución. Para enriquecer la fracción de ARNs pequeños dentro de la cual se encuentran los miRs, se agregaron 2/3 de etanol del volumen de eluido obtenido y se realizó una segunda filtración en una columna con filtro de vidrio. El eluido final se almacenó a - 80°C.

Con la fracción extraída de ARNs menores de 200 pb (ARNs pequeños), se realizó la transcripción reversa de los miRs de interés utilizando un kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher, EE.UU), con la finalidad de obtener el ADNc, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Se preparó la "mastermix" (para una reacción: 0,15 µl de dNTPs 100mM; 1 µl de transcriptasa reversa Multiscribe®; 1,5 µl buffer 10X; 0,19 µl inhibidor de

ARNasa y 4,16 μl de agua libre de nucleasa), el cual se mantuvo en hielo. Para cada reacción de retrotranscripción se utilizaron 5 μl de miRs con una concentración total de 10 ng y 7 μl de master mix. Posteriormente, se agregaron 3 μl de primers incluidos en el kit “TaqMan MicroRNA Assay” (Thermo Fisher, EE.UU) para las hebras 3p y 5p de los miRs miR-423 y miR-27a. La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador aplicando el siguiente protocolo: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y 10 minutos a 4°C. Lo anterior permitió obtener los ADNc que se almacenaron a -80°C.

B.12 RT-PCR cuantitativa con sondas TaqMan

Para medir la expresión de los miRs de interés, se utilizó la técnica de RT-qPCR con sondas TaqMan, la cual entrega valores cuantitativos de expresión a través de la medición de fluorescencia debido a la presencia de sondas marcadas con fluorocromos que se unen específicamente a la secuencia en estudio. Se utilizó el protocolo diseñado por el fabricante. Se preparó un mastermix para los miRs en estudio tanto para la hebra 3p como la 5p. La mastermix incluyó 10 μl de TaqMan® Universal Master Mix II, sin UNG (Thermo Fisher, EE.UU), 7,67 μl de agua libre de nucleasa, 1,0 μl de sonda TaqMan incluida en el kit “TaqMan® MicroRNA Assay” y 1,33 μl de ADNc. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un equipo StepOne Plus Real-Time PCR (Thermo Fisher), de acuerdo al siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C, y luego 40 ciclos a 95°C por 15 minutos y 60°C por 1 minuto. Cada reacción de RT-qPCR se realizó por triplicado y se cuantificó por el método $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Para normalizar los datos se utilizó el ARN nuclear pequeño U6 como control endógeno.

B.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó una prueba t de Student de dos colas (Snedecor y Cochran, 1989) y la igualdad de varianza para determinar las diferencias significativas

entre dos grupos de datos. Los valores de $P < 0,05$; $< 0,01$; $< 0,001$ indicados con asteriscos (*; **; *** respectivamente), se consideraron estadísticamente significativos. Los datos obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado se presentaron como media \pm DE.

B.14 Análisis Bioinformático

Se empleó la plataforma GEO (Gene Expression Omnibus) para la obtención de cuatro conjuntos de datos de expresión por microarray de pacientes con CCR. Se obtuvieron datos de las siguientes accesiones: GSE41258: Affymetrix Human Genome U133A Array - 54 muestras normales y 186 muestras de tumor primario; GSE37364: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array - 38 muestras normales y 27 muestras de tumor primario; GSE68468: Affymetrix Human Genome U133A Array - 53 muestras normales y 186 muestras de tumor primario y GSE9348: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array - 12 muestras normales y 70 muestras de tumor primario. Las muestras se dividieron en dos grupos de acuerdo al tipo de muestra. Para obtener los genes expresados diferencialmente (GED), los datos fueron analizados por GEO2R para identificar GED en las muestras normales y tumorales. El criterio empleado fue el de factor de proporcionalidad (del inglés *fold-change* o *FC*) para evaluar el nivel de expresión media (e) para cada gen siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_2\text{FC} = e_{\text{Tumor}} - e_{\text{Normal}}$$

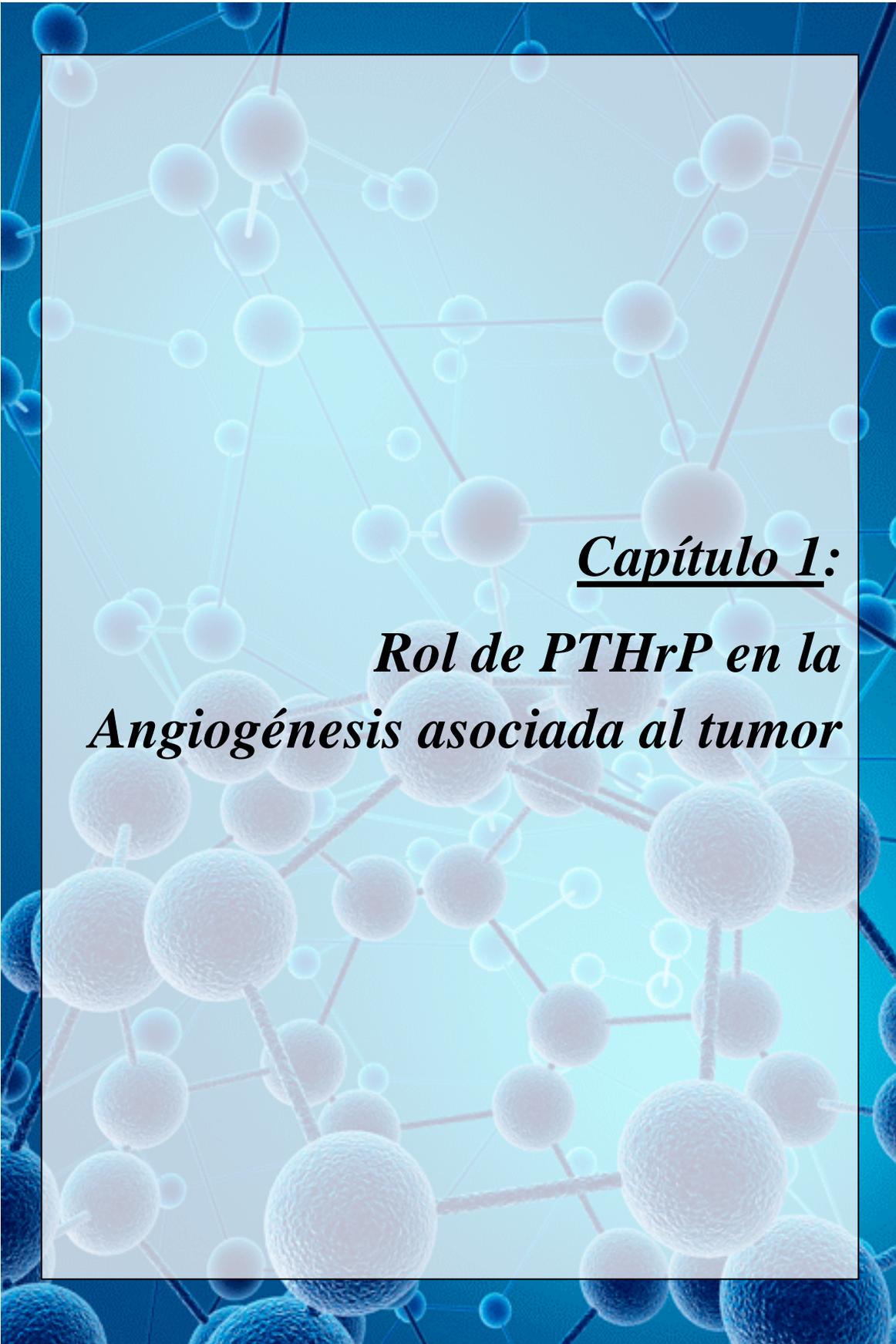
A continuación se seleccionó para los genes sobreexpresados un umbral de $\text{FC} > 2$ (un nivel de expresión mayor al doble) que corresponde a un $\text{Log}_2\text{FC} > 1$. Para los genes regulados negativamente se seleccionó un umbral de $\text{FC} < 1/2$ (un nivel de expresión menor que la mitad) que corresponde a un $\text{Log}_2\text{FC} < -1$. Para la inferencia estadística se consideró por t-student moderado una probabilidad de $p < 0,05$ y un p ajustado por Benjamini y Hochberg (tasa de descubrimiento falso o FDR por sus siglas en inglés) de $q < 0,05$, que corrige el

valor p inicial considerando el testeo múltiple (Glickman et al., 2014). Estos GED se incorporaron al programa FunRich 3.1.3 (“Functional Enrichment analysis tool”) (Fonseka et al., 2021) y se analizó el enriquecimiento funcional por Enrichr (Xie et al., 2021). Se exploraron las bases de datos EMTome (<http://www.emtome.org/>) (Vasaikar et al., 2021), GEPIA2 (“Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2”) (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) (Tang et al., 2019) y STRING 11.5 (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2021), para explorar la implicancia clínica y la interacción entre los genes evaluados en esta Tesis. Además se utilizó el programa Cytoscape 3.8.2 y su aplicación stringApp (Doncheva et al., 2019), para integrar los datos de expresión de los GED en redes importadas de la base de datos STRING de interacción proteína-proteína (IPP) para visualizar redes moleculares centrales relacionadas con el CCR.



5

Resultados



Capítulo 1:
***Rol de PTHrP en la
Angiogénesis asociada al tumor***

5. Resultados

Capítulo 1: Rol de PTHrP en la Angiogénesis asociada al tumor

La angiogénesis tumoral es un mecanismo a través del cual el tumor puede generar vasos sanguíneos y es esencial para su desarrollo y su capacidad metastásica. En condiciones fisiológicas durante el desarrollo fetal y en el adulto es un evento que depende de un balance entre la expresión de factores anti y proangiogénicos que son modulados por diferentes vías de señalización. En el cáncer este balance se pierde al incrementarse la expresión y/o liberación de factores proangiogénicos que provocan la activación de las células endoteliales del microambiente estimulando su proliferación y su capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Como producto de este desequilibrio, los vasos sanguíneos tumorales no se forman completamente, presentan irregularidades, uniones débiles entre células endoteliales y una membrana basal incompleta lo que no permite una oxigenación eficiente (Mander y Finnie, 2018).

Dentro de este evento clave en la progresión tumoral, el rol de PTHrP en la angiogénesis se ha evaluado en diferentes tipos de tumores, sin embargo su participación en este proceso es controversial como se analizará en la sección Discusión. Además en el contexto del desarrollo del CCR su rol se desconocía al momento del comienzo de esta Tesis. No obstante, y como se comentó en la sección Introducción, se había demostrado previamente en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis que PTHrP activa varias vías de señalización tales como ERK1/2, p38 MAPK y PI3K/Akt (Calvo et al., 2017, 2014; Lezcano et al., 2013; Martín et al., 2014) que son capaces de modular la expresión de factores proangiogénicos (Hammoud et al., 2016; Xu et al., 2015).

Por lo tanto, en este primer Capítulo se exploró, utilizando modelos *in vitro e in vivo*, si PTHrP en su rol como citoquina promueve la expresión de factores proangiogénicos y eventos asociados, con el fin de evidenciar si es un mediador en la interacción entre las células tumorales intestinales y las células endoteliales en el proceso de angiogénesis.

Sección 1: Estudio del efecto de PTHrP en la modulación de la expresión de factores proangiogénicos en células tumorales intestinales

1.1 PTHrP aumenta los niveles de ARNm de los factores implicados en la angiogénesis, VEGF, HIF-1 α , MMP-9 y MMP-7 en las líneas celulares Caco-2 y HCT 116

Para evaluar el posible rol de PTHrP en la angiogénesis asociada al tumor, inicialmente se exploró su efecto en la expresión del factor angiogénico VEGF en las células tumorales intestinales Caco-2 y HCT116. Los ensayos de RT-qPCR revelaron que los niveles de ARNm de VEGF aumentan después del tratamiento con PTHrP (10^{-8} M) durante 20 horas en ambas líneas celulares (**Figura 14**). Además, el péptido también aumentó los niveles de ARNm de otras moléculas involucradas en la angiogénesis como MMP-9, HIF-1 α y MMP-7 (**Figura 14**).

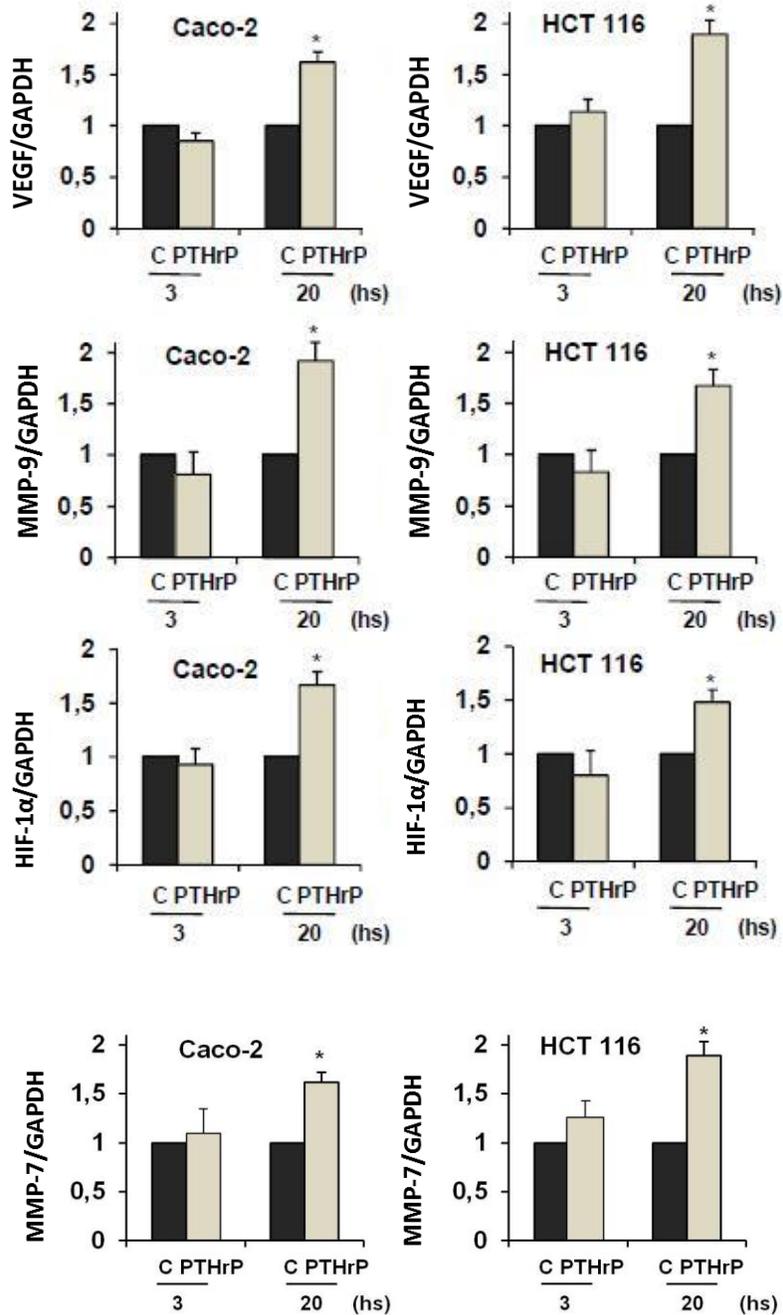


Figura 14. PTHrP aumenta los niveles de ARNm de los factores implicados en la angiogénesis VEGF, MMP-9, HIF-1α y MMP-7 en las líneas celulares Caco-2 y HCT116. Las células tumorales intestinales se trataron con o sin PTHrP 10^{-8} M durante 3 y 20 horas y los niveles de ARNm de estos factores proangiogénicos se analizaron mediante RT-qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Los gráficos de barras representan los niveles

de ARNm de VEGF, HIF-1 α , MMP-9 y MMP-7 de tres experimentos independientes.

*p<0,05 con respecto al control.

Sección 2: Estudio de eventos en las células endoteliales asociados a la angiogénesis tumoral bajo la acción de PTHrP

2.1 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan el número de células endoteliales

La angiogénesis tumoral se establece y mantiene mediante una compleja comunicación entre las células tumorales y las células endoteliales. Por lo tanto, empleamos células HMEC-1, una línea celular inmortalizada de células endoteliales microvasculares humanas, y los MCT para evaluar el efecto sobre las células endoteliales de los factores liberados por las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP y de esta manera probar el potencial angiogénico tumoral del péptido *in vitro*.

Con ese fin, primero llevamos a cabo estudios para probar si los MCT de células de CCR tratadas con PTHrP por 24 horas modifican el número de células endoteliales. Se estimó el número de células usando cristal violeta, un colorante básico que tiñe los núcleos celulares, y se observó que los MCT aumentaron la absorbancia en un 23,2 % (MCT de células Caco-2 tratadas con PTHrP) y en un 27,4 % (MCT de células HCT 116 tratadas con PTHrP) con respecto a las células expuestas a MCT de control (**Figura 15A**). Además, el recuento de células vivas en una cámara de Neubauer (que no se tiñen por exclusión del azul de tripano) reveló un aumento del 53 % y del 62 % en el número de células endoteliales después de 24 horas de exposición al MCT de células Caco-2 o HCT 116 tratadas con PTHrP, respectivamente (**Figura 15B**).

A partir de los resultados obtenidos con los colorantes cristal violeta y azul de tripano, seguidamente decidimos emplear el kit comercial CellTiter-blue® Assay (Promega, EE.UU). Las células endoteliales expuestas por 24 horas con el MCT de células Caco-2 o HCT116 tratadas con PTHrP fueron incubadas con resazurina con el fin de evaluar la capacidad

metabólica de estas células como indicador de viabilidad celular. Se encontró que los MCT de las células Caco-2 y de las células HCT116 tratadas ambas con PTHrP aumentaron la biorreducción de resazurina en las células endoteliales respecto al control (49,8 % y 57,3 % respectivamente) (**Figura 15C**).

En conjunto, estos resultados indican que los MCT de células tumorales intestinales tratadas con PTHrP aumentan el número de células endoteliales viables. Basados en estos hallazgos, luego estudiamos si el mayor número de células HMEC-1 se debe a una mayor tasa de proliferación, a una menor tasa de muerte celular o ambas. Así que evaluamos la expresión de marcadores moleculares relevantes asociados con la regulación de la apoptosis y la proliferación mediante análisis de Western blot. Tal como se observa en la **Figura 16**, los MCT incrementan los niveles proteicos del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés), que es un indicador de proliferación celular en el CCR (Zhou et al., 2018); sin embargo, los niveles de expresión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP por sus siglas en inglés), que es un marcador apoptótico, no cambiaron. Aunque estos resultados sugieren un efecto proliferativo, se requieren más investigaciones para confirmar esta acción del péptido.

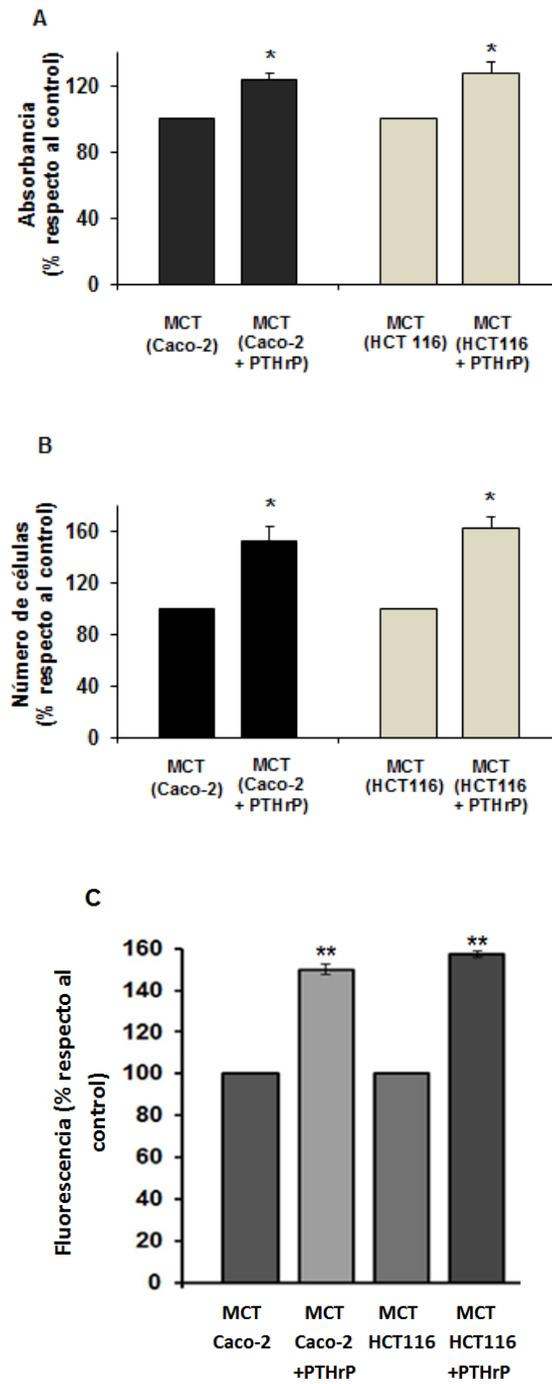


Figura 15. Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan el número de células endoteliales. (A) Tinción con cristal violeta. Se sembró una placa de 96 pocillos con células HMEC-1 (20.000 células/pocillo) y se cultivó con los MCT correspondientes a

37 °C durante 24 horas. Luego, se determinó el número de células viables mediante tinción con cristal violeta como se describe en Materiales y Métodos. **(B)** Exclusión del colorante azul de tripano. Los recuentos de células se realizaron en una cámara de Neubauer mediante la técnica de exclusión de azul de tripano. Los datos mostrados son el promedio del número de células con respecto al control de tres experimentos independientes. **(C)** El número de células viables se determinó mediante tinción con resazurina. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al control de tres mediciones independientes realizadas por triplicado. *P <0.05, **P <0.01 con respecto al control correspondiente.

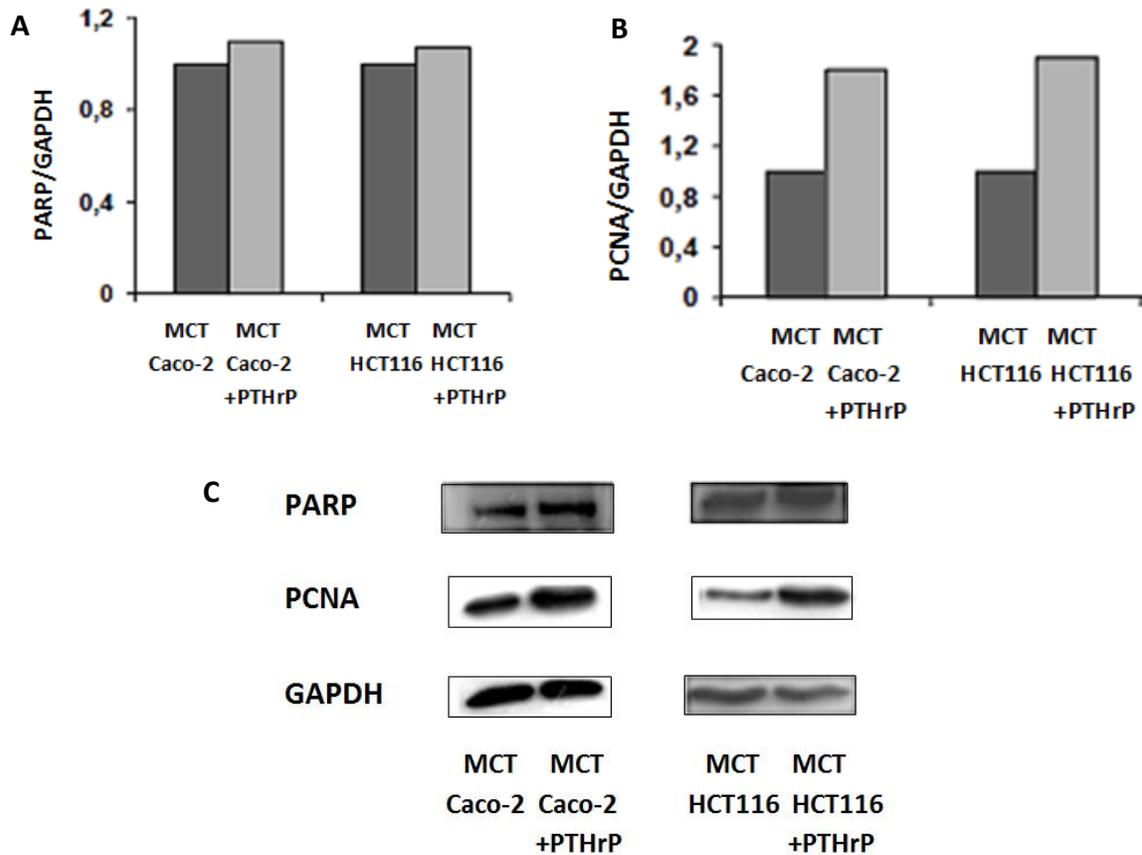


Figura 16. Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan los niveles proteicos de PCNA. Las células HMEC-1 se trataron con los MCT correspondientes durante 24 horas y luego se realizaron análisis de Western blot usando anticuerpos específicos (A) anti-PARP y (B) anti-PCNA. Además se empleó el anticuerpo anti-GAPDH para determinar los niveles de la proteína GAPDH como control de la cantidad de proteínas presentes en la membrana, ya que esta proteína no se modifica sustancialmente con el tratamiento por la citoquina. (C) Se muestran inmunotransferencias representativas.

2.2 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan la capacidad migratoria de las células endoteliales

Durante la angiogénesis tumoral las células endoteliales migran para generar una vasculatura tumoral, por lo que a continuación evaluamos las propiedades migratorias de las células HMEC-1 utilizando insertos transwell y los MCT, como se describe en Materiales y Métodos. En estas condiciones, se permitió que las células endoteliales migraran durante 16 horas. Como se muestra en la **Figura 17A**, los MCT obtenidos de las células tumorales expuestas a PTHrP incrementaron notablemente la movilidad de las células endoteliales. Se obtuvieron datos similares cuando las células endoteliales se cocultivaron con ambas líneas tumorales tratadas previamente con PTHrP empleando insertos Transwell (**Figura 17B**). La migración de las células HMEC-1 en los grupos de control (MCT o células sin tratamiento con PTHrP, **Figura 17A y B**, respectivamente) probablemente se deba a la expresión endógena de moléculas proangiogénicas por parte de las células de cáncer de colon independientemente del tratamiento con PTHrP. Se muestran las correspondientes cuantificaciones en la **Figura 17C**.

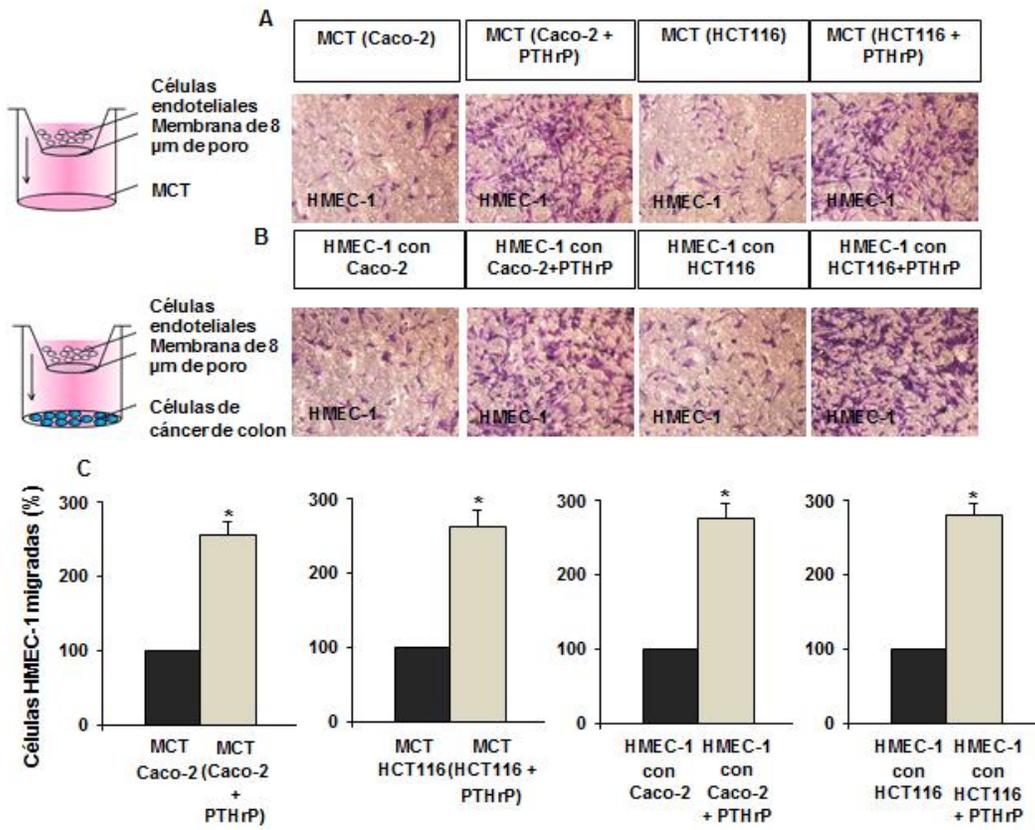
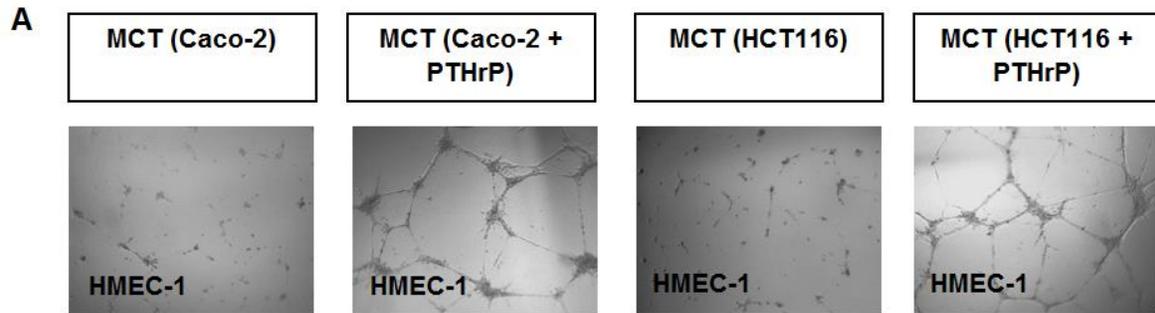


Figura 17. Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP incrementan la migración de las células endoteliales. Evaluamos las propiedades migratorias de las células HMEC-1 utilizando insertos transwell. **(A)** MCT como quimioatrayente. Se sembraron un total de 20.000 células HMEC-1 en medio sin SFB en la cámara superior (en la parte superior de los insertos). Luego, los MCT se agregaron a las cámaras inferiores. **(B)** Ensayos de cocultivo. Las células Caco-2 y HCT116 se sembraron en la cámara inferior de los pocillos, se cultivaron durante 48 horas, seguido del tratamiento con o sin PTHrP. Luego, se sembraron un total de 20.000 células HMEC-1 en medio sin SFB en la cámara superior (en la parte superior de los insertos). **(C)** Cuantificación de los resultados expresados como porcentaje de células migradas en relación con el control. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control.

2.3 Las células tumorales intestinales expuestas a PTHrP inducen la formación de estructuras tubulares en las células endoteliales

Para profundizar respecto a la participación de PTHrP en el proceso de angiogénesis asociado al tumor, empleamos el ensayo de formación de tubos utilizando una matriz de Geltrex para evaluar la capacidad de las células endoteliales de formar una red tubular. Las células HMEC-1 se sembraron en Geltrex y se incubaron con los MCT correspondientes. Después de 24 horas, las células se fotografiaron empleando un microscopio de luz invertida. Como se muestra en la **Figura 18A**, los MCT de ambas líneas tumorales tratadas con PTHrP indujeron la formación de estructuras similares a tubos en las células endoteliales sembradas en Geltrex y también formaron una estructura reticular compuesta por células HMEC-1 conectadas. La cuantificación morfológica de las estructuras de tres experimentos independientes por el programa Image J demostró un aumento notable en el número de nodos, uniones, puntos de ramificación y en la longitud total de las ramificaciones (**Figura 18B**).



B

	N° de nodos	N° de uniones	N° de ramificaciones	Longitud total de las ramificaciones
MCT (Caco-2)	ND	ND	ND	ND
MCT (Caco-2 + PTHrP)	21	6.5	2.5	739
MCT (HCT116)	ND	ND	ND	ND
MCT (HCT116 + PTHrP)	24	6.5	6	735.5

Figura 18. Los MCT de células tumorales intestinales expuestas a PTHrP inducen la formación de estructuras tubulares en las células endoteliales. Se sembraron células HMEC-1 (20.000 células/pocillo) en pocillos recubiertos con Geltrex y se cultivaron con los MCT correspondientes a 37 °C durante 24 horas. Las células se fotografiaron empleando un microscopio de luz invertida. **(A)** Se muestran fotomicrografías representativas de formaciones tubulares de las células HMEC-1 (100x). **(B)** Los parámetros para evaluar la formación de tubos se cuantificaron utilizando la herramienta “Angiogenesis Analyzer” del programa Image J. La longitud total de las ramificaciones se expresa en pixeles. ND: no detectable. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Sección 3: Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la angiogénesis tumoral modulada por PTHrP

3.1 PTHrP promueve la angiogénesis tumoral principalmente a través de VEGF

Debido a que el número de células, la capacidad migratoria y la formación de estructuras similares a tubos de células HMEC-1 aumentaron en respuesta a un efecto indirecto del péptido (dependiente de las células Caco-2 o HCT116), se infirió que PTHrP promueve la angiogénesis tumoral a través de la secreción de factores proangiogénicos de las células tumorales intestinales estimuladas. Es ampliamente aceptado que las células tumorales secretarían VEGF en el entorno circundante, actuando sobre las células endoteliales para impulsar su proliferación, supervivencia, quimiotaxis y migración, y conduciendo a la angiogénesis tumoral (Greenberg et al., 2008). Como observamos que PTHrP aumenta los niveles de ARNm de este factor angiogénico en las células tumorales, se procedió a investigar si el péptido tiene una acción indirecta sobre las células endoteliales a través del VEGF empleando un anticuerpo neutralizante contra este factor.

Para esto, evaluamos si la respuesta de las células HMEC-1 observadas previamente (**Figuras 15, 17 y 18**), difiere o no cuando estas células se exponen al MCT que se incubó previamente durante 2 horas a 37 ° C con el anticuerpo anti-VEGF o con un isotipo IgG de conejo como control. El uso del anticuerpo anti-VEGF atenuó el incremento en el número de células (**Figura 19**), el efecto en la migración celular (**Figura 20**) y la inducción a la formación de vasos (**Figura 21**), respecto a lo observado previamente por efecto de los MCT sobre las células endoteliales *in vitro*.

En conjunto, estos hallazgos indican que PTHrP aumenta la expresión del VEGF en las células Caco-2 y HCT116 e induce su secreción al medio de cultivo. Una vez secretado, este factor media el efecto angiogénico del péptido sobre las células endoteliales siendo este efecto dependiente de las células tumorales intestinales.

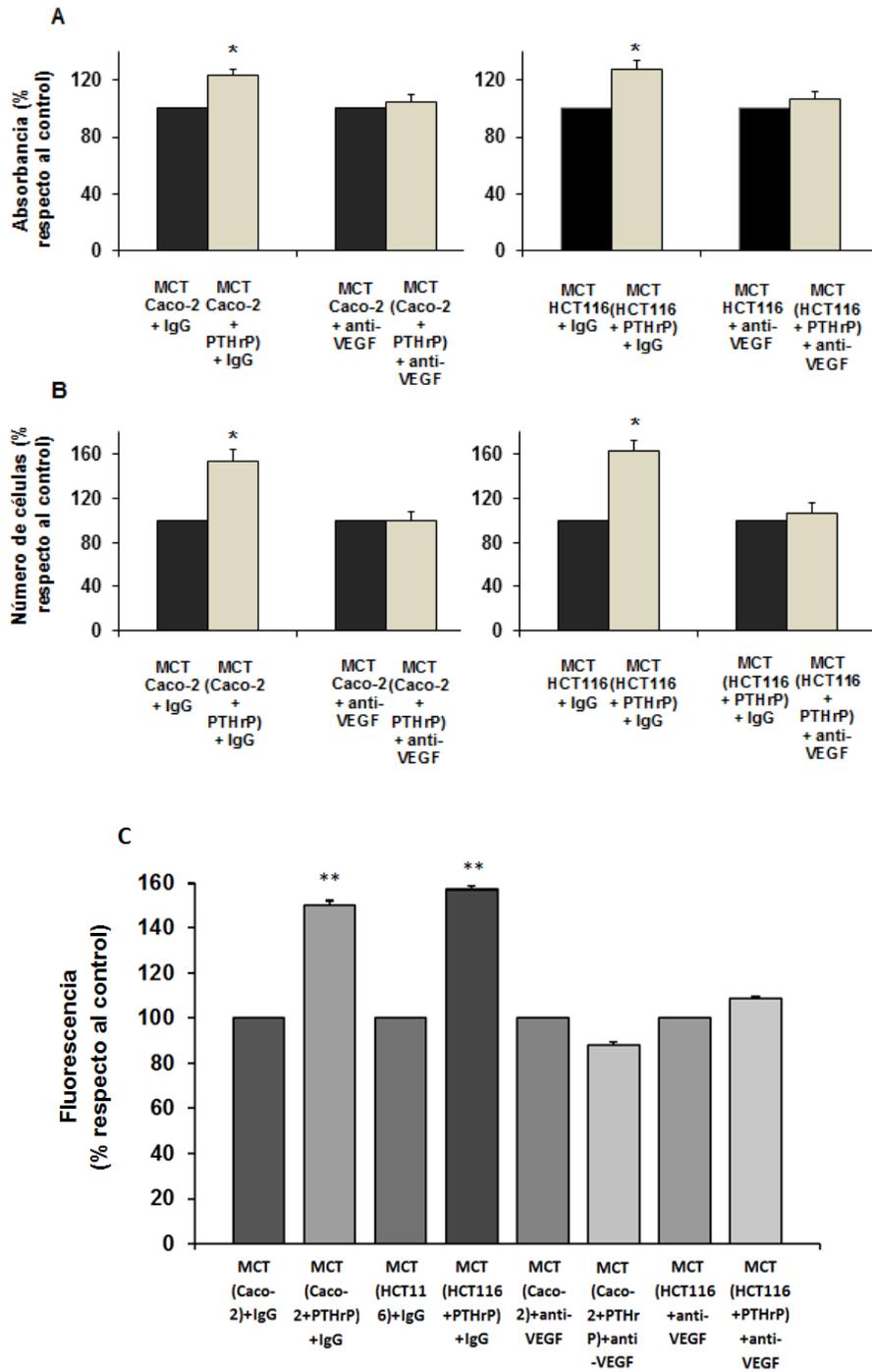


Figura 19. El bloqueo del VEGF revierte el efecto de los MCT obtenidos a partir de células tumorales expuestas a PTHrP en el incremento del número de células endoteliales. Las

células HMEC-1 se cultivaron a 37 °C durante 24 horas con los MCT correspondientes que fueron previamente incubados durante 2 horas a 37 °C con un anticuerpo neutralizante específico dirigido contra el VEGF humano o con una IgG de conejo como control. Luego, el número de células viables se determinó mediante tinción con cristal violeta **(A)**, exclusión del colorante azul de tripano **(B)** y empleando el kit comercial CellTiter-blue® Assay **(C)**. Los resultados se expresan como porcentaje relativo al control de tres mediciones independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control.

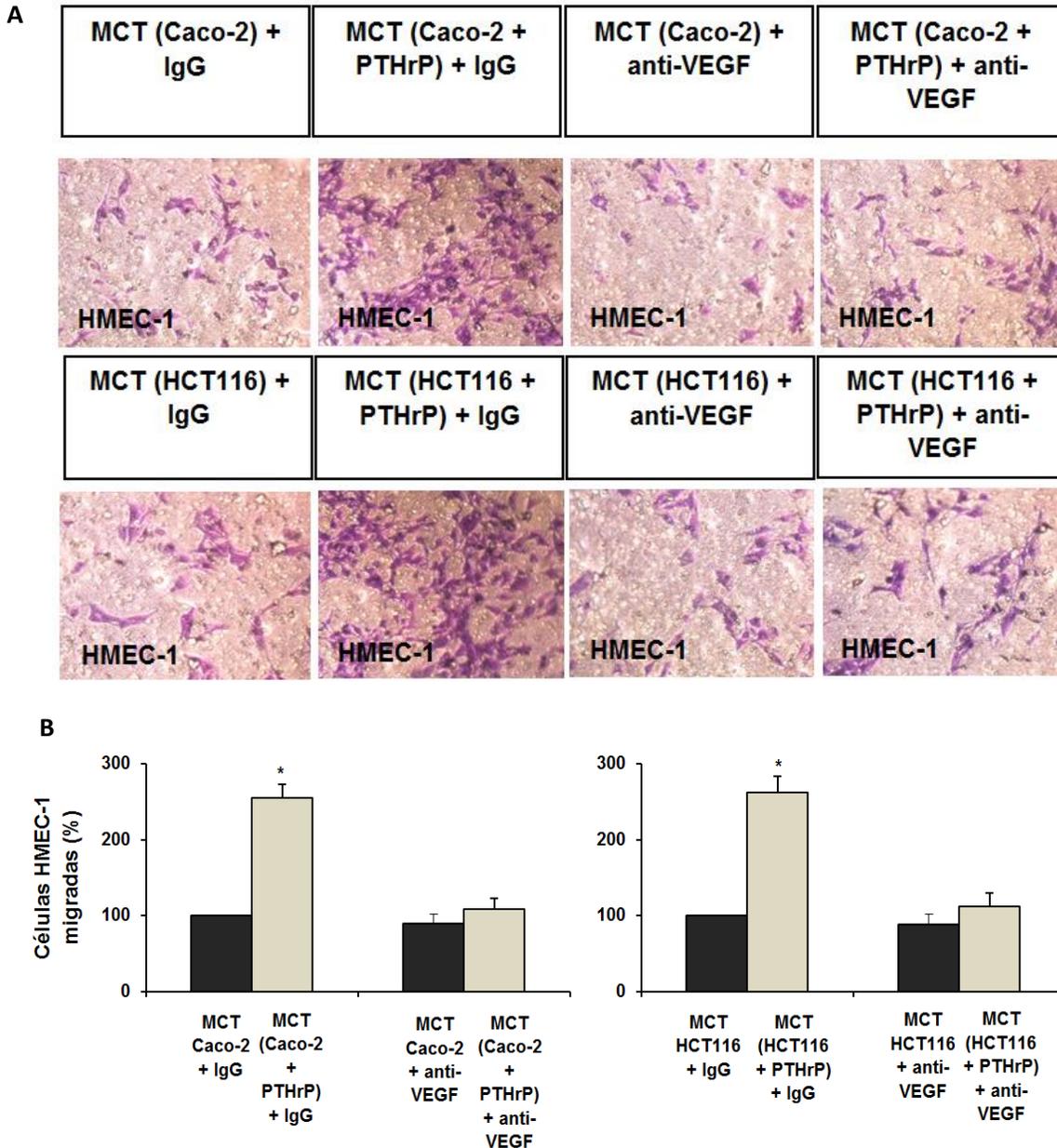
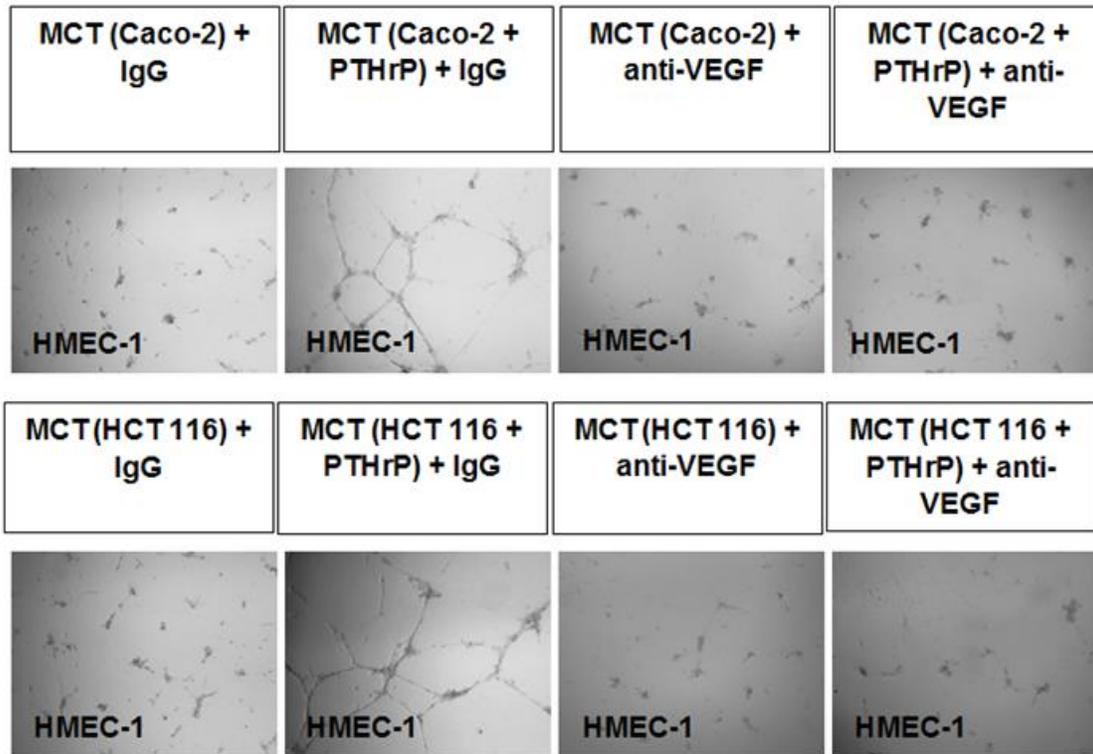


Figura 20. El bloqueo del VEGF revierte el efecto de los MCT obtenidos a partir de células tumorales expuestas a PTHrP en la migración de células endoteliales. Las células HMEC-1 se cultivaron a 37 °C durante 24 horas con los MCT correspondientes que fueron previamente incubados durante 2 horas a 37 °C con un anticuerpo neutralizante específico dirigido contra el VEGF humano o con una IgG de conejo como control. **(A)** Para el ensayo de migración de Transwell se sembraron un total de 20.000 células HMEC-1 en medio sin SFB en la cámara superior (en la parte superior del inserto). Los MCT obtenidos como se

describió anteriormente en Materiales y Métodos se preincubaron durante 2 horas a 37 °C con el anticuerpo anti-VEGF (0,1 µg/ml) o un IgG de conejo como control. Luego, se agregaron los MCT a las cámaras inferiores. Después de 16 horas se contaron las células migradas. **(B)** Se muestra la cuantificación de los resultados expresados como porcentaje de células migradas con respecto al control. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control.

A



B

	Nodos	Uniones	Ramificaciones	Longitud total de las ramificaciones
MCT (Caco-2) + igG	ND	ND	ND	ND
MCT (Caco-2 + PTHrP) + igG	31	8	6	608
MCT (Caco-2) + anti-VEGF	ND	ND	ND	ND
MCT (Caco-2 + PTHrP) + anti-VEGF	ND	ND	ND	ND
MCT (HCT116) + igG	4	2	2	152
MCT (HCT116 + PTHrP) + igG	51	15	13	898
MCT (HCT116) + anti-VEGF	ND	ND	ND	ND
MCT (HCT116 + PTHrP) + anti-VEGF	ND	ND	ND	ND

Figura 21. El bloqueo del VEGF revierte el efecto de los MCT obtenidos a partir de células tumorales expuestas a PTHrP en la formación de estructuras tubulares en células endoteliales. Para el ensayo de formación de tubos se recubrió una placa de 96 pocillos con Geltrex y los MCT fueron previamente incubados durante 2 horas a 37 °C con el anticuerpo anti-VEGF (0,1 µg/ml) o con un IgG de conejo como control. Luego, las células HMEC-1 (20.000 células/pocillo) se sembraron en los pocillos recubiertos con Geltrex y se

cultivaron con los MCT a 37 °C durante 24 horas. Las células se fotografiaron empleando un microscopio de luz invertida. **(A)** Se muestran fotomicrografías representativas de formaciones en forma de tubo por células HMEC-1 (100x). **(B)** Los parámetros para evaluar la formación de tubos se cuantificaron utilizando la herramienta “Angiogenesis Analyzer” del programa Image J. La longitud total de las ramificaciones se expresa en píxeles. ND: no detectable. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

3.2 PTHrP aumenta los niveles de ARNm de VEGF, HIF-1 α y MMP-9 en las líneas celulares Caco-2 y HCT116 a través de las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/Akt

Como se comentó en la Introducción, en los estudios previos realizados en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis se obtuvo evidencia de que la mayoría de los efectos ejercidos por el péptido sobre las células Caco-2 y las células HCT116 son mediados por las vías de señalización de las MAPKs y de PI3K/Akt (Lezcano et al., 2013; Calvo et al., 2014; Martín et al., 2014, Calvo et al., 2017; Martin et al., 2018). ERK1/2 y Akt son proteínas centrales en muchas vías celulares que conducen a la angiogénesis. Por lo tanto, para investigar la relación entre las vías de señalización de ERK 1/2 MAPK y PI3K/Akt activadas por PTHrP y el proceso de angiogénesis asociado al tumor, las células tumorales intestinales se trataron previamente con PD98059 (un inhibidor de la quinasa activadora de ERK1/2, MEK), LY294002 (un inhibidor de PI3K) o GSK690693 (un inhibidor de Akt quinasa) y luego se efectuó el tratamiento con PTHrP seguido del análisis por RT-qPCR. Como se muestra en la **Figura 22**, los inhibidores de ERK1/2 y PI3K/Akt revirtieron el aumento de los niveles de ARNm de VEGF, HIF-1 α y MMP-9 en las líneas celulares Caco-2 y HCT116 inducido por PTHrP. Estos resultados sugieren que el efecto de PTHrP sobre la expresión de estos factores proangiogénicos depende de las vías ERK1/2 y PI3K/Akt. Si bien aún desconocemos la relación entre la vía de señalización de PI3K/Akt con la modulación de la expresión de MMP-7, los resultados presentados en la **Figura 22** sugieren que la vía de las ERK 1/2 MAPK también participa en el incremento del ARNm de MMP-7 inducido por PTHrP en ambas líneas de CCR.

Luego, para determinar si ERK1/2 y Akt median el potencial angiogénico de las células tumorales intestinales inducido por PTHrP, las células tumorales fueron pretratadas con PD98059, LY294002 o GSK690693, para inhibir la actividad de ERK 1/2 y de Akt, luego incubadas con PTHrP durante 24 horas y finalmente se obtuvieron los MCT tal como se describe en Materiales y Métodos.

Luego de la exposición de las células endoteliales a los MCT por 16 horas se observó que la inhibición de las vías de señalización de ERK1/2 y PI3K/Akt en las células de CCR anuló los efectos estimulantes de los MCT en la migración de las células HMEC-1 (**Figura 23**). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la activación de Akt y ERK1/2 por PTHrP en ambas líneas celulares es un evento temprano que conduce a la inducción de la expresión de VEGF y de otros factores angiogénicos con el consecuente comportamiento angiogénico de las células HMEC-1 mediado al menos por VEGF secretado.

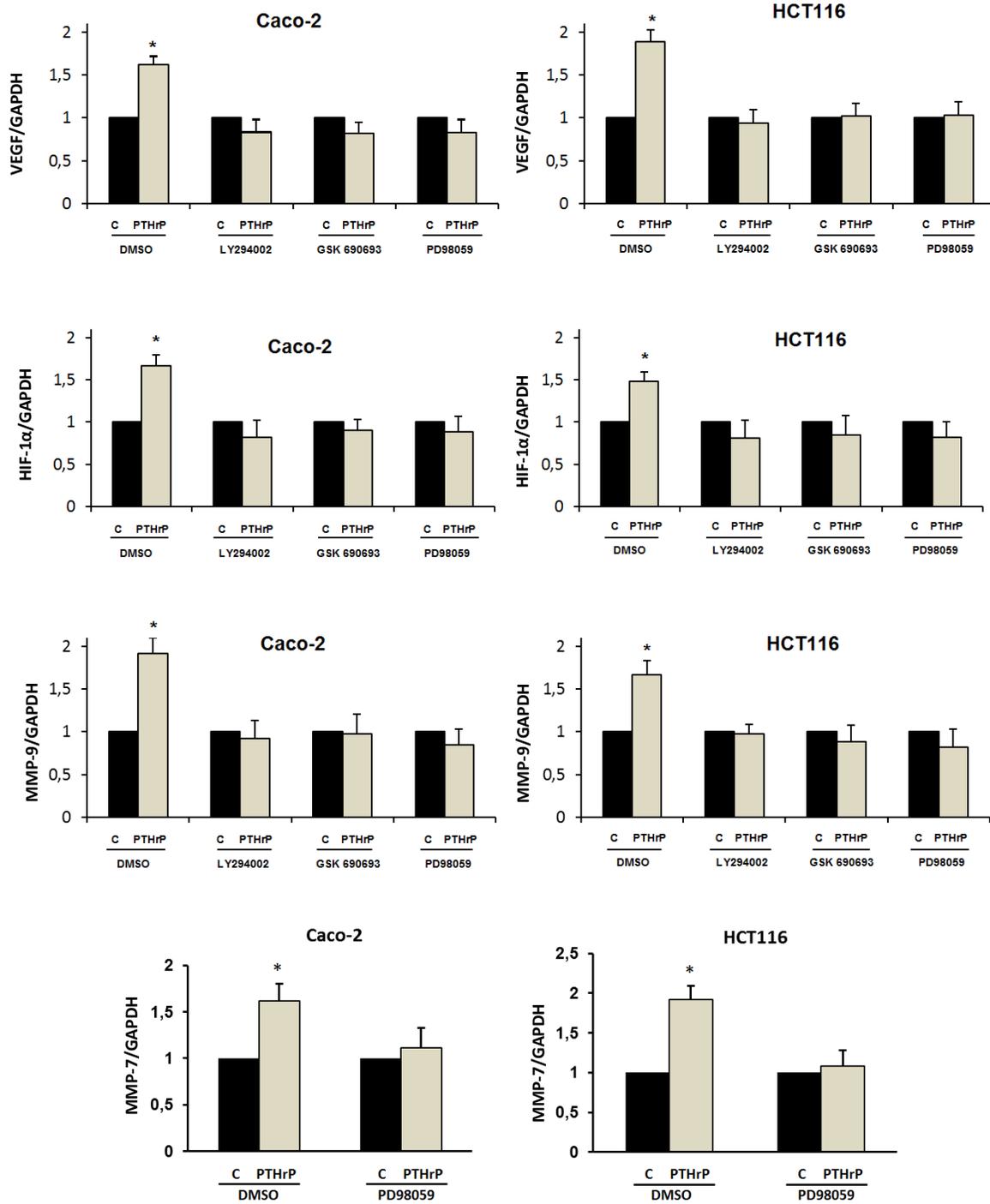


Figura 22. La inhibición de las vías de ERK1/2 y de PI3K/Akt revierte el incremento de los factores proangiogénicos inducido por PTHrP en las células tumorales intestinales. Las células Caco-2 y HCT116 se trataron previamente con PD98059 (20 μM) (un inhibidor de

la quinasa activadora de ERK1/2, MEK), LY294002 (50 μ M) (un inhibidor de PI3K) o GSK690693 (0,1 μ M) (un inhibidor de Akt quinasa) y luego se efectuó el tratamiento con PTHrP seguido del análisis por RT-qPCR de los factores proangiogénicos VEGF, HIF-1 α , MMP-9 y MMP-7. Los gráficos de barras corresponden al nivel de ARNm de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control.

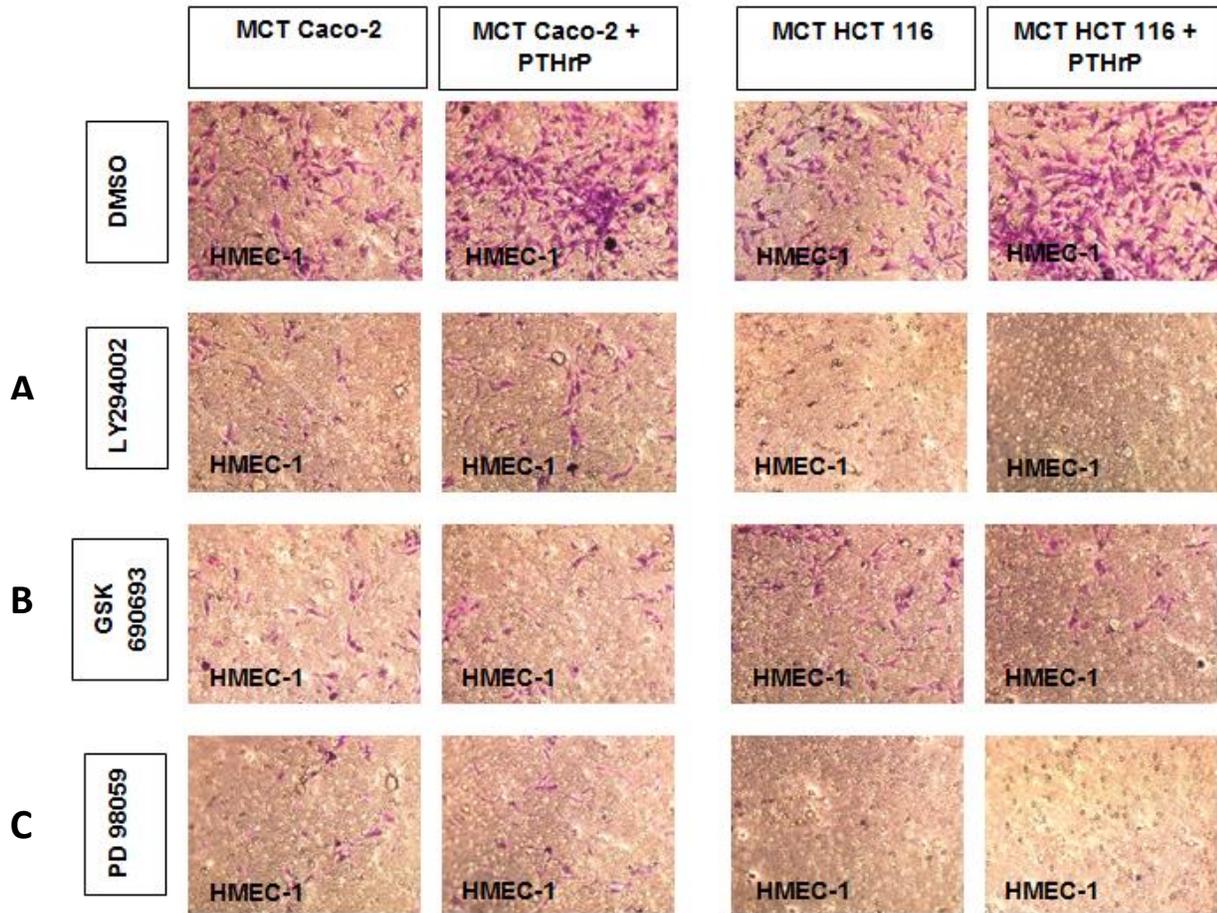


Figura 23. La inhibición de las vías de ERK1/2 y de PI3K/Akt revierte la migración en células endoteliales inducida por el MCT obtenido de células tumorales expuestas a PTHrP. Se sembraron células HMEC-1 en la cámara superior de filtros Transwell y se añadieron a las cámaras inferiores MCT obtenidos a partir de ambas líneas celulares tumorales las cuales fueron previamente tratadas con DMSO (vehículo de los inhibidores) o con los inhibidores de **(A)** PI3K, **(B)** Akt y **(C)** ERK1/2, y luego incubadas en presencia o ausencia de PTHrP. Se muestran fotomicrografías representativas de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Sección 4: Estudio de la acción directa de PTHrP sobre las células endoteliales**4.1 El tratamiento directo con PTHrP aumenta la fosforilación de ERK1/2 y el número de células pero no estimula la migración ni la formación de tubos de células endoteliales**

Los resultados hasta el momento obtenidos mostraron que PTHrP ejerce un efecto indirecto sobre las células endoteliales que es dependiente de las células tumorales ya que observamos que los MCT provenientes de las células de CCR expuestas a PTHrP inducen un aumento en el número de células, la migración y la formación de estructuras similares a tubos en las células endoteliales HMEC-1. Para explorar si PTHrP también ejerce efectos directos (independientes de las células tumorales) sobre el comportamiento angiogénico de las células endoteliales, primeramente se analizó si el receptor de PTH/PTHrP (RPTH1) se expresa en las células HMEC-1. El análisis de las proteínas de los lisados celulares mediante Western blot mostró la presencia de un componente de 90 KDa que corresponde al tamaño reportado para el RPTH1 maduro (Kaufmann et al., 1994), (**Figura 24A primera calle**). Como controles positivos se emplearon lisados de células Caco-2 y HCT116 (**Figura 24A**) ya que previamente se detectó la presencia de este receptor en ambas líneas tumorales intestinales (Calvo et al., 2009; Calvo et al., 2014). En base a este hallazgo seguidamente se investigó si el péptido también es capaz de activar una vía relevante en el comportamiento angiogénico, como es la señalización de las MAP quinasas en células endoteliales, estudiando la fosforilación de ERK1/2. Para esto las células HMEC-1 fueron tratadas con PTHrP (10^{-8} M) durante diferentes tiempos y luego se realizaron análisis de Western blot con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada y activa de ERK1/2. Como se muestra en la **Figura 24B**, PTHrP incrementó la fosforilación de residuos de tirosina presentes en sitios de activación de ERK1/2 a la hora de tratamiento.

Siendo la primera evidencia de la acción de PTHrP en estas células endoteliales, se procedió a evaluar si el efecto del péptido es dependiente de su dosis. Para tal fin se ejecutaron experimentos con dos concentraciones diferentes y se evaluó el número de células mediante los ensayos de tinción con cristal violeta, de exclusión del colorante azul de tripano y de CellTiter-blue® (empleando el sustrato resazurina).

El recuento de células vivas por cámara de Neubauer reveló que PTHrP a dosis de 10^{-7} y 10^{-8} M durante 24 horas de tratamiento aumentó el número de células endoteliales en un 44 % y un 60 %, respectivamente con respecto a las células no tratadas (**Figura 24C**).

Así mismo, mediante la tinción con cristal violeta se observó en las células expuestas a PTHrP 10^{-7} M y 10^{-8} M un incremento de la absorbancia en un 27% y 42%, respectivamente, con respecto a las células no tratadas (**Figura 24C**). Incluso, se halló que PTHrP a una dosis de 10^{-8} M durante 24 horas de tratamiento aumentó la biorreducción de resazurina, lo que se evidenció en un incremento en la medición de fluorescencia en un 27% con respecto a las células expuestas al vehículo (control) (**Figura 24C**). Esta respuesta de las células endoteliales a PTHrP se revirtió por completo en presencia del inhibidor de ERK1/2 (**Figura 25**).

Estos resultados evidencian que PTHrP por acción directa aumenta el número de las células endoteliales HMEC-1. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se evaluaron seguidamente las expresiones del marcador de proliferación (PCNA) y del marcador de apoptosis (PARP). Como se observa en la **Figura 26**, el tratamiento con PTHrP sobre estas células aumentó los niveles proteicos de PCNA pero no promovió la degradación de PARP sugiriendo que el péptido tiene un efecto proliferativo. Se necesitan más investigaciones para confirmar este tipo de respuesta de las células HMEC-1 a partir de la acción directa de PTHrP.

Finalmente se analizaron las propiedades migratorias utilizando insertos transwell y la formación de estructuras tubulares mediante el ensayo de formación de tubos usando matriz de Geltrex. A pesar del efecto observado de PTHrP sobre el número de células, se

concluyó que el péptido (10^{-8} M) añadido directamente a las células o como quimioatrayente no modificó la migración de las células HMEC-1 (**Figura 27A**) ni estimuló la formación de tubos en las células endoteliales luego de 24 horas de tratamiento (**Figura 27B**).

En conjunto, estos resultados sugieren que PTHrP ejerce sus efectos sobre el comportamiento angiogénico de las células endoteliales principalmente en forma dependiente de las células tumorales intestinales.

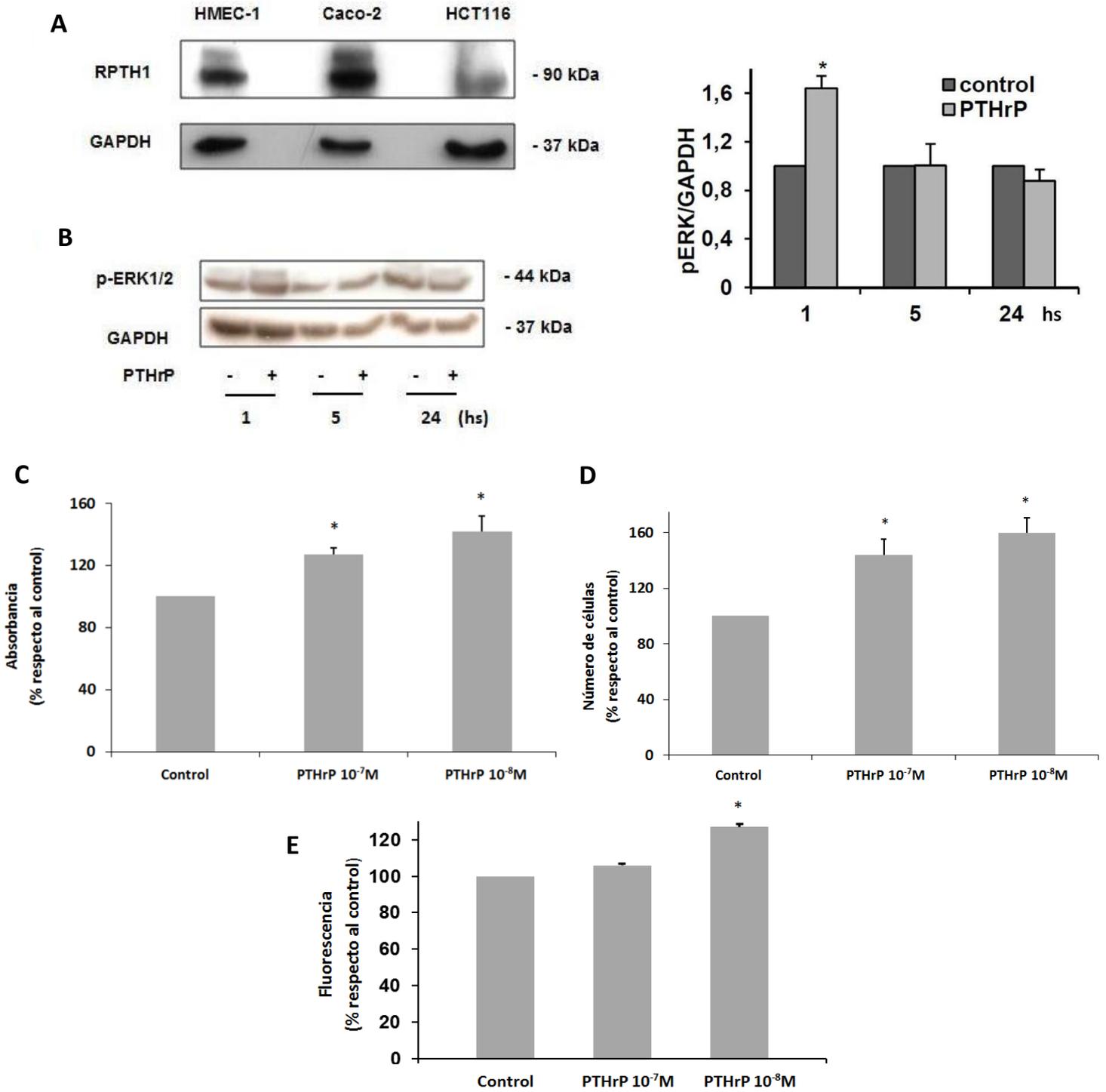


Figura 24. Rol directo de PTHrP en células endoteliales. (A) El análisis de Western Blot de lisados de células HMEC-1 se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti RPTH1. Las líneas

celulares Caco-2 y HCT116 se usaron como control positivo. Se muestra una inmunotransferencia representativa. **(B)** Fosforilación/activación de ERK 1/2 inducida por PTHrP en células endoteliales. Las células HMEC-1 se trataron con PTHrP (10^{-8} M) durante diferentes intervalos de tiempo y se realizó Western blot usando un anticuerpo que reconoce la forma activa de ERK1/2 MAPK. **(C-E)** Medición del número de células. Las células HMEC-1 se cultivaron con PTHrP (10^{-7} y 10^{-8} M) a 37 °C durante 24 horas. El número de células viables fue determinado por **(C)** tinción con cristal violeta, **(D)** exclusión del colorante azul de tripano y **(E)** ensayos de resazurina. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al control de tres mediciones independientes realizadas por triplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control.

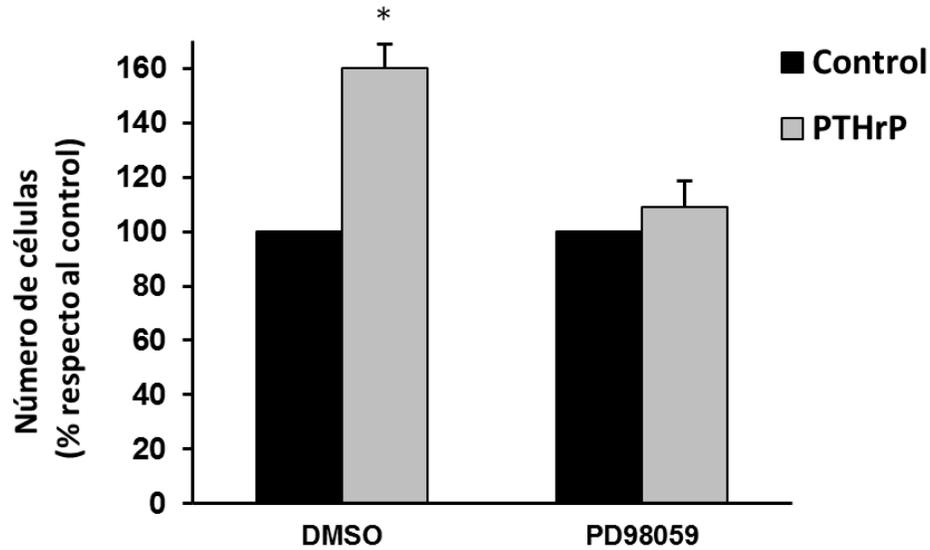


Figura 25. La inhibición de la vía de ERK1/2 revierte el incremento en el número de células inducido por PTHrP en las células endoteliales. Las células HMEC-1 se pretrataron con PD98059 (20 μ M) o con DMSO (vehículo del inhibidor) y luego fueron incubadas en presencia o ausencia de PTHrP 10^{-8} M. Luego las células fueron contadas mediante el ensayo de azul de tripano. Los gráficos de barras corresponden al número de células respecto del control de tres experimentos independientes.* $p < 0,05$ con respecto al control.

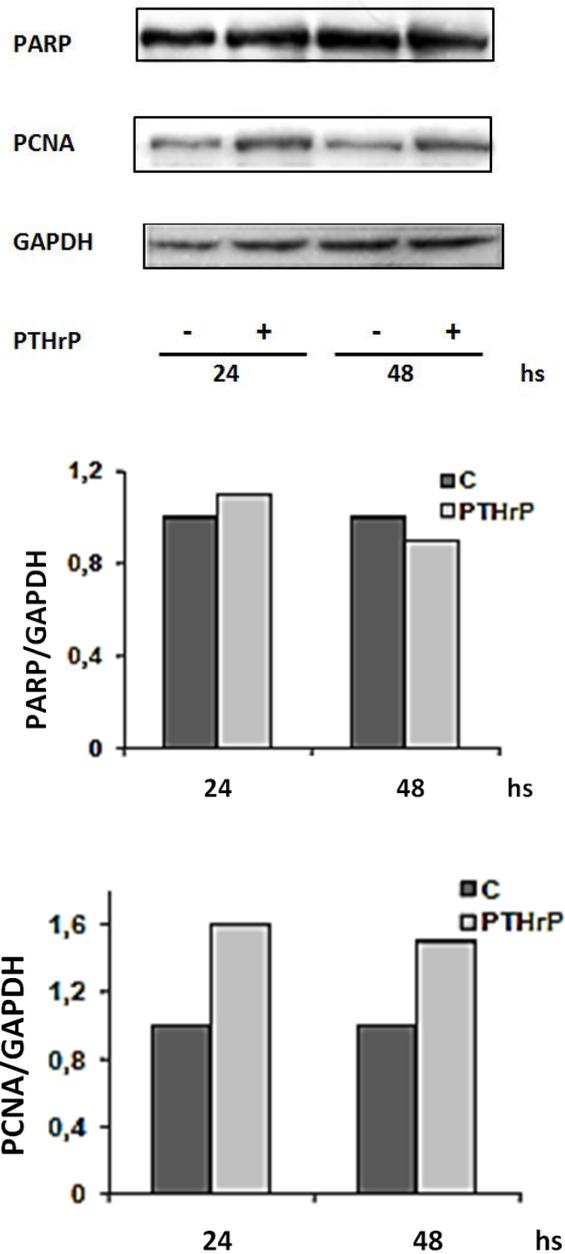


Figura 26. PTHrP de manera directa incrementa los niveles proteicos de PCNA pero no promueve la degradación de PARP en células HMEC-1. Las células HMEC-1 se trataron con PTHrP (10^{-8} M) durante 24y 48 horas, y luego se realizaron los análisis de Western blot usando anticuerpos específicos. Como control de siembra se empleó el anticuerpo anti-GAPDH. Se muestran inmunotransferencias representativas.

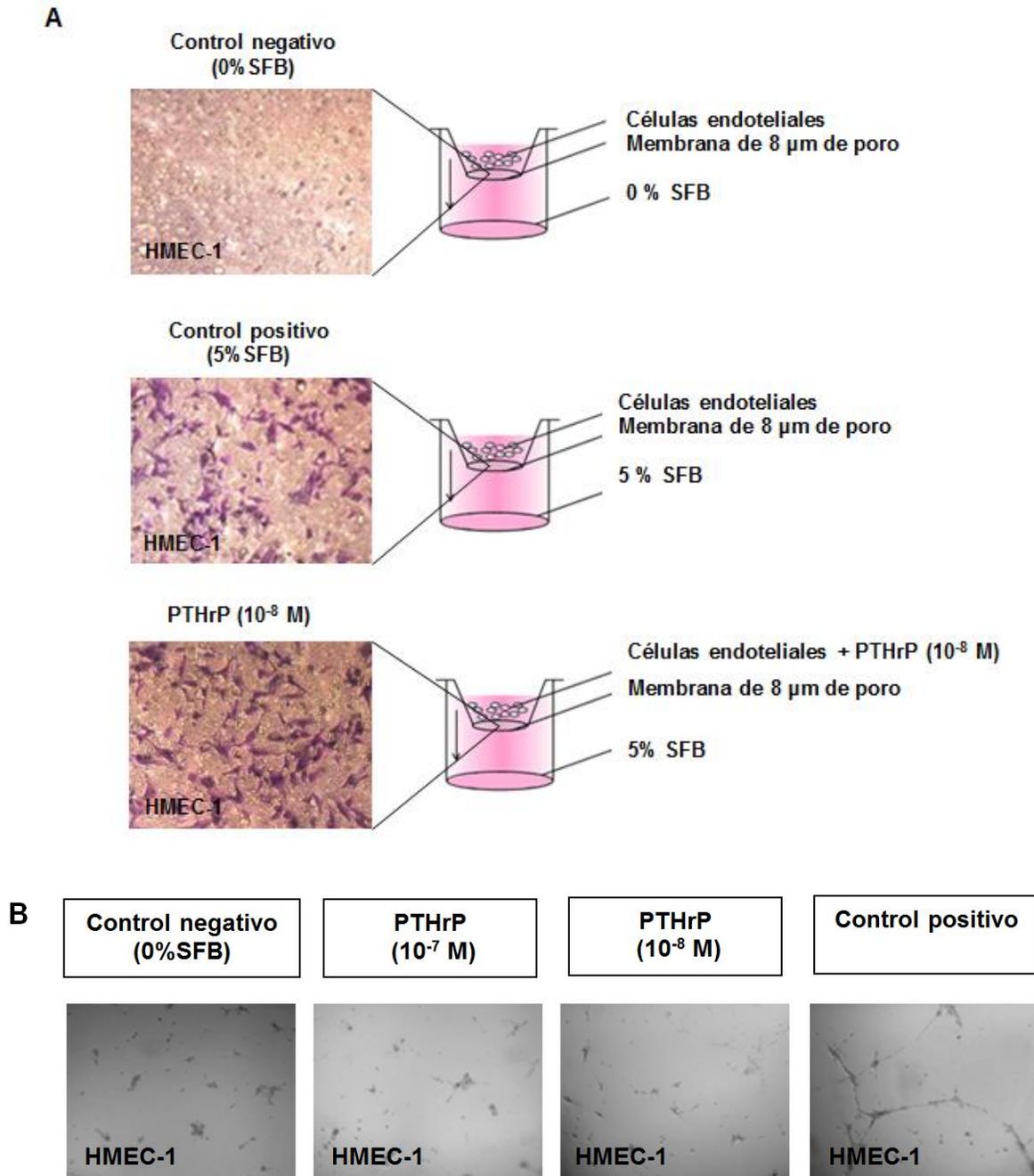


Figura 27. PTHrP no modifica las propiedades migratorias ni la formación de tubos en células endoteliales en los tiempos y concentraciones estudiados. (A) Ensayo de migración por Transwell. Evaluamos las propiedades migratorias de las células HMEC-1 utilizando insertos Transwell como se detalló en Materiales y Métodos. Se contaron las células migradas y se muestran fotografías representativas de tres experimentos

independientes realizados por triplicado. **(B)** Ensayo de formación de tubos con matriz de Geltrex donde se agregó el péptido por 24 horas (a una concentración de 10^{-7} M o 10^{-8} M) directamente a las células endoteliales para evaluar la formación de estructuras similares a tubos. Como control positivo se empleó MCT obtenido de células HCT116 tratadas con PTHrP. Se muestran fotomicrografías representativas de tres experimentos independientes realizados por triplicado (100x).

Sección 5: Ensayos *in vivo***5.1 PTHrP aumenta la expresión de VEGF y el número de estructuras con características de vasos neoformados en xenoinjertos tumorales**

Con el fin de corroborar *in vivo* lo observado hasta ese momento en los modelos *in vitro*, se exploró si PTHrP es también capaz de modular la expresión del factor angiogénico VEGF en tejidos tumorales de xenotrasplantes de células HCT116 en el modelo murino N:NIH(S)_nu. El análisis por RT-qPCR mostró niveles aumentados del ARNm del VEGF en tumores tratados con PTHrP con respecto a los niveles observados en los tumores de ratones control (**Figura 28A**). Además, también observamos niveles proteicos aumentados del VEGF por análisis inmunohistoquímico de estos tejidos tumorales (**Figura 28B**). En concordancia con los resultados informados por otros autores, la localización de VEGF se observó cerca de la membrana nuclear y en el citoplasma (señalado con una flecha), sugiriendo también la posible participación de este factor en una señalización intracrina (Bhattacharya et al., 2016; Domigan et al., 2015). A partir de estos resultados, evaluamos la expresión de CD31 por inmunohistoquímica en los xenoinjertos de células HCT116 tratados o no con PTHrP, ya que este marcador se expresa en las células del endotelio vascular y es empleado para evidenciar vasos intratumorales y el grado de neoangiogénesis (Avdalyan et al., 2012). Esta proteína indica la presencia tanto de vasos neoformados como vasos normales preexistentes en tejidos neoplásicos y no neoplásicos (Gee et al., 2003). Por lo tanto, para evitar errores, sólo evaluamos la marcación positiva para CD31 de estructuras con características de vasos neoformados, lo que se correlaciona con un estado de mayor proliferación de las células endoteliales. La cuantificación se realizó contando el número de células o estructuras con características de vasos neoformados que se marcaron positivamente para CD31 en 10 campos aleatorios a un aumento de 400X. No se contaron ni los grandes vasos con paredes hialinizadas ni las células inflamatorias con marcación CD31+, los que pueden distinguirse de las células endoteliales en base a diferencias morfológicas. Se detectó que los tumores de células

HCT116 tratados con PTHrP mostraban un aumento del número de células o estructuras con características de vasos neoformados (CD31+) respecto a aquellos tratados con el vehículo de PTHrP (**Figura 28C**). Estos resultados sugieren que PTHrP ejerce un efecto aparentemente proangiogénico en xenotrasplantes de células HCT116 en un modelo murino N:NIH(S)_nu.

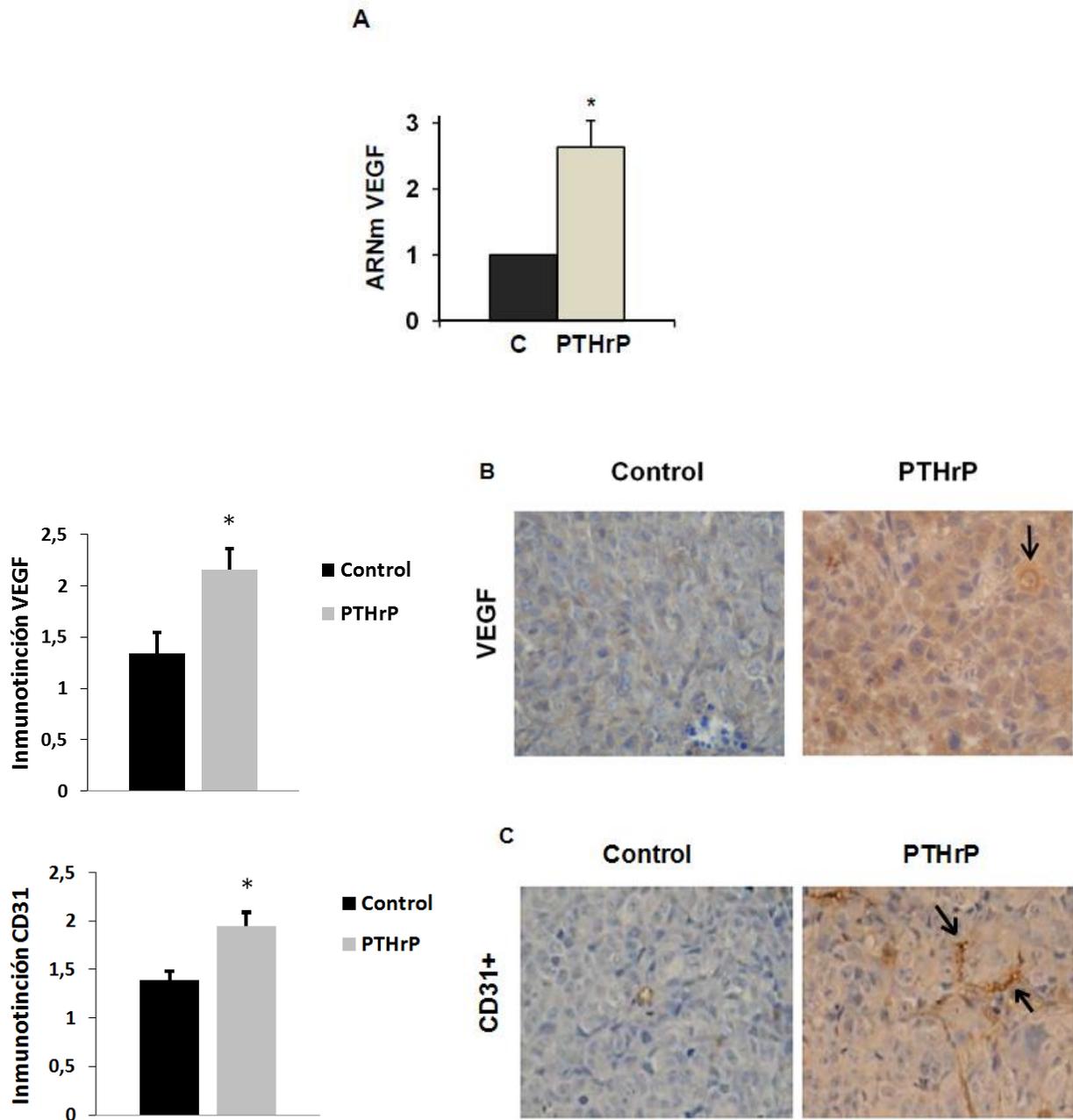


Figura 28. PTHrP aumenta la expresión proteica y el nivel de ARNm del VEGF, y el número de estructuras con características de vasos neoformados *in vivo*. Los tumores de xenotrasplante de HCT116 de ratones N:NIH(S)_nu se analizaron mediante: (A) RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de VEGF en tumores tratados con PTHrP respecto al nivel observado en tumores tratados con PBS. Los gráficos de barras representan los

niveles de ARNm del VEGF. Para el análisis por inmunohistoquímica, las secciones de tumor se incubaron con **(B)** el anticuerpo anti-VEGF (la flecha indica la marcación perinuclear del VEGF), y **(C)** el anticuerpo anti-CD31 (las flechas indican la marcación de estructuras con características de vasos en neoformación). Las imágenes corresponden a tumores tratados con PTHrP (derecha) y de tumores tratados con PBS (izquierda). La inmunoreactividad se cuantificó con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji del programa Image J. * $p < 0,05$ con respecto al control.



Discusión del Capítulo 1

Discusión del Capítulo 1

El CCR es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo (Sung et al., 2021), y a pesar de los avances en su diagnóstico y tratamiento, aún es necesario elucidar los mecanismos que favorecen la progresión a etapas avanzadas lo que constituye la principal causa de fallecimiento. Partiendo de los efectos previamente observados en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis (Calvo et al., 2017, 2014; Lezcano et al., 2013; Martín et al., 2014, 2018) se pensó que otro posible modo de acción de PTHrP sobre las células derivadas del CCR podría ser a través de la liberación de factores bioactivos inducidos por el péptido que facilitan el crecimiento tumoral exitoso y el establecimiento de metástasis, siendo éstos dependientes del proceso angiogénico (Ronca et al., 2017). Se han realizado varios estudios para dilucidar el proceso de angiogénesis, estudiando su rol en el crecimiento del tumor primario y la metástasis, proporcionando resultados prometedores y permitiendo el desarrollo de inhibidores contra factores proangiogénicos como el anticuerpo monoclonal bevacizumab (un anticuerpo humanizado contra VEGF) utilizado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de tumores como el CCR metastásico (Sánchez-Gundín et al., 2018). Sin embargo, debido a la naturaleza multicausal del cáncer y a la generación de resistencias vistas hacia estos tratamientos, es importante revisar y continuar con la investigación de este proceso y su regulación para delinear nuevas terapias alternativas.

Dentro de la vasculatura, las células endoteliales producen PTHrP, pero existen diferentes reportes sobre la expresión del receptor RPTH1. Mientras que las células endoteliales humanas producen PTHrP, pero no el receptor RPTH1 (Rian et al., 1994) las células del músculo liso expresan RPTH1, sugiriendo que PTHrP producido por las células endoteliales puede actuar de manera parácrina sobre estas células musculares (Diamond et al., 2006); sin embargo, estas evidencias no descartan un efecto autocrino de PTHrP.

A pesar de que varios trabajos sugirieron que el péptido tiene un rol en el proceso angiogénico, los datos son contradictorios (Akino et al., 2000; Bakre et al., 2002). Por un lado, Bakre y colaboradores encontraron por primera vez una acción inhibitoria de PTHrP en la angiogénesis en tumores de próstata (Bakre et al., 2002). El impacto del patrón de expresión de PTHrP en el crecimiento de los folículos pilosos también sugiere un papel inhibitorio en la angiogénesis (Diamond et al., 2006; Skrok et al., 2015). Además, Deckers y colaboradores demostraron que el tratamiento con el péptido disminuyó significativamente los niveles del VEGF en un modelo de diferenciación de osteoblastos (Deckers et al., 2000).

Por otro lado, la acción indirecta de PTHrP ha asociado a esta citoquina con un efecto proangiogénico. Varios estudios demostraron que PTHrP estimula rápida y transitoriamente la expresión de VEGF en osteoblastos (Alonso et al., 2008; De Gortázar et al., 2006; Esbrit et al., 2000), sugiriendo un rol del péptido como estimulador de la angiogénesis. Esbrit y colaboradores también observaron que los medios condicionados de células osteoblásticas tratadas con PTHrP aumentan el crecimiento de células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) (Esbrit et al., 2000). Informes posteriores indicaron que PTHrP estimuló la angiogénesis ósea principalmente por sus efectos sobre los osteoclastos (Cackowski et al., 2010). En particular, la investigación de Akino y colaboradores también resaltó un efecto estimulante de PTHrP sobre la angiogénesis (Akino et al., 2000) en la cual observaron que las células tumorales de glándula pituitaria de rata, mGH3, que sobreexpresan PTHrP en comparación con las células GH3 sin sobreexpresión, muestran hipervascularización en xenotrasplantes *in vivo*. Además, al igual que Esbrit y colaboradores, este grupo informó que PTHrP incrementaba la formación de tubos por parte de las células endoteliales BAEC (Akino et al., 2000).

En línea con los resultados mostrados en este Capítulo, otros autores encontraron que PTHrP puede modular la expresión de factores involucrados en la angiogénesis, por su

acción en las células tumorales. Este modo de acción de PTHrP resalta su capacidad para estimular la liberación de factores proangiogénicos como se ha visto en el cáncer de próstata y de mama. El péptido puede inducir la expresión de interleuquina-8 (IL8), un reconocido factor proangiogénico en distintos tumores, en células de cáncer de próstata PCa por vía intracrina independiente de su secuencia de localización nuclear clásica (Gujral et al., 2001). Además, PTHrP derivada de células de cáncer de próstata tiene una acción proangiogénica indirecta, al estimular diferentes factores angiogénicos en las células del estroma de la médula ósea (BMSC) (Liao et al., 2008) y aumentar el reclutamiento y potencial angiogénico de las células derivadas de la médula ósea CD11b⁺Gr1⁺ (Park et al., 2013). También existe un vínculo entre PTHrP y el VEGF en la metástasis del cáncer de mama donde el péptido modula la angiogénesis asociada a las células tumorales mamarias MDA-MB-231 a través de las vías de señalización de la proteína quinasa A (PKA), PKC, ERK 1/2 MAPK y p38 MAPK, aumentando la proliferación y migración de las células endoteliales HUVEC. Estos eventos de PTHrP podrían deberse a la regulación de la expresión de factores críticos como el VEGF (Isowa et al., 2010), el factor VIII y el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF/CCN2) (Li et al., 2011; Shimo et al., 2006).

Además de tratarse de diferentes tipos tumorales, estos datos contradictorios pueden deberse a las interacciones con diferentes tipos celulares del microambiente que expresan o no el receptor RPTH1 y que responden, por lo tanto, de forma diferencial a PTHrP. Otro motivo puede deberse a que diferentes fragmentos de PTHrP pueden tener distintos efectos sobre las células endoteliales. En un trabajo observaron que el tratamiento con PTHrP (87-139) estimula la angiogénesis a través de la regulación del VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) luego de un infarto de miocardio (Zhang et al., 2019). Aunque no está claro si PTHrP puede inhibir o estimular directamente las células endoteliales, en la mayoría de los informes el péptido tiene una participación en la angiogénesis tumoral como un mediador clave en las interacciones entre las células tumorales y el microambiente al estimular la producción de factores angiogénicos.

En este Trabajo de Tesis se demostró por primera vez la participación de PTHrP (1-34) exógeno en la angiogénesis tumoral empleando líneas celulares derivadas de CCR, células endoteliales y un modelo murino.

El péptido a una dosis de 10^{-8} M aumenta los niveles de ARNm de VEGF y de otros factores involucrados en la angiogénesis como HIF-1 α , MMP-9 y MMP-7, en las líneas celulares Caco-2 y HCT116. El uso de inhibidores específicos de ERK1/2, PI3K y Akt sugiere que estas vías de señalización participan en esta respuesta a PTHrP (1-34). Si bien los inhibidores farmacológicos pueden ser herramientas útiles para explorar la participación de las vías de señalización en la respuesta celular a diferentes estímulos extracelulares, los efectos deben considerarse cuidadosamente para la interpretación de los datos experimentales.

Los MCT provenientes del cultivo de células Caco-2 y HCT116 tratadas con PTHrP incrementaron notablemente el número y la migración de las células endoteliales HMEC-1, lo que también se evidenció empleando ensayos de cocultivo. Además, estos MCT indujeron la formación de estructuras similares a tubos en las células endoteliales. Los estudios con un anticuerpo neutralizante contra el VEGF disminuyeron la respuesta de las células endoteliales expuestas a los MCT, lo que sugiere que esta respuesta está asociada con una mayor producción de VEGF. Como se menciona en Materiales y Métodos, en estos ensayos empleamos las líneas celulares derivadas de CCR Caco-2 y HCT116, que presentan diferencias fenotípicas y distinto grado de agresividad con el objetivo de evaluar si la respuesta de ambas líneas celulares a PTHrP es similar o diferente. Se sabe que las mutaciones en los genes KRAS y PIK3CA se encuentran en la línea celular HCT116 (KRAS y PIK3CA mutante) pero no en la línea celular Caco-2 (KRAS y PIK3CA WT) y se ha reportado que las mutaciones del gen APC son muy frecuentes en varias líneas celulares de CCR como Caco-2, sin embargo, esta mutación no está presente en la línea celular HCT116 (APC WT) (Ahmed et al., 2013; Berg et al., 2017).

Aunque las mutaciones de KRAS, PIK3CA y APC se correlacionan con alteraciones en la expresión de VEGF y la angiogénesis (Chen et al., 2018; Lai et al., 2015; Yeh et al., 2017;

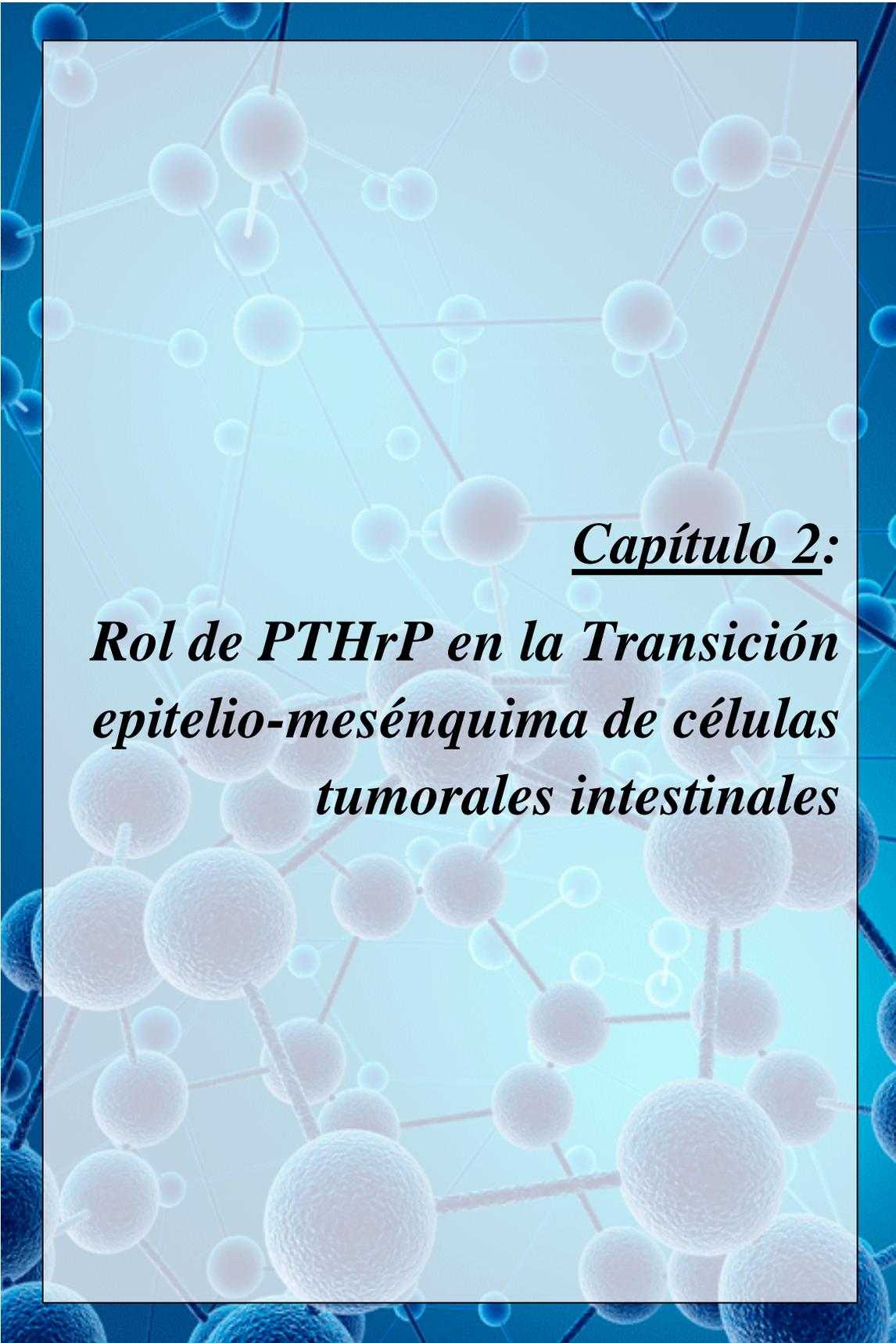
Yekkala y Baudino, 2007), el hecho de que ambas líneas celulares tengan una respuesta similar a PTHrP apoya la idea de que la inducción de la angiogénesis tumoral por parte de PTHrP es independiente de estos estados de mutación.

Por otro lado, el tratamiento directo con PTHrP aumentó la fosforilación de ERK1/2 y el número de células pero no estimuló la migración ni la formación de tubos en la línea celular endotelial HMEC-1 en los tiempos y a las concentraciones estudiadas. Estos hallazgos sugieren que PTHrP (1-34) no tiene un efecto proangiogénico directo sobre estas células endoteliales, y que sola no es suficiente para regular la angiogénesis tumoral.

En este Trabajo de Tesis se observó además que el tratamiento con PTHrP a una dosis de 10^{-8} M incrementó los niveles de ARNm y la expresión proteica del factor proangiogénico VEGF, y promovió la formación de estructuras con características de vasos neoformados en el tumor de xenotrasplante de células HCT116.

Otros autores mostraron una correlación entre PTHrP y marcadores angiogénicos en tumores humanos como el cáncer de próstata y el carcinoma de células renales de células claras (Feng et al., 2013; Liao et al., 2008), lo que respalda la posible relevancia clínica de estos resultados pero destaca la necesidad de realizar estudios con biopsias de pacientes con CCR para validarlos. Además esta relación entre PTHrP y VEGF fue abordada en estudios donde se observó que PTHrP (1-36) incrementa la expresión de VEGF en células tubuloepiteliales renales y que la inhibición de ERK1/2 revirtió la TEM inducida por PTHrP y VEGF (Ardura et al., 2010).

En conclusión, los estudios realizados en el primer capítulo de este Trabajo de Tesis muestran, por primera vez, que PTHrP (1-34) mediante un modo de acción paracrino promueve la angiogénesis asociada al tumor estimulando la síntesis y secreción de VEGF en células derivadas de CCR. De esta manera, mediante la producción de factores proangiogénicos, PTHrP media la comunicación entre las células de CCR y las células endoteliales. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que PTHrP ejerce sus efectos desde y hacia el microambiente tumoral.



Capítulo 2:

***Rol de PTHrP en la Transición
epitelio-mesénquima de células
tumoraes intestinales***

Capítulo 2: Rol de PTHrP en la Transición epitelio-mesénquima de células tumorales intestinales

El estudio de la interacción de las células tumorales con su microambiente es un campo de investigación del cáncer de relevancia que busca comprender los mecanismos reguladores que colaboran en la progresión de estas patologías (Arneth, 2019). Como se evidenció en el Capítulo 1 de este Trabajo de Tesis, PTHrP induce la expresión y liberación de factores proangiogénicos por las células tumorales promoviendo la interacción entre éstas y las células endoteliales. Además, los MCT obtenidos a partir de células tumorales tratadas con PTHrP, incrementan la capacidad migratoria y la formación de estructuras similares a tubos en las células endoteliales, eventos celulares que se han asociado a la adquisición de una plasticidad celular otorgada por la TEM (Dejana et al., 2017) .

A la TEM, que es un programa celular fundamental en etapas tempranas del desarrollo de los vertebrados, se le atribuye de ser el mecanismo que permite la invasión, la angiogénesis y la quimiorresistencia asociada a la metástasis en el cáncer (Tsoumas et al., 2018). En el contexto fisiológico normal, las células epiteliales experimentan la disminución de las uniones intercelulares, la pérdida de su típica polaridad apical-basal y una reorganización del citoesqueleto, adquiriendo características mesenquimales producto de la exposición a factores inductores reconocidos de este programa como la señalización del factor TGF- β y la traslocación nuclear de β -catenina (Hay, 2005). En el contexto de la célula tumoral, la TEM está anormalmente regulada por estímulos derivados del tumor y su microambiente, como factores de crecimiento y citoquinas que derivan en un fenotipo migratorio e invasivo (Derynck y Weinberg, 2019).

Como se mencionó en la sección Introducción, los resultados previos generados en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis revelaron que PTHrP posee un rol relevante al conferir propiedades migratorias a las células tumorales intestinales Caco-2 y HCT116. Además PTHrP disminuye la sensibilidad en ambas líneas de CCR a Irinotecán o

CPT-11 (droga ampliamente empleada en el tratamiento del CCR) mediante las vías de ERK1/2 y de β -catenina (Martin et al., 2018; Martin, Tesis 2018).

Estas acciones de PTHrP son características de etapas avanzadas en el CCR y se asocian a la adquisición de propiedades invasivas en el CCR a través de la TEM.

Con este lineamiento, algunas investigaciones han observado que PTHrP podría regular factores implicados en la inducción de la TEM en células de cáncer de próstata y riñón (Ardura et al., 2010; Ongkeko et al., 2014). Si bien hasta el momento del desarrollo de esta Tesis se desconocía si el péptido podía modular este proceso en el CCR, varios estudios en pacientes demostraron que un gran porcentaje de adenocarcinomas colorrectales sobreexpresan PTHrP, siendo el nivel más alto de expresión en adenocarcinomas menos diferenciados que en aquellos con mayor grado de diferenciación. Esto no solo sugiere que PTHrP se correlaciona con la severidad y metástasis del CCR sino también con la adquisición del estado indiferenciado (Malakouti et al., 1996; Nishihara et al., 1999; Nishihara et al., 2007).

Con el fin de profundizar en el estudio de las respuestas de las células tumorales intestinales al tratamiento con PTHrP, el siguiente objetivo de este Trabajo consistió en analizar si PTHrP tiene un rol en la modulación del fenómeno de la TEM en el CCR y los resultados obtenidos a partir del desarrollo de este propósito son mostrados en este Capítulo. Para esto se evaluaron marcadores y cambios fenotípicos asociados a este programa en los modelos *in vitro* y en el modelo *in vivo*. Como se obtuvo evidencia en el Capítulo 1 de que PTHrP media la comunicación entre las células endoteliales y las tumorales intestinales, entonces también se exploró si el péptido modula el proceso de TEM en el CCR a través de factores reconocidos por estar involucrados en la adquisición de las propiedades mesenquimales y provenientes de las células endoteliales del microambiente tumoral.

Sección 1: Estudio de la modulación por PTHrP de la TEM en células tumorales intestinales

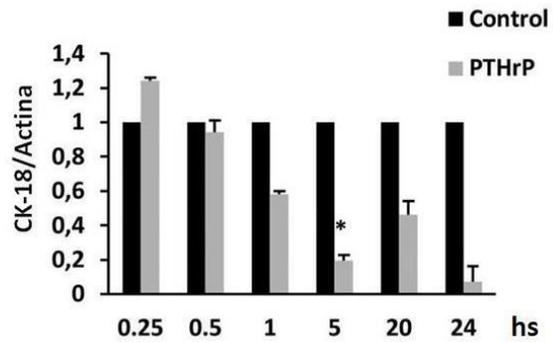
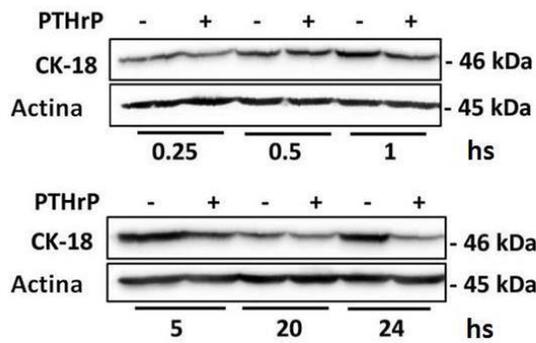
1.1 PTHrP modula la expresión de CK-18, E-cadherina, ZEB1, N-cadherina y favorece cambios morfológicos asociados con la TEM en células HCT116

Como se mencionó, el proceso de TEM involucra cambios drásticos en la morfología celular debido a una disminución de las interacciones intercelulares con la consecuente pérdida de la polaridad apical-basal y una drástica reorganización del citoesqueleto. Así, el cambio del fenotipo epitelial a mesenquimal se caracteriza por la aparición y la pérdida de un grupo de proteínas que han sido reconocidas como marcadores del proceso de TEM. En particular, se ha demostrado que los cambios en la expresión de los marcadores epiteliales citoqueratina 18 (CK-18) y E-cadherina están asociados a este proceso en el CCR (Druzhkova et al., 2019).

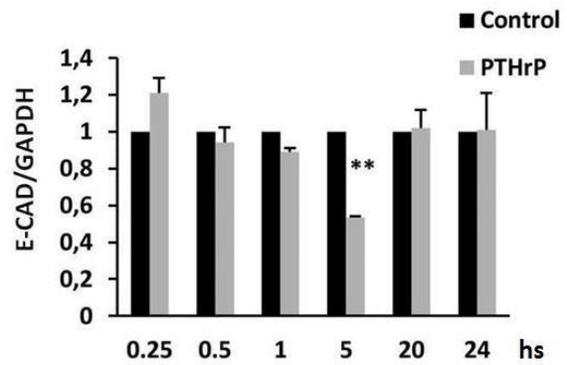
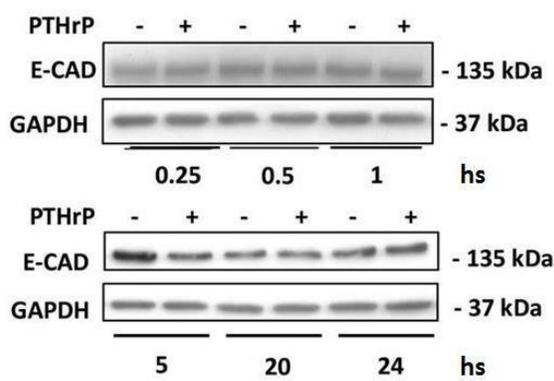
Por tal motivo comenzamos con el estudio de la posible influencia de PTHrP (1-34) 10^{-8} M en la expresión de estas proteínas en las células HCT116 derivadas de CCR. Inicialmente se seleccionaron estas células con el fin de comparar los resultados *in vitro* con aquellos derivados del estudio en los xenoinjertos de las células HCT116 en ratones “nude”. Como se muestra en la **Figura 29A**, el análisis de western blot evidenció que los niveles proteicos de CK-18 y E-cadherina disminuyen a las 5 horas de tratamiento con PTHrP.

En vista del cambio en E-cadherina inducido por PTHrP, a continuación investigamos la expresión de uno de sus represores transcripcionales, ZEB1. Observamos que el péptido en el mismo tiempo de exposición aumentó los niveles proteicos de ZEB1, lo que sugiere que, bajo la acción de PTHrP, el incremento en la expresión de la proteína ZEB1 se acompaña de la correspondiente reducción en la expresión de la proteína E-cadherina. No hubo cambios de estos marcadores en tiempos mayores a 5 horas de tratamiento. Estos resultados fueron confirmados por inmunocitoquímica (**Figura 29B**).

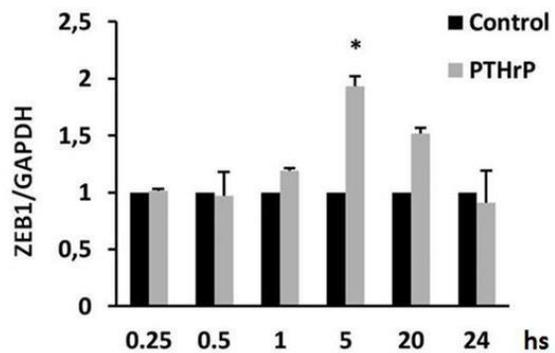
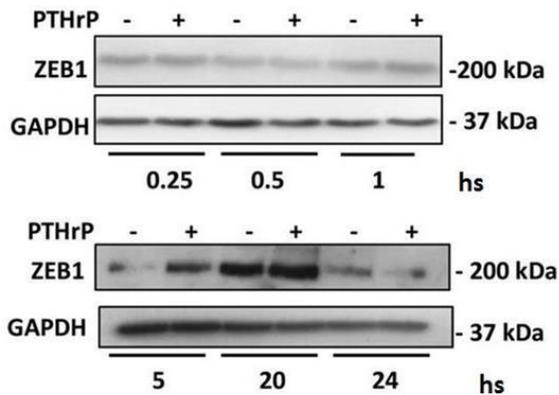
A



B



C



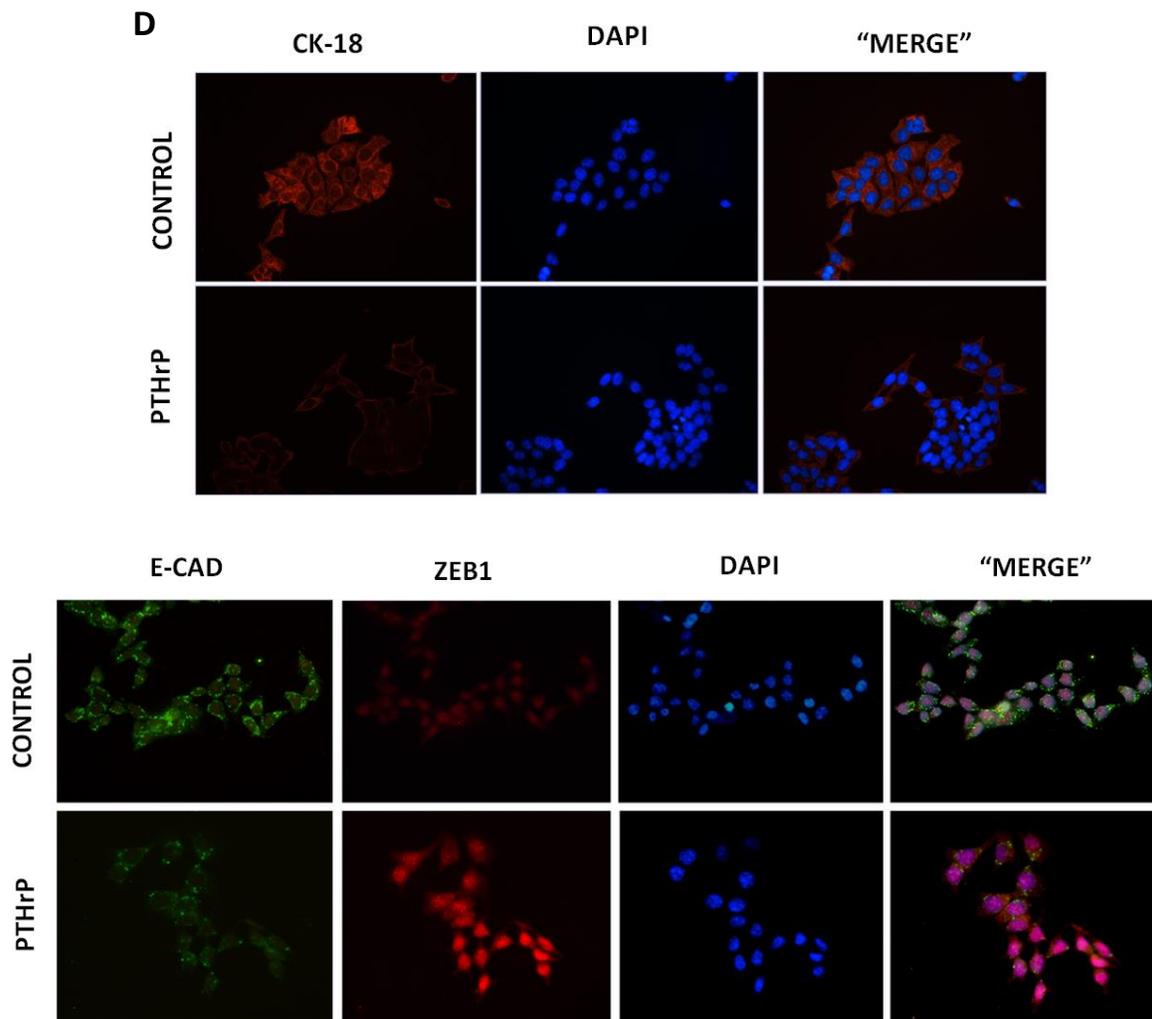


Figura 29. PTHrP modula la expresión proteica de marcadores asociados a la TEM en células HCT116. Mediante el análisis de (A-C) Western blot y (D) inmunocitoquímica, se evaluó la expresión de (A) CK-18, (B) E-cadherina y (C) Zeb1 en la línea celular HCT116. Se muestran inmunotransferencias representativas de tres experimentos independientes y los gráficos de barras correspondientes a las cuantificaciones de las membranas. Se emplearon los anticuerpos anti-GAPDH y anti-actina para determinar los niveles de ambas proteínas como controles de la cantidad de proteínas presentes en la membrana. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia representativas de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ con respecto al control. ** $p < 0,01$ con respecto al control.

Luego, en base a los cambios inducidos por el péptido en la expresión proteica de los marcadores estudiados en la línea celular HCT116, se procedió a evaluar si PTHrP también está involucrada en la modulación de la expresión génica. Como se observa en la **Figura 30**, el tratamiento con PTHrP disminuye los niveles de ARNm de CK-18 y E-cadherina y aumenta los niveles de ARNm de ZEB1 en células HCT116 a las 5 horas de exposición. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que PTHrP modula la expresión de factores involucrados en la progresión de la TEM en células HCT116.

Está establecido que las células epiteliales que experimentan la TEM, en cultivo de baja confluencia evidencian una morfología más elongada (Greenburg y Hay, 1982). Para evaluar si los eventos moleculares hallados pueden conducir a cambios morfológicos potencialmente asociados con la forma mesenquimal, seguidamente se analizaron mediante el registro de fotomicrografías y utilizando el programa Image J los parámetros morfológicos asociados a la pérdida de características epiteliales como se describe en Materiales y Métodos. La observación de las células durante todo el tratamiento con PTHrP y las imágenes de la **Figura 31** muestran que el péptido también induce cambios morfológicos reconocibles a las 24 horas. No hubo cambios en las células no tratadas. La **Tabla 1** y el gráfico de barras revelan que bajo la acción de PTHrP, las células adquieren una morfología asociada al estado mesenquimal. El aumento de la relación entre el eje mayor y menor indica que la exposición a PTHrP durante 24 horas aumentó significativamente el grado de elongación de las células HCT116.

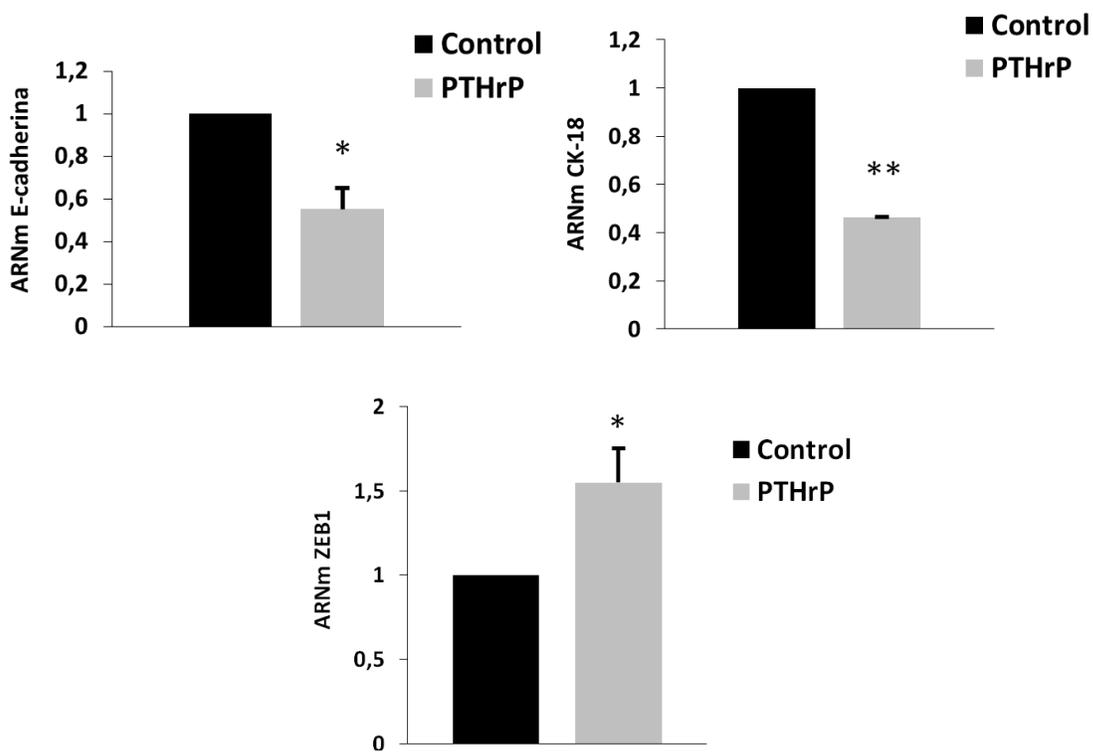


Figura 30. PTHrP modula los niveles de ARNm de CK-18, E-cadherina y ZEB1 en la línea celular HCT116. Las células HCT116 se expusieron a PTHrP durante 5 horas, seguido de un análisis de RT-qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Los gráficos representan los niveles de ARNm de CK-18, E-cadherina y de ZEB1 de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control. ** $p < 0,01$ con respecto al control.

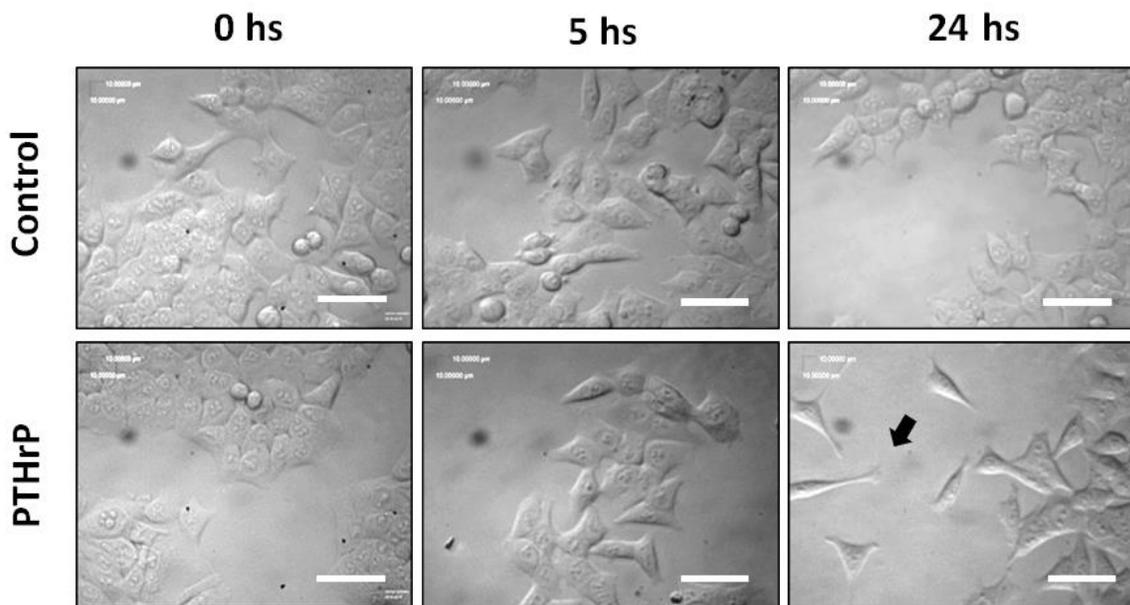


Figura 31. PTHrP induce cambios en la morfología asociados a TEM en células HCT116.

Las células HCT116 se observaron bajo microscopía invertida después del tratamiento con PTHrP durante 5 y 24 horas. Las flechas señalan cambios morfológicos desde una forma poligonal hacia una forma fusiforme observada en la condición de 24 horas. La escala corresponde a 50 µm.

Tabla 1: Las células HCT116 tratadas con PTHrP muestran un incremento en la relación de aspecto.

Condiciones	Área	Perímetro	Redondez	Eje Mayor	Eje Menor	AR
Control 0 hs	486.946	109.886	0.575	39.663	22.824	1.738
PTHrP 0 hs	430.840	121.125	0.512	37.544	30.488	1.231
Control 5 hs	598.320	98.791	0.544	37.429	20.353	1.839
PTHrP 5 hs	439.160	96.534	0.392	37.746	14.814	2.548
Control 24 hs	446.640	87.700	0.489	34.095	16.679	2.044
PTHrP 24 hs	316.440	135.668	0.272	44.121	12.018	3.671

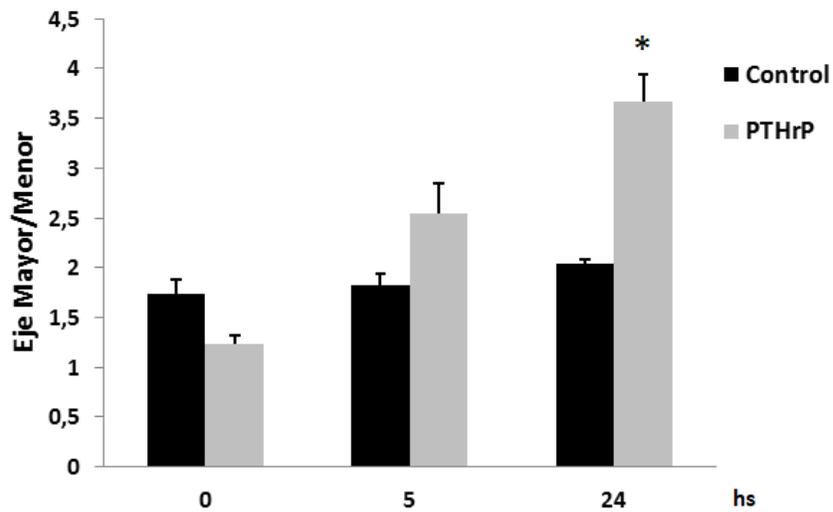


Tabla 1. Análisis de la relación del eje mayor/eje menor obtenido empleando el programa Image J. La tabla muestra el valor de los parámetros celulares: área, perímetro forma redonda, eje mayor, eje menor. El gráfico de barras asociado a la tabla muestra el valor de la relación de eje mayor/eje menor (AR) para cada condición. 10 células fueron medidas por condición para cada experimento por triplicado.

Uno de los eventos desencadenantes en la adquisición de las características mesenquimales es el “cambio de cadherinas” en el que la expresión de E-cadherina es reemplazada por la de N-cadherina la cual confiere uniones intercelulares más lábiles entre las células epiteliales (Loh et al., 2019; Yan et al., 2015). En vista de estos hallazgos, a continuación investigamos el nivel proteico del marcador mesenquimal N-cadherina. De acuerdo con los cambios morfológicos observados, la exposición de PTHrP al mismo tiempo (24 horas) aumenta los niveles de proteína de este marcador mesenquimal en las células HCT116 (**Figura 32**).

En conjunto, los cambios moleculares y morfológicos observados sugieren que el tratamiento con PTHrP induce una transición efectiva hacia el estado mesenquimal en las células HCT116.

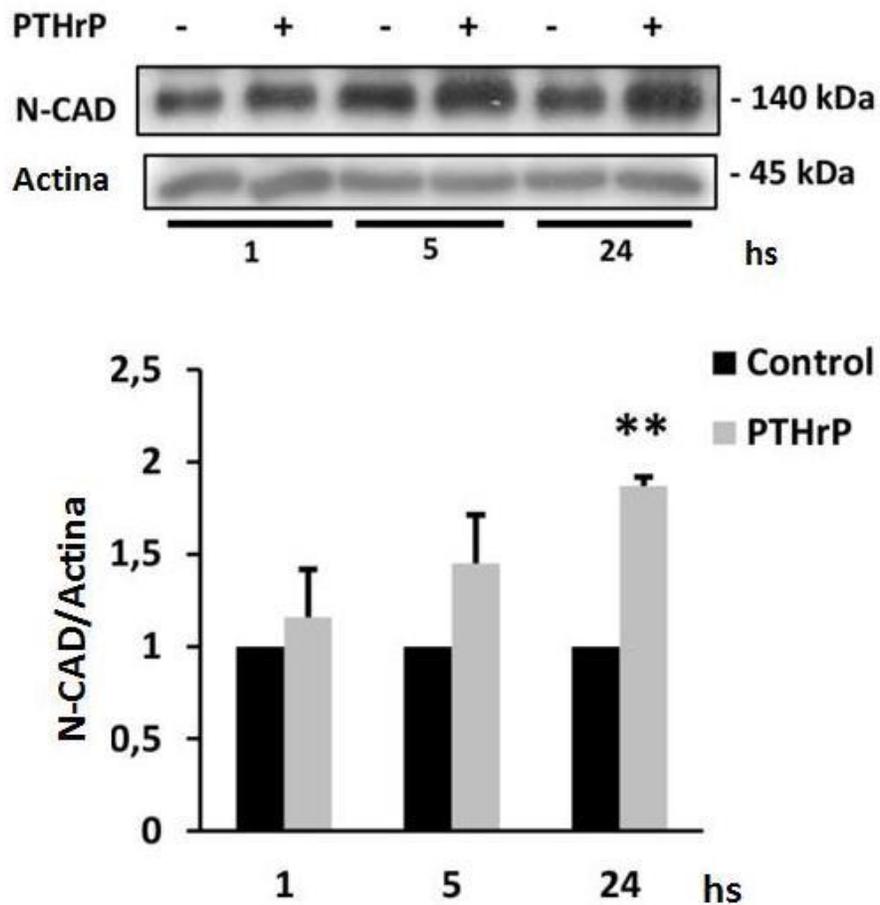


Figura 32. PTHrP incrementa la expresión de N-cadherina en las células HCT116. Las células HCT116 se trataron con PTHrP durante 1, 5 y 24 horas y luego se realizó el análisis de Western blot utilizando un anticuerpo contra N-cadherina. Se empleó el anticuerpo contra actina como control de siembra. Se muestran inmunotransferencias representativas de tres experimentos independientes y la correspondiente cuantificación. **p < 0,01 con respecto al control.

1.2 PTHrP modula la expresión de SPARC y de E-cadherina de forma dependiente de la agresividad de las líneas de CCR

Como se mostró en el Capítulo 1 de este Trabajo de Tesis, PTHrP es capaz de incrementar la expresión de remodeladores de la matriz como las MMP implicadas en la angiogénesis. Considerando la complejidad de señales del microambiente que pueden desencadenar el proceso de TEM, a continuación se exploró la posibilidad de que PTHrP module en las células tumorales la expresión de otros factores que estando presentes en el entorno extracelular puedan estar participando del proceso de TEM. Investigaciones recientes muestran que la expresión de la proteína ácida y rica en cisteína SPARC está significativamente elevada en tumores agresivos de CCR en comparación con aquellos de baja agresividad (Drev et al., 2019) aumentando la capacidad de invasión y la expresión de factores implicados en la TEM. Particularmente, estudios como el de López-Moncada y colaboradores revelan que SPARC sobreexpresado en estadios de Gleason tanto intermedio como alto de cáncer de próstata regula la expresión de CK-18, E-cadherina, ZEB1, junto a otros marcadores, e induce también cambios morfológicos asociados a la TEM (López-Moncada et al., 2019). Esta evidencia coincidente con lo observado hasta el momento respecto al efecto de PTHrP sobre la TEM en células de CCR motivó seguidamente a explorar si el péptido participa de la modulación de SPARC en nuestros modelos experimentales.

Basados en los resultados previos y en el tiempo de tratamiento donde se observaron cambios significativos en la expresión de los marcadores de TEM, entonces se evaluó en la línea HCT116 los niveles de ARNm de SPARC a las 5 horas de exposición a PTHrP mediante RT-qPCR y se observó un incremento significativo de la transcripción de SPARC en estas células a ese tiempo de tratamiento seleccionado (**Figura 33A**). El análisis inmunocitoquímico de la expresión de SPARC reveló un aumento de la fluorescencia en las células tratadas con PTHrP a este tiempo (**Figura 33B**). En base a estos resultados se procedió a realizar ensayos tiempo-respuesta con el fin de analizar si la expresión proteica de SPARC cambia con otros tiempos de exposición a PTHrP. Como se observa en la **Figura**

33C mediante el análisis de Western blot se observó que los niveles proteicos de SPARC se incrementan significativamente a las 5 y 24 horas de tratamiento con PTHrP.

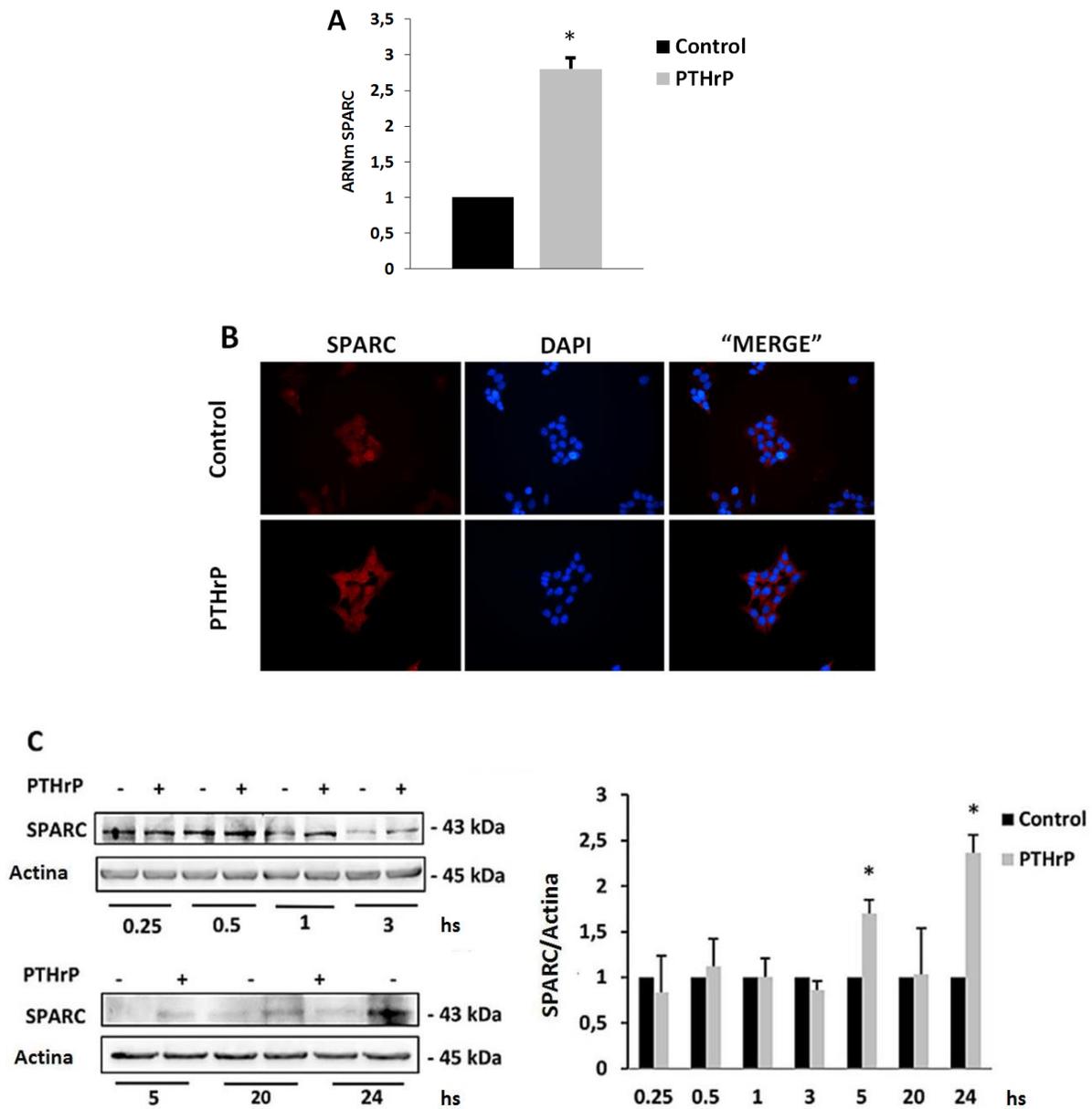


Figura 33. PTHrP incrementa la expresión de SPARC en células HCT116. (A) Mediante análisis de RT-qPCR, (B) inmunocitoquímica y (C) Western blot, se evaluó la expresión de SPARC en la línea celular HCT116. Se muestran gráficos de barras (que corresponden a la cuantificación del ARNm y de las proteínas), campos microscópicos e inmunotransferencias representativos de tres experimentos independientes. Las membranas de todas las inmunotransferencias fueron reprobadas con el anticuerpo anti-actina como control de siembra. *p < 0,05 con respecto al control.

Dado que la expresión de SPARC se correlaciona con estadios más agresivos de la enfermedad de CCR en comparación con estadios menos agresivos (Kim et al., 2013; Porte et al., 1995), entonces luego nos propusimos evaluar la expresión proteica de SPARC en el otro modelo celular de CCR estudiado en esta Tesis, la línea celular Caco-2, que como se mencionó es menos agresiva y más diferenciada que la línea HCT116 con el fin de investigar si el grado de agresividad condiciona una expresión diferencial de este marcador.

Como se ve en la **Figura 34A y B**, las células Caco-2 expresan un nivel casi indetectable de SPARC y no se identificaron cambios bajo el efecto de PTHrP. Este resultado coincide con lo hallado por Kim y colaboradores en la línea Caco-2, quienes afirman que SPARC se encuentra débilmente expresado o es indetectable en casos de CCR con escasa metástasis. El análisis de este resultado se profundizará en la sección Discusión.

A partir de este hallazgo, decidimos evaluar también en esta línea celular los niveles proteicos de E-cadherina, ya que está establecido que la disminución de su expresión es un claro indicador de activación del programa de TEM en el CCR (Gurzu et al., 2016). Para esto, las células Caco-2 fueron expuestas durante diferentes tiempos a PTHrP seguido del análisis por Western blot. Se observó que E-cadherina no modificó su nivel de expresión durante todos los tiempos de exposición a PTHrP (1 a 48 horas) (**Figura 35**).

Estos resultados indican que ni SPARC ni E-cadherina cambian su expresión proteica cuando las células Caco-2 se tratan con PTHrP durante un amplio intervalo de tiempo de exposición.

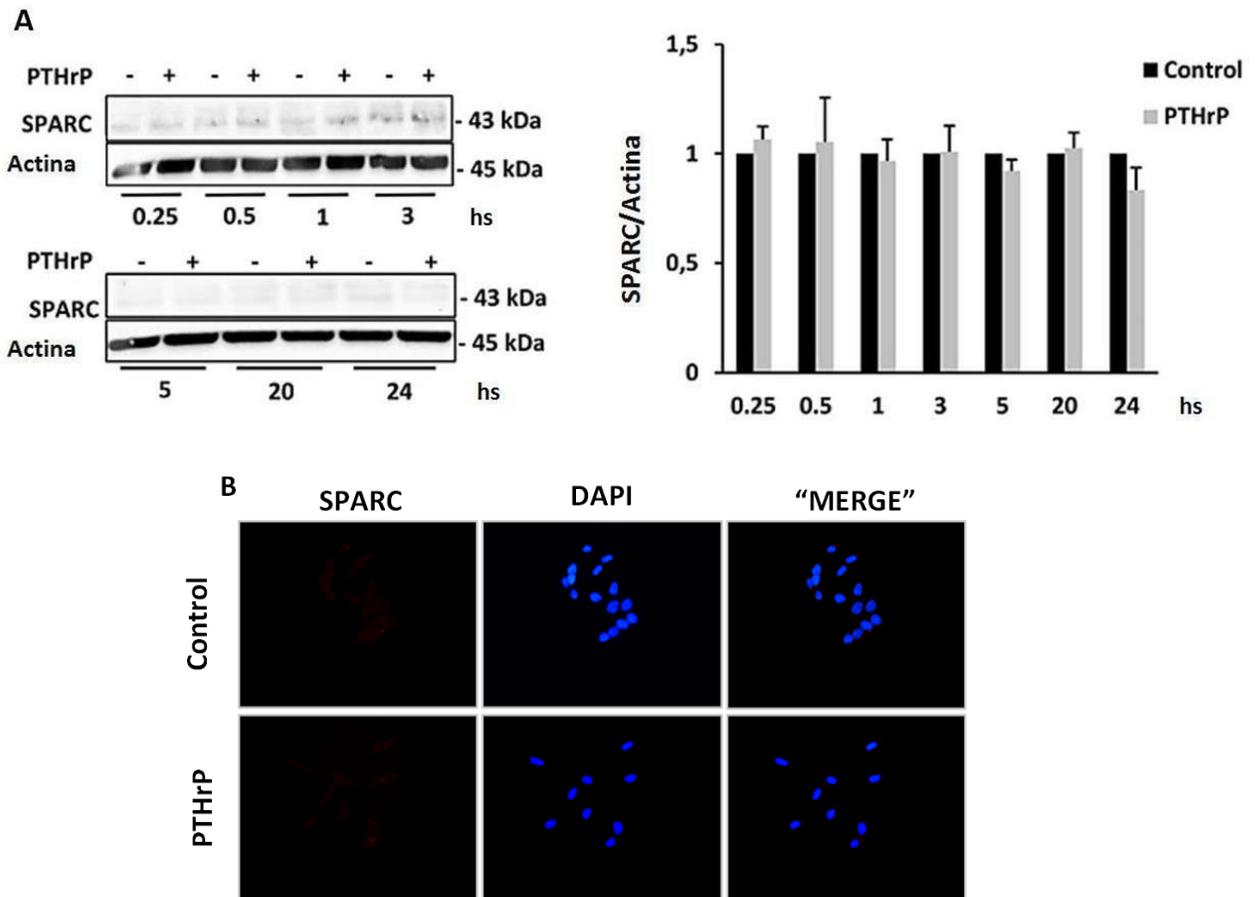


Figura 34. PTHrP no modifica la expresión de SPARC en células Caco-2. Mediante análisis de (A) Western blot e (B) inmunocitoquímica, se evaluó la expresión de SPARC en la línea celular Caco-2. A partir de tres experimentos independientes, se muestran inmunotransferencias representativas y los gráficos de barras, así como campos microscópicos. Para la técnica de Western blot se empleó el anticuerpo anti-actina como control de siembra.

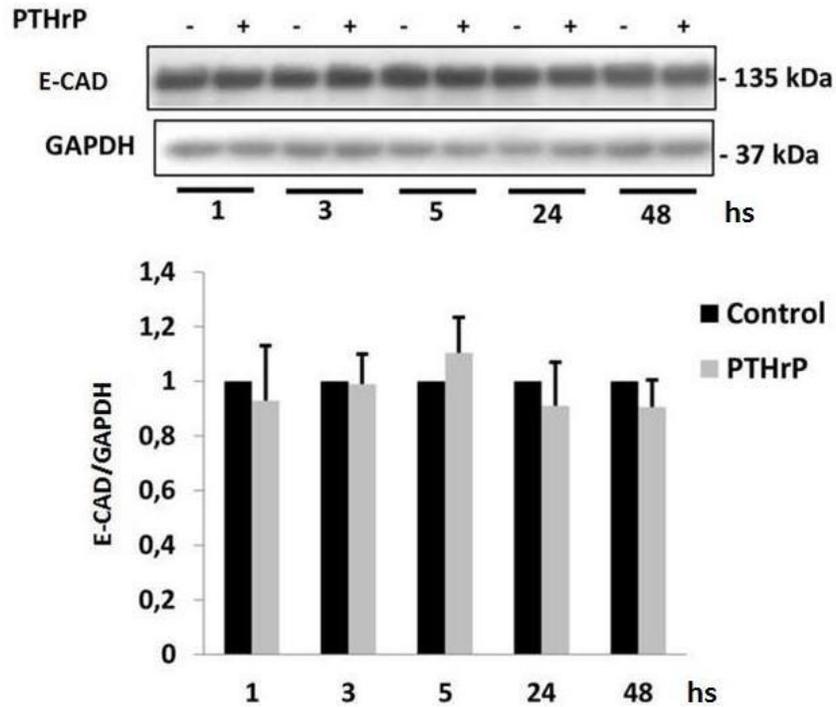


Figura 35. E-cadherina no presenta cambios en su expresión por el tratamiento con PTHrP en la línea celular Caco-2. Mediante análisis de Western blot, se evaluó la expresión de E-cadherina. Se muestra una inmunotransferencia representativa de tres experimentos independientes y la cuantificación de los resultados mediante el correspondiente gráfico de barras. Se empleó el anticuerpo anti-GAPDH como control de siembra.

Sección 2: Estudio de la participación del microambiente tumoral en la modulación por PTHrP de la TEM en células tumorales intestinales

2.1 PTHrP actúa en las células endoteliales HMEC-1 modulando la expresión de SPARC y su liberación

No sólo está establecido que SPARC es un factor presente en el microambiente tumoral que promueve el programa de TEM, sino que también se sabe que puede ser producido por células del microambiente asociado al tumor tal como lo demuestran Kato y colaboradores que hallaron que SPARC está expresada en la línea celular HMEC-1 (Kato et al., 2001). Como se mencionó en el Capítulo 1 de este Trabajo de Tesis, nosotros observamos que las células endoteliales HMEC-1 expresan el receptor RPTH1 y que esta línea responde a la acción de PTHrP. En base a estos resultados y considerando que PTHrP es capaz de modular la expresión de SPARC en las células tumorales HCT116, el siguiente objetivo fue explorar si el péptido también regula la expresión de SPARC en las células HMEC-1. Mediante el análisis por Western blot, se encontró que el tratamiento con PTHrP por diferentes tiempos incrementa los niveles proteicos de SPARC con una diferencia significativa a las 2 horas de exposición al péptido en esta línea endotelial (**Figura 36A**).

A continuación, decidimos investigar si PTHrP induce la liberación de esta proteína al medio ya que se evidenció su acción en el microambiente (Tichet et al., 2015). Para esto, se obtuvieron los medios condicionados endoteliales (MCE) recolectados de células HMEC-1 tratadas con PTHrP, como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 36B**, el ensayo de ELISA revela que el tratamiento con PTHrP aumenta significativamente la secreción de la proteína SPARC en el medio de las células HMEC-1 en comparación con el MCE proveniente de células control. Estos resultados sugieren que en estas células endoteliales, PTHrP modula la expresión de la proteína SPARC y su posterior liberación al medio.

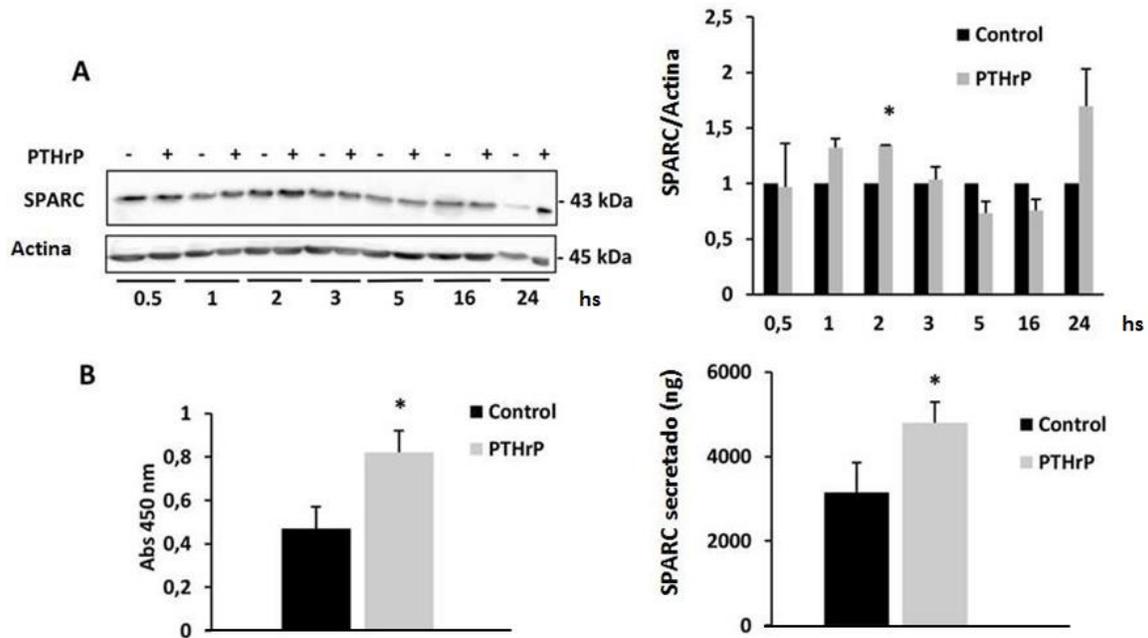


Figura 36. La expresión proteica y la liberación de SPARC aumentan por la acción de PTHrP en las células HMEC-1. (A) Las células HMEC-1 se expusieron a PTHrP durante diferentes tiempos, seguido del análisis por Western blot. Se muestran inmunotransferencias representativas y gráficos de barras de tres experimentos independientes. Se empleó el anticuerpo anti-actina como control de siembra. (B) Ensayo de ELISA para evaluar SPARC empleando MCE provenientes de células HMEC-1 tratadas o no con PTHrP, como se describe en Materiales y Métodos. * $p < 0,05$ con respecto al control.

2.2 El MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP induce cambios tempranos asociados al proceso de TEM en las células HCT116

Las células endoteliales vasculares del microambiente tumoral son una de las fuentes que liberan factores implicados en la progresión tumoral (Alsina-sanchis et al., 2021; Maishi et al., 2019). Como se observó que PTHrP promueve la liberación de un factor de las células HMEC-1 involucrado en el proceso de TEM en el tumor, decidimos evaluar si los MCE obtenidos bajo el tratamiento con PTHrP modulan eventos relacionados con este proceso.

Como se mencionó previamente, de entre todas las moléculas que se pueden emplear como marcadores de la TEM, la E-cadherina es la única que no genera controversias como indicador de este proceso ya que está claramente establecido que los cambios en su expresión en las células epiteliales se asocian a una TEM efectiva. Por ello a continuación se estudió si los MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP modulan la expresión de E-cadherina en las células HCT116.

Bajo el efecto de estos MCE durante 2 horas, los niveles de proteína de E-cadherina disminuyen en las células HCT116 (**Figura 37**). Esta respuesta celular es más temprana que la observada previamente cuando las células HCT116 se expusieron directamente a PTHrP (**Figura 29A**). Luego, también se evaluó la expresión del marcador mesenquimal N-cadherina en estas condiciones. Como se observa en la **Figura 37** los MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP incrementan los niveles proteicos de N-cadherina en las células HCT116.

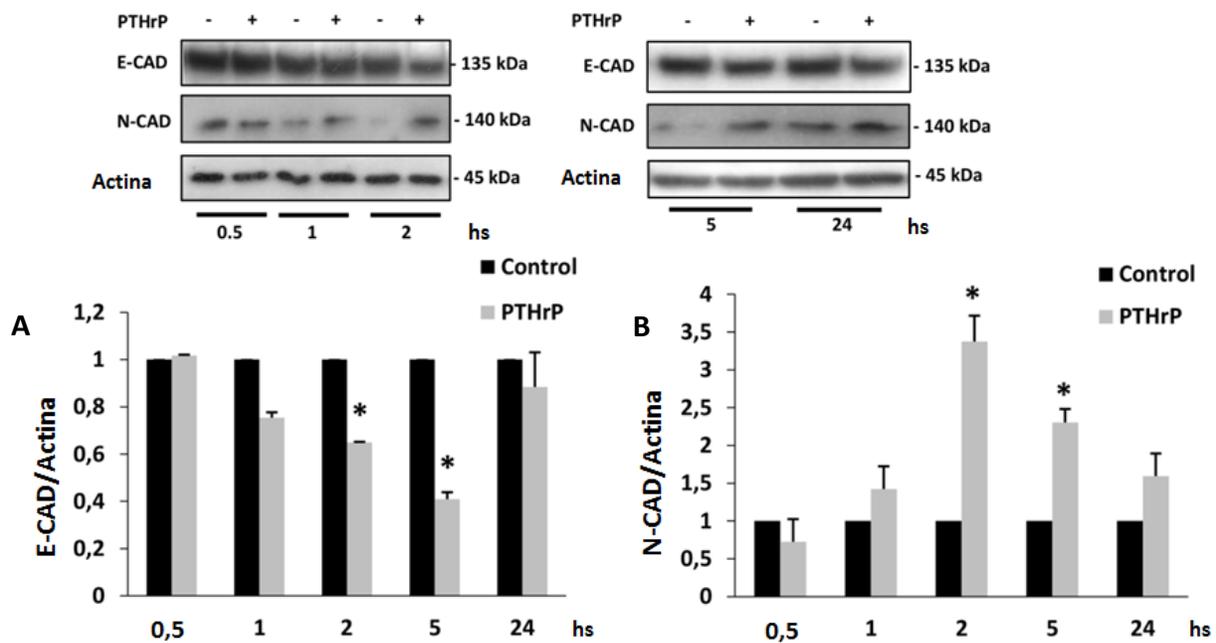


Figura 37. El MCE proveniente de células HMEC-1 tratadas con PTHrP disminuye los niveles proteicos de E-cadherina y aumenta los niveles proteicos de N-cadherina en las células HCT116. Las células HCT116 se expusieron a los MCE de células HMEC-1 tratadas o no con PTHrP por diferentes tiempos y se analizó la expresión proteica por Western blot de (A) E-cadherina y (B) N-cadherina. Se muestran inmunotransferencias representativas y gráficos de barras de tres experimentos independientes. Las membranas luego se reprobaban con el anticuerpo anti-actina como control de siembra. * $p < 0,05$ con respecto al control.

En vista de estos resultados, se procedió a exponer a las células HCT116 a las mismas condiciones para monitorear su morfología celular mediante microscopía invertida. Los mismos parámetros de la **Tabla 1** fueron evaluados en estas nuevas fotomicrografías utilizando el programa Image J y sus valores se incluyen en la **Tabla 2**.

Los cambios en la morfología celular se muestran en la **Figura 38**. La **Tabla 2** y el gráfico de barras revelan que los MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP aumentaron significativamente el grado de elongación celular en las células HCT116 a partir de las 2 horas de exposición. Este efecto resultó más temprano, más drástico y sostenido en los tiempos evaluados en comparación con el observado por la acción directa de PTHrP sobre las células HCT116 (**Figura 31**).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que bajo la acción de PTHrP, las células HMEC-1 liberan factores al medio que a su vez modulan la expresión de E-cadherina (marcador epitelial) y de N-cadherina (marcador mesenquimal) y además favorecen una morfología de TEM en las células HCT116. Asimismo, los cambios moleculares y morfológicos son más tempranos que los observados cuando estas células tumorales fueron expuestas a PTHrP en forma directa.

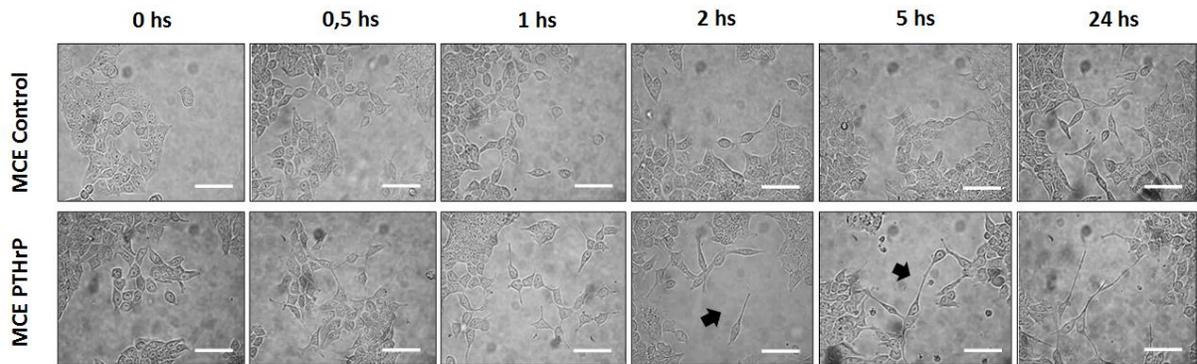


Figura 38. El MCE proveniente de células HMEC-1 tratadas con PTHrP induce cambios tempranos hacia una morfología ahusada en células HCT116. Las células HCT116 se observaron a lo largo del tiempo bajo microscopía invertida después de la exposición al MCE de células HMEC-1 tratadas con PTHrP durante 16 horas. Las flechas indican cambios morfológicos evidentes de pérdida de estructura poligonal en la condición de 2, 5 y 24 horas de tratamiento con este medio. La barra de escala corresponde a 50 μm .

Tabla 2: Los MCE de las células HMEC-1 tratadas con PTHrP aumenta el grado de elongación celular en las células HCT116

Condiciones	Área	Perímetro	Redondez	Eje Mayor	Eje Menor	AR
Control 0 hs	178.857	52.707	0.746	17.471	13.034	1.340
PTHrP 0 hs	299.185	74.135	0.483	28.092	13.560	2.072
Control 0.5 hs	137.549	50.548	0.505	18.617	9.407	1.979
PTHrP 0.5 hs	224.390	93.919	0.483	24.332	11.742	2.072
Control 1 hs	121.631	46.404	0.510	17.432	8.884	1.962
PTHrP 1 hs	153.271	85.070	0.238	28.636	6.815	4.202
Control 2 hs	191.089	60.242	0.543	21.174	11.491	1.843
PTHrP 2 hs	248.682	118.359	0.148	46.214	6.851	6.745
Control 5 hs	113.013	53.189	0.559	16.038	8.972	1.788
PTHrP 5 hs	168.530	99.959	0.138	39.499	5.432	7.271
Control 24 hs	150.024	63.409	0.320	24.420	7.822	3.122
PTHrP 24 hs	295.996	168.492	0.095	63.071	5.975	10.555

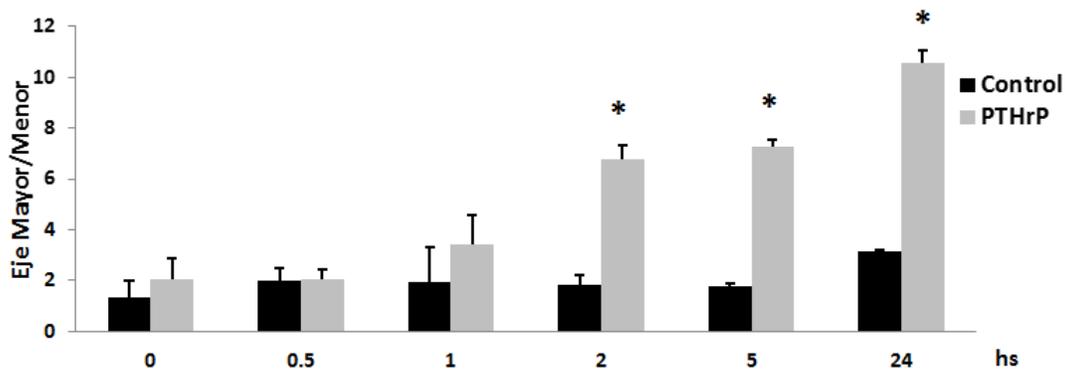


Tabla 2. Análisis de la relación de aspecto (eje mayor/menor) obtenida mediante el programa Image J. Se muestran valores de parámetros relacionados con la morfología celular: área, perímetro, forma redonda, eje mayor, eje menor y la relación eje mayor/eje menor (AR). El gráfico de barras asociado a la tabla muestra el valor de la relación entre el eje mayor y el eje menor para cada condición. Para cada experimento y por condición fueron medidas 10 células.

2.3 SPARC potencia el efecto de PTHrP sobre la modulación de E-cadherina y la migración celular de las células HCT116.

PTHrP no solo aumenta la expresión de SPARC en las células tumorales HCT116, sino también en células del microambiente como las células endoteliales HMEC-1. Más aún, bajo la acción de PTHrP, SPARC es liberado al medio de estas células endoteliales. Estos resultados exponen la complejidad del origen celular de citoquinas como SPARC. Dada la relevancia de SPARC como modulador de la TEM en diversos tipos de cáncer, como el de pulmón (Hung et al., 2017), de cabeza y cuello (Chang et al., 2018) y el hepatocarcinoma (Jiang et al., 2019), y como recientemente se ha demostrado que SPARC podría regular la expresión de la proteína E-cadherina en la línea celular HCT116 (Drev et al., 2019), se procedió a evaluar la influencia de PTHrP junto a SPARC exógeno en la expresión de la proteína E-cadherina en células HCT116.

Por RT-qPCR se observó que el tratamiento simultáneo con ambos factores agregados de forma exógena disminuyó aún más la cantidad de ARNm de E-cadherina respecto a ambos tratamientos por separado, sugiriendo que cuando estos factores actúan juntos, se potencia el efecto en la regulación de la expresión de E-cadherina (**Figura 39**).

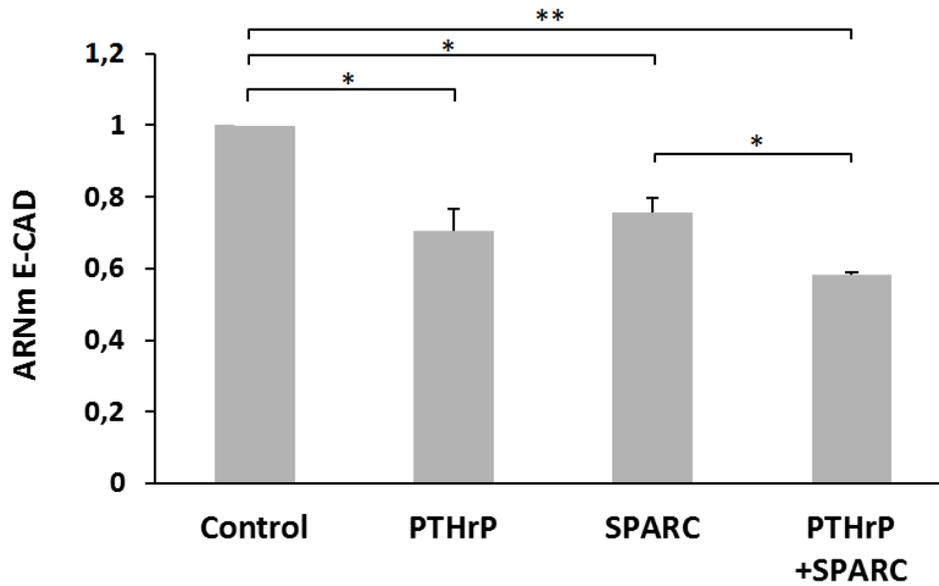


Figura 39. El tratamiento combinado de SPARC y PTHrP tiene un efecto potenciador sobre la disminución de la expresión de E-cadherina en células HCT116. Las células fueron expuestas a PTHrP, SPARC o a una combinación de ambas, y luego se midió el ARNm por RT-qPCR tal como se describe en Materiales y Métodos. Se emplearon paralelamente células control. Se observa que el tratamiento conjunto refuerza la disminución de los niveles de ARNm de E-cadherina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control.

Las células tumorales que pierden la expresión de E-cadherina y presentan un fenotipo mesenquimal, adquieren un comportamiento migratorio (Beerling et al., 2016), que es crucial en la invasión tumoral. Como se ha informado que SPARC es un modulador esencial de este proceso y como en estudios anteriores del laboratorio donde fue desarrollado este Trabajo de Tesis se halló que PTHrP incrementa la capacidad migratoria de las células de CCR (Calvo et al., 2017), se procedió a evaluar el efecto de ambos factores sobre la movilidad de las células HCT116, realizando ensayos de cierre de herida. Como se ve en la **Figura 40**, el tratamiento combinado de PTHrP y SPARC tiene un efecto sinérgico sobre la migración de células HCT116, que se evidencia por un cierre de la herida más pronunciado a las 5 horas de tratamiento con respecto a ambos tratamientos por separado.

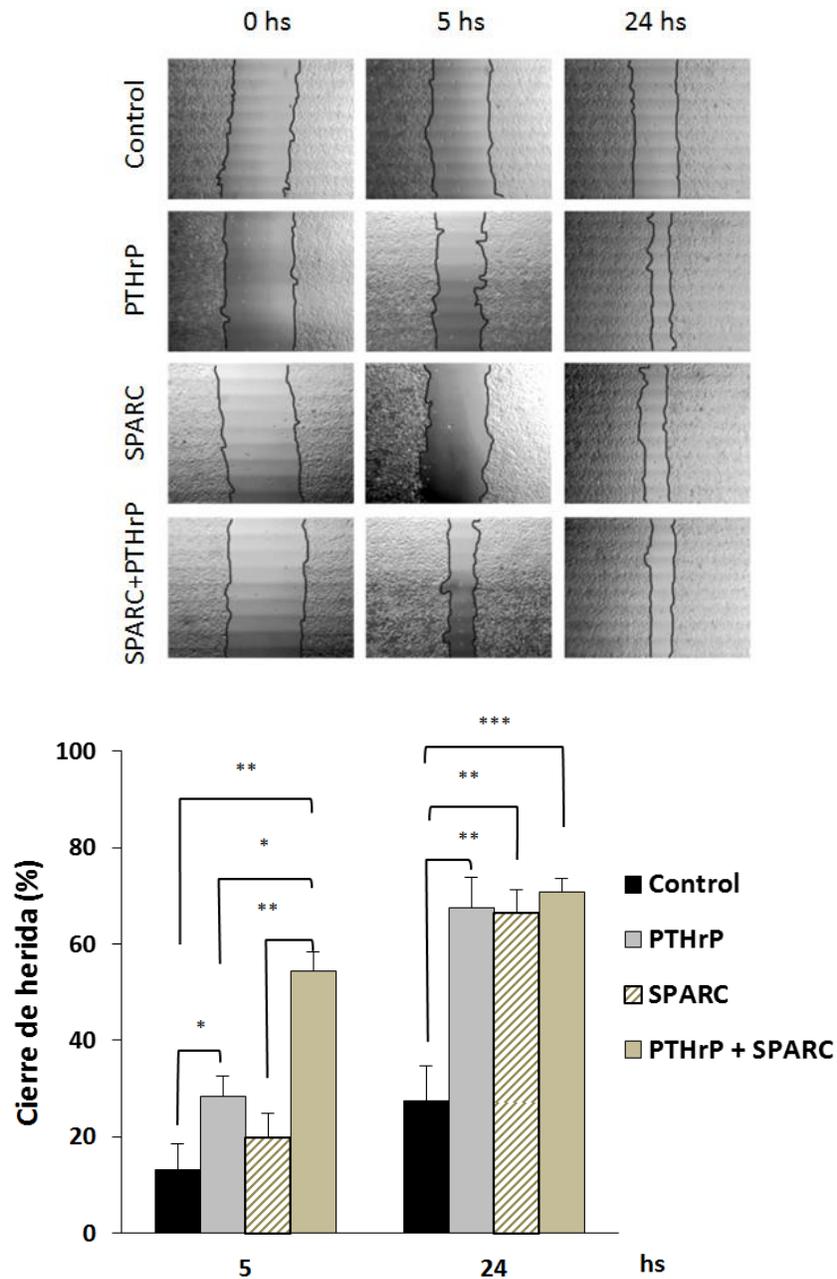


Figura 40. El tratamiento combinado de SPARC y PTHrP incrementa la migración de las células HCT116. Se muestra el ensayo de cierre de herida, donde el mayor efecto se puede observar a las 5 horas de tratamiento conjunto de PTHrP con SPARC. El gráfico de barras representa el porcentaje de cierre de la herida teniendo en cuenta que el 100% es el cierre total sin espacio libre. Los datos se obtuvieron utilizando el programa Image J (MRI Wound Healing Tool). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Sección 3: Estudio del efecto de PTHrP en la modulación de microARNs vinculados a la TEM en el CCR

Como se comentó en la Introducción, en los últimos años se descubrió que los miRs están desregulados en muchos tipos de tumores, incluido el CCR (Shirafkan et al., 2018), y constituyen un mecanismo clave de la progresión tumoral pudiendo actuar como supresores de tumores u oncogenes (Lee y Dutta, 2006). Particularmente, la evidencia reportada indica su rol preponderante en la angiogénesis (Tiwari et al., 2018) y en la TEM (Ferraro et al., 2014). A partir de los resultados expuestos previamente que revelan los mecanismos modulados por PTHrP en las células HCT116 que participarían en la progresión del CCR a través de la TEM, se continuó indagando respecto a la maquinaria molecular que media los efectos de PTHrP y por lo tanto se procedió a explorar si PTHrP modula la expresión de microARNs vinculados a este programa en estas células del CCR.

Se ha estudiado la relevancia clínica de miR-27a en varios tumores sólidos (Zhang et al., 2019) y se informaron resultados contradictorios ya que puede actuar tanto como un oncogén o como un gen supresor tumoral en el CCR. En particular se observó que miR-27a promueve la TEM en el cáncer tanto gástrico (Li et al., 2020) como en el de mama (Jiang et al., 2018), y que favorece la migración e invasión del CCR mediante la regulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Liang et al., 2017). Esto se observa en los tejidos de pacientes y en el análisis bioinformático de muestras donde se encuentran que la sobreexpresión de miR-27a-5p actúa como un regulador clave de genes asociados a la TEM (Busuioc et al., 2021). A pesar de esto, en múltiples estudios no se explora la distinción entre las hebras 3p y 5p de este miR. Por esta razón y basado en los antecedentes expuestos, en este Trabajo de Tesis se analizó la expresión de ambas hebras de miR-27a bajo la acción del péptido y se observó que éstos muestran un patrón de expresión diferencial en células tumorales intestinales tratadas con PTHrP. Mediante el empleo de sondas TaqMan por RT-qPCR se encontró que el tratamiento con PTHrP por 5

horas incrementa la transcripción de la hebra miR-27a-5p en las células HCT116 con un retorno a los niveles del control a las 24 horas. Por el contrario, se observó una disminución consistente en la transcripción de la hebra de miR-27a-3p en estas células tanto a las 5 como a las 24 horas de tratamiento con PTHrP (**Figura 41**).

Recientemente, Ma y colaboradores hallaron que además de participar en la TEM de otros tipos tumorales como de pulmón (Ma et al., 2021a), el análisis bioinformático de miRs exosómicos en muestras clínicas de CCR muestra que miR-423 posee un alto valor diagnóstico para esta patología debido a que participa de una red regulatoria central (Ma et al, 2021b). Por este motivo a continuación se procedió a explorar los niveles de expresión de ambas hebras de miR-423 en las células HCT116 expuestas o no a PTHrP. En la **Figura 42** se observa que el tratamiento con PTHrP durante 5 horas aumenta significativamente los niveles de transcritos de miR-423-3p y miR-423-5p en las células HCT116.

Estos resultados sostienen la importancia de evaluar ambas hebras funcionales de estos miRs. La expresión diferencial de ambas hebras de miR-27a y la sobreexpresión de las dos hebras de miR-423 en las células HCT116 tratadas con PTHrP, indican que el péptido modula la expresión de estos reguladores postranscripcionales claves de genes asociados a este programa celular.

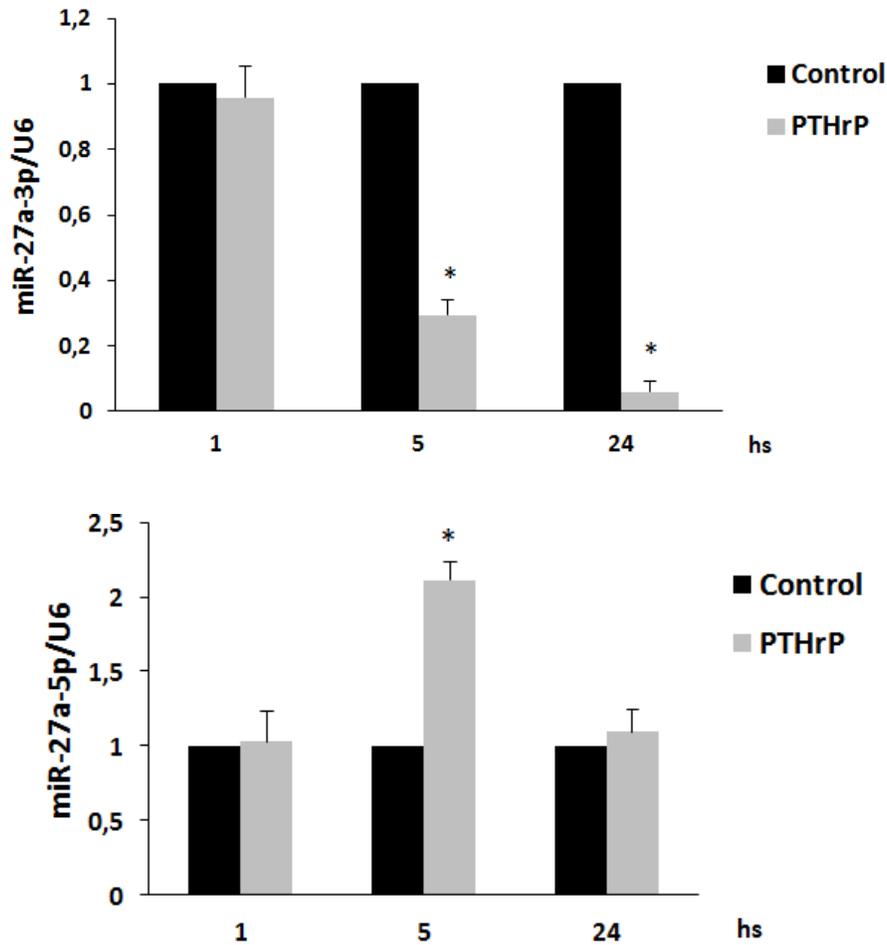


Figura 41. PTHrP modula la transcripción de miR-27a en células HCT116. Las células HCT116 se trataron con PTHrP 10^{-8} M durante 1, 5 y 24 horas. Se procesaron simultáneamente las células control (en ausencia de PTHrP). Los niveles de miR-27a-3p y miR27a-5p se analizaron en todas las condiciones mediante RT-qPCR empleando sondas TaqMan, como se describe en Materiales y Métodos. La expresión se normalizó empleando U6 como control endógeno. Se muestra el gráfico de barras que representa la cuantificación de tres experimentos independientes. *p < 0,05 con respecto al control.

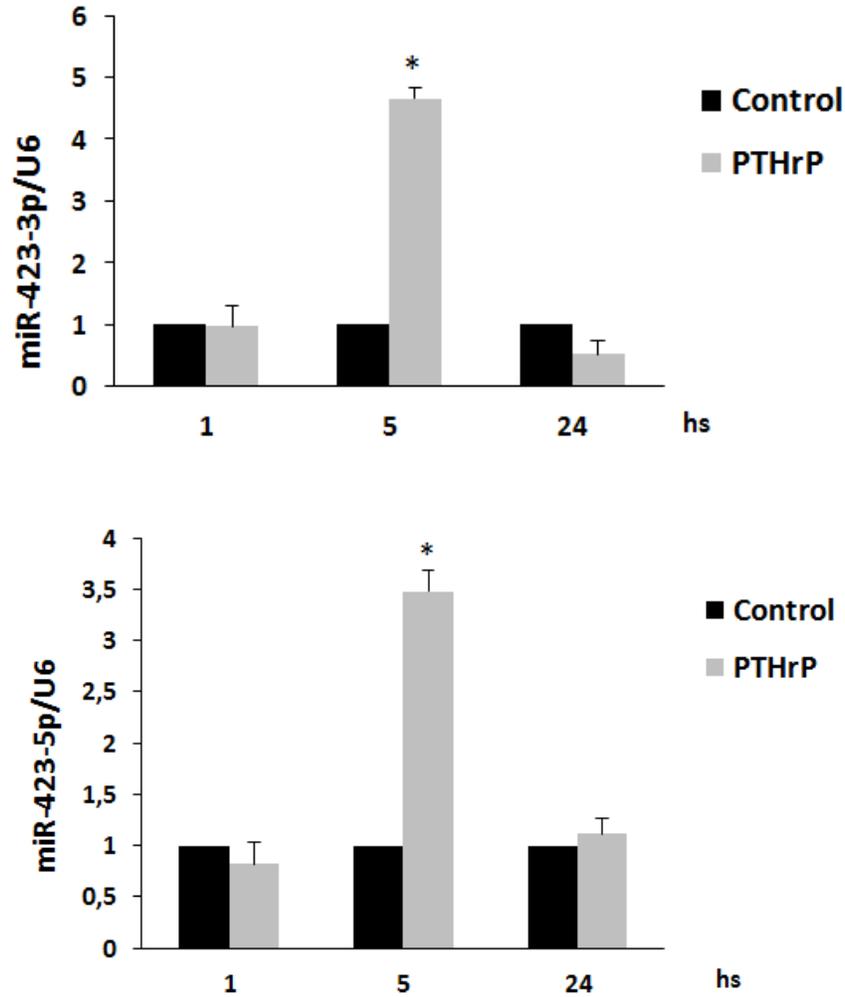


Figura 42. PTHrP modula la transcripción de miR-423 en células HCT116. Las células HCT116 se trataron con PTHrP 10^{-8} M durante 1, 5 y 24 horas. Se procesaron simultáneamente las células control (en ausencia de PTHrP). Los niveles de miR-423-3p y miR-423-5p se analizaron en todas las condiciones mediante RT-qPCR empleando sondas TaqMan, como se describe en Materiales y Métodos. La expresión se normalizó empleando U6 como control endógeno. Se muestra el gráfico de barras que representa la cuantificación de tres experimentos independientes. *p < 0,05 con respecto al control.

Sección 4: Ensayos *in vivo*

4.1. PTHrP modula la expresión de marcadores de la TEM y cambios morfológicos asociados a este programa en xenotrasplantes de células HCT116

En estudios previos del laboratorio donde fue desarrollada este Trabajo de Tesis se observó que la administración intratumoral de PTHrP en xenotrasplantes de células HCT116 en el modelo N: NIH(S) _nu induce una mayor expresión de los marcadores asociados a procesos tumorales Ki67, ciclina D1, ERK1/2 MAPK, CREB/ATF-1 y RSK (Calvo et al., 2017; Martín et al., 2018). En el Capítulo 1 del presente Trabajo se observó que además este péptido favorece la expresión del VEGF en una localización perinuclear, apoyando lo observado por otros investigadores. Con el objetivo de evaluar si los efectos de PTHrP analizados *in vitro* se corresponden con su acción en el modelo *in vivo*, se procedió a analizar los niveles proteicos de SPARC y de E-cadherina en el modelo de ratones inmunodeprimidos N: NIH(S) _nu.

El análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales de CCR de animales control y tratados reveló que la administración diaria de PTHrP (40 µg/Kg) como se describe en Materiales y Métodos, aumenta la expresión de la proteína SPARC siendo la inmunorreactividad de SPARC homogénea en todo el tejido tumoral (**Figura 43A**). El péptido también disminuye la expresión en la membrana celular de la proteína E-cadherina (**Figura 43B**). Las flechas en la **Figura 43B** señalan a las células tumorales tratadas con PTHrP que tienen una forma elongada sugiriendo el fenotipo mesenquimal y que se encuentran en las inmediaciones de vasos sanguíneos. Se presume la presencia de vasos neoformados a partir de la evidencia mostrada en la **Figura 28C (Capítulo 1-Sección 5)** donde se identifica la formación de vasos intratumorales inducido por PTHrP y debido al incremento de la marcación de CD31. La adquisición de esta morfología mesenquimal

no se observó en las células tumorales tratadas con PBS que muestran una mayor expresión de E-cadherina. El gráfico de barras de la **Figura 43C** muestra el valor de la relación entre el eje mayor y el eje menor para cada condición e indica que PTHrP aumentó significativamente el grado de elongación de las células HCT116.

Los resultados de los estudios *in vitro* mostrados en el segundo Capítulo de este Trabajo de Tesis permiten concluir que la acción directa de PTHrP y su efecto mediado por células endoteliales modulan marcadores moleculares y cambios morfológicos claves del programa de TEM en las células HCT116. Los cambios moleculares y morfológicos asociados a este programa son también inducidos por PTHrP en tumores de estas mismas células intestinales.

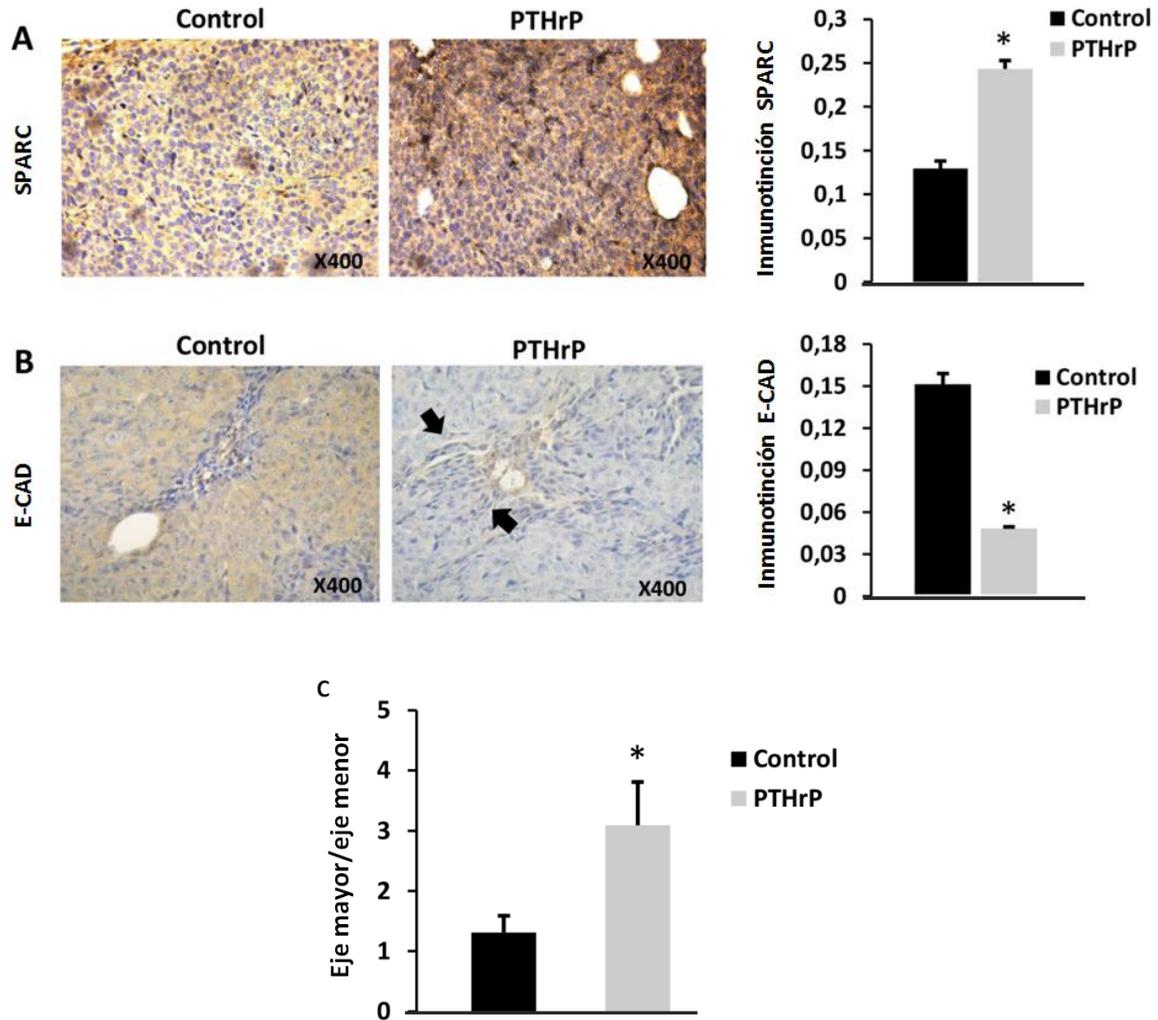


Figura 43. PTHrP modula los niveles proteicos de SPARC y de E-cadherina y aumenta el grado de elongación de células HCT116 en xenotrasplantes. Los tumores originados a partir de xenotrasplantes de células HCT116 se analizaron mediante inmunohistoquímica. Las secciones tumorales se incubaron con los anticuerpos (A) anti-SPARC o (B) anti-E-cadherina. Las imágenes corresponden a tumores tratados con PTHrP y tumores tratados con PBS (solución vehículo). La inmunoreactividad se cuantificó con el paquete de procesamiento de imágenes Fiji del programa Image J. Las flechas indican células con forma ahusada. (C) El gráfico de barras muestra el valor de la relación entre el eje mayor y

el eje menor para cada condición. Se analizaron 10 células por condición.*p < 0,05 con respecto al control.



Discusión del Capítulo 2

Discusión del Capítulo 2

Desde hace algunos años que el programa de TEM se ha vinculado con el CCR. Un estudio realizado por Loboada y colaboradores mostró que en un análisis de microarrays de 326 muestras de CCR, la expresión génica con puntuación más alta se asoció con el programa de TEM (Loboda et al., 2011). Además, se ha visto cómo este proceso es necesario para la adquisición de la capacidad migratoria e invasiva del CCR (Sipos y Galamb, 2012) pero aún queda mucho por entender de éste en los tumores de origen epitelial y su relación con las diferentes señales inductoras del microambiente tumoral. Una de esas señales que pueden participar de la regulación de estas características es PTHrP, el cual puede ser secretado por células tumorales y/o células del microambiente tumoral y aunque su efecto está mediado por diferentes modo de acción, su rol parácrino es el más frecuentemente observado, tal como se mencionó en la sección Introducción (Cowan et al., 2012; Cros et al., 2002; McCauley y Martin, 2012).

Sustentando la hipótesis que motivó el desarrollo de este segundo Capítulo, en la literatura se encuentran estudios que demostraron que PTHrP puede inducir la TEM en células epiteliales de túbulos renales y líneas celulares de cáncer de próstata, y que su acción depende de otras citoquinas presentes en el microambiente tumoral como TGF- β (Ardura et al., 2010; Ongkeko et al., 2014). De acuerdo con estas observaciones, en este Trabajo de Tesis se descubrió que PTHrP de forma exógena puede inducir cambios en la expresión de las proteínas CK-18, E-cadherina, Zeb1, N-cadherina y SPARC, moléculas asociadas con la TEM en las células HCT116 (Druzhkova et al., 2019; Guo et al., 2017; Kuga et al., 2013; Shen et al., 2016). Además, el péptido induce cambios morfológicos reconocibles en esta línea derivada de CCR, y esta respuesta celular observada por la acción directa de PTHrP durante 24 horas podría deberse en parte al aumento significativo de la expresión de SPARC, inducida por el péptido al mismo tiempo. A su vez, la expresión de SPARC se asocia con una mayor capacidad migratoria del CCR invasivo (Porter et al.,

1995; Wiese et al., 2007); sin embargo, los estudios sugieren que su función biológica depende de la agresividad del tumor, su origen celular y su interacción con otros factores liberados por las células tumorales y del microambiente (Podhajcer et al., 2008; Yoshimura et al., 2011). Esto resalta la importancia de evaluar el origen de SPARC, así como su asociación con la agresividad del tumor para comprender su función en las diferentes etapas de la patología.

Los resultados de este Trabajo de Tesis en la línea celular Caco-2 muestran niveles de expresión muy bajos de SPARC y ningún cambio en su expresión en respuesta a PTHrP; además también se encontró que el tratamiento con PTHrP, a diferencia de lo observado en la línea celular HCT116, no modificó el nivel de expresión proteica de E-cadherina en un amplio rango de exposición. Esto sugiere una respuesta diferencial a PTHrP en donde la mayor respuesta del fenotipo más indiferenciado conduce a la progresión de un fenotipo más agresivo. Como se comentó anteriormente ambas líneas, Caco-2 y HCT116, son derivadas del CCR pero fenotípicamente diferentes y con distintas mutaciones que están involucradas en el desarrollo de la patología (Ahmed et al., 2013). El efecto diferencial de PTHrP en la inducción de la TEM en las líneas Caco-2 y HCT116 plantea la necesidad de considerar las diferencias moleculares entre ambas. Debido a que la línea Caco-2 es más diferenciada que la línea HCT116 es posible que un cierto nivel de desdiferenciación sea necesario para hacer que las células sean permisivas a la TEM inducida por PTHrP. Como se mencionó en la discusión del primer Capítulo, la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano posee el gen KRAS de tipo salvaje, BRAF de tipo salvaje, PI3KCA de tipo salvaje, PTEN de tipo salvaje y la mutación E204X en TP53. En cambio, en la línea HCT116 derivada de carcinoma colorrectal humano, además de poseer inestabilidad de microsatélites, en sus células se encuentra la mutación G13D de KRAS, BRAF tipo salvaje, la mutación H1047R de PI3KCA, PTEN tipo salvaje y TP53 de tipo salvaje (Ahmed et al., 2013; Berg et al., 2017). Quizás los eventos desencadenados por PTHrP asociados al programa de TEM pueden ser dependientes de mutaciones como KRAS, cuya señalización

ha sido asociada con la TEM (Singh et al., 2009), lo que podría explicar la diferente respuesta de ambas líneas celulares.

Por otro lado, la evidencia reunida en los últimos años indica una fuerte asociación entre el programa de TEM y la señalización de Wnt/ β -catenina, que se activa con elevada frecuencia en el CCR. La activación de esta vía da como resultado la translocación nuclear de β -catenina, como se observa en áreas tumorales rodeadas por estroma lo que se asocia a la influencia de factores microambientales del tumor (Fodde y Brabletz, 2007). Resultados previos en el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo de Tesis, y que motivaron el desarrollo del mismo, demostraron que PTHrP promueve la fosforilación, activación y traslocación nuclear de β -catenina a través de las vías de Akt y MAPKs. En esos estudios la inhibición de ERK1/2 y β -catenina bloqueó el efecto sobre la proliferación inducida por PTHrP tanto en las células Caco-2 como en las células HCT116 (Martín, Tesis 2018; Martín et al., 2014). Sería relevante evaluar si estas vías están implicadas en la acción de PTHrP sobre la expresión de los marcadores de TEM analizados, o como sugiere el efecto diferencial observado, es dependiente de mutaciones específicas u otros factores del microambiente. En este sentido, se ha observado la expresión diferencial de SPARC en varios tipos de cáncer (Podhajcer et al., 2008), pero no está claramente establecido el motivo por el cual posee efectos variables sobre la agresividad de diferentes tejidos tumorales.

Una búsqueda bibliográfica realizada al momento de comenzar con este Trabajo de Tesis indicaba que hasta esa fecha no había ninguna publicación mostrando estudios de la acción parácrina de SPARC. Sin embargo, al mismo tiempo que nosotros publicábamos los resultados referentes al rol de PTHrP y SPARC en la TEM del CCR, Naito y colaboradores informaban su trabajo basado en el análisis de la asociación entre la expresión de SPARC y las características clínico-patológicas en 42 casos clínicos de CCR. La expresión de SPARC en las células tumorales de estas muestras se asoció con estadios avanzados y mal pronóstico. Además la TEM mediada por SPARC se observó en el borde del tumor donde

las células tumorales y las células estromales están en contacto directo entre sí (Naito et al., 2021).

En este Trabajo de Tesis se halló, por primera vez, que PTHrP aumenta la expresión de la proteína SPARC no solo en células tumorales HCT116 sino también en las células endoteliales HMEC-1. Además, se observó un aumento en la secreción de la proteína SPARC al medio de las células HMEC-1 tratadas con el péptido durante 16 horas. Es importante considerar que SPARC tiene una vida media de su ARNm de aproximadamente 50 horas (Delany y Canalis, 1998; Wrana et al., 1991), y que además Kato y colaboradores observaron la presencia de la proteína de SPARC a las 48 horas de cultivo luego de la privación de suero en las células HMEC-1 sugiriendo que es capaz de ser liberado lentamente luego de su producción en estas células (Kato et al., 2001b). Por este motivo suponemos su producción activa y consecuente secreción al medio de estas células en el tiempo evaluado. En línea con estos resultados, otros autores también hallaron la expresión de SPARC en células del microambiente tumoral. Drev y colaboradores sugieren que SPARC proveniente de fibroblastos estimulados con TGF- β , tiene un efecto prometastásico en las células de CCR. En el mencionado estudio, los mayores niveles de SPARC se asociaron a estadios avanzados del tumor y además, la alta expresión de SPARC en el estroma se asoció con una supervivencia más corta en la enfermedad recurrente (Drev et al., 2019). Asimismo, un estudio de microarrays de tejido de 332 muestras de pacientes con CCR mostró que la sobrevida global estaba inversamente correlacionada con la expresión de SPARC en el estroma tumoral, donde los niveles eran más altos que en el tejido normal e incluso más altos que en los tumores (Kim et al., 2013). Ante este escenario, este Trabajo de Tesis apoya la importancia de estudiar las células endoteliales no solo por su participación en el proceso de angiogénesis asociada al tumor, sino también como componentes del microambiente que pueden influir en el fenotipo agresivo de las células tumorales.

Por este motivo, en base a los resultados obtenidos de que PTHrP promueve la liberación de SPARC de las células endoteliales HMEC-1, el cual es un factor reconocido para modular el proceso de TEM en diferentes tipos de cáncer, se decidió evaluar si el medio condicionado obtenido de estas células previamente tratadas con el péptido induce cambios relacionados con la TEM en las células HCT116. El sello distintivo de la TEM es la disminución de la expresión de E-cadherina producto de una regulación compleja dada por vías de señalización, factores de transcripción y moléculas efectoras (Vu y Datta, 2017). En respuesta a una variedad de señales de inducción, el descenso de los niveles de E-cadherina conduce a la desestabilización de las uniones adherentes, y su disminución localizada en los bordes invasivos del tumor se asocia con un mal pronóstico en pacientes con CCR en estadio III (Yun et al., 2014). Resultados obtenidos por Busch y colaboradores (Busch et al., 2016), muestran que la baja expresión de E-cadherina se asoció con un mayor riesgo de muerte dentro de los 5 años posteriores a la cirugía y resaltan que constituye un marcador prometedor para identificar a los pacientes con CCR en riesgo de enfermedad metastásica.

Los resultados de este segundo Capítulo muestran que en las células HCT116 expuestas al MCE de células HMEC-1 tratadas con PTHrP disminuyó la expresión de E-cadherina en mayor magnitud y mediante una respuesta más rápida, en comparación con el tratamiento directo con PTHrP sobre estas mismas células tumorales. Además, los niveles de expresión proteica del marcador N-cadherina en las células tumorales también fueron modulados por estos MCE. Recientemente en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis se halló que empleando el inhibidor SU11274 de la vía de activación del receptor MET, estos cambios de E-cadherina por el efecto directo de PTHrP se revierten. Estos datos constituyen resultados de la Tesis Doctoral de la Tesista María Belén Novoa Díaz (en curso) y están presentados en un trabajo recientemente aceptado para su publicación (Novoa Díaz et al., WJG, en prensa).

El análisis morfológico mostró que, en presencia de estos MCE de células HMEC-1 tratadas con PTHrP, las células HCT116 experimentan cambios morfológicos más drásticos, más

tempranos y sostenidos en los tiempos evaluados, comparado con lo observado en las células HCT116 bajo la acción directa del péptido. Estos cambios morfológicos son similares a los observados por Kato y colaboradores en células HCT116 que experimentan el programa TEM (Kato et al., 2020). De acuerdo con estos hallazgos, otros estudios demostraron que los factores secretados por las células endoteliales del entorno pueden promover un fenotipo de TEM agresivo. El factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) secretado por células endoteliales indujo la TEM en células tumorales de cabeza y cuello (Zhang et al., 2014). Por otro lado, las células endoteliales incrementaron la TEM, la migración, invasión y metástasis de células de cáncer de mama mediante la liberación del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1 por sus siglas en inglés) y la quimiocina CCL5 (Zhang et al., 2018). Además, factores liberados de células endoteliales, como TGF- β , promovieron la TEM en el carcinoma hepatocelular inducido por el virus de la hepatitis B (Rawal et al., 2019). Más aún, SPARC podría influir en el proceso de TEM al desempeñar un rol autocrino o paracrino en el tumor (López-Moncada et al., 2019).

En base a estos antecedentes, en este Trabajo de Tesis se investigó a continuación si PTHrP y SPARC podrían ser parte de una red de regulación autocrino-paracrino que converge en el programa de TEM. Se halló que el tratamiento exógeno de PTHrP en combinación con SPARC, promueve aún más la disminución de los niveles de ARNm de E-cadherina, con respecto a ambos tratamientos por separado en las células HCT116. Este resultado es consistente con la disminución en la expresión de la proteína E-cadherina en respuesta a SPARC en células HCT116 observada por Drev y colaboradores (Drev et al., 2019). Sin embargo, en este Trabajo de Tesis se demostró que el tratamiento combinado de PTHrP y SPARC potencia este efecto en la reducción de este marcador a nivel de la transcripción. Además, se halló que la exposición de las células HCT116 a ambos factores durante 5 horas aumenta la capacidad migratoria de estas células, en comparación con la exposición por separado. Este resultado plantea la necesidad de más investigaciones para profundizar en este efecto sinérgico y dilucidar si existe una relación secuencial entre la

acción de PTHrP y de SPARC, de acuerdo a lo observado en la expresión de SPARC inducida por PTHrP.

En el efecto observado en las células HCT116 expuestas a los MCE a los tiempos evaluados, se descarta la presencia de PTHrP residual en el MCE debido a que este péptido posee una vida media muy corta cercana a los 5-6 minutos según estudios previos (Deans et al., 2005; Henry et al., 1997). Estos valores son similares a los reportados por Fraher y colaboradores (Fraher et al., 1995). Además, Ratcliffe y colaboradores también demostraron que, en condiciones fisiológicas, el tiempo medio de desaparición de PTHrP *in vivo* es inferior a 5 minutos (Ratcliffe et al., 1993). Por lo tanto, se estima que los efectos observados se deben exclusivamente a la presencia de factores derivados de las células endoteliales y no a la presencia de PTHrP remanente producto del tratamiento.

En base a los resultados obtenidos en el modelo *in vitro*, se evaluó el efecto de PTHrP sobre xenotrasplantes de células HCT116 empleando el modelo N:NIH(S)_nu. Aunque los xenotrasplantes tumorales tienen limitaciones para el estudio del microambiente tumoral por no tratarse de un modelo ortotópico o de tumor inducido, resulta conveniente en el empleo de líneas celulares tumorigénicas como la línea HCT116 para no solo incrementar la complejidad del modelo de CCR, sino para establecer una correlación con los efectos observados *in vitro*. Así, este modelo de xenotrasplante aporta más información respecto al comportamiento de las células HCT116 en el estudio de la influencia del microambiente. En este Trabajo de Tesis se observó que en tumores de células HCT116 tratados con PTHrP se evidencia un incremento homogéneo en la expresión de la proteína SPARC y una disminución en la expresión de E-cadherina en la membrana celular, respecto a los tumores no tratados con el péptido. Además, encontramos que solo las células tumorales de ratones tratados con PTHrP adquieren una forma elongada relacionada con un fenotipo mesenquimal. Rajput y colaboradores describieron características morfológicas similares a las que nosotros encontramos en células HCT116 inyectadas en un modelo murino, donde estas células pueden invadir la mucosa colónica, posiblemente mediante la adquisición del programa de TEM (Rajput et al., 2008).

Bao y colaboradores analizaron muestras de pacientes donde observaron que en comparación con la mucosa colónica normal, el 73% de los tejidos de CCR muestran una expresión reducida de miR-27a, y solo el 27% de los casos de CCR evidencian una sobreexpresión de este miR, lo que sugiere una participación como un supresor tumoral. Además en el mencionado trabajo, los niveles de expresión de miR-27a se determinaron adicionalmente en líneas celulares de CCR donde su expresión se redujo un 95%, 90% y 52% en las células HCT116, Caco-2 y SW480, respectivamente, en comparación con la línea normal de colon humano inmortalizada NCM460 (Bao et al., 2014). También se ha informado que miR-27a exosómico circulante puede usarse como un nuevo biomarcador de diagnóstico y pronóstico en el CCR (Vychytilova-Faltejskova et al., 2016). Utilizando cohortes independientes de pacientes con CCR y modelos experimentales, Barisciano y colaboradores proporcionaron evidencia de que miR-27a actúa como un regulador clave del metabolismo del CCR que favorece un fenotipo agresivo y la adquisición de quimiorresistencia (Barisciano et al., 2020). Por otra parte, Li y colaboradores informaron que miR-423-3p se sobreexpresa en los tejidos de CCR en comparación con los tejidos normales (Li et al., 2015), pero contrariamente a estos resultados se ha observado que miR-423-5p participa de un circuito inhibitorio de la TEM en estas células (Dong et al., 2022). A la fecha se conoce un solo trabajo el cual ha analizado la relevancia de evaluar la expresión de ambas hebras de miRs implicados en el CCR (Choo et al., 2014). Como se detalló en la Introducción, durante su procesamiento una de las hebras del pre-miARN se degrada y la otra hebra determina el miR maduro. De esta forma diversas señales extracelulares pueden determinar una selección de hebra como un mecanismo alternativo de regulación de una función biológica (Choo et al., 2014). En este Trabajo se halló que PTHrP modula diferencialmente ambos brazos de miR-27a. A las 5 horas de tratamiento con PTHrP se evidencia un incremento en la expresión de miR-27a-5p, mientras que a las 5 y 24 horas de exposición al péptido disminuye consistentemente la transcripción de la hebra miR-27a-3p. Además se halló que el tratamiento con PTHrP incrementa la expresión de ambas hebras de miR-423 a las 5 horas, sin observarse cambios a 1 hora y a 24 horas. Estos tiempos se eligieron de acuerdo al efecto observado de PTHrP en los cambios

moleculares y fenotípicos asociados a los eventos protumorales descritos en los Capítulos 1 y 2 de esta Tesis.

Retomando con el rol potencial de SPARC en la progresión del CCR, los resultados de este segundo Capítulo indican que esta función puede deberse a la regulación de su expresión por otros factores del microambiente como PTHrP, lo que constituye un nuevo mecanismo de acción de PTHrP sobre la progresión del CCR. No se descarta explorar más a fondo este efecto de PTHrP sobre las células derivadas de CCR, por ejemplo mediante la interrupción de esta red reguladora silenciando tanto a PTHrP como a SPARC, y estudiando también otros factores que puedan participar en el efecto observado. En este Trabajo no se evaluó el efecto del MCE de células endoteliales tratadas con PTHrP sobre la línea celular Caco-2. Los resultados sugieren que PTHrP por sí solo no es capaz de promover cambios asociados a TEM en esta línea, pero no descartan la existencia de un efecto mediado por los MCE. Por lo tanto, el efecto de PTHrP sobre los cambios moleculares y morfológicos asociados al proceso de TEM podría estar mediado por factores que no solo modulan la remodelación del estroma, lo que motivó su estudio en un principio, sino que también podrían participar en diferentes niveles de regulación del estado mesenquimal que converge en un estado más agresivo de las células del CCR.



Capítulo 3:

***Análisis mediante la exploración
de bases de datos de la implicancia
clínica de los marcadores
modulados por PTHrP y
vinculados con la angiogénesis y
la TEM del CCR***

Capítulo 3: Análisis mediante la exploración de bases de datos de la implicancia clínica de los marcadores modulados por PTHrP y vinculados con la angiogénesis y la TEM del CCR

El desarrollo de herramientas para el análisis de grandes conjuntos de datos ha sido clave para documentar y optimizar esfuerzos en la investigación de nuevos marcadores y vías de señalización relevantes en el cáncer. En el año 2006 un trabajo conjunto entre el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano de Estados Unidos permitió el desarrollo del proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés) que documenta el estudio descriptivo y comparativo de muestras clínicas provenientes de 33 tipos de cáncer (Tomczak et al., 2015). En paralelo ha crecido el número de plataformas disponibles en línea (“on line”) y programas de análisis de datos, que han condensado la enorme cantidad de información publicada en los últimos años.

Con esta visión es que en este Trabajo de Tesis se consideró crucial emplear bases de datos y herramientas para el análisis de éstos con el fin de poner en contexto los hallazgos *in vitro* e *in vivo* descritos en el Primer y Segundo Capítulo y vinculados a los efectos de PTHrP en los procesos de la angiogénesis y la TEM del CCR.

Sección 1: Estudio de genes sobreexpresados en pacientes con CCR asociados a la angiogénesis y a la TEM.

La plataforma GEO del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), es una base de datos de acceso gratuito a experimentos de microarrays y de secuenciación de perfiles de genes que puede emplearse para la exploración y análisis de muestras clínicas en las ciencias biomédicas. Inicialmente se empleó la base de datos en línea GEO y su programa estadístico asociado GEO2R para analizar cuatro conjuntos de datos de expresión génica de muestras intestinales de pacientes con CCR en comparación con muestras de pacientes sanos. Se obtuvieron las siguientes accesiones: 1-GSE41258: Affymetrix Human Genome U133A Array - 54 muestras normales y 186 muestras de tumor primario; 2- GSE37364: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array - 38 muestras normales y 27 muestras de tumor primario; 3- GSE68468: Affymetrix Human Genome U133A Array - 53 muestras normales y 186 muestras de tumor primario y 4- GSE9348: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array - 12 muestras normales y 70 muestras de tumor primario. Para obtener los genes expresados diferencialmente (GED), los datos fueron analizados por GEO2R con una probabilidad ajustada por Benjamini y Hochberg (tasa de descubrimiento falso) de $p < 0,05$ (Glickman et al., 2014).

Como se observa en la **Figura 44A** el análisis por GEO2R de muestras tumorales y muestras normales colorrectales resultó en la obtención de GED en los cuatro conjuntos de datos. Luego, los GED resultantes por una duplicación de la expresión ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ y p ajustado de Benjamini y Hochberg $< 0,05$) se incorporaron al software FunRich 3.1.3 (Fonseka et al., 2021) para determinar los genes compartidos por los cuatro conjuntos de datos (**Figura 44B y 44C**). La lista de los GED sobreexpresados y los GED regulados negativamente comunes a los cuatro conjuntos de datos se muestran en la **Tabla 3**. En particular se halló que en los conjuntos de datos GSE37364 y GSE9348 el análisis de

comparación de muestras normales y tumorales revela que el gen de PTHrP (PTHLH) se encuentra sobreexpresado en muestras de tumores (**Tabla 4**).

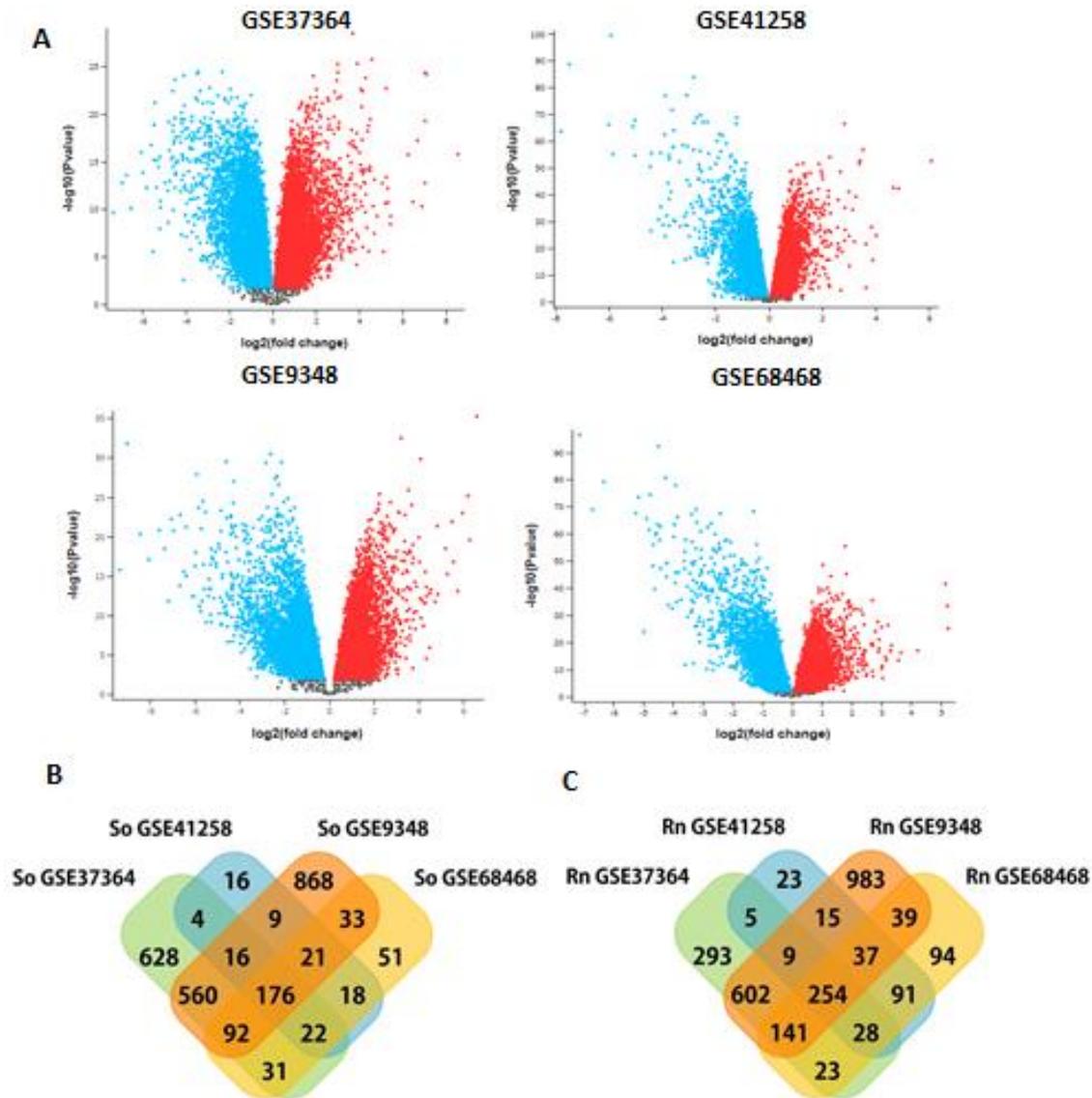


Figura 44. Cuatro conjuntos de datos de pacientes con CCR comparten genes expresados diferencialmente. (A) Diagrama de volcán. Se obtuvieron GED en el tejido tumoral de cada conjunto de datos (celeste: regulado negativamente; rojo: sobreexpresado). (B) Diagrama de Venn obtenido mediante el programa FunRich. Se identificaron 176 genes sobreexpresados (So) y (C) 254 regulados negativamente (Rn) comunes a las muestras tumorales de los cuatro conjuntos de datos de CCR, con un cambio de expresión significativo ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$; $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ y p ajustado $< 0,05$).

Regulación	Genes expresados diferencialmente (GED)
Genes Sobreexpresados	CDC25A PLXNA1 NPM1 CXCL10 AURKA PUS7 VCAN TMEM97 KIF20A SQLE RRP9 PTK7 SHMT2 LEF1 COL1A2 COL5A1 CBX8 GTF3A MET VEGFA SORD SOX4 COL1A1 ERCC6L DACH1 ATP11A GPM2 CKS2 PMEPA1 TMEM132A TOP2A CDH11 ARID3A PDPN ECT2 SOX9 NCAPG MMP14 BMP4 FANCI PAFAH1B3 EFNA3 NEBL NUDT1 EDNRA RFC3 DIO2 PTP4A3 CELSR3 CSE1L KDELC1 SULT1C2 HOMER1 KIF23 SFRP4 PLA2G16 NEK2 FXYD5 ENC1 SPARC CENPN BUB1 CELSR1 TPX2 JAG2 GALNT6 MMP11 RAD54B SERPINH1 CDK1 GTF2IRD1 SERPINE1 BHLHE40 ITGBL1 COL5A2 CCND1 GDPD5 NMU PPM1H FSCN1 PRR7 PMAIP1 IFITM2 UBE2C VSNL1 ANOS1 THY1 WISP1 LRP8 GRP LOXL2 TEAD4 CST2 HILPDA PHLDA1 TNS4 MYC UBE2S TGFBI TRIP13 ARNTL2 LY6E S100A11 CDC25B ASCL2 GDF15 TWIST1 SCD SULF1 NFE2L3 SLC7A11 ANGPT2 PLAU FKBP10 SRPX2 CXCL5 STC2 SLC6A6 TIMP1 CXCL11 CGREF1 TMEM158 TRIB3 IGF2BP3 NOX4 MMP12 AZGP1 CCL20 TNFRSF12A S100P SPP1 CEL SLC7A5 INHBA STC1 EGFL6 BGN S100A2 TRIM29 ADAM12 MME MSX2 DUSP4 TACSTD2 COL11A1 FABP6 COL10A1 ETV4 CLDN1 FCGR3B CEMIP MMP7 THBS2 CXCL2 FAP DPEP1 CXCL1 CST1 MMP1 CXCL3 REG1A CHI3L1 KLK10 KRT23 MMP3 CDH3 CXCL8 GINS1 CNIH3 GZMB COMP MFAP2 EREG IER3 SLCO4A1 TESC
Genes regulados negativamente	AQP8 CA1 GCG SLC30A10 ZG16 CA4 ADH1C CHGA CWH43 PYY CLDN8 CLCA1 TPH1 CHP2 SLC26A3 ABCA8 SLC4A4 CD177 UGT2A3 PLP1 ADH1B ABCG2 CA7 GBA3 UGT2B17 CDHR5 MYOT SST SLC26A2 MT1M EDN3 BRINP3 SOSTDC1 CEACAM7 CA2 AKR1B10 SLC17A4 HMGCS2 BMP5 BEST2 CDH19 ADAMDEC1 NPY1R PCK1 UGT2B15 SEMA6A MST1L PTGDR MMP28 ADTRP FABP1 HAPLN1 STMN2 ASPA LGALS2 NR5A2 CR2 DHRS9 CCL23 ATP1A2 NR3C2 DHRS11 HPGD OGN HSD17B2 PNLIPRP2 JCHAIN PADI2 HSD11B2 RUNDC3B C7 GREM2 ENTPD5 ABCB1 NTRK2 PBLD NAT2 MUC4 RGS13 PDE9A TRHDE FGFR2 HHLA2 MLIP CA12 FGF9 FAM107A PLCE1 C1orf115 FMO5 MEP1A ARL14 IGF1 BCHE CD79A ARHGAP44 ADGRL3 TMEM100 CPM SGK2 METTL7A SELENBP1 INSL5 LGI1 CES3 F13A1 CES2 PLAC8 SPON1 AHCYL2 PRKACB PIGR MT1F PPARGC1A CKB TPSG1 HIGD1A ANK2 MT1G MALL GPM6A CD36 EPHA7 EPB41L3 GHR CLIC5 FABP4 NLGN4X MYO1A KRT20 SFRP1 BCAS1 IL6R CCL8 MT1H ADAM28 DNASE1L3 KLF4 COL4A5 CNR1

<p> NAALADL1 CCL19 ANK3 PDK4 MUC2 CCDC68 MT1E GDPD3 MT1HL1 AOC1 MAOA POU2AF1 SEPP1 SRI CEACAM1 ATP2A3 OSBPL1A GPM6B FUCA1 PTN PLCL2 GCNT3 VILL GPX3 UGDH COL17A1 ALDH1A1 GNA11 KIT TCF21 NEDD4L ETV4 ITM2A GRAMD3 ENDOD1 STYK1 DENND2A GALNT12 KCNMA1 SSBP2 DDX60 ZFAND1 PAPS2 CLU DSC2 TLR3 GPD1L IL1R2 NFASC FGL2 PID1 AKAP7 ECI2 ATP8A1 HLF SORBS2 TDP2 SMPD3 ABCA6 LPAR1 FHL1 KBTBD11 RCAN2 C4orf19 CACNB2 ETHE1 IQGAP2 CCL5 CHRDL1 CASD1 BEX4 SLC44A4 RAB27A ACACB UGP2 TOX GSTM1 SETBP1 KIAA0513 MYH11 EMP1 PER3 MEF2C MT1X TMPRSS2 PTP4A1 DCLK1 CITED2 MT2A HGD SQRDL CFH MYLK BMP2 NR3C1 CCL21 RSAD2 PTGER4 MUC5B ABHD3 PXMP2 PGM1 GPA33 ITM2C BTNL3 SMPDL3A SLC28A2 NAP1L2 TUBAL3 ANPEP CXCL12 LRRC19 NXPE4 MS4A12 </p>
--

Tabla 3. Lista de genes sobreexpresados y regulados negativamente comunes a los cuatro conjuntos de datos de muestras de CCR.

Accesión	ID	p ajustado	Valor p	t (estadístico)	log ₂ FC	Gen
GSE37364	211756_at	5,76x10 ⁻⁸	4,21x10 ⁻⁹	67.323.871	2,34084	PTHLH
GSE9348	211756_at	1,56x10 ⁻³	2,45x10 ⁻⁴	38.334.384	1,5279	PTHLH

Tabla 4. El gen de PTHrP (PTHLH) se encuentra sobreexpresado en dos de los cuatro conjuntos de datos consultados de muestras clínicas de CCR.

Para profundizar en la función de los GED compartidos por los cuatro conjuntos de datos, se evaluó su participación en procesos biológicos, las vías de señalización en los que están involucrados y su localización subcelular. Para esto, se incorporaron los GED a la plataforma Enrichr (Xie et al., 2021), que nuclea distintas bases de datos para el enriquecimiento funcional. Como se observa en la **Figura 45** los genes sobreexpresados en el CCR se asocian significativamente a procesos de organización de la matriz extracelular ($p < 2,11 \times 10^{-16}$), vías de la TEM ($p < 1,95 \times 10^{-28}$), vías de señalización de NF- κ B ($p < 2,37 \times 10^{-12}$), vías de la angiogénesis ($p < 2,44 \times 10^{-8}$) y vías sobreactivadas de KRAS ($p < 2,16 \times 10^{-7}$), mientras que también están asociados a complejos de VEGFA ($p < 5,34 \times 10^{-25}$), entre otros. Por otra parte, los genes regulados negativamente por los cuatro conjuntos de datos mostraron una asociación con el metabolismo de iones metálicos ($p < 5,35 \times 10^{-14}$), vías asociadas a la señalización KRAS ($7,88 \times 10^{-10}$), al metabolismo de ácidos grasos ($8,68 \times 10^{-7}$) y asociación a la región extracelular ($p < 6,23 \times 10^{-18}$) y de complejos apicales ($p < 3,17 \times 10^{-17}$) (**Figura 46**). Estos resultados remarcan la importancia de las vías involucradas en la TEM y la angiogénesis en la génesis/progresión del CCR.

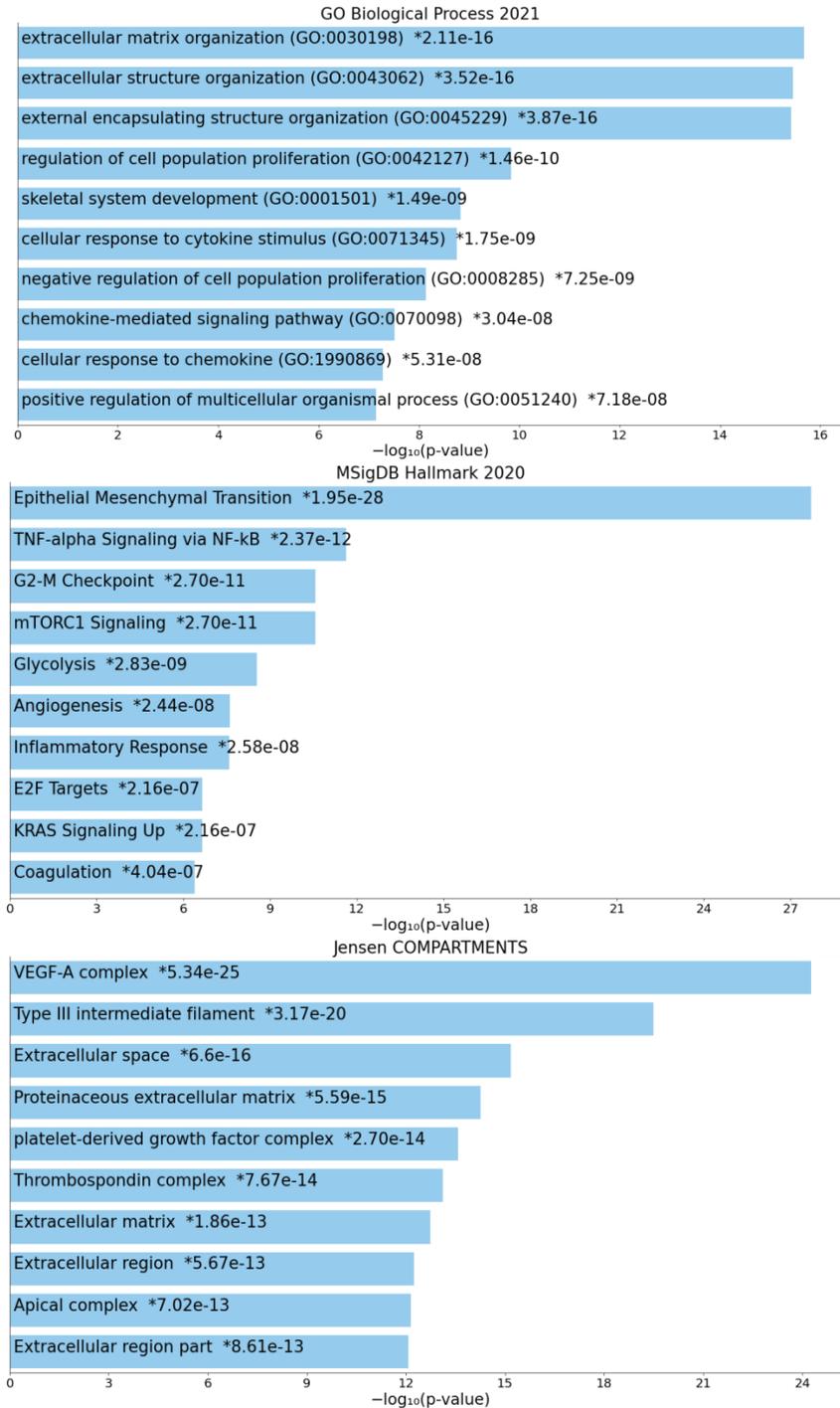


Figura 45. Los genes sobreexpresados en el CCR están enriquecidos en vías asociadas a la angiogénesis y a la TEM. Empleando la plataforma EnrichR se realizó la consulta de enriquecimiento funcional por procesos biológicos (panel superior), vías de señalización (panel medio) y compartimentos subcelulares (panel inferior), de los 176 genes

sobreexpresados compartidos por los 4 conjuntos de datos de CCR. El gráfico de barras muestra la probabilidad asociada en cada caso expresada como $-\log_{10}$ (valor p).

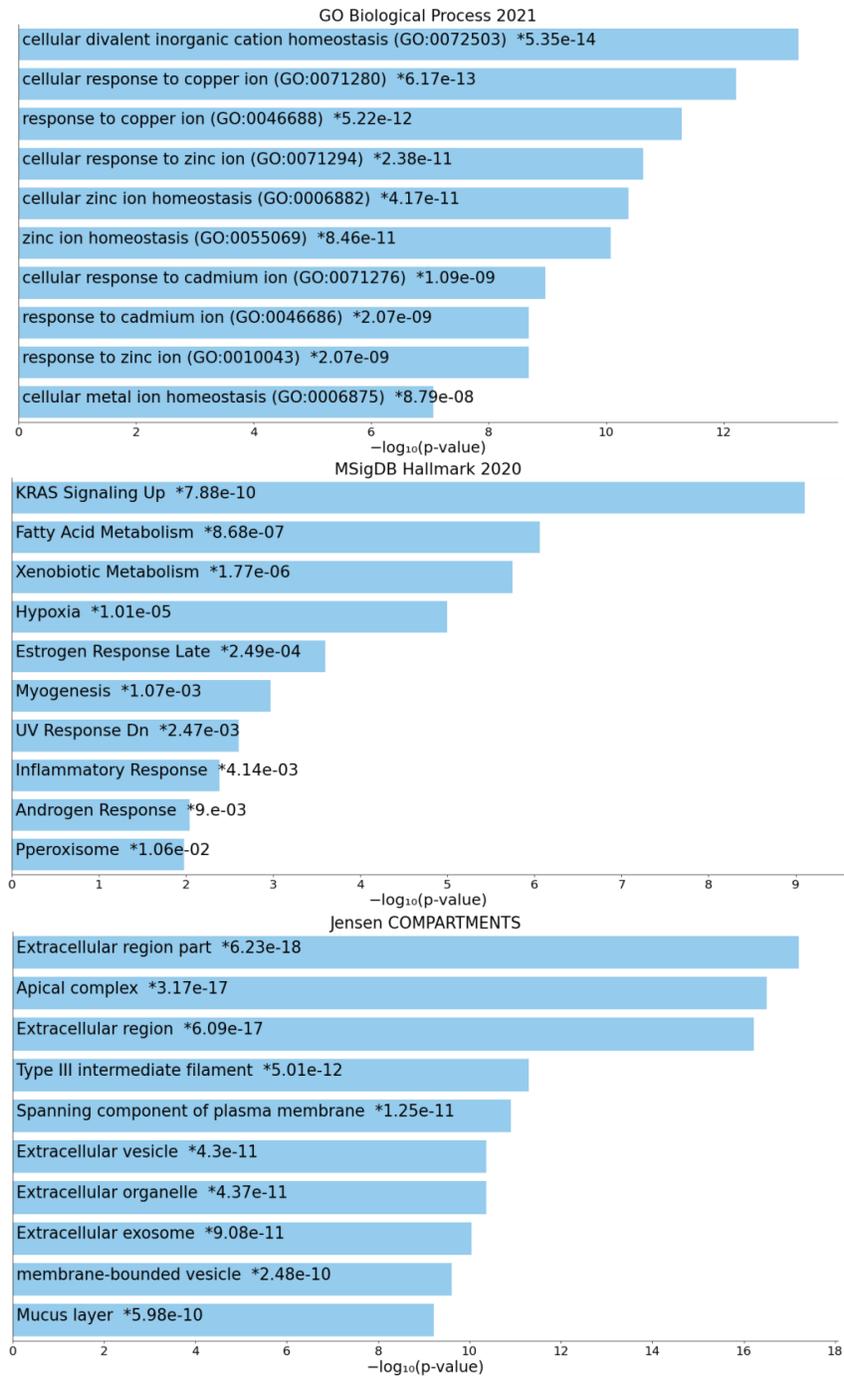


Figura 46. Los genes regulados negativamente en el CCR están enriquecidos en vías asociadas a la progresión de esta enfermedad que no han sido evaluadas en este Trabajo de Tesis. Empleando la plataforma EnrichR se realizó la consulta de enriquecimiento funcional por procesos biológicos (panel superior), vías de señalización (panel medio) y compartimentos subcelulares (panel inferior), de los 254 genes regulados

negativamente compartidos por los 4 conjuntos de datos de CCR. El gráfico de barras muestra la probabilidad asociada en cada caso expresada como $-\log_{10}$ (valor p).

Sección 2: Estudio mediante bases de datos clínicos de la correlación de PTHrP con los eventos y marcadores evaluados y hallados de relevancia en este Trabajo de Tesis

Con el fin de acceder a la enorme cantidad de información actualmente presente en diferentes plataformas de análisis de muestras clínicas, a continuación, se exploró en bases de datos la relación de PTHrP en los distintos tipos de cáncer y su asociación con los procesos evaluados en este Trabajo de Tesis. Inicialmente se empleó la plataforma EMTome (<http://www.emtome.org/>) (Vasaikar et al., 2021), que contiene firmas de genes asociados a la TEM derivadas de la Enciclopedia de Líneas Celulares del Cáncer (CCLE por sus siglas en inglés) (Nusinow et al., 2020), de muestras de pacientes metastásicos (MET500) (Robinson et al., 2017), de muestras clínicas tomadas del repositorio del TCGA (Tomczak et al., 2015) y de datos del Atlas de Proteínas Humanas (HPA por sus siglas en inglés) (Digre y Lindskog, 2021).

En esta plataforma se introdujo como búsqueda el gen de PTHrP (PTHLH) y se obtuvieron diferentes clases de datos. La **Tabla 5** muestra los 10 primeros resultados más significativos de la búsqueda del gen PTHLH. Mediante la exploración de los diferentes procesos celulares asociados a la expresión de PTHLH se observó que en el cáncer de colon (COAD) y en el cáncer de recto (READ) este gen posee una alta correlación positiva con vías implicadas en la TEM, la angiogénesis, la coagulación, uniones apicales, la señalización de TGF- β y la señalización de KRAS, y a otras funciones biológicas con menor correlación (**Figura 47**).

Cancer cohort	GeneSet	Correlation	Pvalue
TCGA-READ	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	0.842	0
TCGA-COAD	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	0.807	1.61e-65
TCGA-READ	HALLMARK_ANGIOGENESIS	0.782	0
TCGA-COAD	HALLMARK_COAGULATION	0.772	1.08e-56
TCGA-READ	HALLMARK_COAGULATION	0.771	0
TCGA-READ	HALLMARK_APICAL_JUNCTION	0.767	0
TCGA-COAD	HALLMARK_ANGIOGENESIS	0.755	7.8e-53
TCGA-COAD	HALLMARK_APICAL_JUNCTION	0.747	2.91e-51
TCGA-COAD	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	0.737	3.97e-49
TCGA-READ	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	0.733	0

Tabla 5. Procesos centrales asociados al gen de PTHrP (PTHLH) en el repositorio de muestras clínicas de TCGA. Los primeros 10 valores de correlación más altos se asocian a la TEM, la angiogénesis, la coagulación, funciones apicales y la señalización de KRAS. Se muestran valores de correlación y valor de probabilidad asociado.

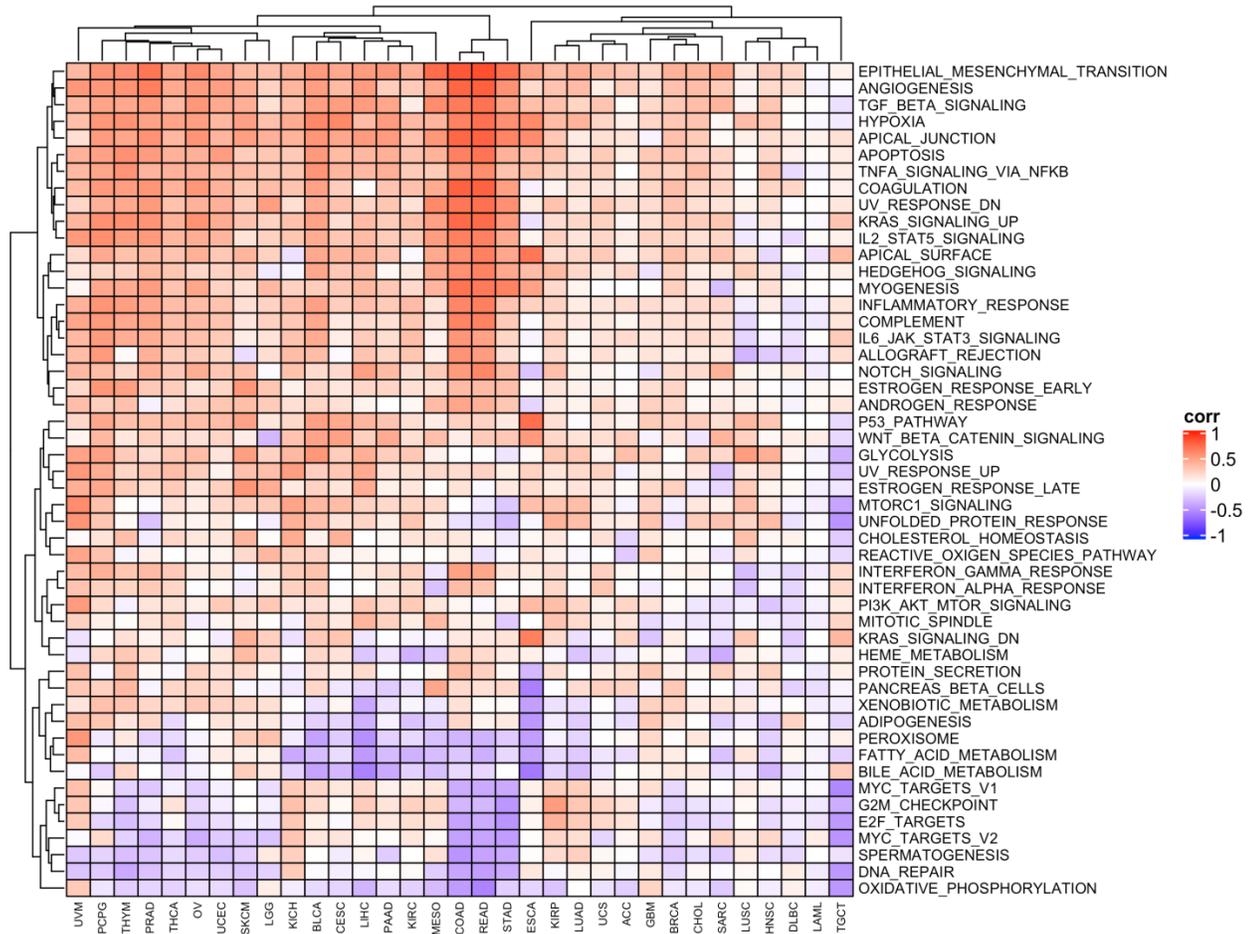


Figura 47. PTHLH se correlaciona significativamente con la TEM y la angiogénesis en el cáncer de colon (COAD) y en el cáncer de recto (READ). En base a lo expuesto en la *Tabla 5*, el diagrama de correlación muestra que el gen de PTHrP (PTHLH) se correlaciona con diferentes eventos en distintos tipos de tumores (Hallmarks Geneset).

Con el fin de determinar en muestras clínicas si existe una asociación entre PTHrP y los marcadores evaluados en los Capítulos 1 y 2 de este Trabajo de Tesis, se realizó un análisis mediante el test de correlación de Pearson (R), empleando la base de datos en línea “Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2” (GEPIA2) (Tang et al., 2019), que incluye 9.736 muestras de tumores y 8.587 muestras normales de los proyectos del TCGA (Tomczak et al., 2015) y de Expresión de Genotipo-Tejido (GTEx por sus siglas en inglés) (Lonsdale et al., 2013).

Como se observa en la **Figura 48**, la expresión del gen de PTHrP (PTHLH) se correlaciona positivamente y de manera significativa con la expresión del gen de HIF-1 ($R=0,37$; $p=3,5 \times 10^{-10}$), con MMP-9 ($R=0,25$; $p=2,1 \times 10^{-5}$) y con MMP-7 ($R=0,29$; $p=7,2 \times 10^{-7}$) en muestras de cáncer de colon. Por otra parte, también se halló una correlación positiva y de manera significativa entre PTHLH y los marcadores evaluados en el Capítulo 2 de este Trabajo de Tesis ZEB1 ($R=0,35$; $p=3,9 \times 10^{-9}$), N-cadherina ($R=0,41$; $p=1,1 \times 10^{-12}$) y SPARC ($R=0,58$; $p=0$) (**Figura 49**). En cada caso, la correlación fue significativa de acuerdo con el valor de p y de R.

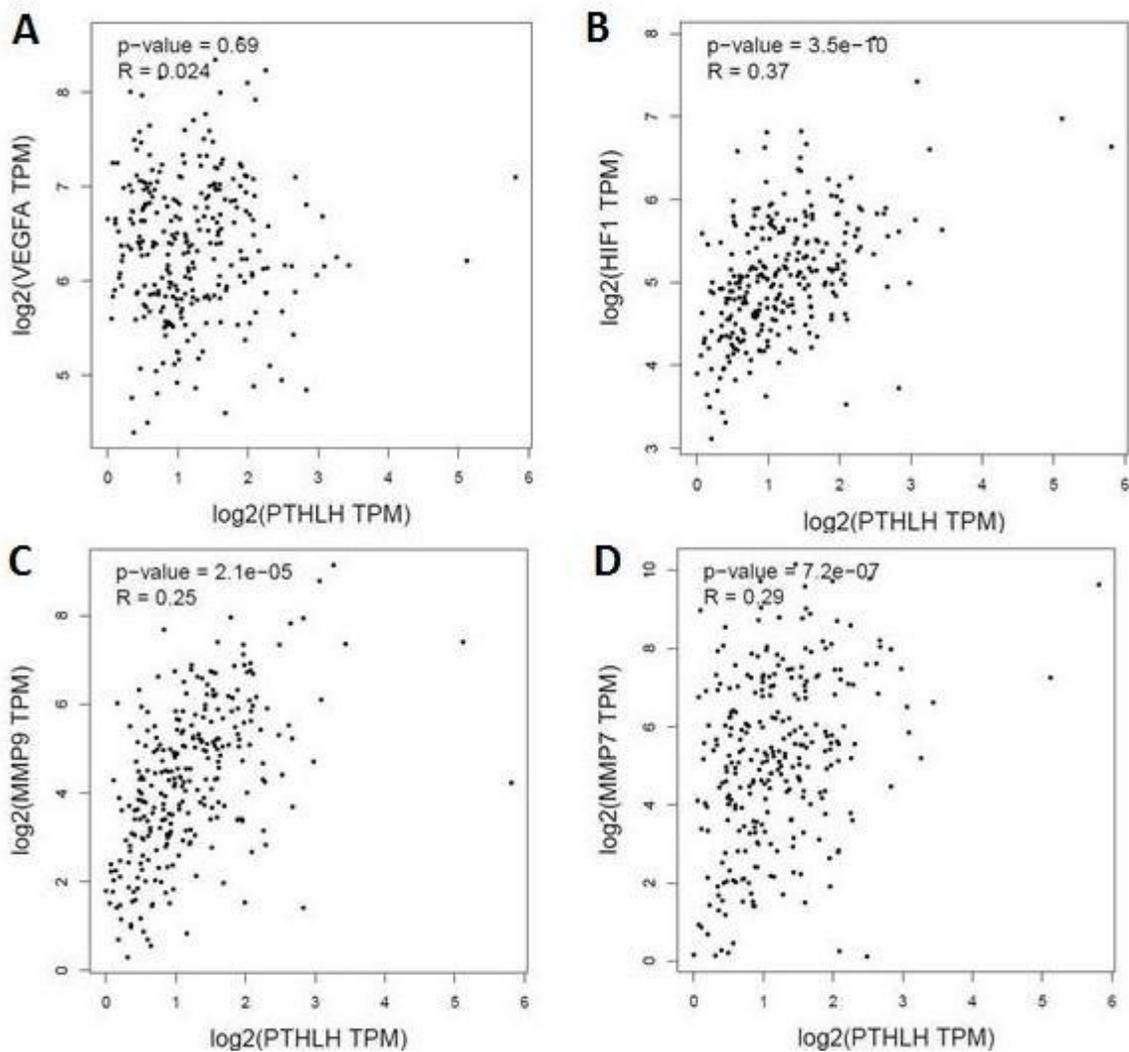


Figura 48. Correlación entre el gen de PTHrP y los marcadores de angiénesis evaluados en el Capítulo 1 de este Trabajo de Tesis. Los gráficos muestran la correlación entre la expresión del gen de PTHrP (PTHLH) con (A) VEGF, (B) HIF-1, (C) MMP-9 y (D) MMP-7 empleando la plataforma GEPIA2 que analiza datos de muestras tumorales de CCR del repositorio de TCGA.

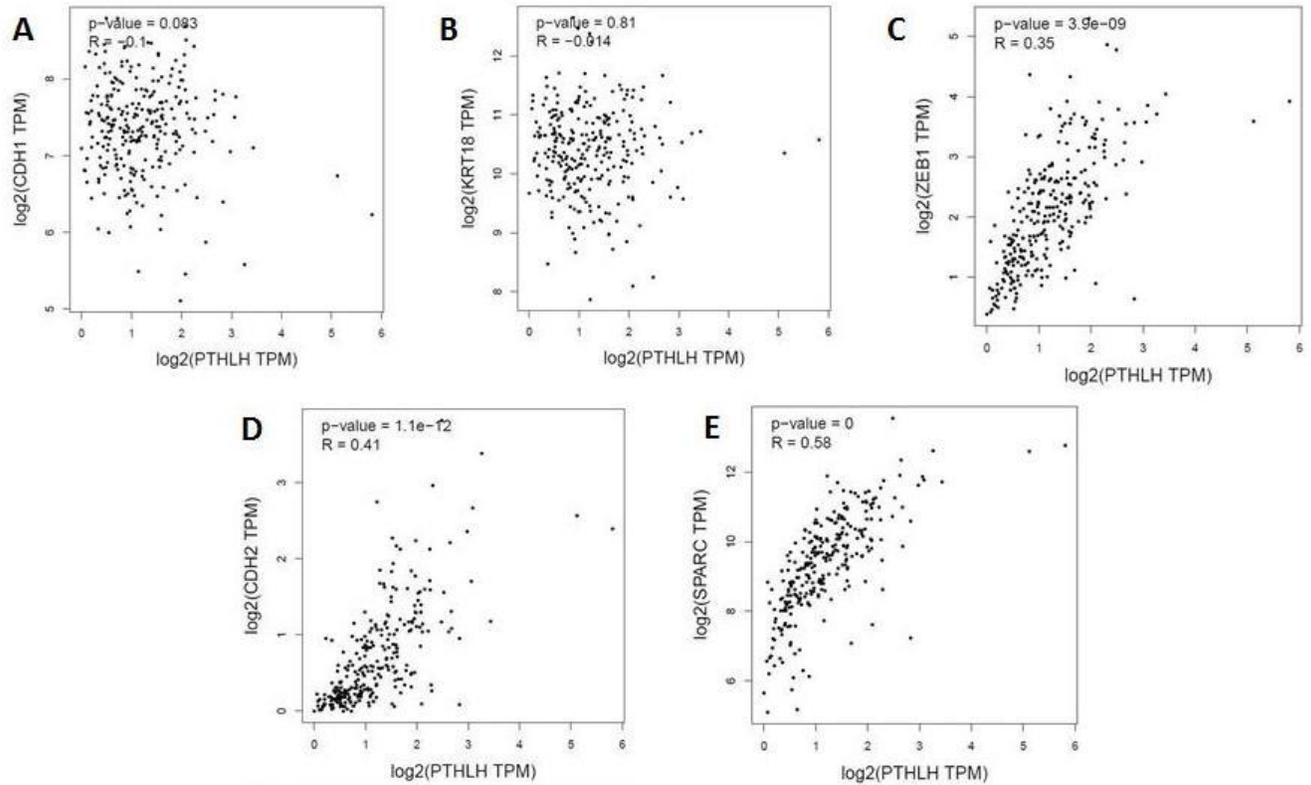


Figura 49. Correlación entre el gen de PTHrP y los marcadores de TEM evaluados en el Capítulo 2 de este Trabajo de Tesis. Los gráficos muestran la correlación entre la expresión del gen de PTHrP (PTHLH) con (A) el gen de E-cadherina (CDH1), (B) el gen de CK-18 (KRT18), (C) el gen de ZEB1, (D) el gen de N-cadherina (CDH2) y (E) el gen de SPARC, empleando la plataforma GEPIA2 que analiza datos de muestras tumorales de CCR del repositorio de TCGA.

Sección 3: Estudio mediante biología de redes de la interacción entre PTHrP y los marcadores de la angiogénesis y de la TEM

Como se comentó en el Segundo Capítulo de este Trabajo de Tesis en las células HCT116 y en el modelo de xenotrasplante, PTHrP actúa aumentando la expresión de SPARC; además el tratamiento con SPARC en las células HCT116 potencia los efectos de PTHrP. Por este motivo se infirió la posibilidad de que exista una red de regulación entre ambos factores del microambiente tumoral. En base a estos hallazgos, se empleó el enfoque de biología de redes para profundizar el estudio de esta relación, y para visualizar la interacción existente entre las proteínas asociadas a ambos factores de acuerdo a bases de datos.

Las moléculas en un sistema biológico como el interior de la célula, interactúan entre sí y forman complejos y vías moleculares que llevan a cabo diversas funciones biológicas. En una red biológica, los nodos (o vértices) representan proteínas, genes o metabolitos, mientras que los ejes (o enlaces que unen a los nodos) suelen representar relaciones, como interacciones físicas, activación/desactivación por fosforilación o regulación de la expresión génica (Merico et al., 2009). Estas redes pueden generarse y deducirse a partir de datos experimentales y publicaciones. Muchos repositorios en línea, como KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto), Reactome, BIND (base de datos de la red de interacción biomolecular), o STRING (herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan), alojan una gran cantidad de datos que pueden representarse como una red y luego analizarse. En esta construcción de redes existen criterios para vincular la información científica existente con los genes o proteínas de interés. La plataforma STRING integra datos de diferente valor para la construcción de esta red desde: contextos genómicos (genes que están bajo el control del mismo promotor por haberse fusionado sus secuencias), datos experimentales (coexpresión de genes a partir de experimentos de secuenciación de ARN o microarray donde se ven genes que se sobreexpresan o se regulan negativamente con la misma amplitud), interacción

física (por espectrometría de masas se pueden detectar proteínas que forman parte de complejos moleculares), conocimiento curado (complejos de proteínas y vías de señalización que están descritas en bases de datos), minería de texto (o extracción de texto es una estimación de la literatura biomédica que esta indexada en pubmed) y co-menciones (los genes o proteínas de la búsqueda se mencionan juntas en un mismo documento).

En base a estos criterios, inicialmente se exploró la plataforma STRING para visualizar las interacciones existentes entre los marcadores y factores evaluados en este Trabajo de Tesis. Como se observa en la **Figura 50**, los marcadores presentan diferentes tipos de asociación entre sí en una red de interacción proteína-proteína (IPP).

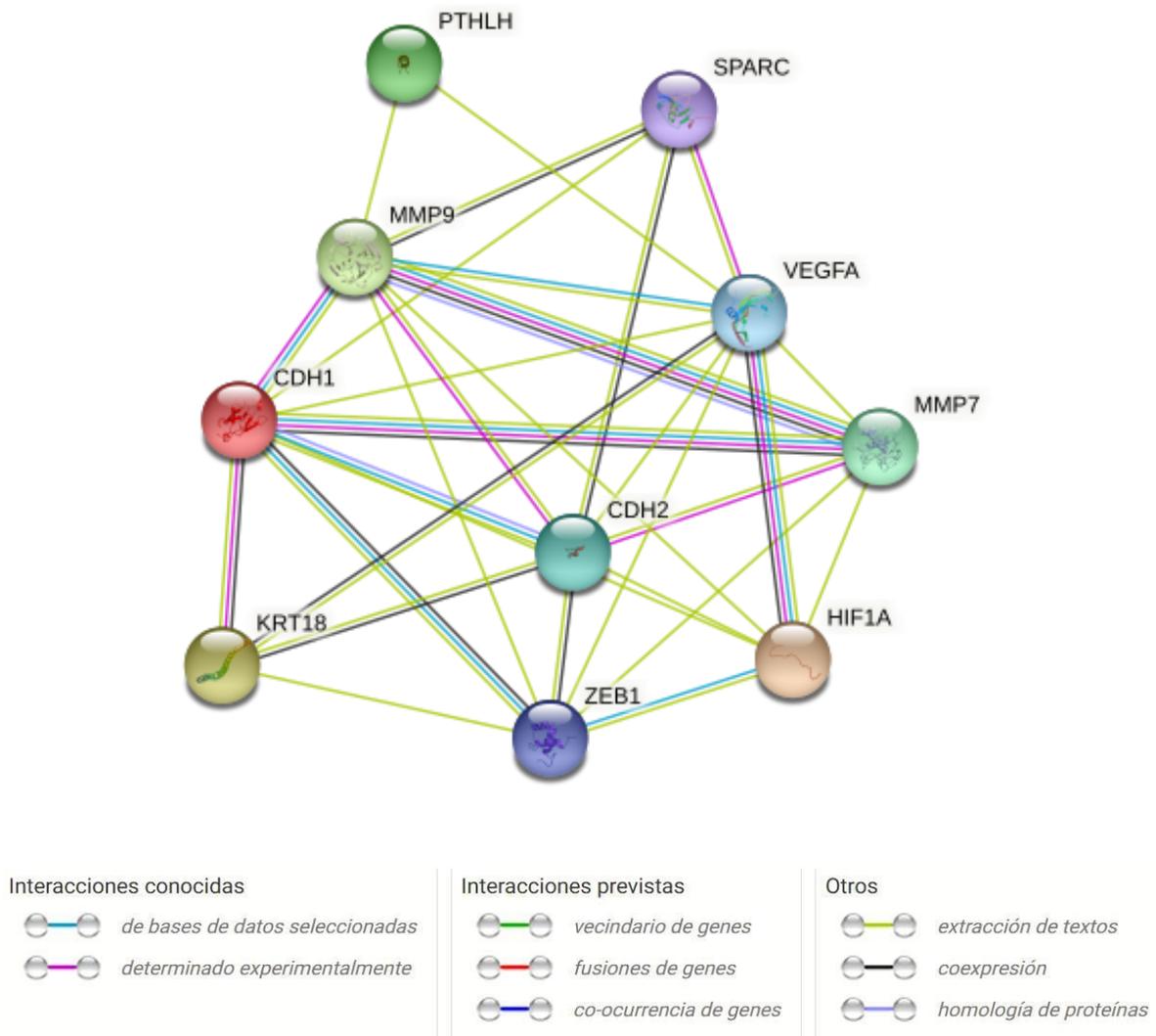


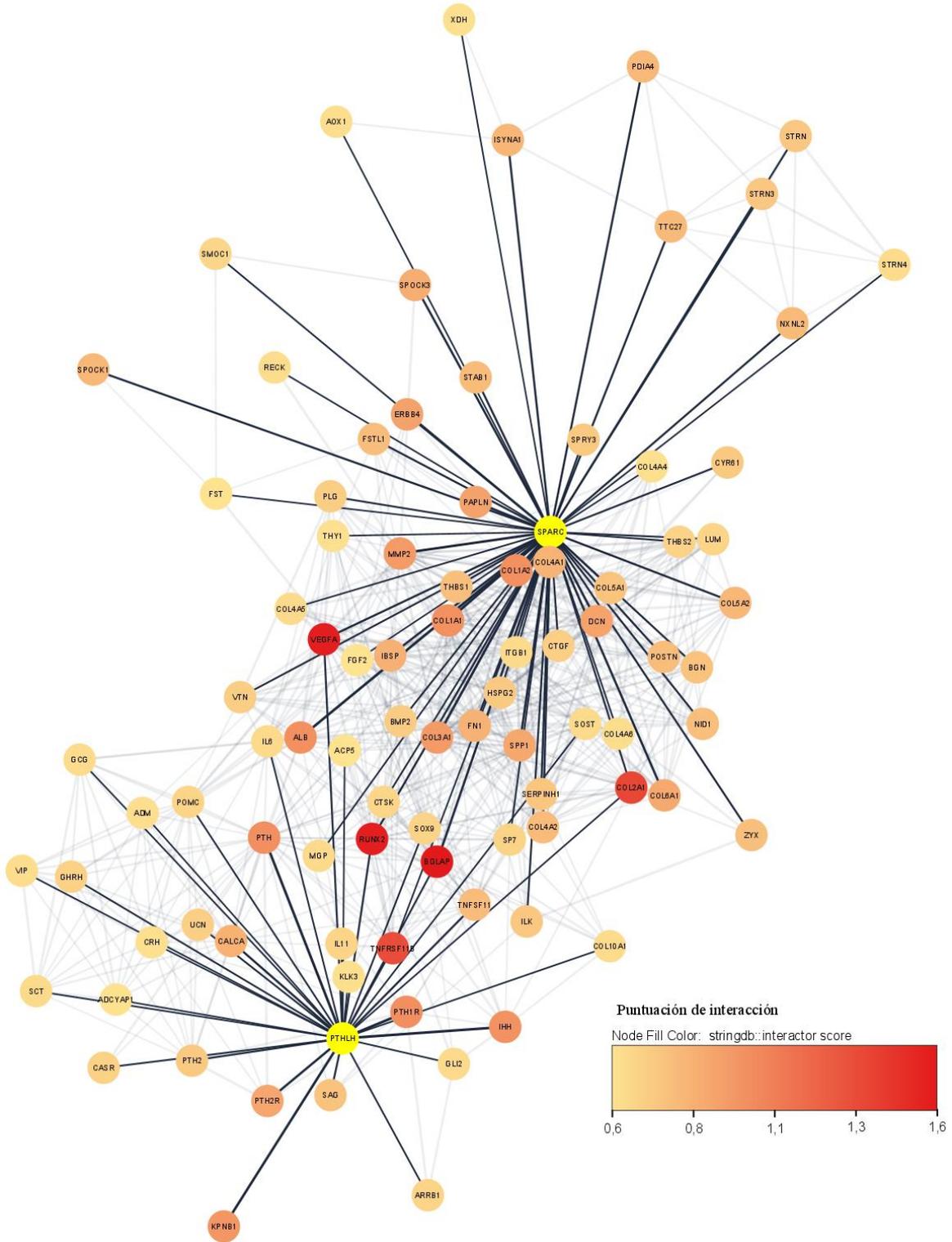
Figura 50. Asociación entre PTHrP y los marcadores de TEM y angiogénesis evaluados en esta Tesis. Empleado la plataforma STRING se obtuvo la red resultante (confianza media: 0,4) de la búsqueda de los marcadores evaluados: PTHrP (PTHLH), E-cadherina (CDH1), CK-18 (KRT18), ZEB1, N-cadherina (CDH2), SPARC, VEGF, HIF-1, MMP-9 y MMP-7. Los diferentes tipos de asociación entre los marcadores apoyan los antecedentes que motivaron este Trabajo de Tesis (valor $p < 0,001$).

Cytoscape es un programa de código abierto utilizado para la exploración (visualización, análisis e interpretación) de redes biológicas y biomédicas. No es una base de datos como las mencionadas anteriormente, sino que permite el análisis de datos de otras fuentes en forma de interconexiones biológicas respaldadas por asociaciones experimentales y bibliográficas, lo que facilita las tareas de investigación como la predicción de la función biológica de determinados biomarcadores y sus vías de señalización. Hoy existe una gran cantidad de aplicaciones disponibles para el programa Cytoscape (conocidas anteriormente como complementos) que brindan diferentes funciones en el análisis de una red como la importación de datos desde repositorios externos, agregar anotaciones, detección de módulos, búsqueda de literatura y filtrado de datos, entre otras (Lotia et al., 2013).

Con el fin de integrar la base de datos de STRING 11.5 y la plataforma de análisis de redes Cytoscape se descargó la aplicación `stringApp` (Doncheva et al., 2019), un complemento de Cytoscape que facilita la importación de redes STRING y la integración con datos adicionales proporcionados por el usuario en un mismo flujo de trabajo. Actualmente, `stringApp` admite cuatro tipos diferentes de consultas, que permiten a los usuarios recuperar una red STRING a partir de (1) una lista de uno o más genes/proteínas, (2) una lista de compuestos químicos, (3) una enfermedad o (4) una consulta de PubMed.

Con el objetivo de dilucidar la posible red regulatoria entre PTHrP y SPARC, posteriormente se exploró la interacción entre PTHrP, SPARC y las diferentes proteínas que se asocian a estos factores en las bases de datos mencionadas, a través de `StringApp` (Doncheva et al., 2019). Como se observa en la **Figura 51A**, la búsqueda de proteínas asociadas a PTHrP y a SPARC con una puntuación de confianza alta de 0,9 (probabilidad de encontrar las proteínas dentro de la misma vía regulatoria) generó una red de 2335 interacciones. Luego se seleccionaron las proteínas que presentaron el mayor grado de interacción entre PTHrP y SPARC (**Figura 51B**).

A



B

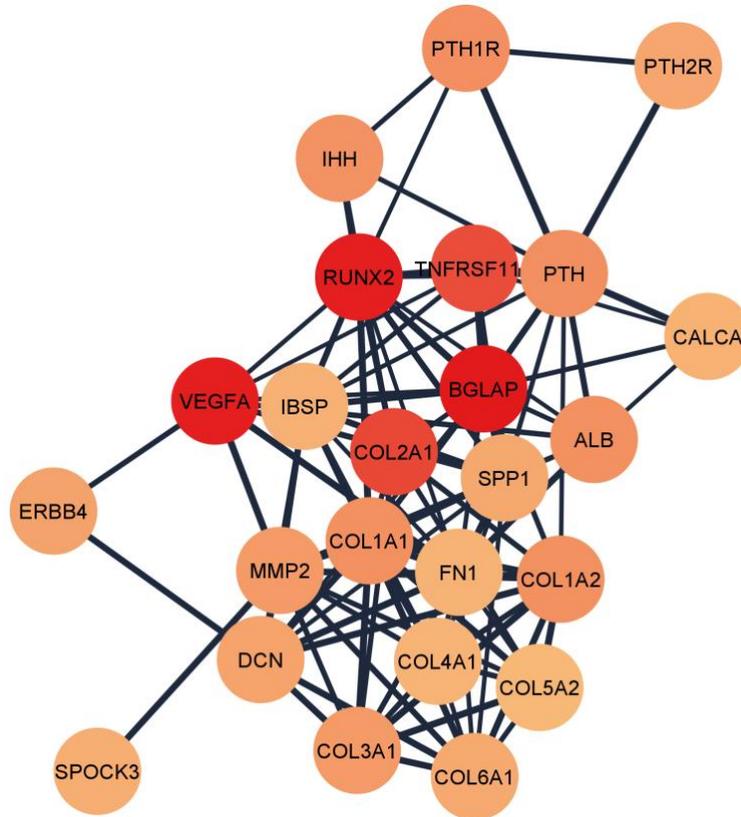


Figura 51. Red de interacción entre PTHrP y SPARC. Se empleó *STRING* búsqueda de proteínas como fuente de búsqueda, con la entrada “PTHrP SPARC”. Se creó una red IPP con un límite de puntuación de confianza mayor a 0,6 y un máximo de 100 proteínas (nodos) que establecieron una red de 92 nodos y 650 interacciones. **(A)** PTHrP y SPARC (amarillo) se muestran con sus proteínas de interacción directa. **(B)** Red formada con los genes con la puntuación de interacción (IS) más alta de la red “PTHrP SPARC”(IS> 0,95).

Finalmente se procedió a establecer la implicancia de los GED relevantes en el CCR obtenidos en la sección 1 de este Capítulo, con el grupo de genes de mayor interacción de la red de PTHrP y SPARC. En base a los resultados del enriquecimiento funcional que mostraron la asociación de los genes sobreexpresados en el CCR en los cuatro conjuntos de datos con los procesos evaluados en este Trabajo de Tesis, se procedió a explorar la vinculación de estos genes con los genes asociados a PTHrP y a SPARC.

Como se observa en la **Figura 52**, se creó una red de interacción con un límite de puntuación de confianza mayor a 0,4 y de 100 proteínas (nodos) como máximo, que generó una red de 789 interacciones. Luego se seleccionaron agrupaciones de nodos (“clustering”) de esta red que estén altamente interconectados utilizando el complemento de Cytoscape MCODE (algoritmo de detección de complejos moleculares) (Bader y Hogue, 2003). La identificación de nodos densamente conectados de una red es útil para identificar módulos biológicos, como complejos o vías de señalización. En este caso, MCODE identificó 3 grupos funcionalmente homogéneos a partir de la red de interacción de genes sobreexpresados en el CCR (**Figura 53**). La visualización de la red obtenida de las proteínas más asociadas a PTHrP y a SPARC (**Figura 51**), y la red de los genes sobreexpresados en los 4 conjuntos de datos de CCR, muestra a VEGF como el nodo compartido entre ambas redes. Aún más, el agrupamiento mediante MCODE de la red de CCR muestra la existencia de un grupo homogéneo (Grupo 2) que contiene a SPARC y a VEGF como parte del mismo módulo funcional (**Figura 53B**) asociado a la TEM y a la angiogénesis (**Tabla 6**). Esta vinculación incluye datos experimentales/bioquímicos, asociación en bases de datos seleccionadas y mención conjunta en los resúmenes de Pubmed.

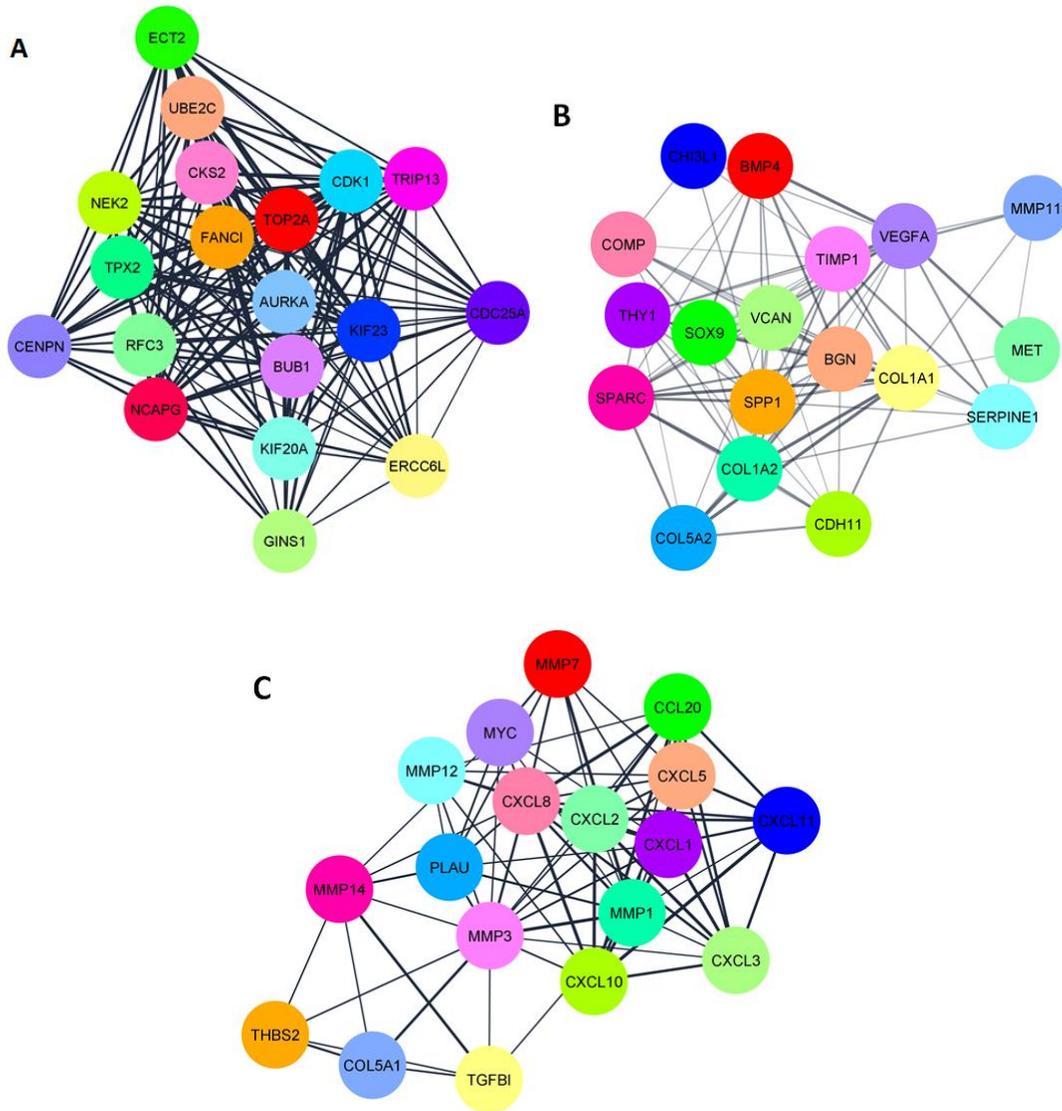
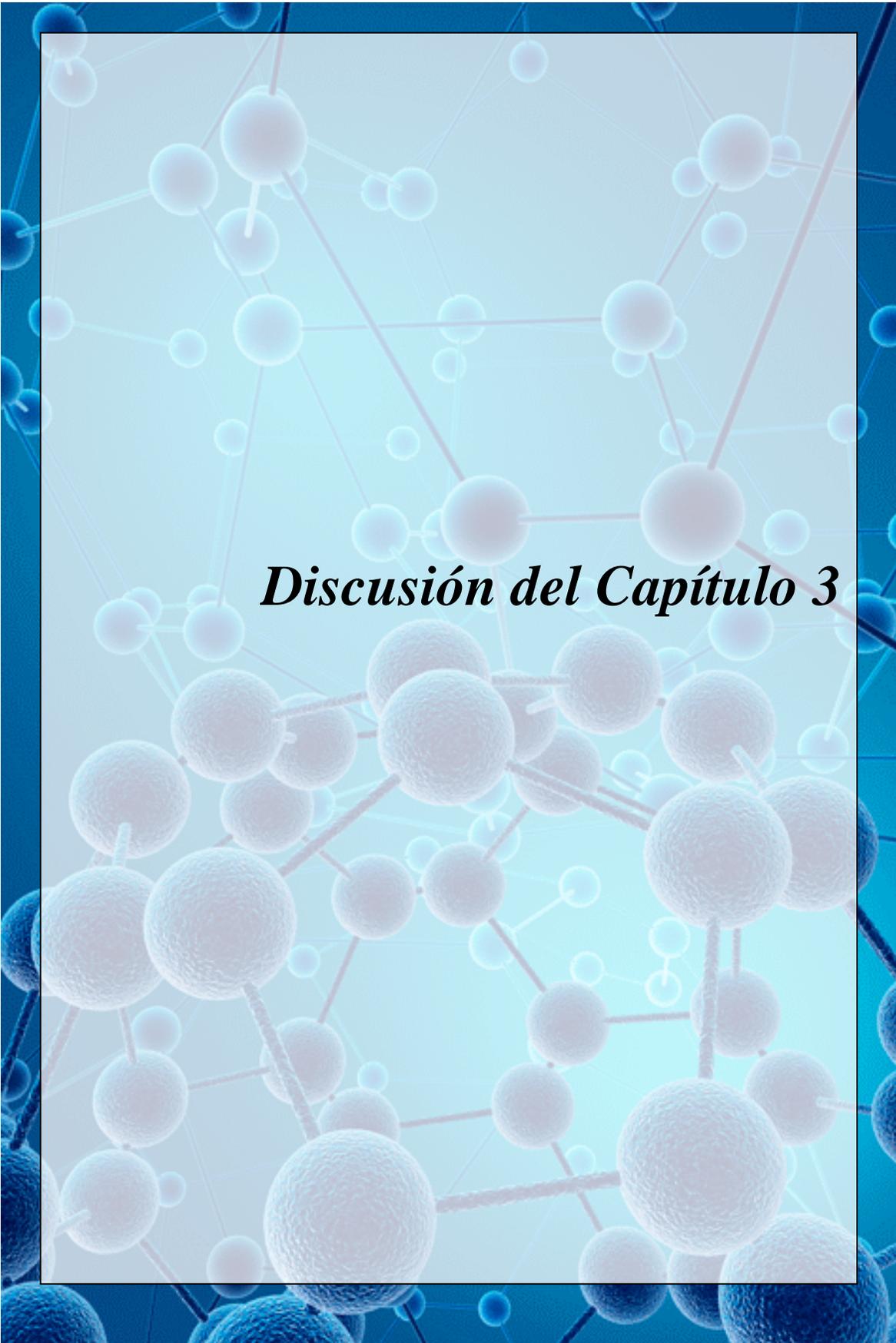


Figura 53. El análisis de agrupamiento en la red de genes sobreexpresados en pacientes con CCR muestra que VEGF y SPARC se encuentran en un mismo módulo funcional. Mediante MCODE se obtuvieron los 3 grupos más homogéneos de la red. **(A)** Módulo 1 con una puntuación de 17,889 (19 nodos, 161 ejes). **(B)** Módulo 2 con una puntuación de 10,471 (18 nodos, 89 ejes). **(C)** Módulo 3 con una puntuación de 9,647 (18 nodos, 82 ejes). VEGF y SPARC son parte de un mismo módulo funcional (Módulo 2). Los parámetros utilizados fueron grado de corte: 2, corte de densidad de nodos: 0,1; corte de puntuación de nodo: 0,2; K-core: 2.

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Epithelial Mesenchymal Transition	5.522e-23	1.104e-21	275.22	14105.48
2	Angiogenesis	1.191e-10	1.191e-9	247.53	5656.27
3	Coagulation	1.159e-7	7.168e-7	57.40	916.71
4	UV Response Dn	1.434e-7	7.168e-7	54.91	865.20
5	Hedgehog Signaling	0.0004733	0.001439	73.34	561.46
6	Glycolysis	0.00002660	0.0001064	28.84	303.84
7	Hypoxia	0.0007195	0.001439	20.09	145.36
8	KRAS Signaling Up	0.0007195	0.001439	20.09	145.36
9	Apical Junction	0.0007195	0.001439	20.09	145.36
10	Inflammatory Response	0.0007195	0.001439	20.09	145.36

Tabla 6. El Módulo 2 obtenido mediante MCODE se asocia a vías implicadas en la TEM y la angiogénesis. La tabla obtenida de la base de datos de firmas moleculares MSigDB Hallmark 2020 de EnrichR, muestra los 10 términos más significativos a los que se asocian los genes del Módulo 2 obtenido mediante MCODE. Los valores p y los valores q representan la probabilidad de asociación y la probabilidad ajustada por Bejamini-Hochberg, respectivamente.



Discusión del Capítulo 3

Discusión del Capítulo 3

En este Tercer Capítulo se abordó un análisis bioinformático para develar la relevancia de los hallazgos obtenidos *in vitro* e *in vivo* de este Trabajo de Tesis, considerando la información reportada de los marcadores evaluados y su comportamiento en muestras de pacientes con CCR. Como se detalló en Materiales y Métodos, inicialmente para determinar los GED de los 4 conjuntos de datos de muestras de pacientes se seleccionaron muestras de tumor primario y muestras normales de mucosa de colon. No se tomó como criterio de inclusión de las muestras aquellas provenientes de estadios avanzados o metástasis, con el objetivo de no incrementar las variables a comparar. Para obtener los GED entre las muestras normales y muestras tumorales se empleó el programa estadístico disponible en la misma plataforma GEO2R que realiza comparaciones en tablas de datos procesados originales proporcionadas por grupos de investigación y utiliza los paquetes GEOquery y limma R del proyecto Bioconductor (Barrett et al., 2013). Bioconductor es un proyecto de código abierto basado en el lenguaje de programación R que proporciona herramientas para el análisis de datos genómicos (Gentleman et al., 2004).

Los resultados de este Capítulo mediante el análisis de los datos evaluados de muestras de pacientes con CCR, revelan que 176 genes sobreexpresados y 254 genes regulados negativamente son compartidos por los 4 conjuntos de muestras. Si bien se utilizó para el análisis los genes compartidos por los 4 conjuntos de datos, es destacable considerar que tanto en el conjunto de datos GSE37364, como en el conjunto de datos GSE9348, el gen de PTHrP (PTHLH) se encuentra sobreexpresado ($\text{Log}_2\text{FC}=2,34$; p ajustado $<0,05$ y $\text{Log}_2\text{FC}=1,52$; p ajustado $<0,05$ respectivamente) (**Tabla 4**). Para este análisis no se clasificó a las muestras en base a otros parámetros como estadio tumoral, ocurrencia de metástasis, tratamientos adyuvantes previos a la toma de muestras, entre otros. Por este motivo se requiere profundizar si la sobreexpresión de PTHrP responde a condiciones particulares de los pacientes. Además, a diferencia de las plataformas GSE41258 y

GSE68468, las plataformas GSE37364 y GSE9348 pertenecen al modelo Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, el cual presenta mayor cantidad de sondas de búsqueda que la plataforma Affymetrix Human Genome U133A Array. Con el objetivo de seleccionar cuatro conjuntos de datos provenientes de repositorios independientes, estas características podrían explicar la ausencia de información sobre PTHLH en los dos conjuntos de datos mencionados.

El enriquecimiento funcional mediante EnrichR arrojó asociaciones con los procesos biológicos, las vías implicadas y los compartimentos subcelulares en los cuales los genes sobreexpresados y regulados negativamente están enriquecidos. Este análisis permitió inferir la asociación significativa de los genes sobreexpresados en las muestras de pacientes con los eventos evaluados en este Trabajo de Tesis. Luego se exploró si PTHrP constituye un gen asociado a la TEM en la base de datos EMTome, lo que mostró que no solo esta base de datos lo considera un gen asociado a TEM sino que muestra una correlación significativa con la angiogénesis y la TEM específicamente en el CCR, en relación con otros tipos de cáncer.

A partir de estos datos, se procedió a emplear la plataforma GEPIA2 donde se observó que en muestras de tumores de CCR del repositorio de datos del TCGA, existe una correlación positiva significativa entre la expresión de PTHrP y la expresión de SPARC, lo que sugiere que ambas proteínas podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad. Si bien una correlación no demuestra una regulación de la expresión entre ambos factores y, aunque la red obtenida posteriormente de la búsqueda “PTHrP SPARC” arroja solo una interacción de mención conjunta de ambos factores en la literatura, los resultados *in vitro* e *in vivo* mostrados en el Capítulo 2 de esta Tesis apoyan este vínculo. En esta sección se observó que, aunque los valores de probabilidad son significativos para la correlación entre PTHLH y MMP-9, y PTHLH y MMP-7, los valores de R son relativamente bajos (0,25 y 0,29 respectivamente). Por lo que es necesaria la incorporación de un mayor número de casos humanos en estos repositorios públicos con el objetivo de obtener una conclusión más precisa respecto a la correlación entre PTHrP y estas dos metaloproteasas.

Contrario a lo esperado, inicialmente no se observó una correlación entre la expresión de VEGF y PTHrP mediante el análisis de muestras de CCR por GEPIA2. Sin embargo, el análisis de la red de proteínas que se asocian a PTHrP y SPARC muestra que VEGF es un nodo con una alta puntuación de interacción con ambos factores. Por este motivo se procedió a investigar la red resultante de los genes sobreexpresados obtenidos previamente en las muestras clínicas. MCODE encuentra “clústeres” (o sea grupos altamente interconectados) en una red. Los “clústeres” tienen distintos significados en diferentes tipos de redes. Por ejemplo, los grupos en una red de interacción proteína-proteína corresponden a complejos de proteínas y partes de vías, mientras que los grupos en una red de similitud de proteínas representan familias de proteínas (Bader y Hogue, 2003).

La identificación de grupos altamente conectados mediante la aplicación MCODE postula a VEGF y a SPARC como proteínas pertenecientes a un mismo grupo funcional, lo que sugiere una relación entre sus vías reguladoras. Considerando nuestras previas observaciones en las cuales PTHrP es capaz de incrementar la expresión de VEGF en las células tumorales, de promover la angiogénesis en las células endoteliales y además de modular la expresión de SPARC en células tumorales y endoteliales; en base a nuestros hallazgos y a la luz de la detección de estos módulos funcionales se infiere una relación entre estos tres factores. La ausencia de correlación entre VEGF y PTHrP en las muestras clínicas de GEPIA2 podría deberse a no considerar el microambiente asociado al tumor en la toma de muestras, lo que denota la importancia de profundizar en la regulación entre SPARC y VEGF.

Otros autores han realizado estudios exploratorios para la detección de biomarcadores en el CCR con un flujo de trabajo similar (Chen et al., 2019; Hammad et al., 2021; Patil et al., 2021), sin embargo pocos estudios han utilizado múltiples conjuntos de datos de microarrays para estudiar los genes centrales y no hay estudios que hallan abordado la relación de PTHrP con los genes relevantes del CCR.

Estos hallazgos *in silico* muestran que varias proteínas interactúan con SPARC y PTHrP en una red de interacción, pero en el contexto de las muestras seleccionadas y la puntuación de confianza establecida no se visualizan interacciones directas entre PTHrP y SPARC, lo que resalta la importancia de los hallazgos experimentales de este trabajo. Por este motivo resulta necesario en un futuro dilucidar el mecanismo regulatorio del circuito PTHrP-VEGF-SPARC que denota un potencial rol relevante en la patología del CCR.



6

Reflexiones finales

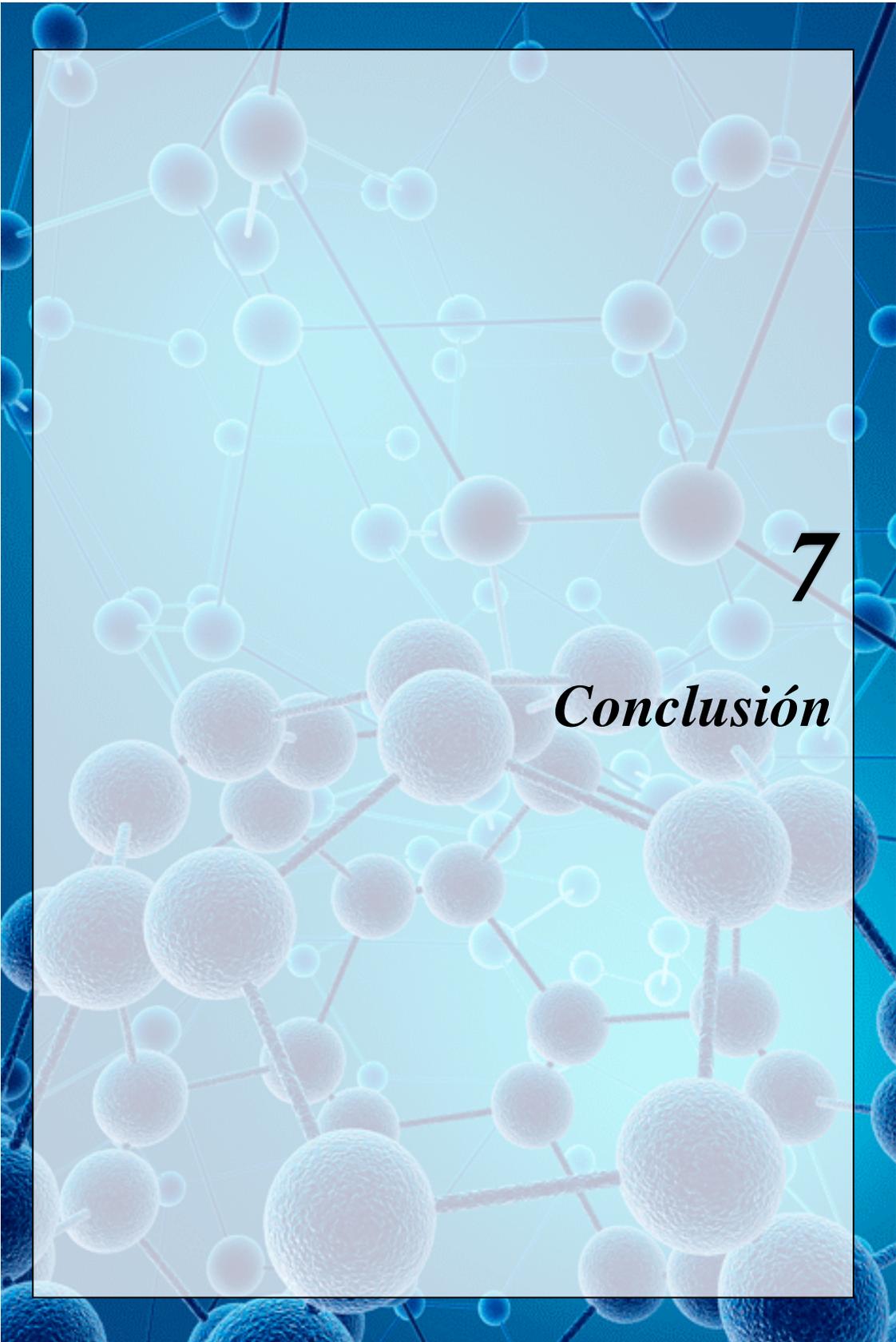
6. Reflexiones finales

El enfoque quimioterapéutico se ha desarrollado en los últimos años como una estrategia dirigida predominantemente para contrarrestar o disminuir la alta tasa de proliferación de las células tumorales y/o para disminuir la supervivencia de éstas. La llegada de los anticuerpos monoclonales como los antiangiogénicos para el tratamiento de etapas avanzadas provee nuevas estrategias para abordar la agresividad del CCR. Sin embargo, es importante pensar que la capacidad de proliferación celular es una de las funciones más antiguas en la evolución de la célula, en comparación con otras características celulares como la diferenciación celular y la capacidad migratoria. La evolución hacia la multicelularidad requirió cierta plasticidad fenotípica temporal de las células para cumplir diferentes funciones de acuerdo a la etapa de desarrollo del individuo. Como se mencionó en la Introducción de este Trabajo de Tesis la angiogénesis y la TEM constituyen programas celulares con funciones específicas durante el desarrollo embrionario, y que se observan en la progresión de tumores como el CCR. Estas funciones celulares se encuentran estrictamente controladas por señales provenientes del microambiente.

Los resultados informados en este Trabajo de Tesis muestran como una de estas señales que puede provenir del microambiente, PTHrP, es capaz de mediar la comunicación entre las células tumorales y las células endoteliales lo que promueve el desarrollo tumoral. Sin embargo, para determinar la influencia del microambiente tumoral de una patología tan heterogénea como el CCR se requiere el estudio de otros tipos celulares presentes en el estroma. Recientemente Wei y colaboradores, indicaron que los macrófagos asociados al tumor (MAT) inducen el programa de TEM e incrementan la migración, la invasión y la metástasis mediada por la regulación del eje JAK2/STAT3/miR-506-3p/FoxQ1, que a su vez conduce a la producción del ligando de quimiocina 2 CCL2 lo que promueve el reclutamiento de macrófagos, revelando la interacción entre las células inmunes y las células tumorales en el microambiente del CCR (Wei et al., 2019). La complejidad de las vías de señalización involucradas, resaltan la necesidad de profundizar en el estudio de las

mismas, así como del análisis de vías clásicas y no clásicas como las mediadas por miRs. El enfoque de la biología de redes como el explorado al final de este Trabajo de Tesis propone este abordaje. Aquí se plantea que PTHrP, VEGF y SPARC, tres moléculas que median la señalización extracelular, posiblemente podrían participar de una red regulatoria que promueve los eventos de angiogénesis y de la TEM en el CCR.

Un estudio reciente observó que los factores secretados al medio por células derivadas de un CCR invasivo de características mesenquimales como es la línea celular SW620, inducen la TEM en las líneas tumorales de CCR DLD1, HCT15, HCT116 y LoVo, pero no en las células HT-29 y Caco-2 (Rokavec et al., 2019). Estos estudios no solo sugieren al igual que lo observado en este Trabajo de Tesis, que estas últimas al tratarse de líneas más diferenciadas requieren de cierto grado de inducción para su dediferenciación, sino que podría existir una inducción de la TEM en las células tumorales a partir de la influencia anómala de células con características mesenquimales. En esta imitación del contexto celular quizá la célula tumoral adquiriendo características mesenquimales, como se ha sugerido, logre así la evasión inmune y otras funciones durante la diseminación metastásica. Esto complementaría los enfoques terapéuticos no solo en ser dirigidos al tratamiento de la célula tumoral, sino a interrumpir la inducción de las características mesenquimales mediadas por moléculas como PTHrP.



7. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis se puede concluir que PTHrP es capaz de inducir cambios en la expresión de los factores proangiogénicos VEGF, HIF-1 α , MMP-7 y MMP-9 en las líneas derivadas de CCR Caco-2 y HCT116. Se halló que esta acción del péptido involucra a las vías PI3K/Akt y Erk1/2, promoviendo el proceso de angiogénesis asociada al tumor principalmente a través del VEGF. Se comprobó que PTHrP ejerce su efecto actuando a través de estas células tumorales en la modulación de eventos celulares en las células endoteliales HMEC-1, incrementando la migración, proliferación y formación de estructuras similares a tubos en estas células. La exploración del efecto directo de PTHrP sobre estas células endoteliales reveló que es capaz de activar la vía de ERK1/2 MAPK e incrementar el número de células sin afectar la capacidad migratoria y la formación de estructuras tubulares, lo que sugiere que su rol en el comportamiento angiogénico de estas células endoteliales es mayormente dependiente de la interacción con las células tumorales intestinales (**Figura 53A**).

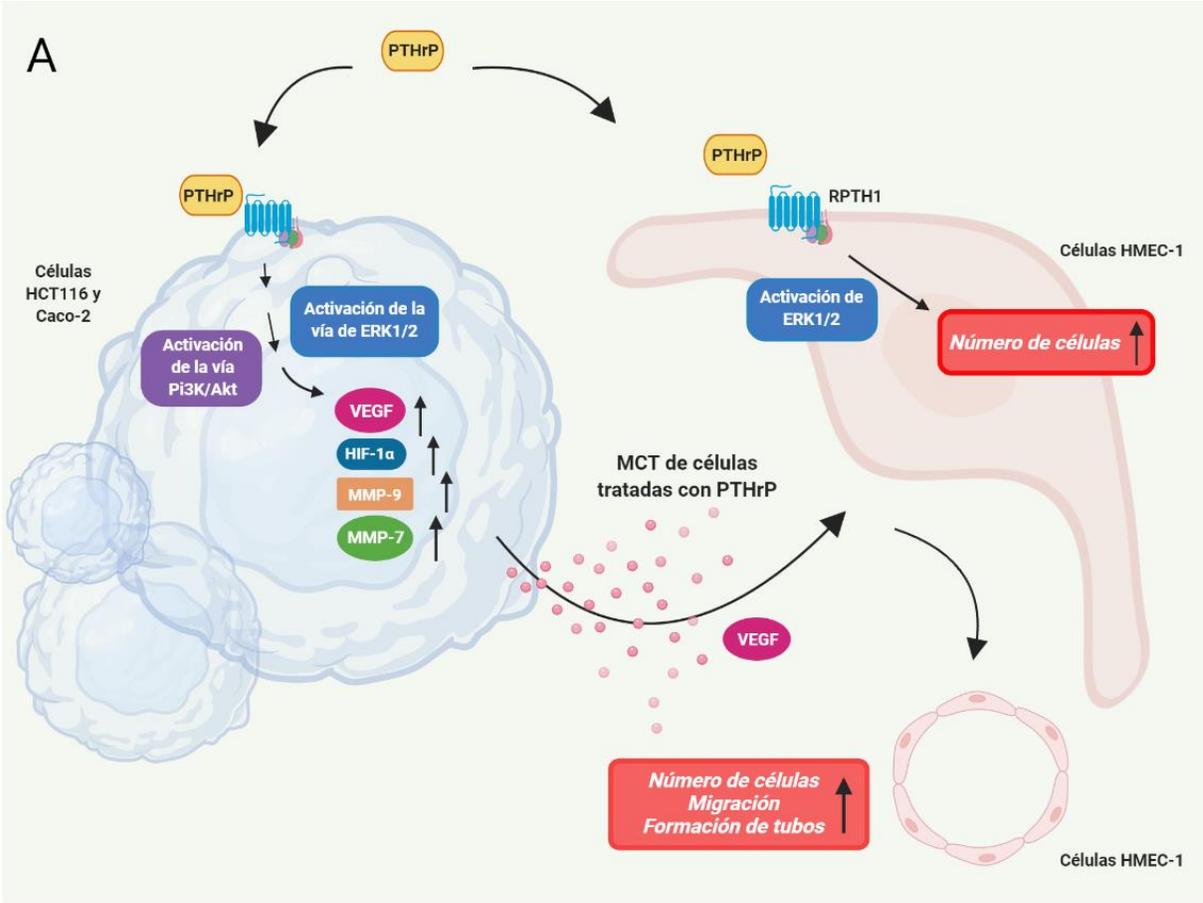
En la **Figura 54B** se muestra que en las células HCT116, el tratamiento con PTHrP modula la expresión de CK-18, E-cadherina, N-cadherina y ZEB-1, que son marcadores cuyos cambios de expresión se vinculan a la activación del programa de TEM, lo que se corresponde con los cambios morfológicos asociados a un estado mesenquimal promovidos también el péptido. A partir de la acción de PTHrP sobre las células endoteliales HMEC-1, se emplearon los medios condicionados de estas células y se observó que los MCE de células tratadas con PTHrP disminuyen la expresión de E-cadherina y favorecen la aparición de un fenotipo mesenquimal en las células HCT116 en tiempos menores respecto a lo observado por la acción directa de PTHrP sobre estas células tumorales. Esto indica que PTHrP es capaz de actuar por sí sola y a través de estas células endoteliales en la modulación de la TEM en las células HCT116.

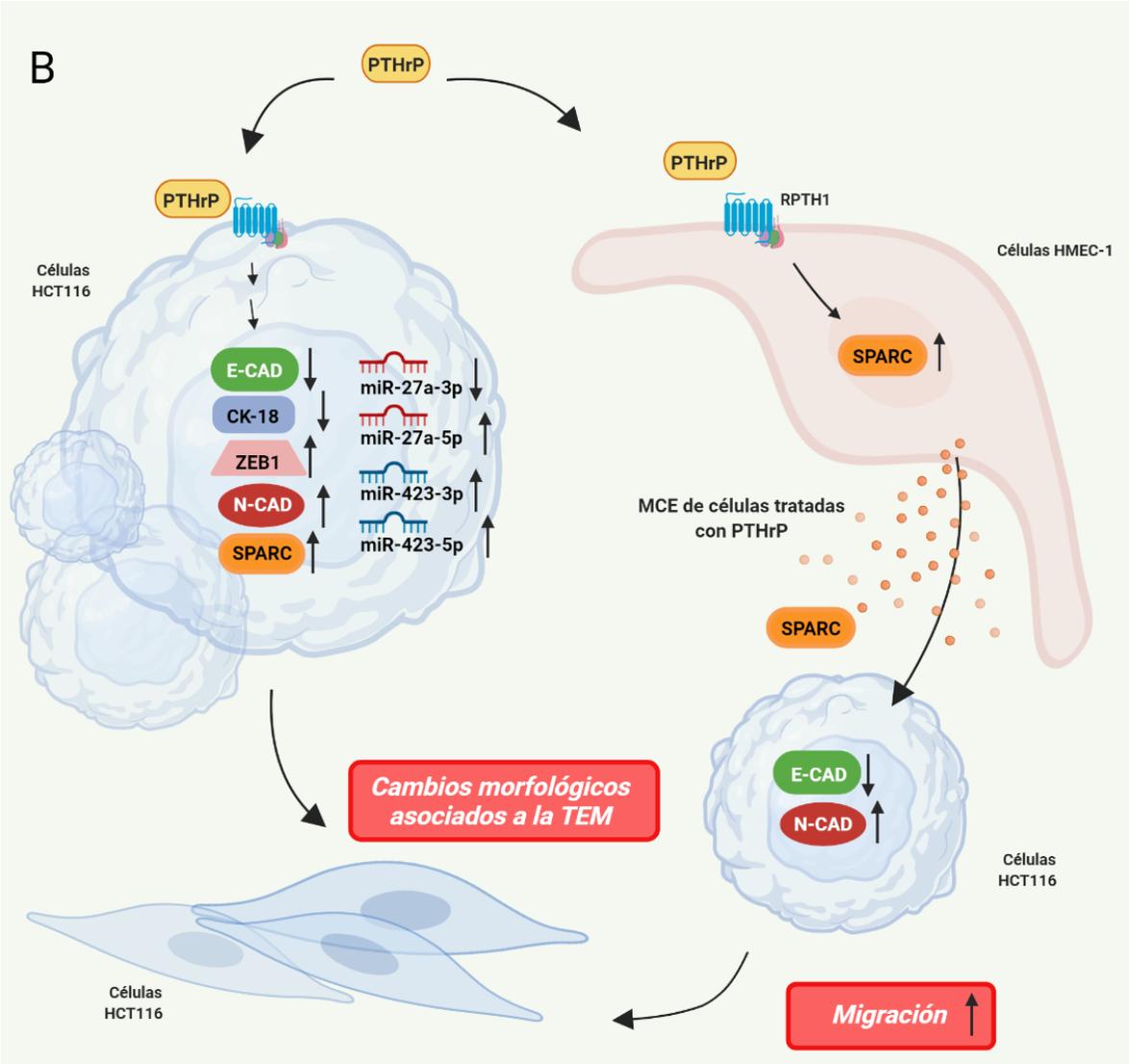
En la misma **Figura 54B** se observa que PTHrP incrementa también la expresión proteica de SPARC, la cual está asociada a la progresión del CCR, tanto en las células tumorales HCT116 como en las células endoteliales HMEC-1; PTHrP promueve además su liberación al medio desde estas células endoteliales. Asimismo, el tratamiento de SPARC exógeno sobre las células tumorales acentúa el efecto de PTHrP en la disminución de la expresión de E-cadherina e intensifica el efecto de PTHrP en el incremento de la migración de las células de CCR. Finalmente, la exploración del efecto de PTHrP a nivel postranscripcional reveló que es capaz de modular miRs relevantes en la activación del programa de TEM. Se observó en las células HCT116 que el tratamiento con PTHrP incrementa la transcripción de la hebra miR-27a-5p; por el contrario, se evidenció una disminución consistente en la transcripción de la hebra de miR-27a-3p en estas células debido al tratamiento. Además, la exposición de las células HCT116 con PTHrP incrementa los niveles de miR-423-3p y miR-423-5p.

El empleo de un modelo animal de xenoinjerto de células HCT116 con administración diaria e intratumoral de PTHrP evidenció que el péptido induce el incremento en la marcación del VEGF, CD31 y SPARC y la disminución de la marcación de E-cadherina. En los ratones tratados con PTHrP estos cambios en la inmunotinción se acompañaron con la formación de vasos intratumorales y con cambios morfológicos en las células tumorales hacia una forma ahusada (**Figura 54C**).

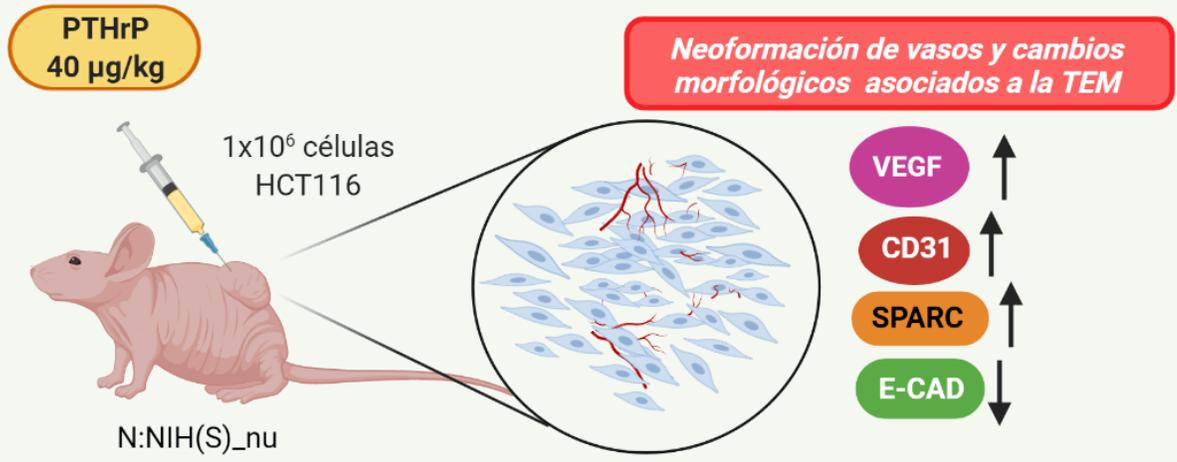
Finalmente, los hallazgos obtenidos *in vitro* e *in vivo* fueron analizados desde el punto de vista de su implica clínica y cotejados a partir de la literatura existente mediante el desarrollo de un análisis bioinformático para lo cual se obtuvieron 4 conjuntos de datos de muestras clínicas. Se descubrió que los genes sobreexpresados en las muestras clínicas de CCR se asocian a vías implicadas en la angiogénesis y la TEM, y que la consulta de diferentes bases de datos sugiere que PTHrP se asocia a estos eventos y a los marcadores evaluados en esta tesis. Por último a través de un análisis de biología de redes se pudo inferir que PTHrP, VEGF y SPARC podrían ser parte de un mismo módulo funcional que participa de la regulación de genes centrales en el desarrollo de CCR (**Figura 54D**). Como

sugiere el análisis bioinformático los aportes de este trabajo sientan las bases para continuar con el estudio de estos marcadores en muestras de pacientes de CCR con el fin de determinar su potencial valor pronóstico/predictivo. Los conocimientos generados por el desarrollo de esta Tesis Doctoral revelan los efectos de PTHrP *in vitro* e *in vivo*, en la modulación de la angiogénesis y la TEM del CCR, y evidencian la importancia de su rol en la interacción entre las células tumorales y su microambiente, en la búsqueda de comprender el desarrollo del fenotipo agresivo de esta patología.





C



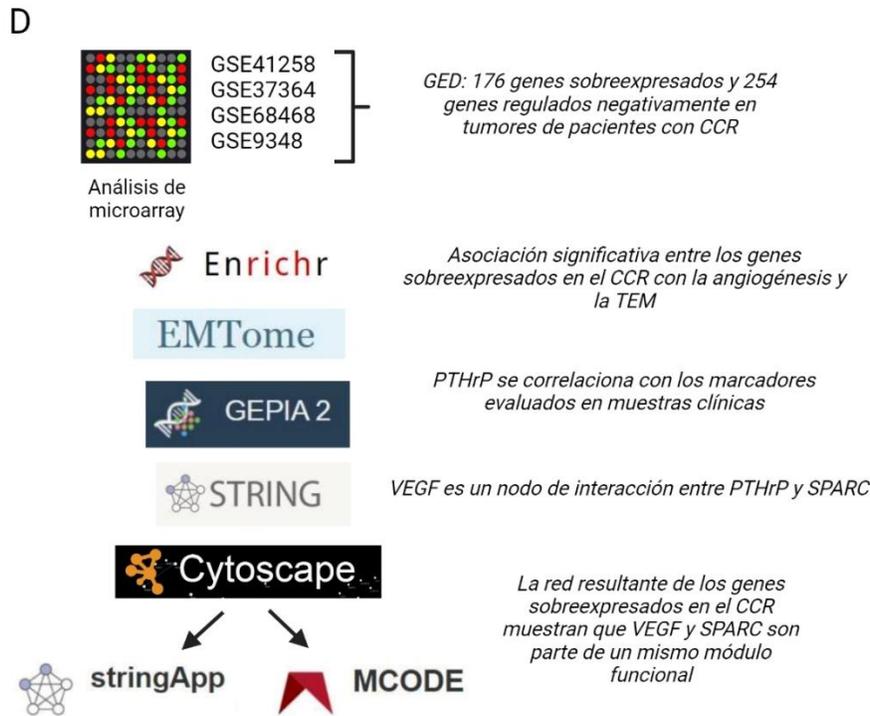
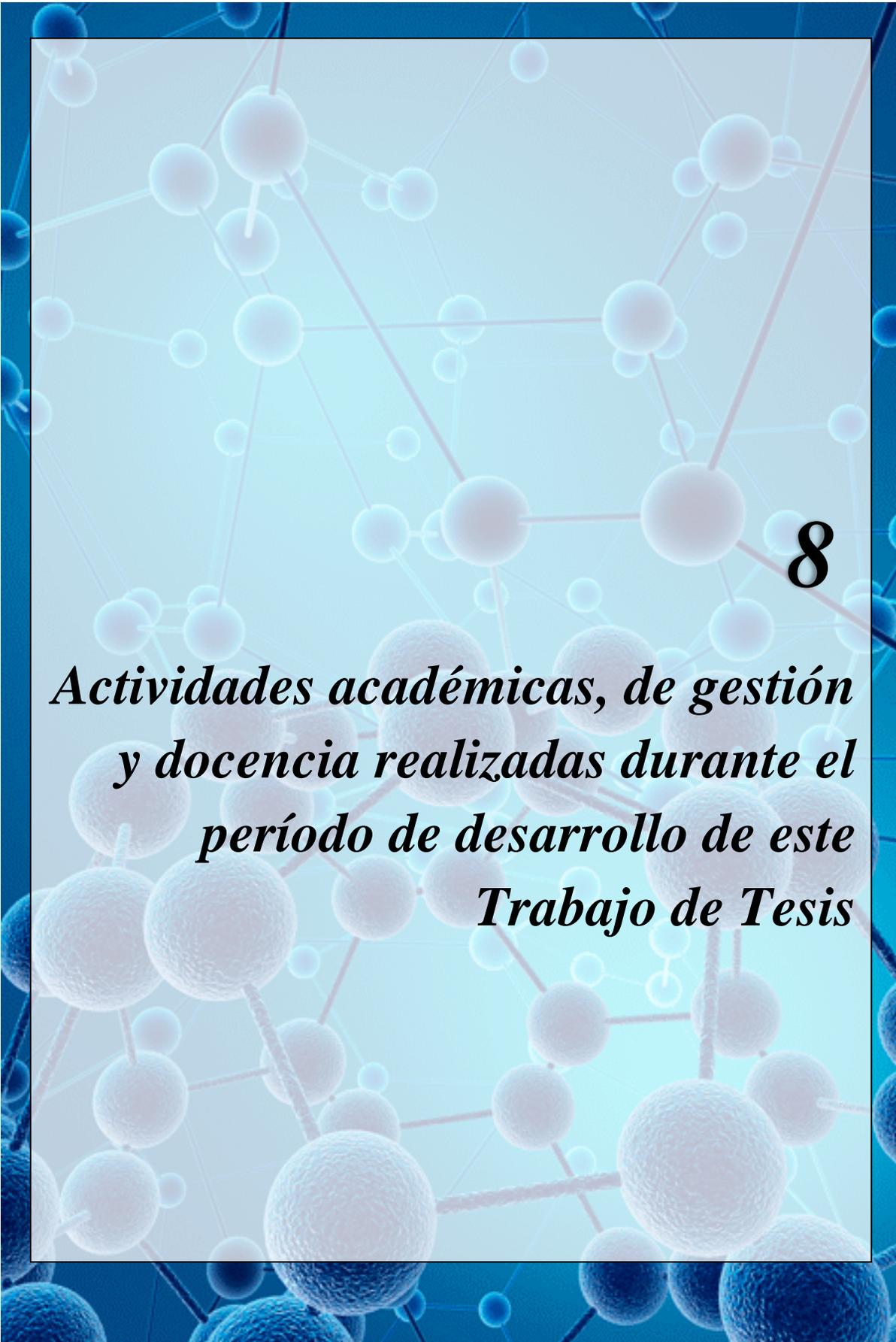


Figura 54. (A) PTHrP induce la expresión de factores pro-angiogénicos mediado por las vías PI3K/Akt y ERK1/2 MAPK en células tumorales intestinales, y promueve la angiogénesis asociada al tumor a través de VEGF. El medio proveniente de estas células tumorales tratadas con PTHrP favorece la migración, la proliferación y la formación de estructuras tubulares en las células endoteliales. (B) PTHrP induce cambios en la expresión de marcadores claves de la TEM y promueve cambios morfológicos asociados al estado mesenquimal en forma dependiente de la agresividad del modelo celular. El medio proveniente de las células endoteliales tratadas con PTHrP también favorece un fenotipo mesenquimal en las células tumorales. El tratamiento de las células endoteliales con PTHrP incrementa la expresión proteica de SPARC y su liberación, y su empleo como citoquina exógena acentúa el efecto de PTHrP en la disminución de la expresión de E-cadherina y en el incremento de la migración en las células tumorales. (C) PTHrP administrado al modelo *in vivo* promueve cambios morfológicos y moleculares que validan lo observado *in vitro*. (D) El estudio *in silico* mediante el análisis de muestras de pacientes con CCR, la consulta en bases de datos y la visualización de redes de interacción predicen que PTHrP, VEGF y SPARC están asociados.



8

*Actividades académicas, de gestión
y docencia realizadas durante el
período de desarrollo de este
Trabajo de Tesis*

8. Actividades académicas, de gestión y de docencia realizadas durante el período de desarrollo de este Trabajo de Tesis

Durante el período en el que se desarrolló este Trabajo de Tesis se realizaron dos pasantías de investigación en el Laboratorio de Oncología Celular y Molecular, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el marco de una colaboración internacional entre los grupos de investigación del Dr. Contreras y la Dra Gentili que permitió el aporte de importantes resultados plasmados en esta Tesis. Esta colaboración se mantiene a la actualidad, con interés en ampliar el conocimiento en el fenómeno de la transición epitelio-mesénquima, uno de los ejes del trabajo expuesto.

Becas que permitieron el desarrollo de esta Tesis

. Beca de Finalización de Doctorado. Institución otorgante: CONICET. Laboratorio de Química Biológica (UNS). Director: Dra. Claudia Gentili. Co-director: Dra. Natalia Calvo. Período: 1 de Abril 2019 - 31 de Marzo 2021. Extendida al 1 de Agosto del 2022.

. Beca de Doctorado. Institución otorgante: Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). Laboratorio de Química Biológica (UNS). Director: Dra. Claudia Gentili. Co-director: Dra. Natalia Calvo. Período: 1 de Abril 2017-31 de Marzo 2018. Renovación por el período: 1 de Abril de 2018 - 31 de Marzo de 2019.

Estancias de investigación en el marco de esta Tesis

. Laboratorio de Oncología Celular y Molecular (LOCyM), Departamento de Oncología Básico-Clínica, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Héctor Contreras Muñoz. Período: 10/11/2018 al 15/01/2019.

. Laboratorio de Oncología Celular y Molecular (LOCyM), Departamento de Oncología Básico-Clínica, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Héctor Contreras Muñoz. Período: 05/07/2017 al 02/08/2017.

Publicaciones como primer autor

- **2021.** **Carriere P** y Calvo N, Novoa MB, Riquelme A, López-Moncada F, Torres MJ, Gigola G, Contreras HR, Gentili C. 2021. Role of SPARC in the epithelial-mesenchymal transition induced by PTHrP in human colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 530:111253.
- **2021.** **Carriere P**; MB. Novoa Díaz; F. López-Moncada; A. Zwenger; H. Contreras; N. Calvo; C. Gentili. PTHrP and SPARC expressions in human colorectal cancer: an *in silico* analysis. *Annals of Oncology.* Volume 32, Issue S3, sup 4 S158.
- **2022.** Manuscrito en preparación: PTHrP modulates microRNAs potentially involved in the aggressive behavior of CRC cells. **Carriere P**, Escalante P, Novoa Díaz MB, Calvo N, Contreras H, Gentili C.

Publicaciones como segundo autor

- **2022.** Novoa MB, **Carriere P**, Gígola G, Zwenger A, Calvo N, Gentili C. Involvement of Met receptor pathway in the the aggressive behavior of colorectal cancer cells induced by PTHrP. Artículo en prensa. *World Journal of Gastroenterology.*
- **2021.** Gigola G, **Carriere P**, Novoa Díaz MB, Perdigon G, Zwenger AO, Gentili C. Survival effect of probiotics in a rat model of colorectal cancer treated with capecitabine. *World Journal of Gastrointestinal Oncology.* 13(10): 1518-1531.
- **2021.** Novoa MB, **Carriere P**, Martin MJ, Calvo N, Gentili C. Involvement of parathyroid hormone-related peptide in the aggressive phenotype of colorectal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology (Frontier).* 27(41):7025-7040.
- **2019.** Calvo N, **Carriere P**, Martín MJ, Gigola G, Gentili C. 2019. PTHrP treatment of colon cancer cells promotes tumor associated-angiogenesis by the effect of VEGF. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1; 483:50-63.

- **2017.** Calvo N, **Carriere P**, Martín MJ, Gentili C. 2017. RSK activation via ERK modulates human colon cancer cells response to PTHrP. *Journal of Molecular Endocrinology*. 59(1):13-27.

Resúmenes presentados en revistas científicas

Annals of Oncology, Volume 32, Issue S3, sup 4 S158 (2021). Biocell Vol. 45, Sup. 3, ISSN 0327- 9545 (impresa) 1667-5746 (versión online) (2020); Annals of Oncology, Volume 31, Issue 11. ISSN 0923-7534 (impresa) 1569-8041 (en línea) (2020). Medicina Vol 80 Sup. V. (2020); Medicina Vol 79 Supl. IV 0240 (2019); Medicina, 78 (sup III):239-240 (2018); Medicina, 78 (supIII):239 (2018); Actualizaciones en osteología Vol.14-N°2 (2018); Actualizaciones en osteología 13 sup II (2017); Medicina 77 sup II 409 (2017); Medicina 77 sup II:194 (2017); Medicina, 76(sup II):136 (2016); Bone, 89:64-72 (2016); Medicina, 75(sup.1):128 (2015); Actualizaciones en Osteología vol. 11 - Sup I: 35 (2015); Biocell, 38(sup.2): 188 (2014).

Presentación en reuniones científicas nacionales (15)

- **2021. Carriere P**, Feijoó N, Novoa Díaz MB, Gigola G, Calvo N, Gentili C. Identificación de genes modulados por probióticos en el cáncer colorrectal. XXIII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. **Publicado en revista BIOCELL.**
- **2021.** Novoa Díaz MB, **Carriere P**, Martín MJ, Zwenger A, Calvo N, Gentili C. Sensibilidad diferencial de células de CCR a drogas quimioterapéuticas: Estudio de mecanismos involucrados. XXIII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. **Publicado en revista BIOCELL.**
- **2021.** Homann L, **Carriere P**, De Victoria S, Novoa Díaz MB, Gentili C, Calvo N. Potencial rol de la vía PI3K/AKT en la formación de mimetismo vasculogénico en el cáncer cervical. XXIII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología.

- **2020. Carriere P**, Calvo N, Novoa MB, Morales S, Martín MJ, Contreras H, Gentili C. PTHrP differentially regulates miR-423 and miR-27a in normal intestinal cells and colorectal cancer cells. SAIC-Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. **Publicado en Revista Medicina, Vol 80, Sup V (2020).**

- **2020.** Valero V, Homann L, Carriere P, Novoa MB, Martín MJ, Gentili C, Calvo N. Identificación de potenciales proteínas involucradas en la angiogénesis asociada al cáncer cervical utilizando enfoques de proteómica y bioinformática. IV Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (SAB). **Biocell Vol. 45, Sup. 3, ISSN 0327-9545 (impresa) 1667-5746 (versión online) (2020).**

- **2020.** Novoa Díaz MB; Carriere P; Martín MJ; Calvo N, Zwenger A; Gígola G; Gentili C. Rol de PTHrP y del receptor Met en la modulación de eventos asociados al fenotipo agresivo de células derivadas de cáncer colorrectal. IV Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (SAB).

- **2020. Carriere P**; Calvo N; Novoa Díaz MB; López-Moncada F; Martín MJ; Contreras HR; Gentili C. Efectos de SPARC y de otros factores del microambiente tumoral en la inducción de PTHrP del fenotipo asociado a la TEM en células de cáncer colorrectal. IV Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (SAB).

- **2019. Carriere P**, Novoa Díaz MB, Martín MJ; Calvo N; Gígola G; Zwenger A; Maturi H; Gómez L; Gentili C. importancia de PTHrP y de marcadores asociados a este péptido como potenciales actores involucrados en el fenotipo agresivo de células derivadas de cáncer colorrectal. XXXIV Jornadas Multidisciplinarias de Oncología Ángel H. Roffo. CABA.

- **2019.** Novoa Diaz MB, Carriere P, Calvo N, Gentili C. Involvement of microenvironment factors in the effect on the aggressive behavior of colorectal cancer cells. SAIC, SAFE, SAB, SAP. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista Medicina Vol 79 Supl. IV 0240 (2019).

- **2018.** Novoa Díaz B, **Carriere P**, Calvo N, Martín MJ, Gentili C. Modulation by PTHrP of molecular mechanisms associated with the induction of cancer stem cell phenotype and epithelial to mesenchymal transition in human colorectal cancer cells. SAIC.SAI.SAFIS. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. Publicado en Revista Medicina 78 (supIII):240 (2018).
- **2018.** Calvo N, **Carriere P**, Novoa Díaz B, Martín MJ, Gentili C. Differential roles of mitogenic pathways in angiogenesis induced by PTHrP employing in vitro and in vivo models of colorectal cancer. SAIC.SAI.SAFIS. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. Publicado en Revista Medicina, 78 (sup III):239-240 (2018).
- **2018.** Jacob J, **Carriere P**, Novoa Díaz B, Gentili C, Calvo N. RSK is involved in angiogenesis induced by hypoxic conditions in cervical cancer. SAIC.SAI.SAFIS. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. Publicado en Revista Medicina, 78 (supIII):239 (2018).
- **2018.** Martín MJ, Calvo N, Novoa Díaz B, **Carriere P**, Gentili C. Parathyroid hormone related peptide (PTHrP) favors a more aggressive phenotype in colorectal cancer derived cells through the positive modulation of its own expression. XXXV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). CABA. Publicado en Revista Actualizaciones en osteología Vol.14-N°2 (2018).
- **2018.** **Carriere P**, Riquelme AN, Novoa Díaz B, Calvo N, Gentili C. Acción del análogo tumoral de PTH (PTHrP) en la regulación de factores asociados al fenotipo invasivo y a la angiogénesis en células de cáncer de colon humano. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores. Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Mendoza.
- **2017.** Calvo N, **Carriere P**, Martín MJ, Novoa Díaz B, Gentili C. Parathyroid hormone-related peptide treatment colon cancer cells enhances angiogenesis through VEGF. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. LXII Reunión Científica Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Buenos Aires. Publicado en Revista Medicina 77 sup II 409 (2017).

- **2017.** Novoa Díaz B, Martín MJ, **Carriere P**, Calvo N, Gentili C. PTHrP induces tumorigenic β -catenin pathway independently of Wnt signaling in colon cancer cells. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Buenos Aires. Publicado en Revista Medicina Vol 77 sup II: 194 (2017).

- **2017.** Martín MJ, Novoa Díaz B, Calvo N, **Carriere P**, Gentili C. Inhibitors of the ERK signaling pathway cooperate in the anti-proliferative effect of chemotherapeutics in colon cancer cells exposed to PTHrP. XXXIV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires. Publicado en Revista Actualizaciones en osteología 13 sup II (2017).

Presentación en reuniones científicas en el exterior (5)

- **2021.** **Carriere P**; MB. Novoa Díaz; F. López-Moncada; A. Zwenger; H. Contreras; N. Calvo; C. Gentili. PTHrP and SPARC expressions in human colorectal cancer: an in silico analysis. World Congress on Gastrointestinal Cancer 2021 (ESMO-evento virtual). Publicado en Revista Annals of Oncology, Vol 32, Issue S3, sup 4 S158 (2021).

- **2020.** Novoa Díaz B, Zwenger A, **Carriere P**, Martín J, Calvo N, Gigola G, Gómez L, Gentili C. Molecular mechanisms related to chemoresistance of colorectal cancer cells. Molecular analysis for precision oncology virtual congress 2020 (MAP-European Society for Medical Oncology). Publicado en Revista Annals of Oncology Vol 31 Issue 11, S1230 (2020).

- **2019.** **Carriere, P**; Novoa Díaz MB; López-Moncada F; Calvo N, Gentili, C. Posible acción sinérgica de un reorganizador del estroma tumoral y del análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) en la promoción del fenotipo agresivo de células de cáncer de colon humano. XXVII Jornadas de Jóvenes Investigadores (AUGM). San Carlos, Brasil.

- **2019.** Novoa Díaz MB, **Carriere P**, Calvo N, Martin MJ, Gentili C. PTHrP modula la expresión y activación de marcadores asociados a la progresión del cáncer colorrectal. Jornadas de Jóvenes Investigadores (AUGM). San Carlos, Brasil.
- **2017.** **Carriere P**, Calvo N, Riquelme AN, Martin MJ, Díaz BN, Contreras HR, Gentili C. PTHrP regulates factors involved in the pathogenesis of colorectal cancer. XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile.

Distinciones (5)

- **2021.** **Carriere P**, Feijoó N, Novoa Díaz MB, Gigola G, Calvo N, Gentili C. Identificación de genes modulados por probióticos en el cáncer colorrectal. XXIII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología.
- **2021.** Novoa Díaz MB, **Carriere P**, Martín MJ, Zwenger A, Calvo N, Gentili C. Sensibilidad diferencial de células de CCR a drogas quimioterapéuticas: Estudio de mecanismos involucrados. XXIII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología.
- **2020.** **Carriere P**; Calvo N; Novoa Díaz MB; López-Moncada F; Martin MJ; Contreras HR; Gentili C. Efectos de SPARC y de otros factores del microambiente tumoral en la inducción de PTHrP del fenotipo asociado a la TEM en células de cáncer colorrectal. IV Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (SAB).
- **2020.** Novoa Díaz MB; **Carriere P**; Martin MJ; Calvo N, Zwenger A; Gigola G; Gentili C. Rol de PTHrP y del receptor MET en la modulación de eventos asociados al fenotipo agresivo de células derivadas de cáncer colorrectal. IV Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (SAB).
- **2019.** Novoa Diaz MB, **Carriere P**, Calvo N, Martin MJ, Gentili C. PTHrP modula la expresión y activación de marcadores asociados a la progresión del cáncer colorrectal. Jornadas de Jóvenes Investigadores (AUGM). San Carlos, Brasil.

Participación en Proyectos de Investigación (12)

Ejecutados en la Actualidad

-Proyecto: “Mecanismos tumorales y del microambiente en la quimiorresistencia del cáncer colorrectal” período: 2022-2024. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2020 SERIE A Resolución N° RESOL-2022-3-APN-DANPIDTYI#ANPIDTYI). IR Dra. Gentili/ Dra. Calvo.

-Proyecto: “Mecanismos del microambiente tumoral involucrados en la quimiorresistencia y otros eventos asociados al fenotipo agresivo de células tumorales”. Período: 2021-2023. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: CONICET (PIP 2021-2023 RES.2021-1639-APN-DIR CONICET) IR: Dra. Gentili/ Dra. Calvo.

-Proyecto: “Mecanismos tumorales y del microambiente en la quimiorresistencia del cáncer colorrectal” período: 01/01/2020 - 31/12/2024. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B303) IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Rol de las células endoteliales vasculares en el cáncer cervical”. Período: 01/01/2020 - 31/12/2022. Unidad de Ejecución: INBIOSUR/ Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: UNS (PGI: 24/ZB86). IR Dra. Calvo.

Proyectos Ejecutados

-Proyecto: “Estudio de los efectos de nanosistemas magnéticos cargados con agentes anti-tumorales en células derivadas de cáncer colorrectal humano” período: 2019-2021. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Sur (PGI 24/ZB80). IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación, supervivencia, apoptosis e invasión de células tumorales intestinales por calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y el análogo tumoral de PTH (PTHrP)” período: 2016-2018. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: CONICET PIP 11220150100350. IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Estudio de marcadores tumorales y del microambiente potencialmente asociados a la quimiorresistencia de pacientes con cáncer colorrectal” período: 2018-2020. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Fundación Roemmers. IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Mecanismos de señalización desencadenados por el análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) involucrados en la modulación del fenotipo agresivo de células tumorales intestinales” período: 2016-2018. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Instituto Nacional del Cáncer (RESOL-2016-1006-E-APN-MS). IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Mecanismos de señalización desencadenados por el análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) involucrados en la modulación del fenotipo agresivo de células tumorales intestinales” período: 2016-2019. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B230). IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación, supervivencia, apoptosis e invasión de células tumorales intestinales por calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y el análogo tumoral de PTH (PTHrP)” período: 2014-2017. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad

Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Resolución N° 214/14). IR Dra. Gentili.

-Proyecto: “Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación, supervivencia, apoptosis e invasión de células tumorales intestinales por calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y el análogo tumoral de PTH (PTHrP)” período: 2014-2015. Unidad de Ejecución: Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Institución: Universidad Nacional del Sur (UNS). Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Instituto Nacional del Cáncer (Resolución Ministerial 493/14). Financiamiento obtenido. IR Dra. Gentili.

-Proyecto Internacional: “Identificación de nuevas dianas terapéuticas y desarrollo de nanoformulaciones para el tratamiento de cánceres de alta mortalidad en Chile”. Período: 2017-2019. Unidad de Ejecución: Universidad de Chile Entidad Acreditadora y/o Financiadora: Proyecto U-Redes de Consolidación. Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo. (N° URC- 007/17). Investigador responsable: Dr. Héctor Contreras Muñoz.

Actividades de gestión (3)

- Integrante del Consejo Directivo del INBIOSUR (CONICET-UNS). Suplente Claustro Becarios. Abril 2019-Abril 2021. Designado por votación.
- Comisión Curricular de la carrera de Biología (CoCuBio). Titular del Claustro Graduados. Resolución CSU-716/16, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS. 2017-prorrogada a abril 2020.
- Integrante de la Comisión de Extensión y Divulgación del INBIOSUR (CEDI)-Universidad Nacional del Sur. 2019-actual.

Actividades de extensión (7)

- Seminario brindado a la comunidad de la facultad de medicina de la Universidad de Chile titulado: “Rol del análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) en la transición epitelio-mesénquima en el cáncer colorrectal” en representación del grupo Biología

Molecular aplicada al Diagnóstico y Pronóstico del Cáncer (CONICET-INBIOSUR). Auditorio Héctor Orrego (Escuela de Postgrado). Enero, 2019.

- Integrante del proyecto “Adecuación de estrategias para fortalecer las medidas sanitarias de barrios vulnerables de Bahía Blanca en el marco de la pandemia mundial COVID – 19”. Directora: Dra. Claudia Gentili. Universidad Nacional del Sur. Período: 2020-2021.

- Expositor en la Semana de la Ciencia 2018 con el stand: “Sustancias buenas y malas en la salud de nuestro intestino”, organizado por INBIOSUR y dirigido a la comunidad y escuelas primarias, Agosto 2018.

- Expositor en las Jornadas de Investigación del Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia 2018 con el trabajo: “Rol del análogo tumoral de PTH (PTHrP) en la adquisición del fenotipo mesenquimal de células de cáncer de colon y en la promoción de la angiogénesis tumoral”, Agosto 2018.

- Expositor en Ciclo de Seminarios del INBIOSUR 2017 con el trabajo: “Rol de PTHrP en la patogénesis del cáncer de colon”, Septiembre 2017.

- Expositor en las jornadas “Investigando y cuidando el medio ambiente y la salud: El INBIOSUR con los chicos”, XIV Edición de la Semana Nacional de la Ciencias, la Tecnología y el Arte Científico, Septiembre 2016.

- Integrante del proyecto de voluntariado (UNS): “*Quimicuentos*”, financiado por la Secretaria General de Cultura y Extensión Universitaria (UNS). Directora: Dra. Sandra Hernández. Período 2015-2018.

Actividades de docencia

- Universidad Nacional del Sur. Ayudante de Docencia A con dedicación simple en la materia: Estructura y Función del Cuerpo Humano (Código 1093) (Carrera de Enfermería). Ordinario por concurso. Desde el 10.12.2021 (actual).

- Universidad Nacional del Sur. Ayudante de Docencia A con dedicación simple en la materia: Estructura y Función del Cuerpo Humano (Código 1093) (Carrera de Enfermería). Designación directa. Desde 02.08.2021 hasta el 31.12.2021.
- Universidad Nacional del Sur. Ayudante de Docencia A con dedicación simple en la materia: Estructura y Función del Cuerpo Humano (Código 1093) (Carrera de Enfermería). Designación directa. Desde el 02.03.2021 hasta el 31.07.2021.
- Universidad Nacional del Sur. Ayudante de Docencia A con dedicación simple en la materia: Estructura y Función del Cuerpo Humano (Código 1093) (Carrera de Enfermería). Designación directa. Desde el 15.07.2020 hasta el 18.12.2020.
- Instituto Superior Juan José Passo, Titular: Medicina del Trabajo I (Tecnicatura Superior en Higiene y Seguridad en el Trabajo). Designación directa. Desde el 5.05.2020 (actual).
- Universidad Nacional del Sur. Ayudante de Docencia A con dedicación simple en la materia: Estructura y Función del Cuerpo Humano (Código 1093) (Carrera de Enfermería). Designación directa. Desde el 5.08.2019 hasta el 31.12.2019.
- Instituto Superior Juan José Passo, Titular: Medicina del Trabajo II (Tecnicatura Superior en Higiene y Seguridad en el Trabajo). Designación directa. Desde el 16.08.2016 (actual).



9

Bibliografía

9. Bibliografia

- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., & Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of Investigative Dermatology*, *99*(6), 683–690. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12613748>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., ... Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, *2*(9). <https://doi.org/10.1038/ONCSIS.2013.35>
- Aiello, N. M., & Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, *216*(5), 1016–1026. <https://doi.org/10.1084/JEM.20181827>
- Akino, K., Ohtsuru, A., Kanda, K., Yasuda, A., Yamamoto, T., Akino, Y., ... Yamashita, S. (2000). Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor. *Endocrinology*, *141*(11), 4313–4316. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7875>
- Albright, F. (1941). Massachusetts General Hospital Case Records, Case 27461. *N Engl J Med*, *225*, 789–791.
- Alonso, V., De Gortázar, A. R., Ardura, J. A., Andrade-Zapata, I., Alvarez-Arroyo, M. V., & Esbrit, P. (2008). Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Journal of Cellular Physiology*, *217*(3), 717–727. <https://doi.org/10.1002/JCP.21547>
- Alsina-sanchis, E., Mülfarth, R., & Fischer, A. (2021). Control of Tumor Progression by Angiocrine Factors. *Cancers*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112610>
- Araújo, R. F., Lira, G. A., Vilaça, J. A., Guedes, H. G., Leitão, M. C. A., Lucena, H. F., & Ramos, C. C. O. (2015). Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9,

and VEGF- α expressions in colorectal cancer. *Pathology, Research and Practice*, 211(1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2014.09.007>

Ardura, J. A., Rayego-Mateos, S., Rámila, D., Ruiz-Ortega, M., & Esbrit, P. (2010). Parathyroid hormone-related protein promotes epithelial-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(2), 237–248. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009050462>

Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(1). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA56010015>

Avdalyan, A., Bobrov, I., Klimachev, V., & Lazarev, A. (2012). Prognostic Value of Microvessel Density in Tumor and Peritumoral Area as Evaluated by CD31 Protein Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Count in Endothelial Cells in Uterine Leiomyosarcoma. *Sarcoma*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/594512>

Bader, G. D., & Hogue, C. W. V. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>

Bakre, M. M., Zhu, Y., Yin, H., Burton, D. W., Terkeltaub, R., Deftos, L. J., & Varner, J. A. (2002). Parathyroid hormone-related peptide is a naturally occurring protein kinase A-dependent angiogenesis inhibitor. *Nature Medicine*, 8(9), 995–1003. <https://doi.org/10.1038/nm753>

Bao, Y., Chen, Z., Guo, Y., Feng, Y., Li, Z., Han, W., ... Yang, W. (2014). Tumor suppressor microRNA-27a in colorectal carcinogenesis and progression by targeting SGPP1 and Smad2. *PLoS One*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105991>

Barillari, G. (2020). The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–29. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124526>

- Barisciano, G., Colangelo, T., Rosato, V., Muccillo, L., Taddei, M. L., Ippolito, L., ... Sabatino, L. (2020). miR-27a is a master regulator of metabolic reprogramming and chemoresistance in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, *122*(9), 1354–1366. <https://doi.org/10.1038/S41416-020-0773-2>
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., ... Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1193>
- Battaglin, F., Puccini, A., Intini, R., Schirripa, M., Ferro, A., Bergamo, F., ... Loupakis, F. (2018). The role of tumor angiogenesis as a therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *18*(3), 251–266. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1428092>
- Beerling, E., Seinstra, D., de Wit, E., Kester, L., van der Velden, D., Maynard, C., ... van Rheenen, J. (2016). Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Reports*, *14*(10), 2281–2288. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.034>
- Behar, V., Nakamoto, C., Greenberg, Z., Bisello, A., Suva, L. J., Rosenblatt, M., & Chorev, M. (1996). Histidine at position 5 is the specificity “switch” between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology*, *137*(10), 4217–4224. <https://doi.org/10.1210/ENDO.137.10.8828480>
- Behrens, J. (2005). The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochemical Society Transactions*, *33*(Pt 4), 672–675. <https://doi.org/10.1042/BST0330672>
- Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., ... Lothe, R. A. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0691-Y>

- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., ... Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737–744.
<https://doi.org/10.1038/35036374>
- Bergwitz, C., Gardella, T. J., Flannery, M. R., Potts, J. T., Kronenberg, H. M., Goldring, S. R., & Jüppner, H. (1996). Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. Evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(43), 26469–26472.
<https://doi.org/10.1074/JBC.271.43.26469>
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary Pathology*, 51(4), 759.
<https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- Bhattacharya, R., Ye, X. C., Wang, R., Ling, X., Mcmanus, M., Fan, F., ... Ellis, L. M. (2016). Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Research*, 76(10), 3014–3024.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1605>
- Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198(1), 11–26. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0304-419X(94)90003-5)
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
- Brattain, W D Fine, F M Khaled. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*, 41(5), 1751–1756.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., & Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Reports*, 9(6), 582–589.

<https://doi.org/10.1038/embor.2008.74>

- Busch, E. L., Keku, T. O., Richardson, D. B., Cohen, S. M., Eberhard, D. A., Avery, C. L., & Sandler, R. S. (2016). Evaluating markers of epithelial-mesenchymal transition to identify cancer patients at risk for metastatic disease. *Clinical & Experimental Metastasis*, *33*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/S10585-015-9757-7>
- Busuioc, C., Ciocan-Cartita, C. A., Braicu, C., Zanoaga, O., Raduly, L., Trif, M., ... Berindan-Neagoe, I. (2021). Epithelial–Mesenchymal Transition Gene Signature Related to Prognostic in Colon Adenocarcinoma. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(6), 476. <https://doi.org/10.3390/JPM11060476>
- Cackowski, F. C., Anderson, J. L., Patrene, K. D., Choksi, R. J., Shapiro, S. D., Windle, J. J., ... Roodman, G. D. (2010). Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood*, *115*(1), 140–149. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-08-237628>
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(11), 857–866. <https://doi.org/10.1038/NRC1997>
- Calvo, N., Carriere, P., Martin, M. J., & Gentili, C. (2017). RSK activation via ERK modulates human colon cancer cells response to PTHrP. *Journal of Molecular Endocrinology*, *59*(1), 13–27. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0216>
- Calvo, N., Martín, M. J., de Boland, A. R., & Gentili, C. (2014). Involvement of ERK1/2, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways in the regulation of cell cycle progression by PTHrP in colon adenocarcinoma cells. *Biochemistry and Cell Biology*, *92*(4), 305–315. <https://doi.org/10.1139/bcb-2013-0106>
- Cao, D., Hou, M., Guan, Y. S., Jiang, M., Yang, Y., & Gou, H. F. (2009). Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-432>
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, *69* Suppl

3(SUPPL. 3), 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>

Carpentier, G., Berndt, S., Ferratge, S., Rasband, W., Cuendet, M., Uzan, G., & Albanese, P. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-67289-8>

Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer*, 2(3), 261–274. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>

Cavallaro, U., Schaffhauser, B., & Christofori, G. (2002). Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Letters*, 176(2), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00759-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00759-5)

Chang, C. H., Yen, M. C., Liao, S. H., Hsu, Y. L., Lai, C. S., Chang, K. P., & Hsu, Y. L. (2018). Correction: Chang, C.-H.; et al. Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Enhances Cell Proliferation, Migration, and Epithelial Mesenchymal Transition, and SPARC Expression Is Associated with Tumor Grade in Head and Neck Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1556. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS19082338>

Chen, L., Lu, D., Sun, K., Xu, Y., Hu, P., Li, X., & Xu, F. (2019). Identification of biomarkers associated with diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients based on integrated bioinformatics analysis. *Gene*, 692, 119–125. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.01.001>

Chen, M., Lin, M., & Wang, X. (2018). Overexpression of miR-19a inhibits colorectal cancer angiogenesis by suppressing KRAS expression. *Oncology Reports*, 39(2), 619–626. <https://doi.org/10.3892/OR.2017.6110>

Chim, S. M., Qin, A., Tickner, J., Pavlos, N., Davey, T., Wang, H., ... Xu, J. (2011). EGFL6 promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of

- extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22035–22046. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.187633>
- Cho, Y. A., Lee, J., Oh, J. H., Chang, H. J., Sohn, D. K., Shin, A., & Kim, J. (2019). Genetic Risk Score, Combined Lifestyle Factors and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Research and Treatment*, 51(3), 1033–1040. <https://doi.org/10.4143/CRT.2018.447>
- Choo, K. B., Soon, Y. L., Nguyen, P. N. N., Hiew, M. S. Y., & Huang, C. J. (2014). MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *Journal of Biomedical Science*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12929-014-0095-X>
- Chou, Y. S., & Yang, M. H. (2015, August 1). Epithelial-mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. *Journal of the Chinese Medical Association*, Vol. 78, pp. 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.05.002>
- Christofori, G. (2003). Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *The EMBO Journal*, 22(10), 2318–2323. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG228>
- Cohnheim, J. (1875). *Congénitas, Quergestreiftes Muskelsarkon der Nieren*. 65–66.
- Corre, I., Paris, F., & Huot, J. (2017). The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(33), 55684–55714. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.18264>
- Cowan, R. W., Singh, G., & Ghert, M. (2012). PTHrP increases RANKL expression by stromal cells from giant cell tumor of bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(6), 877–884. <https://doi.org/10.1002/jor.22020>
- Cros, M., Cataisson, C., Cho, Y. M., Berthois, Y., Bernard-Poenaru, O., Denne, M., ... Bouizar, Z. (2002). Constitutive production of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) by fibroblasts derived from normal and pathological human breast tissue. *Oncology Research*, 13(3), 137–146. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12549623>

Davies, R. J., Miller, R., & Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer* 2005 5:3, 5(3), 199–209.

<https://doi.org/10.1038/nrc1569>

De Gortázar, A. R., Alonso, V., Alvarez-Arroyo, M. V., & Esbrit, P. (2006). Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcified Tissue International*, 79(5), 360–369. <https://doi.org/10.1007/S00223-006-0099-Y>

Deans, C., Wigmore, S., Paterson-Brown, S., Black, J., Ross, J., & Fearon, K. C. H. (2005). Serum parathyroid hormone-related peptide is associated with systemic inflammation and adverse prognosis in gastroesophageal carcinoma. *Cancer*, 103(9), 1810–1818. <https://doi.org/10.1002/CNCR.20972>

Deckers, M. M. L., Karperien, M., Van Der Bent, C., Yamashita, T., Papapoulos, S. E., & Löwik, C. W. G. M. (2000). Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 141(5), 1667–1674. <https://doi.org/10.1210/ENDO.141.5.7458>

Dejana, E., Hirschi, K. K., & Simons, M. (2017). The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14361>

Delany, A. M., & Canalis, E. (1998). Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. *The American Journal of Physiology*, 274(3). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.1998.274.3.C734>

Derynck, R., & Weinberg, R. A. (2019). EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental Cell*, 49(3), 313–316. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2019.04.026>

Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2015). Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biology : Journal of*

the International Society for Matrix Biology, 44–46, 94–112.

<https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2015.04.004>

Diamond, A. G., Gonterman, R. M., Anderson, A. L., Menon, K., Offutt, C. D., Weaver, C. H., ... Foley, J. (2006). Parathyroid hormone-related protein and the PTH receptor regulate angiogenesis of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(9), 2127–2134. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700338>

Díaz, M. B. N., Carriere, P. M., Martín, M. J., Calvo, N., & Gentili, C. (2021). Involvement of parathyroid hormone-related peptide in the aggressive phenotype of colorectal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 27(41), 7025–7040. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I41.7025>

Digre, A., & Lindskog, C. (2021). The Human Protein Atlas—Spatial localization of the human proteome in health and disease. *Protein Science*, 30(1), 218–233. <https://doi.org/10.1002/pro.3987>

Domigan, C. K., Ziyad, S., & Luisa Iruela-Arispe, M. (2015). Canonical and noncanonical vascular endothelial growth factor pathways: new developments in biology and signal transduction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 30–39. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303215>

Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., & Jensen, L. J. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 623–632. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00702>

Dong, H., Liu, Q., Chen, C., Lu, T., & Xu, K. (2022). LncRNA OGFRP1 promotes angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through miR-423-5p/CTCF axis. *Immunobiology*, 227(2). <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2022.152176>

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0080-4>

- Drev, D., Harpain, F., Beer, A., Stift, A., Gruber, E. S., Klimpfinger, M., ... Marian, B. (2019). Impact of Fibroblast-Derived SPARC on Invasiveness of Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11101421>
- Druzhkova, I., Ignatova, N., Prodanets, N., Kiselev, N., Zhukov, I., Shirmanova, M., ... Zagaynova, E. (2019). E-Cadherin in Colorectal Cancer: Relation to Chemosensitivity. *Clinical Colorectal Cancer*, *18*(1), e74–e86. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.10.003>
- Durante, F. (1874). *Nesso fisio-patologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni*. *11*, 217–226.
- Erson, A. E., & Petty, E. M. (2008). MicroRNAs in development and disease. *Clinical Genetics*, *74*(4), 296–306. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0004.2008.01076.X>
- Esbrit, P., Alvarez-Arroyo, M. V., De Miguel, F., Martin, O., Martinez, M. E., & Caramelo, C. (2000). C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *11*(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1161085>
- Feng, C. C., Ding, G. X., Song, N. H., Li, X., Wu, Z., Jiang, H. W., & Ding, Q. (2013). Paraneoplastic hormones: parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and erythropoietin (EPO) are related to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *34*(6), 3471–3476. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-0924-7>
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K. S., ... Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, *380*(6573), 439–442. <https://doi.org/10.1038/380439A0>
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *161*(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/0006->

291X(89)92678-8

- Ferraro, A., Kontos, C. K., Boni, T., Bantounas, I., Siakouli, D., Kosmidou, V., ... Pintzas, A. (2014). Epigenetic regulation of miR-21 in colorectal cancer: ITGB4 as a novel miR-21 target and a three-gene network (miR-21-ITGB4-PDCD4) as predictor of metastatic tumor potential. *Epigenetics*, *9*(1), 129–141. <https://doi.org/10.4161/EPI.26842>
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *3*(3), 153–173. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2078-6891.2012.030>
- Fodde, R., & Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(2), 150–158. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2007.02.007>
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, *59*(1), 221–226. <https://doi.org/10.1093/JNCI/59.1.221>
- Fonseka, P., Pathan, M., Chitti, S. V., Kang, T., & Mathivanan, S. (2021). FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *Journal of Molecular Biology*, *433*(11). <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2020.166747>
- Fraher, L. J., Klein, K., Marier, R., Freeman, D., Hendy, G. N., Goltzman, D., & Hodsma, A. B. (1995). Comparison of the pharmacokinetics of parenteral parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)] and PTH-related peptide-(1-34) in healthy young humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *80*(1), 60–64. <https://doi.org/10.1210/JCEM.80.1.7829640>
- Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/NRD4204>

- Gee, M. S., Procopio, W. N., Makonnen, S., Feldman, M. D., Yeilding, N. M., & Lee, W. M. F. (2003). Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *The American Journal of Pathology*, *162*(1), 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63809-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63809-6)
- Gensure, R. C., Gardella, T. J., & Jüppner, H. (2005). Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *328*(3), 666–678. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.11.069>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., ... Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, *5*(10). <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-10-R80>
- Giaccia, A. J., Simon, M. C., & Johnson, R. (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*, *18*(18), 2183–2194. <https://doi.org/10.1101/GAD.1243304>
- Glickman, M. E., Rao, S. R., & Schultz, M. R. (2014). False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, *67*(8), 850–857. <https://doi.org/10.1016/J.JCLINEPI.2014.03.012>
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(12), 871–882. <https://doi.org/10.1038/NRC3627>
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, *7*(344), re8. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2005189>
- Goto, M., Osada, S., Imagawa, M., & Nishizuka, M. (2017). FAD104, a regulator of adipogenesis, is a novel suppressor of TGF- β -mediated EMT in cervical cancer cells. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16555-3>

- Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., ... Cheresh, D. A. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, *456*(7223), 809–814.
<https://doi.org/10.1038/NATURE07424>
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, *95*(1), 333–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, *21*(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/NM.3967>
- Gujral, A., Burton, D. W., Terkeltaub, R., & Deftos, L. J. (2001). Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Cancer Research*, *61*(5), 2282–2288. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280799>
- Guo, C., Ma, J., Deng, G., Qu, Y., Yin, L., Li, Y., ... Zeng, S. (2017). ZEB1 Promotes Oxaliplatin Resistance through the Induction of Epithelial - Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells. *Journal of Cancer*, *8*(17). <https://doi.org/10.7150/JCA.20952>
- Gurzu, S., Silveanu, C., Fetyko, A., Butiurca, V., Kovacs, Z., & Jung, I. (2016, August 14). Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 22, pp. 6764–6775. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6764>
- Hammad, A., Elshaer, M., & Tang, X. (2021). Identification of potential biomarkers with colorectal cancer based on bioinformatics analysis and machine learning.

Mathematical Biosciences and Engineering : MBE, 18(6), 8997–9015.

<https://doi.org/10.3934/MBE.2021443>

Hammoud, L., Adams, J. R., Loch, A. J., Marcellus, R. C., Uehling, D. E., Aman, A., ...
Rossant, J. (2016). Identification of RSK and TTK as Modulators of Blood Vessel
Morphogenesis Using an Embryonic Stem Cell-Based Vascular Differentiation Assay.
Stem Cell Reports, 7(4), 787–801. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2016.08.004>

Hawkins, P. T., & Stephens, L. R. (2015). PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et
Biophysica Acta*, 1851(6), 882–897. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.12.006>

Hay, E. D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable
signaling mechanisms that create it. *Developmental Dynamics : An Official Publication
of the American Association of Anatomists*, 233(3), 706–720.
<https://doi.org/10.1002/DVDY.20345>

He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.
Nature Reviews. Genetics, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/NRG1379>

Henry, J. G., Mitnick, M., Dann, P. R., & Stewart, A. F. (1997). Parathyroid hormone-related
protein-(1-36) is biologically active when administered subcutaneously to humans.
The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(3), 900–906.
<https://doi.org/10.1210/JCEM.82.3.3811>

Hoare, S. R. J., Gardella, T. J., & Usdin, T. B. (2001). Evaluating the signal transduction
mechanism of the parathyroid hormone 1 receptor. Effect of receptor-G-protein
interaction on the ligand binding mechanism and receptor conformation. *The Journal
of Biological Chemistry*, 276(11), 7741–7753.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M009395200>

Hubbard, J., & Grothey, A. (2010). Antiangiogenesis agents in colorectal cancer. *Current
Opinion in Oncology*, 22(4), 374–380.
<https://doi.org/10.1097/CCO.0B013E328339524E>

- Hung, J. Y., Yen, M. C., Jian, S. F., Wu, C. Y., Chang, W. A., Liu, K. T., ... Kuo, P. L. (2017). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces cell migration and epithelial mesenchymal transition through WNK1/snail in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(38), 63691–63702. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19475>
- Huo, N., Ichikawa, Y., Kamiyama, M., Ishikawa, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, S., ... Shimada, H. (2002). MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells. *Cancer Letters*, 177(1), 95–100. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00772-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00772-8)
- Isowa, S., Shimo, T., Ibaragi, S., Kurio, N., Okui, T., Matsubara, K., ... Sasaki, A. (2010). PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression. *Anticancer Research*, 30(7), 2755–2767. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20683010/>
- Ito, T. K., Ishii, G., Saito, S., Yano, K., Hoshino, A., Suzuki, T., & Ochiai, A. (2009). Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood*, 113(10), 2363–2369. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-08-172742>
- Jain, R. K., Martin, J. D., & Stylianopoulos, T. (2014). The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 321–346. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071813-105259>
- Jiang, G., Shi, W., Fang, H., & Zhang, X. (2018). miR-27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7-dependent manner. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5417–5426. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9587>
- Jiang, X., Liu, F., Wang, Y., & Gao, J. (2019). Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells and acquisition of cancerstem cell phenotypes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 34(10), 1860–1868. <https://doi.org/10.1111/JGH.14692>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The*

Journal of Clinical Investigation, 119(6), 1420–1428.

<https://doi.org/10.1172/JCI39104>

Kanthan, R., Senger, J. L., & Kanthan, S. C. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathology Research International*, 2012.

<https://doi.org/10.1155/2012/597497>

Kato, Yasumasa, Lewalle, J.-M., Baba, Y., Tsukuda, M., Sakai, N., Baba, M., ... Hata, R.-I.

(2001a). Induction of SPARC by VEGF in Human Vascular Endothelial Cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 287(2), 422–426.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5622>

Kato, Yasumasa, Lewalle, J. M., Baba, Y., Tsukuda, M., Sakai, N., Baba, M., ... Hata, R. I.

(2001b). Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), 422–426.

<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.5622>

Kato, Yu, Kondo, S., Itakura, T., Tokunaga, M., Hatayama, S., Katayama, K., & Sugimoto, Y.

(2020). SNAIL- and SLUG-induced side population phenotype of HCT116 human colorectal cancer cells and its regulation by BET inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(1), 152–157.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.094>

Kaufmann, M., Muff, R., Born, W., & Fischer, J. A. (1994). Functional expression of a stably transfected parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein receptor complementary DNA in CHO cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 104(1), 21–

27. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90047-7)

Kemp, B. E., Moseley, J. M., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Wettenhall, R. E. H., Stapleton, D., ... John Martin, T. (1987). Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4833), 1568–1570.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3685995>

- Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *661*, 3–38. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1
- Keum, N. N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *16*(12), 713–732. <https://doi.org/10.1038/S41575-019-0189-8>
- Khaleghpour, K., Li, Y., Banville, D., Yu, Z., & Shen, S. H. (2004). Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, *25*(2), 241–248. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGG195>
- Kim, J. Y., Jeong, D., Ahn, T. S., Kim, H. J., Park, D. S., Park, S. Y., ... Baek, M. J. (2013). Expression of secreted protein acidic and rich in cysteine in the stroma of a colorectal carcinoma is associated with patient prognosis. *Annals of Coloproctology*, *29*(3), 93–99. <https://doi.org/10.3393/ac.2013.29.3.93>
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical Journal*, *437*(2), 169–183. <https://doi.org/10.1042/BJ20110301>
- Kong, D. H., Kim, M. R., Jang, J. H., Na, H. J., & Lee, S. (2017). A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS18081786>
- Kuga, T., Kume, H., Kawasaki, N., Sato, M., Adachi, J., Shiromizu, T., ... Tomonaga, T. (2013). A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I α and FAM83H in colorectal cancer. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 20), 4721–4731. <https://doi.org/10.1242/JCS.129684>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680A0>

- Lai, K., Killingsworth, M. C., & Lee, C. S. (2015). Gene of the month: PIK3CA. *Journal of Clinical Pathology*, *68*(4), 253–257. <https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2015-202885>
- Lee, K., Deeds, J. D., & Segre, G. V. (1995). Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*, *136*(2), 453–463. <https://doi.org/10.1210/ENDO.136.2.7835276>
- Lee, Y. S. (2006, June). MicroARN: pequeños pero potentes oncogenes o supresores de tumores - PubMed. Retrieved April 20, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16784027/>
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, *386*(6625), 623–627. <https://doi.org/10.1038/386623A0>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.12.035>
- Lezcano, V., Gentili, C., & de Boland, A. R. (2013). Role of PTHrP in human intestinal Caco-2 cell response to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 2834–2843. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.029>
- Lezcano, V., Gentili, C., & De Boland, A. R. (2013). Role of PTHrP in human intestinal Caco-2 cell response to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 2834–2843. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.029>
- Li, J., Karaplis, A. C., Huang, D. C., Siegel, P. M., Camirand, A., Yang, X. F., ... Kremer, R. (2011). PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(12), 4655–4669. <https://doi.org/10.1172/JCI46134>
- Li, K., Zhu, X., Chen, X., & Wang, X. (2020). MicroRNA-27a-3p promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting NOVA alternative splicing regulator 1

- in gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, 21(3), 1615–1622.
<https://doi.org/10.3892/MMR.2020.10949>
- Liang, J., Tang, J., Shi, H., Li, H., Zhen, T., Duan, J., ... Han, A. (2017). miR-27a-3p targeting RXR α promotes colorectal cancer progression by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget*, 8(47), 82991–83008. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19635>
- Liao, J., Li, X., Koh, A. J., Berry, J. E., Thudi, N., Rosol, T. J., ... McCauley, L. K. (2008). Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions. *International Journal of Cancer*, 123(10), 2267–2278.
<https://doi.org/10.1002/IJC.23602>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Loboda, A., Nebozhyn, M. V., Watters, J. W., Buser, C. A., Shaw, P. M., Huang, P. S., ... Yeatman, T. J. (2011). EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Medical Genomics*, 4. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-9>
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., ... Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10).
<https://doi.org/10.3390/CELLS8101118>
- Loizzi, V., del Vecchio, V., Gargano, G., de Liso, M., Kardashi, A., Naglieri, E., ... Cormio, G. (2017). Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS18091967>
- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., ... Moore, H. F. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*, 45(6), 580–585.
<https://doi.org/10.1038/NG.2653>

- López-Moncada, F., Torres, M., Castellón, E., & Contreras, H. R. (2019). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces epithelial-mesenchymal transition, enhancing migration and invasion, and is associated with high Gleason score in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 21(6), 557–564.
https://doi.org/10.4103/aja.aja_23_19
- Lotia, S., Montojo, J., Dong, Y., Bader, G. D., & Pico, A. R. (2013). Cytoscape app store. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(10), 1350–1351.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT138>
- Ma, J., Huang, W., Zhu, C., Sun, X., Zhang, Q., Zhang, L., ... Wang, C. (2021). miR-423-3p activates FAK signaling pathway to drive EMT process and tumor growth in lung adenocarcinoma through targeting CYBRD1. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(12). <https://doi.org/10.1002/JCLA.24044>
- Ma, J., Wang, P., Huang, L., Qiao, J., & Li, J. (2021). Bioinformatic analysis reveals an exosomal miRNA-mRNA network in colorectal cancer. *BMC Medical Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12920-021-00905-2>
- Maioli, E., & Fortino, V. (2004). The complexity of parathyroid hormone-related protein signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(3), 257–262.
<https://doi.org/10.1007/S00018-003-3233-2>
- Maishi, N., Annan, D. A., Kikuchi, H., Hida, Y., & Hida, K. (2019). Tumor Endothelial Heterogeneity in Cancer Progression. *Cancers*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/CANCERS11101511>
- Malakouti, S., Asadi, F. K., Kukreja, S. C., Abcarian, H. A., & Cintron, J. R. (1996, July). Parathyroid hormone-related protein expression in the human colon: Immunohistochemical evaluation. *American Surgeon*, Vol. 62, pp. 540–544. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8651548/>
- Mander, K. A., & Finnie, J. W. (2018, October 1). Tumour angiogenesis, anti-angiogenic

- therapy and chemotherapeutic resistance. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 96, pp. 371–378. <https://doi.org/10.1111/avj.12747>
- Mannstadt, M., Jüppner, H., & Gardella, T. J. (1999). Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *The American Journal of Physiology*, 277(5). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.1999.277.5.F665>
- Marconi, G. D., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Pierdomenico, S. D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomedea, F. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS10071587>
- María Belén Novoa, Pedro Carriere, Ariel Zwenger, Natalia Calvo, Graciela Gígola, Luis Gomez, C. G. (2022). Implication of Met and PTHrP in the modulation of the aggressive phenotype of cells derived from colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *En prensa*.
- Martin, T. J. and Atkins, D. (1979). Biochemical regulators of bone resorption and their importance in cancer. *Med Biochem Essays*, 4, 49–82.
- Martin, M. J. (2018). “MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ANÁLOGO TUMORAL DE LA HORMONA PARATIROIDEA (PTHrP) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO” (Universidad acioal del Sur). Retrieved from https://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/handle/123456789/4378/TESIS DOCTORAL_Julia Martin.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Martín, M. J., Calvo, N., De Boland, A. R., & Gentili, C. (2014). Molecular mechanisms associated with PTHrP-induced proliferation of colon cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(12), 2133–2145. <https://doi.org/10.1002/jcb.24890>
- Martín, M. J., Gígola, G., Zwenger, A., Carriquiriborde, M., Gentil, F., & Gentili, C. (2018). Potential therapeutic targets for growth arrest of colorectal cancer cells exposed to PTHrP. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 478, 32–44.

- <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.07.005>
- Martin, T. J. (2016). Parathyroid Hormone-Related Protein, Its Regulation of Cartilage and Bone Development, and Role in Treating Bone Diseases. *Physiological Reviews*, *96*(3), 831–871. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00031.2015>
- Matsumoto, K., & Ema, M. (2014). Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *Journal of Biochemistry*, *156*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/JB/MVU031>
- McCauley, L. K., & Martin, T. J. (2012). Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *27*(6), 1231–1239. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1617>
- Merico, D., Gfeller, D., & Bader, G. D. (2009). How to visually interpret biological data using networks. *Nature Biotechnology*, *27*(10), 921–924. <https://doi.org/10.1038/NBT.1567>
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K., & McDonald, D. M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American Journal of Pathology*, *160*(3), 985–1000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64920-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64920-6)
- Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11), a011254. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A011254>
- Muñoz-Vega, M., Massó, F., Páez, A., Carreón-Torres, E., Cabrera-Fuentes, H. A., Fragoso, J. M., ... Pérez-Méndez, Ó. (2018). Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids in Health and Disease*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/S12944-018-0695-7>
- Naito, T., Yuge, R., Kitadai, Y., Takigawa, H., Higashi, Y., Kuwai, T., ... Chayama, K. (2021).

- Mesenchymal stem cells induce tumor stroma formation and epithelial-mesenchymal transition through SPARC expression in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 45(6).
<https://doi.org/10.3892/OR.2021.8055>
- Negrini, M., Nicoloso, M. S., & Calin, G. A. (2009). MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 470–479.
<https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.002>
- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 631–643.
<https://doi.org/10.1083/JCB.147.3.631>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Niland, S., Riscanevo, A. X., & Eble, J. A. (2021). Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS23010146>
- Nishihara, M., Ito, M., Tomioka, T., Ohtsuru, A., Taguchi, T., & Kanematsu, T. (1999). Clinicopathological implications of parathyroid hormone-related protein in human colorectal tumours. *Journal of Pathology*, 187(2), 217–222.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199901\)187:2<217::AID-PATH210>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:2<217::AID-PATH210>3.0.CO;2-0)
- Nishihara, M., Kanematsu, T., Taguchi, T., & Razzaque, M. S. (2007). PTHrP and tumorigenesis: Is there a role in prognosis? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1117, 385–392. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.046>
- Nusinow, D. P., Szpyt, J., Ghandi, M., Rose, C. M., McDonald, E. R., Kalocsay, M., ... Gygi, S. P. (2020). Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell*, 180(2), 387-402.e16. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.12.023>

- Ongkeko, W. M., Burton, D., Kiang, A., Abhold, E., Kuo, S. Z., Rahimy, E., ... Deftos, L. J. (2014). Parathyroid Hormone Related-Protein Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer. *PLoS ONE*, *9*(1), e85803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085803>
- Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, *9*(6), 667–676. <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000045801.15585.DD>
- Pan, G., Liu, Y., Shang, L., Zhou, F., & Yang, S. (2021). EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. *Cancer Communications (London, England)*, *41*(3), 199–217. <https://doi.org/10.1002/CAC2.12138>
- Pandurangan, A. K. (2013). Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *14*(4), 2201–2205. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.4.2201>
- Park, S. I., Lee, C., David Sadler, W., Koh, A. J., Jones, J., Seo, J. W., ... McCauley, L. K. (2013). Parathyroid hormone-related protein drives a CD11b+Gr1+ cell-mediated positive feedback loop to support prostate cancer growth. *Cancer Research*, *73*(22), 6574–6583. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4692>
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., & Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*, *139*(1), 112–122. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.06.044>
- Patenaude, A., Parker, J., & Karsan, A. (2010). Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. *Microvascular Research*, *79*(3), 217–223. <https://doi.org/10.1016/J.MVR.2010.01.007>
- Patil, A. R., Leung, M. Y., & Roy, S. (2021). Identification of Hub Genes in Different Stages of Colorectal Cancer through an Integrated Bioinformatics Approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(11).

<https://doi.org/10.3390/IJERPH18115564>

- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews. Cancer*, 7(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/NRC2131>
- Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5–6), 365–375. <https://doi.org/10.1387/IJDB.041794HP>
- Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E., & Llera, A. S. (2008, December). The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol. 27, pp. 691–705. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9146-7>
- Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., ... Gespach, C. (1995). Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *International Journal of Cancer*, 64(1), 70–75. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910640114>
- Porter, P. L., Sage, E. H., Lane, T. F., Funk, S. E., & Gown, A. M. (1995). Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 43(8), 791–800. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622842>
- Powell, G., J, S., JA, D., RG, S., JA, H., MA, H., ... TJ, M. (1991). Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Research*, 51(11), 3059–3061. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2032246/>
- Prigozhina, N. L., Heisel, A., Wei, K., Noberini, R., Hunter, E. A., Calzolari, D., ... Price, J. H. (2011). Characterization of a novel angiogenic model based on stable, fluorescently labeled endothelial cell lines amenable to scale-up for high content screening.

Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization, 103(10), 467. <https://doi.org/10.1042/BC20100146>

- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., ... Alvarez-Sánchez, M. E. (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01370>
- Rajput, A., Dominguez San Martin, I., Rose, R., Beko, A., LeVea, C., Sharratt, E., ... Wang, J. (2008). Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *The Journal of Surgical Research*, 147(2), 276–281. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2007.04.021>
- Ratcliffe, W. A., Abbas, S. K., & Care, A. D. (1993). Clearance of exogenous parathyroid hormone-related protein in pregnant, non-pregnant and fetal sheep, goats and pigs. *The Journal of Endocrinology*, 138(3), 459–465. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1380459>
- Rawal, P., Siddiqui, H., Hassan, M., Choudhary, M. C., Tripathi, D. M., Nain, V., ... Kaur, S. (2019). Endothelial Cell-Derived TGF- β Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via CD133 in HBx-Infected Hepatoma Cells. *Frontiers in Oncology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00308>
- Rawson, J. B., & Bapat, B. (2012). Epigenetic biomarkers in colorectal cancer diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12(5), 499–509. <https://doi.org/10.1586/ERM.12.39>
- Recherches sur le traitement du cancer, par la compression methodique simple ou combinee, sur l’histoire generale de la meme maladie. von Récamier was the first to recognize the process of metastasis - Recamier, Joseph C. A.: (1829) | Antiquariat Cassel & Lampe Gbr. (n.d.). Retrieved February 1, 2022, from <https://www.zvab.com/erstausgabe/Recherches-traitement-cancer-compression->

methodique-simple/30794663993/bd

- Remak, R. (1854). *Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Krebshaften geschwulste* (Vol. 6).
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(12), 858–870.
<https://doi.org/10.1038/NRC3628>
- Rian, E., Jemtland, R., Olstad, O. K., Endresen, M. J., Grasser, W. A., Thiede, M. A., ... Gautvik, K. M. (1994). Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: a possible role in angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *198*(2), 740–747.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.1994.1107>
- Ribatti, D., Mangialardi, G., & Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clinical and Experimental Medicine*, *6*(4), 145–149. <https://doi.org/10.1007/S10238-006-0117-4>
- Robinson, B. D., Sica, G. L., Liu, Y. F., Rohan, T. E., Gertler, F. B., Condeelis, J. S., & Jones, J. G. (2009). Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(7), 2433–2441. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2179>
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., Lonigro, R. J., Vats, P., Cobain, E., Everett, J., ... Chinnaiyan, A. M. (2017). Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*, *548*(7667), 297–303. <https://doi.org/10.1038/NATURE23306>
- Rokavec, M., Bouznad, N., & Hermeking, H. (2019). Paracrine Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition Between Colorectal Cancer Cells and its Suppression by a p53/miR-192/215/NID1 Axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *7*(4), 783. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2019.02.003>

- Ronca, R., Benkheil, M., Mitola, S., Struyf, S., & Liekens, S. (2017). Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Medicinal Research Reviews*, *37*(6), 1231–1274. <https://doi.org/10.1002/MED.21452>
- Sánchez-Gundín, J., Fernández-Carballido, A. M., Martínez-Valdivieso, L., Barreda-Hernández, D., & Torres-Suárez, A. I. (2018). New Trends in the Therapeutic Approach to Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(7), 659–665. <https://doi.org/10.7150/IJMS.24453>
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(4), 2435–2444. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2435>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2019>
- Schlüter, K. D. (1999). PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, *14*(6), 243–248. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLOGYONLINE.1999.14.6.243>
- Seger, R; Krebs, E. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, *9*, 726–735.
- Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006098>
- Shen, C. Q., Yan, T. T., Chen, H. Y., Fang, J. Y., & Hong, J. (2016). Expression of SPARC in colorectal cancer and mechanisms of its effects on cancer cell invasion. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, *36*(8), 1127–1134. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1674-8115.2016.08.004>
- Sherwood, L. M., Parris, E. E., & Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic

- implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186.
<https://doi.org/10.1056/NEJM1971111182852108>
- Shimo, T., Kubota, S., Yoshioka, N., Ibaragi, S., Isowa, S., Eguchi, T., ... Takigawa, M. (2006). Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(7), 1045–1059.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.060416>
- Shirafkan, N., Mansoori, B., Mohammadi, A., Shomali, N., Ghasbi, M., & Baradaran, B. (2018). MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: New outlooks. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 97, 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.11.046>
- Shtivelband, M. I., Juneja, H. S., Lee, S., & Wu, K. K. (2003). Aspirin and salicylate inhibit colon cancer medium- and VEGF-induced endothelial tube formation: correlation with suppression of cyclooxygenase-2 expression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 1(10), 2225–2233. <https://doi.org/10.1046/J.1538-7836.2003.00446.X>
- Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., & Settleman, J. (2009). A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*, 15(6), 489–500.
<https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.03.022>
- Sipos, F., & Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World Journal of Gastroenterology*, 18(7), 601–608.
<https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I7.601>
- Skrok, A., Bednarczyk, T., Skwarek, A., Popow, M., Rudnicka, L., & Olszewska, M. (2015). The effect of parathyroid hormones on hair follicle physiology: implications for treatment of chemotherapy-induced alopecia. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(4), 213–225. <https://doi.org/10.1159/000375319>

- Snedecor, G. W., & Cochran, W. G. (1989). No Title. In *Statistical Methods (8th ed.)*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Soki, F. N., Park, S. I., & McCauley, L. K. (2012, July). The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncology*, Vol. 8, pp. 803–817.
<https://doi.org/10.2217/fon.12.76>
- Sourbier, C., & Massfelder, T. (2006, August 28). Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Letters*, Vol. 240, pp. 170–182.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.020>
- Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular BioSystems*, 4(8), 835–850. <https://doi.org/10.1039/B719215K>
- Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., & Brabletz, T. (2019). Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature Cell Biology*, 21(1), 102–112.
<https://doi.org/10.1038/S41556-018-0196-Y>
- Sun, L., Li, H., Luo, H., & Zhao, Y. (2014). Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *BioMed Research International*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/206929>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., ... von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1074>
- Tamura, R., Tanaka, T., Akasaki, Y., Murayama, Y., Yoshida, K., & Sasaki, H. (2019). The role

- of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/S12032-019-1329-2>
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ430>
- Thanki, K., Nicholls, M. E., Gajjar, A., Senagore, A. J., Qiu, S., Szabo, C., ... Chao, C. (2017). Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *International Biological and Biomedical Journal*, 3(3), 105–111. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28825047/>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Tichet, M., Prodhomme, V., Fenouille, N., Ambrosetti, D., Mallavialle, A., Cerezo, M., ... Tartare-Deckert, S. (2015). Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS7993>
- Tiwari, A., Mukherjee, B., & Dixit, M. (2018). MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 18(3), 266–277. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170630142725>
- Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W. J., Khoo, K., Wong, W. C., ... Abastado, J. P. (2011). Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biology*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001162>
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 19(1A), A68–A77. <https://doi.org/10.5114/WO.2014.47136>

- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 145–149. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1422008/>
- Tse, J. C., & Kalluri, R. (2007). Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 816–829. <https://doi.org/10.1002/JCB.21215>
- Tsoumas, D., Nikou, S., Giannopoulou, E., Tsaniras, S. C., Sirinian, C., Maroulis, I., ... Bravou, V. (2018). ILK expression in colorectal cancer is associated with EMT, cancer stem cell markers and chemoresistance. *Cancer Genomics and Proteomics*, 15(2), 127–141. <https://doi.org/10.21873/cgp.20071>
- Usdin, T. B., Wang, T., Hoare, S. R. J., Mezey, É., & Palkovits, M. (2000). New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(4), 349–383. <https://doi.org/10.1006/FRNE.2000.0203>
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., ... Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2010.03.016>
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(3), 195–203. <https://doi.org/10.1038/NRM3290>
- Vasaikar, S. V., Deshmukh, A. P., den Hollander, P., Addanki, S., Kuburich, N. A., Kudaravalli, S., ... Mani, S. A. (2021). EMTome: a resource for pan-cancer analysis of epithelial-mesenchymal transition genes and signatures. *British Journal of Cancer*,

124(1), 259–269. <https://doi.org/10.1038/S41416-020-01178-9>

Viallard, C., & Larrivée, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, *20*(4), 409–426.

<https://doi.org/10.1007/S10456-017-9562-9>

Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/CANCERS9120171>

Vychytilova-Faltejskova, P., Radova, L., Sachlova, M., Kosarova, Z., Slaba, K., Fabian, P., ... Slaby, O. (2016). Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer. *Carcinogenesis*, *37*(10), 941–950.

<https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGW078>

Watson, P. H., Fraher, L. J., Hendy, G. N., Chung, U. I., Kisiel, M., Natale, B. V., & Hodsman, A. B. (2000). Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *Journal of Bone and Mineral Research*, *15*(6), 1033–1044.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.6.1033>

Wei, C., Yang, C., Wang, S., Shi, D., Zhang, C., Lin, X., ... Xiong, B. (2019). Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Molecular Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0976-4>

Wiese, A. H., Auer, J., Lassmann, S., Nährig, J., Rosenberg, R., Höfler, H., ... Werner, M. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detection and Prevention*, *31*(4), 282–295. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2007.07.003>

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 228–234. <https://doi.org/10.1038/NCB0309-228>

WRANA, J. L., OVERALL, C. M., & SODEK, J. (1991). Regulation of the expression of a

secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor β . *European Journal of Biochemistry*, 197(2), 519–528.

<https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1991.TB15940.X>

Wysolmerski, J. J. (2012, September). Parathyroid hormone-related protein: An update. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 97, pp. 2947–2956.

<https://doi.org/10.1210/jc.2012-2142>

Xie, Z., Bailey, A., Kuleshov, M. V., Clarke, D. J. B., Evangelista, J. E., Jenkins, S. L., ...

Ma'ayan, A. (2021). Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols*, 1(3). <https://doi.org/10.1002/CPZ1.90>

Xu, J., Yi, Y., Li, L., Zhang, W., & Wang, J. (2015). Osteopontin induces vascular endothelial growth factor expression in articular cartilage through PI3K/AKT and ERK1/2 signaling. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4708–4712.

<https://doi.org/10.3892/MMR.2015.3975>

Yan, X., Yan, L., Liu, S., Shan, Z., Tian, Y., & Jin, Z. (2015). N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2999–3006. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.3687>

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0237-9>

Yao, Z., Yoon, S., Kalie, E., Raviv, Z., & Seger, R. (2010). Calcium regulation of EGF-induced ERK5 activation: role of Lad1-MEKK2 interaction. *PloS One*, 5(9), 1–10.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0012627>

Yeh, Y. W., Cheng, C. C., Yang, S. T., Tseng, C. F., Chang, T. Y., Tsai, S. Y., ... Su, J. L. (2017). Targeting the VEGF-C/VEGFR3 axis suppresses Slug-mediated cancer metastasis and stemness via inhibition of KRAS/YAP1 signaling. *Oncotarget*, 8(3), 5603–5618.

<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13629>

- Yekkala, K., & Baudino, T. A. (2007). Inhibition of intestinal polyposis with reduced angiogenesis in ApcMin/+ mice due to decreases in c-Myc expression. *Molecular Cancer Research : MCR*, 5(12), 1296–1303. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0232>
- Yoshimura, T., Nagahara, M., Kuo, C., Turner, R. R., Soon-Shiong, P., & Hoon, D. S. B. (2011). Lymphovascular invasion of colorectal cancer is correlated to SPARC expression in the tumor stromal microenvironment. *Epigenetics*, 6(8), 1001–1011. <https://doi.org/10.4161/epi.6.8.16063>
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.245>
- Yun, J. A., Kim, S. H., Hong, H. K., Yun, S. H., Kim, H. C., Chun, H. K., ... Lee, W. Y. (2014). Loss of E-Cadherin expression is associated with a poor prognosis in stage III colorectal cancer. *Oncology*, 86(5–6), 318–328. <https://doi.org/10.1159/000360794>
- Zhang, H., Gao, Y., Wang, Y., Yan, Y., Yang, Z., Miao, D., & Zhang, D. (2019). The effects of parathyroid hormone-related peptide on cardiac angiogenesis, apoptosis, and function in mice with myocardial infarction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14745–14755. <https://doi.org/10.1002/JCB.28735>
- Zhang, J., Cao, Z., Yang, G., You, L., Zhang, T., & Zhao, Y. (2019). MicroRNA-27a (miR-27a) in Solid Tumors: A Review Based on Mechanisms and Clinical Observations. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00893>
- Zhang, W., Xu, J., Fang, H., Tang, L., Chen, W., Sun, Q., ... Guan, X. (2018). Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis via PAI-1 and CCL5 signaling. *The FASEB Journal*, 32(1), 276–288. <https://doi.org/10.1096/FJ.201700237RR>
- Zhang, Z., Dong, Z., Lauxen, I. S., Filho, M. S. A., & Nör, J. E. (2014). Endothelial cell-

secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype. *Cancer Research*, 74(10), 2869–2881. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2032>

Zhou, H., Huang, T., Xiong, Y., Peng, L., Wang, R., & Jun Zhang, G. (2018). The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine*, 97(50). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013752>

Zhou, S., Yang, J., Wang, M., Zheng, D., & Liu, Y. (2020). Endoplasmic reticulum stress regulates epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 21(1), 173–180. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10814>

Zhu, D., Sun, Y., Zhang, D., Dong, M., Jiang, G., Zhang, X., & Zhou, J. (2018). miR-1 inhibits the progression of colon cancer by regulating the expression of vascular endothelial growth factor. *Oncology Reports*, 40(2), 589–598. <https://doi.org/10.3892/OR.2018.6463>