

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

Función de VE-Cadherina no endotelial en el desarrollo del Mimetismo Vasculogénico en melanoma

Daniel Delgado Bellido

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ-NEYRA”
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

Universidad de Granada

2019



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Daniel Delgado Bellido
ISBN: 978-84-1306-411-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58771>

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	11
II. INTRODUCCIÓN	17
1. Cáncer y metástasis: una visión global.....	17
1.1 Melanoma uveal humano, metástasis y prognosis	20
1.2 Genética del melanoma uveal humano	21
1.3 Diagnóstico y tratamiento del melanoma uveal humano	22
2. Angiogénesis en el cáncer.....	25
2.1 Mecanismo de vascularización en cáncer: brotación endotelial	29
2.2 Mecanismo de vascularización en cáncer: Crecimiento microvascular por invaginación.....	32
2.3 Mecanismo de vascularización en cáncer: Angiogénesis Glomeruloide	33
2.4 Mecanismo de vascularización en cáncer: cooptación vascular.....	34
2.5 Mecanismo de vascularización en cáncer: Mimetismo Vasculogénico (VM) .	36
3. Mimetismo Vasculogénico (VM): función de los pseudo-vasos tumorales	39
3.1 Mimetismo Vasculogénico (VM): señalización intracelular	41
4. Cadherina endotelial vascular (VE-Cadherina)	46
4.1 Señalización de VE-Cadherina: VEGF	49
4.2 Señalización de VE-Cadherina: p120	51
4.3 Señalización de VE-Cadherina: Kaiso	54
4.4 Señalización de VE-Cadherina: VE-PTP	57
4.5 Señalización de VE-Cadherina: Focal Adhesion Kinase (FAK)	58
5. Hipoxia y VM.....	60
6. Microambiente tumoral y VM.....	61
7. Cancer Stem Cells (CSCs, células madre del cáncer) y VM.....	63
8. Terapia anti-vascular contra el cáncer	64
8.1 Terapia angiosupresora (agentes anti-angiogénicos).....	65
8.2 Terapia de focalización vascular: agentes disruptores vasculares (VDAs).....	67
8.3 Terapia contra el VM.....	69
III. OBJETIVOS	73

IV. MATERIAL Y METODOS.....	77
Reactivos y anticuerpos.....	77
Cultivos celulares.....	78
Silenciamientos transitorios con la tecnología siRNA (small interfering RNA)	80
<i>Western Blot</i> /Inmunotransferencia	81
RT-PCR.....	82
Inmunoprecipitación y subfraccionamiento celular	84
Experimentos de angiogénesis <i>in vitro</i>	85
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	86
Inmunofluorescencia:.....	88
Edición genética mediante la tecnología CRISPR-Cas9	90
Citometría de flujo.....	91
Microscopia electrónica	91
Experimentos de autofagia	92
V. RESULTADOS	97
Expresión elevada de pVE-Cadherina (pY658) en células de melanoma agresivo.....	97
La inhibición farmacológica de la FAK y su inhibición genética por siRNA disminuyen los niveles de expresión de pY658 de VE-Cadherina	99
Los anticuerpos de pY658 de VE-Cadherina reconocen específicamente la fosforilación de VE-Cadherina <i>in vitro</i>	101
Disminución de la capacidad de formar VM en las células MUM 2B a través de la inhibición farmacológica o siRNA de FAK.....	104
Alteraciones genéticas en la expresión de ARNm de FAK y en el gen de FAK en pacientes con melanoma uveal humano	105
La fosforilación de la Y658 de VE-Cadherina a través de la FAK participa en la importación nuclear de p120 catenina	107
VE-Cadherina forma un complejo con p120/Kaiso en el núcleo en un mecanismo dependiente de FAK	109
pY658 de VE-Cadherina impide la represión de los genes diana dependientes de Kaiso CCND1 y WNT 11.....	112

El silenciamiento de los genes diana dependientes de Kaiso (CNND1 y WNT 11) disminuye la formación de VM en MUM 2B.....	114
La fosforilación de VE-Cadherina en Y658 es esencial para la capacidad de formar VM en MUM 2B.....	116
La expresión de VE-PTP es esencial para la estabilidad de VE-Cadherina y para formar VM.....	118
VE-Cadherina y VE-PTP forman un complejo con p120 catenina en células de melanoma.....	122
EL complejo VE-Cadherina/VE-PTP esta involucrado en la resistencia a la degradación por vía autofágica de VE-Cadherina.....	124
VI. DISCUSIÓN	129
VII. CONCLUSIONES	139
VIII. REFERENCIAS	143
IX. ANEXOS	173

RESUMEN

I. RESUMEN

El fenómeno de angiogénesis tumoral denominado mimetismo vasculogénico (VM) es desarrollado como mecanismo aberrante de angiogénesis de supervivencia y adaptación a las condiciones que sufren las células tumorales revertidas a un fenotipo y genotipo desdiferenciado. El estudio de la formación, estabilización y progresión de los vasos sanguíneos en el cáncer se remonta a la década de 1960. En un inicio se realizaron diversas aproximaciones en el conocimiento de angiogénesis tumoral, siendo implicada en este enfoque principalmente como actor principal la liberación de VEGF por parte de las células tumorales con la consiguiente atracción sobre la producción de angiogénesis aberrante por crecimiento en brotación por parte de las células endoteliales adyacentes al tumor. En la década de 1990, se modelizaron diferentes mecanismos de angiogénesis tumoral, estando bajo sospecha de actuación las propias células tumorales en la formación de la angiogénesis tumoral.

En la presente tesis titulada “**Función de VE-Cadherina no endotelial en el desarrollo del mimetismo vasculogénico en melanoma**”, hemos elucidado el posible rol de VE-Cadherina, más en concreto, como la fosforilación en el residuo Y658 puede formar parte integrante del mecanismo de formación de VM por parte de las células tumorales de melanoma cutáneo y uveal. Los cambios postraduccionales de VE-Cadherina se han estudiado con eficiencia en diversos modelos de dinámica inter-celular y/o célula-célula, siempre sobre el foco mecanístico por parte de las células endoteliales normales. Colateralmente, la pY658 de VE-Cadherina se ha introducido como posible diana de la quinasa de adhesiones focales (FAK) en modelos tumorales. De hecho, la inhibición de la FAK a través del tratamiento específico inhibitorio de la actividad de la misma (PF-271) o su silenciamiento (siRNA FAK), incapacitó la posible fosforilación del residuo Y658 de VE-Cadherina con la consiguiente depleción de formación de VM en las líneas celulares MUM 2B (melanoma uveal) y C8161 (melanoma cutáneo) con capacidad de formar VM.

Por otro lado, es conocido que la dinámica de tráfico intracelular entre los movimientos de las cadherinas son dependientes de las proteínas ancladas a las mismas, dichas proteínas pertenecen a la familia de las cateninas. Más en

detalle, la catenina denominada p120 por su peso molecular, está envuelta en el desplazamiento o mantenimiento en membrana de E-Cadherina y de VE-Cadherina, todo ello orquestado por los diversos factores solubles que pueden repercutir en la localización intracelular de las mismas. La función de E-cadherina sobre la dinámica intracelular ha sido ampliamente estudiadas en diversas localizaciones intracelulares en compañía con p120 y β -catenina y estas a su vez tienen unión con diferentes factores transcripcionales (Kaiso). En esta tesis, a través de experimentos tanto por experimentos de subfraccionamiento celular y co-immunoprecipitación detectamos a VE-Cadherina formando complejo con p120 y Kaiso en el compartimento intracelular nuclear y que la inhibición de la FAK abolía dicha unión.

Se ha publicado y estudiado con anterioridad el posible impacto que puede suponer la unión de p120 a Kaiso y su desplazamiento a compartimentos subcelulares anómalos en la ruta de señalización de E-Cadherina y la consiguiente repercusión transcripcional sobre los genes dependientes de Kaiso. Nuestros resultados muestran y como aquí reportamos, VE-Cadherina es parte integrante del complejo p120/Kaiso en células de melanoma con capacidad de formar VM. La inhibición de la FAK o el silenciamiento de VE-Cadherina reprimen la expresión de los genes dependientes de Kaiso, por acumulación y reclutamiento del mismo sobre los promotores de CCND1 y WNT 11, como así también disminuye la capacidad de formación de VM. El desarrollo de la línea celular MUM 2B K.O para VE-Cadherina a través de la tecnología de edición génica CRISPR-Cas 9, nos permitió analizar el impacto que tiene la fosforilación de la Y658 de VE-Cadherina sobre la formación de VM. El rescate de VE-Cadherina WT revertía la capacidad de VM, por el contrario, el rescate de VE-Cadherina Y658 mutada a F (por tanto, no fosforilable) impidió a la línea celular MUM 2B la formación de VM. Demostrando así, la importante acción por parte de VE-Cadherina y la fosforilación basal en el residuo Y658 en el desarrollo aberrante de angiogénesis tumoral.

Finalmente, la implicación de VE-PTP sobre la dinámica y movimiento intracelular de VE-Cadherina está siendo objeto de estudio en la última década en relación a la función de la célula endotelial. En la presente tesis hemos abordado la posible actuación de VE-PTP en la formación de VM. Así, la expresión de VE-PTP se correlaciona con la de VE-Cadherina en las líneas

celulares de melanoma uveal (MUM 2B) y cutáneo (C8161). Además, VE-PTP es esencial en el mantenimiento y estabilidad de VE-Cadherina, ya que su silenciamiento produce la degradación de VE-Cadherina con la consiguiente depleción de formación de VM en experimentos de angiogénesis *in vitro*. Todo ello, debido en parte, a la disminución de expresión de los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11).

Por otro lado, a través de experimentos de co-inmunoprecipitación de p120 tras el silenciamiento de VE-PTP, observamos un incremento de las fosforilaciones globales sobre las tirosinas de p120, lo que sugería que VE-PTP podría estar implicada en la dinámica de mantenimiento del estado de fosforilación de p120 y en el mantenimiento del complejo pY658/p120. La persistencia de este complejo, incluso tras la fosforilación de VE-cadherina, puede estar en la base de la adquisición de plasticidad celular por parte de las células de melanoma con capacidad de VM.

Como conclusión, el estado de fosforilación de VE-Cadherina en el residuo Y658 confiere a las células de melanoma con capacidad de formación de VM adquirir una plasticidad y una capacidad de diferenciación parcial para así llegar a término el desarrollo tumoral, orquestado por la acción y unión de p120 y VE-PTP sobre VE-Cadherina y ejerciendo un efecto sobre la transcripción de genes implicados en el mantenimiento de VM. El estado de activación permanente de la quinasa FAK es, en parte, responsable de la fosforilación continua de VE-cadherina y la inhibición de FAK impide las acciones indebidas de la pY658 en el VM, siendo, por tanto, una posible diana terapéutica para impedir el desarrollo de angiogénesis aberrante de VM.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer y metástasis: una visión global

Se define como cáncer al conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células, las cuales invaden y dañan tejidos u órganos provocando finalmente la muerte del individuo.

El cáncer es el resultado de mutaciones en genes que regulan la proliferación y la homeostasis, incluida la muerte celular. Entre ellos se encuentran los oncogenes y los genes supresores de tumores. Alteraciones en éstos promueve la aparición del cáncer, ya que se produce la pérdida de control de procesos básicos celulares, como, por ejemplo, la función de un gen, el control del ciclo celular o la proliferación descontrolada debido a la ganancia de la función de un oncogén.

Se ha propuesto que la carcinogénesis supone la adquisición de al menos 6 alteraciones fundamentales en la fisiología celular que van a determinar la transformación maligna: proliferación autosuficiente, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis¹. En las dos últimas décadas a estas alteraciones se han adicionado nuevos marcadores emergentes relacionados con la reprogramación del metabolismo energético, la inflamación, la inestabilidad genómica y la evasión del sistema inmunológico. Además de las células tumorales, los tumores exhiben otro grado de complejidad, contienen un repertorio de células normales que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos creando el microambiente tumoral.

La diversidad de cánceres que surgen en los seres humanos supera las 200 entidades de enfermedades distintas, lo que refleja las diferencias en las células de origen normales, las mutaciones somáticas adquiridas, las redes transcripcionales alteradas de forma variable y las influencias de los microambientes de tejidos locales. Se han hecho intentos para destilar esta complejidad en un conjunto unificador de principios organizadores denominados signos distintivos del cáncer (**Fig. 1**). A pesar de los avances

significativos en el estudio, diagnóstico y tratamiento del cáncer, la gran mayoría de los pacientes con enfermedad metastásica avanzada se enfrentan a una enfermedad terminal que es, con rara excepción, incurable por los regímenes terapéuticos actuales. Dicho de otra manera, la abrumadora mayoría de las muertes asociadas al cáncer (alrededor del 90%) son causadas por una enfermedad metastásica en lugar de tumores primarios. La diseminación de células cancerosas de tumores primarios y su posterior implante de nuevas colonias tumorales en tejidos distantes implica un proceso de múltiples pasos conocido como la cascada de invasión-metástasis. Esta secuencia de eventos implica la invasión local de células tumorales primarias en los tejidos circundantes; intravasación de estas células en el sistema circulatorio y supervivencia durante el tránsito hematógeno; detención y extravasación a través de las paredes vasculares hacia el parénquima de tejidos distantes; formación de colonias micrometastásicas en este parénquima; y la posterior proliferación de colonias microscópicas en lesiones metastásicas manifiestas, clínicamente detectables, este último proceso se denomina colonización.

La metástasis es la diseminación de células malignas de un tumor primario a lugares distantes y es la causa de muerte de la mayoría de casos de cáncer. Numerosos estudios son constantemente publicados acerca de los diversos elementos involucrados en este proceso tan importante que, sin embargo, sigue siendo uno de los aspectos más enigmáticos de la enfermedad¹, (**Fig. 1**).

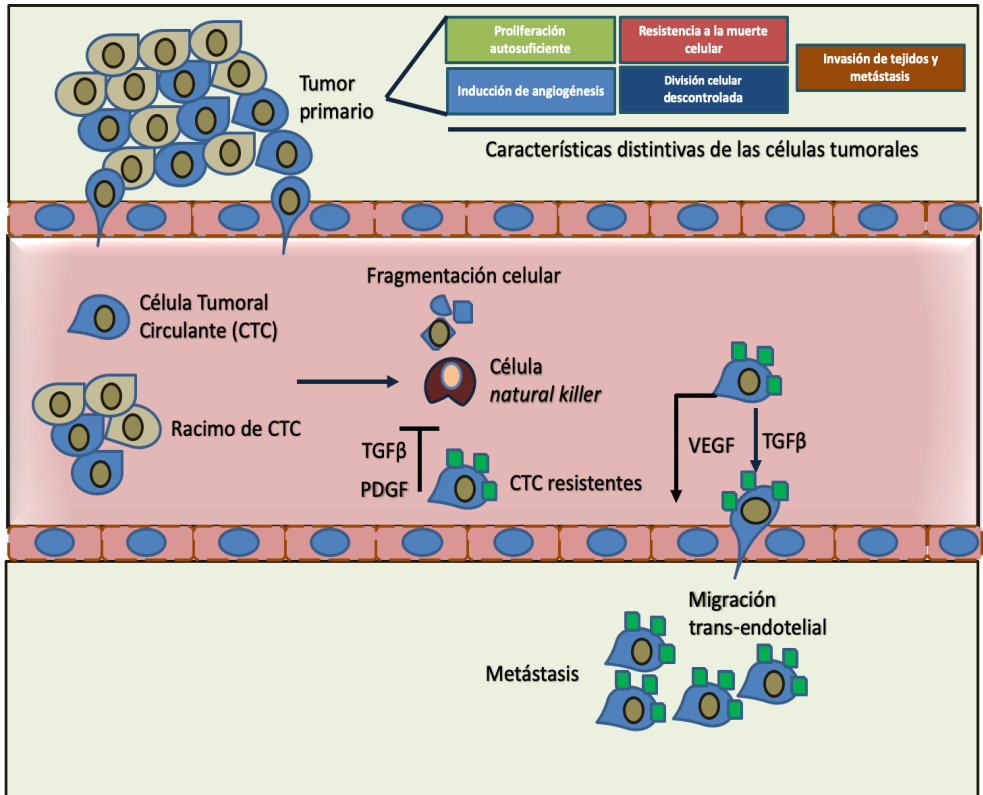


Fig 1: Representación de las características distintivas complementarias del cáncer que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica que continúan brindando una base sólida para comprender la biología del cáncer. Las células de carcinoma que escapan de los tumores primarios pueden intravasarse hacia la circulación, ya sea como células tumorales circulantes individuales (CTC) o como grupos de CTC multicelulares. El torrente sanguíneo representa un ambiente hostil para las CTC, exponiéndolos a la eliminación rápida por las células asesinas naturales (NK) o la fragmentación debido al estrés físico que se encuentra en el tránsito a través de la circulación. Las células de carcinoma obtienen protección física e inmunológica a través de las acciones de las plaquetas, que recubren las CTC poco después de la intravasación. Los neutrófilos también pueden proporcionar protección contra los ataques de células NK, al tiempo que contribuyen a atrapar y a la extravasación de las CTC. Una vez alojadas en un capilar, las plaquetas activadas y las células de carcinoma secretan una serie de factores bioactivos que pueden actuar sobre los monocitos, las células endoteliales y las propias células de carcinoma. Los efectos colectivos de estas interacciones promueven la migración transendotelial de las células de carcinoma, que puede ser ayudada por los macrófagos asociados a metástasis en el parénquima objetivo.

1.1 Melanoma uveal humano, metástasis y prognosis

El melanoma uveal es la neoplasia maligna intraocular primaria más común en los adultos y presenta una incidencia de 0.7 por cada 100.000 habitantes, clasificada por tanto como una enfermedad rara. Esta incidencia aumenta con la edad y el pico máximo se sitúa entre la sexta y la séptima década de vida. Es más común en la población caucásica, especialmente aquellos con iris azul/gris. Las tasas de supervivencia a los 5, 10 y 15 años son el 65%, 50% y 45% respectivamente². El 92% de los casos de melanoma uveal surgen en las coroides, mientras que el resto tiene su origen en el iris (3%) y el cuerpo ciliar (5%). Los melanomas coroideos tienen el peor pronóstico, mientras que los melanomas del iris tienen el más favorable.

El melanoma uveal se asocia con el desarrollo de metástasis en aproximadamente el 50% de los casos y el 40% de los pacientes mueren por la enfermedad metastásica a pesar del tratamiento con éxito del tumor primario³. La diseminación metastásica, predominantemente se produce en el hígado en hasta el 90% de los pacientes con enfermedad metastásica⁴. Otros sitios potenciales incluyen pulmón (24%), hueso y piel (16%), pero estos son raros en ausencia de metástasis en el hígado⁵.

La muerte por metástasis generalmente ocurre en su mayoría dentro de los 12 meses posteriores a la detección de la enfermedad metastásica⁶. Los pacientes con metástasis hepáticas sobreviven durante un promedio de 4 a 6 meses, con una tasa de supervivencia a 1 año del 10-15%. El tiempo de supervivencia informado para pacientes con otros tipos de metástasis son 19-28 meses⁷.

El tratamiento mediante quimioterapia sistémica o local y/o hepatectomía parcial, rara vez prolonga la vida⁸. Para tener la posibilidad de impactar en la baja tasa de supervivencia, es necesaria la detección temprana de la enfermedad metastásica. Por lo tanto, se recomienda una monitorización sistémica que incluya principalmente la función hepática y las imágenes mediante ultrasonido o resonancia magnética dos veces al año. Con base en los hechos de que los pacientes pueden desarrollar enfermedad metastásica incluso después de la enucleación del ojo primario con tumor y con respecto a los estudios que demuestran células de melanoma circulantes en pacientes sin metástasis

clínicamente evidentes, se debe suponer que muchos pacientes ya tienen micrometástasis indetectables en el tiempo de detección y tratamiento del tumor primario.

El pronóstico también depende del tipo histológico del tumor, con un mayor riesgo de metástasis cuando el tumor muestra un tipo de célula epitelioide, redes microvasculares, actividad mitótica e infiltración linfocítica. El análisis citogenético celular tumoral definitivamente ayuda en el pronóstico. La monosomía 3 tiene un riesgo significativo de enfermedad metastática⁹. Las anormalidades asociadas con los cromosomas 1, 6, 8 y 11 aumentan el riesgo. El perfil de expresión génica identifica dos clases de melanoma, en las que la clase 1 de disomía-3-positiva (grado bajo) mostró un 95% de supervivencia y la clase 2 de monosomía-3-positiva (grado alto) mostró solo el 31% de supervivencia a los 8 años¹⁰⁻¹².

1.2 Genética del melanoma uveal humano

El melanoma uveal se origina a partir de células de la cresta neural pluripotentes que migran y pueblan diferentes ubicaciones anatómicas (por ejemplo, epidermis, dermis y tracto uveal). Los melanocitos que residen en el tracto uveal parecen tener un linaje de desarrollo y perfil citogenético distintos en comparación con sus homólogos epidérmicos de melanocitos de la piel. Los tumores de melanoma uveal muestran alteraciones en los cromosomas 1, 3, 6 y 8. Pero la aberración cromosómica más relevante asociada con el melanoma uveal metastásico es la pérdida del cromosoma 3. La presencia de monosomía 3 en el tumor primario se correlaciona estrechamente con el riesgo de enfermedad metastásica. La ganancia de 8q, que también se asocia con una supervivencia reducida, ocurre frecuentemente en combinación con monosomía 3 y se considera un evento posterior inducido por la pérdida del cromosoma 3. Otras alteraciones cromosómicas, como la pérdida de 6q o 1p, también aumentan el riesgo metastásico, mientras que la ganancia de 6p se produce casi de forma mutuamente excluyente con la monosomía 3 y se asocia con un mejor pronóstico^{9,13-15}.

El desarrollo de la malignidad se ha asociado con mutaciones oncogénicas que influyen en el ciclo celular y la muerte celular programada. Los melanomas uveales muestran una expresión exacerbada de la proteína reguladora del ciclo celular ciclina D (CCND) que involucra las vías RAF/MEK/ERK. Estas vías son importantes para la homeostasis de los melanocitos. La activación de estas vías conduce a la fosforilación e inactivación del gen supresor de tumores del retinoblastoma¹⁶.

Una mutación oncogénica que afecta a la ruta RAF/MEK/ERK es una mutación de los genes GNAQ y GNA11 en el codón 29. Además, GNAQ también participa en la señalización de la endotelina, que es esencial para la supervivencia de los melanocitos al inicio del desarrollo¹⁷. La activación de GNAQ imita la señalización del factor de crecimiento en la ruta RAF/MEK/ERK, lo que lleva a la activación transcripcional de CCND1 que estaba sobreexpresada en melanomas uveales. La mutación GNAQ se observó en el 45 a 49% de las muestras de biopsia de melanoma uveal, mientras que las mutaciones GNA11 se observaron en 31.9% de las muestras de melanoma uveal¹⁸.

1.3 Diagnóstico y tratamiento del melanoma uveal humano

En contraste con los principios básicos de oncología, la evaluación histológica o citológica no se usa de manera rutinaria en el diagnóstico de lesiones neoplásicas intraoculares. El diagnóstico del melanoma uveal se basa principalmente en el examen clínico mediante biomicroscopía y oftalmoscopia indirecta, y los médicos experimentados pueden diagnosticar un melanoma uveal según el examen clínico. Sin embargo, es imperativo que se realicen pruebas de diagnóstico adicionales. Las pruebas complementarias incluirán ecografía, fotografía en color del fondo, angiografía del fondo con fluoresceína, angiografía con verde de indocianina, tomografía óptica computarizada y biomicroscopía con ultrasonido.

La terapia del melanoma uveal depende del tamaño del tumor, la ubicación, las características asociadas, el estado del otro ojo, el estado sistémico del paciente y el deseo del paciente. Las opciones de manejo incluyen termoterapia

transpupilar (TTT), radioterapia de placa, irradiación de partículas cargadas, radioterapia estereotáctica (RTS), resección local, enucleación o exenteración orbital.

TTT es un método de tratamiento que utiliza un sistema de administración de láser de diodo modificado para inducir la hipertermia en el tumor mediante el suministro de luz en el rango infrarrojo. El tumor se calienta a una temperatura de 60–65°C¹⁹. Cuando se introdujo la TTT en el tratamiento del melanoma coroideo, los datos de seguimiento a corto plazo demostraron que, en casos apropiados, la regresión del tumor se puede lograr en más del 90% de los pacientes²⁰. Los estudios con un seguimiento más largo, sin embargo, han amortiguado el entusiasmo inicial, mostrando que la fotocoagulación convencional y la TTT pueden no ser tan diferentes como se pensaba anteriormente. Singh et al encontraron una tasa promedio de recurrencia del 17% (8-56%) después del TTT primario en pacientes con melanoma pequeño e informaron que el 7% de estas recidivas implicaron una extensión extraescleral²¹. La terapia se limitará a tumores planos de 2,5 mm después de los resultados del estudio de la técnica TTT a largo plazo. Con el alto riesgo de recurrencia del tumor^{21,22}, los pacientes deben seleccionarse cuidadosamente y controlarse con frecuencia cuando se tratan con TTT. La TTT se ha adaptado actualmente en combinación con la radioterapia de placa²³ o se aplica como tratamiento secundario a la recurrencia local del tumor después de la radioterapia o la resección local²⁴. Shields et al estudiaron el impacto de la radioterapia de placa combinada con la TTT en 270 pacientes con melanoma coroideo y concluyeron que la radioterapia de placa combinada con la TTT proporciona un excelente control local del tumor, con solo un 3% de recurrencia a los 5 años de seguimiento²⁵. Las complicaciones de este enfoque terapéutico incluyen la tracción macular, la oclusión vascular y la hemorragia²⁶.

La radioterapia es actualmente el tratamiento más común para el melanoma uveal, especialmente en el melanoma uveal posterior. En la aplicación clínica, la radioterapia puede administrarse en forma de placa radiactiva, radioterapia de haz externo (RTS) o con un acelerador lineal.

En la RTS, la radiación se administra como una dosis única o RTS fraccionada en dosis iguales más pequeñas. Los dispositivos utilizados en la irradiación de haz de fotones estereotácticos son el “Gamma Knife”, el acelerador lineal (rayos X) y el “Cyber Knife”. Una ventaja del enfoque estereotáctico es que los bordes del tumor están determinados por MRI (resonancia magnética nuclear) y CT (tomografía computarizada) y no se requiere ningún procedimiento quirúrgico para determinar la ubicación del tumor^{27,28}. “Gamma Knife” se ha utilizado para tratar los melanomas uveales con resultados exitosos²⁹. Sin embargo, no es una modalidad de tratamiento preferida debido a las altas tasas de retinopatía por radiación y glaucoma neovascular (8,6 a 64%)²⁸. El acelerador lineal se utiliza para tratar el melanoma uveal mediante radioterapia estereostática hipofraccionada. Las ventajas de este enfoque son una menor exposición a la radiación en los tejidos sanos adyacentes al tumor y evitación de efectos a largo plazo. Los sistemas de fijación no invasivos diseñados para su uso con aceleradores lineales tienen una mayor comodidad para el paciente y cumplimiento del tratamiento³⁰. Utilizando RTS, Zehetmayer et al logró un control local del tumor en el 98% de los casos y la reducción del tumor en el 97%. Las reducciones del volumen tumoral relativo medio fueron 44, 60 y 72% después de 12, 24 y 36 meses, respectivamente. Siete pacientes desarrollaron metástasis (11%)³¹.

La enucleación primaria está generalmente indicada para los melanomas grandes que ocupan la mayor parte del espacio intraocular o para los tumores que han invadido el nervio óptico. En términos de supervivencia, muchos estudios no han demostrado una diferencia significativa en la mortalidad entre las terapias de conservación ocular y la enucleación³². Los pacientes con melanoma uveal tratados con braquiterapia de placa (terapia de radiación interna) y aquellos que se sometieron a enucleación no revelaron diferencias significativas en la supervivencia a largo plazo^{32,33}. Por lo tanto, en los últimos años, los tratamientos de conservación ocular han ganado popularidad frente a la enucleación. La resección local es una opción de tratamiento alternativa para los pacientes con melanoma coroideo, que impide la resección del ojo. Actualmente la coroidectomía solo se realiza por un pequeño número de cirujanos debido a los desafíos técnicos involucrados. Los tumores se pueden extirpar quirúrgicamente a través de una ruta transretinal (endoresección) o transescleral (exoresección). Las complicaciones mayores como el

desprendimiento de retina y la hemorragia vítrea se han informado con ambas técnicas³⁴.

2. Angiogénesis en el cáncer

El concepto de nuevos vasos o neovascularización se describió por primera vez en 1787 con referencia a los tejidos en desarrollo de los animales. El término angiogénesis se acuñó en 1900, pero no se usó con referencia a tumores hasta la década de 1960³⁵. Se han descrito varios tipos de angiogénesis en el cáncer: angiogénesis brotante, crecimiento microvascular por invaginación, proliferación microvascular glomeruloide, cooptación vascular y Mimetismo Vasculogénico (VM de sus siglas en inglés)³⁶. Los estudios recientes muestran que solamente una minoría de tumores puede crecer de una manera puramente no angiogénica incluso en condiciones hipóxicas, y otros tumores tienen una mezcla de áreas angiogénicas y no angiogénicas³⁷ (Fig. 2 y 3).

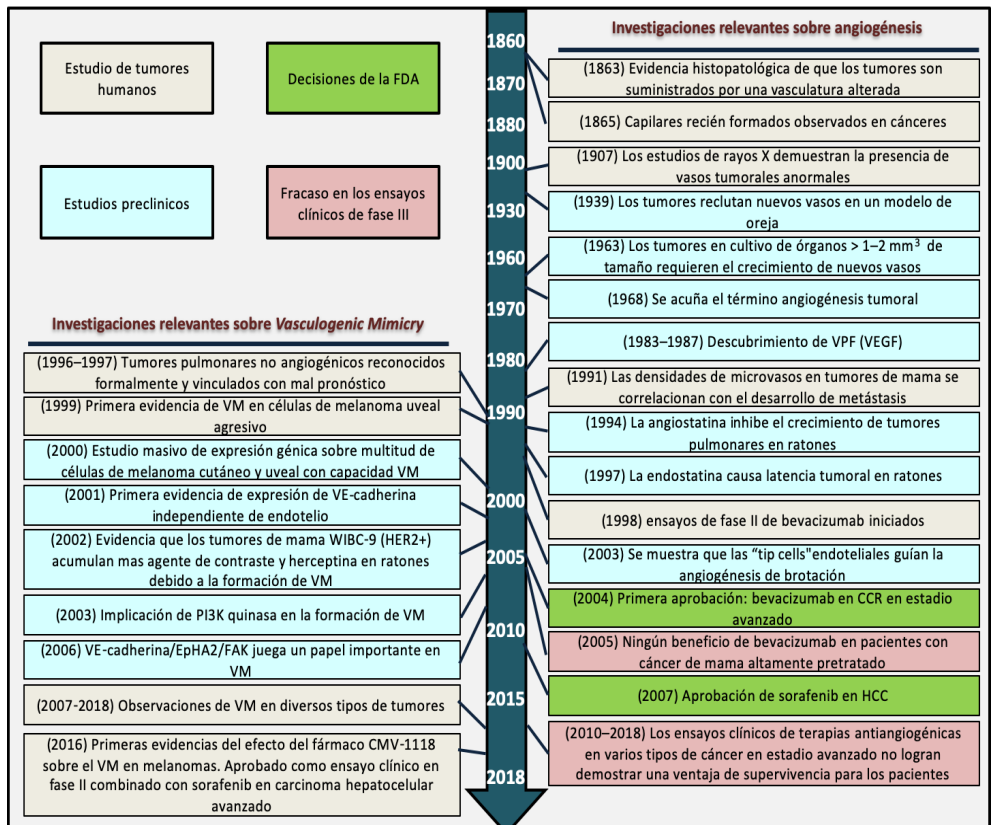


Fig. 2: Cronología histórica de investigaciones relevantes seleccionadas en VM y angiogénesis. Se muestran estudios experimentales preclínicos (Caja azul), informes histopatológicos de tumores humanos (Caja marrón), resultados de ensayos clínicos (Caja roja) y otros eventos clave desde mediados del siglo XIX hasta nuestros días. Los descubrimientos de investigación relacionados con la angiogénesis tumoral se muestran a la derecha, y los relacionados con VM se muestran a la izquierda.

Los vasos sanguíneos suministran oxígeno y nutrientes a cada parte del cuerpo, eliminan sustancias de desecho y proporcionan puertas de entrada para las células inmunitarias y otras células (pericitos, células de músculo liso) que forman parte de estos vasos alrededor de las principales células endoteliales. Los vasos pueden crecer de varias maneras. Mientras la vasculogénesis se refiere a la formación de vasos sanguíneos por las células progenitoras de células endoteliales, la angiogénesis se refiere a la formación de brotes y posterior estabilización de estos por las células murales, y la arteriogénesis se define al crecimiento colateral que denota el crecimiento expansivo de los vasos preexistentes, formando finalmente puentes colaterales entre redes de arterias³⁸. Cuando el crecimiento de los vasos se desregula puede afectar a nuestra salud y producir diversas patologías. Esta desregulación puede ser debida a la inflamación de la barrera endotelial o a la infiltración común de leucocitos; así como otras patologías como el cáncer y la hipoxia, produciéndose dentro de un microambiente bien orquestado por las células tumorales. Entre otras patologías implicadas se encuentran la psoriasis, la artritis, la obesidad, el asma, la arteriosclerosis y las enfermedades infecciosas, y la lista sigue creciendo, pero es importante señalar que la causa principal de la alteración de la visión por pérdida de angiogénesis es la pérdida de visión por envejecimiento celular³⁹. Como hasta ahora, tradicionalmente, el tratamiento de las estrategias de bloqueo de los vasos aberrantes han sido el uso de fármacos anti-angiogénicos, estos intentan inhibir la formación de nuevos vasos y para así destruir los vasos existentes que producen los tumores⁴⁰.

Ciertos investigadores se mostraron escépticos en cuanto a si los agentes anti-angiogénicos serían altamente efectivos en humanos. En la década de 1990, Pezzella y colaboradores^{41,42} observaron que algunos tumores de pulmón cooptan vasos preexistentes en lugar de inducir la angiogénesis y que este mecanismo podría ser una barrera importante para la eficacia de agentes anti-angiogénicos en pacientes. No obstante, numerosos son los agentes anti-

angiogénicos dirigidos en contra de la señalización de VEGF que finalmente entraron en uso clínico, incluidos los anticuerpos dirigidos a VEGF-A (bevacizumab) o al receptor 2 de VEGF (ramucirumab), una trampa de VEGF (aflibercept) y varios inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de VEGF (incluidos nintedanib, pazopanib, regorafenib, sorafenib, sunitinib y vatalanib). La amplitud de las aprobaciones de agentes anti-angiogénicos ha incluido pacientes con cánceres de pulmón, riñón, gastrointestinal en estadio avanzado, cerebro, hígado, mama, tiroides, páncreas (tumor neuroendocrino pancreático), cérvix y ovario (**Fig. 2**).

Sin embargo, con respecto a la premisa original de que la angiogénesis sostenida es un requisito previo para la progresión del tumor, las grandes esperanzas de la eficacia terapéutica de los agentes anti-angiogénicos no se han cumplido por completo⁴³⁻⁴⁵. Primero, a pesar de la presunta dependencia universal, los agentes no son uniformemente activos en todos los tipos de tumores. Mejoras reproducibles y estadísticamente significativas en la supervivencia libre de enfermedad (SLP) y la supervivencia general (SG) se han observado en ciertos cánceres, como el carcinoma de células renales (CCR) en estadio avanzado, el carcinoma hepatocelular (CHC) y el carcinoma colorrectal (CCR)⁴⁶⁻⁵²; sin embargo, no se ha demostrado ninguna mejora significativa en la SG con un agente anti-angiogénico (ya sea en monoterapia o en combinación) en pacientes con adenocarcinoma pancreático, cáncer de próstata, cáncer de mama o melanoma⁵³⁻⁵⁷.

En los siguientes apartados describiremos los diferentes modelos de producción de angiogénesis en el cáncer conocidos (**Fig. 3**), pero esta tesis doctoral estará centrada en el mecanismo denominado Mimetismo Vasculogénico (VM), representando así en la **Fig. 2** los progresos científicos más importantes en este campo.

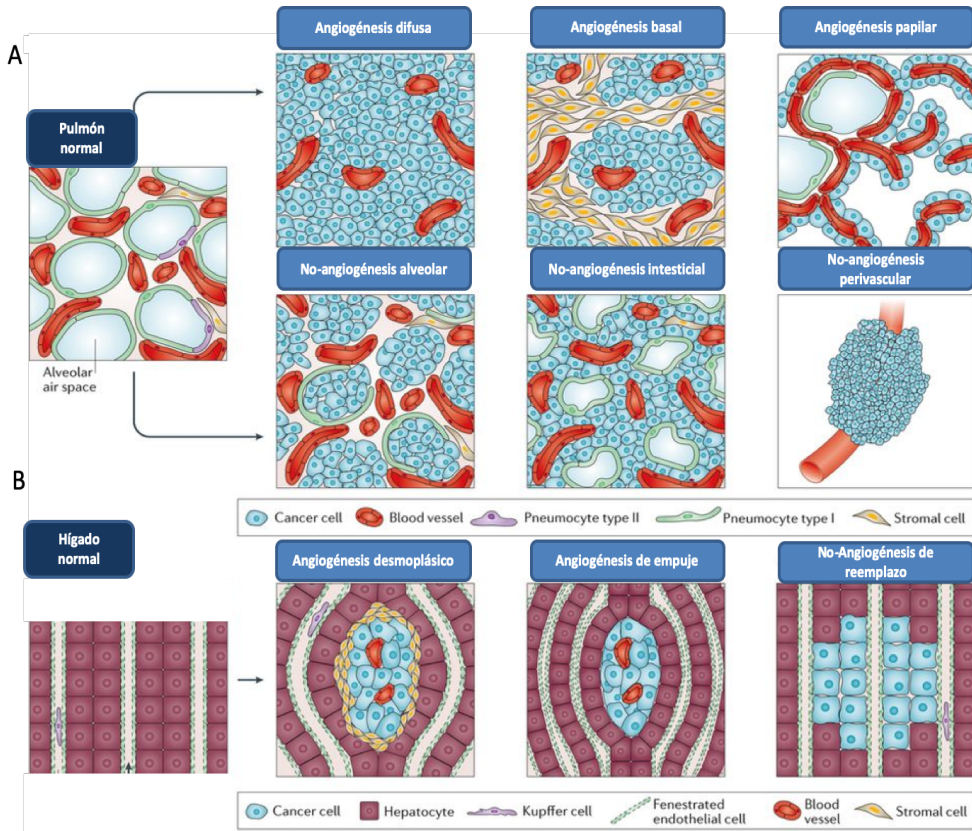


Fig. 3: a) Representaciones esquemáticas de los patrones de crecimiento tumoral en el pulmón. En el parénquima alveolar normal, los espacios alveolares del pulmón están llenos de aire y están delimitados por las paredes alveolares. Dentro de las paredes alveolares hay vasos sanguíneos rodeados por una capa delgada de matriz extracelular. Los neumocitos tipo I y tipo II se alinean en las paredes alveolares y separan los vasos del espacio aéreo. Se observan tres patrones angiogénicos básicos de crecimiento tumoral en el pulmón, que se pueden encontrar tanto en lesiones primarias como metastásicas. El primero se llama "difuso", en el que el tumor crece sin ninguna estructura arquitectónica identificable al reemplazar el parénquima normal. El segundo es "basal", en el que los nidos de células neoplásicas están rodeados por estroma que contiene vasos e inflamación (que reemplaza al parénquima normal). El tercero es "papilar", en el que las células neoplásicas recubren las papilas formadas por un delgado tallo fibroso que contiene el nuevo vaso para formar el tumor. Este último patrón de crecimiento se asocia principalmente con el carcinoma bronquioalveolar primario de pulmón, y cierta estructura residual del pulmón normal puede permanecer visible en algunas áreas del tumor. También se pueden observar tres patrones no angiogénicos de crecimiento tumoral. El primer patrón se conoce como "alveolar" y es el tipo más común de crecimiento maligno no angiogénico en el pulmón tanto en el tumor primario como en el secundario, en el que las células neoplásicas llenan los espacios alveolares y, posteriormente, los neumocitos desaparecen. Se podría argumentar que, en la fase inicial, las células tumorales cooptan el epitelio en lugar del vaso. El segundo patrón es "intersticial", que se observa solo con lesiones metastásicas en el pulmón, en las que las células metastásicas se extravasan y crecen dentro de las paredes alveolares, pero no entran en los espacios alveolares. El tercer patrón no angiogénico que se ve en el pulmón es el "*perivascular cuffing*" (también se observa solo en las

metástasis), en el que las células crecen abrazando como un manguito alrededor de un vaso más grande.

b) Representaciones esquemáticas de los patrones de crecimiento tumoral en el hígado. En el hígado, la sangre fluye desde la vena porta y desde las ramas de la arteria hepática (ubicadas en los espacios del portal), a través de los sinusoides y, en última instancia, a la vena centrilobular. Los sinusoides del hígado son canales vasculares revestidos por células endoteliales especializadas que contienen numerosos poros y células dispersas con capacidad fagocítica, conocidas como células de Kupffer. Entre el endotelio y las células hepáticas se encuentra el espacio de Disse, en el que los fluidos pueden transportar moléculas desde los hepatocitos hasta el flujo sanguíneo y viceversa. Existen dos tipos angiogénicos de crecimiento tumoral en el hígado. Uno se conoce como "desmoplásico", en el que las células cancerosas inducen el crecimiento de nuevos vasos y están rodeadas por un estroma desmoplásico que las separa del parénquima hepático normal. El otro es conocido como "empuje", en el que el tumor también induce el crecimiento de nuevos vasos y empuja directamente contra el tejido hepático normal, lo que lleva a la compresión de las placas hepáticas. En el tipo de crecimiento no angiogénico de crecimiento tumoral observado en tumores hepáticos primarios y secundarios, las células neoplásicas reemplazan de manera efectiva a los hepatocitos, pero preservan la arquitectura del hígado y cooptan vasos sinusoidales preexistentes. Adaptación de Donnem T, 2018⁵⁸.

2.1 Mecanismo de vascularización en cáncer: brotación endotelial

El mecanismo más conocido por el cual los tumores promueven su propia vascularización es inducir nuevos brotes capilares a partir de capilares de tejido huésped preexistentes. La primera descripción de este proceso se remonta a la década de 1970, cuando Ausprunk y Folkman⁵⁹ sugirieron la siguiente secuencia para el brote capilar inducido por un tumor:

1. La membrana basal se degrada localmente en el lado de la vénula peritumoral poscapilar dilatada situada más cerca del estímulo angiogénico, los contactos inter-endoteliales se debilitan y las células endoteliales emigran hacia el tejido conectivo por los estímulos angiogénicos.
2. A continuación, se produce la formación de un cordón sólido por las células endoteliales que se suceden entre sí de manera bipolar.
3. La formación de la luz ocurre por la curvatura cuerpo-célula de una célula endotelial única o por la participación de más células

endoteliales en paralelo con la síntesis de la nueva membrana basal y el reclutamiento de células periticas o murales.

Las principales desventajas de este modelo son su incapacidad para identificar la naturaleza y el origen del estímulo necesario para la formación de la luz y la suposición de que la desdiferenciación y la rediferenciación tienen lugar durante el mismo proceso, que se manifiesta en la pérdida y recuperación de la polaridad luminal-basal de las células endoteliales. Además, aunque se ha establecido que el estímulo necesario para la formación de la luz proviene de la membrana basal en desarrollo, según este modelo, la deposición de la membrana basal se produce después de la formación de la luz.

A principios de la década de 1990, se describió un modelo de brotación diferente⁶⁰. Este modelo sugiere una secuencia de tres etapas para explicar los cambios ultraestructurales durante el brote endotelial inducido por el tumor:

1. Existe una alteración estructural de la membrana basal caracterizada por la pérdida de densidad de electrones en toda la circunferencia del "vaso madre" dilatado (aunque los componentes de la membrana basal como la laminina y el colágeno IV pueden todavía ser detectado por inmunohistoquímica). La degradación parcial y regulada de la membrana basal alterada ocurre solo en lugares donde los procesos de las células endoteliales (conectados por uniones intercelulares) se proyectan en el tejido de conexión.
2. La migración adicional de las células endoteliales, que están dispuestas en paralelo, manteniendo su polaridad basal-luminal y formando una luz en forma de hendidura, tiene lugar continuamente con la luz del vaso madre y se sella mediante uniones inter-endoteliales intactas. La membrana basal de baja densidad de electrones se deposita continuamente por las células endoteliales polarizadas, mientras que solo la punta misma del capilar en crecimiento está libre de material de membrana basal.
3. Los pericitos proliferantes del vaso madre migran a lo largo de la membrana basal de la yema capilar, lo que da como resultado una cobertura completa del nuevo vaso. Paralelamente, se puede observar la aparición de una membrana basal densa en electrones alrededor de

las yemas capilares maduras. Según el modelo anterior, no es necesario ningún estímulo para la inducción de la formación de luz, ya que las células endoteliales no pierden su polaridad durante el proceso.

Las bases moleculares del proceso de brotación ha sido ampliamente estudiadas y revisadas⁶¹. Durante este proceso, los vasos inicialmente se dilatan y se hacen más débiles en respuesta al factor de permeabilidad vascular o también denominado factor de crecimiento endotelial vascular (VPF/VEGF)⁶². Esto está mediado por la regulación a grosso modo, por el óxido nítrico, el desarrollo de fenestraciones y orgánulos vesiculo-vacuolares, y por la redistribución de CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina. La transición de la membrana basal, probablemente mediada por metaloproteinasas de matriz (MMP), gelatinasas y el sistema activador de plasminógeno de uroquinasa, podría ser en parte responsable del inicio de la proliferación y migración de las células endoteliales. Ang-2 (Angiopoetina-2, un mediador de la señalización Tie-2) está involucrado en el desprendimiento de pericitos y el desmadejamiento de la matriz. Un gran número de moléculas estimulan la proliferación y la migración endotelial, incluido el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1)^{63,64}, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), los miembros del sistema de quimioquinas, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)⁶¹. Se podría argumentar que las integrinas representan los receptores de adhesión más importantes en las células endoteliales migratorias⁶⁵. (**Fig. 4**).

En general, la germinación/brotación está controlada por un equilibrio estrictamente regulado de factores activadores e inhibidores de la angiogénesis: una citoquina angiogénica promueve la proliferación, migración o formación de luz sobre las células endoteliales mientras que un inhibidor interfiere con estos pasos y modula la actividad de proliferación o migración de las mismas. Sin embargo, los tipos de tumores individuales usan varias combinaciones de citoquinas proangiogénicas e inhibidoras⁶¹.

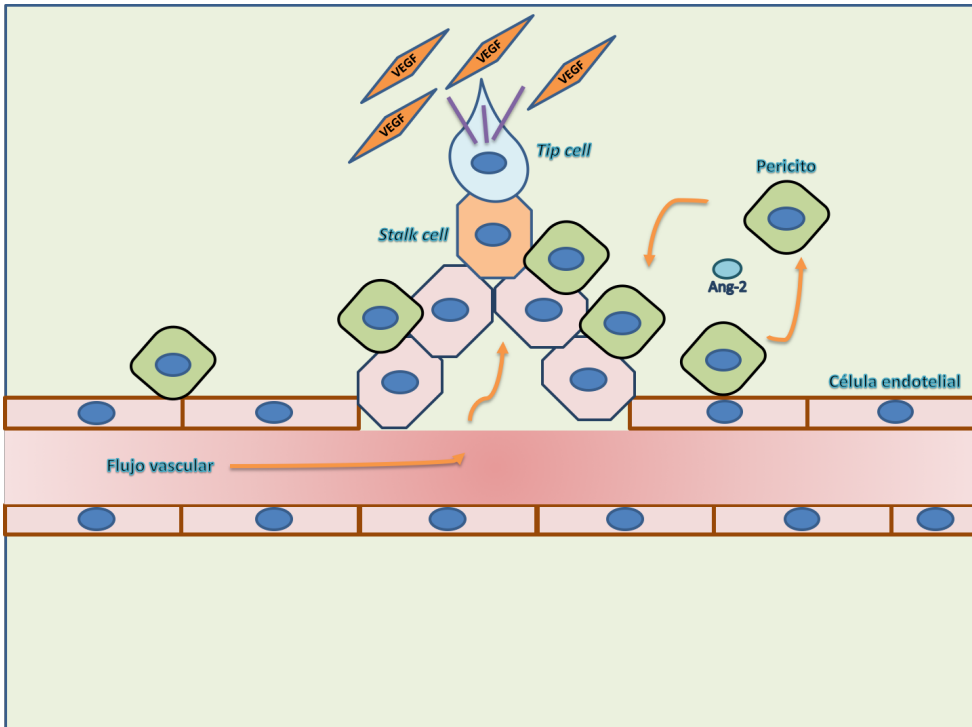


Fig. 4: Representación esquemática del mecanismo de crecimiento vasculogénico endotelial en brotación.

2.2 Mecanismo de vascularización en cáncer: Crecimiento microvascular por invaginación

El crecimiento microvascular por invaginación se refiere a la formación de redes de vasos mediante la inserción de columnas de tejido conectivo, llamadas pilares de tejido, en la luz del vaso y al crecimiento posterior de estos pilares, lo que resulta en la división de la luz del vaso. Este tipo de angiogénesis, que se ha observado en una amplia variedad de tejidos normales y malignos, es más rápido y más económico que la germinación, ocurre en cuestión de horas o incluso minutos y no depende principalmente de la proliferación de las células endoteliales, la degradación de la membrana basal y la invasión del tejido conectivo⁶⁶. Sin embargo, a diferencia del crecimiento en brote, este crecimiento solo puede funcionar en redes de vasos existentes. La característica más importante, por lo tanto, parece ser su capacidad para aumentar la complejidad y densidad de la red de microvasos tumorales ya construida por brotación, independiente de la proliferación por parte de las células endoteliales. Además, puede proporcionar más área de superficie para más brotes. Sin embargo, su regulación molecular es poco conocida, ya que se

describió por primera vez hace solo unos años. Sin embargo, el papel de algunas proteínas implicadas se está volviendo cada vez más claro. Sabemos que los estímulos locales, como el estrés por cizallamiento intravascular, pueden inducir una cascada de reacciones fisiológicas o patológicas en las células endoteliales, y el nuevo desarrollo capilar por la formación de pilares tisulares podría ser uno de ellos⁶⁷. Además, la invaginación intersticial está ciertamente sincronizada por varias citoquinas.

Los principales candidatos son aquellos capaces de mediar información entre las células endoteliales o desde las mismas a células murales, como PDGF- β , angiopoyetinas (Ang-1/2) y sus receptores Tie-1/2, TGF- β , y receptores de efrina y EphB⁶⁶.

Después de la etapa inicial de formación de la red capilar inmadura por brotación, puede ocurrir crecimiento vascular adicional y desarrollo de lechos vasculares complejos, incluida su remodelación y adaptación continuas, por invaginación intersticial en los cánceres. La ausencia de una intensa proliferación por parte de las células endoteliales en este modelo de crecimiento vascular implica que la neovascularización por este mecanismo sería resistente al tratamiento angiosupresor en sí mismo.

2.3 Mecanismo de vascularización en cáncer: Angiogénesis Glomeruloide

Los cuerpos glomeruloides son más conocidos en neoplasias gliales de alto grado, donde es una de las características de diagnóstico histopatológico del glioblastoma multiforme. Sin embargo, estos agregados vasculares complejos también se han descrito en una amplia variedad de otras neoplasias malignas⁶⁸. Se componen de varios microvasos estrechamente asociados rodeados por una membrana basal de engrosamiento variable dentro de la cual se incrusta un número limitado de pericitos. En estudios recientes, la presencia de este crecimiento vascular se asoció con marcadores de comportamiento tumoral agresivo y una reducción significativa de la supervivencia en pacientes con cáncer⁶⁹. En el primer modelo animal, se desarrollaron⁷⁰ la angiogénesis

glomeruloide en los vasos maternos a partir del reclutamiento y la proliferación de células endoteliales y pericitos (en ausencia de células tumorales), y VEGF fue esencial para su inducción y mantenimiento. En contraste con este modelo y en base a resultados publicados en el primer modelo experimental de tumor de angiogénesis glomeruloide⁷¹, hipotetizaron que la formación de este crecimiento angiogénico tumoral comienza inmediatamente después de la extravasación de células tumorales, mucho antes de que aparezca la necrosis dentro de las metástasis. Descubrieron que las células tumorales en proliferación y migración son capaces de atraer a los capilares y los puntos de ramificación capilares adyacentes hacia los nidos de las células tumorales. Este proceso conduce a la aparición de estructuras vasculares en espiral simples que luego se convierten en angiogénesis glomeruloide con múltiples capilares aferentes y eferentes estrechos.

A pesar de la ausencia de brotes de angiogénesis, la necrosis era escasa en estas lesiones, lo que sugiere que el suministro de sangre desde el lecho vascular existente es suficiente para proporcionar oxígeno y nutrientes a las células tumorales. Este tipo de formación de angiogénesis glomeruloide no puede denominarse angiogénesis verdadera; más bien representa una remodelación de la vasculatura existente en el huésped. Si este crecimiento angiogénico tumoral representan una forma acelerada de angiogénesis o una forma disfuncional, posiblemente abortiva, sigue sin respuesta. Sin embargo, no se puede excluir que los tipos de angiogénesis glomeruloide "activa" y "pasiva" puedan operar simultáneamente en varios tipos de cáncer⁷².

2.4 Mecanismo de vascularización en cáncer: cooptación vascular

Cuando los tumores surgen o hacen metástasis a un tejido preexistente, generalmente bien vascularizado, su crecimiento no solo depende de la expansión que es más típico de los tumores benignos de crecimiento lento, sino también de la invasión del tejido del huésped, lo que permite que las células cancerosas tengan contacto cercano con la superficie de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, las células malignas pueden asociarse inicialmente y crecer preferentemente a lo largo de microvasos preexistentes. Hasta hace

poco, sin embargo, ningún estudio se había centrado en el papel desempeñado por la vasculatura del huésped en el proceso de vascularización tumoral. Aunque en 1987⁷³ ya se había propuesto que los tumores adquirieran su vasculatura mediante la incorporación de capilares de tejido del huésped, el primer estudio que sugiere la existencia de cooptación de vasos no fue publicado hasta 1999 por Holash et al⁷⁴. En su modelo, Holash y sus colaboradores encontraron que la cooptación se limita a las fases iniciales de la tumorigénesis⁷⁴. Sin embargo, la evidencia morfológica adicional en neoplasias humanas sugiere que la cooptación de los vasos sanguíneos preexistentes podría persistir durante todo el período de crecimiento tumoral primario o metastásico. En el melanoma cutáneo, encontramos que, durante el crecimiento del tumor, no hay signos de crecimiento dirigido de vasos; en cambio, estos tumores parecen crecer cooptando el plexo vascular masivo presente en el tejido conectivo peritumoral⁷⁵. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, se observó un patrón de crecimiento supuestamente no angiogénico⁴², en este "tipo alveolar" de crecimiento, las células tumorales llenaron los alvéolos, atrapando, pero no destruyendo los capilares alveolares cooptados. En las metástasis hepáticas de carcinomas colorrectales humanos, se observaron diferentes patrones de crecimiento (reemplazo, empuje y desmoplásico), dependiendo del grado de diferenciación. En el tipo de crecimiento de reemplazo, se preservó la arquitectura del hígado y las células endoteliales de los sinusoides mostraron baja actividad mitótica. Sin embargo, el empuje y los tipos de tumores desmoplásicos destruyeron la arquitectura del hígado.

Definimos entonces la co-optación de los vasos como un proceso no angiogénico mediante el cual las células tumorales utilizan directamente la vasculatura preexistente del tejido no maligno que colonizan. Las células cancerosas migran a lo largo de la superficie abluminal de los vasos preexistentes, y/o las células cancerosas se infiltran en el espacio tisular entre los vasos preexistentes, lo que finalmente lleva a la incorporación de los vasos preexistentes en el tumor. De esta manera, los tumores cooptan los vasos del huésped para satisfacer sus demandas metabólicas sin necesidad de estimular el crecimiento de nuevos vasos (angiogénesis). La existencia de cooptación de vasos podría explicar al menos algunas de las deficiencias de los agentes anti-

angiogénicos, incluidos los muchos casos de resistencia intrínseca o adquirida^{36,43,58,76-78}, Además, la evidencia disponible implica roles adicionales de la cooptación de los vasos en la biología tumoral más allá de la expansión tumoral: la cooptación de los vasos preexistentes también podría ser central para facilitar los procesos involucrados en la metástasis, incluida la motilidad de las células cancerosas, la supervivencia por parte de las células cancerosas y su latencia.

La cooptación de los vasos generalmente se identifica mediante el análisis histopatológico, en el que se pueden usar una serie de características diferentes, y a menudo concurrentes, para indicar el reclutamiento de vasos sanguíneos preexistentes. Hasta la fecha, se ha observado la cooptación de vasos en muestras histopatológicas de pulmón, hígado, cerebro, piel, ganglios linfáticos y otros tejidos en una amplia gama de tipos de cáncer y, a veces, sin evidencia de angiogénesis concurrente⁷⁹.

2.5 Mecanismo de vascularización en cáncer: Mimetismo Vasculogénico (VM)

Los tumores sólidos requieren vasos sanguíneos para el crecimiento, y acceso a oxígeno y nutrientes. Las terapias actuales antiangiogénicas están diseñadas para dirigirse a las células endoteliales vasculares capaces de formar vasos sanguíneos *de novo*⁸⁰. Mientras que numerosos modelos preclínicos tienen reconocido el uso eficiente de inhibidores de la angiogénesis para limitar el crecimiento tumoral, colectivamente solo un retraso del crecimiento está siendo eficaz en la práctica clínica⁸¹. Esto se debe en parte a la complejidad de las alteraciones y variables que actúan sobre el ambiente tumoral que se nos escapan de la comprensión actual en conocimientos de vasculatura tumoral. Por todo ello una gran cantidad de estudios en patología del cáncer han centrado y descrito un alto grado de plasticidad asociado con cáncer agresivo. Dicha plasticidad y fenotipo embrionario de las células tumorales agresivas puede explicar, en parte, la habilidad para imitar las funciones de células endoteliales normales y así poder participar en procesos de neovascularización, formación de pseudo-conductos que pueden conducir plasma todo ello en una red vascular conectada^{82,83} (**Fig. 5**).

En 1999 Maniotis y colaboradores⁸⁴ introdujeron el término “Vasculogenic Mimicry” (VM) para describir la capacidad única de las células tumorales de melanoma uveal extremadamente agresivas PAS positivas (Periodic Acid Schiff) y CD31 negativas para formar estructuras tubulares y redes modeladas tridimensionalmente en medios celulares, que “imitan” redes vasculogénicas primitivas formadas mediante la desdiferenciación de las células tumorales.

Con este término se describe la formación de canales por parte de células no endoteliales, que tienen capacidad de conducir fluidos como plasma y células rojas, y hace referencia a dos procesos: 1) mimetismo, porque son canales, no son vasos sanguíneos y simplemente imitan su función, y 2) vasculogénico porque no se forman a partir de un vaso preexistente a pesar del hecho de que ellos distribuyen plasma y pueden contener células sanguíneas⁸⁵. El mimetismo vasculogénico aporta a los tumores una vía de perfusión independiente de la angiogénesis sin la participación de células endoteliales⁸⁵.

Se han desarrollado diversas interpretaciones del VM, sobre la base de diversos análisis en los hallazgos originales. Una interpretación simple es la descripción de redes vasculares teñidas con PAS en tumores. Otro se refiere a las células cancerosas que recubren los espacios o canales tumorales, que también contienen eritrocitos o lagos de sangre. Otros han equiparado el VM con las células tumorales que expresan genes específicos del endotelio. Es posible que cualquier combinación de estos escenarios pueda explicar las características del VM. El término "mimetismo vascular" también se ha utilizado de forma sinónima con mimetismo vasculogénico. Sin embargo, la mímica vascular tiene implicaciones más amplias, ya que incluye otros fenotipos asociados a células vasculares, como los linfocitos y los macrófagos^{86,87}.

El VM ha sido observado en osteosarcoma, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células pequeñas, glioma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma de ewing, melanoma cutáneo y melanoma uveal⁸⁸. La presencia de VM en los tumores es indicativo de agresividad, y clínicamente se corresponde con un aumento del 50% de riesgo de muerte por metástasis⁸⁹. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier indican que los pacientes con VM tienen menos supervivencia y empeoramiento clínico en comparación con los pacientes que no exhiben VM.

La **Tabla 1** y **Figura 5** representa las similitudes de huella proteica relacionadas entre células endoteliales y células tumorales que presentan VM⁹⁰⁻⁹².

CÉLULAS ENDOTELIALES	CÉLULAS VM
Similitudes	
VE-Cadherina Neuropilina-1 TIE-1 ⁹³ TIE-2 ⁹³ VEGFR-1/2 Endotelina-1 ⁹⁴ <i>Tissue factor pathway inhibitor 1 (TFPI1)</i> VEGF-C (Células endoteliales linfáticas) ⁹⁵ Endogлина/CD105 ⁹⁶	
Diferencias	
P-selectina/E-selectina positivas	P-selectina negativas
VCAM-1/CD106 positivas	VCAM-1/CD106 negativas
CD31/PECAM-1 positivas	CD31/PECAM-1 negativas
Receptor de trombina positivas	Receptor de trombina negativas
<i>Laminin 5 gamma 2 chain</i> (LAMC2) negativas	<i>Laminin 5 gamma 2 chain</i> (LAMC2) positivas
EphA-2 negativas	EphA-2 positivas
Integrina β -1 negativas	Integrina β -1 positivas ⁹⁷

Tabla 1: Posibles diferencias en expresión de proteínas en comparación entre células endoteliales versus células tumorales agresivas que producen el fenómeno de VM.

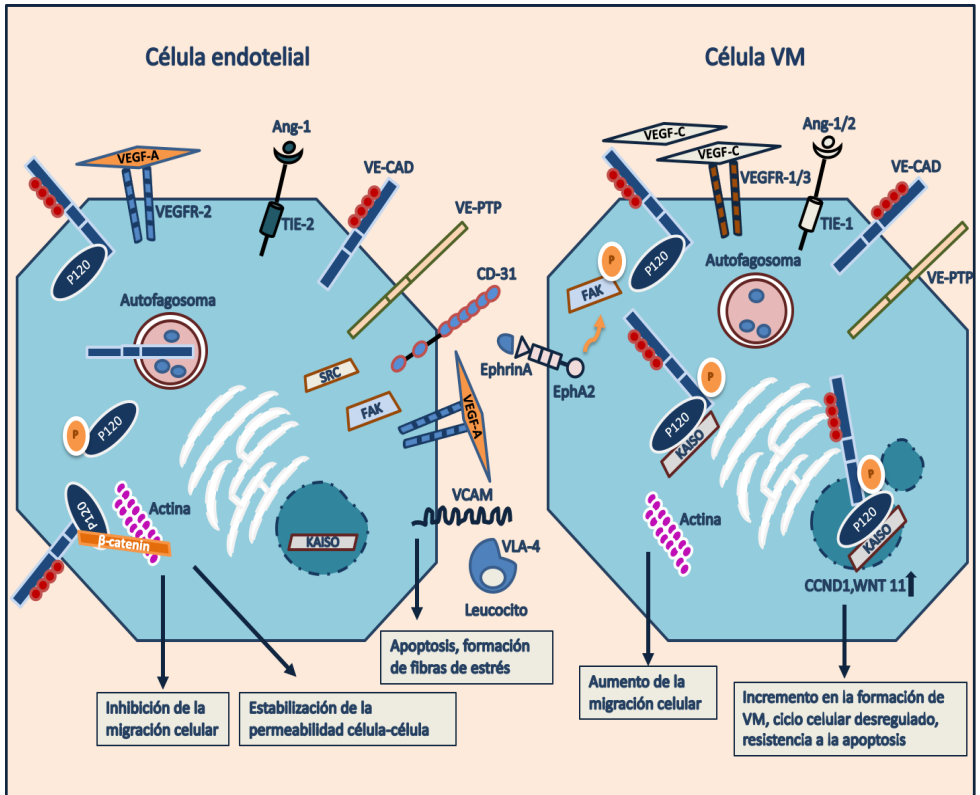


Fig. 5: Representación esquemática de la expresión de proteínas en comparación entre células endoteliales versus células tumorales agresivas que producen el fenómeno de VM.

3. Mimetismo Vasculogénico (VM): función de los pseudo-vasos tumorales

Entonces, ¿cuáles son las conexiones biológicas y funcionales entre las redes de matriz revestidas de células tumorales, positivas para PAS y positivas para laminina que se forman en melanomas agresivos y la vasculatura normal revestida de endotelio? Antes del descubrimiento del VM, varios estudios sobre melanomas agresivos (y otros tipos de tumores) reportaron que las células tumorales podrían alinear canales, lagos y senos, y entrar en contacto con los eritrocitos^{82,98,99}. Sin embargo, no estaba claro si esto tenía alguna relevancia para el suministro de sangre a la masa tumoral en crecimiento. De hecho, la hipótesis predominante era que los eritrocitos encontrados en los espacios extravasculares eran probablemente el resultado de fugas de los vasos sanguíneos.

El análisis morfológico mostró que las redes con patrones de PAS positivo, que se encontraron en melanomas agresivos y se asociaron con un mal resultado clínico¹⁰⁰⁻¹⁰⁶, también parecían converger con los vasos sanguíneos^{72,84}. Por lo tanto, se propuso que se producía algún tipo de anastomosis entre las redes revestidas de células tumorales y la vasculatura revestida de endotelio, lo que contribuye a la acumulación de eritrocitos en la infraestructura de la red⁸⁴. Esto condujo a la especulación de que las redes revestidas de células tumorales podrían proporcionar una para-circulación única que se forma independientemente de, o simultáneamente con, la angiogénesis y/o la cooptación de los vasos. Sin embargo, para probar un fenómeno tan complejo se requeriría un estudio más detallado. Se ha desarrollado un modelo ortotópico de melanoma uveal humano en ratones inmunocomprometidos para estudiar más a fondo la generación del patrón de red vascular único que es característico de las células de melanoma agresivo¹⁰⁷, como también se ha reportado análisis modelizando el comportamiento de metástasis en el hígado por parte de células de melanoma uveal (MUM 2B y M619) con capacidad de formar VM en el órgano diana¹⁰⁸.

Diversos estudios han indicado la presencia de una malla de matriz extracelular conductora de fluidos en modelos de xenoinjerto de melanoma cutáneo y uveal humano que corresponde a las redes con patrones de PAS y laminina positiva. Estas redes consisten en arcos y bucles de matriz consecutivos^{109,110}. Diferentes artículos utilizaron ensayos de microscopía confocal e inmunoelectrónica para demostrar que el líquido puede ser conducido por la vasculatura revestida de endotelio, así como extravascularmente a lo largo de los espacios en forma de canal creados por las zonas que son positivas para PAS y la laminina positivos que encierran los grupos de células tumorales independientemente de la vasculatura normal¹⁰⁹⁻¹¹¹. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que esta malla conductora de fluidos contiene fibrinógeno. Esto indica la presencia de plasma que rodea los grupos de células tumorales revestidos de células tumorales¹¹⁰. Es probable que el plasma, además de los eritrocitos que se han observado en muchos bucles y redes de tumores PAS y laminina positivos, se derive de los vasos tumorales locales que tienen fugas y están en remodelación.

La investigación sobre VM a menudo ha estado rodeada de escepticismo en cierta medida. La razón de esta controversia suele ser la dificultad para

distinguir los canales VM de los vasos sanguíneos endoteliales o lagos de sangre *in vivo*. Del mismo modo, la investigación *in vitro* presenta inconvenientes inherentes, dada la necesidad de desarrollar modelos tridimensionales donde las células tumorales puedan desarrollar estructuras capilares. La mayor parte de la investigación *in vitro* se basa en cultivos celulares que usan matrigel. Sin embargo, las estructuras tubulares observadas en este modelo pueden no siempre representar VM *in vivo*.

La **Tabla 2** muestra algunos artículos seleccionados donde VM se ha confirmado inequívocamente en varios tipos de cáncer *in vivo* e *in vitro*.

Tipo de cáncer	<i>In vitro</i> (Moléculas implicadas)	<i>In vivo</i> (Moléculas implicadas)
Mama	Liu S et al 2019 (225) (S1PR1/VE-cadherin)	Liu TJ et al 2013 (226) (CD133,MMP-2 y 9), Liu S et al 2019 (225) (S1PR1/VE-cadherin)
Colon	Qi L et al 2015 (227) (Wnt 3a, β -catenin, VEGFR1 y 2, VE-cadherin)	Qi L et al 2015 (227) (Wnt 3a, β -catenin, VEGFR1 y 2, VE-cadherin)
Glioblastoma multiforme		El Hallani et al 2010 (228) (EphA2, laminin 5y2, TFPI-1, Neuropilin-2, endoglin)
Carcinoma hepatocelular		Sun et al 2010 (229) (Twist-1, VE-cadherin, MMP-9)
Pulmón		Xia et al 2018 (230) (Sema4D,MMP-2 y 9, VE-cadherin, EphA2, PlexinB1)
Melanoma		Dunleavy et al 2013 (231) (CD31, tyrosinase, AP-2 α)
Pancreas	Yang J et al 2017 (232) (HIF-2 α , VE- cadherin, Twist1)	Yang J et al 2017 (232) (HIF-2 α , VE- cadherin, Twist1)
Ovario	Racordon et al 2017 (233)	Tang et al 2016 (234) (Urokinase, MMP-2, AKT)
Pulmón de células pequeñas	Williamson SC et al 2016 (235) (VE- cadherin)	Williamson SC et al 2016 (235) (VE- cadherin)
Sarcoma de Ewing	van der Schaft DW et al 2005 (236) (TFPI-1, VE-cadherin, Integrin α 3, EphA2)	van der Schaft DW et al 2005 (236) (TFPI-1, VE-cadherin, Integrin α 3, EphA2)

Tabla 2: Principales tipos de tumores donde se ha confirmado VM en modelos *in vitro* (izquierda) y en modelos *in vivo* (derecha)¹¹²⁻¹²³.

3.1 Mimetismo Vasculogénico (VM): señalización intracelular

A través del estudio de expresión de genes mediante microarrays en muestras de pacientes con melanoma metastásico¹²⁴ (**Tabla 3**), se estudiaron las funciones biológicas de las moléculas endoteliales asociadas a líneas celulares tumorales humanas, establecidas de melanoma del mismo paciente. En dicho microarray se observó que los niveles de proteína TIE-1 (receptor tirosina quinasa) y VE-Cadherina (CDH5) estaban altamente sobreexpresados en las células tumorales agresivas respecto a las células no agresivas y por otra parte dichas células no expresaban CD31 (proteína de unión celular endotelial específica de células endoteliales) (**Fig. 5**). Entre otros, en este estudio las células altamente agresivas de melanoma incluyen genes que generalmente se expresan por precursores de células endoteliales, epiteliales, pericitos, fibroblastos, hematopoyéticos, renales, neuronales, musculares y varios otros tipos de células (**Tabla 3**). Estos hallazgos indican que las células de melanoma agresivo pueden revertir a un fenotipo indiferenciado, de tipo embrionario. Sin embargo, la importancia biológica de estos hallazgos sigue sin resolverse. De hecho, estas observaciones han llevado a una mayor investigación sobre la relevancia potencial de un fenotipo de células tumorales que desafían nuestro pensamiento actual sobre cómo identificar y atacar a las células tumorales que pueden hacerse pasar por otro tipo celular.

EphA2 también se ha demostrado que está relacionado con VM. EphA2 es una proteína tirosina quinasa cuya fosforilación y actividad dependen de la unión de ephrin-A1 (**Fig. 5**), aunque se ha publicado que EphA2 también puede ser constitutivamente activa en algunas células tumorales¹²⁵. Al igual que VE-Cadherina, se encontró que EphA2 se expresaba solo en tumores altamente agresivos con capacidad de formar VM, donde estaba hiperfosforilada en tirosina. Cuando las células se cultivaron en una matriz tridimensional y se marcaron con anticuerpos anti-fosfotirosina, la tinción mostró que la fosforilación de tirosina estaba presente principalmente en las áreas de formación de la red tubular. Los inhibidores generales de las proteínas tirosina quinasa, así como el silenciamiento específico de EphA2, disminuyeron el desarrollo de redes vasculares, lo que sugiere un papel potencial para la EphA2 fosforilada en este proceso¹²⁵. En VM, VE-Cadherina y EphA2 se localizan en la membrana plasmática, específicamente en regiones de contacto de célula a célula. La inhibición de VE-Cadherina dio lugar a una reorganización de la ubicación de EphA2, que parecía moverse hacia el citoplasma. Además, hubo una disminución en la fosforilación de EphA2.

Debido a estos resultados, parece que VE-Cadherina puede ayudar a que EphA2 se transloque a la membrana plasmática^{126,127}.

PI3K regula positivamente tanto la actividad como la expresión de la metaloproteínasa de matriz 14 (MMP-14) en células altamente agresivas con capacidad de formar VM¹²⁸. MMP-14 a su vez activa MMP-2 y finalmente corta la cadena de laminina 5 γ 2 para producir los fragmentos γ 2 y γ 2x, que se secretan a la matriz extracelular para promover la migración en varios tipos de células tumorales, como los de mama, carcinomas de colon y hepatocarcinoma¹²⁹. Más en concreto, activan la secreción de fragmentos promigratorios γ 2 y γ 2x que conducen a VM en melanoma y carcinoma de ovario^{128,130,131}. Además, las células de melanoma poco agresivas (que normalmente no pueden participar en VM) podrían formar redes de tipo vasculogénico cuando se siembran en geles de colágeno que habían sido pre acondicionados por células de melanoma altamente agresivas (Ver apartado microambiente tumoral y VM). Las células agresivas se eliminaron antes de la aparente formación de redes tubulares, pero el examen de las matrices celulares mostró la presencia de redes con patrones de laminina positiva. Si estas matrices fuesen tratadas con anticuerpos anti-laminin-5 γ 2 antes de sembrar las células de melanoma poco agresivas, ya no podrían desarrollar redes tubulares. En conjunto, estos resultados confieren gran importancia a esta cascada de señalización y a la laminina-5 γ 2 en particular (**Tabla 3**)

Por otro lado, la expresión de ADAMTS1 (desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina 1) se ha observado aumentada en la línea celular de fibrosarcoma HT1080¹³² (Véase Fig. 1 del artículo citado), como también una sobreexpresión de la misma se correlaciono con un aumento de expresión de VE-Cadherina, laminina 5 γ 2 y TIE-1 entre otras, lo que condujo a una mayor producción de tinción PAS en un modelo de xenoinjerto murino con la línea celular HT1080, con la consiguiente capacidad de formación de VM, debido en parte al aumento de las proteínas endoteliales antes citadas. Además, la delección de ADAMTS1 a través de shRNA en la línea celular de sarcoma de ewing EW7 disminuyó la capacidad de formación de VM en experimentos de angiogénesis en matrigel (Véase Fig. 5 del artículo citado)¹³².

En 2001 Mary JC Hendrix¹³³ y su grupo publicaron un estudio midiendo por *Western blot* y otras técnicas si dicha sobreexpresión genética en estas proteínas

tenía un impacto a nivel funcional en las células de melanoma agresivo. Por ello, observaron que las células altamente agresivas de melanoma (C8161, C918 y MUM 2B) expresaban niveles elevados de VE-Cadherina y TIE-1 en contraposición con las células poco agresivas de melanoma (C81-61, OCM-1A y MUM 2C respectivamente). Utilizaron las células HUVEC como control positivo de expresión de VE-Cadherina, TIE-1 y por último de CD31, esta última solo se expresa en células endoteliales normales. Concluyeron el estudio con experimentos funcionales de desarrollo de angiogénesis *in vitro* 3D compuesto con gel de colágeno teniendo como resultado que solo las células de melanoma altamente agresivo C8161 son capaces de formar redes tridimensionales en este modelo 3D *in vitro*, además vieron que tanto silenciando con tecnología de siRNA o bloqueando VE-Cadherina con anticuerpos monoclonales (2,5 μ gr/ml) producía una depleción de la formación de VM en dicho modelo tridimensional en geles de colágeno^{124,133}.

En la **Tabla 3** están representados los genes que están desregulados en la línea celular de melanoma cutáneo (C8161) con capacidad de VM en comparación con la línea celular C81-61 sin capacidad de formación de VM⁸⁶.

Gen	Unigene	Función	Ratio de expresión
Marcadores específicos de melanocitos			
Melan-A (MLANA)	Hs.154069	Antígeno de superficie de melanoma	22
Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF)	Hs.166017	Factor de transcripción de crecimiento de melanocitos.	34
Tirosinasa (TYR)	Hs.2053	Catalasa de conversión de tirosina a melanina	37
Proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP1)	Hs.75219	Catalasa de conversión de tirosina a melanina	100
Molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM)	Hs.211579	Glicoproteína de superficie celular.	27
Marcadores de otros fenotipos celulares			
Receptor tirosina quinasa 1 (TIE-1)	Hs.78824	Tirosina quinasa endotelial	25
Quinasa de células epiteliales (EPHA-2)	Hs.171596	Receptor tirosina quinasa	13
Factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C)	Hs.79141	Ligando de FTL4	6.4
Neuropilina-1 (NRP-1)	Hs.69285	Co-Receptor de VEGF	5.3
Cadherina endotelial vascular (CDH5)	Hs.76206	Molécula de adhesiones célula-célula	11
Selectina E (SELE)	Hs.89546	Molécula de adhesión	6.6
Endoglina (ENG)	Hs.76753	Receptor de TGF- β 1	4.3
CD34	Hs.85546	Marcador de célula madre, sialomucina	2.5
Factor inducible por hipoxia-1 α (HIF1A)	Hs.197540	Factor de transcripción bHLH	3.1
Inhibidor de la vía del factor tisular 1 (TFPI1)	Hs.170279	Inhibidor de coagulación	4
TFPI2	Hs.78045	Inhibidor de coagulación	8.5
Laminina 5 γ 2 (LAMC2)	Hs.54451	Matriz extracelular	50
Fibronectina 1 (FBN1)	Hs.118162	Matriz extracelular	27
Colageno IV α 2 (COL4A2)	Hs.75617	Matriz extracelular	3.6
Fibrilina (FBN1)	Hs.750	Matriz extracelular	5
Receptor de diferenciación endotelial (EDG1)	Hs.154210	Receptores acoplados a proteína G	3.7
Molécula específica de células endoteliales (ESM1)	Hs.41716	Molécula de señalización específica de endotelio	41
Factor de diferenciación endotelial 1 (EDF1)	Hs.174050	Regulador de diferenciación de células endoteliales	4.8

Tabla 3: El perfil de expresión génica de más de 45 líneas celulares de melanoma uveal y cutáneo humano ha producido hallazgos inesperados con respecto al fenotipo de células de tumores agresivos^{91,124,134}. El nivel de expresión de más de 6,000 genes se comparó entre células de melanoma altamente agresivas y poco agresivas aisladas de los mismos pacientes. La expresión de muchos marcadores específicos de melanoma, por el contrario, tuvo una reducción de expresión en las células tumorales agresivas (marcadas en rojo), con la excepción de la molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM). Por ejemplo, la expresión del factor de transcripción asociado a la microftalmía (MITF) tuvo una disminución de expresión de 34 en células de melanoma agresivas en comparación con células tumorales poco agresivas. MITF activa la expresión del gen que codifica la tirosinasa, una enzima que participa en la diferenciación de melanocitos¹³⁵. El nivel de expresión de los genes que codifican la tirosinasa y la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP1) también tuvo una bajada de expresión (de entre 37 y más de 100 respectivamente) en las mismas células tumorales agresivas en comparación con las células tumorales poco agresivas. Por lo tanto, las células de melanoma parecen diferenciarse a medida que se vuelven más agresivas, lo que podría hacerlas más difíciles de identificar utilizando métodos de histopatología de rutina. Será interesante determinar si las células de melanoma diferenciadas se transforman en células tumorales indiferenciadas, o si coexisten subpoblaciones de células de melanoma diferenciadas e indiferenciadas.

Por todo lo anteriormente comentado, esta tesis doctoral se centrará en los posibles mecanismos de VE-Cadherina y las diferentes rutas implicadas en el modelo de VM en cáncer.

4. Cadherina endotelial vascular (VE-Cadherina)

El endotelio controla la permeabilidad vascular a través de proteínas plasmáticas y células circulantes. Esta específica función está regulada por vías transcelulares y paracelulares de permeabilidad celular^{136,137}. La ruta transcelular está mediada por sistemas vesiculares complejos que contienen receptores para proteínas circulantes. Estas vesículas que se disponen en el lado endotelial apical transportan los componentes del plasma a la cara basal de la membrana endotelial y al espacio subendotelial. La permeabilidad paracelular es controlada por moléculas de adhesión específicas presentes en las uniones célula-célula y por la capacidad de las células endoteliales para retraerse y, finalmente, abrir las uniones célula-célula^{136,138}. La estimulación por agentes solubles como la histamina o VEGF incrementa la permeabilidad vascular y actúan sobre ambos sistemas al aumentar el número y la organización de vesículas disminuyendo la fuerza de adherencia inter-endotelial¹³⁹⁻¹⁴¹.

VE-Cadherina es una proteína transmembrana comúnmente expresada en endotelio, donde es responsable de la adhesión célula-célula¹⁴² y los modelos experimentales *in vivo* han demostrado que los ratones deficientes de VE-Cadherina mueren por defectos vasculares graves¹⁴³. Aunque VE-Cadherina solía ser considerada específica en células endoteliales normales, su expresión ha sido fuertemente asociada con la agresividad y VM en melanoma. Sorprendentemente, VE-cadherina se puede encontrar en células tumorales altamente agresivas, pero no en células poco agresiva. Además, la ausencia de su expresión en melanoma implicó la pérdida de formación de VM¹³³.

VE-Cadherina es la cadherina más conocida en el contexto de la adhesión vascular, pero los conocimientos de su papel en VM en las células tumorales agresivas no se han analizado. Estructuralmente, VE-Cadherina tiene cinco dominios extracelulares dependientes de calcio para su unión (DEC: aa46-aa599) que pueden formar homodímeros en cis con otra VE-Cadherina o dímeros similares en trans a través de los dominios DECI-DECIV, que tiene como función de soporte de reconocimiento y adhesión célula-célula. El dominio DECV es fundamental para la unión de VE-Cadherina a VE-PTP¹⁴⁴, otros estudios más recientes han observado que plakoglobina hace como puente de unión entre VE-Cadherina/VE-PTP ya que la fosforilación de plakoglobina tras el bloqueo de VE-PTP con anticuerpos produce la desunión de VE-Cadherina/VE-PTP llegando a aumentar la permeabilidad vascular como así la migración celular¹⁴⁵. VE-Cadherina también posee un pequeño dominio transmembrana (DTM: aa600-aa620) y por último un dominio intracelular (aa621-aa784) implicado en las modificaciones postraduccionales representado en la **Fig. 6**¹⁴⁶.

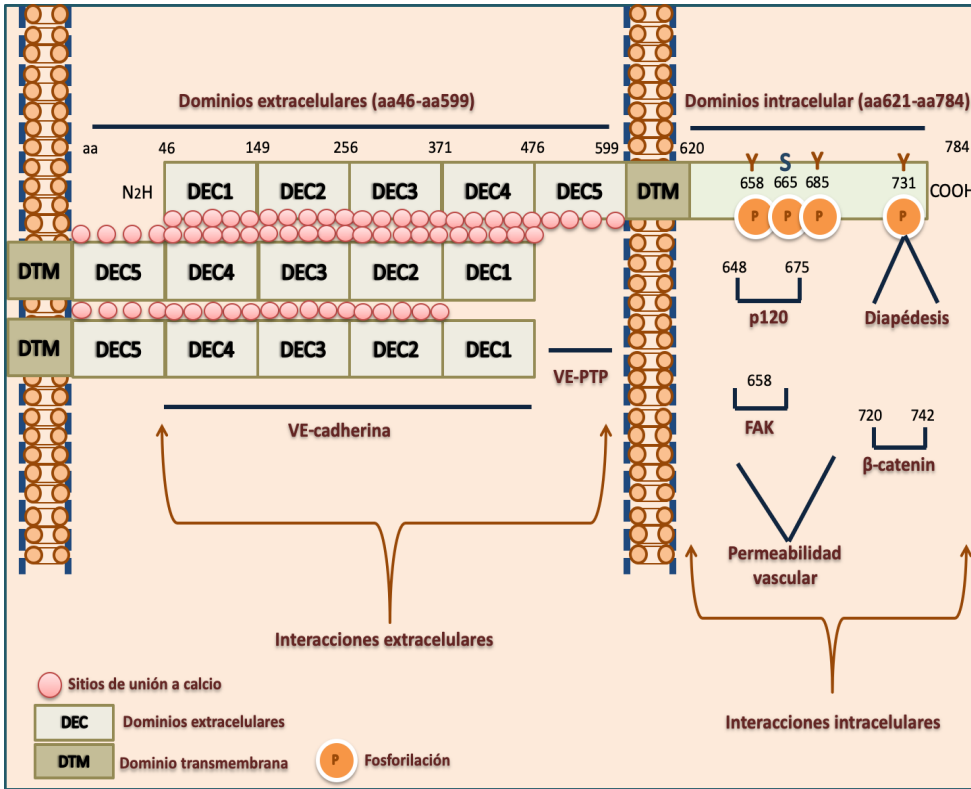


Fig. 6: Características estructurales de VE-Cadherina e implicación en señalización. Se proporcionan más detalle en el texto.

De hecho, 13 posibles residuos en VE-Cadherina se han descrito que pueden ser fosforilados en células humanas (Base de datos: Uniprot KB/PhosphositePlus) pero los más importantes y estudiados son los residuos Y658, S665, Y685 y Y731.

La fosforilación en el residuo S665 de VE-Cadherina es debida a la actividad serina/treonina quinasa de la proteína PAK en respuesta a la estimulación por el factor soluble VEGF que produce la consecuente internalización de VE-Cadherina dependiente de clatrina¹⁴⁷. Estudios recientes han observado que el residuo Y658 de VE-Cadherina puede ser fosforilado por la quinasa de adhesiones focales (FAK) en modelos *in vitro* e *in vivo* de células endoteliales asociadas a células tumorales, identificando así que la FAK juega un papel muy importante en la dinámica de permeabilización celular en el endotelio tumoral metastásico¹⁴⁸. Por otro lado, la fosforilación de la Y685 de VE-Cadherina es mediada por Src, teniendo un importante rol en la permeabilidad vascular *in vivo*^{149,150}. Finalmente, la fosforilación de la Y731 se ha observado que tiene un papel importante en la internalización de VE-Cadherina a través del fenómeno

denominado diapédesis dependiente de la estimulación por histamina que provoca la extravasación de neutrófilos y leucocitos sobre el endotelio vascular¹⁵⁰, por otro lado, ratones mutados en Y731F se vieron afectados en dicha extravasación de neutrófilos sobre el endotelio vascular normal¹⁵⁰.

4.1 Señalización de VE-Cadherina: VEGF

Una de las rutas más estudiadas y con más impacto sobre la dinámica de VE-Cadherina es el factor soluble VEGF y sus receptores VEGFR-2 (flk-1/KDR) y VEGFR-1 (FLT-1) aunque se han descrito al menos cinco isoformas de receptores de VEGF en humano. Estos receptores son estimulados por VEGF-A y representan un sistema regulador crucial del crecimiento endotelial en un contexto de endotelio normalizado; en contraste VEGF es un potente inductor de la permeabilización vascular secretado específicamente por las células tumorales y que produce alteraciones en el microambiente del tumor¹⁵¹. VEGFR-2 está altamente expresado en células endoteliales vasculares encargadas de formar vasos tubulares primitivos mediante el proceso de vasculogénesis. Por otro lado, la expresión de VEGFR-1 se ha observado aumentada en células tumorales capaces de formar VM, como es el caso del melanoma maligno¹⁵². Como ha sido mencionado antes, VEGF promueve la fosforilación en los diferentes residuos de VE-Cadherina y con el consecuente aumento de la permeabilidad vascular ya que debilita las uniones célula-célula adherentes y uniones estrechas teniendo como consecuencia la separación parcial o total del contacto celular¹⁴⁷. De hecho, VEGF-A promueve la fosforilación de VE-Cadherina y su desunión de p120-catenina, β -catenina y plakoglobina en un mecanismo dependiente de la quinasa Src¹⁵³. VE-Cadherina, así como su fosforilación son inhibidas en ratones deficientes en Src¹⁵³. VE-Cadherina también puede asociarse a VEGFR2 y su inhibición impide su subsecuente internalización¹⁵⁴. Esta asociación promueve la fosforilación de los componentes de las uniones adherentes por Src, lo que perjudica la integridad de la barrera endotelial y promueve la extravasación de células tumorales y su diseminación¹⁵⁵. Además, VEGF-A media la fosforilación/internalización de VE-Cadherina a través de la activación

secuencial de Src, el factor de intercambio de nucleótidos Vav2, Rho/Rac GTPasa, llevando una activación aguas abajo en la serina/treonina quinasa PAK. Finalmente, la activación de PAK por fosforilación conduce a la fosforilación de VE-Cadherina desencadenando su internalización¹⁴⁷. Además, la señalización de VEGF reduce la unión de VE-Cadherina a p120-catenina promoviendo la endocitosis de VE-Cadherina dependiente de clatrina¹⁵⁶, la unión de p120 a VE-Cadherina impide su internalización mientras que el silenciamiento de p120 evita su degradación y consecuente pérdida de contactos célula-célula¹⁵⁶. Cuando VEGF-A se une a VEGFR-1 puede tener otras vías de señalización, activando a Src y a la quinasa reguladora extracelular 1 y 2 (ERK1/2) lo que conduce a un aumento en la invasión y migración por parte de las células tumorales. En melanoma, VEGFR-1 se ha observado que promueve VM a través de la ruta PI3K/PKC^{157,158}. Por otro lado, VEGFR-1 es necesario para la expresión de VE-Cadherina en el proceso de crecimiento tumoral¹⁵². En cuanto a VEGFR-3 se ha comprobado que puede afectar a la expresión de ET-1 (endotelina-1) y también a los factores solubles VEGF-C y D. La vía de señalización de ET-1 activa a los factores de hipoxia inducibles llevando un aumento en la fosforilación de VEGFR-3 la cual activa a la ruta de la MAPK en cascada. Teniendo como resultado toda esta activación un aumento en la migración celular y el VM¹⁵⁹ (**Fig. 7**).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) se sabe que contribuye a la proliferación de las células endoteliales normales, influyendo como inductor de la proliferación angiogénica en células tumorales y ha sido relacionado con VM tanto en carcinoma de ovario como en melanoma¹⁵⁷. Todas estas evidencias expuestas con anterioridad indican que VEGF promueve el VM, pero, por el contrario, se ha observado que el VM puede aumentar en ausencia de la ruta de VEGF, mientras el bloqueo de VEGF tras silenciamientos o bloqueando el receptor a través de anticuerpos específicos (bevacizumab) incrementa las estrategias de supervivencia por parte de las células tumorales incluyendo el VM¹⁶⁰.

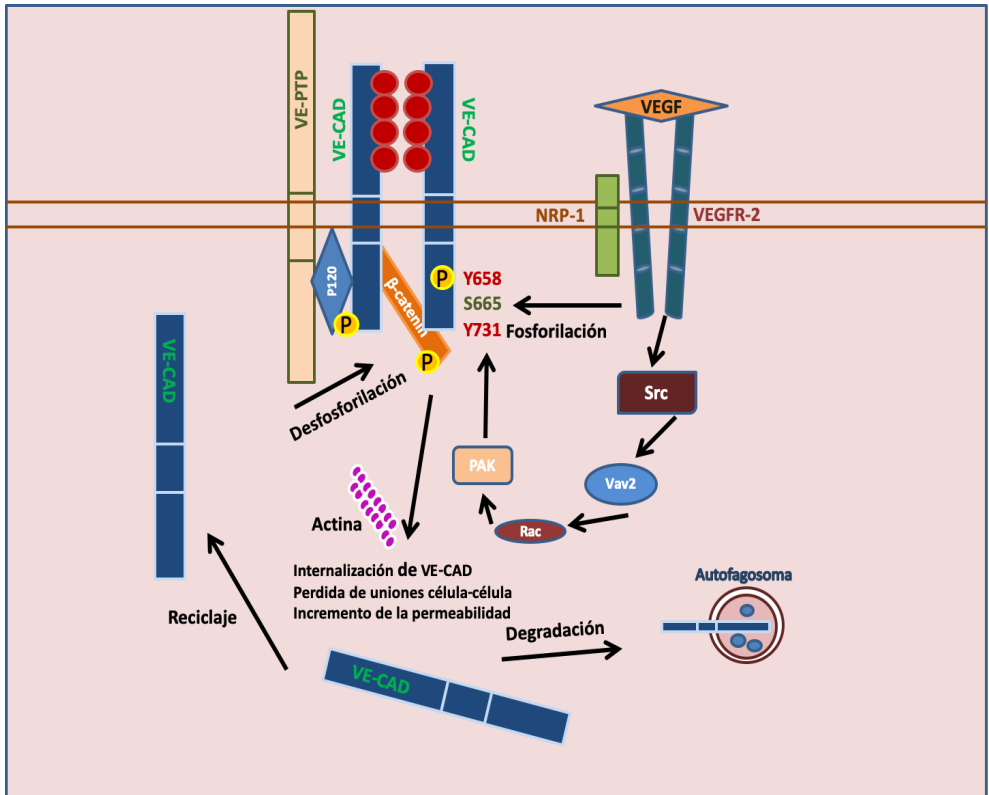


Fig. 7: Representación de la ruta de VEGF/VE-cadherina y sus implicaciones intracelulares.

4.2 Señalización de VE-Cadherina: p120

p120 catenina se describió originalmente como un sustrato de la quinasa Src, y más tarde como un componente del complejo cadherina-catenina. La proteína p120 catenina promueve la estabilidad de las cadherinas¹⁶¹, disminuyendo la susceptibilidad del complejo a la endocitosis, la ubiquitinación y la destrucción proteosomal¹⁶². Las fosfatasas tales como SHP-1, SHP-2, DEP1 y RPTP μ actúan sobre la p120-catenina. La tirosina fosfatasa RPTP μ se une a p120 de una manera independiente del dominio de armadillo central de p120¹⁶³. p120, contienen un dominio central de repetición de armadillo que facilita las interacciones proteína-proteína. El dominio armadillo es solo parcialmente homólogo entre las cateninas de la subfamilia p120 (identidad de secuencia primaria del 45-55%), y las regiones terminales amino y carboxilo son aún más divergentes. Además de unir y modular a E-cadherina puede modular una gran

diversidad de cadherinas clásicas, p120-catenina regula las GTPasas (por ejemplo, Rac1 y RhoA). Esto puede ocurrir mientras p120 está asociado o disociado del complejo cadherina-catenina¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. p120-catenina se asocia además con microtúbulos y proteínas motoras¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. p120-catenina se relaciona también con su entrada nuclear y su asociación con reguladores transcripcionales como Kaiso¹⁷⁰⁻¹⁷², Glis2¹⁷³ y REST/CoREST¹⁷⁴. En resumen, p120 se une y regula el complejo cadherina-catenina (uniones célula-célula), las proteínas GTPasas y factores citoesqueléticos (uniones célula-célula y otros) y factores de transcripción (núcleo). La fosforilación de la catenina p120, el estado de las isoformas y la localización intracelular varían según el tipo de célula y el tejido^{165,166,175}. Con respecto a la localización nuclear, se sugirió inicialmente que p120 contenía dos señales de localización nuclear (NLS)¹⁷⁶ y tres regiones potenciales de exportación nuclear (NES)¹⁷⁷ (**Fig. 8**)

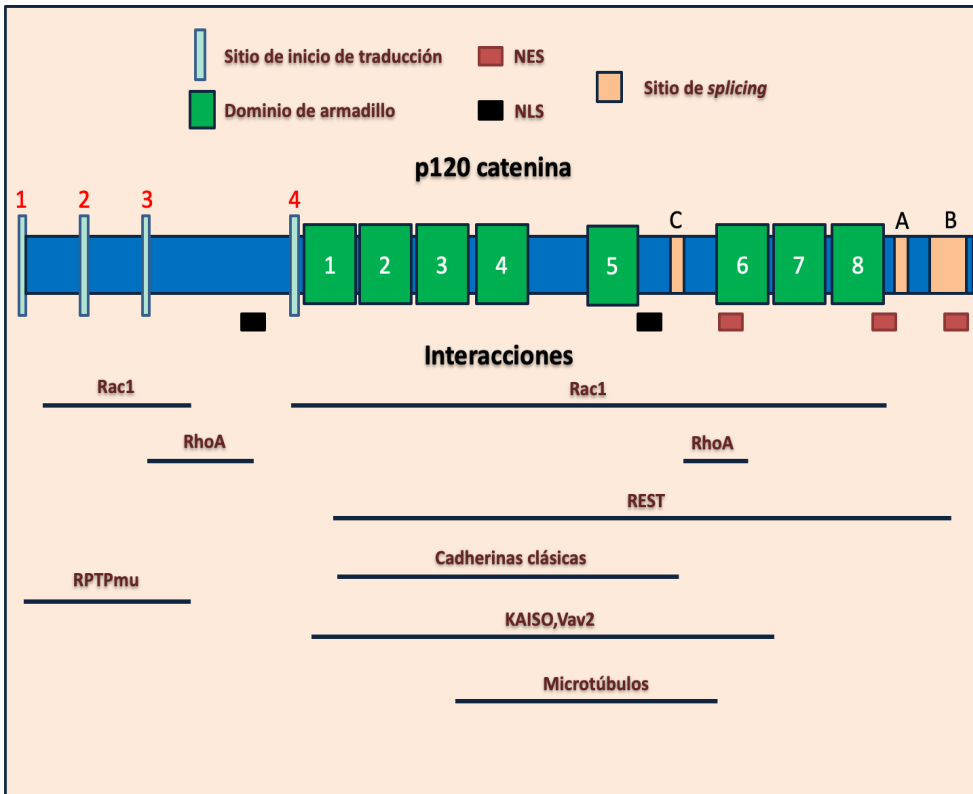


Fig. 8: Características estructurales de p120 e interacciones con proteínas. Se proporciona más detalle en el texto.

Considerando las posibilidades combinatorias que resultan de cuatro sitios distintos de iniciación de la traducción y cuatro exones ensamblados alternativamente, p120-catenina humana posee en teoría 64 posibles isoformas. Las isoformas 1 y 3 son las isoformas más ampliamente y abundantemente expresadas y estudiadas. La isoforma 1 se expresa preferentemente en células de tipo mesenquimal más móviles, mientras que la isoforma 3 caracteriza las células epiteliales. Sin embargo, las diferentes isoformas de p120 a menudo se co-expresan de manera equilibrada^{176,178}. La isoforma 1 de p120 contiene un dominio de bobina en espiral en el dominio N-terminal, que está ausente en las otras isoformas. Una región reguladora que alberga la mayoría de los sitios de fosforilación de tirosina y serina/treonina en p120 reside en el dominio N-terminal¹⁷⁹.

VE-Cadherina y muchos otros miembros de la familia de las cadherinas, está vinculada a través de su dominio citoplasmático a las proteínas de adhesiones como: p120, β -catenina y plakoglobina. La β -catenina y la plakoglobina se unen a la α -catenina, que interactúa con varias proteínas de unión a la actina, incluidas la α -actinina, zonula occludens-1 (ZO-1) entre otras¹⁸⁰. Las implicaciones que puede tener p120 en la dinámica de VE-Cadherina han sido sobre todo estudiadas en el contexto de la ruta anteriormente expuesta sobre el VEGF (ver apartado de VEGF/VE-Cadherina). Más en detalle, en las células de ovario de hámster chino (CHO), se observó que mutantes puntuales únicos de tirosina a ácido glutámico (Y a E) en las tirosinas 658 y 731 de VE-cadherina causan una función desregulada en la función de la barrera endotelial y pierden la capacidad de unirse a p120 y a β -catenina, respectivamente¹⁸¹. Todas las evidencias expuestas con anterioridad han sido estudiadas sobre el mecanismo intracelular en células endoteliales normales. La ruta de p120/VE-Cadherina tiene otro posible mecanismo intracelular sobre las células agresivas tumorales con capacidad de formar VM. Se ha observado que p120 puede unirse a Kaiso¹⁷⁰⁻¹⁷², la unión de p120 a Kaiso bloquea la posible capacidad represora de Kaiso sobre sus genes diana: Siamosis, CCND1, WNT 11, MMP-7 entre otros¹⁷⁰.

4.3 Señalización de VE-Cadherina: Kaiso

Kaiso (codificado por el gen denominado ZBTB33) recibió su nombre de la animada música caribeña Calypso que sonaba mientras los investigadores llevaban a cabo su descubrimiento. Se identificó hace menos de una década en un análisis de levadura doble híbrido para proteínas que interactúan directamente con la catenina p120 (p120, codificada por el gen de la catenina D1, CTNND1), un miembro de la familia del armadillo que incluye β -catenina¹⁸²⁻¹⁸⁴. Kaiso se desplaza entre el citoplasma y el núcleo, donde una de sus funciones es reprimir los genes específicos de secuencia. También se cree que Kaiso tiene funciones reguladoras de genes además de funciones citoplasmáticas que podrían o no estar sujetas a la modulación de p120.

El factor de transcripción Kaiso es miembro de la subfamilia de proteínas BTB/POZ de dedos de zinc (POZ-ZF); Kaiso reconoce y se une a secuencias consenso de ADN específica (sitios de unión a Kaiso KBS, TCCTGCnA), así como a los dinucleótidos CpG metilados efectuando una función represora tras la unión de Kaiso a sus genes dependientes¹⁸⁵. La participación de varias proteínas POZ-ZF en el cáncer y la evidencia que se analiza a continuación indican un papel para Kaiso en la progresión tumoral.

La sobreexpresión y la inhibición dominante negativa de Kaiso se realizó recientemente en *Xenopus*¹⁸⁶. Curiosamente, se descubrió que Kaiso reprime directamente los genes dianas de la ruta de WNT canónica, junto con la proteína de unión potenciador linfocitario (TCF/LEF). Este estudio se centró en el gen *Siamois*, que codifica un factor de transcripción de alta movilidad que promueve la dorsalización del mesodermo en *Xenopus*. Sin embargo, otros genes diana canónicos conocidos de WNT (TCF/LEF- β -catenina) que tienen funciones relacionadas con la proliferación, incluidos Fos, Myc y CCND1 (que codifica Cyclina D1), también parecían estar regulados de manera similar. Otros dos grupos científicos¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ también relacionaron a CCND1 como diana de la represión mediada por Kaiso¹⁸⁷. Recientemente, la metaloproteína 7 (MMP7, también conocida como matrilisina) de la matriz que promueve la invasión se identificó como una diana directa de la represión de Kaiso¹⁸⁹. Además, las señales de WNT no canónicas son moduladas por Kaiso, al menos en *Xenopus*, en el que la disminución de Kaiso conduce directamente a la

activación del promotor WNT 11¹⁸⁸. El ligando WNT 11 tiene actividades tanto no canónicas como canónicas^{190–192}. Las funciones no canónicas de las proteínas WNT en general incluyen la modulación de los movimientos celulares dirigidos en la morfogénesis tisular normal, así como el comportamiento aberrante de las células migratorias en el cáncer^{193–195}. Existen evidencias adicionales de que p120 catenina y β -catenina regulan de forma coordinada algunas dianas genéticas de la ruta WNT canónica, los represores Kaiso y TCF/LEF, respectivamente. Esto incluye observaciones de que Kaiso suprime la capacidad de la β -catenina exógena para generar ejes dorsales ectópicos en embriones de *Xenopus*. Cuando Kaiso se asocia a TCF, la sobreexpresión de Kaiso reduce la capacidad de TCF de asociarse con β -catenina, presumiblemente a través de una interferencia estérica¹⁸⁶. Se esperaría que esta última propiedad de Kaiso promoviese la represión transcripcional de los genes diana de la ruta de WNT canónica, junto con la capacidad notoria de Kaiso para unirse al ADN y reclutar co-represores a sitios de islas CpG específicos de secuencia o metilados. Estos resultados implican a Kaiso como un posible supresor tumoral potencial en ciertos tipos de cáncer.

Con respecto a lo que se conoce en humanos, ZBTB33 se ha asignado al coromosoма Xq23 y CTNND1 se ha asignado a 11q11. Según la base de datos de *Cancer Chromosomes Entrez* del Centro Nacional de Información Biotecnológica, se ha reportado que la eliminación o translocación de estas regiones tiene lugar en varios tumores sólidos como el cáncer de colon, pancreático y de ovario, y en la leucemia mieloblástica aguda¹⁸⁵. Se cree que la disminución de los niveles o la ausencia de expresión de E-cadherina, como se encuentra en numerosas líneas de células tumorales y cánceres, libera a p120 de las uniones célula-célula¹⁸⁵. Esta p120 citoplasmática podría entonces ingresar al núcleo para relajar la represión génica mediada por Kaiso. De hecho, la p120 nuclear ha sido observada en varias líneas celulares tumorales y cánceres que carecen de E-cadherina^{177,196,197} de manera similar a lo que sucede con la β -catenina nuclear (por ejemplo, en células de cáncer de colon). Sin embargo, la tinción inmunohistológica en la mayoría de los cánceres humanos muestra una pérdida de expresión de p120 en los puntos focales celulares con una mayor expresión en el citoplasma en lugar de una expresión nuclear de p120^{197–202}. Datos inmunohistoquímicos recientes sobre la expresión de Kaiso en tumores

han demostrado que las células tumorales a menudo, pero no siempre, expresan Kaiso nuclear. Las células invasoras en el borde del tumor tienen los niveles de tinción nuclear de Kaiso aumentados en comparación con las células en el centro del tumor²⁰².

Estudios previos han demostrado que Kaiso forma complejo con p120 y esta a su vez a E-cadherina y este complejo previene la unión de Kaiso a los promotores de sus genes dependientes: *CCDN1*, *WNT 11*, *MMP-7* entre otros¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. VE-cadherina podría también mediar la unión de p120/Kaiso y modificar así el efecto que podría tener Kaiso sobre sus genes dependientes, llevando todo ello a un posible actor principal a VE-cadherina en modelos de VM relacionado con la señalización membrana-citoplasma-núcleo de p120/Kaiso (**Fig. 9**).

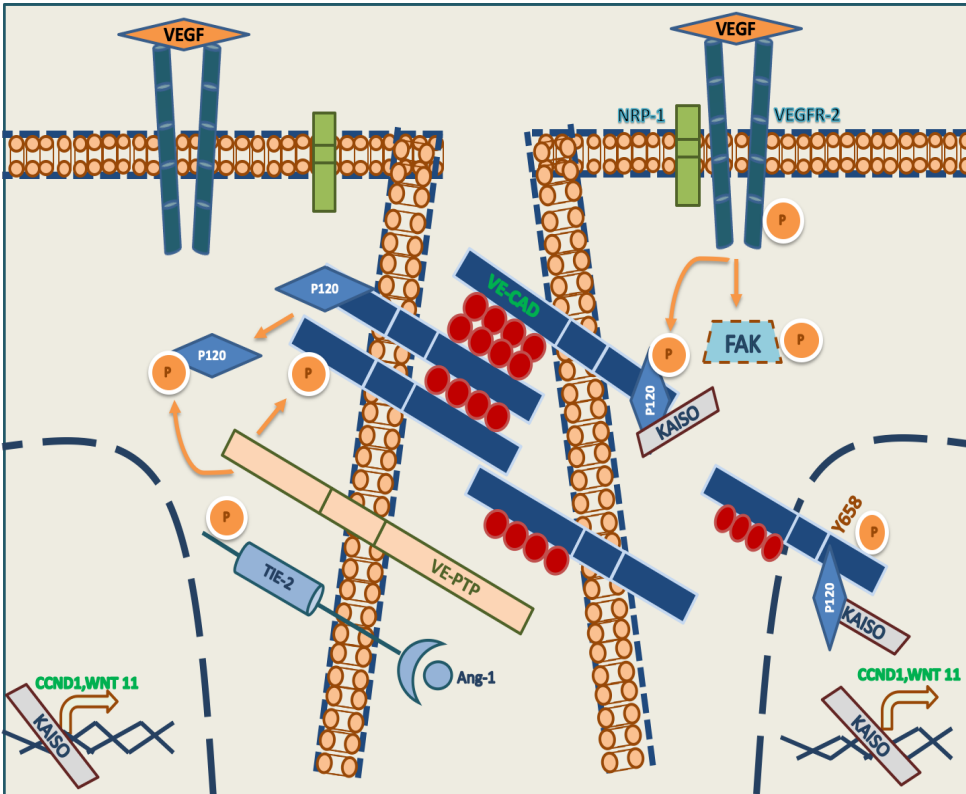


Fig 9: Señalización intracelular de VE-Cadherina en células VM. Se proporciona más detalle en el texto.

4.4 Señalización de VE-Cadherina: VE-PTP

El dominio intracelular V de VE-Cadherina es necesario para unirse a VE-PTP¹⁴⁴; esta unión es dependiente de plakoglobina (γ -catenina)^{145,203}. VE-PTP (proteína tirosina fosfatasa endotelial vascular), es una fosfatasa de tipo receptor específica de células endoteliales, cuyo nombre fue acuñado por su prevalencia en la unión a la VE-Cadherina¹⁴⁴. Aunque VE-PTP se describió en un principio por sus implicaciones vasculares embrionarias y los ratones nulos (VE-PTP) aunque experimentan angiogénesis mueren embrionariamente debido a defectos en la angiogénesis²⁰⁴. Alteraciones en VE-PTP también se han descrito en otras patologías: patología vascular ocular²⁰⁵, desarrollo de vasos sanguíneos²⁰⁶, angiogénesis aberrante en el cáncer de mama y progresión metastásica²⁰⁷. La mayoría de las implicaciones de la vía de VE-PTP son a través de la angiopoyetina y TIE-1/2; diferentes grupos farmacéuticos apuestan sobre la aplicación de un nuevo inhibidor de VE-PTP (AKB-9978, Aerpio Pharmaceuticals) que activa TIE-2 y estabiliza la vasculatura ocular en modelos de isquemia e inflamación. AKB-9778 activa TIE2, ampliando la activación de TIE2 por ANG1, y estimula la fosforilación de moléculas de señalización en la vía de TIE2, incluyendo AKT, eNOS y ERK²⁰⁵ (**Fig. 9**). Recientemente, Gong H et al en 2015 publicaron que la hipoxia (dependiente de HIF-2 α) aumenta la expresión de VE-PTP en la lesión pulmonar aguda²⁰⁸. Esas implicaciones sobre VE-PTP²⁰⁹ están siempre enfocadas en el contexto de los modelos endoteliales, pero se desconocen las implicaciones del eje VE-PTP/VE-Cadherina en el contexto de VM que necesita un nuevo enfoque para descifrar la vía molecular dentro de las células cancerosas de VM. (**Fig. 9**)

Así como VE-PTP juega un papel muy importante en el mantenimiento del estado de fosforilación de VE-Cadherina, también podría modificar el estado de fosforilación de p120, (RPTP μ puede unirse a p120, véase la **Fig. 8 y 9**). Todo ello lleva a que VE-PTP puede actuar como posible actor en el estado de unión de VE-Cadherina a p120 en modelos de VM.

4.5 Señalización de VE-Cadherina: Focal Adhesion Kinase (FAK)

La quinasa de adhesión focal (FAK) es un regulador multifuncional de la señalización celular dentro del microambiente tumoral²¹⁰⁻²¹². Durante el desarrollo y en diversos tumores, la FAK promueve la motilidad celular, la supervivencia y la proliferación a través de mecanismos dependientes de la quinasa e independientes²¹³. En los últimos años, se han iniciado varios ensayos clínicos que se encuentran en Fase I y II con inhibidores de FAK; Sin embargo, algunas de las funciones de FAK en la tumorigénesis permanecen bajo investigación actualmente^{214,215}.

La sobreexpresión de EphA2 se ha observado con un aumento de MMP-2 de una manera dependiente de FAK en modelos de VM²¹⁶. La propia FAK está altamente fosforilada en las posiciones Y397 e Y576 en melanoma altamente agresivo, pero no en células de melanoma poco agresivas; estos cambios postraduccionales son indicativos de una FAK completamente activa. La proteína conocida como no quinasa relacionada con FAK (FRNK) puede interactuar con las proteínas de adhesión focal, pero carece de actividad quinasa, por lo que se considera una proteína de FAK dominante-negativa. La expresión de FRNK en el melanoma agresivo disminuyó la invasividad, la migración y la capacidad para formar redes tubulares en geles de colágeno. También redujo los niveles de fosforilación de ERK1/2, cuya inhibición disminuyó los niveles de uroquinasa, así como la actividad de MMP-14 y MMP-2. Estos resultados apuntan a que la cascada de señalización de EphA2 promueve el VM a través de FAK y ERK, como también la vía de PI3K e MMP-14 que termina conduciendo como último paso la escisión de laminin-5 γ 2²¹⁷.

En esta relación de EphA2 con la FAK puede tener posibles implicaciones la VE-Cadherina ya que puede unirse a EphA2 y modificar la localización intracelular de las misma^{126,127}, se necesitan más enfoques sobre esta posible relación y las consecuencias posibles de la sobreexpresión u/o fosforilación que puede ocurrir entre EphA2/FAK y VE-cadherina²¹⁸.

Por otro lado, un estudio publicado en 2015¹⁴⁸ observó que VE-cadherina, más en concreto la Y658 puede ser fosforilada por la FAK en células tumorales de ovario (ID8-IP) como también en modelos de ratones de cáncer de mama (4T1-L) y la administración oral en ratones de inhibidores competitivos en el sitio activo de ATP de FAK (PND-1186: 30 mg/kg) mostró una disminución en el crecimiento tumoral y en la metástasis. FAK puede así tener un papel en la regulación de la fosforilación de VE-Cadherina, de echo los inhibidores de FAK (PF-271) inhiben la capacidad de formar VM en células agresivas de melanoma con alta expresión basal de pY658 de VE-Cadherina y su desregulación en la localización intracelular de la misma²¹⁹ (**Fig. 9**).

5. Hipoxia y VM

Una de las estrategias de supervivencia por parte de las células tumorales agresivas capaces de formas VM es a través de la hipoxia que tiene lugar en el propio tumor. El agotamiento de oxígeno es una situación bastante común en el microambiente tumoral y en gran medida esta adaptación hace más maligno el crecimiento celular. Los factores inducibles por hipoxia (HIF) y los elementos sensibles a hipoxia (HRE) desempeñan un papel crucial en este contexto²²⁰.

Notablemente, algunos genes potenciales de hipoxia que contienen elementos sensibles a hipoxia o HRE están involucrados en VM, como es el caso de VEGF-A, VEGFR-2, EphA2, Twist, Nodal, COX-2 y VE-cadherina^{88,157}. Como resultado, se ha observado por varios estudios que la hipoxia promueve VM en una amplia variedad de líneas celulares tumorales²²¹⁻²²³. En modelos murinos de melanoma, el VM se incrementó en condiciones de isquemia. Por otro lado, hay una correlación positiva entre la expresión de HIF-1 α y VEGF-A en células tumorales isquémicas²²⁴. En 2012, Misra RM y colaboradores observaron que HIF-1 α promovía el VM a través de la activación de Neuropilina-1 (NRP-1, receptor de VEGF y correceptor de VEGFR-2) en un modelo de fibrosarcoma humano. Inesperadamente, experimentos de silenciamiento de NRP-1 interrumpía totalmente la formación de tumores en fibrosarcoma²²⁵. En melanoma humano, la hipoxia induce una sobreexpresión de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica de linfomas de células B 2) que a su vez induce el aumento de la expresión de VE-Cadherina²²⁶. VE-Cadherina también está altamente regulada por HIF-1 α en carcinoma esofágico²²³. En resumen, la hipoxia tiene un papel muy importante en la activación de las rutas vasculogénicas en la formación de VM. La hipoxia también puede influir a la formación de VM a través de BNIP-3 (proteína que pertenece la familia de Bcl-2). La expresión de BNIP-3 se ve aumentada en condiciones de hipoxia, lo que permite su contribución en la migración celular y el desarrollo de VM en melanoma humano. BNIP-3 incrementó el VM modulando la reorganización de los filamentos de actina al citoesqueleto, mientras que el silenciamiento de BNIP-3 disminuyen la formación de VM, conduciendo a la formación de fibras de tensión de actina y reduciendo las uniones adherentes celulares²²⁷.

6. Microambiente tumoral y VM

Durante mucho tiempo, se ha descrito que el microambiente tumoral juega un papel importante en el desarrollo y progresión tumoral, incluyendo invasión y metástasis^{228,229}. En este nicho físico-químico incluyen: células estromales, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inmunes, matriz extracelular y citoquinas²³⁰. El microambiente tumoral en el contexto tumoral presenta una interacción bidireccional que regula varios procesos en la progresión tumoral y uno de estos procesos regulados en este nicho es el VM.

La complejidad de los tumores se ha reconocido cada vez más en las últimas décadas, hasta el punto de que numerosos artículos publicados en el campo de la investigación del cáncer ya no se centran exclusivamente en las células cancerosas. Por el contrario, los diferentes componentes del microambiente tumoral han recibido una atención cada vez mayor.

La primera evidencia de la influencia del microambiente tumoral en VM fue propuesta por Hendrix et al en 2002²³¹. En un estudio *in vivo* indujeron un ambiente isquémico por cirugía en la arteria femoral en ratones desnudos y los compararon con ratones inyectados con células tumorales agresivas y poco agresivas de melanoma humano. Observaron las células agresivas de melanoma (C8161) y no las poco agresivas (C81-61), se encontraban superpuestas con células endoteliales en la vascularización en isquemia de musculo. También encontraron por técnicas de inmunohistoquímicas que solo los ratones que fueron inyectados con las células C8161 expresaban marcadores de formación de vasculogénesis embrionaria entre ellas Notch-3 y 4²³¹. En otro estudio, este mismo grupo demostró que las células agresivas de melanoma pueden modificar el microambiente y en consecuencia reprogramar la expresión de ciertas proteínas en las células poco agresivas de melanoma e inducir en estas la formación de VM. Estudios de microarrays de expresión confirmaron que tanto la expresión de genes como de proteínas medidas por *Western Blot* cambiaba tras poner en contacto los medios condicionados de las células agresivas de melanoma en las células poco agresivas de melanoma y todo ello permitió producir VM en las células poco agresivas de melanoma. Entre los genes regulados como los niveles de proteína que aumentaron están: EphA2, VE-Cadherina TIE-1. VEGF-C, MMPs (metaloproteinasas), laminina 5

gamma 2²³². La cooperación entre células endoteliales normales y células tumorales con capacidad de formar VM se han visto implicadas en la progresión del cáncer de pulmón²³³. Más aun, células de melanoma agresivo inducen VM en co-cultivo con células normales humanas estromales del mesénquima. Este efecto es mediado por VEGF-A²³⁴.

Se ha demostrado que la hipoxia promueve el VM a través de otras vías de señalización además de la VE-Cadherina. Por ejemplo, la estabilización mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) de HIF-1 α activó el protooncogén met, que indujo la formación de tubos *in vitro* en matrigel en células de melanoma²³⁵. Además, HIF-1 α y HIF-2 α promovieron la formación de tubos *in vitro* en matrigel a través de la regulación positiva de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) C y D, así como el receptor de VEGF (VEGFR3)¹⁵⁹. En el cáncer de mama triple negativo, la hipoxia aumentó la subpoblación de células CD133⁺ (comúnmente consideradas como células madre cancerosas) a través de un mecanismo mediado por Twist1. Este cambio de población pareció mejorar la formación de tubos, ya que se encontró que las células CD133⁺ cubrían los tubos similares a VM²³⁶. Además, HIF1 α podría promover la formación de tubos en el carcinoma hepatocelular mediante la regulación ascendente de la lisil oxidasa como 2 (LOXL2)^{237,238}, que participa en la reticulación del colágeno durante la remodelación de la matriz extracelular.

La importancia de las células no cancerosas dentro del tumor del estroma también está ganando lentamente atención en el estudio de VM. Los macrófagos asociados a tumores (TAM por sus siglas en inglés) parecían promover la formación de VM en el glioblastoma multiforme correlacionado con un aumento en la expresión de la ciclooxigenasa 2 en las células tumorales²³⁹. Los fibroblastos asociados con el cáncer (CAF por sus siglas en inglés) también pueden ser determinantes en la formación de VM. En un estudio reciente, se inyectaron células vasculogénicas de melanoma murino en ratones que portaban una delección específica de CAF para la proteína matricelular CCN2 y obtuvieron como resultado que la ausencia de CCN2 derivado de fibroblastos redujo la vasculatura tumoral, incluyendo VM²⁴⁰. Finalmente, una publicación reciente de Thijssen et al.²⁴¹ mostraron que los tejidos PAS⁺ en el melanoma cutáneo humano se tiñen positivamente para el marcador de pericito α -actina del músculo liso (α SMA) dentro de las redes de

matriz extracelular revestidas por células tumorales. Además, cuando las células tumorales VM⁺ se cultivaron conjuntamente con pericitos, hubo una estabilización de las redes VM hasta 96 h. Se demostró que el reclutamiento de pericitos en las redes de VM depende de la señalización de PDGF-β, mientras que la adición de STI-571 (mesilato de imatinib) para inhibir el receptor de PDGF obstaculizó la formación de VM y el crecimiento tumoral.

7. Cancer Stem Cells (CSCs, células madre del cáncer) y VM

El VM requiere una respuesta adaptativa de las células tumorales y la plasticidad celular es una propiedad esencial para este proceso. Las CSCs son por definición una subpoblación de células tumorales con una alta plasticidad celular. En este contexto, la plasticidad se define como la capacidad pluripotente de las CSCs para producir una trans-diferenciación celular. En 1994, Lapidot et al y Cáceres Córtes et al, observaron la primera evidencia de células madre de cáncer iniciadoras de tumor por inyección de diferentes subpoblaciones de células de leucemia en ratones²⁴². En la actualidad, las CSCs se han visto implicadas en una gran variedad de tumores sólidos, como el cáncer de mama²⁴³, gliomas²⁴⁴, próstata²⁴⁵, melanoma²⁴⁶ entre muchos otros.

Las CSCs representan una subpoblación de células tumorales agresivas con capacidad de auto renovación, diferenciación de diferentes linajes celulares, iniciación tumoral y resistencia a la radio-quimioterapia^{244,247,248}. El fenotipo de las CSCs se exagera en el nicho perivascular tumoral y esto correlaciona con agresividad tumoral²⁴⁹. Además, las CSCs se pueden diferenciar a células endoteliales, demostrando este hecho la implicación de las CSCs en vascularización tumoral²⁵⁰. Varios trabajos han vinculado las CSCs con la capacidad de formar VM en varios modelos tumorales. Más en concreto, en cáncer de mama triple negativo la capacidad de formar VM correlaciona estadísticamente con la expresión del marcador CD133 de CSCs¹¹² y dicha correlación también fue demostrada en melanoma uveal y melanoma cutáneo, gliomas, carcinoma hepatocelular y cáncer de pulmón no microcítico^{112,251,252}.

En células de melanoma agresivo se produce VM y este fenómeno se inhibe por la depleción de la proteína VE-Cadherina¹³³. En células madre del cáncer de melanoma se relacionó la expresión de CD133 y ABCB5 con la expresión de VE-Cadherina y dichas células madre tumorales se ubicaban en el nicho perivascular tumoral permitiendo la formación de VM²⁵³.

8. Terapia anti-vascular contra el cáncer

Han pasado más de 30 años desde que Judah Folkman hipotetizó que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis⁴⁰. Investigaciones posteriores han llevado a la identificación de varios reguladores de la angiogénesis, algunos de los cuales representan posibles dianas terapéuticas. Sin embargo, aunque los agentes anti-vasculares a menudo son muy activos en los estudios preclínicos, los ensayos clínicos recientes que incluyen estos agentes han sido tanto alentadores como decepcionantes. Debido al papel predominante de la brotación capilar y su principal mediador molecular VEGF en la vascularización tumoral, la inhibición de VEGF parece ser necesaria pero probablemente es insuficiente para detener la progresión del tumor de forma permanente en muchos tipos de cáncer. Debido a la existencia de múltiples mecanismos de vascularización y vías de señalización angiogénicas, la inhibición de una sola vía probablemente desencadenará mecanismos de vascularización alternativos y vías de factor de crecimiento adicionales. En consecuencia, la aplicación de la terapia anti-vascular en pacientes con cáncer requiere la identificación del perfil de vascularización individual y la maquinaria molecular detrás del proceso de vascularización y, además, la individualización de la terapia anti-vascular para obtener beneficios potenciales^{254,255}.

Cualquier clasificación de estrategias anti-vasculares es difícil, con superposición en varias características. Sin embargo, las principales categorías de estos enfoques que se han desarrollado son angiosupresores (agentes anti-angiogénicos) y terapias de focalización vascular (agentes disruptores vasculares)²⁵⁶. Aunque la quimioterapia metronómica (modalidad de tratamiento en dosis bajas de forma crónica al paciente) utiliza fármacos citotóxicos convencionales, las dianas principales de esta estrategia son las células endoteliales aberrantes. Esta es la razón por la cual Browder et al²⁵⁷

acuñaron el término "quimioterapia antiangiogénica" para describir este tratamiento.

8.1 Terapia angiosupresora (agentes anti-angiogénicos)

Este enfoque de tratamiento está motivado por el hecho de que la neoangiogénesis en el cáncer requiere la inducción de la proliferación de las células endoteliales por mitógenos específicos o inespecíficos. Estos agentes se dirigen a la producción de mitógenos endoteliales, los mitógenos mismos, sus receptores endoteliales, las vías de señalización asociadas, las integrinas endoteliales y las metaloproteinasas²⁵⁸ (Tabla 4).

Agentes	Diana/ mecanismo de acción	Fase clínica
Angiosupresores		
Agentes anti-VEGF	Anticuerpo contra VEGF-A	Fase III, aprobado por la FDA para cáncer colorrectal
• Bevacizumab		
• VEGF-Trap	VEGF-A, PlGF y unión de VEGF-B	Fase I
• VEGF-AS	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D	Fase I
VEGFR y agentes contra el receptor TK		
	Anticuerpo contra VEGFR-2	Fase I
• IMC-1C11		
• ZD6474	VEGFR-2, EGFR, RET	Fase I/II
• PTK787/ZK222584 (vatalanib)	VEGFR-1, -2, -3; PDGFR- β , c-Kit	Fase II/III
• BAY 43-9006 (sorafenib)	EGFR-2, -3; PDGFR, RET, c-Kit, Raf	Fase III, aprobado por la FDA para cáncer renal
• SU11248 (sunitinib)	VEGFR-1, -2; PDGFR, FLT3, c-Kit	Fase III, aprobado por la FDA para cáncer renal
• AG-013796	VEGFR-1, -2, -3; PDGFR- β , c-Kit	Fase I/II
• Angiozyme	VEGFR-1, ribozima destructora de ARNm	Fase I/II
Señalización de integrina	Imitando el dominio peptídico de reconocimiento del ligando RGD común a ligandos de integrina-v	Fase I/II
• EMD 121974 (cilengitide)		
• MEDI-522 (vitaxin)	Anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$	Fase I/II
Miscelánea	Efecto inhibidor múltiple sobre el brote de células endoteliales inducido por bFGF, VEGF y TNF-α	Fase I/II
• AE-941	Inhibidor de MMP-2, -9, -12 y VEGFR-2	Fase II/III
• Marimastat	MMP2/9	Fase III
• BAY-12-9566	MMP2/9	Fase III
• AG3340	MMP2/9	Fase III
• Endostatina	Integrina $\alpha_v\beta_1$	Fase II/III
• ABT-627	Receptor de endotelina	Fase II/III

Tabla 4: Ejemplos de agentes anti-vasculares en desarrollo clínico.

A pesar de los prometedores resultados preclínicos con estos agentes, en los primeros ensayos clínicos rara vez se observaron respuestas positivas en los

pacientes. El avance clínico para la terapia angiosupresora se derivó de un ensayo de fase III que demostró una supervivencia significativamente prolongada cuando se usó bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF, con quimioterapia en pacientes con cáncer colorrectal metastásico⁴⁸. En base a estos resultados, bevacizumab se convirtió en el primer agente anti-angiogénico en ser aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA de sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer. En posteriores ensayos de fase III, el bevacizumab en combinación con la quimioterapia estándar mejoró la supervivencia general en pacientes con cáncer de pulmón y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama²⁵⁴. Además, se ha reportado que es activa en pacientes con cáncer metastásico de células renales como monoterapia (mejora la supervivencia libre de enfermedad, pero no en la supervivencia general)²⁵⁹.

Recientemente se obtuvo un mayor éxito clínico con agentes de múltiples dianas y de amplio espectro que se dirigen a los receptores de VEGF y otras tirosinas quinasas presentes en las células endoteliales y cancerosas (**Tabla 4**). Los ensayos de fase III han demostrado la eficacia de SU11248/sunitinib (dirigido a VEGFR-1, -2; al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR, FLT3 y c-Kit) y BAY-43-9006/sorafenib (dirigido a VEGFR-2, -3; PDGFR, RET, c-Kit y Raf) en el tratamiento de pacientes con cáncer renal²⁵⁴. Según estos resultados, sunitinib y sorafenib ahora están aprobados por la FDA como monoterapias para el cáncer de riñón. También se han encontrado resultados prometedores con la combinación de ZD6474 (dirigido a VEGFR2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y RET) y quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Curiosamente, el reemplazo de bevacizumab con inhibidores de tirosina quinasa (TK) similares, como PTK787/ZK 222584/vatalanib (dirigido a VEGFR-1, -2, -3; PDGFR- β y c-Kit), en el régimen combinado no resultó con una eficacia similar en pacientes con cáncer colorrectal previamente tratados con quimioterapia o sin tratamiento previo²⁶⁰. Sin embargo, el éxito clínico de bevacizumab, sunitinib y sorafenib como medicamentos novedosos para el tratamiento de pacientes con cáncer ha confirmado la relevancia de la investigación sobre la angiogénesis y ha estimulado la búsqueda de enfoques anti-angiogénicos novedosos y más efectivos.

8.2 Terapia de focalización vascular: agentes disruptores vasculares (VDAs)

La terapia de direccionamiento vascular (incluidos los anticuerpos anti-células endoteliales y los VDAs basados en ligandos y moléculas pequeñas; **Tabla 5**) reconoce el hecho de que el diagnóstico clínico de cáncer ocurre con frecuencia cuando el tejido tumoral ya ha establecido su vasculatura^{256,258}. Esta estrategia se basa en la capacidad de los VDAs para distinguir los capilares tumorales de las normales en función de su diferente fenotipo, mayor potencial proliferativo y permeabilidad, y la dependencia inherente del citoesqueleto de tubulina. Los VDAs causa una inhibición selectiva y rápida de los capilares tumorales establecidos, lo que resulta en una muerte celular extensa de cáncer en las áreas centrales de los tumores, aunque dejan la perfusión en regiones tumorales periféricas relativamente intactas^{256,261}. El mecanismo de los VDAs no depende del tipo de vascularización que ocurre en un cáncer dado. Basado en desarrollos preclínicos prometedores, varios VDAs han entrado en desarrollo clínico (**Tabla 5**).

Aunque los tumores, como otros tejidos, requieren una red de vasos que les suministre sangre, la vasculatura tumoral no se deriva necesariamente por la proliferación de las células endoteliales y el brote de nuevos capilares. Además de los mecanismos alternativos de vascularización, las nuevas estrategias antivascuales deben armonizarse con la etapa de progresión del tumor y con el mecanismo molecular responsable del fenotipo angiogénico. Una mejor comprensión de los diferentes mecanismos de vascularización de los diversos tipos de cáncer ciertamente ayudará a afinar estas nuevas estrategias contra el cáncer.

Agentes	Diana/ mecanismo de acción	Fase clínica
VDA Ligandos directos contra VDAs	Dominio ED-B de fibronectina	Preclínico
<ul style="list-style-type: none"> L19 cadena simple Fv 		
<ul style="list-style-type: none"> Anticuerpo contra endoglina ligada a ricina-A 	Endoglina	Preclínico
<ul style="list-style-type: none"> Anti-VCAM-1 vinculado a la inducción de coagulación 	VCAM-1	Preclínico
<ul style="list-style-type: none"> Anti-TES-23 	Marcador de células endotelial relacionado con CD44	Preclínico
<ul style="list-style-type: none"> Anticuerpo desnudo contra fosfatidilserina 	Fosfatidilserina	Preclínico
<ul style="list-style-type: none"> $\alpha_v\beta_3$ dirigido a ligando que produce apoptosis en células endoteliales induciendo ATP^{ras}-Raf 	ATP ^{ras} -Raf	Preclínico
Moléculas pequeñas VDAs		
<ul style="list-style-type: none"> Profármaco de CA4; AVE8062 y Oxi4503 (análogos sintéticos de combretastatina) 	Polimerización de actina, estabilización de filamentos a través de la vía de señalización Rho	Fase I/II
<ul style="list-style-type: none"> ZD6126 	Inhibición de la polimerización de microtúbulos sobre las células endoteliales	Fase I
<ul style="list-style-type: none"> ABT-751 	β -tubulina	Fase I
<ul style="list-style-type: none"> DMXAA (análogo del ácido acético de flavona) 	Liberación de TNF- α , inducción del factor nuclear- $\kappa\beta$	Fase I/II

Tabla 5: Ejemplos de agentes VDAs en desarrollo preclínico y clínico.

8.3 Terapia contra el VM

Dado que el uso de terapias anti-angiogénicas contra el desarrollo de tumores ha tenido resultados limitados e ineficaces, existe una necesidad imperativa de intentar buscar nuevas terapias contra la angiogénesis antitumoral centradas en el mecanismo alternativo dirigido en las células tumorales (por medio de la trans-diferenciación) para convertirse en pseudo células vasculares que conducen a VM. Numerosos estudios han intentado deshabilitar específicamente el VM en diferentes modelos de tumores (**Tabla 6**).

Agentes	Diana/ mecanismo de acción	Efecto en VM	Referencias
bevacizumab (Avastin)	VEGF	No efectos	Wang et al (77)
cetuximab (Erbix)	EGFR	No descrito	
panitumumab (Vectibix)	EGFR	No descrito	
sunitinib (Sutent)	VEGFRs, PDGFR- β , RET	No descrito	
sorafenib (Nexavar)	VEGFRs, PDGFR- β , Raf-1	No descrito	
erlotinib (Tarceva)	EGFR	No descrito	
imatinib (Gleevec, Glivec)	Inhibición TK; BCR-ABL	Inhibición	Paulis et al (78)
gefitinib (Iressa)	EGFR	No descrito	
pazopanib (Votrient, GW786034)	VEGFRs, PDGFR- β , c-Kit	No descrito	
lapatinib (Tykerb)	EGFR, HER2	No descrito	
thalidomida (Thalomid)	Productos TNF α ; ROS	Inhibición	Zhang et al (79)
TNP-470 (AGM-1470)	Inhibición TK	No efectos	van der Schaft et al (80)
endostatina (rhEndostatin, Endostar)	Señalización de integrinas	No efectos	van der Schaft et al (80), Liu et al (81)
rapamycina (Rapamune)	mTOR, VEGF	Inhibición	Su et al (82)
curcumina	EPHA2, PI3K, MMPs	Inhibición	Chen et al (83)
isoxanthohumol	TGF- β	Inhibición	Serwe et al (84)
vadimezan (ASA404, AS1404, DMXAA)	MAPK, VE-cadherina	Inhibición	Zhao et al (85)
resveratrol	VEGFR1, VEGFR2	Inhibición	Vartanian et al 86*
epirubicina plus celecoxib liposomas	VE-cadherina/MMP-2/MMP-9/PI3K/FAK	Inhibición	Ju RJ et al (87)
ginsenosido Rg3	VE-cadherin/ MMPs/ EphA2	Inhibición	Jing-Qiang Guo et al (88)
STI-571	PDGFR- β	Inhibición	Thijssen VL et al (253)
PF-562271	FAK/VE-cadherina	Inhibición	Delgado-Bellido D et al (70)

Tabla 6: Ejemplos de agentes que han tenido posibles efectos en la formación de VM.^{219,241,262-273.}

Un metanálisis de 22 estudios clínicos elegibles con datos relevantes para VM y una supervivencia a 5 años de 3062 pacientes en 15 tumores con VM se asoció el VM con un mal pronóstico al finalizar el estudio⁸⁹. Dado que el uso de terapias anti-angiogénicas (preferiblemente, anticuerpos contra la unión de VEGF sobre su receptor, bevacizumab y afines) contra el desarrollo de tumores ha tenido resultados limitados, existe la necesidad de intentar nuevas estrategias terapéuticas contra la angiogénesis tumoral¹⁶⁰ centradas en el mecanismo alternativo de orientación utilizado por las células tumorales que se convertirán en células pseudovasculares que conducen a VM. Un único compuesto molecular pequeño con un interés particular en desarrollo clínico (NCT03582618) para el tratamiento del cáncer anti-VM es el CVM-1118; (clasificado como un derivado de fenil-quinolina producido por la compañía TaiRx) que está siendo considerado como agente para poder llegar a la clínica con posibilidad: en los resultados obtenidos en ensayos pre-clínicos, la estructura central del CMV-1118 se ha demostrado tener este compuesto potentes propiedades antineoplásicas y anti-mutagénicas²⁷⁴.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, la inhibición farmacológica de la actividad de FAK/pY658 de VE-Cadherina con el inhibidor de la FAK específico PF-562271 puede representar una nueva oportunidad terapéutica en la represión de genes implicados en la promoción de VM en células de melanoma con capacidad de formar VM. Del mismo modo, la inhibición de la vía VE-PTP/TIE-2 con AKB-9778 podría abrir nuevas formas de controlar la capacidad de formar pseudo-vasos por las células de mimetismo vascular. Finalmente, los nuevos tratamientos dirigidos a las células murales, como los pericitos, también podrían tener valor terapéutico. Es el caso de apuntar al eje PDGF-B con STI-571, que resultó útil en modelos de ratones con formación de VM. Dirigirse a VM con compuestos moleculares específicos combinados con terapias de primera línea puede representar el mejor enfoque para obtener un buen pronóstico en pacientes en el futuro.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El mimetismo vasculogénico (VM) ha implicado en el campo del desarrollo de la angiogénesis tumoral un punto de inicio para desarrollar e investigar las pautas de acción que se encuentran intrínsecamente envueltas en la maquinaria celular tumoral, para poder así las mismas sobrevivir a la hostilidad impuesta por parte del propio organismo. En los inicios del desarrollo de terapias anti-angiogénicas por parte de la comunidad científica como de las farmacéuticas las terapias anti-angiogénicas eran alentadoras, pero con el desarrollo de diferentes y diversos ensayos clínicos fallidos, se ha activado la imperativa crítica de desarrollar e investigar los mecanismos adyacentes y paralelos a modelos de angiogénesis ya establecidos con anterioridad. Como ya hemos comentado el estudio del desarrollo del VM por parte de las células tumorales puede tener diversos abordajes. En esta tesis doctoral el **objetivo general** se centra en determinar el papel de VE-Cadherina, su fosforilación y su asociación a diversas proteínas en el desarrollo de VM.

Para la realización de esta tesis doctoral nos propusimos los siguientes **objetivos específicos** para llevar a cabo el estudio de la implicación de VE-Cadherina sobre la dinámica de formación del VM:

- Estudiar la expresión aberrante de VE-Cadherina y VE-PTP y su implicación en el desarrollo del mimetismo vasculogénico.
- Analizar los cambios postraduccionales de VE-Cadherina y las posibles asociaciones a *partners* de VE-Cadherina y como estas interfieren en el desarrollo de VM.
- Observar el impacto directo de la inhibición de la FAK sobre la dinámica intracelular de VE-Cadherina y de formación de VM.
- Estudiar la localización subcelular del complejo de VE-Cadherina/p120/Kaiso y observar el impacto de la inhibición de la FAK sobre el mismo.
- Evaluar el estado de represión génica por acción de pY658 sobre los genes dependientes de Kaiso.
- Identificar la posible implicación de VE-PTP y su unión a VE-Cadherina/p120.

- Descifrar el mecanismo de degradación de VE-Cadherina a través de la inhibición de VE-PTP en las células de melanoma VM⁺.

MATERIAL Y METODOS

IV. MATERIAL Y METODOS

Reactivos y anticuerpos

Se utilizaron los siguientes reactivos: PF-562271 (PF-271, Abcam), VEGF (Peprotech), pervanadato de sodio $V_2O_5 + 6 NaOH \rightarrow 2 Na_3VO_4 + 3 H_2O$ (22). Leptomicina B (Sigma Aldrich) fue usado a una concentración de 20 ngr/ml durante 3 horas, Cloroquina (Sigma Aldrich) fue usado a una concentración de 20 μ M durante 3 horas, Lastacistina (Sigma Aldrich) fue usado a una concentración de 30 μ M durante 30 minutos y MG-132 (Sigma Aldrich) fue usado a una concentración de 3 μ M durante 3 horas.

El pervanadato de sodio Na_3VO_4 (0,2mM durante 5 minutos) fue únicamente usado como tratamiento para comprobar la especificidad del anticuerpo Y658 de VE-Cadherina, ya que dicho químico provoca la inactividad de las fosfatasa celulares e incrementa la fosforilación de la VE-Cadherina como se ha publicado en diversos artículos^{150,275}.

Los anticuerpos utilizados para la realización de esta tesis doctoral fueron: Y658 VE-Cad de conejo. (1: 1000 WB, 1: 100 IF, Termofisher), VE-Cad dominio C-ter de ratón (1: 500 WB, 1:50 IF, 2 μ g IP, clon F-8, sc-9989), FAK de conejo (1: 2000 WB, clon C-20, sc-558), VE-Cad dominio extracelular de ratón (1: 1000 WB, 1: 100 IF, clon BV6, Millipore), anti-fosfotirosina p-Tyr de ratón (1: 500 WB, 2 μ g IP, clon PY20, sc-508), Kaiso de ratón (1: 1000 WB, clon 6F, Millipore), Kaiso grado CHIP de ratón (8 μ g de CHIP, clon 6F8, Abcam), α -tubulina de ratón (1: 10000 WB, clon B-5-1- 2, Sigma-Aldrich), p120 catenina de ratón (1: 1000 WB, 1: 100 IF, BD Biosciences), lamin B1 de conejo (1: 1000 WB, Abcam), PARP-1 de ratón (1: 1000 WB, Calbiochem), Y731 VEC de conejo (1: 1000 WB, Biotech A8251), Glut1 de conejo (1: 1000 W Santacruz H-43), anti-phosphotyrosine p-Tyr de ratón (1:1000 WB, clone 4G10, Millipore), VE-PTP de ratón (1:1000 WB, 2 μ g IP, Clone 12/RPTPb, BD Biosciences) y LC3-II de raton (1:100 WB, clon 5F10, NanoTools) (**Tabla 7**) (WB: *Western Blot*, IF: inmunofluorescencia y IP: inmunoprecipitación).

Nombre/Clon	Huésped	Dosis	Firma
Anticuerpos			
• Y658 VE-CAD	Conejo	1:1000 WB, 1:100 IF	ThermoFisher
• VE-CAD dominio C-ter (Clon F-8)	Ratón	1:500 WB, 1:50 IF y 2µg IP	Santa Cruz
• VE-CAD dominio extracelular (Clon BV6)	Ratón	1: 1000 WB, 1: 100 IF	Merck Millipore
• FAK (Clon C-20)	Conejo	1: 2000 WB	Santa Cruz
• p-Tyr (Clon PY20)	Ratón	1: 500 WB, 2 µg IP	Santa Cruz
• Kaiso (Clon 6F)	Ratón	1: 1000 WB	Merck Millipore
• Kaiso CHIP grade (Clon 6F8)	Ratón	8 µg de CHIP	Abcam
• α-tubulina (Clon B-5-1- 2)	Ratón	1: 10000 WB	Sigma-Aldrich
• p120 catenina (98/pp120)	Ratón	1: 1000 WB, 1: 100 IF y 2µg IP	BD Biosciences
• Lamin B1	Conejo	1: 1000 WB	Abcam
• PARP-1	Ratón	1: 1000 WB	Calbiochem
• Y731 VE-CAD (Clon A8251)	Conejo	1: 1000 WB	Biotech
• Glut 1 (Clon H-43)	Conejo	1: 1000 WB	Santa Cruz
• p-Tyr (Clon 4G10)	Conejo	1: 1000 WB	Merck Millipore
• VE-PTP (Clon 12/RPTPb)	Ratón	1:1000 WB y 2 µg IP	BD Biosciences
• LC3-II (Clon 5F10)	Ratón	1:1000 WB	NanoTools
Reactivos			
• PF-562271		1 µM	Abcam
• VEGF-165		80 ng/ml	Peptotech
• Pervanadato de sodio Na ₃ VO ₄		50 mM	
• Cloroquina		20 µM	Sigma-Aldrich
• Lastacistina		30 µM	Sigma-Aldrich
• MG-132		3 µM	Sigma-Aldrich

Tabla 7: Representación de los anticuerpos (Nombre/Clon, huésped, dosis usada y marca comercial) y reactivos utilizados para la realización de la tesis doctoral. WB: uso en *Western Blot*, IF: uso en inmunofluorescencia, IP: uso en inmunoprecipitación y CHIP: uso en inmunoprecipitación de cromatina.

Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo de tesis doctoral se han utilizado dos líneas celulares de melanoma uveal humano: **MUM-2B** y **MUM-2C**.

Ambas líneas celulares se extrajeron originalmente del hígado de pacientes con metástasis de melanoma uveal que fallecieron a causa de la enfermedad²⁷⁶. Los análisis morfológicos y funcionales revelaron que las células MUM-2B expresan fenotipos mesenquimales y epiteliales, altamente invasivas y capaces de formar mimetismo vascular. La línea celular MUM-2C es usada como control y es menos metastásica.

MUM 2B son células altamente agresivas y esto queda de manifiesto por su capacidad de formar redes tubulares en modelos tridimensionales en matrigel *in vitro* e *in vivo*, unas de las posibles causas de esta capacidad de formar estructuras pseudovasculares se atribuye en parte al tener sobreexpresadas diferentes proteínas que tiene una función normal en endotelio, siendo así las proteínas implicadas en esta transformación: EphA2, VE-Cadherina TIE-1, VEGF-C, MMPs (metaloproteinasas), laminina 5 gamma 2²³². En contra posición las células de melanoma uveal MUM 2C no son capaces de formar dichas redes tubulares como tampoco contienen una expresión de proteínas presentes en endotelio.

También se utilizaron para la realización de esta tesis doctoral las células de melanoma cutáneo: **C8161** y **C81-61**. Ambas líneas celulares tienen similitudes y diferencias en formación de VM como así en expresión de VE-Cadherina y TIE-1 como las células anteriormente expuestas (MUM 2B, MUM 2C respectivamente)^{131,232}.

Las líneas celulares MUM 2B, MUM 2C, C8161 y C81-61 fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero bovino inactivado (FBSi) al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina / estreptomycin al 1% (laboratorios PAA). Todas las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en incubadoras de células. Dichas líneas celulares se sometieron a diferentes pases (1:6) semanales para su mantenimiento mediante tripsinización previo lavado con PBS 1X y posterior centrifugación (1500 rpm durante 5 minutos).

La línea celular **HUVEC** (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) fue utilizada como control positivo de expresión y mecanismo intracelular de VE-Cadherina y las proteínas relacionadas a la misma. Dichas células fueron cultivadas en medio de crecimiento de células endoteliales-2 (EGM-2 de sus siglas en inglés) (Lonza) suplementado con FBSi al 5% y penicilina/estreptomycin al 1% (laboratorios PAA). Las células HUVEC se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en incubadoras de células. Dichas líneas celulares se sometieron a diferentes pases (1:4) semanales para su mantenimiento mediante tripsinización previo doble lavado con PBS 1X y posterior centrifugación (1500 rpm durante 5 minutos). Todas las líneas

celulares fueron analizadas periódicamente mediante PCR para descartar contaminación por micoplasma. Las secuencias de los *primers* (Sigma Aldrich) utilizadas para la detección fueron:

-*Sense*:5'-GATGTCAAGAGTGGGTAAGGTT-3'

- *Antisense*:5'-GATGTTTAGCCGGGTCGAGAG-3'.

Silenciamientos transitorios con la tecnología siRNA (small interfering RNA)

Las células cultivadas se transfectaron transitoriamente con los siRNAs correspondientes (**Tabla 8**) utilizando el reactivo comercial *jetPRIME* (Polyplus), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante del producto:

1. Se siembran las células correspondientes en placas de 6 pocillos (125.000 células por pocillo) en medio de cultivo de crecimiento 24 horas antes de la transfección.
2. Al día siguiente se prepara una mezcla de *buffer* de transfección, el siRNA correspondiente a una [50 nM], el reactivo jetPrime y se mezclan durante 10 segundos en agitación suave.
3. Se incuba este mix durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. La mezcla (200 µl) se añade gota a gota con 2 ml de medio de cultivo celular renovado.
5. Al día siguiente se cambia el medio de cultivo celular durante 24 horas.
6. Se realizaron los experimentos correspondientes después de 48 horas de silenciamiento genético transitorio con siRNA.

Proteína/Gen	Secuencia siRNA	Concentración de uso
VE-cadherina (CDH5)	5'-AGAUGCAGAGGCCU AUGAUTT-3'	50 nM
FAK (PTK2)	5'-GGUUCAAGCUGGAUUUUU-3'	50 nM
Ciclina D1 (CCND1)	5'-CCAAUAGGUGUAGGAAAUAGCGCTG-3'	50 nM
WNT 11	<i>SMARTpool: ONE-TARGET plus</i> (Dharmacon)	100 nM
VE-PTP (PTPRB)	5'- GACAGUAUGAGGUGGAAGU -3'	50 nM
p120 (CTNND1)	5'- GGATCACAGTCACCTTCTA -3'	50 nM
<i>Scrambled</i> (Control)	5'-CCUACAUCCGAUCGAUGAUG-3'	50 nM

Tabla 8: siRNAs utilizados en la tesis doctoral.

Western Blot/Inmunotransferencia

Las proteínas celulares se extrajeron en su totalidad de las placas de cultivos siguiendo los siguientes pasos:

1. Lisis celular: después de los diferentes tratamientos las células se lavaron con PBS 1X frío, se rasparon las células por fuerza mecánica con el buffer de lisis TR3 (3% SDS, 10% glicerol, 10mM Na₂HPO₄ anhidro). La lisis celular se completó mediante sonicación.
2. Cuantificación proteica: las muestras de proteínas totales fueron cuantificadas mediante colorimetría mediante la técnica Lowry acuñada por el científico Oliver H Lowry en 1951²⁷⁷. Siguiendo las indicaciones del kit *DC protein assay* (BioRad).
3. Desnaturalización de proteínas y linealización a estructura primaria proteica: se añadió Laemmli *buffer* modificado (250mMde Tris-HCl pH

7,5, SDS 10%, Glicerol 20%, 1,4 M Mercaptoetanol, azul de bromofenol 1%) acuñado por el científico suizo Ulrich K. Laemmli en 1970²⁷⁸. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a 95°C para completar la desnaturalización.

4. Electroforesis y transferencia: se separan las proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida (7,5%-10%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel de acrilamida fue transferido a membranas de PVDF (Amershan), por el método semi-seco de Trans-Blot Turbo (BioRad) a voltaje constante durante 20 minutos.
5. Immunodetección de proteínas: la membrana de PVDF se bloqueó con PBS 1X-Tween al 1% con leche desnatada en polvo al 5% durante 2 horas en agitación. Para observar proteínas fosforiladas se utilizó TBS 1X-Tween al 1% con BSA al 2%.
6. Las membranas correspondientes se incubaron durante 24 horas con los anticuerpos primarios de las diferentes proteínas a medir, al día siguiente las membranas fueron lavadas con PBS 1X-Tween 1% durante 10 minutos en agitación.
7. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario (ligado a la peroxidasa de rábano, HRP) correspondiente durante 90 minutos y se realizaron los lavados adecuados con PBS 1X- Tween 1%.
8. Por último, las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia con ECL (Merck Millipore) en películas de rayos X medicinales (Konica Minolta).

RT-PCR

Para determinar los perfiles de expresión de ARNm de las diferentes proteínas expresadas en nuestras líneas celulares realizamos los siguientes pasos:

1. Extracción de RNA total: se extrajo el RNA total a través del kit por columnas de afinidad biológica *RNAasy Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.
2. Eliminación de ADN genómico: se eliminaron los posibles restos de ADN genómico usando DNAasa/RNAsin (Invitrogen).

3. Cuantificación de RNA total: se midió la productividad de extracción de RNA del Kit mediante el espectrofotómetro denominado NanoDrop teniendo en consideración los ratios de Abs 260/280 y Abs 260/230.
4. Retro-Transcripción inversa: se utilizó 1 µgr de ADN purificado y se le añadió la transcriptasa inversa del kit *ScriptcDNA Synthesis Kit* (BioRad) para pasar de ARN a ADN complementario (cDNA).
5. Reacción en cadena de la polimerasa (Taq: *Therrmus aquaticus*): dichos cDNAs se amplificaron exponencialmente tras la reacción en cadena de la polimerasa utilizando *iTaq Universal SYBR green supermix* (Biorad), cada reacción se realizó por triplicado utilizando los sistemas de detección de PCR en tiempo real CFX96. Las secuencias de los *primers* para las diferentes secuencias y la temperatura de alineamiento (60°C) están representadas en la **Tabla 9**

Gen	Secuencia
36B4 (<i>Housekeeping</i>)	Sense 5'-CAGATTGGCTACCCAAGTGT-3' Antisense 5'-GGCCAGGACTCGTTTGTACC-3'
CCND1	Sense 5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3' Antisense 5'-GAAGACCTCCTCTCGCACT-3'
CDH5	Sense 5'-AACTTCCCCTTCTTCAACC-3' Antisense 5'-AAAGGCTGCTGGAAAATG-3'
WNT 11	Sense 5'-GCTTGTGCTTGCCTTAC-3' Antisense 5'-TGGCCCTGAAAGGTCAAGTCTGTA-3'
PTPRB	Sense 5'- TGCTAAGTGAAAATGGAGGCT-3' Antisense 5'- GCCCAGCACCACTTTCTCAT-3'

Tabla 9: *Primers* utilizados en la tesis doctoral.

Inmunoprecipitación y subfraccionamiento celular

Para determinar la localización subcelular como así las posibles relaciones entre nuestras proteínas expresadas en las diferentes líneas celulares realizamos experimentos de inmunoprecipitación simple de proteínas, subfraccionamiento celular y por último, inmunoprecipitación a partir de extractos citosol-núcleo, para ello realizamos los siguientes pasos:

Inmunoprecipitación simple de proteínas:

1. Lisis celular: se lisaron las células con buffer de lisis celular (Tris / HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 120 mM, NP-40 al 0,1%, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM y se suplementaron con un cóctel inhibidor de proteasas (1 tableta por cada 10 ml de buffer de lisis) durante 30 minutos a 4°C, se agito la muestra cada 3 minutos para mejorar la lisis.
2. Eliminación de restos celulares: se eliminaron los restos celulares por centrifugación (13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C)
3. Incubación de anticuerpos: se incubaron los lisados celulares con los anticuerpos correspondientes y se dejaron durante 24 horas en agitación a 4°C. Se utilizó un anticuerpo IgG como control de uniones inespecíficas. Se retiró parte del lisado para comprobar por *Western Blot* los niveles de carga de proteína (Input) en paralelo a la inmunoprecipitación.
4. Unión del complejo anticuerpo/proteína problema a las bolas magnéticas: al día siguiente se incubaron los complejos de anticuerpo/proteína problema con 50 µl de bolas magnéticas (Proteína G) *Dynabeads™ Protein G* para inmunoprecipitación (ThermoFischer), se dejaron las muestras durante 2 horas en agitación a 4°C.
5. Lavados del complejo proteico: se realizaron 3 lavados con *buffer* de lisis 120 mM de NaCl y 2 lavados con *buffer* de lisis 300 mM de NaCl.
6. Desnaturalización del complejo: las diferentes muestras fueron calentadas a 95°C en agitación durante 10 minutos.
7. Western Blot: las muestras fueron expuestas a separación por electroforesis en geles de acrilamida al 7,5 % para su consecuente detección de proteínas (ver apartado de *Western Blot*).

Subfraccionamiento celular^{279,280}:

1. Lisis celular, extracción de la fracción citosólica: se lisaron las células con el *buffer* de lisis (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NP-40 al 0,25% y se suplementaron con un cóctel inhibidor de proteasa (1 comprimido por 10 ml de *buffer* de lisis, Roche) durante 10 minutos a 4°C. a continuación, las muestras se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se consideró la fracción citosólica.
2. Eliminación de posibles contaminaciones de fracciones: el pellet celular se resuspendió en el buffer de lavado (sacarosa 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 5 mM MgCl₂) y fue centrifugado a 3000 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante.
3. Lisis nuclear, extracción de la fracción nuclear: el pellet celular (núcleos) se lisó con el buffer nuclear (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,4 M, glicerol al 15%, 1,5 % Triton X-100) durante 30 minutos en agitación a 4°C. Después se centrifugó la muestra a 5000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se consideró la fracción nuclear. Se utilizó la expresión de α -tubulina como control de la fracción citosólica y así también PARP-1 y lamina B1 como control de la fracción nuclear.

Inmunoprecipitación de proteínas de los extractos citosólico-nuclear:

1. Subfraccionamiento celular: se realizó primero la extracción de las proteínas citosólicas-nucleares como anteriormente se ha comentado. Se retiró parte del lisado como Input.
2. Inmunoprecipitación de proteínas: se llevó a cabo la precipitación de los complejos proteicos sobre los diferentes compartimentos subcelulares.

Experimentos de angiogénesis in vitro

El efecto de los inhibidores como así de los silenciamientos de proteínas sobre el desarrollo de VM en las diferentes líneas celulares de melanoma fue llevado a cabo mediante los siguientes pasos:

1. Formación de la matriz en 3D: se revistieron los pocillos con 50 μ l de matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix) a 4°C (estado sólido) y se solidificó el matrigel durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular.
2. Siembra celular: las células (25.000 células por pocillo) en cultivo fueron sembradas en placas de 96 pocillos pre-tratadas en matrigel.
3. Imágenes: tras 24 horas de incubación fueron tomadas imágenes con el aumento 10X utilizando el microscopio Olympus CKX4. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y los experimentos se repitieron independientemente al menos tres veces.
4. Cuantificación: fue usado para la formación de VM el programa Wimasis para cuantificación de tubos vasculares.
5. En los experimentos de silenciamiento por siRNA o rescate de la VE-Cadherina, las células fueron previamente silenciadas o transfectadas previa realización de los experimentos en matrigel.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Realizamos los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina para medir la asociación de la proteína Kaiso sobre sus genes dianas y como los diferentes tratamientos afectan a la misma, el protocolo correspondiente se desglosa en los siguientes puntos:

1. Diseño de *primers*: antes de comenzar dichos experimentos hicimos una búsqueda exhaustiva en la literatura científica de los posibles genes diana de Kaiso y las secuencias consenso (KBS) de unión a los diferentes promotores. Encontramos que Kaiso se puede unir a los promotores de CCND1 y WNT 11¹⁸⁷.
2. Siembra celular: las células de melanoma uveal (MUM 2B) fueron sembradas (18×10^6 células por pocillo) hasta llegar a una confluencia celular del 80-90%.
3. Lavado y fijación: las células fueron fijadas con formaldehído al 36,5% durante 10 minutos a temperatura ambiente previo lavado con PBS 1X frío, siguiendo las indicaciones del kit *SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit* (Magnetix beads) (Cell signaling).

4. Extracción nuclear: el pellet celular fue sometido a una lisis nuclear ayudada con la digestión por parte de la nucleasa microcócica a 37°C durante 20 minutos en agitación. Se retiró parte de la lisis como Input.
5. Incubación con el anticuerpo: los núcleos fijados fueron incubados con el anticuerpo anti-Kaiso 6F8 ChIP-grade.
6. Unión del complejo anticuerpo/proteína problema-bolas magnéticas: el complejo de Kaiso unido a la cromatina fue incubado con bolas magnéticas (50 μ l) durante 3 horas en agitación a 4°C
7. Purificación y extracción de ADN: el ADN de las muestras, tanto Inputs como inmunoprecipitaciones, fueron purificadas y extraídas mediante columnas de afinidad biológica.
8. q-PCR: las muestras fueron expuestas a la reacción en cadena de la polimerasa (Ver apartado de RT-PCR) con los correspondientes *primers* de unión a los promotores de los genes diana de Kaiso (CCND1 y WNT11). Se utilizaron los *primers* de secuencia contra RPL30 (Control negativo de unión) y PMSD5 (Control positivo de unión)¹⁸⁷. Las secuencias de los *primers* usados fueron: **Tabla 10**.

Gen/promotor	Secuencia
PMSD5 (Control positivo)	Sense 5'-GATCTGATCACAGCCTCCTTG-3' Antisense 5'-CAACCACTGGCTACAGTTGA-3'
CCND1	Sense 5'-TTTACATCTGCTTAAGTTGCG-3' Antisense 5'-TTAGAATTTGCCCTGGGACT-3'
WNT 11	Sense 5'-CACCTTCCCACTTCAA-3' Antisense 5'-GAGAGACGTCTGCTGGCT-3'

Tabla 10: *Primers* de CHIP utilizados en la tesis doctoral.

Inmunofluorescencia:

Se realizaron experimentos de detección de proteínas a través de inmunofluorescencia para así localizar la situación intracelular de las proteínas como su posible correlación entre las mismas siguiendo los siguientes pasos:

1. Siembra celular: se sembraron las células (100.000 células por pocillo) en placas de 48 pocillos. En dichos pocillos se introdujeron cubreobjetos de menor calibre que el pocillo previo lavado con alcohol al 99%, para así evitar posibles contaminaciones. Se dejaron secar los pocillos durante 30 minutos.
2. Crecimiento celular: se dejaron las células crecer durante 24 horas para así poder alcanzar una confluencia adecuada de aproximadamente el 80%, Se ha reconocido la importancia de la confluencia celular en

diversos artículos, más en concreto para analizar proteínas relacionadas con VE-cadherina²⁸¹. Siendo una mala práctica hacer experimentos de inmunofluorescencia con una baja o muy alta confluencia celular.

3. Fijación: las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 3% con sacarosa al 2% en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavados: se realizaron 3 lavados con PBS 1X.
5. Permeabilización: las células fueron expuestas a una solución de PBS 1X con un tensoactivo no iónico (Triton X-100 al 0,25%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Con este paso se intenta preparar a las células para la entrada posterior de los anticuerpos, creando microporos en la membrana citoplasmática celular.
6. Lavados: se realizaron 3 lavados con PBS 1X.
7. Bloqueo: las células se bloquearon con una solución de PBS 1X con BSA (*Bovine Serum Albumin*) al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Incubación de anticuerpos primarios: las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios (epítipo: fracción variable contra la proteína diana, teniendo en su fracción constante la unión a anticuerpos del huésped: ya sea ratón o conejo) correspondientes en PBS 1X con BSA al 2% durante 45 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavados: se realizaron 5 lavados con PBS 1X.
10. Incubación de anticuerpos secundarios: se utilizaron anticuerpos secundarios frente a la fracción constante de los anticuerpos primarios (ratón o conejo) de especies diferentes a estos para evitar así reacciones cruzadas. Las células se incubaron durante 20 minutos con los anticuerpos secundarios correspondientes. Se utilizaron anticuerpos secundarios que albergan en su fracción constante la unión de fluoróforos que determinaremos más tarde a través de microscopía confocal. Para la realización de esta tesis se utilizó el anticuerpo secundario contra ratón unido al fluoróforo que emite a la longitud de onda 488 nm (Alexa) y el anticuerpo secundario contra conejo unido al fluoróforo que emite a la longitud de onda 647 nm (Alexa). Finalmente se utilizaron muestras celulares sin incubación de anticuerpo primario y

solo de secundario para así poder determinar las posibles uniones inespecíficas de los mismos.

11. Lavados: se realizaron 5 lavados con PBS 1X.
12. Marcaje de los núcleos celulares y montaje: los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol) durante 10 minutos, el DAPI que se une fuertemente a regiones de adenina y timina del ADN, descubierto en su inicio como tratamiento de contra la tripanosomiasis²⁸² emite a una longitud de onda de 358 nm. El montaje de los cubreobjetos sobre donde se depositan las células fue realizado con medio de montaje (*Vectashield antifade mounting medium*, LSBio) sobre portas de cristal.
13. Obtención de imágenes: se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia en el rango lineal de detección para evitar la saturación de la señal utilizando un microscopio fluorescente (*Zeiss Axio Imager A1*) o microscopía confocal (*Leica SP5*).

Edición genética mediante la tecnología CRISPR-Cas9

Se produjo la eliminación genética estable de VE-Cadherina (CDH5) en la línea celular de melanoma uveal humano (MUM 2B), a través de la tecnología CRISPR-Cas9 de edición génica, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Diseño de las guías: Se diseñaron 5 sgRNA (guías simples de RNA) diferentes usando la herramienta de diseño CRISPR Optimized diseñada por Zhang et al²⁸³.
2. Clonación: Se clonaron en el vector pL-CRISPR.EFS.GFP²⁸⁴ que se adquirió en el repositorio público de Addgene (# 57818).
3. Validación de las guías: las guías de sgRNA se validaron en las células HEK 293T utilizando el kit de detección de escisión genómica *GeneArt* (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
4. Formación de partículas virales: Las partículas lentivirales para las 2 mejores sgRNA en términos de disrupción alélica (GGCAGGCGCCCGATGTGGCG y

GATGATGCTCCTCGCCACATCC) se produjeron como se describió anteriormente en células HEK 293T utilizando para la extracción de los lentivirus filtros específicos.

5. Transfección y experimentos posteriores: Las células MUM 2B se co-transdujeron a MOI 10-100 con las 2 partículas lentivirales diferentes y se confirmó por citometría de flujo con una eficiencia de transducción cercana al 100%. Finalmente, la interrupción alélica y el truncamiento de proteínas se confirmaron mediante secuenciación Sanger y por *Western blot*.

Citometría de flujo

Para determinar el posible efecto inespecífico del inhibidor de la *focal adhesion kinase* (FAK) PF-271, se realizó citometría de flujo para ver los posibles efectos de dicho inhibidor sobre las células MUM 2B, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos y tras 24 horas se aplicaron los tratamientos correspondientes.
2. Se lavaron las células tres veces con PBS 1X frío.
3. Se fijaron con etanol frío al 70% y yoduro de propidio 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ suplementado con ribonucleasa A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma).
4. El ciclo celular se determinó mediante el citómetro de flujo *FACSCalibur* y se analizó con el software *FlowJO* 7.6.3 (Tree Star).

Microscopia electrónica

Para analizar las ultraestructuras de las células tumorales de melanoma uveal y humano y los posibles efectos que tiene la disminución de la VE-Cadherina sobre los mecanismos de degradación, se realizó experimentos de microscopia electrónica siguiendo estos pasos:

1. Fijación: las células MUM 2B extraídas de placas de 6 pocillos fueron fijadas mediante una solución de fijación (*buffer* de cacodilato 0,1 M pH 7,4 y tetraóxido de osmio) durante 60 minutos a 4°C.

2. Lavado y tinción: las muestras fueron lavadas con agua miliQ y teñidas con acetato de uranilo.
3. Deshidratación: las muestras celulares fueron deshidratadas en series de concentraciones crecientes de alcohol o acetona.
4. Corte e inclusión en parafina: las secciones ultrafinas se cortaron con un cuchillo de diamante en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut S). Y fueron depositadas en redes circulares en parafina.
5. Obtención de imágenes: las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Zeiss 902 con 80 KV de aceleración de voltaje (CIC-UGR).

Experimentos de autofagia

La macroautofagia (referida solo como "autofagia") es una vía homeostática de "autoalimentación" que se ha conservado entre las células eucariotas. Existe un proceso asociado a lisosomas cuyos componentes intracelulares, pequeñas porciones de citosol o envueltas de vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, se degradan con hidrólisis lisosómica reguladas por el entramado proteico de chaperonas²⁸⁵. Recientemente, diferentes estudios han relacionado que la formación de VM fue promovida por la autofagia inducida por bevacizumab en células de glioblastoma multiforme, que se asoció con la resistencia tumoral a la terapia antiangiogénica a través de la alta expresión de VEGFR-2²⁸⁶.

Nosotros quisimos medir los posibles cambios ultraestructurales en la formación de autofagosomas y comprobarlos a través de diferentes experimentos de autofagia, para ello realizamos los siguientes pasos:

1. Siembra celular: las células fueron sembradas (125.000 células por pocillo) en placas de 6 pocillos durante 24 horas.
2. Transfección de GFP-LC3: las células fueron transfectadas con el plásmido GFP-LC3 (0,5µgr) con el reactivo *JetPrime* (véase apartado de siRNA) durante 48 horas. Se utilizó medio HANKs, dicho medio fue utilizado para intentar cultivar *Mycobacterium leprae* en células en 1949 por el científico John H. Hanks²⁸⁷. A groso modo HANKs es una

solución de equilibrio en sales (Calcio y Fósforo). La solución HANKs se utilizó como control positivo de formación de autofagolisosomas.

3. Cambio de medio de cultivo celular: se cambiaron los medios de cultivo tras 24 horas de transfección.
4. Determinación de autofagolisosomas: para determinar la localización de LC3, se observaron las células transfectadas con GFP-LC3 bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager A1). Para determinar la translocación LC3-II, realizamos también *Western Blot* de LC3-I y su derivado lipidado LC3-II (18 y 16 kDa, respectivamente) usando un anticuerpo monoclonal contra LC3.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

Expresión elevada de pVE-Cadherina (pY658) en células de melanoma agresivo

Antes de comenzar el estudio más en detalle sobre las posibles implicaciones de VE-Cadherina en la formación de VM, decidimos comprobar y medir los niveles de expresión de VE-Cadherina y su estado basal de fosforilación en la Y658 en diferentes líneas celulares de melanoma uveal y cutáneo.

Utilizamos para ello las siguientes líneas celulares de melanoma: MUM 2B, C8161, MUM 2C y C81-61 (VE-Cadherina⁺, capacidad de formar VM y VE-cadherina⁻, respectivamente), como ha sido descrito en estudios con anterioridad²³². Con dicha premisa, las líneas celulares MUM 2B y C8161 expresaron VE-Cadherina muy fuertemente por *Western Blot*, en comparación con las líneas celulares MUM 2C y C81-61 (**Fig. 10A**). Sorprendentemente, la diferencia de expresión de VE-Cadherina entre dichas células también se encontró con los niveles de expresión de la pY658 de VE-Cadherina sin ningún estímulo proangiogénico (**Fig. 10A**).

La expresión de la pY658 de VE-Cadherina como así sus posibles implicaciones en la dinámica celular endotelial han sido bien estudiadas por diversos grupos científicos^{139,140}, pero es imperativo en dichos estudios utilizar diversos factores solubles con capacidad de activar la ruta de VEGFR-2 (VEGF)¹⁴⁹ o mediadores de la inflamación (histamina entre otros)¹⁴⁰ para así activar la fosforilación del residuo Y658 de VE-Cadherina. En otros estudios para comprobar la especificidad de los anticuerpos contra la Y685 y Y731 de VE-Cadherina¹⁵⁰, se utilizaron tratamientos controlados con pervanadato de sodio (0,2 mM durante 5 minutos).

Experimentos de *Western Blot* con tratamientos de pervanadato de sodio (PV, 0,2 mM) sobre las líneas MUM 2B y C8161 mostraron que tras el tratamiento de PV se activa fuertemente la fosforilación de la Y658, dicho experimento se realizó para comprobar la especificidad del anticuerpo (**Fig. 10B**).

En adición, realizamos silenciamientos siRNA de VE-Cadherina en las células MUM 2B para así estar más seguros del uso del anticuerpo de pY658 de VE-Cadherina (**Fig. 10C**).

Como se ha comentado anteriormente, la ruta más importante sobre la dinámica de VE-Cadherina, es la ruta de señalización del VEGF^{147,153}. En 2015, Jean et al¹⁴⁸ reportaron con experimentos de espectrofotometría de masas, que la Y658 de VE-Cadherina puede ser diana de FAK en un mecanismo VEGF dependiente.

Tras el tratamiento del inhibidor competitivo contra el sitio activo de unión a ATP de la FAK (PF-271) (izquierda, tercera línea de la **Fig. 10D**), como la inhibición del mismo con silenciamientos de siRNA (derecha, segunda línea de la **Fig. 10D**), produjo una disminución de la expresión de la pY658 en células MUM 2B independientemente del tratamiento de VEGF (**Fig. 10D**).

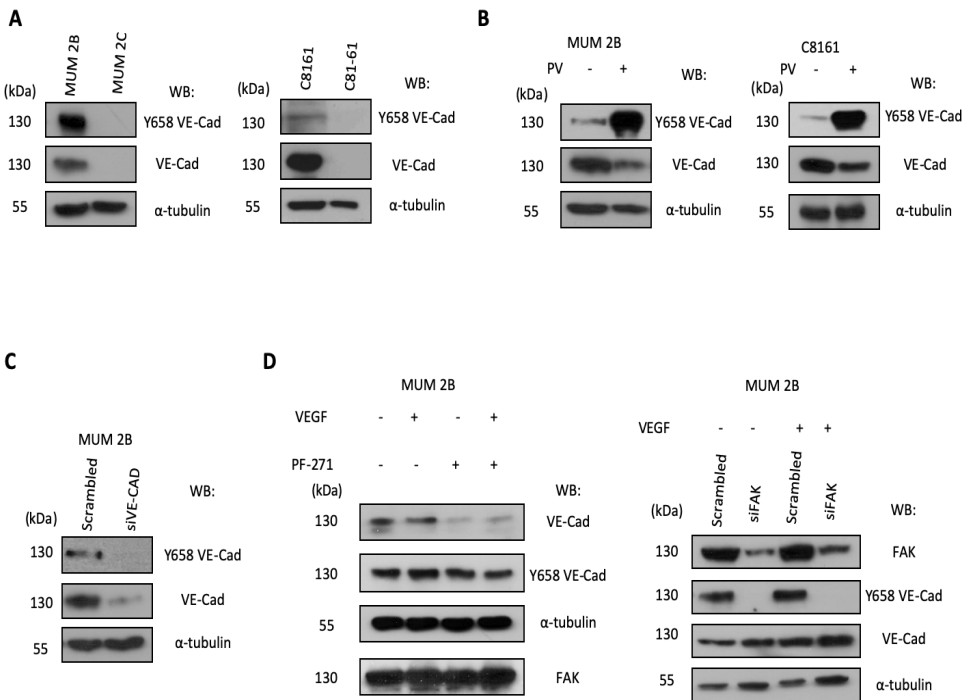


Fig. 10: expresión elevada de pY658 de VE-Cadherina en células de melanoma agresivo. A) expresión de VE-Cadherina y pY658 en las líneas celulares agresivas de melanoma uveal (MUM 2B) y cutáneo (C8161) medidas por *Western Blot*, **B)** el tratamiento con PV aumentó la fosforilación de la Y658 en MUM 2B y C8161, **C)** silenciamiento siRNA de VE-Cadherina (50 nM) fue utilizado para comprobar la especificidad del anticuerpo pY658, **D)**

inhibición (PF-271, 1 μ M durante 24 horas) y/o silenciamiento siRNA (50 nM) de la FAK impidió la fosforilación independientemente del tratamiento con VEGF (80 ngr/ml).

La inhibición farmacológica de la FAK y su inhibición genética por siRNA disminuyen los niveles de expresión de pY658 de VE-Cadherina

Para afianzar los resultados obtenidos en la **Fig. 10D**, realizamos experimentos de inmunofluorescencia en las mismas condiciones de tratamiento sobre las líneas celulares MUM 2B. La inhibición química a través del tratamiento con PF-271 disminuyó la expresión de la pY658 de modo independiente de VEGF (**Fig. 11A**), así como el tratamiento de VEGF aumento muy ligeramente la fosforilación sobre la Y658 de VE-Cadherina (nótese que las líneas MUM 2B tienen muy baja expresión de VEGFR-2).

Por otro lado, el silenciamiento a través de siRNA de la FAK (**Fig. 11B**) disminuyó la fosforilación en la Y658 de VE-Cadherina independientemente del tratamiento combinado con VEGF.

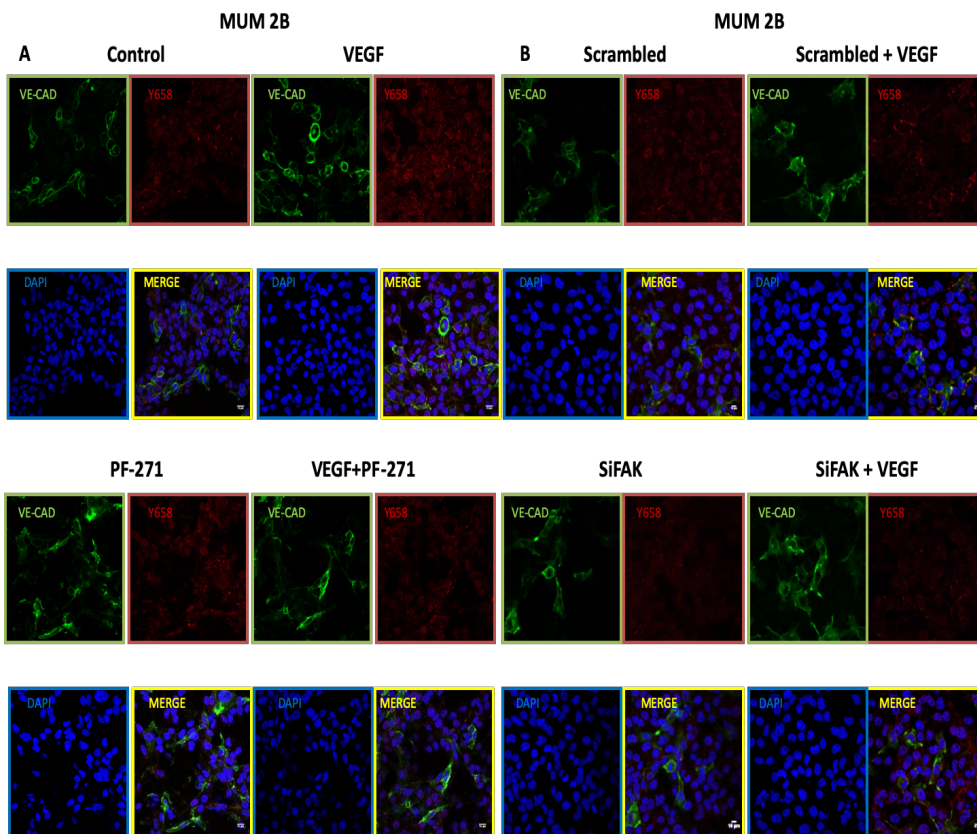


Fig. 11: La inhibición farmacológica de la FAK y su inhibición genética por siRNA disminuyeron los niveles de expresión de pY658 de VE-Cadherina. A) el tratamiento con PF-271 (1 μ M, durante 24 horas) produjo una disminución de la producción de pY658 de VE-Cadherina en la línea celular MUM 2B, así como el tratamiento combinado con VEGF (80 ngr/ml), **B)** el siRNA de FAK obtuvo los mismos efectos en la expresión de la pY658 de VE-Cadherina. Escala bars: 15 μ m.

Se ha publicado con anterioridad¹⁴⁸ que la inhibición de la FAK a través de los químicos PF-271 o PND-1186 afectan a la expresión de la fosforilación de VE-Cadherina en el residuo Y658 en la línea celular HUVEC (Véase Fig. 2C del artículo citado). Por ello, realizamos experimentos de *Western Blot* (**Fig. 12A**) e inmunofluorescencia (**Fig. 12B**) con el tratamiento PF-271 con o sin VEGF en la línea celular HUVEC para corroborar la posible inhibición de expresión de la Y658 de VE-Cadherina en un modelo ya estudiado con anterioridad.

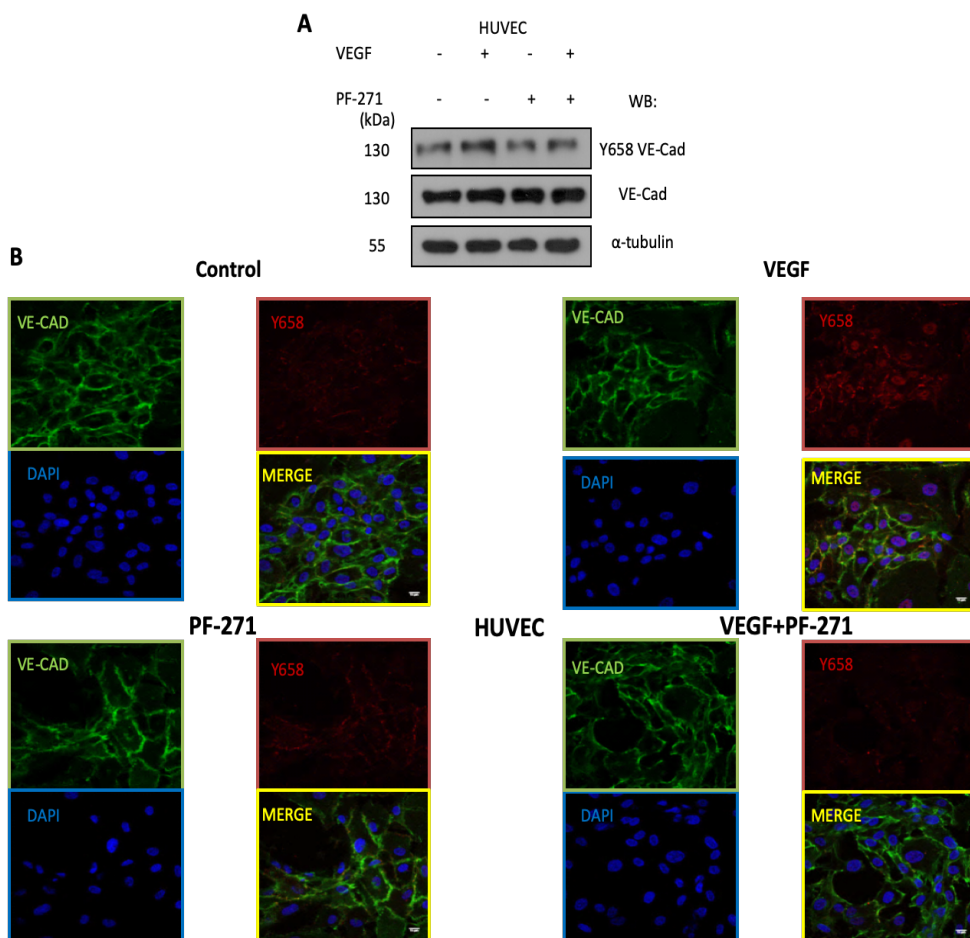


Fig. 12: La inhibición farmacológica de la FAK disminuyen los niveles de expresión de pY658 de VE-Cadherina en la línea celular HUVEC. **A)** *Western Blot* en la línea celular HUVEC con tratamientos de PF-271 (1 μ M, durante 24 horas) con o sin VEGF (80 ngr/ml), **B)** inmunofluorescencia de VE-Cadherina (verde) y pY658 (rojo) con los tratamientos anteriormente explicados. (Bars: 15 μ m).

Los anticuerpos de pY658 de VE-Cadherina reconocen específicamente la fosforilación de VE-Cadherina *in vitro*

Como se ha comentado anteriormente y siguiendo las pautas de controles para las mediciones de fosforilación de VE-Cadherina, ya sea la Y658, Y685 o Y731, realizamos diferentes experimentos para aclarar la especificidad del anticuerpo de pY658. Nótese que el laboratorio de Elisabetha Dejana (IFOM, Milán),

publicó en 2012 en la revista *Nature communications*¹⁴⁹, una figura (Fig. 1 del artículo citado) explícitamente para comprobar que el anticuerpo para la pY658 de VE-Cadherina reconocía específicamente dicha fosforilación. En adición, otro artículo¹⁵⁰, también dedicaron una figura completa al análisis de especificidad de anticuerpo contra la Y685 y Y731 de VE-Cadherina. Esto vino dado porque al principio del estudio de las fosforilaciones de VE-Cadherina, había en el mercado anticuerpos que tuvieron problemas para afianzar la especificidad del producto, además se retiraron anticuerpos del mercado. Dichos grupos diseñaron anticuerpos propios para realizar dichas comprobaciones^{149,150}.

Dado estos inconvenientes sobre el anticuerpo de pY658, tomamos la determinación imperativa de realizar los debidos experimentos de comprobación de especificidad (**Fig. 13A y B**). Gracias a la colaboración del laboratorio de Dejana (Fabrizio Orsenigo), pudimos adquirir mutantes de la Y658 de VE-Cadherina, como así una pequeña alícuota de anticuerpo diseñado en su laboratorio.

Así, introdujimos en la línea celular MUM 2C (VE-Cadherina⁻, VM⁻) una VE-Cadherina *Wild Type* (WT), una VE-Cadherina mutada su Y658 a fenilalanina (Y658F) teniendo este aminoácido menos capacidad para ser fosforilado y por último una VE-Cadherina mutada su Y658 a glutámico (Y658E) con mayor capacidad de ser fosforilado. Realizamos experimentos por *Western Blot* (**Fig. 13A**) e inmunofluorescencia de GFP-VE-Cadherina (verde: plasmido), Y658 (derecha: rojo) y control de VE-cadherina (izquierda: rojo) (**Fig. 13B**) y observamos que la expresión de la Y658 de VE-Cadherina solo se expresaba cuando introducíamos a la línea celular MUM 2C la Y658E, como tampoco veíamos dicha expresión en el mutante Y658F.

Por otro lado, se ha publicado que la inhibición de la FAK a través del inhibidor competitivo PF-271 afecta específicamente a las fosforilaciones de la FAK, no a su estabilidad. Más concretamente PF-271 afecta al residuo Y397 de la FAK independientemente de la posible actividad de dicho inhibidor sobre la fosforilación de la Y416 de Src¹⁴⁸ (véase Fig. 2A, B y C del artículo citado). Por ello realizamos experimentos de inmunoprecipitación de fosfo-tirosinas totales (pTyr) en la línea celular MUM 2B y pudimos observar que tras la inhibición de la FAK con PF-271 disminuyeron las fosforilaciones de tirosina totales de la

FAK, y sorprendentemente también las de VE-Cadherina independientemente del estímulo de VEGF (Fig. 13C).

Como se ha reportado en diferentes artículos el posible efecto del PF-271 sobre la viabilidad celular y actividad sobre el ciclo celular^{288,289}, de hecho se han analizado curvas de viabilidad celular *in vitro*, y solo es a partir de concentraciones mayores a 1 μ M donde puede tener un posible efecto dicho inhibidor en la viabilidad celular^{289,290}. Por todo lo comentado, realizamos análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo con la dosis de 1 μ M durante 24 horas de PF-271 en la línea celular MUM 2B y comprobamos que dicho inhibidor no produce cambios en el ciclo celular ni un incremento de SubG1 (Fig. 13D).

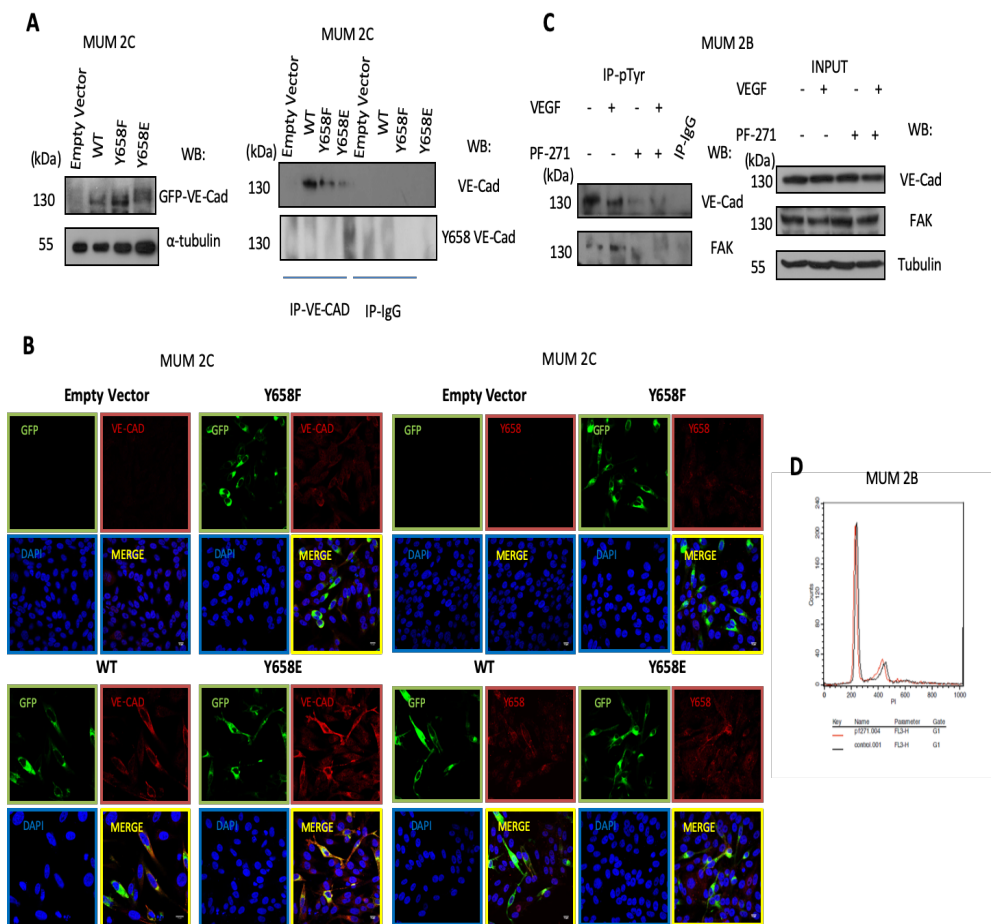


Fig. 13: Los anticuerpos de pY658 de VE-Cadherina reconocen específicamente la fosforilación de VE-Cadherina *in vitro*. La línea celular MUM 2B fueron transfectadas con

los diferentes constructos de VE-Cadherina (1 μ gr), siendo solo reconocida la Y658 mediante **A)** WB o **B)** inmunofluorescencia (Bars 15 μ m) en el mutante Y658E, **C)** inmunoprecipitación de pTyr totales reveló que la inhibición de la FAK (PF-271) inhibe específicamente las fosfotirosinas totales de la FAK, como también inhibió las fosfotirosinas de VE-cadherina, **D)** experimentos de citometría de flujo pusieron de manifiesto que el PF-271 no produce efectos citotóxicos sobre el ciclo celular en la línea celular MUM 2B.

Disminución de la capacidad de formar VM en las células MUM 2B a través de la inhibición farmacológica o siRNA de FAK

Como se ha observado en los diversos resultados anteriores, la inhibición de la FAK disminuye la fosforilación de VE-Cadherina en el residuo Y658. Decidimos así, realizar experimentos de formación de angiogénesis *in vitro* en una matriz tridimensional sobre placas de cultivo, para afianzar que dicha disminución tenía un efecto en el desarrollo de VM en la línea celular MUM 2B. Como hemos comentado con anterioridad, se ha reportado que una disminución de VE-Cadherina tiene como resultado una anulación de VM en modelos *in vitro*¹³³. Pero, el posible efecto que pueden tener las fosforilaciones de VE-Cadherina en la dinámica de formación de VM no habían sido exploradas.

La inhibición de la FAK a través del PF-271 (**Fig. 14A**) produjo la disminución de la capacidad de formar VM (*loops*) independientemente del estímulo de VEGF, como así con la inhibición a través de siRNA de la FAK donde se obtuvieron similares resultados (**Fig. 14B**). Los resultados obtenidos de los experimentos en matrigel tras la inhibición de FAK fueron cuantificados por el programa Wimasis, representando la formación de *loops* tras el tratamiento de PF-271 (**Fig. 14C**) y/o siRNA de FAK (**Fig. 14D**). Comprobamos el silenciamiento de la FAK y la consecuente disminución de la pY658 de VE-Cadherina a través de experimentos por *Western Blot* (**Fig. 14E**).

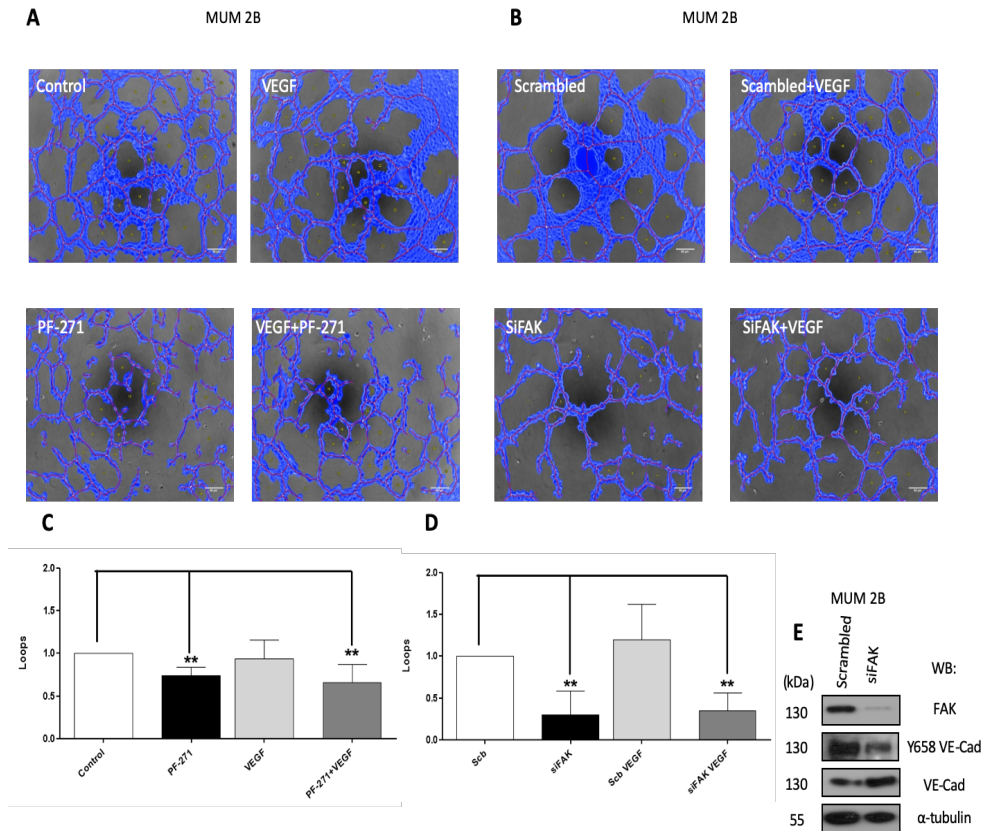


Fig. 14: Disminución de la capacidad de formar VM en las células MUM 2B a través de la inhibición farmacológica o siRNA de FAK. A y B) el ensayo de angiogénesis in vitro con matrigel en MUM 2B mostró el efecto de los inhibidores de FAK (PF-271: 1 μ M y siFAK 50 nM) con o sin VEGF, las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Bars de 50 μ m) y C, D) la formación de las estructuras en forma de tubo fue cuantificadas por el programa Wimasis. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y el experimento se repitió independientemente al menos tres veces. E) el siRNA de FAK fue confirmado por *Western Blot*.

Alteraciones genéticas en la expresión de ARNm de FAK y en el gen de FAK en pacientes con melanoma uveal humano

Todos los resultados anteriores sugirieron que la razón principal para explicar la elevada fosforilación basal de VE-Cadherina en las células malignas de melanoma uveal (MUM 2B) se debía a la fosforilación basal de la FAK, que se mantiene constitutivamente activa, apoyados por resultados ya publicados en el

año 2005 (Véase Fig. 1 del artículo citado)²¹⁷. Al analizar la base de datos cBioPortal, una plataforma de 48333 muestras tumorales, descubrimos que el número de copias del gen FAK estaba muy amplificado en numerosos cánceres humanos, como el melanoma de ovario, mama, próstata y úvea (**Fig. 15A**). Además, utilizamos una base de datos web de expresión génica en tejidos normales y tumorales (GENT) que proporciona patrones de expresión génica a través de más de 34,000 muestras. El gen FAK se encontró sobreexpresado particularmente (el más alto de todos los estudios en la base de datos) en melanoma uveal (**Fig. 15B**). Además, el 57% de los pacientes con melanoma uveal humano incluidos en el estudio de TCGA (80 muestras) mostraron alteraciones génicas (amplificaciones) o regulación por aumento de ARNm (**Fig. 15C**), lo que sugiere que FAK regula el crecimiento celular normal in vivo. Además, encontramos que las alteraciones en la expresión de FAK correspondían con una clara tendencia (aunque no estadísticamente significativa, probablemente debido al número relativamente bajo de pacientes) a una disminución de la supervivencia general (**Fig. 15C derecha**).

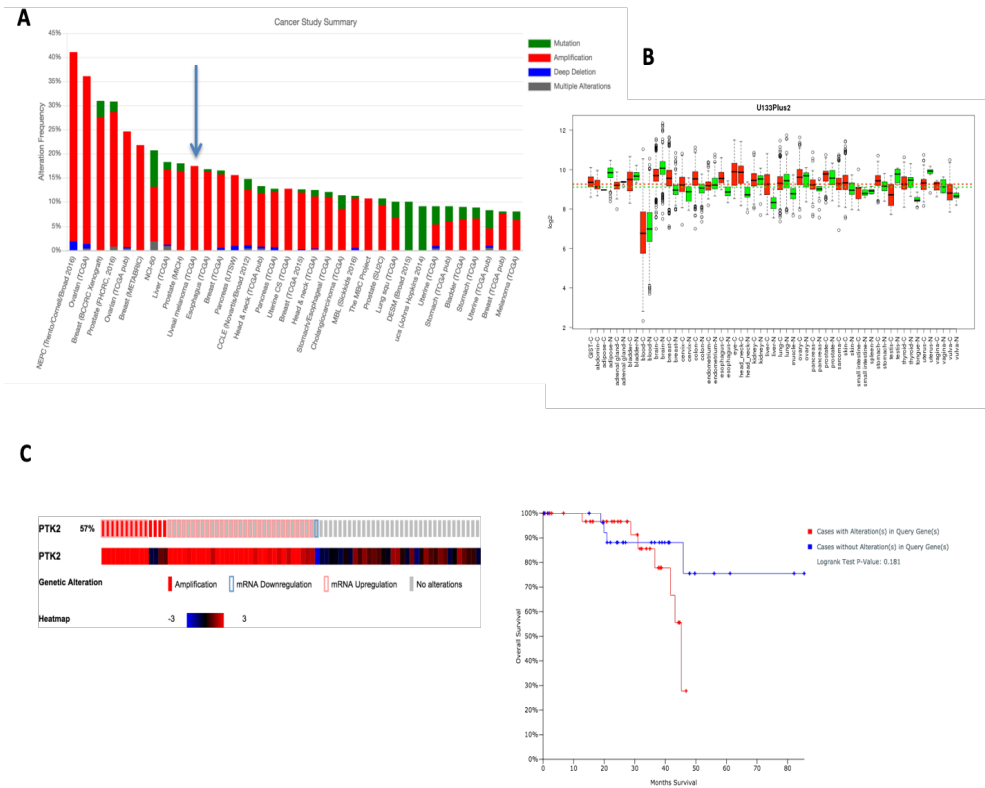


Fig. 15: Alteraciones genéticas en la expresión de ARNm de FAK y en el gen de FAK en pacientes con melanoma uveal humano. **A)** gráfico de barras que muestra el porcentaje de alteración del gen PTK2 (FAK) en diferentes tipos de cáncer (cBioportal), **B)** alteraciones genéticas que afectan PTK2 (FAK) en melanoma uveal humano; el 57% de los casos presentaron alteraciones genéticas o de expresión de ARNm, **C)** correlación entre la expresión de ARNm de PTK2 y la supervivencia general (SG) de los pacientes en con melanoma uveal.

La fosforilación de la Y658 de VE-Cadherina a través de la FAK participa en la importación nuclear de p120 catenina

Como se ha comentado con anterioridad (Véase el apartado de señalización de VE-Cadherina: p120 y Kaiso) la p120 catenina puede unirse a E-Cadherina y así este complejo puede importarse al núcleo y tener acciones sobre la transcripción de genes por diversas proteínas efectoras^{185,189}. Estudios recientes^{251,291} han demostrado que E-Cadherina se puede importar al núcleo de modo aberrante en células de cáncer de pulmón, cáncer gástrico y cáncer de mama²⁵¹ (Véase la Fig. 3 del artículo citado). Además, se vio por inmunohistoquímica en 39 muestras de pacientes con cáncer de pulmón, que la E-Cadherina nuclear se correlacionaba en las muestras de pacientes con grado moderado del estadio del tumor (Véase Fig. 1 del artículo citado). Como también recientemente se ha publicado (Véase Fig. 6 del artículo citado) la localización de E-Cadherina nuclear (unida a β -catenina) en cáncer colorectal²⁹².

Con la premisa anteriormente comentada de una posible translocación de E-Cadherina en tumores avanzados, quisimos explorar si la VE-Cadherina también podría tener una localización aberrante en la línea celular MUM 2B y si esta localización podría estar involucrada en la capacidad de formar redes tubulares (VM) en dichas células.

Es conocido que el tratamiento con Leptomicina B tiene efectos en el tráfico de exportaciones de proteínas hacia el núcleo (descubierto en sus inicios como potente antibiótico-antifúngico por el científico Tetsuo Hamamoto en el año 1983 producido por la levadura *Streptomyces sp*)²⁹³, pero no se relacionó con el efecto inhibitorio de exportaciones nucleares de proteínas hacia el citoplasma por inhibición de la exportina 1 (CRM1) hasta el año 1998²⁹⁴.

El tratamiento con Leptomicina B en experimentos de subfraccionamiento celular en la línea celular MUM 2B reveló que VE-Cadherina está de forma aberrante en el núcleo en dichas células, más aun la forma fosforilada de la misma (Y658 de VE-Cadherina), y su regulación de exportación nuclear fue bloqueada por el tratamiento, acumulándose así Y658 en la fracción nuclear (**Fig. 16A**). Además, el doble tratamiento de Leptomicina B y PF-271 disminuyó la acumulación de pY658 de VE-Cadherina (cuarta línea de la Fig. 16A) afianzando así la directa regulación de la FAK sobre el estado de fosforilación de la pY658.

Sabiendo que la VE-Cadherina como así la pY658 de VE-Cadherina pueden tener una localización nuclear, quisimos saber si la inhibición de la FAK podría estar influyendo en dicha translocación nuclear. Por todo ello, realizamos experimentos de subfraccionamiento celular tras la inhibición de la FAK a través de siRNA en las células C8161 (**Fig. 16B**) o en las MUM 2B (**Fig. 16C**) y observamos que el tratamiento con el inhibidor de FAK PF-271 (**Fig. 16D**) disminuye la translocación de la pY658 de VE-Cadherina al núcleo. La translocación nuclear de p120 también se vio ligeramente afectada tras la inhibición de la FAK.

La localización y/o funcionalidad intracelular de p120 puede estar regulada, en parte, por los posibles cambios conformacionales de las diferentes cadherinas que se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática, como así, del estado de fosforilación de p120 catenina (involucradas en estos cambios las desfosfatasa: SHP-1, SHP-2, DEP1 y RPTP μ o fosforilaciones a través de las quinasas CK1 α y GSK3 β)²⁹⁵.

En experimentos de subfraccionamiento celular, tras el silenciamiento siRNA de VE-Cadherina se abolió la localización nuclear de p120 (**Fig. 16E**).

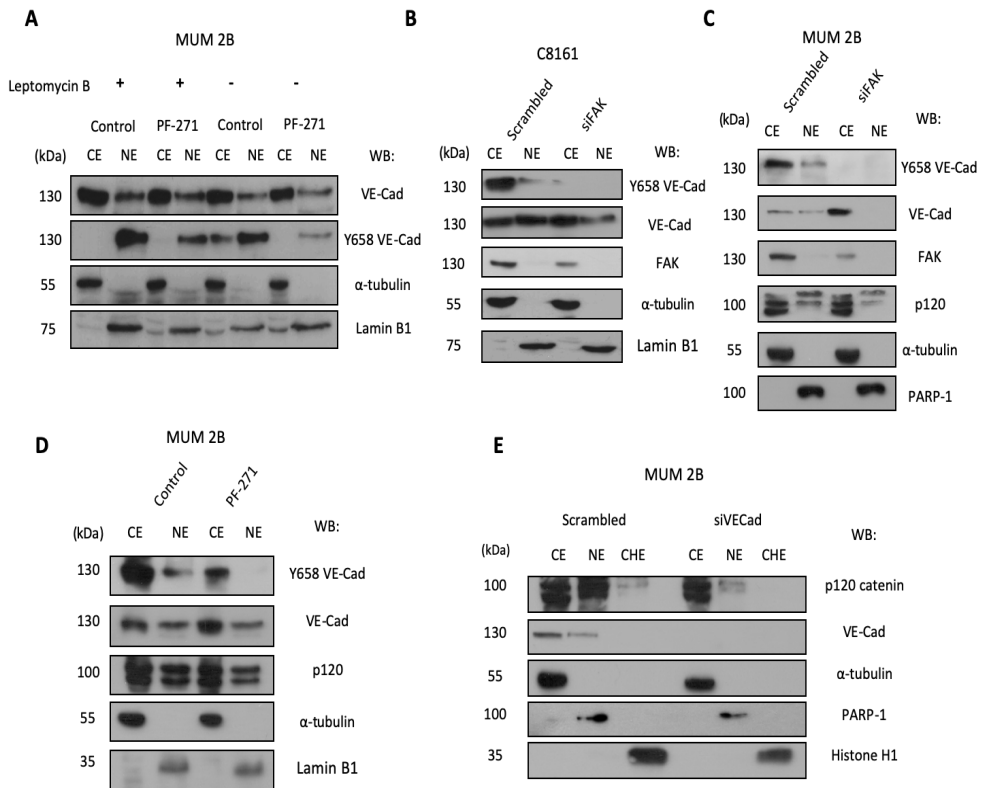


Fig. 16: La fosforilación de la Y658 de VE-Cadherina a través de la FAK participa en la importación nuclear de p120 catenina. **A)** el tratamiento de leptomicina B (20 ngr/ml durante 3 horas) impidió la exportación de la Y658 de VE-cadherina y el tratamiento PF-271 disminuyó su translocación aún con el doble tratamiento, **B y C)** el silenciamiento siRNA de la FAK mostró disminuir la expresión y translocación de la pY658 hacia el núcleo en la línea celular **A)** C8161 y **B)** MUM 2B, **D)** tratamientos del PF.271 en MUM 2B disminuyó también dicha translocación de pY658, por último, **E)**, silenciamientos siRNA de VE-cadherina en experimentos de subfraccionamiento celular mostraron que VE-cadherina es necesaria para la translocación nuclear de p120 catenina.

VE-Cadherina forma un complejo con p120/Kaiso en el núcleo en un mecanismo dependiente de FAK

Teniendo en cuenta la posible implicación del estado de fosforilación de VE-Cadherina (a través de la FAK) en la translocación del núcleo de p120 y como se ha publicado con anterioridad la formación del complejo E-Cadherina/p120/Kaiso^{171,196,296}, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de las diferentes fracciones celulares donde se localiza

VE-Cadherina (**Fig. 17A**) y/o p120 (**Fig. 17B**) tras la inhibición específica de la FAK (PF-271) en células de melanoma uveal MUM 2B y en células de melanoma cutáneo C8161. Sorprendentemente, comprobamos que VE-Cadherina puede formar parte del complejo p120/Kaiso en un mecanismo dependiente de FAK, y que tras la inhibición de la FAK el complejo y su consecuente translocación nuclear VE-Cadherina/p120/Kaiso se ven afectados.

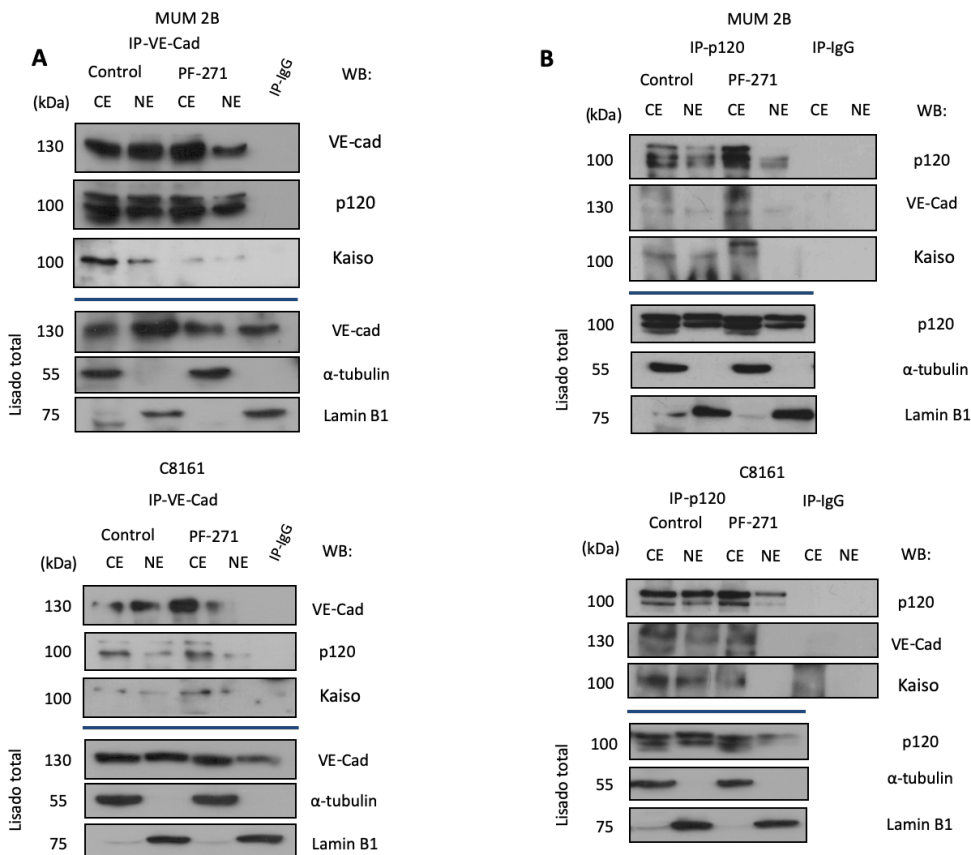


Fig. 17: VE-Cadherina forma un complejo con p120/Kaiso en el núcleo en un mecanismo dependiente de FAK. La inhibición de la FAK (PF-271) impidió la translocación del complejo proteico VE-Cadherina/p120/Kaiso en la línea celular MUM 2B y C8161 tras la inmunoprecipitación de la fracción citosólica (CE) o nuclear (NE) de **A**) VE-Cadherina o **B**) p120 catenina. Se realizó en paralelo una inmunoprecipitación control de IgG para descartar uniones inespecíficas llevadas a cabo en los experimentos.

Para corroborar la unión de VE-Cadherina pY658 a p120 catenina, realizamos experimentos de co-inmunofluorescencia con el tratamiento PF.271 para así poder afianzar los resultados anteriormente expuestos (**Fig. 18A**).

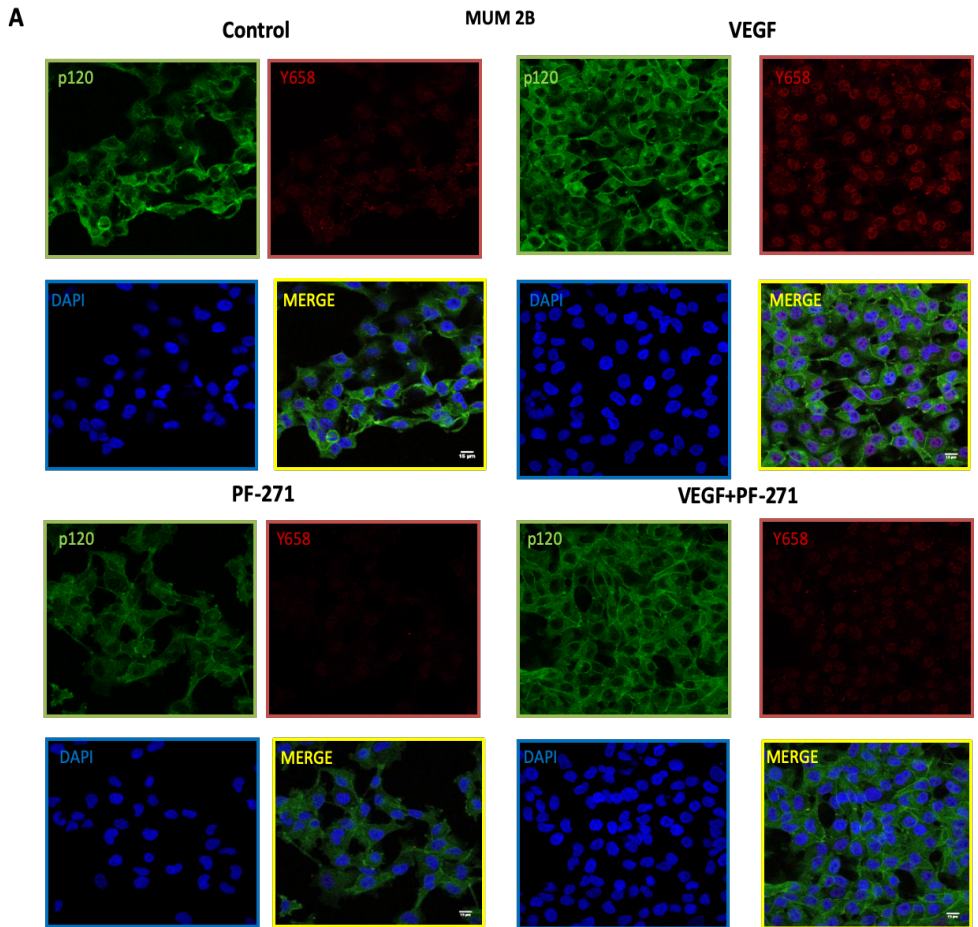


Fig. 18: VE-Cadherina forma complejo con p120/Kaiso en el núcleo en un mecanismo de FAK dependiente. A) co-inmunofluorescencia de pY658 (rojo) y p120 catenina (verde) en la línea celular MUM 2B con previo tratamiento del inhibidor PF-271, el cual redujo la co-localización de ambas proteínas independientemente del doble tratamiento con VEGF (Bars 15 μ m).

pY658 de VE-Cadherina impide la represión de los genes diana dependientes de Kaiso CCND1 y WNT 11

Los resultados anteriores sugerían una posible acción por parte de VE-Cadherina, más en concreto, de la pY658 de VE-Cadherina sobre la localización de p120/Kaiso y teniendo en conocimiento que una desunión de p120 sobre Kaiso conlleva a una posible represión de Kaiso sobre sus genes diana dependientes y la consecuente disminución de expresión genética y proteica de las mismas²⁹⁷.

Decidimos, por todo ello, realizar experimentos de qPCR tras la inhibición química de la FAK (PF-271) (**Fig. 19A**) o siRNA de FAK y de VE-Cadherina (**Fig. 19B**), sobre los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11). Tras dichos tratamientos o silenciamientos sobre la línea celular MUM 2B, obtuvimos una reducción de expresión significativa de los ARNm de las proteínas CCND1 y WNT 11.

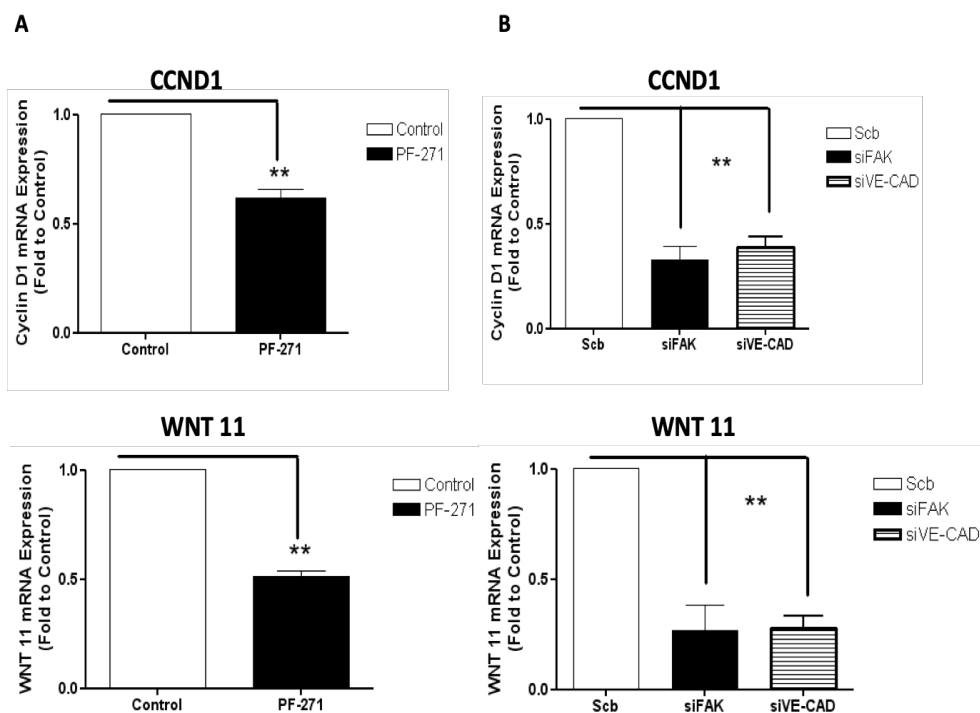


Fig. 19: pY658 de VE-Cadherina reprime los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11). Ay B) experimentos de qPCR con inhibidores de FAK (PF-271) o silenciamiento de FAK y VE-Cadherina mostraron una fuerte disminución de la expresión de genes dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11). Los análisis estadísticos se realizaron

utilizando el software *Graph Pad Prism*. La significación estadística se calculó utilizando una prueba t de Student (sin emparejar, de dos colas) (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001) con mediciones de al menos tres ensayos independientes. La barra de error denota la desviación estándar.

Como hemos comentado con anterioridad, p120 juega un papel importante en la inactivación de Kaiso por unión a la misma²⁰². Más en concreto, el estado de fosforilación de p120, a través de CK1ε, y por estimulación de Wnt 3a en diversas líneas celulares de adenocarcinoma de colon (SW480 y HT-29 M6) disminuyó la unión de E-Cadherina a la misma (véase Fig. 2 del artículo citado)²⁹⁸ y por lo tanto facilita su unión a Kaiso, desplazándolo hacia el citoplasma y por tanto incrementando así la expresión (no represión por parte de Kaiso) al gen diana CDKN2A (inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina) (Véase Fig. 8 del artículo citado)²⁹⁸.

Teniendo en cuenta que la localización de Kaiso, mediada en parte por p120 y VE-Cadherina en la línea celular MUM 2B (**Fig. 17**) es importante para su acción de represión sobre sus genes diana. Decidimos realizar experimentos de inmunoprecipitación de Kaiso-cromatina, previo tratamiento inhibitorio sobre la actividad de la FAK (PF-271) (**Fig. 20A**) o tras el silenciamiento de VE-Cadherina (**Fig. 20B**) y realizamos qPCR de los promotores de los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11). Tras el tratamiento con PF-271 o silenciamiento de VE-Cadherina obtuvimos como resultado un aumento del reclutamiento de Kaiso tras la inhibición de la pY658 de VE-Cadherina de manera directa (siRNA de VE-Cadherina) o indirecta (PF-271), sobre los promotores antes citados expresados en *Fold enrichment Over input*, que correlaciona con la bajada de expresión de los ARNm mensajeros representados en la **Fig. 19**. Utilizamos la secuencia reconocida de unión al promotor PMSD5 (ZBTB33 CHIP-seq: GSM1334009 and GSM803504)¹⁸⁷ como control positivo de unión a Kaiso y una secuencia de unión al promotor RPL30 como control negativo de unión. Por último, se realizó (en las mismas condiciones experimentales) una inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo no relevante de unión IgG.

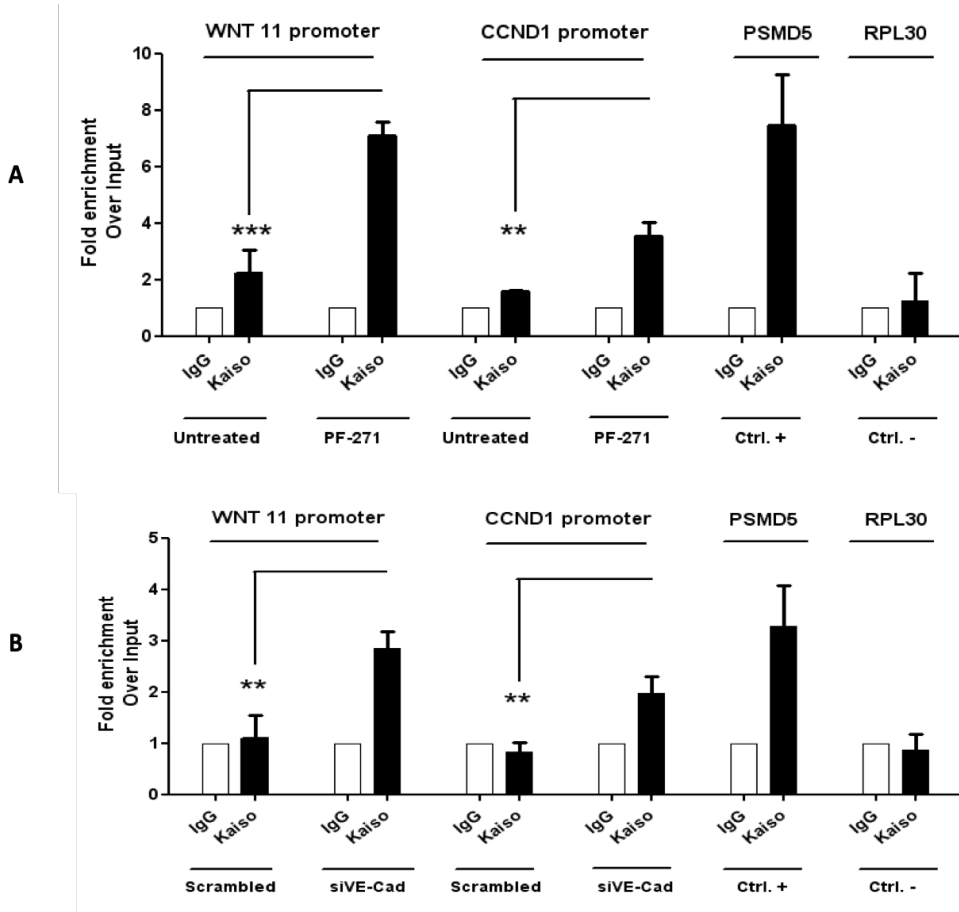


Fig. 20: pY658 de VE-Cadherina aumenta el reclutamiento de Kaiso a sus genes diana (CCND1 y WNT 11). **A)** inmunoprecipitación de cromatina unida a Kaiso en la línea celular MUM 2B, previo tratamiento con PF-271 y **B)** tras el silenciamiento de VE-Cadherina. Utilizamos *primers* contra el promotor de CCND1 y WNT 11, así como un control positivo de unión de Kaiso (PSMD5) y un control negativo de unión (RPL30). La significación estadística se calculó utilizando una prueba t de Student (sin emparejar, de dos colas) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) con mediciones de al menos tres ensayos independientes. La barra de error denota la desviación estándar.

El silenciamiento de los genes diana dependientes de Kaiso (CNND1 y WNT 11) disminuye la formación de VM en MUM 2B

Para corroborar la posible implicación de los genes diana de Kaiso en el contexto de formación de VM por parte de las células MUM 2B (todo ello a

través de la fosforilación aberrante de VE-Cadherina), decidimos realizar experimentos de formación de VM en matrigel, silenciando dichos genes dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11).

Primero, realizamos la corroboración del silenciamiento de CCND1 en MUM 2B, a través de experimentos de qPCR (**Fig. 21A**) y WNT 11 (**Fig. 21D**). El silenciamiento de CCND1 disminuyó la capacidad de formación de VM (**Fig. 21B**) cuantificado en el número de *loops* en matrigel (**Fig. 21C**). Por parte de WNT 11, el silenciamiento del mismo también disminuyó la capacidad de formar VM, aunque en menor medida (**Fig. 21E y F**). Estos resultados resaltan la posible importancia, por ahora desconocida, que puede llevar a cabo la sobreexpresión de la pY658 de VE-Cadherina en la formación de VM, orquestado por la unión sobre la ruta de p120/Kaiso a nivel transcripcional.

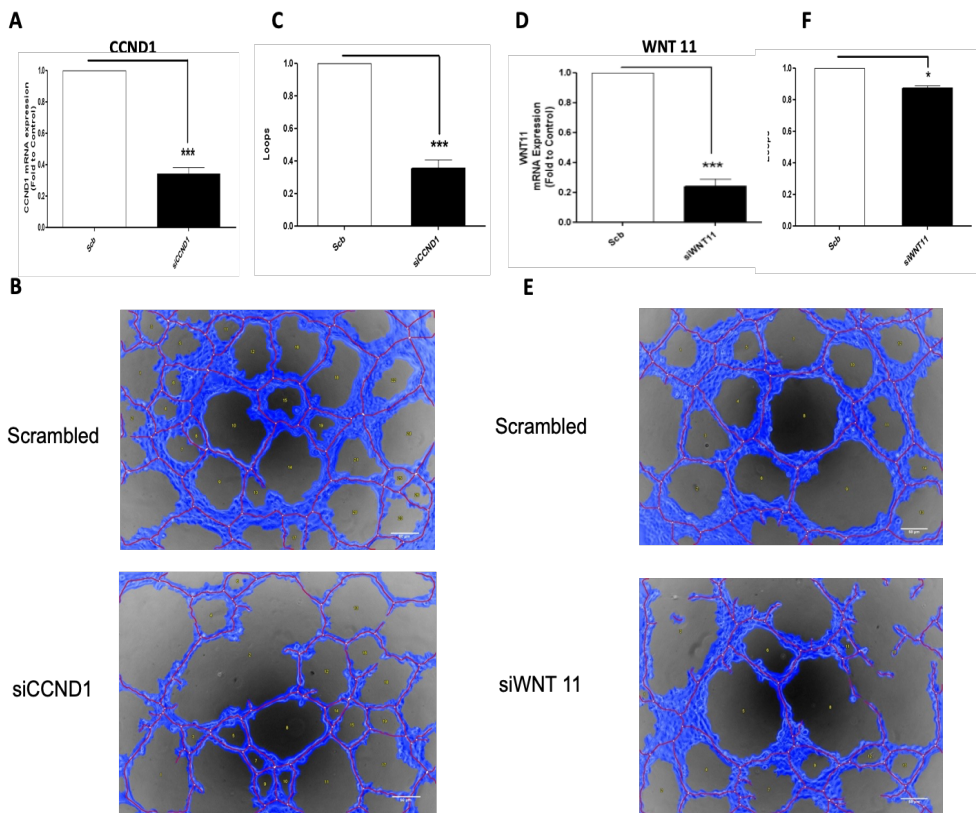


Fig. 21: La inhibición de los genes diana dependientes de Kaiso (CNND1 y WNT11) disminuye la formación de VM en MUM 2B. **A)** qPCR de CCND1 o **D)** WNT 11 tras el

silenciamiento siRNA de las mismas, **B)** experimento de formación de VM en matrigel tras el siRNA de CCND1 o **E)** silenciamiento siRNA de WNT 11. **C y F)** cuantificación de formación de *loops* por el programa Wimasis. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Bars de 50 μ m) La significación estadística se calculó utilizando una prueba t de Student (sin emparejar, de dos colas) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) con mediciones de al menos tres ensayos independientes. La barra de erro denota la desviación estándar.

La fosforilación de VE-Cadherina en Y658 es esencial para la capacidad de formar VM en MUM 2B

Todos los resultados anteriormente expuestos podrían interpretarse que la acción de VE-Cadherina y su estado de fosforilación en el residuo Y658 están mediados por la inhibición de la FAK, es decir, la inhibición de la capacidad de formar VM por parte de las células MUM 2B o C8161 puede ser debido *per se* a la inhibición de la FAK (efecto indirecto), en adicción, se había puesto de manifiesto que una inhibición de la VE-Cadherina total (tratamientos de anticuerpos) disminuye la formación de VM¹³³.

Para esclarecer la posible relación directa de la pY658 de VE-Cadherina sobre la formación de VM, editamos genéticamente (CRISPR-Cas9) la línea celular MUM 2B produciendo una línea celular MUM 2B K.O para VE-Cadherina, corroborando dicha edición genética de VE-Cadherina a través de *Western Blot* (**Fig. 22A**).

El siguiente paso fue realizar experimentos de formación de VM en matrigel en las siguientes condiciones: el silenciamiento de VE-Cadherina mediante siRNA (**Fig. 22C arriba-derecha**) disminuyó la formación de VM, corroborando así lo publicado con anterioridad¹³³. Este resultado fue apoyado cuando sembramos la línea celular MUM 2B K.O de VE-Cadherina en matrigel y obtuvimos semejantes resultados en formación de VM (**Fig. 22C abajo-izquierda**). Sorprendentemente, cuando rescatamos a través de la tranfección de VE-Cadherina WT a la línea celular MUM 2B K.O de VE-Cadherina, se revirtió la capacidad de formar VM por parte de las células (**Fig. 21C**). Finalmente, la introducción de la VE-Cadherina Y658F (no fosforilable), impidió la formación de VM (**Fig. 21C**). Todos los experimentos fueron cuantificados en formación de *loops* representados en la **Fig. 21B**.

En general, estos resultados sugieren que la fosforilación de la Y658 de VE-Cadherina es esencial en la capacidad de formar VM en células de melanoma agresivo.

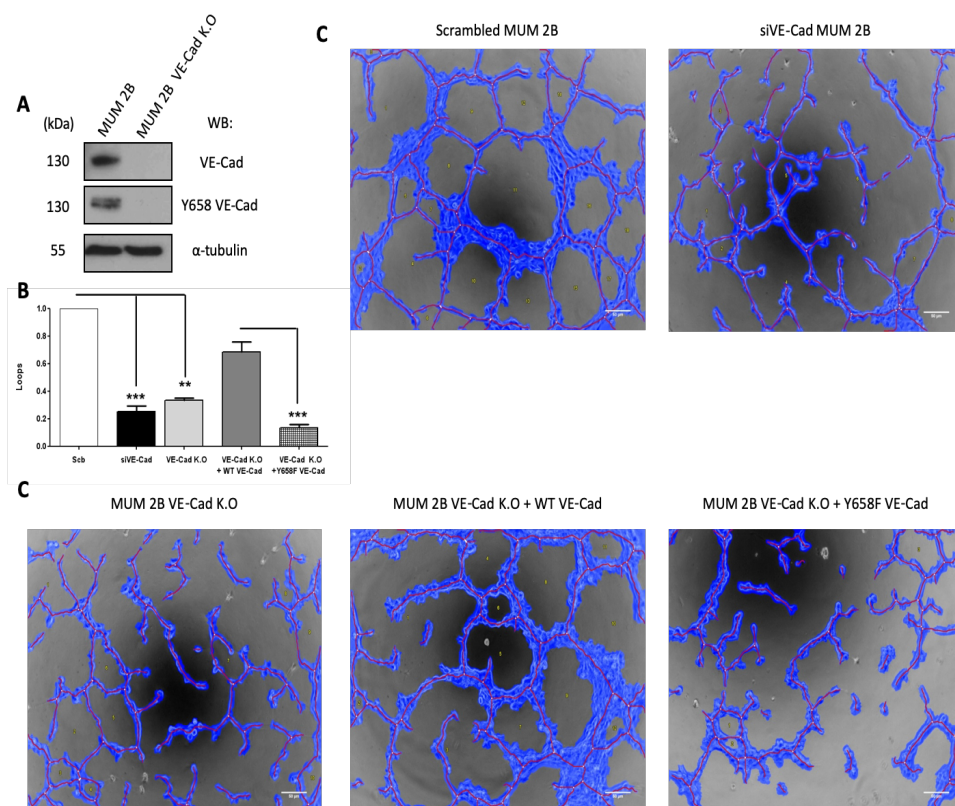


Fig. 22: La fosforilación de VE-Cadherina/pY658 es esencial en la capacidad de formar VM en MUM 2B. **A)** experimentos de *Western Blot* corroboraron la ausencia de VE-Cadherina y pY658 en la línea celular MUM 2B K.O para VE-Cadherina editada genéticamente con la mediante CRSPR-Cas9, **C)** experimentos de formación de VM en matrigel puso de relieve el papel esencial que tiene la expresión aberrante de Y658 de VE-Cadherina ya que tras introducir mediante transfección (1 μ gr) y el mutante no fosforilable Y658F incapacitaba a la células para formar VM, por el contrario el rescate de VE-Cadherina WT sobre la línea celular MUM 2B K.O de VE-Cadherina capacitó a las mismas para formar VM, **B)** cuantificación de formación de *loops* por el programa Wimasis. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Bars de 50 μ m) La significación estadística se calculó utilizando una prueba t de Student (sin emparejar, de dos colas) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) con mediciones de al menos tres ensayos independientes. La barra de error denota la desviación estándar.

La expresión de VE-PTP es esencial para la estabilidad de VE-Cadherina y para formar VM

En el inicio del estudio de la familia de proteínas cadherinas, la expresión de VE-Cadherina se consideraba como una cadherina clásica que estaba presente específicamente en células endoteliales, más en concreto fue analizada y caracterizada en 1993 en placentas humanas²⁹⁹. En estudios posteriores¹³³, se relacionó la expresión de VE-Cadherina por parte de las células de melanoma altamente agresivas (MUM 2B, C8161 y C918, véase Fig.1 del artículo citado), en particular, se relacionó la expresión molecular de VE-Cadherina y la agresividad por capacidad de formar metástasis e invasión de tejidos aledaños de la línea celular MUM 2B, que fue caracterizada en 2002⁹¹, todo ello comparado con la línea celular MUM 2C (sin capacidad de formar VM). Posteriormente a estos estudios de VM, se ha reafirmado la posible implicación de VE-Cadherina en el fenómeno de VM y en el mal pronóstico en pacientes¹⁴⁶.

VE-PTP (como VE-Cadherina) se considera una proteína que juega un papel muy importante en la regulación de la permeabilidad celular, manteniendo el balance de fosforilaciones de VE-Cadherina adecuadas a las condiciones que se presentan y/o enfrentan las células de endotelio^{144,207,209}. Profundizando en los estudios sobre el posible rol de VE-PTP en la estabilidad vascular, observaron recientemente un grupo en 2014²⁰⁵ que la desregulación en la función de VE-PTP sobre las células endoteliales, podría estar afectando a la vasculatura ocular y que su inhibición por el agente químico (AKB-9978) estabilizaba dicha vasculatura previa activación de la ruta de Tie-2. Abriendo así la salida del fármaco por parte de la compañía Aerpio Phamaceuticals en ensayos clínicos (nótese que AKB-9978 está actualmente en ensayos clínicos de Fase IIa: NCT03197870 en pacientes con retinopatía diabética).

Siguiendo la línea de tiempo de resultados sobre la acción de VE-PTP sobre la estabilidad de permeabilidad en la células endoteliales, en 2017²⁰³, se puso de manifiesto que la integridad y estabilidad de la vasculatura de las células endoteliales estaba mediada por una proteína de puente de unión sobre la VE-Cadherina y VE-PTP, dicha proteína era la plakoglobina que anteriormente se

había visto totalmente relacionada con la unión de VE-PTP a VE-Cadherina¹⁴⁵, en el dominio V de la misma.

Un estudio aún más reciente publicado por Andrea Tadei y colaboradores, reportaron en 2018³⁰⁰, escuetamente, que cuando VE-Cadherina está presente secuestra a Ezh2 (histona-lisina metiltransferasa 2 perteneciente al grupo de proteínas denominadas *Polycomb*), específicamente Ezh2 se une a los residuos 450-473 de VE-Cadherina, (Véase Fig. 6 del artículo citado), y este secuestro reprime los genes diana de Ezh2 (VE-PTP y claudina-5). Poniendo de manifiesto, la posible relación de VE-Cadherina en procesos epigenéticos de regulación de genes endoteliales.

Más recientemente, en abril de este año³⁰¹ se ha reportado la posible entrada de tratamiento contra VE-PTP en la lesión diabética de riñón, aumentando así el posible potencial de la dinámica de VE-PTP sobre las células de endotelio.

Todo lo anteriormente comentado está enfocado al estudio y/o dinámica de VE-PTP sobre los mecanismos moleculares implicados en la permeabilidad vascular como así la integridad de la misma.

Teniendo en cuenta, por tanto, todos los conocimientos reportados sobre el papel de VE-PTP, en la dinámica de la permeabilidad vascular, decidimos explorar la posible relación de VE-PTP y VE-Cadherina en un modelo tumoral con capacidad de formar VM. Para ello, realizamos experimentos de *Western Blot* sobre las líneas celulares MUM 2B, MUM 2C, C8161 y C81-61 para medir así la expresión de VE-PTP en las mismas (**Fig. 23A**), sorprendentemente solo en las líneas celulares que expresan a nivel basal VE-Cadherina se correlaciona con la expresión de VE-PTP. Esto nos abrió la posibilidad de indagar en el mecanismo intracelular de VE-PTP en un modelo de formación de VM.

Realizamos experimentos de qPCR de expresión de ARNm de VE-PTP (para corroborar los resultados anteriores de expresión de VE-PTP) en las líneas celulares MUM 2B y MUM 2C (**Fig. 23B**).

Se ha publicado que el silenciamiento de VE-PTP en la línea celular de endotelio (HLMVEC) disminuye la expresión de VE-Cadherina con el correspondiente aumento de las fosforilaciones en Y658, Y685 y Y731 de VE-Cadherina²⁰⁸ (Véase Fig.1 y 3 del artículo citado). Con dicha premisa,

realizamos el silenciamiento de VE-PTP en la línea celular MUM 2B (**Fig. 23F**) y sorprendentemente tras el silenciamiento de VE-PTP los niveles VE-Cadherina disminuyó según lo previsto pero la expresión de la pY658 disminuyó casi por completo, lo que nos hizo plantear el mecanismo por el cual VE-PTP está afectando a la dinámica intracelular de VE-Cadherina en dicho modelo de VM.

Como hemos reportado anteriormente, una disminución de la pY658 de VE-Cadherina tiene un efecto sobre la represión de los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11) (**Véase Fig. 19 y 20**). Con dicha premisa, decidimos medir los niveles de expresión de ARNm de CCND1 y WNT 11 a través de experimentos de qPCR (**Fig. 23 C**). Los niveles de CCND1 y WNT 11 disminuyeron tras el silenciamiento de VE-PTP confirmando los anteriores experimentos realizados.

A continuación, decidimos medir la capacidad de formar VM en matrigel en MUM 2B tras el silenciamiento de VE-PTP, como se muestra en la **Fig. 23D y E**, dicho silenciamiento de VE-PTP disminuyó la formación de *loops* por parte de las células MUM 2B. Finalmente, para confirmar los resultados expuestos, realizamos experimentos de subfraccionamiento celular en la línea celular HUVEC (**Fig. 23G**) (Control positivo de expresión y/o localización de VE-Cadherina e VE-PTP) tras el silenciamiento de VE-PTP, y pudimos observar que tras la inhibición de expresión de VE-PTP la pY658 de VE-Cadherina aumento en expresión y se desplazó debatiblemente hacia el núcleo. Corroborando este último experimento que la línea celular MUM 2B se comporta de manera diferente a nivel de dinámica intracelular del eje VE-Cadherina/VE-PTP.

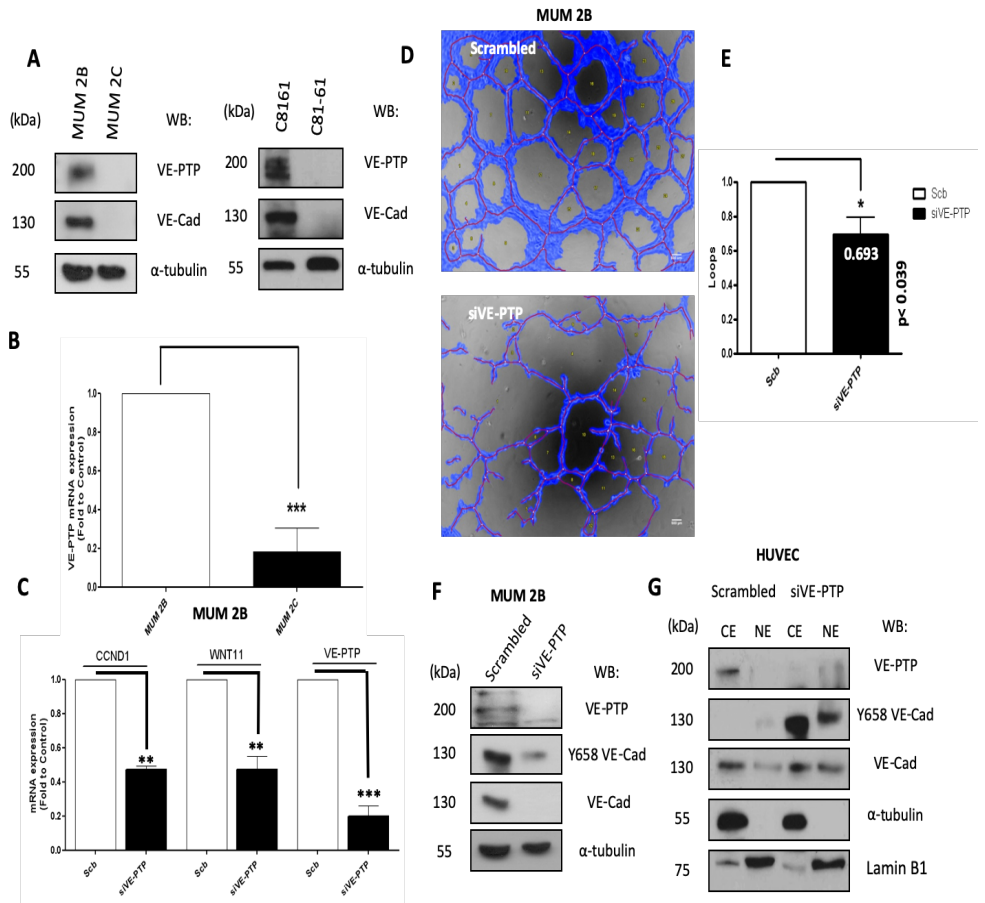


Fig. 23: La expresión de VE-PTP es esencial para la estabilidad de VE-Cadherina y para formar VM. **A)** experimentos de *Western Blot* en las líneas celulares MUM 2B, MUM 2C, C8161 y C81-61 mostraron que la expresión de VE-PTP solo estaba presente en las líneas celulares de melanoma agresivo, **B)** qPCR de VE-PTP en células MUM 2B y MUM 2C corrobora la diferencia de expresión de VE-PTP entre las líneas celulares. El silenciamiento de VE-PTP, **F)** disminuyó la expresión de VE-Cadherina como así la pY658 en las células MUM 2B, en experimentos de qPCR dicho silenciamiento **C)** disminuyó la expresión de los genes diana dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11), **D y E)** experimentos de formación de VM en matrigel previo silenciamiento de VE-PTP, muestran que VE-PTP participa en la formación de VM en las células MUM 2B. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Barras de 50 μ m). La significación estadística se calculó utilizando una prueba t de Student (sin emparejar, de dos colas) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) con mediciones de al menos tres ensayos independientes. La barra de error denota la desviación estándar. Finalmente, el silenciamiento de VE-PTP sobre la línea celular HUVEC, **G)** corroboró la dualidad de mecánica intracelular de VE-Cadherina/VE-PTP en contraposición con las células de melanoma agresivo MUM 2B.

VE-Cadherina y VE-PTP forman un complejo con p120 catenina en células de melanoma

El complejo VE-Cadherina-catenina proporciona la columna vertebral de la unión adherente en el endotelio. Sin embargo, en las células no endoteliales, las proteínas que interactúan con VE-Cadherina no han sido identificadas. A través de experimentos de co-inmunoprecipitación para analizar las proteínas que interactúan con VE-Cadherina y VE-PTP, demostramos que VE-Cadherina forma un complejo frágil con VE-PTP en MUM 2B (**Fig. 24A, 2C**) en comparación con las células HUVEC, que es un control positivo, en tanto en cuanto, se refiere a unión de VE-PTP/VE-Cadherina en un contexto endotelial normal²⁰⁹ (**Fig. 24B**). Sorprendentemente, se detectó la presencia de p120 catenina formando un complejo con VE-PTP en las células MUM 2B al contrario de lo que se aprecia en las células HUVEC (**Fig. 24B y 2C**). Estos resultados sugieren que VE-PTP podría estar involucrada en el control del estado de fosforilación de p120-catenina en las células de melanoma MUM 2B por unión física sobre ella.

Para analizar el posible impacto de p120 en la estabilidad de VE-Cadherina en MUM2B, llevamos a cabo un ensayo de subfraccionamiento de citosol-núcleo después de silenciar p120, los resultados mostraron que p120 protege la estabilidad de VE-Cadherina (**Fig. 24D**). Finalmente, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de p120 tras el silenciamiento de VE-PTP en células MUM 2B, observamos que la unión de VE-Cadherina a p120 se perdía, dando lugar a un aumento de la fosforilación global de tirosina de p120, lo que sugiere que VE-PTP salvaguarda la unión de VE-Cadherina a p120, vinculante toda actividad de VE-PTP a las células VM⁺ por el equilibrio entre la fosforilación y la desfosforilación de p120 a través de la actividad fosfatasa de VE-PTP (**Fig. 24E**) siendo p120 catenina un posible sustrato para VE-PTP. Estos resultados son compatibles con el aumento de fosfo-p120 (como resultado de la inactivación de VE-PTP) que es responsable de la disociación del complejo, para así iniciar la proteólisis de VE-Cadherina. De hecho, se ha descrito que solo la isoforma 1A de p120 puede ser sustrato de RPTP μ ²⁹⁵, correlacionado con los resultados de la **Fig. 24C** (mayor unión de VE-PTP con la isoforma 1A de p120) y **24E** (banda indicada de pTyr-p120 en el *Western Blot* de p-Try global (4G10) en el experimento de inmunoprecipitación de p120).

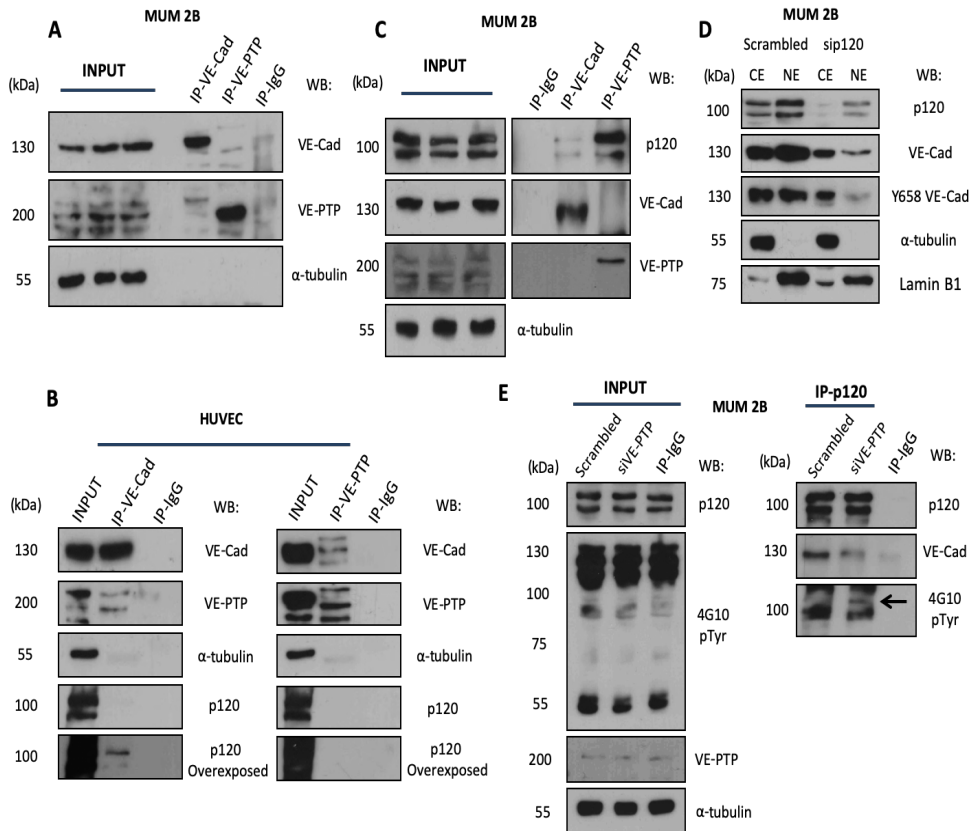


Fig. 24: VE-Cadherina y VE-PTP forman un complejo con p120 catenina en células de melanoma. A) experimentos de inmunoprecipitación de VE-Cadherina y VE-PTP en MUM 2B mostraron una pequeña unión de ambas proteínas en las células MUM 2B, **B)** en contraste, en las células endoteliales (HUVEC) mostró una alta unión de VE-Cadherina a VE-PTP y solo p120 tiene unión con VE-Cadherina y no con VE-PTP, **C)** sorprendentemente, p120 tiene una alta unión con VE-PTP y VE-Cadherina en experimentos de inmunoprecipitación en MUM 2B **D)** subfraccionamiento de citosol-núcleo con scb y sip120 mostraron que la estabilidad de VE-Cadherina, así como la fosforilación de Y658 depende de p120, **E)** finalmente, la inmunoprecipitación de p120 después de la inhibición de VE-PTP produce un alto aumento en la fosforilación de p120 y disminuye la unión de VE-Cadherina.

EL complejo VE-Cadherina/VE-PTP está involucrado en la resistencia a la degradación por vía autofágica de VE-Cadherina

Para diseccionar el mecanismo que conduce a la degradación de VE-Cadherina tras el silenciamiento de VE-PTP, se trató a las células MUM 2B con el inhibidor de proteasoma (Lactacistina) y no evitó la degradación de VE-Cadherina después de la desactivación de VE-PTP (**Fig. 25A**). Recientemente, un estudio ha informado que la formación de VM fue promovida por la autofagia inducida por bevacizumab en células tumorales de glioblastoma, que se asoció con la resistencia tumoral a la terapia antiangiogénica a través de la alta expresión de VEGFR-2²⁸⁶. La inhibición de la fusión de autofagosomas y lisosomas con el tratamiento de cloroquina suprimió la degradación de VE-Cadherina después del silenciamiento de VE-PTP (**Fig. 25A**). Aún más, los niveles del sustrato mTOR p-p70S6K (como una medida de la actividad mTOR y el estado de autofagia) disminuyeron en las células MUM 2B K.O para VE-Cadherina (**Fig. 25B**), lo que sugiere que la presencia aberrante de VE-PTP mantiene el estado y balance de fosforilación necesaria sobre p120 para así no llegar a término la degradación controlada de VE-Cadherina vía autofágica.

Finalmente, experimentos de microscopía electrónica (**Fig. 25C**) en MUM 2B y C8161 tras el silenciamiento de VE-PTP o en MUM 2B K.O para VE-Cadherina; mostraron un incremento de las características de morfología autofágica después del silenciamiento de VE-PTP o en las células inactivadas para VE-Cadherina, lo que sugiere que la pérdida de cualquiera de las proteínas del complejo desencadenó la autofagia.

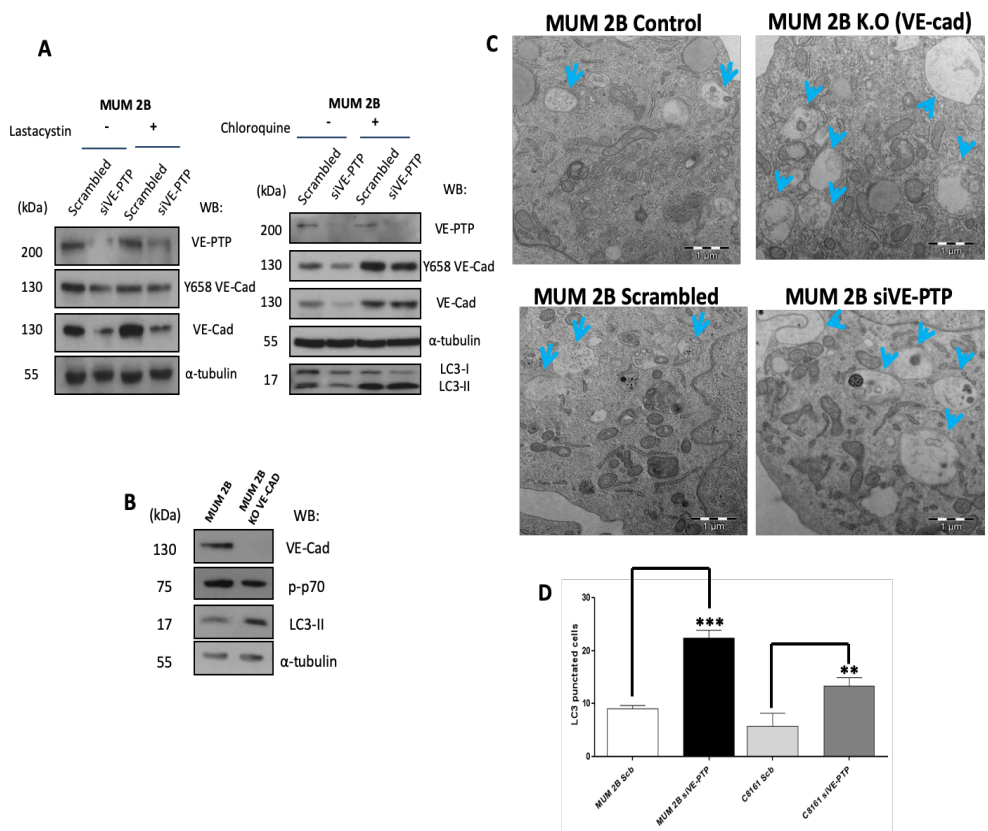


Fig. 25: El complejo VE-Cadherina/VE-PTP está involucrado en la resistencia a la degradación vía autofagia de VE-Cadherina. A) la inhibición del proteasoma a través del tratamiento con Lactacystina (30 μ M durante 30 minutos) con o sin siVE-PTP no impide la degradación de VE-Cadherina, el tratamiento con Cloroquina (20 μ M durante 3 h) en las mismas condiciones descritas anteriormente previenen la degradación de VE-cadherina, sugiriendo las posibles implicaciones de la autofagia después de las condiciones de siVE-PTP en MUM 2B, **C)** los experimentos de microscopía electrónica en condiciones de, siVE-PTP y MUM 2B K.O para VE-Cadherina, mostraron que después de la inhibición de VE-PTP aumentan los autofagosomas (Bars: 1 μ m), **B)** *Western Blot* en las células MUM 2B K.O mostraron una disminución en la expresión de p-p70 con un aumento en la formación de LC3-II, **D)** la cuantificación de los autofagosomas (células puntuadas con LC3-GFP) aumentó después del silenciamiento de VE-PTP en las células MUM 2B y C8161, cada tratamiento se realizó por triplicado, y los experimentos se repitió independientemente al menos tres veces.

Para confirmar la implicación de la autofagia en la degradación de VE-Cadherina, realizamos experimentos para cuantificar la formación de autofagosomas en las mismas condiciones descritas anteriormente tras la transfección del plasmido LC3-GFP y observamos que los autofagosomas (punteado por LC3-GFP) aumentaron después del silenciamiento de VE-PTP en ambas líneas celulares de melanoma agresivo: MUM 2B y células C8161

(Fig. 25D y Fig. 26A). Al analizar la base de datos cBioPortal, descubrimos que los altos niveles de ARNm de PTPRB (gen que codifica para VE-PTP) estaban inversamente asociados con la expresión de dos genes esenciales involucrados en la autofagia, LAMP1 y ATG7 en el melanoma uveal (Fig. 26B), lo que sugiere que en pacientes esta interacción podría ser relevante para determinar las características de autofagia del tumor.

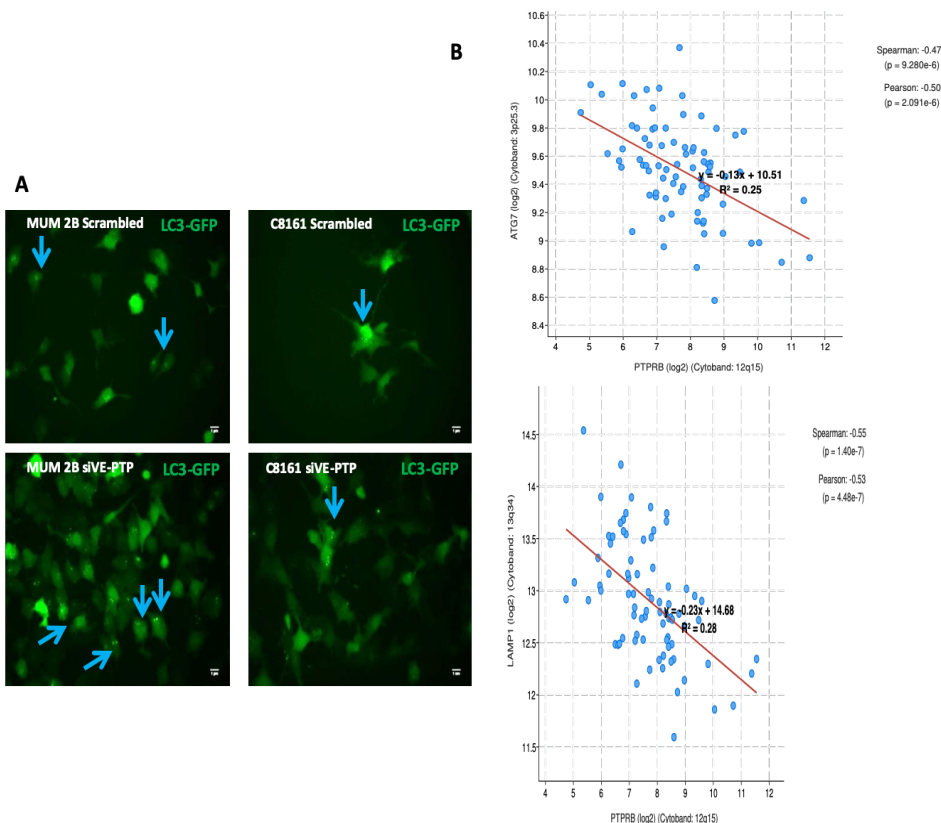


Fig. 26: El complejo VE-Cadherina/VE-PTP está involucrado en la resistencia a la degradación por vía autofágica de VE-Cadherina. A) los autofagosomas (células punteadas con LC3-GFP) aumentaron después del silenciamiento de VE-PTP en las células MUM 2B y C8161, cada tratamiento se realizó por triplicado y el experimento se repitió independientemente al menos tres veces, las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Barras: 1 μ m), **B)** análisis de la base de datos cBioPortal, una plataforma de 48333 muestras tumorales, mostraron la posible correlación de dos genes implicados en autofagia con la alta expresión de PTPRB en los mismos.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El término angiogénesis se remonta al año 1900 para referirse al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir del crecimiento y organización celular orquestado por el organismo. En los inicios de los estudios de desarrollo de angiogénesis estaban enfocados al conocimiento básico sobre el mecanismo de embriogénesis fetal y posterior estabilización y organización de los mismos. No es hasta la década de 1960 donde se utiliza el término angiogénesis en procesos implicados en cáncer. En un principio los estudios sobre la angiogénesis tumoral se centraron en la capacidad de las propias células endoteliales de proliferar en brotación hacia la localización del propio tumor, conjeturando así que las propias células endoteliales normales sufrían cambios de pérdida de estabilidad en la organización de la polaridad luminal-basal por pérdida de los contactos inter-endoteliales, todo ello bien orquestado en un entorno de conexión célula-célula y estimulación por diversas citoquinas (VEGF, PDGF, TGF- β 1 entre otras). Se pensó posteriormente que la brotación de las células endoteliales necesitaban como anclaje para su proliferación y éxito de formación vascular las denominadas células periciticas (pericitos), teniendo estas una gran diversidad dependiente de su origen como de su consiguiente diferenciación tejido específica. Posteriormente surgieron diferentes modelos de formación de angiogénesis tumoral dependiendo de las características de las células tumorales en cuestión, llevando así el término y estudio de la angiogénesis tumoral a un plano más longitudinal. En la década de 1990, se desarrolló por parte de diferentes grupos científicos la imperativa necesidad de modelizar diferentes mecanismos de supervivencia por parte de las células tumorales mediada por formación de vasos *de novo* o aprovechamiento sobre los vasos sanguíneos ya preexistentes. Mientras se desarrollaban terapias anti-angiogénicas contra el anclaje de VEGF sobre las células endoteliales (bevacizumab, aprobado por la FDA en 2004 para el tratamiento de cáncer colorectal), otros grupos científicos exploraban otros posibles mecanismos de angiogénesis tumoral en diferentes modelos.

En 1999, se introdujo en la comunidad científica el término denominado *Vasculogenic Mimicry*, que en un inicio se describió como la capacidad de las células tumorales de melanoma uveal y cutáneo PAS positivas y CD31 negativas en la formación de pseudovasos sanguíneos que tienen capacidad de

fluir sangre y fluidos por los mismos, en un mecanismo independiente por parte de las células endoteliales adyacentes o posible atracción por brotación endotelial. En 2001, se observó que las células tumorales de melanoma con capacidad de formar VM sobreexpresaban la cadherina endotelial vascular (VE-Cadherina), considerada como cadherina específica por parte de las células endoteliales hasta dicho año.

El Mimetismo Vasculogénico (VM) permite por tanto, la perfusión tumoral debido a la capacidad específica de las células malignas para formar redes en forma de vasos que proporcionan suficiente suministro de sangre para el crecimiento del tumor⁷². Un número creciente de estudios ha indicado que la angiogénesis tumoral no solo incluye los vasos dependientes del endotelio, sino que también depende del VM formado por la matriz extracelular de las células cancerosas³⁰². De hecho, los canales del VM, los vasos sanguíneos en mosaico y los vasos endoteliales coexisten en tumores malignos y pueden intercambiar dinámicamente el estado de cada uno de acuerdo con las fluctuaciones en el microambiente tumoral¹⁴⁶. El mecanismo que permite a las células tumorales la adquisición de este fenotipo aún permanece bajo estudio. En el contexto de endotelio normal, VE-Cadherina se somete a una internalización constitutiva impulsada por un motivo endocítico único que también sirve como un sitio de unión a p120 catenina. pY658 sirve como una señal para iniciar la disociación de p120 catenina de VE-Cadherina permitiendo su internalización^{147,154}. Las modificaciones postraduccionales de VE-Cadherina desencadenan cambios de unión e internalización de VE-Cadherina. En particular, pY658 se encuentra dentro de la región de unión a p120 catenina y se ha demostrado que es el sitio de unión a p120-catenina responsable de la internalización de VE-Cadherina¹⁶¹ y la inhibición de la actividad de FAK impide la metástasis tumoral al mejorar la función de la barrera endotelial¹⁴⁸. Además, se ha publicado que la fosforilación de Y658 reduce la unión a p120, un importante estabilizador de cadherinas en la membrana celular¹⁸¹. FAK se fosforila en las posiciones Y397 y Y576 en melanoma altamente agresivo, pero no en células de melanoma poco agresivo; estos cambios postraduccionales son indicativos de una FAK²¹⁷ completamente activada. Esta Y397 auto-fosforilada de FAK en células de melanoma altamente agresivas podría explicar los altos niveles constitutivamente elevados de pY658. Como se muestra en la **Fig.15**, las alteraciones tanto en la dosificación génica, como en la expresión de ARNm de FAK (PTK2) se encuentran con frecuencia en pacientes con melanoma uveal

(el 57% de los melanomas uveales humanos muestran alteraciones genéticas o regulación al alza del ARNm de PTK2) y, lo que es más interesante, estas variaciones están directamente relacionadas con la supervivencia general, y luego destacan la importancia de la expresión de FAK en la progresión de los melanomas uveales humanos.

Inesperadamente, nuestros resultados demostraron que las células de melanoma maligno que muestran la capacidad de formación de VM, expresan constitutivamente altos niveles de pY658. pY658 y p120 forman complejo de manera permanente, también presente en el núcleo. La explicación mecánica detrás de la persistencia de este complejo no está elucidada y podría deberse a alteraciones en el sitio de unión de p120 a VE-Cadherina o simplemente como resultado de tener una gran población de pY658 que satura de manera estequiométrica, teniendo como consecuencia final la no separación de p120 del complejo. De la misma manera, el mecanismo por el cual pY658 entra en el núcleo no se conoce actualmente. En estas células transformadas, una gran población de pY658 está en asociación permanentemente con p120 y puede usar el mismo mecanismo de importación nuclear que p120²⁹⁵. Otra posible causa sobre la translocación nuclear del complejo VE-Cadherina/p120 se debe en parte a la posible e inesperada acción de VE-PTP sobre la dinámica de fosforilaciones sobre p120, ya que estas líneas celulares de melanoma agresivo expresan niveles inesperados de VE-PTP, que, además, fosforila de manera específica las tirosinas de p120, manteniendo así a p120 en un estado fosforilado aberrante (**Véase Fig. 24E**). Por otro lado, la translocación de VE-Cadherina como de p120 son mutuamente dependientes, ya que los silenciamientos de ambas abolen la capacidad de translocación nuclear de la contraria (**Véase Fig. 16E y Fig. 24D**). Poniendo de manifiesto estos resultados, la dependencia de formación del complejo p120/VE-Cadherina para realizar sus funciones de desplazamiento sobre posibles proteínas con capacidad transcripcional.

Debido a que p120 se une a las cadherinas clásicas, tanto en el endotelio como en otros tejidos, es un regulador importante de la dinámica de la unión adherente y es en buena parte responsable de las condiciones cambiantes en el microambiente tumoral, entendiendo estos procesos como fluctuaciones del tráfico intracelular sobre la dinámica de p120/VE-Cadherina en concreto.

Dichas fluctuaciones de dinámicas intracelulares de permeabilidad celular dependientes de la superfamilia de proteínas cateninas y cadherinas siguen brindando un área importante para la investigación sobre los posibles mecanismos intracelulares de movimiento y estrechamiento celulares aportados por el recambio de posición del complejo cadherinas/cateninas con unión al citoesqueleto celular. Existe un desacuerdo significativo sobre qué sitios pueden fosforilarse en diferentes condiciones y si la unión de p120 está interrumpida tras las estimulación de factores proangiogénicos^{150,161}. Además, los conocimientos moleculares de la dinámica de VE-Cadherina en las células tumorales aún no se han dilucidado por completo. En la presente tesis doctoral, nos centramos en la quinasa FAK que se ha informado que es crítica para la internalización de VE-Cadherina al ser diana del residuo Y658^{148,213}. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de VE-Cadherina en el residuo Y658 es necesaria (pero no suficiente) para que las células de melanoma maligno se sometan a un comportamiento endotelial normalizado. El tráfico intracelular de pY658 está claramente alterado como consecuencia de la persistencia del complejo p120/pY658 (**Fig. 17**). En el compartimento nuclear, este complejo persiste en virtud de la fosforilación de Y658: la inhibición de la quinasa FAK o silenciamiento de FAK evitó en gran parte la formación de complejos entre VE-Cadherina y p120. Similar a la señalización de β -catenina sobre la dinámica de intercambio citosol-núcleo y su acción de modificación transcripcional, p120 también puede localizarse en el núcleo y realizar cambios en la señalización nuclear²⁹¹. Daniel y Reynolds publicaron originalmente la posible asociación de p120 con el factor de transcripción Kaiso¹⁷⁰

En general, se cree que Kaiso se une a las regiones promotoras a través de dos mecanismos diferentes: mediante una secuencia consenso de ADN específica¹⁷¹, o mediante la unión a dinucleótidos CpG metilados¹⁷². Si bien se ha estudiado poco en comparación con la señalización nuclear de β -catenina, los datos disponibles sugieren que Kaiso actúa principalmente como un represor transcripcional y que la unión a p120 activa la transcripción de los genes diana de Kaiso por incapacidad de unión física de acción sobre sus genes diana. De acuerdo, la sobreexpresión de p120 revirtió la expresión mediada por Kaiso en la actividad del gen Siamosis, CCND1, WNT 11 y MMP-7, mientras que el silenciamiento de p120 tuvo el efecto contrario¹⁸⁶. Nuestros resultados colocan a pY658 como un posible actor integrante en la regulación de la

represión génica dependiente de Kaiso y conectan las elevadas cantidades de pY658 con malignidad tumoral (formación de VM) y por su capacidad de potenciar la formación del complejo p120/Kaiso, evitando el reclutamiento de Kaiso a los sitios específicos KBS (sitios específicos de unión a Kaiso). Como resultado, la expresión elevada de genes reprimidos por Kaiso, como WNT 11 y CCDN1 amplifica la capacidad y adaptación de formación de VM de manera más eficiente por parte de las células de melanoma. Los Wnt son morfógenos con funciones bien reconocidas durante la embriogénesis y se ha demostrado que la señalización de Wnt aberrante es importante en diferentes entornos de la carcinogénesis^{303,304}. WNT 11 estimula la proliferación, la migración y la invasión de células tumorales y la proteína CCDN1 (Ciclina D1) está altamente expresada en pacientes con pólipos adenomatosos, adenocarcinoma colorrectal primario y poliposis adenomatosa familiar³⁰⁵, y en ratones portadores de adenomas intestinales por neoplasia intestinal múltiple³⁰⁵. Además, la sobreexpresión en las familias de proteínas ciclinas, se ha correlacionado con la formación de melanoma uveal¹⁶. Aquí documentamos una conexión directa entre la modificación postraduccional de VE-Cadherina y el aumento de la formación de VM causada por la expresión desregulada de WNT 11 y CCDN1.

En la **Fig. 27** mostramos un resumen gráfico que resume nuestro modelo actual presentado en esta tesis doctoral: las células de melanoma maligno, ya sean cutáneas y/o uveales, expresan grandes cantidades de FAK que conducen a cambios postraducionales de pY658 constitutivamente activos a nivel basal. La localización subcelular de VE-Cadherina fosforilada en el residuo Y658 es tanto el citosol como el núcleo. Incluso en ausencia de un estímulo externo (como tratamiento con VEGF-A o histamina) se expresa pY658, contrario de lo que se ha demostrado para las células endoteliales sobre dinámica intracelular catenina-cadherinas. La p120 catenina permanece en complejo con pY658. Más sorprendentemente, para permitir la localización nuclear de p120, VE-Cadherina debe ser fosforilada por FAK, cuya inhibición promueve la acumulación de p120 en el citosol. La acción nuclear de p120 sobre el represor del factor de transcripción Kaiso requiere *per se* de pY658 unida al complejo y la inhibición sobre la fosforilación de VE-Cadherina aumenta el reclutamiento de Kaiso (luego la represión de la expresión génica) sobre los genes dependientes de Kaiso, así como CCDN1 y WNT11. La presencia de pY658

aberrante permite la regulación positiva de los genes dependiente de Kaiso que a su vez acelera la capacidad de VM en las células tumorales de melanoma con capacidad de formar VM estudiadas en esta tesis doctoral.

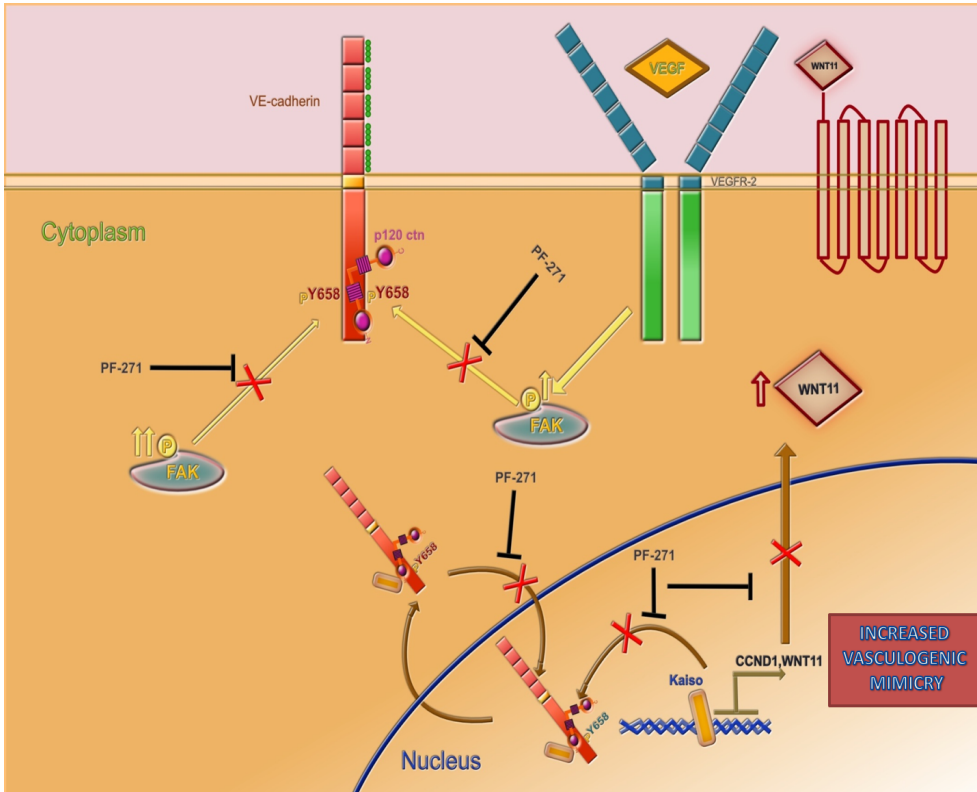


Fig. 27: modelo esquemático del proceso de VM en células de melanoma agresivo presentado en esta tesis doctoral. Se proporciona más detalles en el texto.

Si bien el papel de la VE-Cadherina como actor del comportamiento pseudoendotelial de las células de melanoma maligno se ha descrito ampliamente^{133,146,219} y expuesto anteriormente, ningún estudio ha abordado hasta ahora las implicaciones de VE-PTP en el desarrollo de VM. Los resultados anteriores han esclarecido la posible implicación de VE-Cadherina en las células tumorales con capacidad de VM debido en gran parte a la expresión aberrante de pY658 y localización de la misma en varias ubicaciones intracelulares (incluido el núcleo) que confieren a las células la plasticidad necesaria para experimentar una diferenciación pseudoendotelial. Para obtener más información sobre la causa de esta población de VE-Cadherina fosforilada, nos centramos en la posible actividad de la fosfatasa VE-PTP, que mantiene la dinámica de cambios postraduccionales de VE-Cadherina en las

células endoteliales, como ha sido ampliamente estudiado^{144,208}. A pesar de la gran expresión de VE-Cadherina por parte de las líneas celulares MUM 2B y C8161, la unión a VE-PTP en dichas líneas es limitada o nula, lo que sugiere que la mayoría de la población de VE-Cadherina no está en complejo con VE-PTP (en comparación con las células endoteliales **Fig 24A y B**), tolerando así las células de melanoma VM la acumulación de pY658 y la unión a p120, mientras que las uniones estrechas de las células endoteliales requieren un complejo de VE-PTP/VE-Cadherina estable y abundante para mantener la permeabilidad vascular estrictamente bajo control, independientemente de la actividad fosfatasa por parte de VE-PTP sobre VE-Cadherina³⁰⁶. En las células de melanoma agresivo con capacidad de formar VM, esa no presencia (células nulas VE-PTP, siRNA de VE-PTP) de VE-Cadherina no unida a VE-PTP inicia la proteólisis vía autofágica de VE-Cadherina (aumenta pTyr-p120, **Fig. 24E**) y finalmente disminuye la capacidad de VM (**Fig. 23D**) o la situación inversa células VE-PTP positivas aumentan la capacidad de formar VM (**Fig. 28**). La pregunta sigue siendo cómo una cantidad relativamente pequeña de VE-PTP protege de la proteólisis y qué señal emerge para el posible mantenimiento del complejo pY658/p120 escapando de la degradación vía autofágica. A diferencia de las células endoteliales, p120 catenina también está firmemente unida a VE-PTP (**Fig. 24B y C**), y la pérdida de este complejo (después del silenciamiento siVE-PTP) conduce a un aumento de la fosforilación de p120-catenina y la degradación de la VE-Cadherina. Estos resultados abren el campo de investigación sobre un nuevo mecanismo para controlar el mecanismo de VM a través del equilibrio entre VE-PTP/VE-Cadherina y el estado de fosforilación de p120 de las células VM⁺ de melanoma agresivo.

En la **Fig. 28** está representado el posible mecanismo de evasión de degradación de VE-Cadherina por parte de la actividad fosfatasa de VE-PTP sobre p120 en el mecanismo aberrante de formación de VM llevado a cabo por las células de melanoma cutáneo y uveal humano.

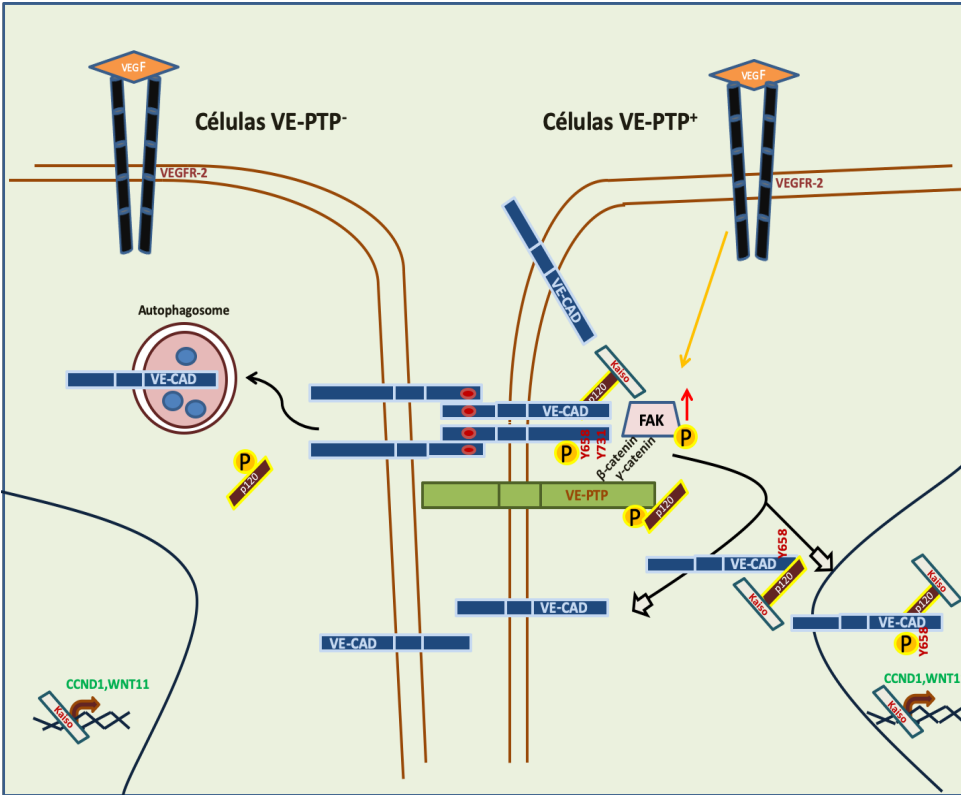


Fig. 28: principales vías de señalización involucradas en células de melanoma agresivas VM VE-PTP positivas y nulas.

En resumen, los resultados presentados en esta memoria aportan nuevos elementos para la elucidación de los mecanismos de diferenciación de la célula tumoral a pseudo-endotelial, situando a la elevada fosforilación de VE-Cadherina y a la ausencia de control por parte de VE-PTP como alteraciones fundamentales, capaces de provocar una serie de cambios y una intrincada respuesta de las células tumorales para adaptarse a un entorno hostil. Por otro lado, nuestros resultados ponen de manifiesto que la actuación farmacológica sobre la fosforilación de VE-Cadherina podría controlar la formación de VM y, eventualmente, conducir al control del tumor.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- Las células de melanoma uveal (MUM 2B) y cutáneo (C8161) con expresión de VE-Cadherina y capacidad de formar VM, tienen a nivel basal una alta expresión de pY658 de VE-Cadherina (pY658).
- La inhibición de la quinasa de adhesiones focales (FAK) o su silenciamiento genético disminuyen los niveles de Y658 de VE-Cadherina e impiden la formación de VM en células de melanoma.
- VE-Cadherina y su fosforilación en el residuo Y658 pueden tener una localización nuclear dependiente de la actividad quinasa de la FAK.
- La localización nuclear de VE-Cadherina como también de la catenina p120 son mutuamente dependientes una de la otra.
- VE-cadherina puede formar complejo con p120 y Kaiso en el núcleo celular, dependiente de la actividad pY658 mediada por FAK.
- La inhibición de la FAK o VE-Cadherina disminuye la expresión de los genes dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11) y aumenta el reclutamiento de Kaiso sobre los promotores de sus genes diana (CCND1 y WNT 11).
- Las células MUM 2B K.O para VE-Cadherina no desarrollan VM como así tampoco el rescate de VE-Cadherina mutada su Y658 a F.
- VE-PTP está presente en las células con capacidad de formar VM y su silenciamiento disminuye la formación de VM por disminución de VE-Cadherina y pY658.
- El silenciamiento de VE-PTP disminuye la expresión de los genes dependientes de Kaiso (CCND1 y WNT 11).

- VE-PTP se une fuertemente a la catenina p120 y ligeramente a VE-Cadherina.
- El silenciamiento de VE-PTP aumenta las fosforilaciones de tirosinas de p120 produciendo la desunión de la misma con VE-Cadherina.
- La degradación de VE-Cadherina es vía autofágica, dependiente del estado de fosforilación de p120 a través de la acción de VE-PTP sobre la misma.

REFERENCIAS

VIII. REFERENCIAS

1. D H, RA W. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000.
2. Singh AD, Topham A. Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology*. 2003. doi:10.1016/S0161-6420(03)00077-0
3. Bedikian AY. Metastatic uveal melanoma therapy: Current options. *Int Ophthalmol Clin*. 2006. doi:10.1097/01.iio.0000195852.08453.de
4. Kashyap S, Meel R, Singh L, Singh M. Uveal melanoma. *Semin Diagn Pathol*. 2016. doi:10.1053/j.semdp.2015.10.005
5. Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: Imaging study in 110 patients. *Am J Roentgenol*. 1991. doi:10.2214/ajr.157.6.1950883
6. Eskelin S, Pyrhönen S, Hahka-Kemppinen M, Tuomaala S, Kivelä T. A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma. *Cancer*. 2003. doi:10.1002/cncr.11113
7. Gragoudas ES, Egan KM, Seddon JM, et al. Survival of Patients with Metastases from Uveal Melanoma. *Ophthalmology*. 1991. doi:10.1016/S0161-6420(91)32285-1
8. Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of Treatments for Metastatic Uveal Melanoma. *Am J Ophthalmol*. 2009. doi:10.1016/j.ajo.2009.01.023
9. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jöckel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet*. 1996. doi:10.1016/S0140-6736(96)90736-9
10. Tschentscher F, Hüsing J, Hölter T, et al. Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res*. 2003.
11. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res*. 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1750
12. Dopierala J, Damato BE, Lake SL, Taktak AFG, Coupland SE. Genetic heterogeneity in uveal melanoma assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010. doi:10.1167/iovs.09-5004

13. Horsman DE, Sroka H, Rootman J, White VA. Monosomy 3 and isochromosome 8q in a uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990. doi:10.1016/0165-4608(90)90090-W
14. Prescher G, Bornfeld N, Becher R. Nonrandom chromosomal abnormalities in primary uveal melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 1990. doi:10.1093/jnci/82.22.1765
15. Tschentscher F, Prescher G, Zeschnigk M, Horsthemke B, Lohmann DR. Identification of chromosomes 3, 6, and 8 aberrations in uveal melanoma by microsatellite analysis in comparison to comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000. doi:10.1016/S0165-4608(00)00266-1
16. Onken MD, Worley LA, Long MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008. doi:10.1167/iovs.08-2145
17. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009. doi:10.1038/nature07586
18. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010. doi:10.1056/NEJMoa1000584
19. Mashayekhi A, Shields CL, Rishi P, et al. Primary transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma in 391 cases: Importance of risk factors in tumor control. *Ophthalmology.* 2015. doi:10.1016/j.ophtha.2014.09.029
20. Oosterhuis JA, Journée-de Korver HG, Keunen JEE. Transpupillary thermotherapy: Results in 50 patients with choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol.* 1998.
21. Singh AD, Kivelä T, Seregard S, Robertson D, Bena JF. Primary transpupillary thermotherapy of “small” choroidal melanoma: Is it safe? *Br J Ophthalmol.* 2008. doi:10.1136/bjo.2007.133249
22. Shields CL, Shields JA, Perez N, Singh AD, Cater J. Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: Outcomes and limitations. *Ophthalmology.* 2002. doi:10.1016/S0161-6420(01)00902-2
23. Keunen JEE, Journée-De Korver JG, Oosterhuis JA. Transpupillary thermotherapy of choroidal melanoma with or without brachytherapy: A dilemma [2]. *Br J Ophthalmol.* 1999.

24. Robertson DM. TTT as rescue treatment for choroidal melanoma not controlled with iodine-125 brachytherapy. *Ocul Immunol Inflamm.* 2002. doi:10.1076/ocii.10.4.247.15587
25. Shields CL, Cater J, Shields JA, et al. Combined plaque radiotherapy and transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma: Tumor control and treatment complications in 270 consecutive patients. *Arch Ophthalmol.* 2002. doi:10.1001/archophth.120.7.933
26. Shildkrot Y, Wilson MW. Update on posterior uveal melanoma: Treatment of the eye and emerging strategies in the prognosis and treatment of metastatic disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009. doi:10.1097/ICU.0b013e328330b549
27. Zehetmayer M. Stereotactic photon beam irradiation of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol.* 2012. doi:10.1159/000328259
28. Dunavoelgyi R, Zehetmayer M, Gleiss A, et al. Hypofractionated stereotactic photon radiotherapy of posteriorly located choroidal melanoma with five fractions at ten Gy - Clinical results after six years of experience. *Radiother Oncol.* 2013. doi:10.1016/j.radonc.2013.08.004
29. Langmann G, Pendl G, Müllner K, Feichtinger KH, Papaefthymiouaf G. High- compared with low-dose radiosurgery for uveal melanomas. In: *Journal of Neurosurgery.* ; 2002.
30. Dunavoelgyi R, Dieckmann K, Gleiss A, et al. Local tumor control, visual acuity, and survival after hypofractionated stereotactic photon radiotherapy of choroidal melanoma in 212 patients treated between 1997 and 2007. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.04.035
31. Zehetmayer M, Kitz K, Menapace R, et al. Local tumor control and morbidity after one to three fractions of stereotactic external beam irradiation for uveal melanoma. *Radiother Oncol.* 2000. doi:10.1016/S0167-8140(00)00164-X
32. Jampol LM, Moy CS, Murray TG, et al. The coms randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma. *Evidence-Based Eye Care.* 2004. doi:10.1097/00132578-200407000-00022
33. Damato BE. Local resection of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol.* 2012. doi:10.1159/000328261
34. Damato BE, Paul J, Foulds WS. Predictive factors of visual outcome after local resection of choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol.* 1993. doi:10.1136/bjo.77.10.616

35. Natale G, Bocci G, Lenzi P. Looking for the Word “Angiogenesis” in the History of Health Sciences: From Ancient Times to the First Decades of the Twentieth Century. *World J Surg.* 2017. doi:10.1007/s00268-016-3680-1
36. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007. doi:10.2353/ajpath.2007.060302
37. Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol.* 2017. doi:10.1002/path.4845
38. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003. doi:10.1038/nm0603-653
39. Folkman J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007. doi:10.1038/nrd2115
40. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med.* 1971. doi:10.1056/NEJM197111182852108
41. Pezzella F, Di Bacco AD, Andreola S, Nicholson AG, Pastorino U, Harris AL. Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer Part A.* 1996. doi:10.1016/S0959-8049(96)00377-2
42. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997.
43. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis.* 2014. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
44. Ebos JML, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: Impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011. doi:10.1038/nrclinonc.2011.21
45. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet.* 2016. doi:10.1016/S0140-6736(15)01088-0
46. Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, González del Alba A, Duran I. Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review. *Cancer Treat Rev.* 2017. doi:10.1016/j.ctrv.2017.08.010
47. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced

- hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008. doi:10.1056/NEJMoa0708857
48. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004. doi:10.1056/NEJMoa032691
 49. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind. *Lancet Oncol.* 2015. doi:10.1016/S1470-2045(15)70127-0
 50. Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017. doi:10.1016/S0140-6736(16)32453-9
 51. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013. doi:10.1016/S0140-6736(12)61900-X
 52. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* 2012. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
 53. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: Phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol.* 2010. doi:10.1200/JCO.2010.28.1386
 54. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005. doi:10.1200/JCO.2005.05.098
 55. Flaherty KT, Lee SJ, Zhao F, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel with or without sorafenib in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2013. doi:10.1200/JCO.2012.42.1529
 56. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007.

doi:10.1056/NEJMoa072113

57. Miles DW, Chan A, Dirix LY, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010. doi:10.1200/JCO.2008.21.6457
58. Donnem T, Hu J, Ferguson M, et al. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: An obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med.* 2013. doi:10.1002/cam4.105
59. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Micronasc Res.* 1977. doi:10.1016/0026-2862(77)90141-8
60. Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest.* 1991.
61. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005. doi:10.1038/nature04478
62. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995.
63. Zavadil J, Böttinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005. doi:10.1038/sj.onc.1208927
64. Labelle M, Schnittler HJ, Aust DE, et al. Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor β signaling. *Cancer Res.* 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2706
65. Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: A sticky business. *Exp Cell Res.* 2006. doi:10.1016/j.yexcr.2005.10.020
66. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. *News Physiol Sci.* 2003.
67. Osawa M, Masuda M, Kusano KI, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: Is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol.* 2002. doi:10.1083/jcb.200205049
68. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: A new world of angiogenesis research. *Am J Pathol.* 2001. doi:10.1016/S0002-9440(10)64025-4
69. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, et al. Prognostic importance of

glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 2002.

70. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, et al. Animal Model: Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol.* 2001. doi:10.1016/S0002-9440(10)64062-X
71. Döme B, Tímár J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003. doi:10.1093/jnen/62.6.655
72. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer. *Am J Pathol.* 2007. doi:10.2353/ajpath.2007.060302
73. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol.* 1987. doi:10.1002/path.1711510413
74. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science (80-).* 1999. doi:10.1126/science.284.5422.1994
75. Dme B, Paku S, Somlai B, Tmr J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol.* 2002. doi:10.1002/path.1124
76. Leenders WPJ, Küsters B, De Waal RMW. Vessel co-option: How tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothel J Endothel Cell Res.* 2002. doi:10.1080/10623320212006
77. Pezzella F, Gatter KC. Evidence showing that tumors can grow without angiogenesis and can switch between angiogenic and nonangiogenic phenotypes. *J Natl Cancer Inst.* 2016. doi:10.1093/jnci/djw032
78. Winkler F. Hostile takeover: how tumours hijack pre-existing vascular environments to thrive. *J Pathol.* 2017. doi:10.1002/path.4904
79. Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019. doi:10.1038/s41571-019-0181-9
80. Qiao L, Liang N, Zhang J, et al. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med.* 2015. doi:10.1111/jcmm.12496
81. Ellis LM, Fidler IJ. Finding the tumor copycat: Therapy fails, patients

don't. *Nat Med.* 2010. doi:10.1038/nm0910-974

82. Folberg R, Hendrix MJC, affiliation> AJM. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000. doi:10.1016/S0002-9440(10)64739-6
83. Paulis YWJ, Soetekouw PMMB, Verheul HMW, Tjan-Heijnen VCG, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2010. doi:10.1016/j.bbcan.2010.01.001
84. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5
85. Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS.* 2004. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x
86. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: Lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003. doi:10.1038/nrc1092
87. Barnett FH, Rosenfeld M, Wood M, et al. Macrophages form functional vascular mimicry channels in vivo. *Sci Rep.* 2016. doi:10.1038/srep36659
88. Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. *Cancer Lett.* 2007. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.036
89. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013. doi:10.1016/j.ejca.2013.07.148
90. Goncharov N V., Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin P V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev.* 2017. doi:10.1155/2017/9759735
91. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2002. doi:10.1023/A:1015591624171
92. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. *Dev Cell.* 2013. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020
93. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, et al. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002. doi:10.1002/ijc.10423
94. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, et al. Hemodynamics in

- vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.* 2002.
95. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004. doi:10.1038/ni1013
 96. Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2006.
 97. Kawahara R, Niwa Y, Simizu S. Integrin $\beta 1$ is an essential factor in vasculogenic mimicry of human cancer cells. *Cancer Sci.* 2018. doi:10.1111/cas.13693
 98. Shubik P, Warren BA. Additional literature on “vasculogenic mimicry” not cited [3]. *Am J Pathol.* 2000. doi:10.1016/S0002-9440(10)64778-5
 99. Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Investig.* 1966.
 100. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, et al. The Prognostic Value of Tumor Blood Vessel Morphology in Primary Uveal Melanoma. *Ophthalmology.* 1993. doi:10.1016/S0161-6420(93)31470-3
 101. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 1999. doi:10.1093/jnci/91.4.359
 102. Sakamoto T, Sakamoto M, Yoshikawa H, et al. Histologic findings and prognosis of uveal malignant melanoma in Japanese patients. *Am J Ophthalmol.* 1996. doi:10.1016/S0002-9394(14)70275-2
 103. Seregard S, Spångberg B, Juul C, Oskarsson M. Prognostic accuracy of the mean of the largest nucleoli, vascular patterns, and PC-10 in posterior uveal melanoma. *Ophthalmology.* 1998. doi:10.1016/S0161-6420(98)93032-9
 104. Thies A, Mangold U, Moll I, Schumacher U. PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol.* 2001. doi:10.1002/path.988
 105. Warso MA, Maniotis AJ, Chen X, et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2001.
 106. Rummelt V, Mehaffey MG, Campbell RJ, et al. Microcirculation

architecture of metastases from primary ciliary body and choroidal melanomas. *Am J Ophthalmol*. 1998. doi:10.1016/S0002-9394(98)00164-0

107. Mueller AJ, Maniotis AJ, Freeman WR, et al. An orthotopic model for human uveal melanoma in SCID mice. *Microvasc Res*. 2002. doi:10.1006/mvre.2002.2398
108. Folberg R, Leach L, Valyi-Nagy K, et al. Modeling the behavior of uveal melanoma in the liver. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007. doi:10.1167/iovs.06-1522
109. Clarijs R, Otte-Höller I, Ruiter DJ, De Waal RMW. Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2002.
110. Maniotis AJ, Chen X, Garcia C, et al. Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest*. 2002. doi:10.1097/01.LAB.0000024362.12721.67
111. Pötgens AJG, Van Altena MC, Lubsen NH, Ruiter DJ, De Waal RMW. Analysis of the tumor vasculature and metastatic behavior of xenografts of human melanoma cell lines transfected with vascular permeability factor. *Am J Pathol*. 1996.
112. Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, et al. CD133 + cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2013. doi:10.1038/onc.2012.85
113. Liu S, Ni C, Zhang D, et al. S1PR1 regulates the switch of two angiogenic modes by VE-cadherin phosphorylation in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2019. doi:10.1038/s41419-019-1411-x
114. Williamson SC, Metcalf RL, Trapani F, et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat Commun*. 2016. doi:10.1038/ncomms13322
115. Van Der Schaft DWJ, Hillen F, Pauwels P, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2468
116. Qi L, Song W, Liu Z, Zhao X, Cao W, Baocun Sun BS. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -Catenin signaling. *Int J Mol Sci*. 2015. doi:10.3390/ijms160818564
117. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: Tubular vasculogenic mimicry. *Brain*. 2010. doi:10.1093/brain/awq044

118. Sun T, Zhao N, Zhao XL, et al. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology*. 2010. doi:10.1002/hep.23311
119. Xia Y, Cai XY, Fan JQ, et al. The role of sema4D in vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms. *Int J Cancer*. 2019. doi:10.1002/ijc.31958
120. Dunleavey JM, Xiao L, Thompson J, et al. Vascular channels formed by subpopulations of PECAM1 + melanoma cells. *Nat Commun*. 2014. doi:10.1038/ncomms6200
121. Yang J, Zhu DM, Zhou XG, et al. HIF-2 α promotes the formation of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer by regulating the binding of Twist1 to the VE-cadherin promoter. *Oncotarget*. 2017. doi:10.18632/oncotarget.17999
122. Racordon D, Valdivia A, Mingo G, et al. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro. *Sci Rep*. 2017. doi:10.1038/s41598-017-07622-w
123. Tang J, Wang J, Fan L, et al. cRGD inhibits vasculogenic mimicry formation by down-regulating uPA expression and reducing EMT in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.8079
124. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000. doi:10.1038/35020115
125. Epha E, Hess AR, Seftor EA, et al. Molecular Regulation of Tumor Cell Vasculogenic Mimicry by Tyrosine Phosphorylation: Role of Epithelial Cell Kinase Advances in Brief Molecular Regulation of Tumor Cell Vasculogenic Mimicry by Tyrosine. *Cancer Res*. 2001.
126. Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor REB, Hendrix MJC. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: Implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther*. 2006. doi:10.4161/cbt.5.2.2510
127. Hess AR, Margaryan N V., Seftor EA, Hendrix MJC. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: Role of the Eph receptors. *Dev Dyn*. 2007. doi:10.1002/dvdy.21190
128. Lu XS, Sun W, Ge CY, Zhang WZ, Fan YZ. Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5 γ 2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas. *Int J*

129. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 2000. doi:10.1083/jcb.148.3.615
130. Seftor REB, Seftor EA, Koshikawa N, et al. Cooperative interactions of laminin 5 γ 2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res.* 2001.
131. Welch DR, Bisi JE, Miller BE, et al. Characterization of a highly invasive and spontaneously metastatic human malignant melanoma cell line. *Int J Cancer.* 1991. doi:10.1002/ijc.2910470211
132. Casal C, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge MDC, et al. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res.* 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4197
133. Hendrix MJC, Seftor EA, Meltzer PS, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. doi:10.1073/pnas.131209798
134. Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: Role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. doi:10.1016/S1040-8428(01)00199-8
135. Tachibana M, Takeda K, Nobukuni Y, et al. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet.* 1996. doi:10.1038/ng0996-50
136. Van Hinsbergh VWM. Endothelial permeability for macromolecules: Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997. doi:10.1161/01.ATV.17.6.1018
137. Gavard J, Gutkind SJ. VE-cadherin and claudin-5: It takes two to tango. *Nat Cell Biol.* 2008. doi:10.1038/ncb0808-883
138. Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. *Colloq Ser Integr Syst Physiol From Mol to Funct.* 2011. doi:10.4199/c00025ed1v01y201101isp013
139. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998.

140. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. doi:10.1161/01.ATV.19.10.2286
141. Chen XL, Nam JO, Jean C, et al. VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK. *Dev Cell.* 2012. doi:10.1016/j.devcel.2011.11.002
142. Breier G, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res.* 2014. doi:10.1007/s00441-014-1851-7
143. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 1999. doi:10.1016/S0092-8674(00)81010-7
144. Nawroth R, Poell G, Ranft A, et al. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J.* 2002. doi:10.1093/emboj/cdf497
145. Nottebaum AF, Cagna G, Winderlich M, et al. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med.* 2008. doi:10.1084/jem.20080406
146. Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: Focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer.* 2017;16(1). doi:10.1186/s12943-017-0631-x
147. Gavard J, Gutkind JS. VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β -arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006. doi:10.1038/ncb1486
148. Jean C, Chen XL, Nam JO, et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol.* 2014. doi:10.1083/jcb.201307067
149. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun.* 2012. doi:10.1038/ncomms2199
150. Wessel F, Winderlich M, Holm M, et al. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol.* 2014. doi:10.1038/ni.2824
151. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Susan Harvey V,

- Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (80-). 1983. doi:10.1126/science.6823562
152. Frank NY, Schatton T, Kim S, et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res.* 2011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1660
 153. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 1999. doi:10.1016/S1097-2765(00)80221-X
 154. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* 2006. doi:10.1083/jcb.200602080
 155. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* 2004. doi:10.1083/jcb.200408130
 156. Xiao K, Garner J, Buckley KM, et al. p120-catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell.* 2005. doi:10.1091/mbc.E05-05-0440
 157. Seftor REB, Hess AR, Seftor EA, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: From controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol.* 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.013
 158. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor REB, Hendrix MJC. Molecular pathways: Vasculogenic mimicry in tumor cells: Diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3237
 159. Spinella F, Caprara V, Di Castro V, et al. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl).* 2013. doi:10.1007/s00109-012-0956-2
 160. Schnegg CI, Yang MH, Ghosh SK, Hsu MY. Induction of vasculogenic mimicry overrides VEGF-A silencing and enriches stem-like cancer cells in melanoma. *Cancer Res.* 2015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1855
 161. Nanes BA, Chiasson-MacKenzie C, Lowery AM, et al. p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J Cell Biol.* 2012. doi:10.1083/jcb.201205029

162. Chiasson CM, Wittich KB, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP. P120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2009. doi:10.1091/mbc.E08-07-0735
163. Zondag GCM, Reynolds AB, Moolenaar WH. Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTP μ binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn). *J Biol Chem*. 2000. doi:10.1074/jbc.275.15.11264
164. Klompstra D, Anderson DC, Yeh JY, Zilberman Y, Nance J. An instructive role for *C. elegans* E-cadherin in translating cell contact cues into cortical polarity. *Nat Cell Biol*. 2015. doi:10.1038/ncb3168
165. Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. P120 catenin: An essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. ; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2
166. Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, et al. p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell*. 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.09.046
167. Chen X, Kojima SI, Borisy GG, Green KJ. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*. 2003. doi:10.1083/jcb.200305137
168. Franz CM, Ridley AJ. p120 Catenin associates with microtubules: Inverse relationship between microtubule binding and RHO GTPase regulation. *J Biol Chem*. 2004. doi:10.1074/jbc.M312812200
169. Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ. A Novel Interaction between Kinesin and p120 Modulates p120 Localization and Function. *J Biol Chem*. 2004. doi:10.1074/jbc.M310895200
170. Daniel JM, Reynolds AB. The Catenin p120 ctn Interacts with Kaiso, a Novel BTB/POZ Domain Zinc Finger Transcription Factor . *Mol Cell Biol*. 1999. doi:10.1128/mcb.19.5.3614
171. Daniel JM. The p120ctn-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2002. doi:10.1093/nar/gkf398
172. Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, et al. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional

repressor. *Genes Dev.* 2001. doi:10.1101/gad.198501

173. Hosking CR, Ulloa F, Hogan C, et al. The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. *Mol Biol Cell.* 2007. doi:10.1091/mbc.E06-10-0941
174. Lee M, Ji H, Furuta Y, Park J Il, McCrea PD. p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation. *J Cell Sci.* 2014. doi:10.1242/jcs.151944
175. Pieters T, Van Roy F, Van Hengel J. Functions of p120ctn isoforms in cell-cell adhesion and intracellular signaling. *Front Biosci.* 2012. doi:10.2741/4012
176. Aho S, Levänsuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J. Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002.
177. Van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, Van Roy F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. doi:10.1073/pnas.96.14.7980
178. Montonen O, Aho M, Uitto J, Aho S. Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms. *J Histochem Cytochem.* 2001. doi:10.1177/002215540104901202
179. Alemà S, Salvatore AM. p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.001
180. Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem.* 2006. doi:10.1074/jbc.R600027200
181. Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and β -catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 2005. doi:10.1074/jbc.M505568200
182. Reynolds AB, Carnahan RH. Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: Implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2004. doi:10.1016/j.semcdb.2004.09.003
183. Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene.* 2004. doi:10.1038/sj.onc.1208161
184. Hatzfeld M. The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol.*

2005. doi:10.1016/j.ejcb.2004.12.016

185. Daniel JM. Dancing in and out of the nucleus: p120ctn and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.052
186. Park J Il, Kim SW, Lyons JP, et al. Kaiso/p120-Catenin and TCF/ β -Catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell.* 2005. doi:10.1016/j.devcel.2005.04.010
187. Pozner A, Terooatea TW, Buck-Koehntop BA. Cell-specific Kaiso (ZBTB33) Regulation of Cell Cycle through Cyclin D1 and Cyclin E. *J Biol Chem.* 2016. doi:10.1074/jbc.M116.746370
188. Kim SW, Park J Il, Spring CM, et al. Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol.* 2004. doi:10.1038/ncb1191
189. Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, Daniel JM. The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the β -catenin/TCF target gene matrilysin. *Exp Cell Res.* 2005. doi:10.1016/j.yexcr.2005.01.007
190. De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R. Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development.* 2005. doi:10.1242/dev.01857
191. Jopling C, den Hertog J. Fyn/Yes and non-canonical Wnt signalling converge on RhoA in vertebrate gastrulation cell movements. *EMBO Rep.* 2005. doi:10.1038/sj.embor.7400386
192. Garriock RJ, D'Agostino SL, Pilcher KC, Krieg PA. Wnt11-R, a protein closely related to mammalian Wnt11, is required for heart morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol.* 2005. doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.013
193. Wang Y, Li YP, Paulson C, et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci - Landmark.* 2014. doi:10.2741/4214
194. Strutt D. Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development.* 2003. doi:10.1242/dev.00695
195. Tada M, Concha ML, Heisenberg CP. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol.* 2002. doi:10.1016/S1084-9521(02)00052-6

196. Rocznik-Ferguson A, Reynolds AB. Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci.* 2003. doi:10.1242/jcs.00724
197. Mayerle J, Friess H, Büchler MW, et al. Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120ctn in pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2003. doi:10.1053/gast.2003.50142
198. Kallakury BVS, Sheehan CE, Ross JS. Co-downregulation of cell adhesion proteins α - and β -catenins, p120CTN, e-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2001. doi:10.1053/hupa.2001.26463
199. Thoreson MA, Reynolds AB. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: Implications for tumor progression. *Differentiation.* 2002. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700911.x
200. Sarrió D, Pérez-Mies B, Hardisson D, et al. Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene.* 2004. doi:10.1038/sj.onc.1207439
201. Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am J Pathol.* 2004. doi:10.1016/S0002-9440(10)63783-2
202. Soubry A, Van Hengel J, Parthoens E, et al. Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2020
203. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Hayashi Y, Iba T, Takakura N. Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J Biochem.* 2017. doi:10.1093/jb/mvx001
204. Dominguez MG, Hughes VC, Pan L, et al. Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. doi:10.1073/pnas.0611510104
205. Shen J, Frye M, Lee BL, et al. Targeting VE-PTP activates TIE2 and stabilizes the ocular vasculature. *J Clin Invest.* 2014. doi:10.1172/JCI74527
206. Bäumer S, Keller L, Holtmann A, et al. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood.* 2006. doi:10.1182/blood-2006-01-0141

207. Goel S, Gupta N, Walcott BP, et al. Effects of vascular-endothelial protein tyrosine phosphatase inhibition on breast cancer vasculature and metastatic progression. *J Natl Cancer Inst.* 2013. doi:10.1093/jnci/djt164
208. Gong H, Rehman J, Tang H, et al. HIF2 α signaling inhibits adherens junctional disruption in acute lung injury. *J Clin Invest.* 2015. doi:10.1172/JCI77701
209. Vockel M, Vestweber D. How T cells trigger the dissociation of the endothelial receptor phosphatase VE-PTP from VE-cadherin. *Blood.* 2013. doi:10.1182/blood-2013-04-499228
210. Parsons JT. Focal adhesion kinase: The first ten years. *J Cell Sci.* 2003. doi:10.1242/jcs.00373
211. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci.* 2010. doi:10.1242/jcs.045112
212. Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009. doi:10.1007/s10555-008-9165-4
213. Zhao X, Peng X, Sun S, Park AYJ, Guan JL. Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *J Cell Biol.* 2010. doi:10.1083/jcb.200912094
214. Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2010. doi:10.1517/14728220903460340
215. Ward KK, Tancioni I, Lawson C, et al. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) activity prevents anchorage-independent ovarian carcinoma cell growth and tumor progression. *Clin Exp Metastasis.* 2013. doi:10.1007/s10585-012-9562-5
216. Haskell H, Natarajan M, Hecker TP, et al. Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors in vivo and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells. *Clin Cancer Res.* 2003.
217. Hess AR, Postovit LM, Margaryan N V., et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2172
218. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. EphA2: A determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic

target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 2004. doi:10.1038/sj.onc.1207247

219. Delgado-Bellido D, Fernández-Cortés M, Rodríguez MI, et al. VE-cadherin promotes vasculogenic mimicry by modulating kaiso-dependent gene expression. *Cell Death Differ*. 2018. doi:10.1038/s41418-018-0125-4
220. Wong BW, Kuchnio A, Bruning U, Carmeliet P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2013. doi:10.1016/j.tibs.2012.10.004
221. Huang M, Ke Y, Sun X, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is involved in the vasculogenic mimicry of glioma via hypoxia-inducible factor-1 α . *Oncol Rep*. 2014. doi:10.3892/or.2014.3454
222. Jin-lu M, Su-xia H, Qing Z, et al. Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.089
223. Tang NN, Zhu H, Zhang HJ, et al. HIF-1 α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2014. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17894
224. Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, Zhao X. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett*. 2007. doi:10.1016/j.canlet.2006.08.016
225. Misra RM, Bajaj MS, Kale VP. Vasculogenic Mimicry of HT1080 Tumour Cells In Vivo: Critical Role of HIF-1 α -Neuropilin-1 Axis. *PLoS One*. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050153
226. Zhao N, Sun BC, Sun T, et al. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol*. 2012. doi:10.1007/s12032-012-0245-5
227. Maes H, Van Eygen S, Krysko D V., et al. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton. *Cell Death Dis*. 2014. doi:10.1038/cddis.2014.94
228. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001. doi:10.1038/35094059
229. Khawar IA, Kim JH, Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. *J Control Release*. 2015. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.018

230. Casey SC, Amedei A, Aquilano K, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2015. doi:10.1016/j.semcancer.2015.02.007
231. Hendrix MJC, Seftor REB, Seftor EA, et al. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: Role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res.* 2002.
232. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Margaryan N V., Seftor REB, Hendrix MJC. The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med.* 2006. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00299.x
233. Kaessmeyer S, Bhoola K, Baltic S, Thompson P, Plendl J. Lung cancer neovascularisation: Cellular and molecular interaction between endothelial and lung cancer cells. *Immunobiology.* 2014. doi:10.1016/j.imbio.2013.11.004
234. Vartanian A, Karshieva S, Dombrovsky V, Belyavsky A. Melanoma educates mesenchymal stromal cells towards vasculogenic mimicry. *Oncol Lett.* 2016. doi:10.3892/ol.2016.4523
235. Comito G, Calvani M, Giannoni E, et al. HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2011. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.042
236. Zhang Y, Sun B, Zhao X, et al. Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2013. doi:10.1002/jso.23402
237. Wang M, Zhao X, Zhu D, et al. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017. doi:10.1186/s13046-017-0533-1
238. Bedal KB, Grassel S, Spanier G, Reichert TE, Bauer RJ. The NC11 domain of human collagen XVI induces vasculogenic mimicry in oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2015. doi:10.1093/carcin/bgv141
239. Rong X, Huang B, Qiu S, Li X, He L, Peng Y. Tumor-associated macrophages induce vasculogenic mimicry of glioblastoma multiforme through cyclooxygenase-2 activation. *Oncotarget.* 2016. doi:10.18632/oncotarget.6930
240. Hutchenreuther J, Vincent K, Norley C, et al. Activation of cancer-

associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol.* 2018. doi:10.1016/j.matbio.2018.06.003

241. Thijssen VLJL, Paulis YWJ, Nowak-Sliwinska P, et al. Targeting PDGF-mediated recruitment of pericytes blocks vascular mimicry and tumor growth. *J Pathol.* 2018. doi:10.1002/path.5152
242. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994. doi:10.1038/367645a0
243. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. doi:10.1073/pnas.0530291100
244. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004. doi:10.1038/nature03128
245. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
246. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1343
247. Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AKY. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp Mol Pathol.* 2015. doi:10.1016/j.yexmp.2015.02.002
248. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006. doi:10.1038/nature05236
249. Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell.* 2014. doi:10.1016/j.stem.2014.01.005
250. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010. doi:10.1038/nature09557
251. Su YJ, Chang YW, Lin WH, Liang CL, Lee JL. An aberrant nuclear localization of E-cadherin is a potent inhibitor of Wnt/ β -catenin-elicited promotion of the cancer stem cell phenotype. *Oncogenesis.* 2015. doi:10.1038/oncsis.2015.17

252. Wan F, Zhang S, Xie R, et al. The utility and limitations of neurosphere assay, cd133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain Pathol.* 2010. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00379.x
253. Lai CY, Schwartz BE, Hsu MY. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* 2012. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0624
254. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006. doi:10.1038/ncponc0403
255. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: A universal chemosensitization strategy for cancer? *Science (80-).* 2006. doi:10.1126/science.1125950
256. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin Cancer Res.* 2005.
257. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000.
258. Gasparini G, Longo R, Fanelli M, Teicher BA. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: Results, challenges, and open questions. *J Clin Oncol.* 2005. doi:10.1200/JCO.2005.10.022
259. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003. doi:10.1056/NEJMoa021491
260. Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine Kinase Inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Clinical Trials: Current Status and Future Directions. *Oncologist.* 2006. doi:10.1634/theoncologist.11-7-753
261. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer.* 2005. doi:10.1038/nrc1628
262. Zhao L, Marshall ES, Kelland LR, Baguley BC. Evidence for the involvement of p38 MAP kinase in the action of the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Invest New Drugs.* 2007. doi:10.1007/s10637-006-9029-0

263. Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Baryshnikov A, Lichinitser M. VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner. *Melanoma Res.* 2011. doi:10.1097/CMR.0b013e328343a237
264. Ju RJ, Zeng F, Liu L, et al. Destruction of vasculogenic mimicry channels by targeting epirubicin plus celecoxib liposomes in treatment of brain glioma. *Int J Nanomedicine.* 2016. doi:10.2147/IJN.S94467
265. Guo JQ, Zheng QH, Chen H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of VE-cadherin/EphA2/MMP9/MMP2 expression. *Int J Oncol.* 2014. doi:10.3892/ijo.2014.2500
266. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 2010. doi:10.1038/nature09624
267. W.J. Paulis Y, Dinnes D, M.M.B. Soetekouw P, et al. Imatinib Reduces the Vasculogenic Potential of Plastic Tumor Cells. *Curr Angiogenesis.* 2012. doi:10.2174/2211552811201010064
268. Zhang S, Li M, Gu Y, et al. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008. doi:10.1186/1756-9966-27-60
269. van der Schaft DWJ, Seftor REB, Seftor EA, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 2004. doi:10.1093/jnci/djh267
270. Liu Z, Li Y, Zhao W, Ma Y, Yang X. Demonstration of vasculogenic mimicry in astrocytomas and effects of Endostar on U251 cells. *Pathol Res Pract.* 2011. doi:10.1016/j.prp.2011.07.012
271. Su M, Feng YJ, Yao LQ, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry in vivo. *Int J Gynecol Cancer.* 2008. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.01034.x
272. Chen LX, He YJ, Zhao SZ, et al. Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by cucumin through downregulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model. *Cancer Biol Ther.* 2011. doi:10.4161/cbt.11.2.13842
273. Serwe A, Rudolph K, Anke T, Erkel G. Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. *Invest New Drugs.* 2012. doi:10.1007/s10637-011-9643-3

274. Huang MT, Wood AW, Newmark HL, et al. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*. 1983. doi:10.1093/carcin/4.12.1631
275. Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*. 2005. doi:10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f
276. Folberg R, Kadkol SHS, Frenkel S, et al. Authenticating cell lines in ophthalmic research laboratories. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008. doi:10.1167/iovs.08-2324
277. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951.
278. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. doi:10.1038/227680a0
279. Rockstroh M, Müller SA, Jende C, Kerzhner A, Von Bergen M, Tomm JM. Cell fractionation - An important tool for compartment proteomics. *J Integr OMICS*. 2011. doi:10.5584/jiomics.v1i1.52
280. Liu X, Fagotto F. A method to separate nuclear, cytosolic, and membrane-associated signaling molecules in cultured cells. *Sci Signal*. 2011. doi:10.1126/scisignal.2002373
281. Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci*. 1997.
282. Kapuscinski J. DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995. doi:10.3109/10520299509108199
283. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013. doi:10.1038/nbt.2647
284. Barde I, Salmon P, Trono D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Neurosci*. 2010. doi:10.1002/0471142301.ns0100s37
285. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018. doi:10.1038/s41580-018-0003-4
286. Wu HB, Yang S, Weng HY, et al. Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. *Autophagy*. 2017. doi:10.1080/15548627.2017.1336277
287. Hanks JH, Wallace RE. Relation of Oxygen and Temperature in the

Preservation of Tissues by Refrigeration. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949. doi:10.3181/00379727-71-17131

288. Golubovskaya VM, Nyberg C, Zheng M, et al. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the Y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J Med Chem.* 2008. doi:10.1021/jm800483v
289. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 2014. doi:10.1038/nrc3792
290. Infante JR, Camidge DR, Mileskin LR, et al. Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2012. doi:10.1200/JCO.2011.38.9346
291. McCrea PD, Maher MT, Gottardi CJ. Nuclear signaling from cadherin adhesion complexes. In: *Current Topics in Developmental Biology.* ; 2015. doi:10.1016/bs.ctdb.2014.11.018
292. He Y, Davies CM, Harrington BS, et al. CDCP1 enhances Wnt signaling in colorectal cancer promoting nuclear localization of β -catenin and E-cadherin. *Oncogene.* 2019. doi:10.1038/s41388-019-0983-3
293. Hamamoto T, Beppu T, Seto H. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics ii. structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo).* 1983. doi:10.7164/antibiotics.36.646
294. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, et al. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res.* 1998. doi:10.1006/excr.1998.4136
295. Hong JY, Oh IH, McCrea PD. Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.008
296. Daniel JM, Ireton RC, Reynolds AB. Monoclonal antibodies to Kaiso: A novel transcription factor and p120ctn-binding protein. *Hybridoma.* 2001. doi:10.1089/027245701750293484
297. Van Roy FM, McCrea PD. A role for kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer.* 2005. doi:10.1038/nrc1752
298. del Valle-Perez B, Casagolda D, Lugalde E, et al. Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1 ϵ -dependent phosphorylation of p120-catenin. *J Cell Sci.* 2011. doi:10.1242/jcs.082693

299. Leach L, Clark P, Lampugnani MG, Arroyo AG, Dejana E, Firth JA. Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci.* 1993.
300. Morini MF, Giampietro C, Corada M, et al. VE-cadherin-mediated epigenetic regulation of endothelial gene expression. *Circ Res.* 2018. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312392
301. Carota IA, Kenig-Kozlovsky Y, Onay T, et al. Targeting VE-PTP phosphatase protects the kidney from diabetic injury. *J Exp Med.* 2019. doi:10.1084/jem.20180009
302. Spiliopoulos K, Peschos D, Batistatou A, Ntountas I, Agnantis N, Kitsos G. Vasculogenic mimicry: Lessons from melanocytic tumors. *In Vivo (Brooklyn).* 2015.
303. Ouko L, Ziegler TR, Gu LH, Eisenberg LM, Yang VW. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004. doi:10.1074/jbc.M402877200
304. Mori H, Yao Y, Learman BS, et al. Induction of WNT11 by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α regulates cell proliferation, migration and invasion. *Sci Rep.* 2016. doi:10.1038/srep21520
305. Zhang T, Nanney LB, Luongo C, et al. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 1997.
306. Juettner V V., Kruse K, Dan A, et al. VE-PTP stabilizes VE-cadherin junctions and the endothelial barrier via a phosphatase-independent mechanism. *J Cell Biol.* 2019. doi:10.1083/jcb.201807210

ANEXOS

IX. ANEXOS

Glosario de abreviaturas

αSMA	α -smooth muscle actin
36B4	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
ABCB5	ATP-binding cassette sub-family B member 5
ADN	Acido dexosiribonucleico
ADAMTS1	Metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
AKB-9978	VE-PTP inhibitor
AktR	AC-alpha serine/threonine-protein kinase
ANGPT 1/2	Angiopoyetinas 1/2
ARN	Acido ribonucleico
ATG	Autophagy Related Protein
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BNIP-3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BTB/POZ	BR-C, tkk and bab/ Poxvirus and Zinc finger protein
BSA	Bovine Serum Albumin
C-Fos	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
CAF	Cancer-associated fibroblast
CCN2	Connective tissue growth factor
CCND1	Cyclin D1
CTNND1	Catenin delta-1
CD31/PECAM-1	Plateled endothelial cell adhesion molecule
CD34	Sialomucin protein
CD106/VCAM-1	Vascular cell adhesion protein-1
CD133	Prominin-1
CDH5/VE-Cad	Vascular endothelial cadherin
CDKN2A	Cyclin-dependent kinaseinhibitor 2A
CK1	Casein kinase 1
COL4A2	Colágeno IV α 2
CoREST	REST corepressor 1
COX2	Cyclooxygenase 2

CSCs	Cancer stem cells
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRM1	Chromosomal maintenance 1
C-Kit	Proto-oncogene c-KIT/CD117
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEP1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta
DEC	Dominio extracelular
DTM	Dominio transmembrana
EDG1	Endothelial differentiation gene 1
EDF1	Endothelial differentiation-related factor 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENG	Endoglin
eNOS	Endothelial NOS
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium-2
ESM1	Endothelial cell-specific molecule 1
ET-1	Endothelin 1
Ezh2	Enhancer of zeste homolog 2
FBS	Fetal bovine serum
FBN1	Fibrillin-1
FAK	Focal adhesion kinase
FLT-1	Fms Related Tyrosine Kinase 1
FLT-3	Fms like tyrosine kinase 3
Flk-1/KDR	Fetal Liver Kinase 1/ Kinase insert domain receptor
FRNK	Focal adhesion kinase (FAK)-related nonkinase
GENT	Gene Expression across Normal and Tumor tissue
GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G
GFP	Green fluorescent protein
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GLIS2	GLIS family zinc finger 2
GTP	Guanosine triphosphate

HLMVEC	Human Lung Microvascular Endothelial Cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish peroxidase
KBS	Kaiso binding sites
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMC2	Laminin subunit gamma-2
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LOXL2	Lysyl oxidase homolog 2
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MLANA	Melanoma antigen recognized by T cells 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MYC	Proto-oncogene, bHLH transcription factor
NES	Nuclear export signal
NLS	Nuclear localization sequence
NRP-1	Neuropilin-1
NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxyethano
PAS	Periodic acid–Schiff
PBS	Phosphate-buffered saline
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerases
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAK	Serine/threonine-protein kinase
PDGF-B	Platelet-derived growth factor subunit B
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PKC	Protein kinase C
POZ-ZF	Poxvirus and Zinc finger protein
PTK2	Protein tyrosine kinase 2
PMSD5	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase, 5

PVDF	Polyvinylidene fluoride
REST	RE1-Silencing Transcription factor
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RPTP	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase
RAF	Serine/threonine-specific protein kinases
RET	RET proto-oncogene/receptor tyrosine kinase
RPL30	Ribosomal protein L30
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SELE	E-selectin
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SRC	Proto-oncogene tyrosine- <i>protein</i> kinase
TAM	Tumor-associated macrophages
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TIE	Tyrosine-protein kinase receptor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1
Vav2	Guanine nucleotide exchange factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VE-PTP	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta
WNT	Drosophila gene wingless/ proto-oncogene integration-1
ZBTB33	Zinc Finger and BTB Domain Containing 33/Kaiso

