



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA



FACULTAD DE CIENCIAS



Licenciatura en Biología Humana

**POLI-ADP-RIBOSILACIÓN EN LA
TRANSICIÓN DE EPITELIO A MESÉNQUIMA**

MICHELLE SCHACKE

Orientadora: Dra. Laura Lafon-Hughes

Co-orientador: Dr. Gustavo Folle

Montevideo

2018

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título

POLI-ADP-RIBOSILACIÓN EN LA TRANSICIÓN DE EPITELIO A MESÉNQUIMA

Autor/s: Michelle Schacke

Orientadora: Dra. Laura Lafon-Hughes

Co-orientador: Dr. Gustavo Folle

Carrera: Licenciatura en Biología Humana

Puntaje
.....

Tribunal

Profesor.....
(Nombre y firma)

Profesor.....
(Nombre y firma)

Profesor.....
(Nombre y firma)

Fecha

Agradecimientos

Agradezco a todos mis compañeros del Departamento de Genética del IIBCE por su compañía diaria y el apoyo en esta etapa final de la carrera. En especial agradezco a mi tutora, Laura, por su apoyo, no solamente en el ámbito académico, ya que me ha ayudado a tomar decisiones personales importantes. A Pablo y Valentina, mis compañeros del PAIE, por el apoyo recibido y por mantener la buena energía en momentos de estrés de hacer muchos experimentos del PAIE, de esta pasantía y del doctorado de Pablo al mismo tiempo. Agradezco a los integrantes de la Comisión Curricular de la LBH por la paciencia que tuvieron para contestar las millones de consultas que enviamos por correo electrónico. A mi padre, Martin, y mi pareja, David, por el apoyo incondicional en momentos complicados y por compartir la alegría de los pequeños logros durante la carrera. Finalmente agradezco a mi madre, Monika, por ser mi inspiración para trabajar en ésta temática de la biología.

Índice de Contenidos

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IV
RESUMEN	VI
PALABRAS CLAVE.....	VIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN.....	11
FENOTIPO EPITELIAL.....	11
TRANSICIÓN DE EPITELIO A MESÉNQUIMA (TEM)	15
<i>Marcadores moleculares de TEM.....</i>	<i>16</i>
<i>Modificaciones en el citoesqueleto de actina.....</i>	<i>18</i>
<i>Factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF-β).....</i>	<i>18</i>
POLI-ADP-RIBOSILACIÓN	22
<i>Poli-ADP-ribosil polimerasas (PARPs)</i>	<i>22</i>
<i>Inhibidores de PARPs (iPARPs).....</i>	<i>25</i>
<i>PARilación y TEM.....</i>	<i>26</i>
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	26
HIPÓTESIS.....	29

OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
<i>Cultivo de células.....</i>	30
<i>Siembra de células y tratamientos con TGF-β1 y Olaparib</i>	30
<i>Inmunocitofluorescencia (ICF).....</i>	32
<i>Microscopía Confocal</i>	34
<i>Análisis de imágenes y procesamiento de datos.....</i>	35
RESULTADOS	37
LAS CÉLULAS NMUMG PRESENTARON UN CINTURÓN DE PAR.....	37
LAS CÉLULAS NMUMG EXPERIMENTARON MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES DURANTE LA TEM	38
OLAPARIB PREVINO LA TEM INDUCIDA POR TGF-B EN CÉLULAS NMUMG....	42
OLAPARIB REVIRTIÓ AL MENOS PARCIALMENTE LA TEM INDUCIDA POR TGF-B EN CÉLULAS NMUMG	46
DISCUSIÓN	54
ANEXO A.....	62
FENOTIPO ALTERADO DE LAS CÉLULAS NMUMG (PASAJES 6-9) EN CONDICIONES CONTROL.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Resumen

Antecedentes. La Transición de Epitelio a Mesénquima (TEM) o transdiferenciación de células epiteliales a células mesenquimales ocurre en contextos fisiológicos o patológicos, incluido el cáncer. Implica la pérdida del cinturón de adhesión epitelial y modificaciones del citoesqueleto; disminución de E-cadherina y aumento de vimentina; aumento de la capacidad migratoria y de la quimio-resistencia. La poli-ADP-ribosa (PAR) es un polímero sintetizado por poli-ADP-ribosil polimerasas (PARPs). PAR nuclear modula la estructura de la cromatina, la expresión génica y la reparación del ADN. PAR citoplásmica está menos estudiada. El inhibidor de PARP-1/2, Olaparib, es utilizado como terapia anti-cáncer de acuerdo a un *rationale* centrado en la reparación del ADN.

Hipótesis. Las células NMuMG (mama murina) tendrían PAR asociada al cinturón de adhesión epitelial. Durante la TEM inducida por el factor de crecimiento tumoral beta-1(TGF- β), ocurrirían cambios de PAR nuclear, citoplásmica y del cinturón. El Olaparib afectaría la TEM en su conjunto.

Objetivos: (i) determinar si las células NMuMG poseen el cinturón de PAR y si se desensambla durante la TEM; (ii) evidenciar si durante la TEM existen modificaciones de PAR nuclear y citoplásmica; (iii) cuantificar los cambios que ocurren durante la TEM, tanto a nivel molecular (expresión y distribución de determinados marcadores) como a nivel

morfológico (anisotropía); (iv) evaluar si Olaparib previene o revierte la TEM.

Metodología. Se utilizó inmunocitofluorescencia, microscopía confocal y técnicas de análisis de imagen.

Resultados y discusión. Las células NMuMG presentaron un cinturón de PAR que se desensambló durante la TEM inducida por TGF- β . A pesar de la alta variabilidad observada, PAR nuclear y citoplásmica aumentó durante la TEM. Olaparib previno la TEM y también la revirtió al menos parcialmente, sugiriendo que Olaparib afecta no sólo los mecanismos de reparación del ADN en los cuales se basa el *rationale* actual para utilizarlo en terapias de letalidad sintética, sino además la propia TEM.

Descripción de una situación no prevista (Anexo A) La profundización de este estudio está actualmente detenida debido a cambios observados en la línea celular NMuMG. Las células no tratadas, en pasaje 6-12, están mostrando características híbridas, con uniones intercelulares en cremallera, alta expresión de Vimentina, presencia de daño genético, evidenciado por γ -H2AX y PAR nuclear. Nuestros datos sugieren que el TGF- β presente en exosomas de suero fetal bovino utilizado para cultivar las células, puede haber sido al menos parcialmente responsable de las alteraciones observadas.

Palabras clave

transición de epitelio a mesénquima; cáncer; poli-ADP-ribosilación; PARP; Olaparib; poli-ADP-ribosa; cinturón de adhesión; factor de crecimiento tumoral beta1

Índice de Abreviaturas

BSA: seroalbúmina bovina

E-cad: E-cadherina

F-actina: Actina filamentosa

FBSf: Suero Fetal Bovino filtrado

ICF: inmunocitofluorescencia

iPARP: Inhibidor de Poli-ADP-ribosil Polimerasa

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

Nam: Nicotinamida

OLA: Olaparib

PAR: Poli-ADP-ribosa

PARG: Poli-ADP-ribosil Glicohidrolasa

PARP: Poli-ADP-ribosil Polimerasa

PBSf: buffer fosfato salino filtrado

PFAf: paraformaldehído filtrado

TEM: Transición de epitelio de mesénquima

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β

TBR I/II/III: receptor de TGF- β de tipo I, II o III

TME: Transición de mesénquima a epitelio

TNKS: Tankyrasa

UCF: medio de cultivo complementado con suero fetal bovino,
ultracentrifugado

Vcl: Vinculina

Vim: Vimentina

β -cat: β -catenina

Introducción

Fenotipo Epitelial

El tejido epitelial reviste las cavidades y conductos del cuerpo, forma glándulas y está presente en la piel. Este tipo de tejido funciona como una barrera selectiva entre las cavidades o el exterior del organismo y el tejido conjuntivo subyacente. Las células que lo constituyen presentan una polaridad ápico-basal. La cara apical, opuesta a la basal, se dirige hacia la luz del órgano o conducto, o hacia el exterior en el caso de la piel. La cara basal está adherida a la membrana basal. Las caras laterales se caracterizan por la presencia de uniones intercelulares específicas. (Alberts, 4ta Ed.; Geneser, 1a Ed.).

Las moléculas de adhesión celular son proteínas transmembrana que permiten a las células formar uniones con la membrana basal y con las células vecinas (Figura 1) (Alberts, 4ta Ed.).

Las uniones con la membrana basal, cuyo principal componente es integrina, son contactos focales y hemidesmosomas. Constituyen por su lado intracelular puntos de anclaje al citoesqueleto de actina y a filamentos intermedios, respectivamente (Alberts, 4ta Ed.).

Existen cuatro tipos de uniones intercelulares que se distinguen por su localización en el eje ápico-basal de la cara lateral de la célula, las proteínas que las conforman y su función. Desde apical a basal son uniones ocluyentes, uniones adherentes, desmosomas y uniones comunicantes (Alberts, 4ta Ed.).

Las uniones adherentes del epitelio forman el denominado cinturón de adhesión o *zonula adherens*, permitiendo la adhesión entre células vecinas vinculando sus citoesqueletos de actina a través de proteínas asociadas (Figura 2). Esto provee al tejido resistencia al estrés mecánico (tensión). Las proteínas centrales de las uniones adherentes son las cadherinas, proteínas transmembrana que forman homodímeros con las moléculas provenientes de células contiguas de manera calcio-dependiente. En el desarrollo embrionario tienen un importante rol en la clasificación celular durante la formación de los tejidos, precisamente porque sólo pueden unirse entre sí las células que expresen la misma cadherina. Proteínas como β -catenina y α -catenina se unen a la E-cadherina por su cara intracelular y participan directa o indirectamente en el anclaje del citoesqueleto de actina. La actina cortical en células epiteliales se dispone como un anillo paralelo al cinturón de adhesión. Una proteína que participa en el anclaje del citoesqueleto de actina tanto en los contactos focales como en las uniones adherentes, es la vinculina (Alberts, 4ta Ed).

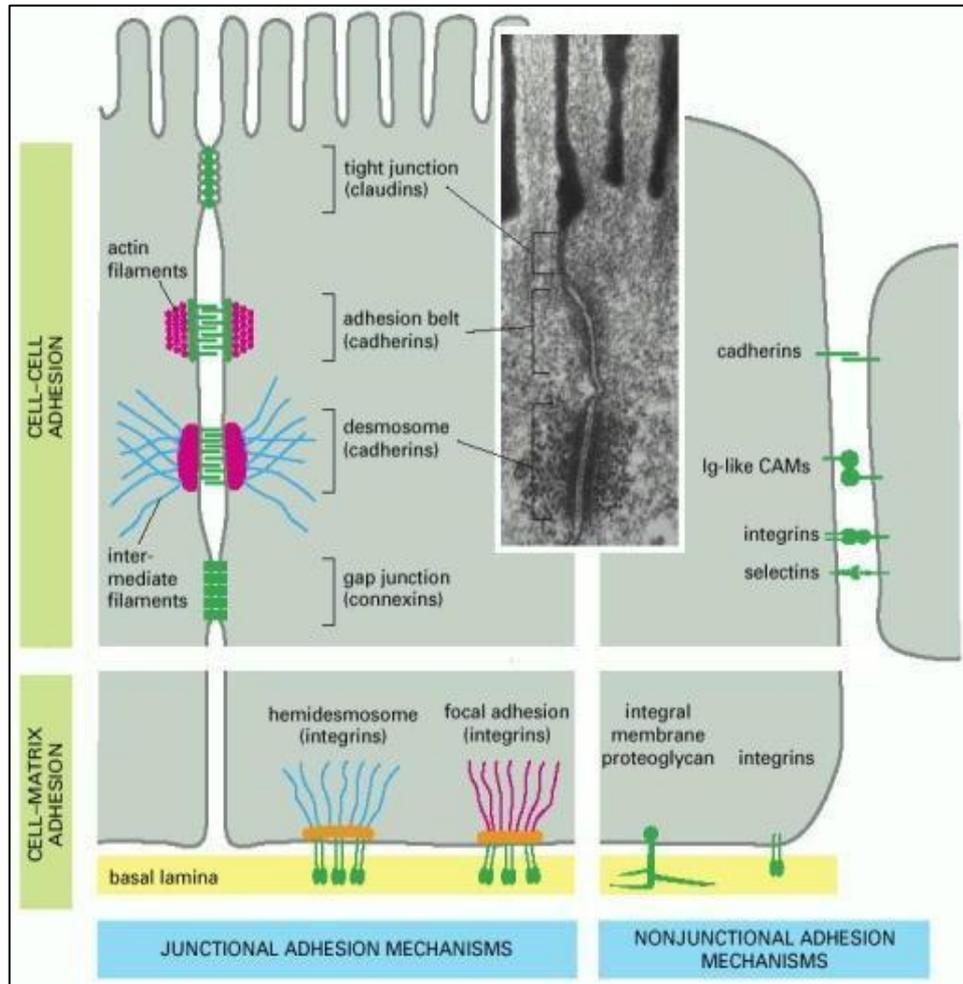


Figura 1. Tipos de uniones celulares en tejidos epiteliales. Uniones intercelulares: ocluyentes, adherentes, desmosomas y comunicantes. Uniones célula-matriz extracelular: hemidesmosomas y contactos focales. Extraído de Alberts, 4ta Ed. (2002).

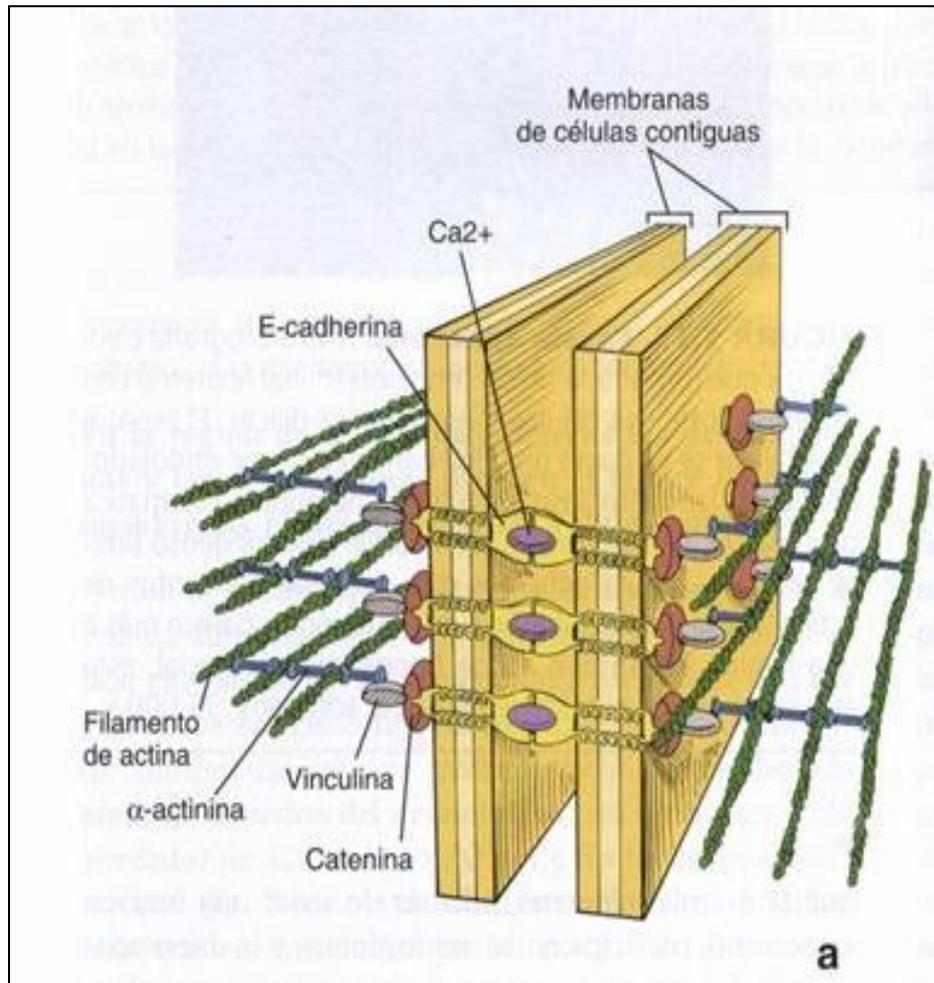


Figura 2. Estructura de una unión adherente. Las cadherinas de células vecinas se unen entre sí formando homodímeros de manera calcio-dependiente. Del lado intracelular, moléculas accesorias como α - y β - catenina, vinculina y α -actinina permiten el anclaje del citoesqueleto de actina, y en particular de la actina cortical. Extraído de Ross & Pawlina, 5ta Ed. (2007).

Transición de Epitelio a Mesénquima (TEM)

La transición de epitelio a mesénquima (TEM) es un proceso mediante el cual las células epiteliales sufren cambios bioquímicos y morfológicos, adoptando un fenotipo mesenquimal.

La TEM puede ocurrir en distintos contextos biológicos, pero existe una base bioquímica y genética común. En el año 2008 se propuso clasificar la TEM en tres tipos, según el contexto biológico en el que ocurría. Las TEM de tipo I ocurren en implantación del ovocito, formación del embrión y organogénesis del desarrollo embrionario. Puede dar origen a diversos tipos celulares y células mesenquimales capaces de sufrir una reversión del proceso (TME), de manera que pueden originar epitelios secundarios. Las TEM de tipo II están asociadas a la reparación y regeneración de tejidos. Se generan fibroblastos y otros tipos celulares para reparar los tejidos dañados. Este tipo de TEM culmina una vez que la inflamación del tejido disminuye. Las TEM de tipo III ocurren en contextos patológicos. Dan origen a fibrosis y constituyen un paso en la generación de cánceres de origen epitelial o carcinomas. Los carcinomas se caracterizan por las altas tasas de proliferación celular y la angiogénesis. En etapas tempranas del desarrollo de carcinomas las células pueden migrar a través de la membrana basal, y a medida que el proceso transcurre su capacidad invasiva aumenta, permitiendo su diseminación sanguínea o

linfática, también conocido como metástasis (Gilbert, 9a Ed.; Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009).

Durante la TEM las células epiteliales pierden su polaridad ápico-basal, las uniones intercelulares adherentes y oclusivas se rompen y se reorganiza el citoesqueleto (Lamouille et.al., 2014; Gonzalez & Medici, 2015). Esto lleva a un aumento de la capacidad migratoria e invasiva, así como de la resistencia a la apoptosis y senescencia, y pérdida de la sensibilidad a la inhibición por contacto (Cooper, 2000). La transición se considera completa una vez que la membrana basal del epitelio ha sido degradada y las células son libres para migrar a otros tejidos (Kalluri & Weinberg, 2009; Pengfei et. al., 2011). La TEM se considera una transición, ya que la alta plasticidad celular permite que sea potencialmente reversible (Hölzel et. al., 2012).

Marcadores moleculares de TEM

Durante la TEM disminuye la expresión de marcadores moleculares epiteliales, y aumenta la de los mesenquimales (Figura 3). Disminuye la expresión de E-cadherina, ZO-1 y Ocludina (González & Medici, 2015). Aumenta la expresión de β -catenina, y se transloca al núcleo (Brabletz et. al., 1998; Mao et. al., 2013). Aumenta la expresión de Vimentina, una proteína de los filamentos intermedios (Liu et. al., 2015). Se expresan los factores de transcripción Snail y Slug, reguladores negativos de la

expresión de proteínas supresoras de tumores, como E-cadherina (Pecina-Slaus, 2003; Zeisberg & Neilson, 2009; Yu et. al., 2010; Lamouille et. al., 2014). Asimismo, Snail y Slug son capaces de generar un mecanismo de retroalimentación positiva, aumentando la expresión de proteínas de la vía de TGF- β 1 (Dhasarathy et. al., 2011).

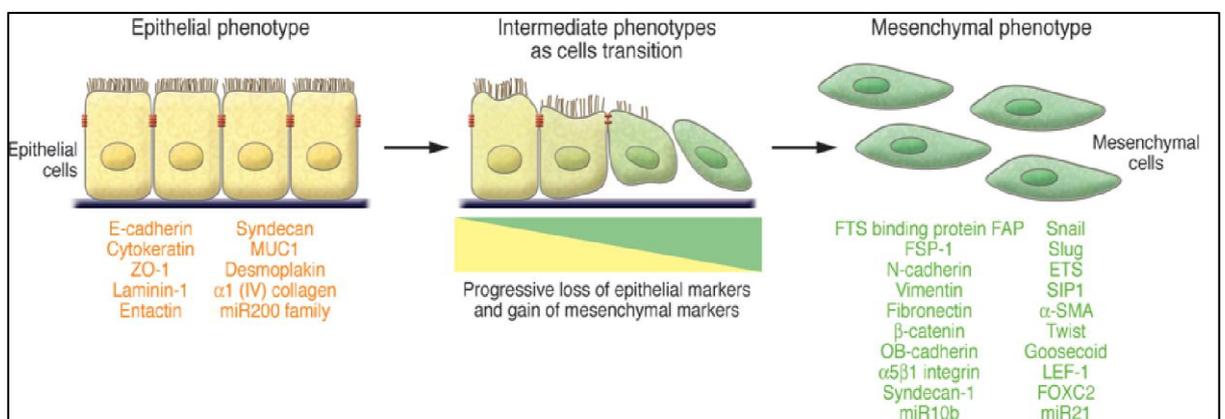


Figura 3. La Transición de epitelio a mesénquima. En amarillo se muestra el fenotipo epitelial junto a un listado de sus marcadores moleculares clásicos. Durante la transición de epitelio a mesénquima se pierden los marcadores epiteliales, la morfología y polaridad de las células, adquiriendo un fenotipo mesenquimal, mostrado en verde, y se adquieren los marcadores moleculares listados en la imagen. Abreviaturas: ZO-1: *zona occludens* 1; MUC: mucina 1; miRNA200: microRNA 200; SIP1: *survival of motor neuron protein interacting protein*; FOXC2: *forkhead box* 2. Extraído de Kalluri & Weinberg (2009).

Modificaciones en el citoesqueleto de actina

Las fibras del citoesqueleto de actina son polímeros dinámicos y versátiles que participan en la determinación de la polaridad celular, la distribución de los organelos y la generación de fuerzas contráctiles y movilidad celular (Hall, 2009).

Es característico del fenotipo mesenquimal, un aumento de expresión de actina filamentosa (F-actina) y la formación de gruesas fibras de estrés (Haynes et al., 2011).

Anisotropía de F-actina. Según la Real Academia Española la anisotropía (opuesto a isotropía) se define como la cualidad de un cuerpo o sustancia que hace que sus propiedades físicas varíen según la dirección en que se midan. Esto implica que es posible cuantificar la orientación y el grado de alineamiento de estructuras fibrilares, como la F-actina durante la TEM.

Factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β)

El factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) es una citoquina de la cual existen 3 isoformas (TGF- β 1, 2 y 3), cada una de las cuales es esencial para el desarrollo. Se sintetiza como un propéptido. En el retículo endoplásmico, se une por enlaces disulfuro a una proteína latente de unión a TGF- β (LTBP). En el complejo de Golgi ocurre un clivaje del propéptido, dando lugar a un homodímero de TGF- β y los respectivos

péptidos asociados a latencia (LAP). TGF- β , LAP y LTBP forman un complejo que se secreta y permanece en la matriz extracelular. TGF- β permanece en estado latente, biológicamente no disponible, hasta su liberación por acción de diversos estímulos como pueden ser proteasas (Krstic & Santibañez, 2014), especies reactivas del oxígeno (Rhyu et. al., 2005) o modificaciones mecánicas (Maeda et. al., 2012). Al liberarse, TGF- β impacta sobre el dominio extracelular de receptores de tipo I y II (TBR I, II), así como en co-receptores tipo III (TBR III; ubicuo tipo β -glicanos o de expresión restringida tipo endoglinas) o CD109 (Bizet et al., 2011; Santibañez et al., 2011).

Los receptores de tipo I y II (TBR I y II) son bien conocidos como serina/treonina quinasas pero también presentan actividad tirosina-quinasa. TGF- β promueve la formación de un complejo hetero-tetramérico (2 TBR I y 2 TBR II). TBR II activa TBR I.

TGF- β 1 es un inductor de la TEM (Miettinen et al., 1994; Bhowmick et al., 2001; Maeda et al., 2004; Kalluri & Weinberg, 2009; Wendt et al., 2012; Mahdi et al., 2015; Zhang, 2016). En este trabajo nos centraremos en la isoforma 1 (que por simplicidad abreviaremos TGF- β).

En la vía canónica de señalización (Figura 4, izquierda), que ocurre asociada a endocitosis receptor-mediada en vesículas recubiertas de clatrina, TBR I fosforila Smad2 y Smad3. Éstas se disocian del dominio de anclaje a membranas, se unen a Smad4, y el complejo de Smads se

transloca al núcleo, donde regula la expresión de sus genes blanco (Taylor et al., 2010). Por ejemplo, aumenta la expresión de SNAI1/2 (también conocidos como Snail y Slug) (Aomatsu et al., 2011), que a su vez bloquea la expresión de marcadores epiteliales como la E-cadherina y aumenta la expresión de marcadores mesenquimales como la Vimentina.

Existen varias vías no canónicas de señalización (Figura 4, derecha) iniciadas por actividad tirosina-quinasa de TBRI/II y asociadas a caveolas. Las caveolas son invaginaciones de membrana mecanosensitivas, ricas en colesterol y caveolina (Cav-1) y ligadas a los filamentos de actina, que tienen un rol importante en la señalización celular, homeostasis lipídica y adaptación a los cambios de tensión de la membrana. Por ejemplo, TGF- β , de manera independiente de Smads, activa RhoA suscitando la reorganización del citoesqueleto de actina (Bhowmick et al., 2001) y también promueve el desensamblaje de las uniones intercelulares (Ozdamar et al., 2005) que requiere inhibición de RhoA (Zhang, 2016).

La primera línea celular en la que se indujo experimentalmente la TEM con TGF- β fue NMuMG, proveniente de glándula mamaria de ratón. En células NMuMG se demostró la deslocalización y disminución de la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, ZO-1) y el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, Fibronectina y Vimentina), así como la formación de fibras de estrés y un aumento en la migración celular (Miettinen et al., 1994, Bhowmick et al., 2001).

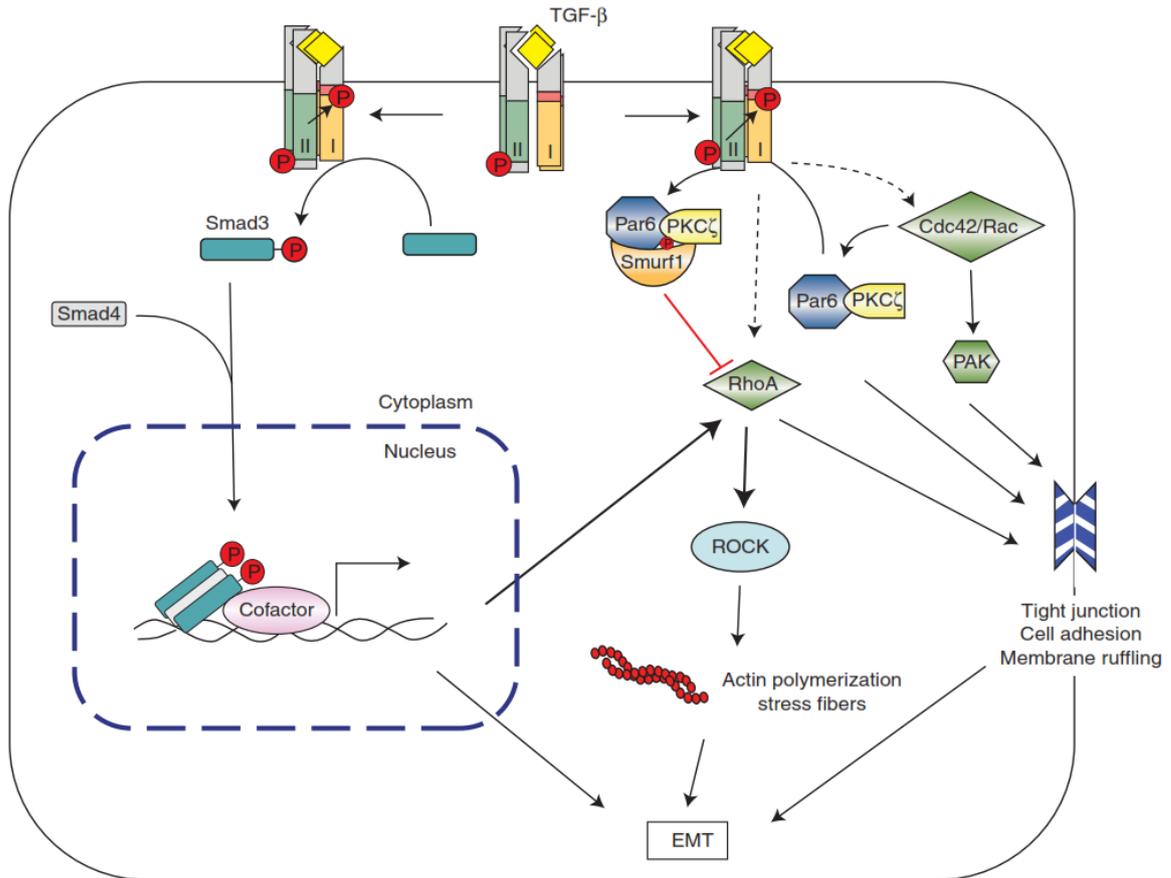


Figura 4. Vías de señalización de TGF-β. TGF-β se une a receptores TBR I y TBR II, formándose un complejo. TBR II fosforila TBR I. La vía canónica (izquierda) implica la fosforilación de Smad2 y Smad3, que forman un complejo con Smad4 y se translocan al núcleo, donde regulan la expresión de sus genes blanco. Existen varias vías no canónicas (derecha), que activan efectores independientes de Smads. Aquí se representa la regulación de las GTPasas de tipo Rho y Cdc42. RhoA y ROCK (*Rho-associated protein kinase*) son activadas por TGF-β de manera Smad dependiente o independiente inducen la polimerización de la actina y formación de fibras de estrés. Asimismo, Par6 puede ser fosforilada por TBR II, mediante el reclutamiento de Smurf1, induciendo la degradación de RhoA y por lo tanto, también el desensamblaje de las uniones intercelulares ocluyentes. Otras GTPasas como Cdc24 y Rac1

pueden unirse al complejo proteico asociado a los receptores de TGF- β , y activar quinasas (PAK: *p21- activated kinase*, PKC: *protein kinase C*), que también inducen el desensamblaje de las uniones ocluyentes y la migración celular (extraído de Zhang, 2016). Algunos otros ejemplos de vías no canónicas de TGF- β (no mostradas en esta figura), incluyen a Ras, PI3K, AKT, mTOR y MAPK (Taylor, 2010).

Poli-ADP-ribosilación

Poli-ADP-ribosil polimerasas (PARPs)

La poli-ADP-ribosa(PAR), es un polímero formado por unidades de estructura pentosa-bifosfato-pentosa-adenina enlazadas por enlaces glicosídicos (Figura 5). Este polímero es sintetizado por poli-ADP-ribosa-polimerasas, conocidas como PARPs, a partir de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), en una reacción conocida como poli-ADP-ribosilación o PARilación, en la cual además se libera nicotinamida (Nam). Asimismo, el polímero es degradado principalmente por poli-ADP-ribosa glicohidrolasa o PARG. La adición de múltiples unidades de ADP-ribosa mediante enlaces covalentes, es una modificación post-traducciona l de proteínas. Se han detectado los siguientes residuos ADP-ribosilados: arginina, aspartato, cisteína, glutamato, lisina y serina (Larsen et al., 2018). La longitud del polímero puede llegar hasta las 400 unidades de

poli-ADP-ribosa, y a su vez éste puede ser lineal o ramificado (Figura 5) (Virág & Szabó, 2002).

Las PARPs existen en todos los dominios de vida, en 18 isoformas, aunque no todas están presentes en todos los organismos (Perina et al., 2014).

Algunas de las isoformas como PARP-1 y PARP-2 sintetizan polímeros largos y ramificados; Tankyrasa 1 (TNKS-1) y Tankyrasa 2 (TNKS-2) sintetizan polímeros cortos y lineales (oligo-ADP-ribosilación); PARP-3 sintetiza monómeros de ADP-ribosa (mono-ADP-ribosilación), e incluso existen isoformas sin actividad enzimática detectable, como PARP-8 (Vyas et al., 2014; Hottiger, 2015; Bai, 2015).

El polímero PAR puede estar asociado a una gran variedad de proteínas involucradas en distintos procesos celulares: la regulación de la estructura de la cromatina, la reparación del ADN, la transcripción y la regulación del ciclo celular. Existen asimismo PARPs asociadas a centrómeros. Hasta el momento, PARP-1 ha sido la más estudiada de la familia. La deficiencia o sobreexpresión de PARP-1, así como mutaciones en su secuencia nucleotídica o alteraciones del polímero de PAR están asociadas con el desarrollo de varios tipos de carcinomas, y pueden causar defectos en los mecanismos de reparación del ADN, puntos de control del ciclo celular e inestabilidad genómica (revisado en Lafon-Hughes et al., 2008).

Existe una localización celular diferencial entre las PARPs. PARP-1 es la única enzima de la familia localizada exclusivamente en el núcleo. PARP-2, cuya estructura y función es muy similar a PARP-1, es tanto nuclear como citoplásmica. Las TNKS presentan localización nuclear y citoplásmica. En particular, TNKS-1 se localiza en varios organelos citoplásmicos y en las uniones adherentes de la cara lateral de la membrana celular, aunque puede ser reclutada hacia el núcleo por TRF1 (*telomere repeat binding factor 1*) (Yeh et al., 2006).

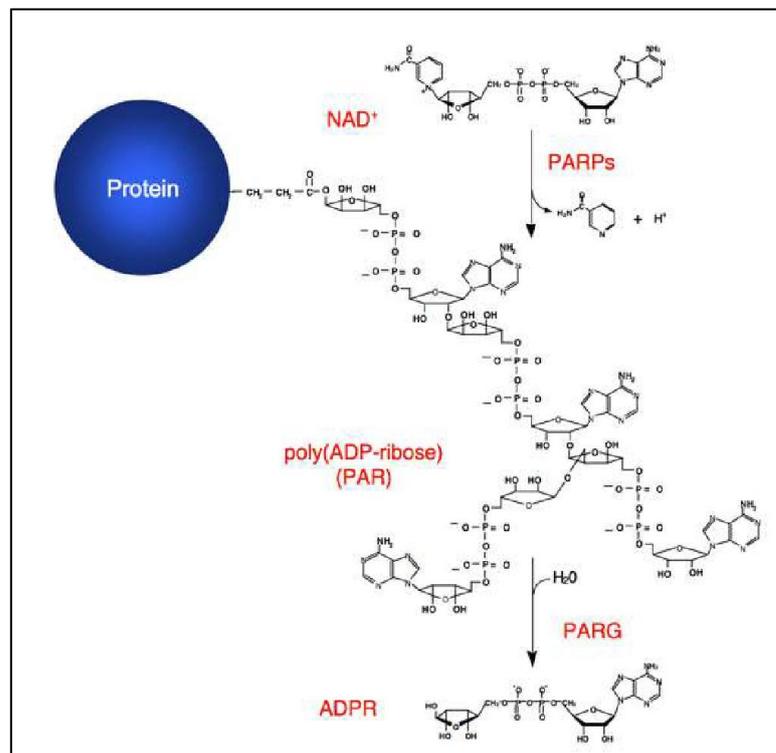


Figura 5. Estructura, síntesis y degradación del polímero PAR, así como de las moléculas involucradas en las reacciones. PAR es una modificación post-

traduccional que es sintetizada por PARPs a partir de NAD⁺ liberando Nam, y es degradada por PARG. Extraído de la Tesis de doctorado de D'Onofrio (2011).

Inhibidores de PARPs (iPARPs)

Dado que las alteraciones en la expresión de PARPs se relacionan con el desarrollo de distintos tipos de carcinoma, los inhibidores de PARPs pueden ser utilizados como terapia contra el cáncer. Actualmente se están realizando ensayos preclínicos sobre la eficacia y seguridad de su aplicación para tratar varios cánceres epiteliales, basados en un *rationale* de letalidad sintética, las células blanco de los iPARPs son aquellas deficientes en una de las vías de reparación, y su mecanismo de acción se basa en inhibir sus vías alternativas de reparación (Anwar et al., 2015). Olaparib (Lynparza, AZD-2281) es un iPARP aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) para tratar el cáncer de ovario, desde agosto del 2017, y para tratar el cáncer de mama desde enero de 2018. Es indicado para pacientes con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, codificantes para proteínas que participan en la vía de reparación homóloga del ADN. Las mutaciones en estos genes implican que las roturas de ADN, sean reparadas por las vías de reparación alternativas que incluyen a PARP. Dado que Olaparib inhibe la acción de PARP-1/-2, impide la reparación del daño del ADN, causando la muerte de las células cancerígenas (Robson et al., 2017).

PARilación y TEM

Existe controversia aún sobre el rol de las PARPs y su interacción con las SMADs durante la TEM. Algunos autores plantean que PARP-1 tiene un efecto pro-TEM (Huang et al., 2011), mientras que otros autores plantean que su efecto es anti-TEM (Lönn et al., 2010;Dahl et al., 2014).

Antecedentes específicos

Los antecedentes específicos de este trabajo se desprenden de investigaciones realizadas por la orientadora de esta pasantía, la Dra. Laura Lafon-Hughes en colaboración con investigadores nacionales y del exterior.

- Se demostró que existe PAR nuclear y citoplásmica en células epiteliales VERO. Existe PAR asociada al cinturón de adhesión, el cual tiene una altura de entre 1 y 1.5 μm y a la actina cortical. Una disrupción del citoesqueleto de actina implica la rotura y en algunos casos la desaparición del cinturón de PAR. A la inversa, la inhibición de TNKS con XAV939 tiene como efecto la pérdida parcial del cinturón de adhesión y, por lo tanto, también de la adhesión celular. También de acuerdo con que TNKS sintetice PAR periférica, las cadenas de PAR detectadas eran cortas, a

diferencia de las cadenas largas sintetizadas por PARP-1. Si las células VERO se comportan como las MDCK (epitelio renal canino), TNKS-1 sería reclutada hacia los sitios de formación de uniones adherentes mediadas por E-cadherina (Yeh et al., 2006, Lafon-Hughes et al., 2014).

- Para descartar que la presencia de PAR en las uniones adherentes era una particularidad de células VERO, se verificó si existía en otros tipos de epitelios con uniones ricas en E-cadherina. Se detectó PAR en muestras epiteliales de hígado, piel e intestino de ratón. En cambio, en epitelio de córnea bovina, con uniones ricas en N-cadherina no se observó PAR (Lafon-Hughes et al., 2016). Dado que las uniones ricas en E-cadherina son más fuertes y las ricas en N-cadherina son más lábiles, y que se ha descrito a PAR como un “pegamento” (*glue*) surgió la hipótesis que PAR contribuye a estabilizar las uniones.
- Se detectó la presencia de PAR en nervios ciáticos de ratones. Se observó co-localización de PAR citoplásmica y actina en las regiones de mielina no compacta (ricas en E-cadherina) de los nervios de ratones *wild type*. En nervios de ratones Trembler J (modelo de la enfermedad humana Charcot-Marie-Tooth 1E) en los cuales ya se había demostrado que hay un aumento de F-actina (Kun et al., 2012), se encontró que también aumenta PAR, argumentando nuevamente a favor de la existencia de una

estrecha relación entre el citoesqueleto de actina y la PARilación (Lafon-Hughes et al., 2017).

- Dado que en la TEM E-cadherina es sustituida por N-cadherina, surgió la hipótesis que el cinturón de PAR existe en células epiteliales y se desarma durante la TEM. Así fue como se decidió comenzar a estudiar PARilación en TEM. En el año 2015, investigadores de la Universidad de North Dakota, luego de realizar un experimento preliminar sugerido por la Dra. Lafon, firmaron un convenio de transferencia de materiales con la misma, por el cual le enviaron células NMuMG, TGF- β , el inhibidor de la kinasa activada por TGF- β (SB-431542) y un anticuerpo anti-PAR. Se comenzó a trabajar en Montevideo y EEUU paralelamente realizando diferentes aproximaciones experimentales. Esta tesina de grado se inscribió en este trabajo ya iniciado. Implicó pues, revisar experimentos ya realizados, analizar imágenes, cuantificar, y también la realización de nuevos experimentos.

Hipótesis

Las células NMuMG poseen un cinturón de PAR. Durante la TEM ocurren modificaciones de PAR nuclear, citoplásmica y del cinturón, por lo cual la TEM puede ser modulada con un inhibidor de PARPs.

Objetivo General

Evaluar la presencia, localización celular y cantidad de PAR en células NMuMG en condiciones control y tratadas con TGF- β . Evaluar asimismo si el inhibidor de PARP-1/-2 Olaparib modula la TEM.

Objetivos Específicos

En células NMuMG:

- Determinar si poseen un cinturón de PAR
- Evaluar si existen modificaciones de PAR nuclear, citoplásmica y del cinturón durante la TEM.
- Evaluar los efectos del tratamiento con OLA durante o luego de inducir TEM con TGF- β . Para ello, se cuantificarán PAR y marcadores moleculares epiteliales y mesenquimales, así como la anisotropía del citoesqueleto de actina.

Materiales y Métodos

Cultivo de células

La línea celular NMuMG (ATCC[®] CRL-1636[™]) proveniente de epitelio de glándula mamaria de *Mus Musculus*, se cultivó en DMEM-HPSTA (Capricorn) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (11A, Capricorn o 12657-029, Gibco), en ausencia o presencia de los antibióticos penicilina y estreptomicina de Capricorn (PS-B, concentración 1:100), en estufa de cultivo con 5% de CO₂, a 37°C.

Además, para evitar la presencia de partículas, el FBS (FBSf) y el buffer fosfato salino 1X (PBSf) eran filtrados por un filtro con poros de 0,2 µm.

Se realizó un pasaje y un cambio de medio por semana. Se mantuvo un stock de células congeladas en dimetilsulfóxido al 10% (154958 Sigma Aldrich) y FBSf al 20% en DMEM-HPSTA.

Siembra de células y tratamientos con TGF-β1 y Olaparib

Siembra. Para los experimentos, las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles en placas de 24 pocillos. La densidad celular inicial se ajustó de acuerdo a la duración total del experimento, por ejemplo para

experimentos de 48 h se sembraron entre 100.000 y 400.000 células, y para experimentos de 96 h se sembraron entre 30.000 y 45.000 células.

Inducción de la TEM con TGF- β . Al día siguiente a la siembra, los cultivos fueron sometidos a 4 h de depleción de FBSf (Wendt et al., 2010). A continuación se agregó 5 ng/mL de TGF- β 1, preparada a partir de una solución stock de 5 mg/mL en seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1% en PBSf, y se esperó al menos 48 h.

Tratamiento combinados con Olaparib (OLA). El Olaparib se utilizó en una concentración final de 50 nM, preparada a partir de una solución stock de 5 mM en PBSf.

Se utilizaron dos esquemas temporales: (a) co-tratamientos: OLA simultáneo al TGF- β 1, con una duración de 48 h y (b) post-tratamientos: luego de inducida la TEM con TGF- β durante 48 h, se trató con OLA y se mantuvo el tratamiento con TGF- β , completando una duración total de 72 o 96 h.

En todos los casos se realizó un control con depleción de FBSf. (en los primeros experimentos, se realizó también control sin depleción de FBSf para comprobar que la misma no tuviera efecto).

Inmunocitofluorescencia (ICF)

Se utilizó la inmunocitofluorescencia indirecta . Los preparados fueron lavados con PBSf y luego fijados en PFA 4% en PBSf frío (15 min). Se realizaron lavados con PBSf (3 x 5 min). Se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.1% en PBSf (10 min) y se bloqueó 30 min en solución de bloqueo (Bloq) de seroalbúmina bovina al 1% en PBSf-Tween 20 al 0.2% (PBSf-T). Se incubó con anticuerpos primarios (Tabla 1) diluídos en Bloq (2 h, 37°C). Se lavó con PBSf-T (3 x 5 min.). Se incubó con anticuerpos secundarios (Tabla 2) en Bloq. (1 h, TA) y una sonda de rhodamina-faloidina (R415) o Cytosinker (ab176756). Se lavó con PBSf-T (2 x 5 min). Se incubó en DAPI (1.5 µg/mL en PBSf-T, 10 min). Se enjuagó en PBSf, se montó en ProLong™ P36961 Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific), y se selló con esmalte de uñas. Alternativamente, se utilizó un medio de montaje que ya contenía DAPI (VECTASHIELD® H-1200 Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories). En todos los experimentos se realizó un control sin anticuerpo primario (Bordeaux et al., 2010).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunocitofluorescencia, con sus respectivos códigos de fabricación, animal de origen y la concentración utilizada.

	Código de fabricación	Animal de origen	Concentración
E-cadherina	ab11512 (clon DECMA-1)	rata	1:100
β- catenina	ab32572	conejo	1:500
PAR (BD)	BD551813	conejo	1:50
PAR (H10)	sc-56198	ratón	1:50
PAR (Enzo)	Enzo BML-SA216	ratón	1:50
Vimentina	ab8978 (clon RV202)	ratón	1:50
Vimentina	ab24525	pollo	1:50
Vinculina	ab18058	ratón	1:50
γ-H2AX	ab26350	ratón	1:350

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de inmunocitofluorescencia, con sus respectivos picos de excitación en nm, código y animal de fabricación y la concentración utilizada.

Anticuerpo	Pico de excitación (nm)	Código de fabricación	Animal de origen	Concentración
anti-conejo	488	a11034	cabra	1:1000
anti-pollo	488	ab96947	cabra	1:500
anti-rata	488	a21208	burro	1:500
anti-ratón	633	a21052	cabra	1:500
anti-ratón	488	a11029	cabra	1:1000
anti-ratón	546	a11030	cabra	1:1000

Microscopía Confocal

Se utilizaron tres microscopios confocales:

- Zeiss LSM 800- Airyscan (IIBCE)
- Olympus BX61, módulo confocal FV300 (IIBCE)
- Leica TCS SP5 II (Facultad de Medicina, UdelaR)

Se tomaron stacks en Z, de imágenes de distintos campos de cada preparado, con una distancia entre planos de 0.5 μm , abarcando la altura completa de la célula. Las imágenes fueron tomadas con aumentos de 40X, 60X, 63X y 100X. La intensidad del láser y ganancia neta del fotomultiplicador fueron ajustados en cada experimento, utilizando la muestra control sin anticuerpo primario para evitar señal inespecífica y chequeando el nivel máximo de todos los preparados para evitar la saturación.

Análisis de imágenes y procesamiento de datos

Se utilizó el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012) para medir la intensidad de fluorescencia de los marcadores moleculares y la anisotropía de la F-actina. Se utilizó Microsoft Excel para el procesamiento de los datos y generación de gráficos.

Cuantificación de la Intensidad de fluorescencia

Con el fin de detectar variaciones en la intensidad de fluorescencia de los marcadores moleculares, comparando las células control y tratadas solamente con TGF- β o TGF- β + OLA. Para cada marcador molecular, se midió la suma de los valores de intensidad de los píxeles en el campo total, con la función "*RawIntDen*" en todos los planos de cada stack. Las intensidades de fluorescencia de cada marcador fueron normalizadas por

la intensidad de fluorescencia de DAPI. Los datos se corrigieron, restando la intensidad de fluorescencia del control sin anticuerpo primario normalizado por DAPI, y se expresaron como porcentaje del control. Se realizó una prueba *t* de student a dos colas, de varianzas desiguales, para calcular significancia estadística.

Además se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear utilizando el plugin "*Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm*". Se ajustó el área nuclear mínima y el porcentaje máximo de saturación a detectar para cada experimento. Los datos fueron normalizados por la intensidad de fluorescencia de DAPI. Se aplicó la prueba estadística *t* de student con dos colas, de varianzas desiguales, para calcular la significancia estadística.

Cuantificación de la Anisotropía de la F-actina

Con el fin de cuantificar variaciones en la orientación y el grado de alineamiento del esqueleto de F-actina, se seleccionaron de cada stack los tres planos con mayor intensidad de fluorescencia total de actina. Se les aplicó un filtro gaussiano con un radio=1 y se midió la anisotropía, utilizando el plugin "*FibrilTool*" (Boudaoud et al., 2014). Se realizó una prueba *t* de student con dos colas, de varianzas desiguales, para calcular la significancia estadística.

Resultados

Las células NMuMG presentaron un cinturón de PAR

En el artículo de Lafon-Hughes et al. (2014) se demuestra que la línea celular VERO presenta un cinturón de PAR asociado a las uniones adherentes del epitelio ricas en E-cadherina, y que además está asociado al citoesqueleto de actina. Debido a que las células NMuMG provienen del epitelio de glándula mamaria de ratón, nos propusimos verificar si también cuentan con el cinturón de adhesión. Se detectó esta estructura por ICF con el anticuerpo anti-PAR(BD) (Figura 6A) y comprobamos que colocalizó con el cinturón de actina (Figura 6B) (Figura 6).

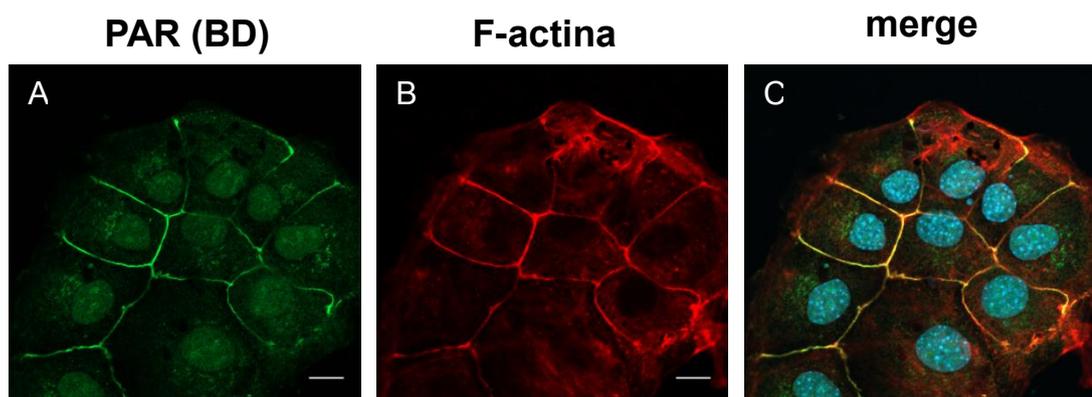


Figura 6. Las células NMuMG presentaron un cinturón de PAR asociado al cinturón de adhesión epitelial. Se muestra un plano confocal. El cinturón de PAR fue detectado con el anticuerpo anti-PAR (BD) **(A)**, asociado al cinturón de adhesión de actina **(B)**. Se muestra la superposición **(C)**. Barra: 10 μ m.

Las células NMuMG experimentaron modificaciones morfológicas y funcionales durante la TEM

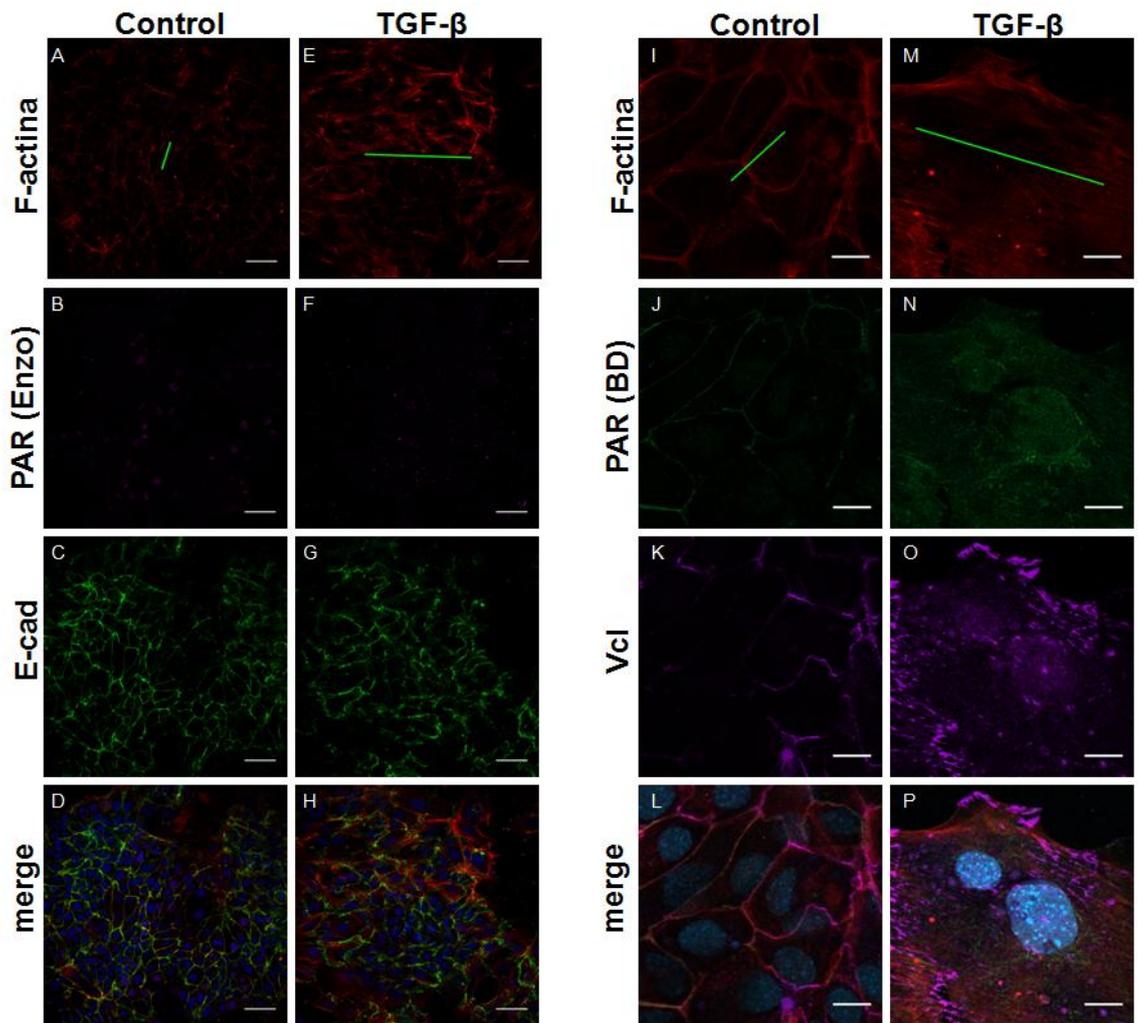
Las PARP-1/-2, de localización principalmente nuclear, sintetizan polímero de hasta 400 unidades de ADP-ribosa (Hottiger, 2015). Dicho polímero largo y ramificado es detectado preferencialmente por ICF por el anticuerpo anti-PAR (H10) (Kawamitsu et al., 1984). En cambio la TNKS-1 localizada en el citoplasma, sintetiza un polímero lineal de aproximadamente 20 unidades de ADP-ribosa, asociado a las uniones intercelulares ricas en E-cadherina, este tipo de polímero puede ser detectado por ICF con los anticuerpos anti-PAR (BD) o (Enzo) (Lafon-Hughes et al., 2014). Nos propusimos verificar si al inducir la TEM con TGF- β (5 ng/mL) por 48 h, las células sufren cambios en el citoesqueleto de actina, en particular en la actina cortical; y si ocurren alteraciones de PAR nuclear y citoplásmica (Figura 7).

Se vio un aumento de PAR total y nuclear (Figuras 7 S, 7 T),. Marcando el citoesqueleto de actina (Figura 7 A, E, I, M), E-cadherina (Figura 7 C, G), PAR (anticuerpos de BD y Enzo) (Figura 7 B, F, J, N) y Vinculina (Figura 7 K, O) por ICF observamos que tanto el cinturón de adhesión epitelial como la actina cortical que lo acompaña, se desensamblan durante la TEM. Además de perder su polaridad ápico-basal, las células se alargaron y aplanaron tanto que fue posible observar en un mismo plano

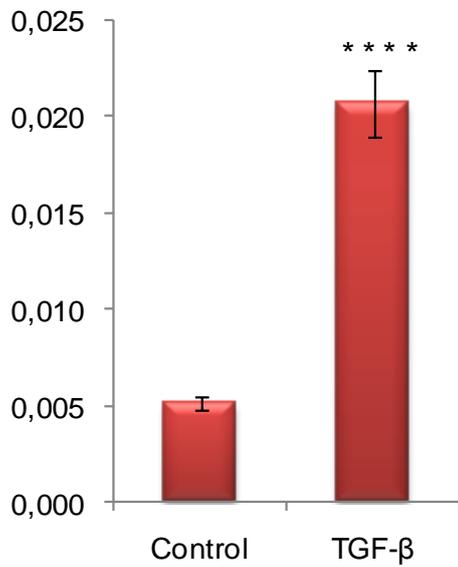
confocal restos de la Vinculina que pertenecía a cinturones de adhesión y aquella presente a nivel de los contactos focales.

Con respecto a la F-actina se observó la formación de fibras de estrés y un aumento en la anisotropía (Figura 7 A, E, I, M) . Este aumento de anisotropía también se vio en los núcleos pero de forma menos pronunciada (Figura 7 R). Estos aumentaron su tamaño, se volvieron más ovoides y su eje mayor se orientó paralelo a las fibras de estrés.

Figura 7.



Q Anisotropía de F-actina



R Anisotropía de DAPI

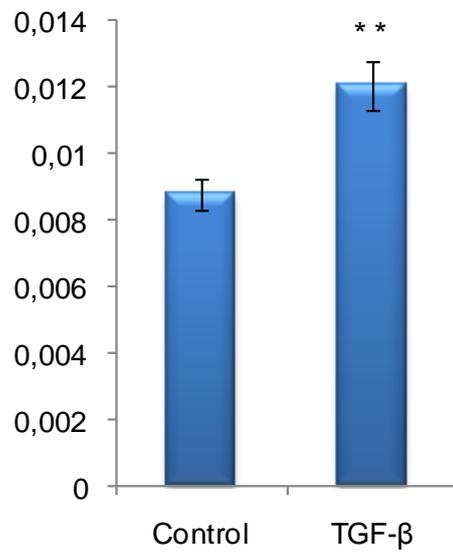


Figura 7.

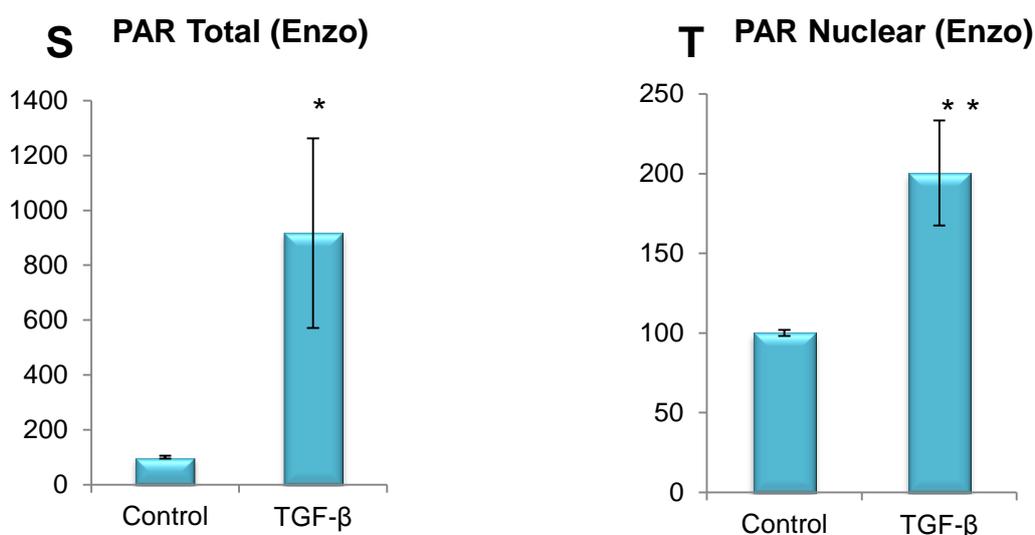


Figura 7. Inducción de TEM en células NMuMG con TGF- β (5 ng/mL, 48 h). Panel izquierdo: planos confocales para F-actina, PAR (Enzo), E-cad y la superposición, de células control (**A-D**) y tratadas con TGF- β (**E-H**). Barra: 50 μ m. Panel derecho: planos confocales de F-actina, PAR (BD), Vinculina (VCL) y la superposición, de células control (**I-L**) y tratadas con TGF- β (**M-P**). Nótese (**K** vs **O**) que en células control se observa Vinculina asociada al cinturón de adhesión y en ese plano no hay contactos focales (que no se muestran, pero sí se observan en posición basal). En células tratadas, se puede llegar a ver restos del cinturón desensamblado en el mismo plano que ya se divisan los contactos focales. Barra: 10 μ m. Gráficos: primera cuantificación de la anisotropía del citoesqueleto de actina (**Q**) y nuclear (**R**). Para la anisotropía de F-actina se cuantificaron 3 experimentos independientes, con un total de 180 planos para control y 175 planos para células tratadas. Para la anisotropía de los núcleos se cuantificaron 2 experimentos independientes, con un total de 129 planos para control y 110 para células tratadas. Se cuantificaron todos los planos de los stacks. PAR total (**S**) y nuclear (**T**) aumentan durante la TEM. Se utilizó el anti-

PAR de Enzo para la inmunomarcación. Los datos provienen de 3 experimentos independientes, con un total de 70 planos para control y 59 para células tratadas. Se cuantificaron todos los planos de los stacks. Los datos están expresados como porcentaje del control. Media \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

Olaparib previno la TEM inducida por TGF- β en células NMuMG

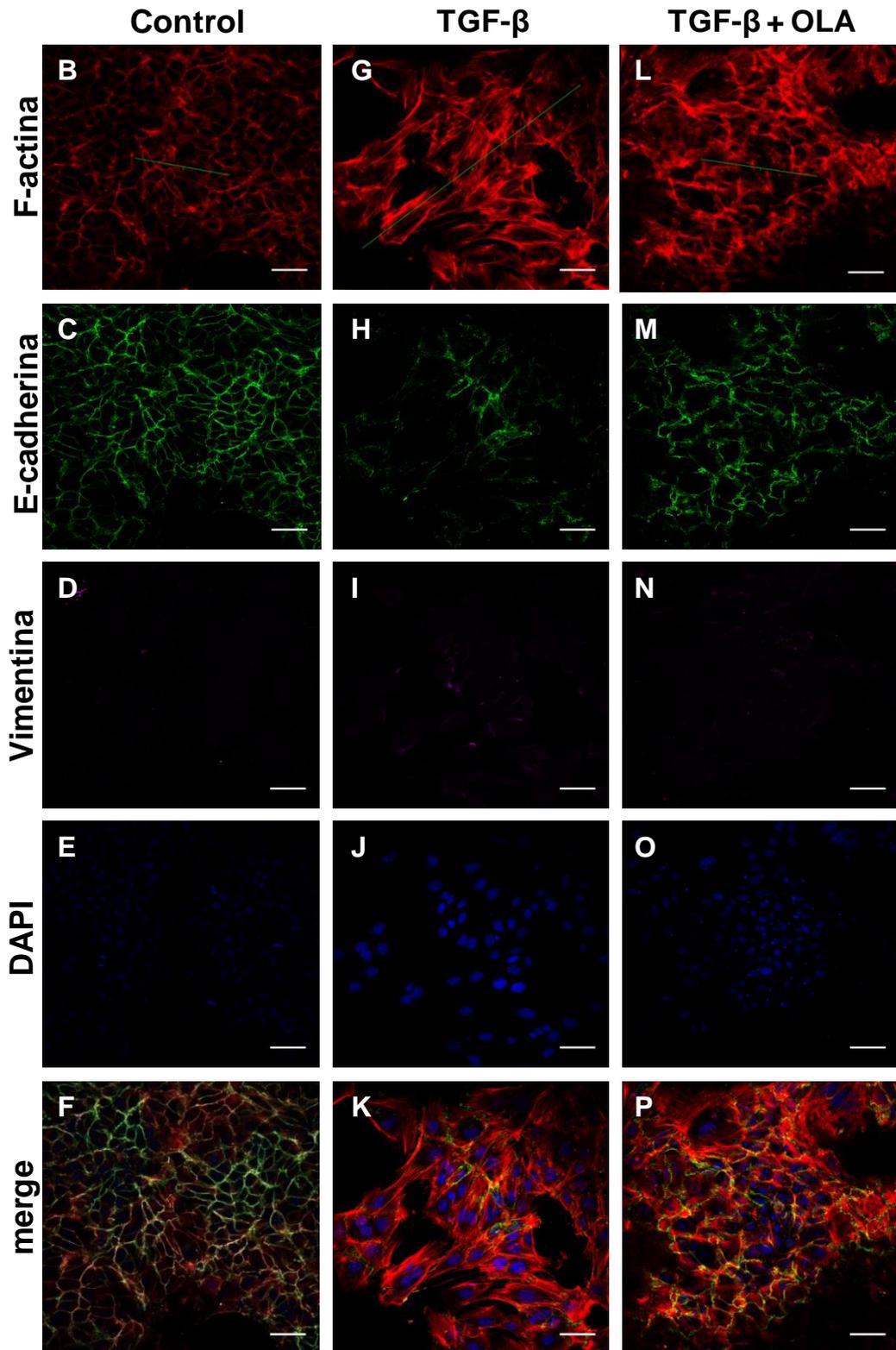
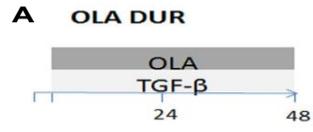
Dado que PAR aumentó durante la TEM, nos propusimos investigar si el iPARP OLA puede prevenir o revertir la TEM en células NMuMG (que no tienen BRCA mutado reportado). Se realizaron inicialmente co-tratamientos de TGF- β (5 ng/mL) en ausencia o presencia de OLA (50 nM) de 48 h de duración (Figura 8 A). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de varios marcadores moleculares de la TEM, de PAR (anti-PAR Enzo), y la anisotropía del citoesqueleto de actina.

Al tratar las células sólo con TGF- β se vio que disminuyó E-cadherina, considerada un marcador epitelial clásico (Figura 8 C, H, Q), y Vinculina (como en Li et al., 2014) (Figura 8 S). Dada la presencia de Vinculina tanto en contactos focales como en el cinturón de adhesión, se dificultó su cuantificación en células tratadas con TGF- β , ya que en la TEM las células se aplanan y se torna difícil distinguir a qué región corresponde la Vinculina (contactos focales o cinturón de adhesión desensamblado).

Como marcador clásico del fenotipo mesenquimal se usó Vimentina, cuya expresión aumentó durante la TEM (Figura 8 D, I, S). Aumentó la cantidad de PAR (Figura 8 T). Finalmente, con respecto al citoesqueleto de actina, se detectó un aumento de intensidad de F-actina, así como un aumento del anisotropía del mismo (Figura 8 B, G, U).

Con respecto al tratamiento sólo con TGF- β , los co-tratamientos con OLA produjeron una tendencia a la disminución de PAR estadísticamente no significativa (Figura 8 T). Sin embargo, ocurrió un aumento de E-cadherina (Figura 8 M, Q) y Vinculina (Figura 8 R) y una disminución de Vimentina (Figura 8 N, S) y de la anisotropía de F-actina (Figura 8 L, U). En su conjunto estos resultados apuntan a que Olaparib previno la TEM al realizar un co-tratamiento con TGF- β (Figura 8).

Figura 8. Panel



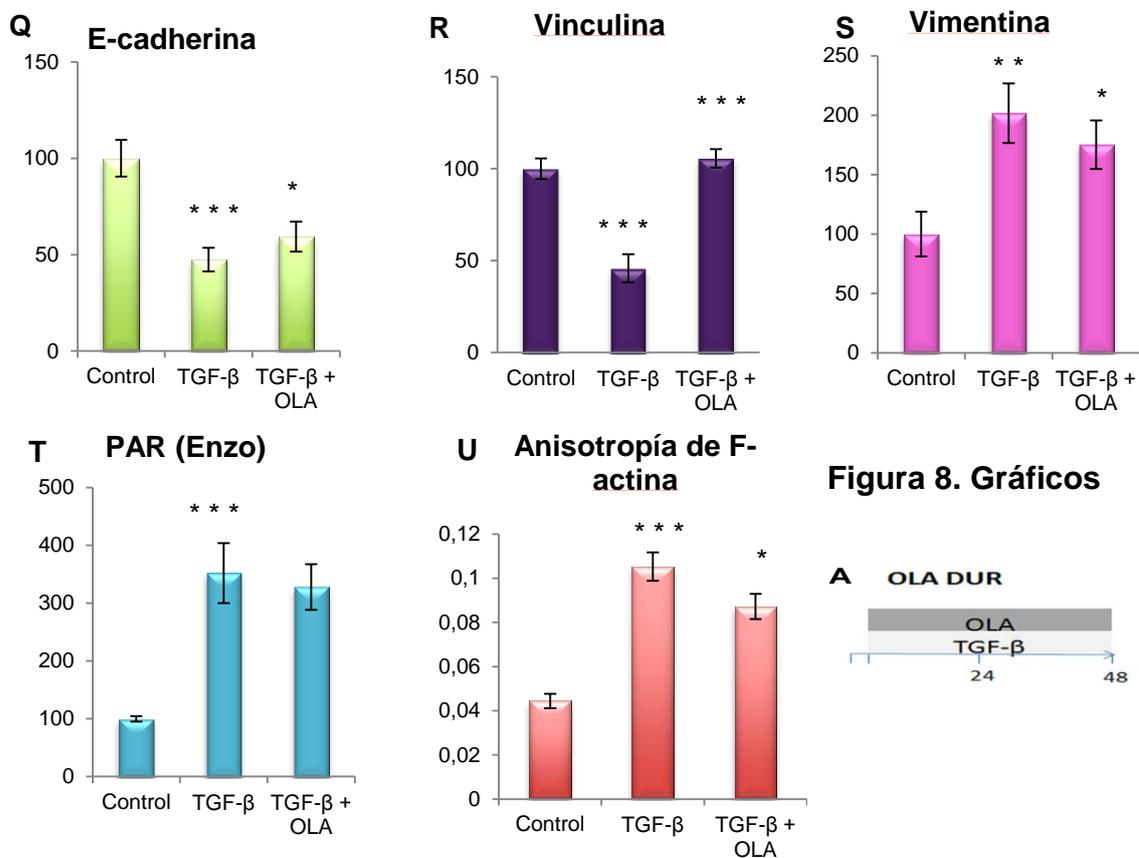


Figura 8. Olaparib previno la TEM. Se trató células NMuMG con TGF-β(5 ng/mL) en presencia o ausencia de Olaparib (50 nM) por 48 h **(A)**. Panel: planos confocales para F-actina con su barra de anisotropía en verde, E-cadherina, Vimentina, DAPI y la superposición, de células control **(B-F)**, sólo con TGF-β **(G-K)** o TGF-β + OLA **(L-P)**. Barra: 50 μm. Gráficos: E-cadherina **(Q)**, Vinculina **(R)**, Vimentina **(S)**, PAR (Enzo) **(T)**, y anisotropía de F-actina **(U)**. Se cuantificaron 4 experimentos independientes con al menos 115 planos en cada categoría para E-cadherina y al menos 60 para PAR (Enzo). Los datos de Vinculina provienen de sólo un experimento con al menos 5 planos cuantificados en cada categoría, y Vimentina proviene de 2 experimentos independientes con al menos 70 planos en cada categoría. Las intensidades de fluorescencia total están expresadas

como porcentaje del control. Los datos de anisotropía de F-actina proviene de 4 experimentos independientes con 87 planos para el control y al menos 150 planos para cada una de las otras categorías. Para esta medición se tomaron los 3 planos con mayor intensidad de fluorescencia de F-actina de cada stack y se les aplicó un filtro gaussiano de radio 1. Media \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Olaparib revirtió al menos parcialmente la TEM inducida por TGF- β en células NMuMG

Como anteriormente observamos que OLA previno la TEM, nos propusimos investigar si también podía revertirla. Se realizaron tratamientos de TGF- β (5 ng/mL) por 72 h, en ausencia o presencia de OLA (50 nM) en las últimas 24 h del tratamiento (Figura 9 A). Igual que en el caso anterior se cuantificó intensidad de fluorescencia de los marcadores moleculares, de PAR con el anticuerpo de BD, y la anisotropía del citoesqueleto de actina. Al tratar las células solamente con TGF- β disminuyó la intensidad de fluorescencia correspondiente a marcadores epiteliales E-cadherina (Figura 9 R, W, AF) y Vinculina (Figura 9 D, I) y aumentó la del marcador mesenquimal Vimentina (Figura 9 S, X, AG). Con el anti-PAR (BD) pudo observarse claramente el desensamblaje del cinturón de PAR asociado a actina y E-cadherina, detectándose además un aumento de PAR (Figura 9 C, H, AH). El

citoesqueleto de actina formó fibras de estrés y se observó un aumento de la anisotropía (Figura 9 AI). Al agregar OLA durante las últimas 24 h del tratamiento de TGF- β se vió que los cinturones de adhesión conformados por PAR, actina y E-cadherina (Figura 9 L, M, AA, AB) volvieron a ensamblarse parcialmente, asimismo disminuyó la cantidad de fibras de estrés y la anisotropía (Figura 9 AI). La expresión de Vimentina disminuyó nuevamente (Figura 9 AG). La expresión de E-cadherina no fue exactamente como se esperaba, ya que continuó disminuyendo en vez de reestablecerse en un nivel similar a una muestra control (Figura 9 AF). OLA indujo una disminución en la cantidad de PAR (Figura 9 M, AH). En su conjunto estos resultados indican que OLA puede prevenir la TEM al menos parcialmente (Figura 9).

Figura 9. Panel 1.

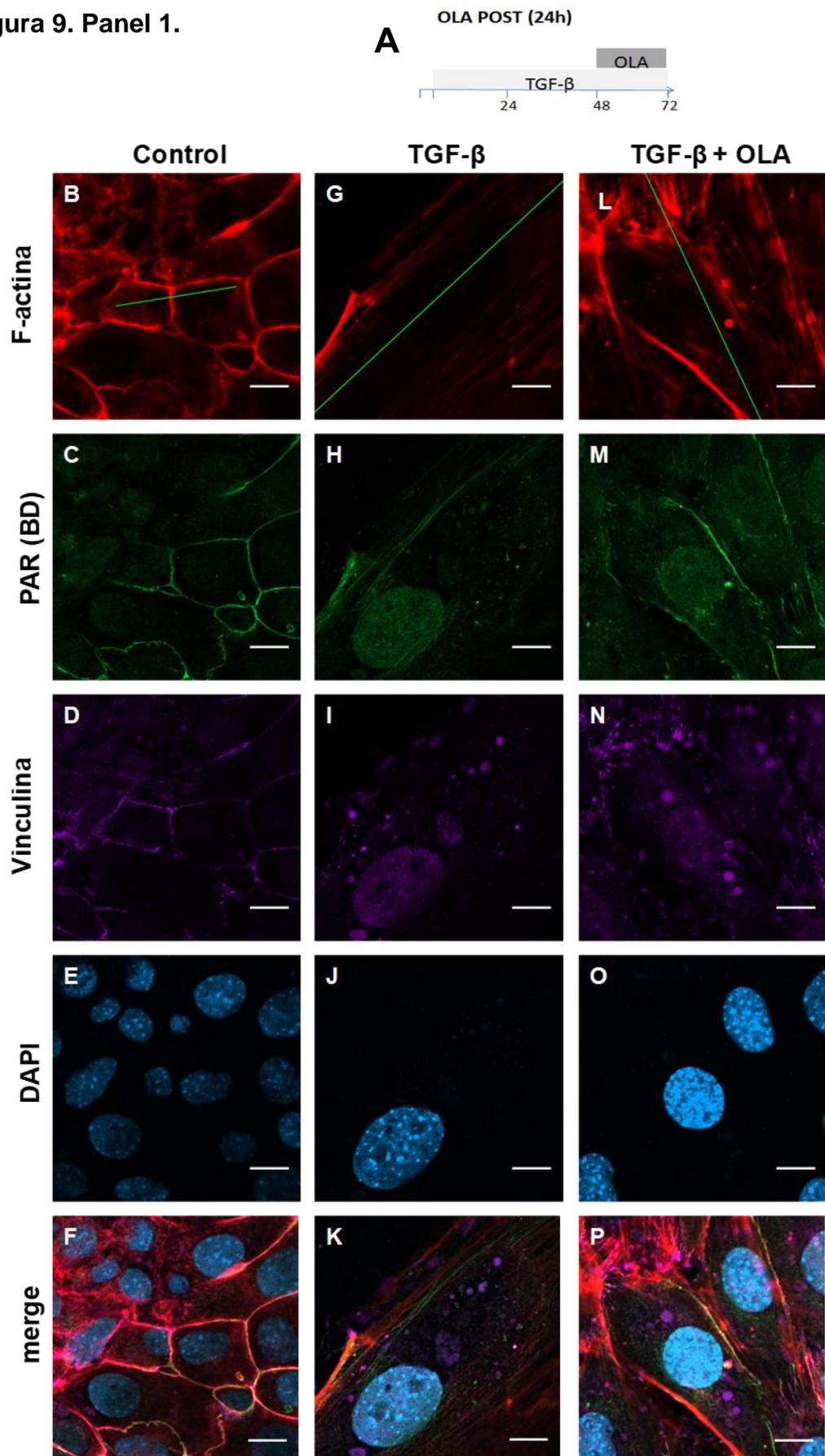


Figura 9. Panel 2.

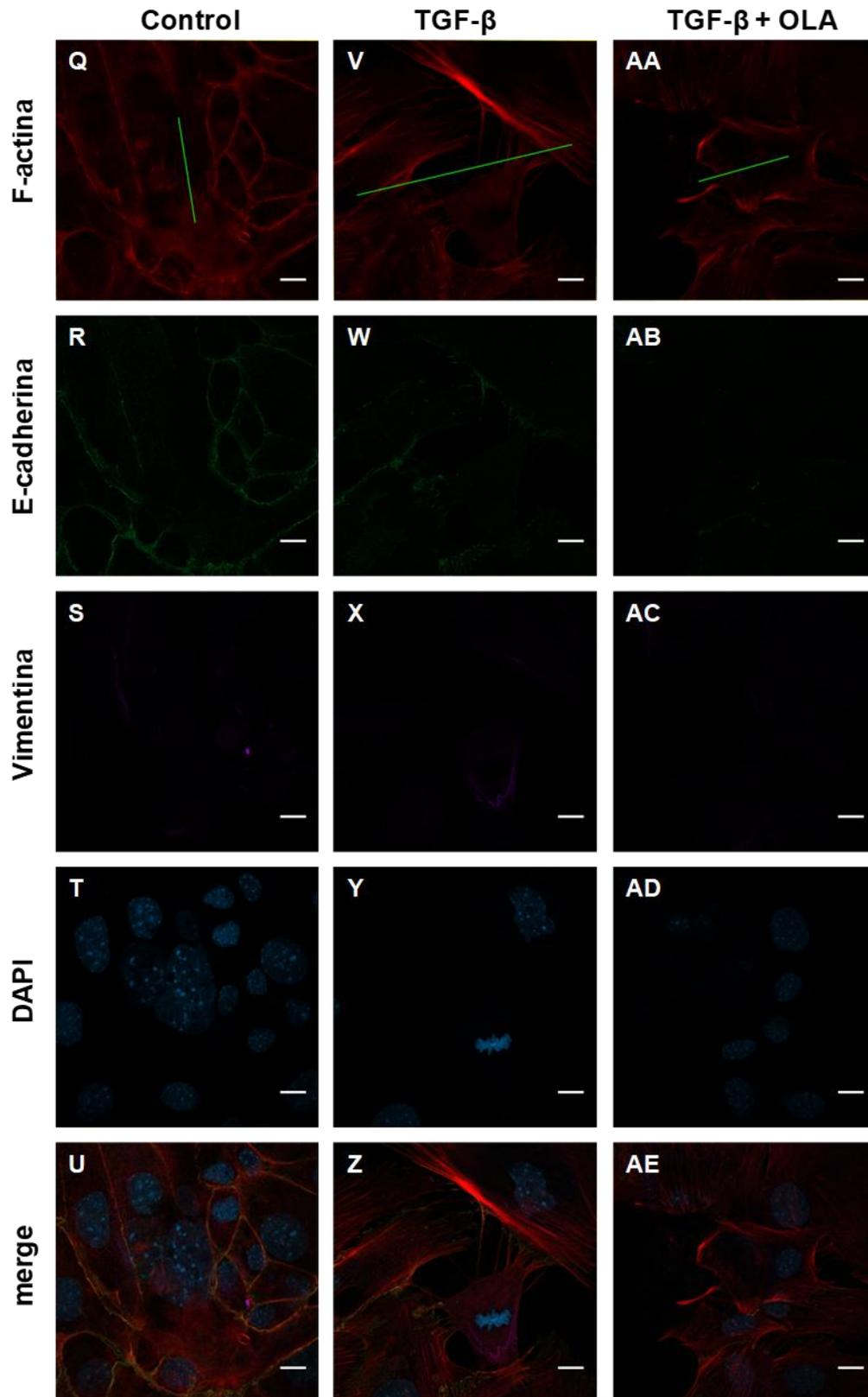


Figura 9. Gráficos.

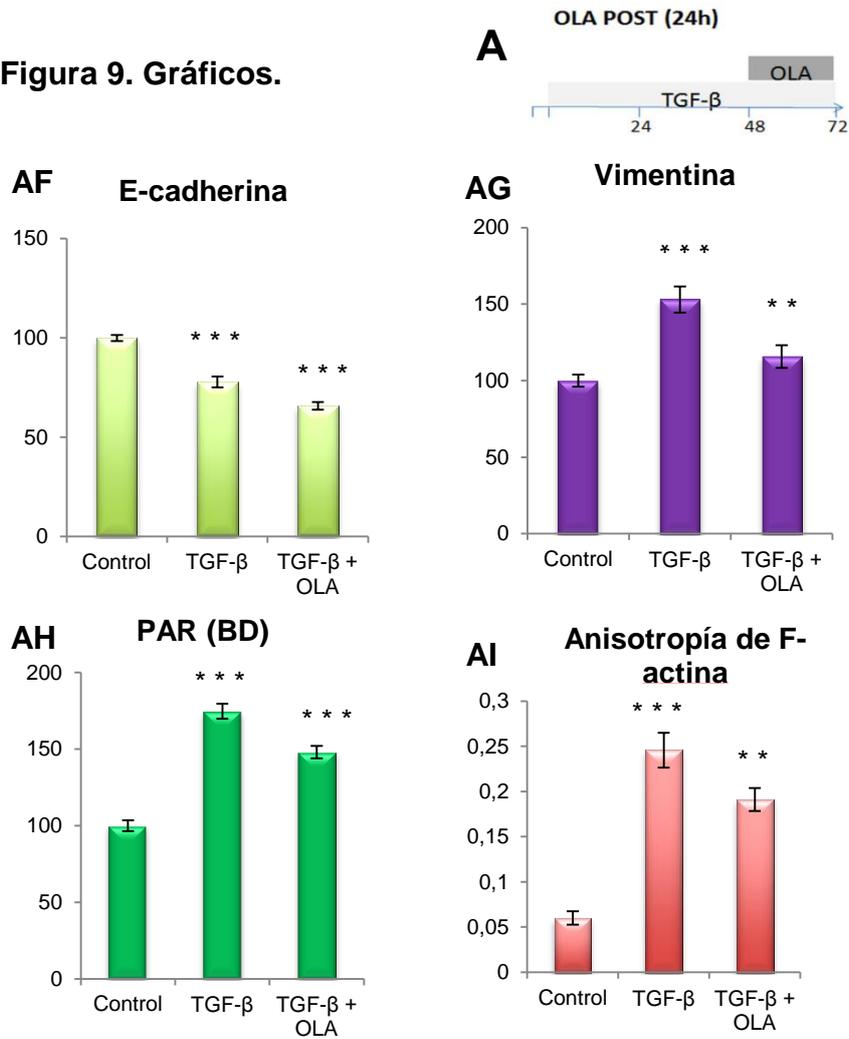


Figura 9. Olaparib revirtió la TEM al menos parcialmente. Se indujo la TEM en células NMuMG con TGF- β (5 ng/mL) por 72 h en presencia o ausencia de Olaparib (50 nM) durante las últimas 24 h del tratamiento (**A**). **Panel 1:** planos confocales para F-actina con su barra de anisotropía en verde, PAR (BD), Vinculina, DAPI y la superposición; de células control (**B-F**), sólo con TGF- β (**G-K**) y TGF- β + OLA (**L-P**). Barra: 10 μ m. **Panel 2:** planos confocales para F-actina con su barra de anisotropía en verde, E-cadherina, Vimentina, DAPI y la superposición para: células control (**Q-U**), sólo con TGF- β (**V-Z**) y TGF- β + OLA (**AA-AE**). Barra: 10 μ m. **Gráficos:** E-cadherina (**AF**), Vimentina (**AG**), PAR (BD) (**AH**) y la anisotropía del citoesqueleto de actina (**AI**). Para E-cadherina se cuantificaron 101 planos de control y 48 planos para TGF- β y TGF- β + OLA

provenientes de un experimento. Para PAR se cuantificaron 72 planos de control y al menos 230 para las otras categorías, provenientes de 2 experimentos independientes. Para Vimentina se cuantificaron 105 planos de control y al menos 50 planos de las TGF- β y TGF β + OLA, provenientes de un experimento. Las intensidades de fluorescencia total están expresadas como porcentaje del control. Para la anisotropía del citoesqueleto de actina se cuantificaron 24 planos de control y al menos 60 para las otras categorías, provenientes de 2 experimentos independientes. Para esta medición se tomaron los 3 planos con mayor intensidad de fluorescencia de actina de cada stack y se les aplicó un filtro gaussiano de radio 1. Media \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Quisimos comprobar también los efectos de un tratamiento más largo de OLA. Para esto indujimos la TEM con TGF- β (5 ng/mL) durante 96 h en presencia o ausencia de OLA (50 nM) durante las últimas 48 h del tratamiento (Figura 10 A). Se usó β -catenina como marcador molecular mesenquimal clásico, y se detectó un aumento al inducir la TEM. En las sesiones de microscopía confocal se pudo observar que ya no se encontraba en los cinturones de adhesión y se veía una migración hacia los núcleos en forma de lengüetas (Figura 10 C, H, Q). Con respecto a PAR, detectada con el anti-PAR de Enzo, también aumentó (Figura 10 D, I, R). En el citoesqueleto de actina se vio la formación de fibras de estrés y un aumento en la anisotropía (Figura 10 B, G, S). Al agregar OLA durante las últimas 48 h del tratamiento todos los parámetros volvían a disminuir (Figura 10 L, M, N, Q, R, S) (Figura 10).

Figura 10. Panel.

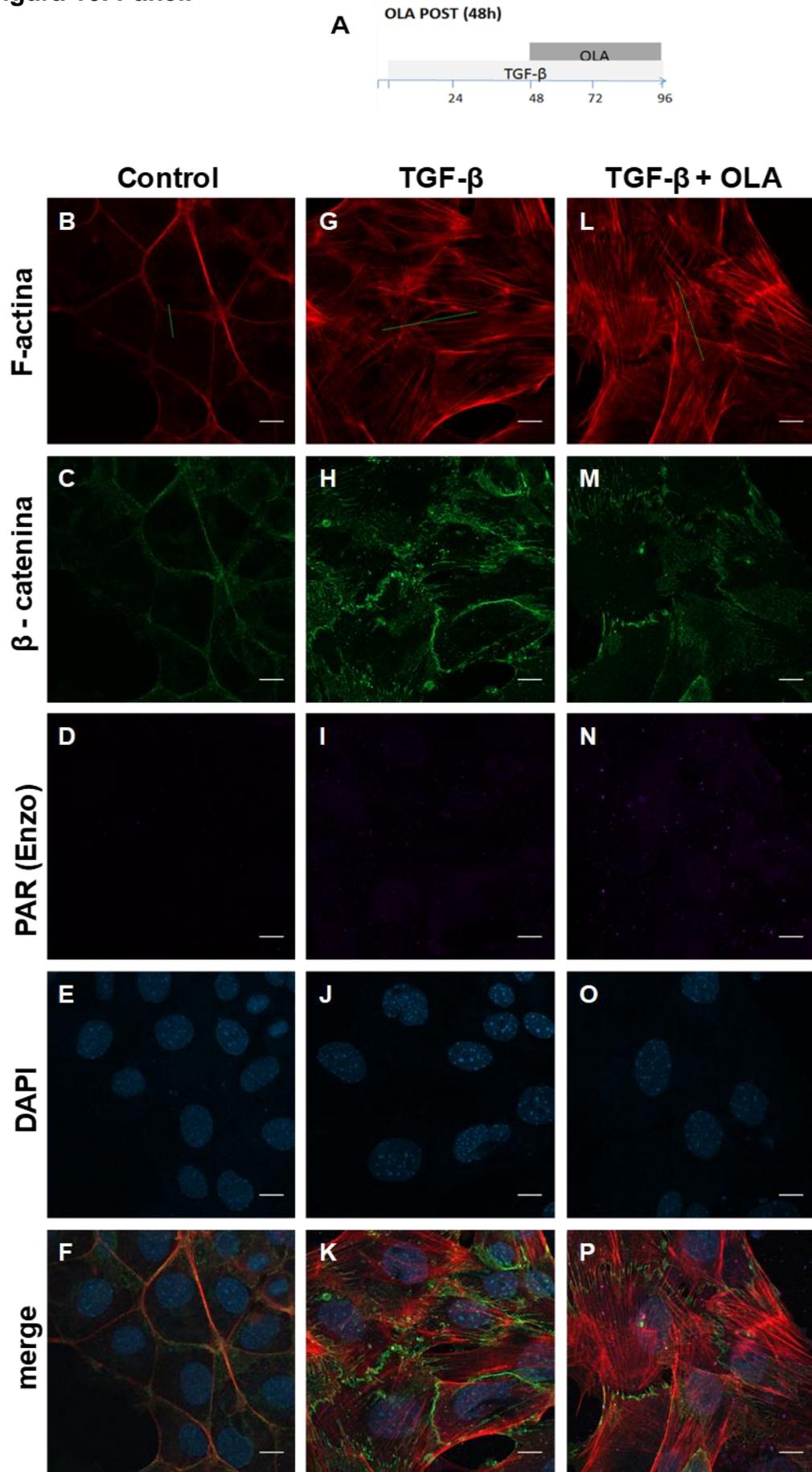


Figura 10. Gráficos.

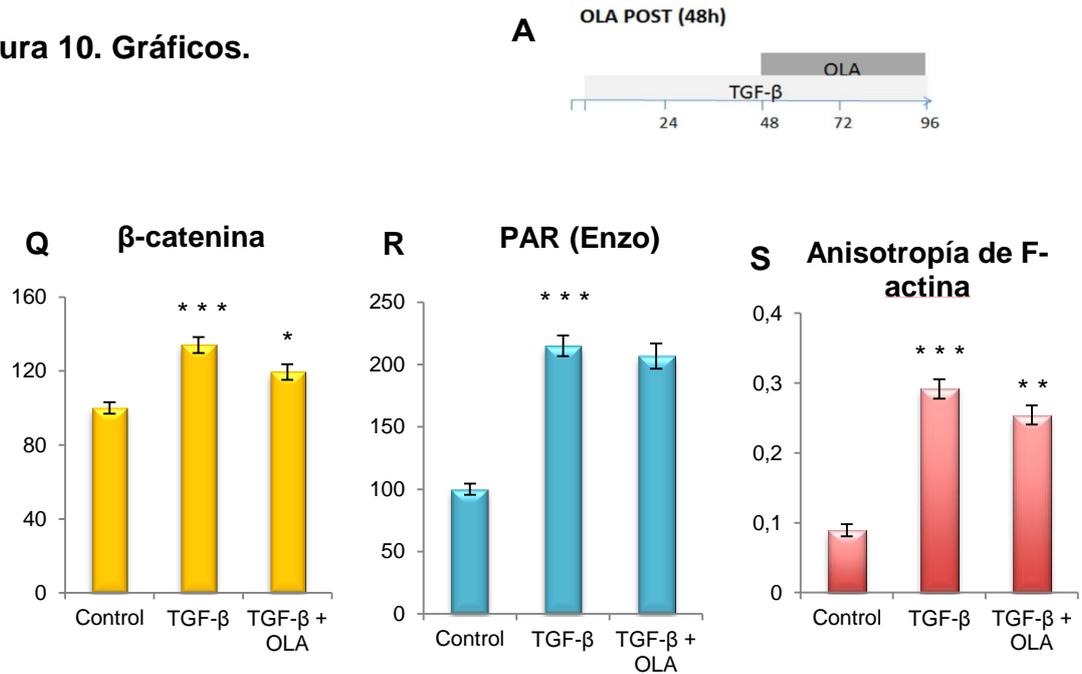


Figura 10. Un tratamiento extendido de Olaparib pudo revertir la TEM. Se indujo la TEM en células NMuMG con un tratamiento de TGF- β (5 ng/mL) de 96 h en ausencia o presencia de Olaparib (50 nM) durante las últimas 48 h del tratamiento **(A)**. Panel: planos confocales para F-actina con su barra de anisotropía en verde, β -catenina, PAR (Enzo), DAPI y la superposición; en células control **(B-F)**, tratadas solo con TGF- β **(G-K)** y con Olaparib en las últimas 48 h **(L-P)**. Barra: 10 μ m. Gráficos: Intensidad de fluorescencia de β -catenina **(Q)**; PAR (Enzo)**(R)** y anisotropía de F-actina **(S)**. Para cuantificar PAR se analizó un experimento con al menos 100 planos para cada categoría. Para cuantificar β -catenina se analizaron 2 experimentos independientes, con un total de al menos 200 planos para cada categoría. Las intensidades de fluorescencia total están expresadas como porcentaje del control. Para la anisotropía se cuantificaron 2 experimentos independientes, con al menos 65 planos en cada categoría, los cuales corresponden a los 3 planos con mayor intensidad de fluorescencia de actina de cada stack y se les aplicó un filtro gaussiano de radio 1. Media \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Discusión

Las células NMuMG presentaron PAR asociada al cinturón de adhesión (Figura 6), al igual que otros epitelios con uniones intercelulares ricas en E-cadherina (Lafon-Hughes et al., 2014, 2016). La detección del polímero en el cinturón de adhesión con el anticuerpo de BD indicaría que es un polímero corto y lineal, como el que se ha descrito que sintetizan las TNKS (Yeh et al., 2006; Vyas et al., 2014).

Se utilizaron dos anticuerpos anti-PAR (ENZO y BD) debido a que el de BD ya no se produce y tenemos muy poca cantidad disponible (Figura 7). Si bien en nervios de ratón las marcaciones de PAR con ambos anticuerpos mostraron el mismo patrón (Lafon-Hughes et al., 2017), en las células NMuMG se observaron diferencias, a saber: (i) el anti-PAR de ENZO, fabricado contra PAR de 2 a 50 monómeros, dio una marcación detectable y medible pero pobre; (ii) no marcó el cinturón de adhesión como el de BD y (iii) marcó una cantidad de vesículas extracelulares, indicando que había PAR en esas vesículas. PARP-1 ha sido identificada en vesículas extracelulares provenientes de queratinocitos (Tesis de Doctorado de Trang Than, 2017) y se ha demostrado indirectamente que cumple un rol en la comunicación intercelular por exosomas (Nozaki et al., 2018). PARP-1 y otros miembros de la familia se han detectado en exosomas de cáncer colorrectal, melanoma y carcinoma hepático (EXOCARTA; Keerthikumar et. al. 2015). Casi todos los integrantes de la

familia de las PARPs, incluyendo TNKS, han sido detectados en microvesículas o ectosomas (Vesiclepedia; Kalra et al., 2016). Es interesante destacar que ya se ha descrito que PAR de las vesículas actúa como una señal parácrina (Krukenberg et al., 2015).

Tanto los marcadores moleculares clásicos de la TEM estudiados (E-cadherina y Vimentina), como los cambios observados de localización subcelular de Vinculina y la formación de fibras de estrés, que se vio reflejada en el aumento de anisotropía, confirmaron que el tratamiento con TGF- β (5 ng/mL, 48 h) indujo la TEM en células NMuMG (Figura 8). En estas condiciones se observó un aumento de PAR total y nuclear, así como la pérdida total o parcial del cinturón de PAR acompañando la pérdida del cinturón de adhesión. En la TEM, las uniones intercelulares fuertes y ricas en E-cadherina son sustituidas por uniones más laxas ricas en N-cadherina (Kalluri & Weinberg, 2009). Junto con la presencia de PAR en epitelios ricos en E-cadherina como el intestino y la ausencia de PAR en córnea bovina rica en N-cadherina, los datos muestran una correlación que sugiere que PAR podría tener un rol en el fortalecimiento de las uniones ricas en E-cadherina.

Dado que las células que cursaron TEM presentaron altos niveles de PAR, se decidió estudiar los efectos de un inhibidor de PARPs sobre dicho proceso. Se eligió el olaparib (OLA) debido a que ya se utiliza como droga anti-cáncer en ciertas situaciones específicas (*Food and Drug Administration*, EEUU; Robson et al., 2017).

Según la evaluación realizada de la intensidad de E-cadherina y Vimentina, así como de la anisotropía de la actina, el co-tratamiento con OLA (50 nM) durante 48 h fue efectivo para prevenir la TEM inducible por TGF- β (5 ng/mL). Es decir que OLA previno la TEM, de acuerdo a parámetros moleculares y morfológicos. Con respecto a la evaluación de PAR (Enzo), hemos de aclarar que si bien el tratamiento con OLA mostró una tendencia a su disminución, ésta no fue significativa. Dado que estamos trabajando en un sistema con alta variabilidad, es probable que solamente detectemos cambios que sean relativamente grandes y la sensibilidad no haya sido suficiente apropiada para detectar una leve disminución de PAR. Una posibilidad sería evaluar PAR nuclear por separado de PAR citoplásmica. También se podría realizar *western blots* con anticuerpos anti-PAR sobre homogenados de fracciones celulares nuclear y citoplásmica. No se puede descartar que a pesar que OLA es específico para PARP-1/2 y fue utilizado a una concentración adecuada para no afectar otras PARPs, haya ocurrido algún efecto inespecífico.

El co-tratamiento no permite distinguir prevención de reversión de la TEM. Obviamente, a efectos clínicos es relevante la pregunta de si OLA puede revertir la TEM. Por ese motivo, realizamos experimentos manteniendo TGF- β por 72 h y agregando OLA durante las últimas 24 h. En estas condiciones, se obtuvo una reversión parcial del fenotipo mesenquimal (Figura 9), caracterizada por disminución de Vimentina y de la anisotropía de la actina, concomitante con una disminución -y no un aumento- de E-

cadherina. Ya ha sido descrita la existencia de fenotipos intermedios o híbridos, que cuentan con características epiteliales y mesenquimales simultáneamente, cuyo significado biológico está actualmente en discusión (Jolly et al., 2015). En este caso sí se detectó una disminución significativa de PAR (BD) en respuesta al OLA.

Dado que la reversión del fenotipo mesenquimal con OLA (24h) fue parcial, extendimos el tratamiento. Las células fueron expuestas 96 h a TGF- β con presencia de OLA en las últimas 48 h. Nuevamente, utilizando el anti-PAR de ENZO, se detectó una tendencia no significativa a la disminución de PAR en presencia de OLA. Sin embargo, en estas condiciones, en que el tratamiento inductor de TEM y el de OLA duraron el mismo tiempo, se observó reversión del fenotipo mesenquimal de acuerdo a los indicadores β -catenina y anisotropía de actina.

Como se había mencionado en la introducción, aún existen puntos de vista opuestos sobre el rol de las PARPs y la poli-ADP-ribosilación en la TEM. Los autores Huang et al. (2011) demostraron que en células de músculo liso vascular de rata el tratamiento de las células con TGF- β , estimula la activación de PARP-1, lo cual a su vez estimula la fosforilación de Smad3 y su acumulación nuclear. PARP-1 luego se une a Smad3 fosforilada en el núcleo, promoviendo su unión a secuencias consenso en el ADN para inducir la transcripción de genes que responden a TGF- β . Es más, en dicho sistema el inhibidor de reacciones NAD⁺-dependientes 3-AB, el iPARPs PJ34 o el knockdown de PARP utilizando siRNAs,

previenen la transcripción Smad-dependiente. Por lo tanto, PARP-1 es pro-TEM y los iPARPs cumplirían una función anti-TEM, como en nuestros experimentos en las células NMuMG.

Pu et al. (2014) plantean por el contrario, que la pérdida de PARP-1 en la TEM tiene un efecto pro-TEM. Este trabajo fue realizado en ratones TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), que desarrollan formas progresivas de cáncer de próstata metastático espontáneamente luego de la pubertad (Hurwitz et al., 2001). Estos ratones fueron cruzados con ratones portadores de PARP-1 inactiva o (-/-). Es importante aclarar que el *background* genético original de los ratones PARP-1 (-/-) es la línea 129Sv que según han descrito Jiang & Nadeau (2001), son conocidos por ser proclives a desarrollar cáncer de testículo. Es decir que los ratones PARP-1 -/- estaban sesgados hacia el cáncer de testículo desde antes de portar la mutación en PARP-1. Los controles, PARP-1 (+/+) no provienen del mismo *background* genético. Nos preguntamos cómo serían los ratones TRAMP PARP-1 (-/-) sin el *background* genético proclive al cáncer testicular de los 129Sv.

Lönn et al. (2010) plantean en el cuerpo principal de su trabajo que al hacer *knockdowns* de PARP-1 aumenta la expresión de genes que responden a TGF- β en varias líneas celulares, entre ellas HaCat y NMuMG, lo cual atribuiría un efecto pro-TEM a la pérdida de función de PARP-1. Sin embargo, en la figura suplementaria S2 demuestran que

TGF- β en células HaCaT induce un aumento de PARilación nuclear mediada por PARP-1, y que al silenciar PARP-1 desaparece la PARilación de las proteínas que había surgido en respuesta a TGF- β , lo cual atribuiría un efecto anti-TEM al silenciamiento de PARP-1. No discuten cómo compatibilizar la interpretación de ambos resultados aparentemente contradictorios.

En células NMuMG, el inhibidor de PARP-1/2 OLA previno o revirtió la TEM inducida por TGF- β , es decir tuvo un efecto anti-TEM. Nuestros datos aportan una nueva perspectiva para interpretar los efectos de OLA en el contexto de las terapias anti-tumorales.

Descifrar cómo OLA interfiere o revierte la señalización por TGF- β está fuera del alcance de este trabajo. De cualquier modo, a continuación discutiremos algunas posibilidades.

La señalización por TGF- β es extremadamente compleja. No solamente existe la vía canónica y varias vías no canónicas de señalización que dependen de la activación de los receptores TBRII/TBRI y cascadas de fosforilación en serina/treonina o en tirosinas, sino que existe todo un sistema de modulación de estas señales dependiente de la interacción de TGF- β y unos 40 factores de su familia con sus respectivos receptores de tipo I y II y con co-receptores que facilitan o compiten por la unión de los receptores al ligando (Santibañez et al., 2011). Además, por ejemplo Smad activa la transcripción de uno u otro conjuntos de genes

dependiendo de los *pool*s disponibles de otros factores de transcripción con los que actúa coordinadamente. Como resultado de esta red, el efecto final del TGF- β depende del contexto celular. La visión más aceptada actualmente es que TGF- β tiene un rol dual: en células epiteliales es un factor regulador del ciclo celular, promotor de diferenciación y apoptosis, por lo tanto se comporta como supresor tumoral; en células con ciertas alteraciones, por el contrario, TGF- β se comporta como un factor inductor de TEM, promotor tumoral, promotor de metástasis, supresor del sistema inmune y promotor de angiogénesis (Santibañez et al., 2011; Connolly et al., 2012; Principe et al., 2013). Así, por ejemplo, TGF- β cumple funciones regulatorias en el colon normal, así como durante el desarrollo y metástasis del cáncer colorrectal (Villalba et al., 2017). De acuerdo a esto, las células NMuMG habrían respondido a TGF- β sufriendo TEM debido a que ya presentaban alguna alteración de sus vías de señalización. OLA tendría la capacidad de revertir o contrarrestar dicha alteración, tal vez por afectar la actividad de PARP-1/2 nuclear, citoplásmica o - como se sugiere en el anexo A - presente en exosomas.

No siempre se detectó disminución de PAR en respuesta a OLA. Esto puede deberse a un problema técnico (de sensibilidad, o de no haber utilizado el anticuerpo más adecuado para PAR de cadena larga) o significar que OLA hizo un efecto sin alterar sustancialmente el *pool* de

PAR. Queda abierta la posibilidad de que exista algún otro blanco molecular inespecífico no descrito de la acción de OLA.

Anexo A.

Fenotipo alterado de las células NMuMG (pasajes 6-9) en condiciones control

Originalmente se planteaba en este trabajo profundizar más en los tratamientos del esquema temporal de 96 h de TGF- β con Olaparib durante las últimas 48 h. Esto no fue posible ya que las células comenzaron a mostrar un fenotipo alterado. Los experimentos de co- y post- tratamiento mencionados anteriormente fueron realizados con células que nunca superaron 18 pasajes. En cierto momento comenzamos a observar un fenotipo similar al mesenquimal de las células cultivadas en condiciones control. Dado que frecuentemente con un alto número de pasajes pueden adquirir un fenotipo transformado, decidimos recurrir a células desde el pasaje 6, en las cuales observamos las mismas características. Las células en condiciones control presentaban mucha marcación de Vimentina (Figura 11 C). La E-cadherina tenía un aspecto de cremallera característico de la TEM (Figura 11 B, F), al igual que la actina (Figura 11 A, E). En la monocapa observábamos pequeñas regiones que con un fenotipo epitelial, pero principalmente regiones con uniones intercelulares desensambladas y con un aspecto mesenquimal. Con respecto a PAR, detectamos marcación nuclear por ICF directa e indirecta con el anti-PAR de Enzo (Figura 11 G), y el mismo patrón con el anticuerpo del clon H10 (Figura 11 I). Este último detecta polímero PAR

largo y ramificado nuclear, característico de células sometidas a condiciones de estrés. Estos resultados apuntan a que el fenotipo mesenquimal observado en las condiciones de cultivo normales no dependía del número de pasajes realizados (Figura 11).

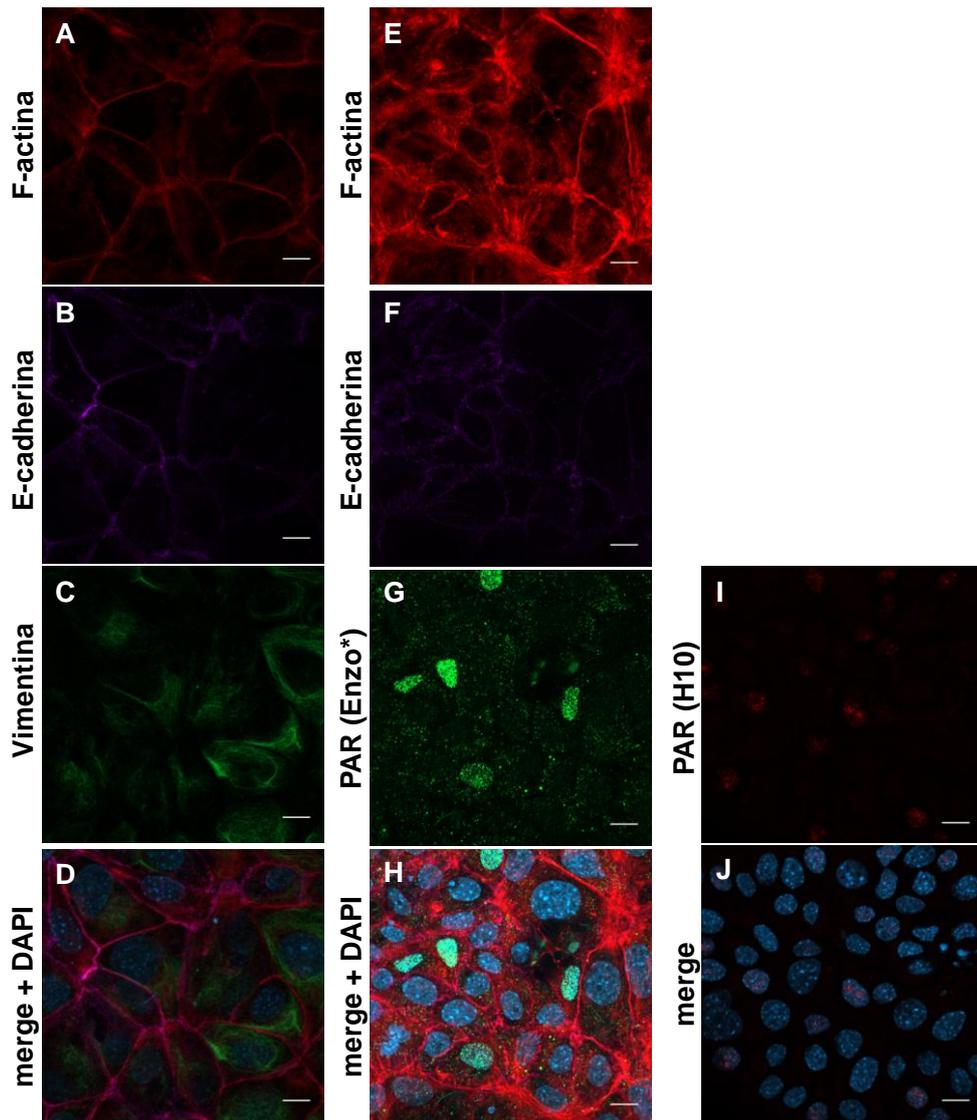


Figura 11. Las células NMuMG cultivadas en condiciones control con bajo número de pasajes (6-12) presentaron un fenotipo alterado. Se muestran planos confocales de F-actina (A,E), E-cadherina (B,F), Vimentina (C), anti-PAR de

Enzo* por inmunomarcación directa **(G)** y anti-PAR del clon H10 **(I)**, y la superposición + DAPI **(D,H,J)**. Se realizó 3 experimentos independientes. Barra: 10 μ m.

Dado que utilizar células con menor cantidad de pasajes no resolvió el problema comenzamos una búsqueda en la bibliografía disponible.

Se ha detectado TGF- β asociado a vesículas extracelulares (ECVs) en fluidos como leche y suero (Pieters et al., 2015; Cavallari et al., 2017), así como en exosomas derivados de células mesenquimales de endometrio (Álvarez et al., 2018). Los exosomas provenientes de cáncer de vejiga contienen TGF- β que por una vía Smad-dependiente inducen la alteración de fibroblastos normales a tipo carcinoma (Goulet et al., 2018). Además, el FBSf usado para complementar el medio de cultivo puede contener TGF- β en cantidades no despreciables. A modo de ejemplo, un cultivo de células T murinas en medio con 10% de FBS contiene entre 1000-2000 pg/mL de TGF- β (Oida & Weiner, 2010). Según Malm et al. (2018), el FBS utilizado para el cultivo de células es capaz de inducir la TEM en células BEAS-2B provenientes de epitelio de pulmón humano. Esto nos llevó a pensar que el fenotipo que observamos en las células NMuMG en condiciones normales podría deberse a la presencia de TGF- β en concentraciones no despreciables en el FBS, y que además la vía del TGF- β está asociada a exosomas. Decidimos pues testar si las células

seguían siendo sensibles a cambios en TGF- β y si era posible acercar su fenotipo al epitelial mediante esquemas de tratamiento que implicaran la depleción de TGF- β (Figura 12).

Si el FBS que estábamos utilizando contenía TGF- β mayormente asociado a exosomas, entonces al ultracentrifugar el medio de cultivo complementado con FBSf, se depletarían los exosomas disminuyendo la concentración de TGF- β (situación a). Por otra parte, ya que la TEM es reversible en ausencia de TGF- β , al mantener las células en un exceso de TGF- β , podrían internalizar los receptores y adaptarse, de manera que al depletar este TGF- β podríamos obtener un fenotipo epitelial nuevamente (situación b).

Para poner a prueba esto, a partir de células NMuMG cultivadas en medio de cultivo con 10% de FBSf, se mantuvieron dos frascos de células por 3 días, uno en condiciones control y el otro con TGF- β a 10 ng/mL. Luego de los 3 días se realizó la siembra de la manera habitual. Para testar la hipótesis (a) se partió del frasco con condiciones normales de cultivo. En algunos pocillos luego de la siembra se continuó con las condiciones normales ("Control") y en otros se utilizó medio de cultivo complementado con 20% FBSf, ultracentrifugado a 100.000 g durante 12 h a 4°C ("UCF") por 48 h. Para testar la hipótesis (b) se partió del frasco con TGF- β para sembrar. En algunos pocillos se continuó con el tratamiento de TGF- β a 10 ng/mL (" + TGF- β "), y en otros pocillos se dejaron las condiciones control ("sin TGF- β ") por 48 h. En la figura 12 A se muestran los

esquemas temporales para cada condición. Analizamos la intensidad de fluorescencia de Vimentina para verificar si la TEM se revertía.

En referencia a la hipótesis (a) en UCF se detectó menos Vimentina que en Control (Figura 12 B-E, J), y con respecto a la hipótesis (b) observamos que en -TGF- β disminuyó la cantidad de Vimentina con respecto a +TGF- β (Figura 12 F-I, K). Ambos resultados apuntan a que se revirtió el fenotipo mesenquimal al depletar el TGF- β contenido en el FBS y también al depletar el TGF- β en exceso. De hecho, la cantidad de Vimentina en UCF y sin TGF- β presentan porcentajes similares, al comparar con Control y +TGF- β respectivamente (Figura 12 J, K).

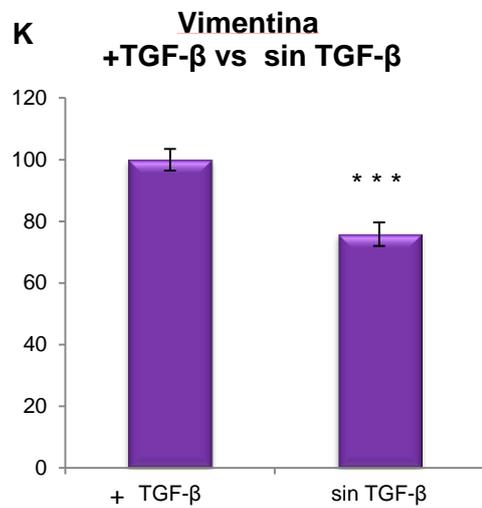
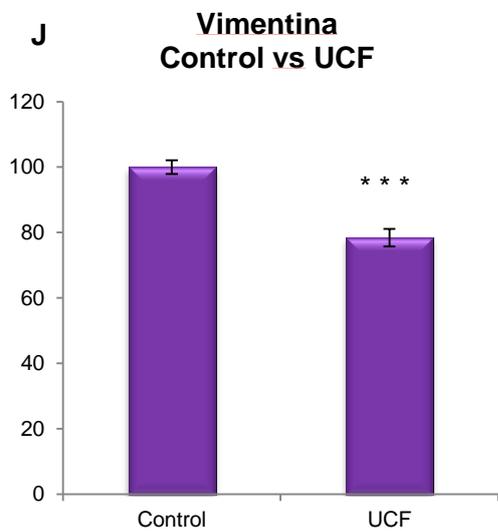
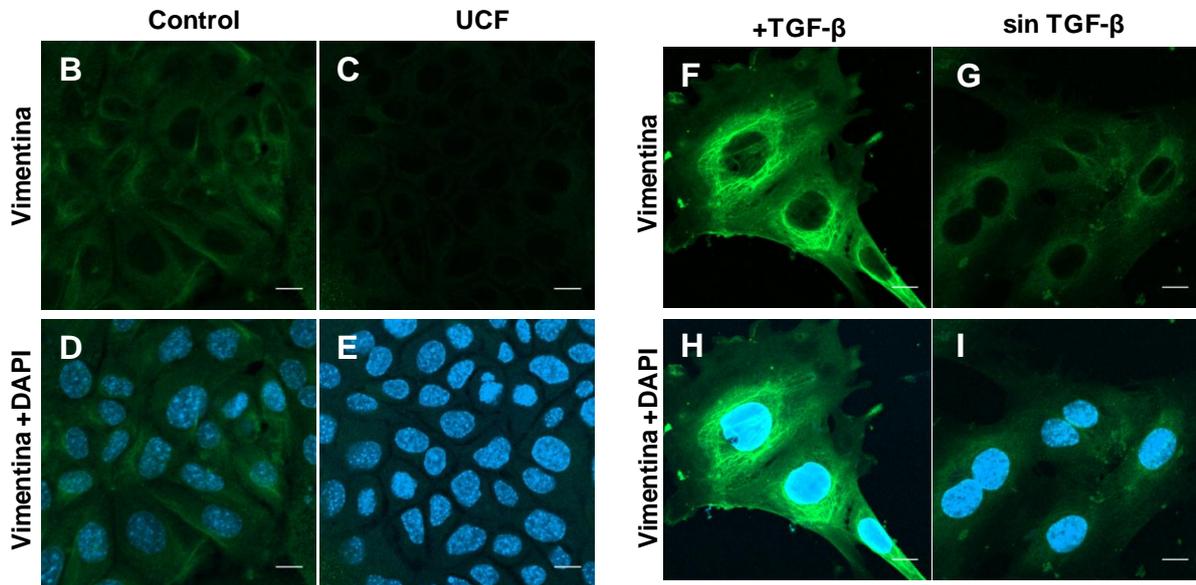
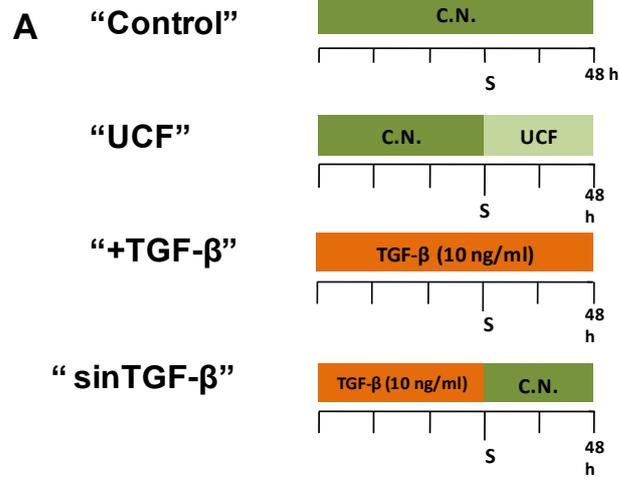


Figura 12. La depleción de TGF- β revirtió la TEM de células NMuMG con fenotipo alterado “en condiciones control” al menos parcialmente. Se partió de células NMuMG en medio de cultivo con 10% de FBS y se separaron dos frascos: uno en las mismas condiciones y el otro con TGF- β a 10 ng/mL. Luego de 3 días se realizó la siembra. A partir del frasco en condiciones normales se sembraron células que continuaron con las mismas condiciones ("Control") y otras que se cultivaron en medio con 20% de SFB ultracentrifugado ("UCF"). A partir del frasco con exceso de TGF- β se sembraron células que continuaron con este exceso ("+ TGF- β ") y otras que se cultivaron en ausencia del mismo ("sin TGF- β ") **(A)**. Panel: planos confocales de Vimentina y Vimentina + DAPI para células Control **(B,D)**, UCF **(C,E)**, +TGF- β **(F,H)** y sin TGF- β **(G,I)**. Barra: 10 μ m. Gráficos: intensidad de fluorescencia de Vimentina de Control versus UCF, y +TGF- β versus -TGF- β . Los datos provienen de 3 experimentos independientes, con al menos 250 planos cuantificados para cada categoría. Los datos están expresados como porcentaje del control. Media \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Dado el fenotipo alterado, de aspecto mesenquimal de las células NMuMG en condiciones de cultivo normales, decidimos comprobar si además presentaban daño genético. El tipo más letal de roturas de ADN son las roturas de doble cadena. Estas provocan la fosforilación de la variante histónica H2AX, formando γ -H2AX en dominios de cromatina flanqueando las lesiones (Rogakou et al., 1998). Esto permite la inmunodetección de las roturas con un anticuerpo anti- γ -H2AX, en foci

nucleares o de forma pan-nuclear. Al cultivar células NMuMG en condiciones normales (con 10 % SFB), observamos la presencia de una gran cantidad de células con foci de γ -H2AX, y también algunas con distribución pan-nuclear, que podrían corresponder a células apoptóticas (Liddle et al., 2014) (Figura 13).

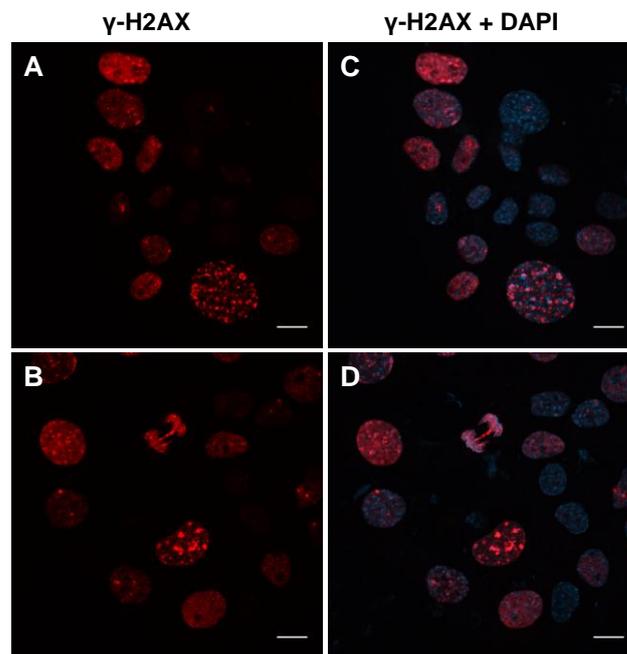


Figura 13. Las células NMuMG alteradas, presentaron daño genético en condiciones control. Inmunocitofluorescencia de γ -H2AX (A,B) y contratinción de DAPI (C,D) en células en medio de cultivo con 10% SFB. Se observan células con foci de γ -H2AX y células pan-nucleares. Se muestran dos campos representativos. Esta marcación se observó en dos experimentos. Barra: 10 μ m.

En definitiva, 8 experimentos independientes realizados en las células NMuMG con aspecto alterado utilizando alguno de los diferentes marcadores de interés mostraron que dichas células tienen E-cadherina en cremallera, Vimentina aumentada, daño genético evidenciado mediante γ -H2AX y PAR nuclear no sólo de cadena corta, sino también de cadena larga, sugiriendo que éstas células estaban estresadas y estaban sufriendo TEM en ausencia de TGF- β agregado expresamente. Si bien numerosos estímulos pueden desencadenar TEM (Rhyu et Al., 2005; Maeda et al., 2012; Krstic & Santibañez, 2014), nuestros datos sugieren que las células siguen siendo sensibles al TGF- β y que el TGF- β presente en exosomas de SFB puede haber sido al menos parcialmente responsable de las alteraciones observadas.

Referencias bibliográficas

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) **Molecular Biology of the Cell**. 4° Ed. New York. Garland Science.
- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, Macías-García B, Gómez-Serrano M, Jorge I, Vázquez J, Blázquez R, Casado J. (2018). The immunomodulatory activity of extracellular vesicles derived from endometrial mesenchymal stem cells on CD4+T cells is partially mediated by TGFbeta. **J Tissue Engineering and Regenerative Medicine** 12(10): 2088-2098.
- Anwar M, Aslam HM, Anwar S. (2015) PARP inhibitors. **Hered Cancer Clin Pract**.13(1): 4.
- Aomatsu K, Arao T, Sugioka K, Matsumoto K, Tamura D, Kudo K, Kaneda H, Tanaka K, Fujita Y, Shimomura Y, Nishio K (2011). TGF- β induces sustained upregulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 52(5): 2437-2434.
- Bai P (2015) Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. **Mol Cell** 58: 947-958.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL (2001). Transforming growth factor beta 1 mediates epithelial to mesenchyma ltransdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Mol Biol Cell** 12:27-36.
- Bizet AA, Liu K, Tran-Khanh N, Saksena A, Vorstenbosch J, Finnson KW, Buschmann MD, Philip A (2011). The TGF- β co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- β receptors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1813: 742-753.
- Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T (1998) Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in

colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. **Pathol Res Pract** 194: 701-704.

- Bordeaux J, Welsch AW, Agarwal S, Killiam E, Baquero MT, Hann JA, Anagnostou KV, Rimm DL. (2010) Antibody Validation. **Biotechniques** 48(3): 197-209.
- Boudaoud A, Burian A, Borowska-Wykre D, Uyttewaal M, Wrzalik R, Kwiatkowska D, Hamant O. (2014) FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. **Nat Protoc** 9(2): 457-463.
- Cavallari C, Ranghino A, Tapparo M, Cedrino M, Figliolini F, Grange C, Giannachi V, Garneri P, Deregibus MC, Collino F, Rispoli P, Camussi G, Brizzi MF (2017). Serum-derived extracellular vesicles (EVs) impact on vascular remodeling and prevent muscle damage in acute hind limb ischemia. **Sci Rep** 7(1): 8180.
- Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ (2012). Complexities of TGF- β Targeted Cancer Therapy. **Int J Biol Sci** 8: 964-978.
- Cooper GM (2000). **The Cell: A Molecular Approach**. 2da Ed. Sunderland (MA):Sinauer Associates.
- Dahl M, Maturi V, Lönn P, Papoutsoglou P, Zieba A, Vanlandewijck M, van der Heide LP, Watanabe Y, Söderberg O, Hottiger MO, Heldin CH, Moustakas A (2014). Fine-Tuning of Smad Protein Function by Poly(ADP-Ribose) Polymerases and Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase during Transforming Growth Factor β Signaling. **PLoS ONE** 9(8): e103651.
- Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA (2011) The Transcription Factors Snail and Slug Activate the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway in Breast Cancer. **PLoS ONE** 6(10): e26514.
- D'Onofrio G (2011). Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) signaling of DNA damage induced by Topoisomerase 1 (TOP1) inhibition in

carcinoma cells: chemotherapeutic implications of PARP and TOP1 inhibitors. **Tesis de Doctorado**. Universidad de Nápoles - Federico III.

- U.S. Department of Health and Human Services. (2017). FDA approves olaparib tablets for maintenance treatment in ovarian cancer. (Internet). **Food & Drug Administration**. Disponible desde: <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm572143.htm>. [31/10/2018].
- U.S. Department of Health and Human Services.(2018). FDA approves olaparib for germline BRCA-mutated metastatic breast cancer. (Internet). **Food & Drug Administration**. Disponible desde: <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm592357.htm>. [31/10/2018].
- Geneser F (1998). **Atlas color de Histología**. 1° Ed., Madrid. Editorial Médica Panamericana SA. p:17-20.
- Gilbert SF .(2010).**Developmental Biology**. 9° Ed. Sunderland. Sinauer Associates.
- González DM, Medici D (2015). Signaling mechanisms of the epithelial mesenchymal transition. **Sci Signal** 7(344): re8.
- Goulet CR, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F (2018). Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-associated Fibroblasts through TGF- β Signaling. **American Association for Cancer Research**. doi: 10.1158.
- Hall A (2009). The cytoskeleton and cancer. **Cancer Metastasis Rev** 28(1-2): 5-14.
- Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. **Mol Biol Cell** 22(24): 4750-4764.

- Hölzel M, Bovier A, Tüting T (2012). Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? **Nat Rev Cancer** 13: 365-376.
- Hong P, Horbinski C, Hensley PJ, Matuszak EA, Atkinson T, Kyprianou N (2014). PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis. **Carcinogenesis**. 35(11): 2592-2601.
- Hottinger MO (2015). Snapshot: ADP-Ribosylation Signaling. **Mol Cell**. 58: 1134.
- Huang D, Wang Y, Wang L, Zhang F, Deng S, Wang R, Zhang Y, Huang K (2011). Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 is Indispensable for Transforming Growth Factor- β Induced Smad3 Activation in Vascular Smooth Muscle Cell. **PLoS ONE** 6(10): e27123.
- Hurwitz AA, Foster BA, Allison JP, Greenberg NM, Kwon ED. (2001). The TRAMP mouse as a model for prostate cancer. **Curr Protocol Immunol** Chapter 20, Unit 20.5. doi: 10.1002/0471142735.im2005s45.
- Jiang LI & Nadeau JH (2001). 129/Sv mice- a model system for studying germ cell biology and testicular cancer. **Mammalian Genome** 12: 84-94.
- Jolly MK, Boareto M, Huang B, Dongya J, Mingyang L, Ben-Jacob E, Onuchic JN, Levine H (2015). Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. **Front Oncol**. 5:155.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 119(6): 1420-1428.
- Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. **Int J Mol Sci** 17(2): 170.
- Kawamitsu H, Hoshino H, Okada H, Miwa M, Momoi H, Sugimura T (1984). Monoclonal Antibodies to Poly(adenosine diphosphate ribose) Recognize Different Structures. **Biochemistry** 23: 3771-3777.

- Keerhikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, Mechler A, Adda CG, Ang CS, Mathivanan S (2015). Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. **Oncotarget** 6(17): 15375-15396.
- Krstic J, Santibañez JF (2014). Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. **Scientific World Journal** doi: 10.1155/2014/521754.
- Krukenberg KA, Kim S, Tan ES, Maliga Z, Mitchison TJ. Extracellular poly(ADP-ribose) is a pro-inflammatory signal for macrophages. **Chem Biol** 22(4): 446-452.
- Kun A, Canclini L, Rosso G, Bresque M, Romeo C, Hanusz A, Cal K, Calliari A, Sotelo Silveira J, Sotelo JR (2012). F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves. **Cytoskeleton** 69: 7.
- Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L, Martínez-López W (2008). Chromatin remodelling mechanisms in cancer. **Mutat Res** 658: 191-214.
- Lafon-Hughes L, Vilchez Larrea SC, Kun A, Fernández Villamil SH (2014) VERO cells harbor a poly-ADP-ribose belt partnering their epithelial adhesion belt. **PeerJ** 2: e617
- Lafon-Hughes L, Romeo C, Cal K, Vilchez-Larrea S, Villamil S, Folle G, Sotelo JR, Kun A. (2016). Poly-ADP-ribose: New Localizations and Increase in Peripheral Nerves of Trembler-J Mice. **CSHL: The PARP Family & ADP-Ribosylation**.(Poster).
- Lafon Hughes L, Romeo Cardeillac CJ, Cal Castillo KB, Vilchez-Larrea SC, Sotelo Sosa JR, Folle Ungo, GA, Fernández Villamil SH, Kun González AE. (2017). Poly(ADP-ribosylation) is present in murine sciatic nerve fibers and is altered in a Charcot-Marie-Tooth neurodegenerative model. **PeerJ** 10(5): e3318.

- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. **Nat Rev Mol Cell Biol** 15(3): 178-196.
- Larsen SC, Hendriks IA, Nielsen ML (2018). Site-specific analysis of the ADP-ribosylome reveals the extent and prominence of serine-ADP-ribosylation upon oxidative stress. **CSHL: The PARP Family & ADP-Ribosylation** (Poster).
- Li T, Guo H, Song Y, Zhao X, Shi Y, Lu Y, Hu S, Nie Y, Fan D, Wu K (2014). Loss of vinculin and membrane bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. **Molecular Cancer** 13: 263.
- Liddle P, Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Reyes-Ábalos AL, Jara J, Cerda M, Härtel S, Folle G. (2014). Bleomycin-induced γ -H2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei. **Chromosome Res** 22: 463-481.
- Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK (2015) Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget** 6(18): 15966-15983.
- Lönn P, van der Heide LP, Dahl M, Hellman U, Heldin CH, Moustakas A (2010). PARP-1 Attenuates Smad-Mediated Transcription. **Molecular Cell** 40: 521-532.
- Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. (2004). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. **Journal of Cell Science** 118: 873-887.
- Maeda T, Sakabe T, Sunaga A, Sakai K, Rivera LA, Keene DR, Sasaki T, Stavnezer E, Iannotti J, Schweitzer R, Ilic D, Baskaran H, Sakai T (2012). Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals. **Curr. Biol** 21(11): 933-941.

- Mahdi SHA, Cheng H, Li J, Feng R (2015). The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 583: 18-26.
- Malm SW, Amouzougan EA, Klimecki WT.(2018). Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line. **Toxicol in Vitro** 50: 383-390.
- Mao Y, Xu J, Li Z, Zhang N, Yin H, Liu Z (2013) The Role of Nuclear β -Catenin Accumulation in the Twist2-Induced Ovarian Cancer EMT. **PLoS One** 8(11): e78200.
- Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR et al. (1994). TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. **J Cell Biol** 127: 2021-2016.
- Nozaki T, Sasaki Y, Fukuda I, Isumi M, Nakamoto K, Onodera T, Masutani M (2018). Next-generation sequencing-based miRNA expression analysis in Parp1-deficient embryonic stem cell-derived exosomes. **Biochem Biophys Res Commun** 499(3): 410-415.
- Oida T, Weiner HL (2010). Depletion of TGF- β from fetal bovine serum. **J Immunol Methods** 362(1-2): 195-198.
- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL (2005). Regulation of polarity protein Par 6 by TGF-beta receptors controls epithelial cell plasticity. **Science** 307(5715): 1603-1609.
- Pecina-Slaus N (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell Int** 3:17.
- Pengfei L, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011) Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring HarbPerspect Biol** 3(12): a005058.

- Perina D, Mikoc A, Ahela J, Cetkovic H, Zajab R, Ahelc I (2014) Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. **DNA Repair** 23: 4-16.
- Pieters BCH, Arntz OJ, Bennik MB, Broeren MGA, van Caam APM, Koenders MI, van Lent PLEM, van den Berg WB, de Vries M, van der Kraan PM, van de Loo FAJ (2015). Commercial Cow Milk Contains Physically Stable Extracellular Vesicles Expressing Immunoregulatory TGF- β . **PLoS ONE** 10(3): e0121123.
- Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, Pasche B, Lee C, Grippo PJ (2013) TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 106(2): djt369
- Pu H, Horbinski C, Hensley PJ, Matuszak EA, Atkinson T, Kyprianou N (2014). PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis. **Carcinogenesis** 35(11): 2592-2601.
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh S, Lee HB (2005). Role of Reactive Oxygen Species in TGF- β 1-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Tubular Epithelial Cells. **JASN** 16(3): 667-675.
- Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, Conte P (2017) Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. **N Engl J Med** 377(6): 523-533.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabasechromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. **J Cell Biol** 146: 905-915.
- Ross MH & Pawlina W (2007). **Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular**. 5^o Ed. Lippincot Williams & Wilkins, Inc. EEUU.

- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011). TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science** 121: 233-251.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods** 9(7): 671-675.
- Trang Than UY (2017). Extracellular membrane vesicles from Keratinocytes. **Tesis de Doctorado**. Queensland University of Technology.
- Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP (2010). The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- β in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 15(2): 169-190.
- Villalba M, Evans SR, Vidal-Vanaclocha F, Calvo A (2017). Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. **Cell Tissue Res** 370(1): 29-39
- Virág L y Szabó C. (2002) The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. **Pharmacol. Rev** 54: 375-429.
- Vyas S, Matic I, Uchima L, Rood J, Zaja R, Hay RT, Ahe I, Chang P (2014). Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. **Nat Commun** 5: 4426.
- Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP (2010) Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Facilitates Epidermal Growth Factor-Dependent Breast Cancer Progression. **Oncogene** 29(49): 6485-6498.
- Wendt MK, Tian M, Schiemann WP (2012). Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β induced EMT during cancer progression. **Cell Tissue Res** 347 (1): 85- 101.
- Yeh TY, Meyer TN, Schwesinger C, Tsun ZY, Lee RM, Chi NW. (2006). Tankyrase recruitment to the lateral membrane in polarized epithelial

cells: regulation by cell-cell contact and protein poly(ADP-ribosylation).
Biochemical Journal. 399: 415-425.

- Yu Q, Zhang K, Wang X, Liu X, Zhang Z (2010) Expression of transcription factors snail, slug and twist in human bladder carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 29(1): 119.
- Zhang YE (2016). Non-Smad Signalling Pathways of the TGF- β Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol** doi: 10.1101/cshperspect.a022129
- Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transition. **J Clin Invest** 119(6): 1429-1437.