



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
Biología Experimental

Modulación de la vía de NF kappa B por Neuropilina 1 en células de cáncer de próstata.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Biól. KARLA MAGNOLIA SUAREZ SANCHEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. VILMA MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **Dra. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

.....h\ o8k°) \ -V #@V#@o" @ O 8@° o

COMITÉ TUTOR: **Dr. MARIANO MARTÍNEZ VELÁZQUEZ**
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
Biología Experimental

**Modulación de la vía de NF kappa B por Neuropilina 1 en células de cáncer de
próstata.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Biól. KARLA MAGNOLIA SUAREZ SANCHEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. VILMA MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

COMITÉ TUTOR: Dr. MARIANO MARTÍNEZ VELÁZQUEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de agosto de 2013, se le ratificó el jurado que se le había asignado en una sesión similar pero con fecha de 11 de marzo del presente año. Para la presentación de su examen para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna SUÁREZ SÁNCHEZ KARLA MAGNOLIA con número de cuenta 99324122 con la tesis titulada "MODULACIÓN DE LA VÍA NF KAPPA B POR NEUROFILINA - 1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA", realizada bajo la dirección de la DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS:

Presidente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DR. MARIO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Suplente: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Suplente: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de enero de 2014

María del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM y al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A CONACYT por el apoyo económico brindado (344933).

A mi asesora la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, que gracias a su confianza orientación y apoyo incondicional, logramos concluir este trabajo de forma satisfactoria

A los miembros del Comité Tutor, Dra. Patricia García López, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Gonzalo Castillo Rojas y Dra. Erika Rendón Huerta, que gracias a sus observaciones que enriquecieron este trabajo, prontitud, disponibilidad y amabilidad, se pudo facilitar todo este proceso.

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Histología y patología de la próstata.....	10
Factor Nuclear kappa B (NFkB).....	13
NFkB y cáncer.....	17
NFkB y cáncer de próstata	20
Neuropilinas	23
Neuropilinas y cáncer.....	28
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS.....	34
ANTECEDENTES.....	35
METODOLOGIA.....	36
Plásmidos.....	36
usados.....	36
Purificación de DNA plasmídico.....	37
Transformación de bacterias supercompetentes.....	38
Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Cuantificación del DNA.....	38
Cultivo Celular.....	38
Transfección estable de células.....	39
Extracción de RNA.....	39
Análisis de expresión genética por RT-PCR.....	40
Citometría de flujo.....	41
RESULTADOS.....	41
Análisis de la expresión de Neuropilinas endógenas.....	41
Sobreexpresión de NIK.....	42
Efecto de la sobreexpresión de NIK en la expresión de Neuropilinas.....	44
Inhibición de NIK.....	44
Efecto de la inhibición de NIK sobre la expresión de Neuropilinas.....	45
Inhibición de la vía canónica de NFkB.....	46
Efecto de la inhibición de la vía canónica de NFkB en la expresión de Neuropilinas.....	47

DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53

RESUMEN.

El factor nuclear κ B (NF κ B) es considerado el mediador central del proceso inflamatorio y una pieza clave en la respuesta inmune innata y adaptativa. Recientemente se ha demostrado la importancia de la señalización de este factor en el desarrollo del cáncer. La activación de NF κ B es frecuente en los carcinomas, debida principalmente a las citoquinas inflamatorias en el microambiente tumoral. Es importante destacar, que en todos los tumores malignos, NF κ B actúa de una manera específica del tipo celular: mediante la activación de genes de supervivencia en las células de cáncer y genes promotores de la inflamación en los componentes del microambiente tumoral. Las Neuropilinas comprenden dos receptores homólogos ampliamente expresados en la membrana plasmática (NRP1 y NRP2). Los datos preclínicos sugieren que el bloqueo de NRP1 suprime el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis, además de inhibir directamente la proliferación de células tumorales en ciertos modelos. Evidencias recientes sugieren, además, un papel de las neuropilinas en la progresión del cáncer, debido a su interacción con los receptores de tirosina quinasas, moléculas de adhesión, e integrinas. Estos y otros datos ponen de manifiesto que las neuropilinas constituyen plataformas de señalización en la superficie celular, potencialmente capaces de regular a las células cancerosas, así como a las células del microambiente del tumor. Existen evidencias de que estas dos vías están relacionadas en diversos tipos de cáncer. Curiosamente, los datos clínico-patológicos a menudo demuestran una correlación entre el aumento de la expresión de neuropilinas y de la activación de NF κ B, con estadios avanzados del tumor y un mal pronóstico. En este estudio, se investigó el efecto del silenciamiento génico de NIK, así como su sobreexpresión, en la expresión de NRP1 y sNRP en células de cáncer de próstata PC3. La expresión de ARNm se determinó por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT - PCR). Los niveles de proteína de NRP1 se determinaron por citometría de flujo. En las células con NIK inhibido la expresión de sNRP se atenuó marcadamente, acompañada por la regulación al alza de NRP1 membranar. Caso contrario, en las células con una activación forzada de NIK, se observó un incremento de la expresión de las isoformas solubles y un decremento de expresión de la isoforma membranar de NRP1. A partir de estos resultados, se concluyó que en la línea celular de cáncer de próstata PC3, NF κ B participa en la modulación a la baja de la expresión de NRP1.

ABSTRACT.

The nuclear factor- κ B (NF κ B) transcription factor family has been considered the central mediator of the inflammatory process and a key participant in innate and adaptive immune responses. It is only recently that the full importance of nuclear factor- κ B signalling to cancer development has been understood. NF κ B activation is also prevalent in carcinomas, in which NF κ B activation is mainly driven by inflammatory cytokines within the tumor microenvironment. Importantly, however, in all malignancies, NF κ B acts in a cell type-specific manner: activating survival genes within cancer cells and inflammation-promoting genes in components of the tumor microenvironment. Yet, the complex biological functions of NF κ B have made its therapeutic targeting a challenge. Neuropilins comprise two homologous widely-expressed single-pass plasma membrane receptors (NRP1 and NRP2). Neuropilin-1 is a co-receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF). Preclinical data suggest that blockade of NRP1 suppresses tumour growth by inhibiting angiogenesis, in addition to directly inhibiting tumour cell proliferation in certain models. Recent evidence further suggests a role of neuropilins in cancer progression due to their interaction with receptor tyrosine kinases, adhesion molecules, and integrins. Altogether, these data seem to qualify neuropilins as signaling platforms on the cell surface, potentially capable of regulating cancer cells, as well as cells of the tumor microenvironment. There is evidence that these two channels are connected in various cancers. Intriguingly, clinical-pathological data often indicate a correlation between increased expression of neuropilins and NF κ B activation, advanced stage tumors with poor prognosis. To further investigate the relationship, we have built by overexpressing NIK in PC3 cells and inhibiting it by shRNA. Cultured PC3 were transduced with overexpression or shRNA and harvested for analysing NRP1 level by RT-PCR and flow cytometry. In NIK inhibited cells, the expression of sNRP was markedly attenuated, accompanied by the upregulation of NRP1. Otherwise, forced activation of NIK, promotes an increase of the expression of soluble isoforms and decreased NRP1 expression was observed. From these results, it was concluded that the prostate cancer PC3 cell line, NF κ B is involved in the down modulates of the expression of NRP1.

INTRODUCCIÓN.

HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LA PRÓSTATA.

La próstata es una glándula exocrina que forma parte del tracto reproductivo masculino en mamíferos. Aunque está presente en muchas especies de mamíferos, la morfología y los productos secretados de la próstata varían ampliamente. La próstata humana está constituida por varios componentes, tanto glandulares como no glandulares⁽¹⁾. El tejido no glandular de la próstata se concentra anteromedialmente y es el principal responsable de la convexidad anterior del órgano, mientras que el contorno de la próstata glandular rodea de forma parcial el tejido no glandular, dando lugar a cuatro regiones distintas, cada una de las cuales proviene de un segmento diferente de la uretra prostática. La uretra es por lo tanto un punto de referencia anatómico primario⁽²⁾ (Figura 1).

Desde el punto de vista anatómico, la próstata puede diferenciarse en cuatro zonas: la zona periférica, central, de transición y la zona anterior.

- La zona periférica comprende aproximadamente el 70% de la masa de la próstata glandular normal. Es la región más susceptible a la inflamación y el punto de origen de la mayor parte de carcinomas, aunque algunos surgen en la zona de transición⁽²⁾.
- La zona anterior se ubica delante de la uretra, es fibromuscular y no presenta elementos glandulares⁽²⁾.
- La zona de transición se compone de dos pequeños lóbulos independientes y rodea a la uretra posterior con un 5% del volumen glandular, es en esta zona donde la hiperplasia prostática benigna ocurre casi de manera exclusiva⁽²⁾.
- La zona central, cruzada por los conductos eyaculadores, comprende aproximadamente el 20 % de la masa de la próstata glandular. Esta zona es bastante resistente tanto a carcinoma como a inflamación.⁽³⁾

En el epitelio prostático se pueden distinguir tres tipos celulares según sus características morfológicas, su función y su relevancia para la carcinogénesis. El tipo celular epitelial luminal es andrógeno dependiente, produce proteínas secretoras como el antígeno específico prostático (PSA) y expresa el receptor de andrógenos (RA). El segundo tipo corresponde a las células basales, que forman una capa continua y no producen proteínas secretoras prostáticas⁽⁴⁾, pero expresan factores que protegen del daño al DNA, tales como la proteína de defensa antioxidante Glutatió-S-

Transferasa (GST) y el gen anti apoptótico Bcl-2. El tercer tipo celular es el neuroendócrino, es independiente de andrógenos y su acumulación en la capa basal es una característica del cáncer de próstata. ⁽⁵⁾

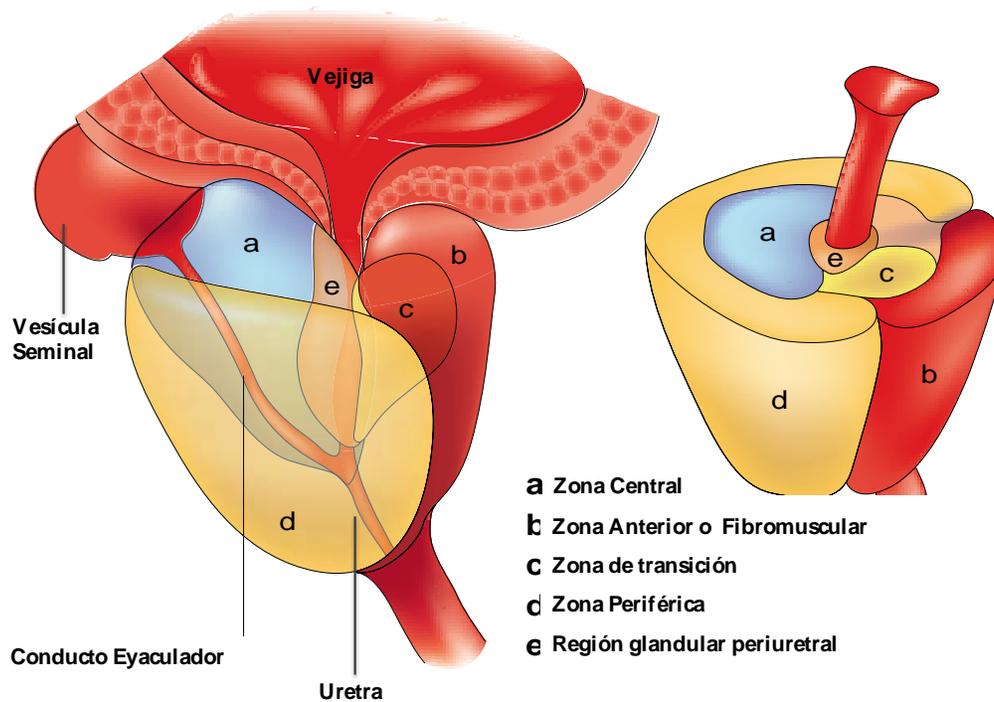


Figura 1. Anatomía Zonal de la próstata Humana. Como se ha indicado, cada zona alberga secciones distintas de la uretra prostática. La zona central, donde pocas enfermedades se desarrollan, alberga el conducto de la vesícula seminal. La zona periférica, el principal sitio donde ocurren lesiones precancerosas y cancerosas, alberga la uretra peneana. La zona de transición es el único sitio donde ocurre la hiperplasia benigna prostática. Imagen modificada de De Marzo *et al.*, 2007

El cáncer de próstata (CaP) es una neoplasia maligna que se presenta usualmente en edades avanzadas. Es el segundo tipo de neoplasia maligna más frecuente y la sexta causa de muerte por cáncer, representando el 14% (903.500) del total de nuevos casos de cáncer y 6% (258,400) del total de muertes por cáncer en hombres, a nivel mundial ⁽⁶⁾. En México, en el 2011, el CaP ocupó el primer lugar en cuanto a mayor número de muertes asociadas a neoplasias malignas en varones adultos ocupando un 16.9% ⁽⁷⁾. Es un cáncer que predomina en el adulto mayor, con el 75% de casos nuevos diagnosticados en pacientes mayores de 65 años.

Al igual que en otros tipos de cáncer, el cáncer de próstata se desarrolla a través de la acumulación de modificaciones tanto genéticas como epigenéticas y mutaciones en elementos implicados en el control del crecimiento celular normal y la homeostasis tisular, resultando en la

inactivación de genes supresores de tumores y en la activación de oncogenes, lo que conlleva a la transformación maligna de las células precursoras cancerosas. También existen evidencias de una inestabilidad genética subyacente que pudiera facilitar la progresión del tumor.

No se han detectado con exactitud las causas que originan el CaP, sin embargo, la patogénesis refleja tanto componentes hereditarios como ambientales. Hasta ahora se considera una enfermedad multifactorial y los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo del cáncer de próstata son la edad avanzada, antecedentes familiares, raza, factores dietéticos y factores hormonales (apoyado por la presencia de receptores esteroides en las células tumorales y la respuesta positiva a la supresión de los andrógenos, así como a los altos niveles de Dihidrotestosterona en las células cancerosas) ⁽⁸⁾.

Además, algunos factores producidos en el microambiente tumoral, extrínsecos a las células malignas, contribuyen al desarrollo y progresión tumoral. En numerosos tipos de cáncer el microambiente en torno a las células malignas es inflamatorio por naturaleza, lo que expresa una clara relación entre inflamación y cáncer ⁽⁹⁾. Aproximadamente el 20% de todos los cánceres humanos en los adultos resultan de estados inflamatorios crónicos, que se desencadenan por agentes infecciosos o la exposición a otros factores ambientales, o por una combinación de los mismos. A la vista de la elevada incidencia de la malignidad prostática y la frecuente presencia de signos de inflamación en la próstata, es claro que la inflamación recurrente o crónica contribuye al desarrollo de la enfermedad ⁽¹⁰⁾.

La inflamación es un proceso muy complejo, que implica cientos de genes. Por lo tanto, son muchos los genes en las vías inflamatorias que podrían contribuir al desarrollo de CaP.

El factor nuclear kappa B (NFkB) desempeña una función central en la inflamación y promueve la expresión de genes implicados en algunos aspectos del cáncer como supervivencia, proliferación y control del ciclo celular, angiogénesis e invasividad. Por tanto, NFkB podría proporcionar un nexo entre inflamación y cáncer, como componente clave de vías de señalización extracelular desencadenadas por agentes infecciosos, citocinas proinflamatorias (IL-1 o TNF-alpha), factores de crecimiento y señales de "peligro" liberadas por células necróticas ⁽¹¹⁾.

La activación de NFkB es frecuente en los carcinomas, debida principalmente a citoquinas inflamatorias presentes en el microambiente tumoral. Es importante destacar, sin embargo, que en todos los tumores malignos, NFkB actúa de una manera específica dependiendo del tejido y tipo

celular, por ejemplo, en CaP activa genes de supervivencia y genes que promueven la inflamación en los componentes del microambiente del tumor ⁽¹²⁾.

FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NFkB).

El factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) fue descubierto como modulador de la transcripción de la cadena ligera de las inmunoglobulinas en los linfocitos B. Estudios posteriores demostraron que NFkB es un factor dimérico de transcripción nuclear y expresión ubicua, implicado en la regulación de diversos procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis.

NFkB comprende una familia génica cuyos miembros comparten dominio de homología a Rel (REI Homology Domain [RHD]). En mamíferos, NFkB está constituida por cinco miembros: NFkB1 (p50/p105), NFkB2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel y RelB (Figura 2). NFkB1 y NFkB2 se sintetizan como moléculas precursoras, p105 y p100 respectivamente, las cuales, sufren un procesamiento proteolítico, dan lugar a las formas maduras p50 y p52. Los factores de transcripción NFkB funcionales son dímeros formados por prácticamente cualquier combinación de los cinco miembros de la familia. Referente a su estructura todos los miembros de la familia NFkB presentan un dominio N terminal común llamado RHD de unión a DNA. Este dominio está formado por 300 aminoácidos y es responsable de la dimerización entre los distintos miembros de la familia, de la asociación con el inhibidor IκB, y también en este dominio se encuentran las secuencias de localización nuclear NLS (del inglés Nuclear Localization Sequence). Solo p65, c-Rel y Rel B, pero no p50 y p52, poseen el dominio C-terminal de transactivación TAD. Por tanto, solamente los dímeros p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65 y p65/c-Rel son transcripcionalmente activos, mientras que los homodímeros de p50 y p52 actúan como represores de la transcripción ⁽¹³⁾.

NFkB es regulado por un gran número de estímulos y participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos mediante el control de la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión o receptores inmunológicos. De entre ellos destacan la inmunidad, la inflamación y el desarrollo de diversos tejidos ⁽¹⁴⁾.

Los dímeros de NFkB se encuentran predominantemente retenidos en el citoplasma formando un complejo con proteínas inhibitoras de la familia IκB. Por lo tanto, estas proteínas mantienen la vía NFkB inactiva. No obstante, después de un estímulo adecuado, las proteínas IκB son fosforiladas, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo así la liberación de

NFκB que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes diana. La unión de las proteínas IκB con los dímeros de NFκB, oculta una de las dos secuencias NLS, por ello, el dímero debe primero disociarse del inhibidor IκB para alcanzar su destino nuclear. Dependiendo del estímulo, diferentes proteínas señalizan desde la membrana citoplasmática hacia el núcleo. Además, se ha observado que noxas como el estrés genotóxico, el daño en el DNA y estrés oxidativo desencadenan vías de señalización que van desde el núcleo hacia el citoplasma y que comprometen al complejo de activación de NFκB (15).

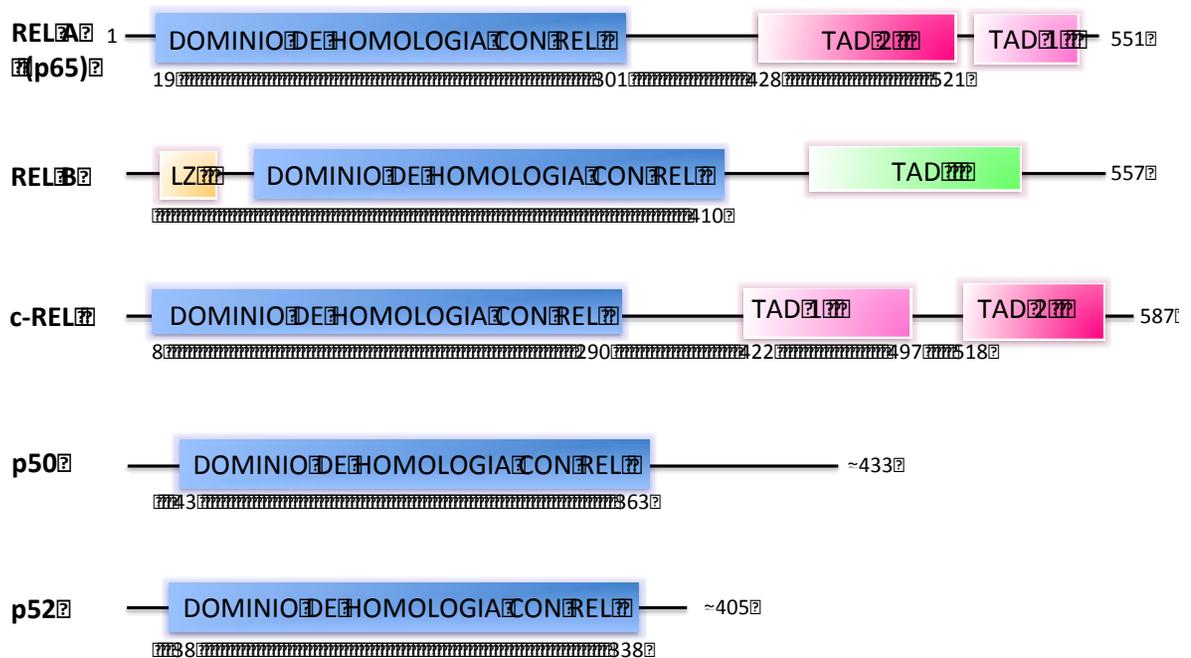


Figura 2. Subunidades de NFκB. El término factor nuclear kappa B (NFκB) describe colectivamente los diversos homodímeros y heterodímeros que se pueden formar a partir de las cinco subunidades de NF-κB en mamíferos. Todos ellos comparten un dominio de dimerización y de unión al ADN de aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, que se denomina dominio de homología a REL (RHD). RELA, RELB y c-REL contienen dominios de transactivación carboxi-terminales (TAD), y RELB tiene un dominio amino-terminal de leucinas (LZ). p52 y p50 derivan de la proteólisis de sus proteínas precursoras p100 y p105, respectivamente (no se muestra). Imagen modificada de Neil D. Perkins 2012.

Se han descrito mecanismos distintos de activación de la vía de NFκB (Figura 3):

1) La vía canónica (clásica) es la forma más común de activación en todos los tipos celulares. Básicamente, esta vía se activa en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como TNFα, IL-1, moléculas asociadas a patógenos (también llamadas PAMP, por "pathogen associated molecular patterns"), receptores de antígenos, etc. En esta vía los IκB son fosforilados en las Ser32 y Ser36 por

el complejo IKK α/β , que incluye a la proteína adaptadora NEMO (NFkB *essential modifier*, o IKK γ), induciéndose su poliubiquitinación y su posterior degradación por la vía del proteasoma. NFkB quedará así libre y translocará al núcleo por interacción con importinas mediante su secuencia de localización nuclear. El equilibrio inicial se restablece rápidamente, debido a que uno de los genes que NFkB regula son los propios I κ B, que al ser sintetizados de nuevo, entrarán en el núcleo y secuestrarán los NFkB, llevándolos de nuevo al citoplasma mediante exportinas como Crm1. En la vía clásica NFkB es principalmente un heterodímero que contiene RelA y p50 ⁽¹⁶⁾.

La vía clásica está asociada a un incremento en la transcripción de citoquinas (IL6, IL12 β , IL-1 β , TNF α), quimiocinas (IL8, RANTES), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina), enzimas productoras de mediadores inflamatorios (iNOS, COX2) e inhibidores de apoptosis. Éstos son componentes importantes de la respuesta inmunitaria innata a la invasión por microorganismos y se requieren para la migración de células inflamatorias y fagocíticas a los tejidos donde NF- κ B se ha activado por una infección o una herida ⁽¹⁷⁾.

2) La vía no canónica (alternativa), también conocida como I κ B independiente, se caracteriza por la activación del heterodímero RelB/p52 y es inducida por un número limitado de estímulos, como diversas citoquinas de la familia del TNF (linfotóxina- β y CD40L, entre otros), factor activador de células B (BAFF), etc. La activación de la vía no canónica de NFkB depende de la activación de homodímeros de IKK α a través de la proteína NIK (NFkB *inducing kinase*). NIK al activarse fosforila el complejo de IKK α , el cual por su parte es el responsable de la fosforilación de p100, que tras un procesamiento en el proteosoma da lugar a la forma activa, p52. La forma madura de p52 se une a RelB provocando su translocación nuclear y la respuesta génica ⁽¹⁸⁾.

La vía alternativa de activación de NFkB está relacionada con la maduración y supervivencia de los linfocitos B, participando así en la inmunidad adaptativa ⁽¹⁹⁾, osteoclastogénesis ⁽²⁰⁾, el desarrollo de órganos linfoides y la regulación del ciclo celular ⁽²¹⁾.

Se ha visto que las dos vías pueden ser solapantes, produciendo activaciones de genes más prolongadas. La vía clásica presenta una respuesta rápida a estímulos, mientras que la alternativa presenta una activación más retardada. De esta forma, estímulos como la linfotóxina- β , que puede activar las dos rutas, inducen de forma sostenida genes que dependen del heterodímero RelB/p52, al presentar éste una cinética de activación más lenta ⁽²²⁾.

NFκB puede regular transcripcionalmente una gran variedad de genes. En circunstancias normales, estos genes reprograman integralmente el patrón de expresión génica de una célula para hacer frente a una amenaza para el organismo. Los blancos de NFκB son genes que codifican proteínas y microRNAs (miRNAs) que regulan una amplia gama de efectos biológicos. Estos incluyen citocinas, quimiocinas y sus respectivos receptores, que son asociados tradicionalmente con el papel central de NFκB en la respuesta inflamatoria, junto con los genes que regulan la supervivencia celular, la proliferación, la adhesión celular y el microambiente celular ⁽²³⁾. El resultado de la activación de NFκB, en términos de los efectos sobre la expresión génica, variará dependiendo del tipo de tejido o célula. Aunque los genes diana de NFκB pueden ser similares entre células normales y cancerosas, su regulación puede ser diferente. Por ejemplo, los blancos de NFκB en células tumorales, pueden mostrar una inducción sostenida (o represión) de su expresión, que resulta en la pérdida de mecanismos de control de retroalimentación negativa ⁽²⁴⁾.

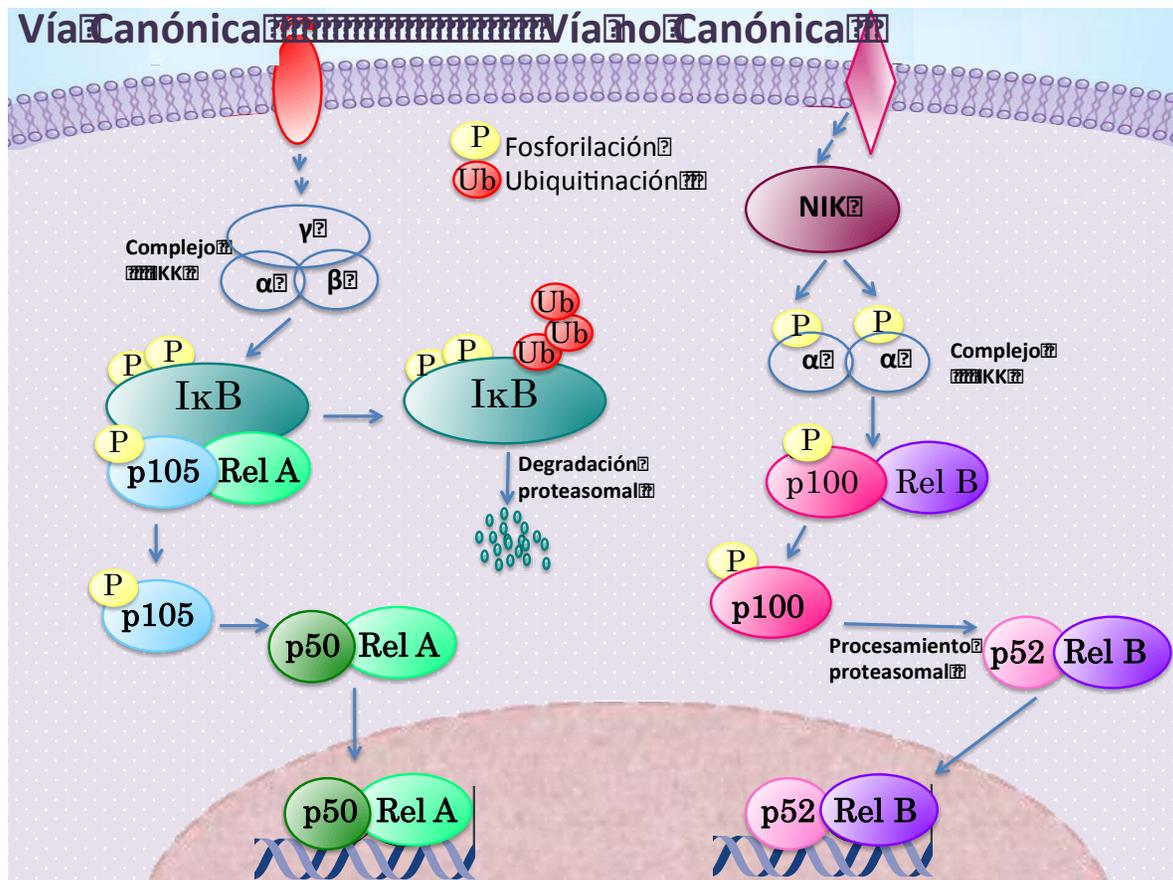


Figura 3. Activación de la vía canónica y no canónica de NFκB.

Llama la atención cómo las consecuencias funcionales de la activación anómala de NFκB se correlacionan con los marcadores del cáncer (figura 4). Esto incluye la capacidad para promover la

supervivencia de células cancerosas mediante la inducción de la expresión de genes anti-apoptóticos; inducción de la proliferación celular mediante la expresión de ciclinas y proto-oncogenes, la promoción de la metástasis mediante la regulación de la expresión de metaloproteinasas de la matriz y genes de adhesión celular; y la estimulación de la angiogénesis por la regulación de genes asociados con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos ⁽²⁵⁾. Por otra parte, NFκB puede ayudar a promover un cambio metabólico en las células de cáncer favoreciendo la vía glucolítica sobre la fosforilación oxidativa (efecto Warburg), mediante la inducción de la expresión de enzimas glicolíticas, así como, la represión de la expresión de genes mitocondriales ⁽²⁶⁾. La capacidad de la vía de IKK-NFκB para inducir la inflamación denota que es un componente crucial en el enlace entre las condiciones inflamatorias crónicas y cáncer. En efecto, hay un reconocimiento creciente del papel que la inflamación tiene en muchos tipos de cáncer y la importancia del papel de NFκB que en combinación con otras proteínas como el activador de la transcripción 3 (STAT3), como factor transcripcional de promoción tumoral. En este contexto, NFκB funciona como un promotor tumoral y no se limita a los efectos intrínsecos dentro de las células tumorales, NFκB también influye en la función de la infiltración de linfocitos y macrófagos ⁽²⁷⁾.

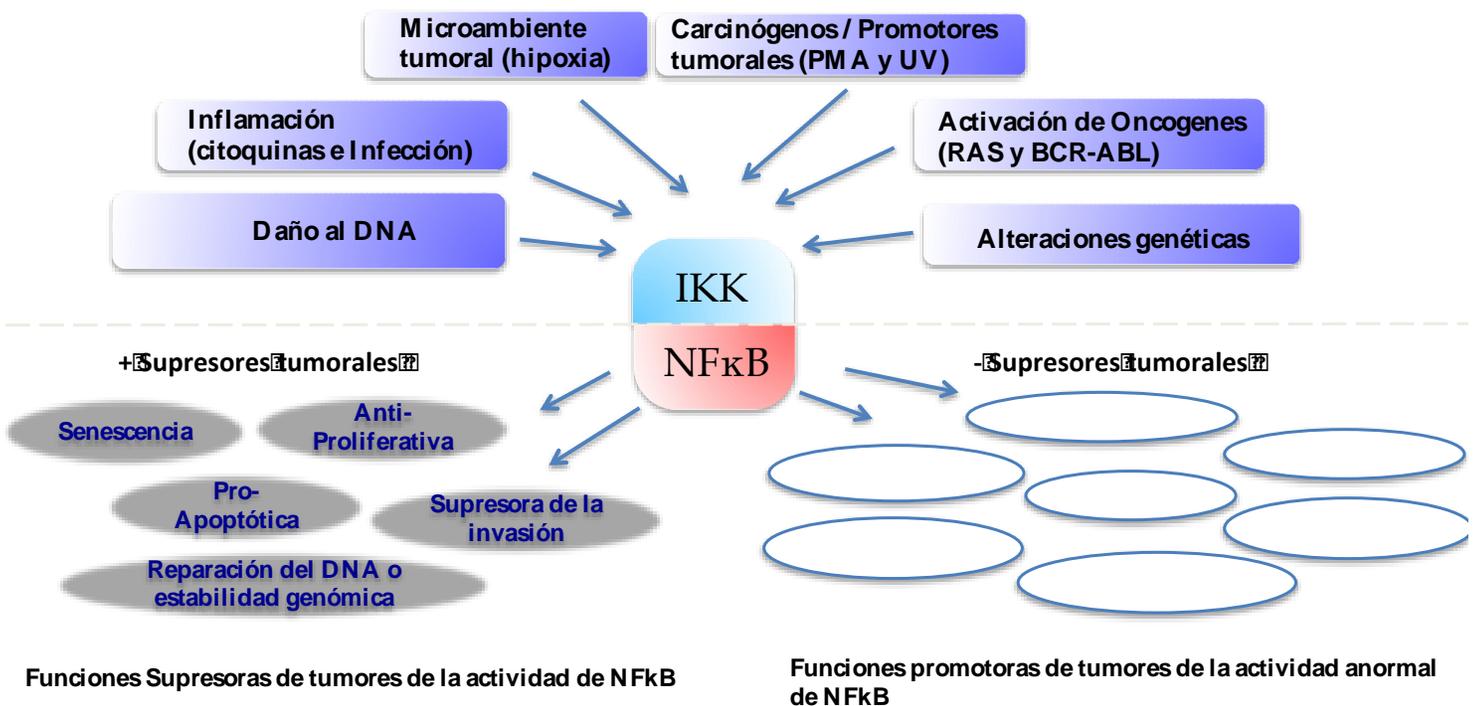


Figura 4. Consecuencias de la activación de NFκB. Imagen modificada de Neil D. Perkins, 2010

NFκB Y CANCER.

En un estado homeostático, una respuesta de NFκB es automáticamente autolimitada, a través de la inducción de ciclos de retroalimentación negativa. Estos incluyen la transcripción de NFKBIA (codifica IκBα) y NFKBIE (codifica IκBε), junto con genes que codifican proteínas que regulan negativamente las vías de señalización que conducen a la activación de IKK ⁽²⁸⁾. La actividad desregulada de NFκB en cáncer, puede ocurrir ya sea a través de mutaciones que conducen a los altos niveles intrínsecos de señalización IKK-NFκB dentro de las células tumorales o por la exposición continua de estímulos activadores de NFκB, tales como la liberación de citoquinas por macrófagos asociados al tumor (TAMs). La lista de tipos de tumores que muestran una actividad aberrante de NFκB es extensa e incluye muchos tumores sólidos, así como leucemias y linfomas. Como NFκB también es inducido por muchas drogas quimioterapéuticas comunes en cáncer, la actividad de NFκB potencialmente puede regular la supervivencia y la malignidad de la mayoría, si no todos, los tumores ⁽²⁹⁾.

Las mutaciones genéticas que conducen a la activación anómala de NFκB en los tumores por lo general pueden ser de dos tipos. Oncogenes como HRAS o BCR-ABL1, junto con reguladores positivos, como NIK, sufren mutaciones con ganancia de función que llevan a la continua señalización del complejo IKK. Alternativamente, las mutaciones que afectan a reguladores negativos tales como CYLD o A20 conducen a un fracaso en la regulación de NFκB ⁽³⁰⁾.

La exposición variada de las células cancerosas a múltiples estímulos inductores de NFκB, incluyendo citoquinas inflamatorias, hipoxia, daño al ADN y otros efectos río abajo en la señalización oncogénica, hace que la actividad de NFκB no sea uniforme a lo largo de un tumor dado. Por lo tanto, distintos objetivos génicos tienen el potencial de ser inducidos o reprimidos en función del contexto del tumor, probablemente como consecuencia de diferentes mutaciones postraduccionales (PTMs), así como co-activadores y represores ⁽³¹⁾.

La actividad de NFκB se integra con múltiples vías de supresores tumorales, y el antagonismo con los supresores tumorales puede contribuir en parte a la actividad promotora del tumor de las subunidades de NFκB ⁽³²⁾. Por ejemplo, NFκB puede inhibir la actividad de p53 a través de la competencia por las proteínas coactivadoras p300 y CBP ⁽³³⁾ y puede inducir

transcripcionalmente la expresión de MDM2 ⁽³⁴⁾. Sin embargo, los supresores de tumores conocidos, tales como p53, ARF, INK4A, PTEN, etc., también pueden regular a NFκB. Ya sea por interacciones directas o afectando PTMs, los supresores tumorales regulan la actividad transcripcional de NFκB y pueden, por ejemplo, suprimir su capacidad para inducir la expresión de genes que están asociados con el crecimiento del tumor y la supervivencia. Por otra parte, p53 puede evitar la localización mitocondrial de Rel A y la inhibición de la fosforilación oxidativa. Rel A se requiere para la expresión de la proteína p53 en inanición de glucosa, lo que permite a p53 promover la fosforilación oxidativa a través de la expresión de genes tales como SCO2. Este mecanismo permite a RELA suprimir la transformación oncogénica de la regulación del metabolismo energético. Es importante destacar que la pérdida de p53 se traducirá en un cambio en la función de RELA, lo que le permite suprimir la expresión de genes mitocondriales y promover la glicolisis ⁽³⁵⁾.

La relación entre NFκB y el supresor tumoral p53 se revela aún más por la identificación de promotores que contienen sitios de unión para ambos factores de transcripción, tales como SKP2 , DR5 y cas4. Estos promotores funcionan como sitios importantes de la integración entre estas vías y permiten que funcionen cooperativamente, en vez de antagonica, para influir en el destino celular. Por otra parte, p53 y las subunidades de NFκB tales como RELA y p52 pueden interactuar directamente, por lo que pueden funcionar como co-reguladores transcripcionales para p53 , y viceversa , de forma independiente de los sitios de unión a promotor ⁽³⁶⁾.

Como consecuencia de estas vías, la actividad de NFκB puede ser pro-apoptótica, puede suprimir la metástasis o puede inhibir proliferación. Otras actividades supresoras de tumores de las subunidades NFκB incluyen una capacidad para inducir la senescencia y promover reparaciones de DNA. Como el desarrollo de tumores se asocia con la pérdida de supresores de tumor, un efecto de arrastre de esto es que NFκB está menos controlado y es más probable que funcione de una manera antagonica, es decir, como promotor de tumores ⁽³⁷⁾.

Los mecanismos que articulan las funciones oncogénicas de NFκB son propensos a requerir más que la pérdida de supresores tumorales y la activación de IKK. Factores de transcripción como STAT3, que pueden funcionar cooperativamente con NFκB, participan en la tumorigénesis dependiente de NFκB. Por ejemplo, la transformación mediada por SRC requiere de la regulación a la baja dependiente de NFκB del miRNA let-7, que conduce a un aumento de los niveles de IL- 6 y la activación de STAT3. Por otra parte, vías de señalización paralelas, tales como la desregulación de la señalización de PI3K, que resulta en la activación de AKT (también conocida como PKB) y la

supresión de GSK3, la activación de la señalización de MAPK e IKKε también promueven el papel oncogénico de NFκB. Estas vías se combinan para determinar el papel de NFκB en las diferentes etapas de desarrollo del tumor o en respuesta a diferentes desencadenantes oncogénicos, tales como la inflamación crónica o la activación de proto-oncogenes. Sin embargo, la tumorigénesis en sí no es la única vía a través del cual NFκB puede influir en la supervivencia de un paciente con cáncer, la actividad de NFκB es también un determinante importante de la respuesta a la quimioterapia ⁽³⁸⁾.

NFκB Y CÁNCER DE PRÓSTATA.

Existen evidencias de que NFκB juega un papel muy importante en la iniciación y progresión del cáncer de próstata humano, existiendo una correlación entre la activación de NFκB y el grado de la agresividad del tumor.

El tratamiento de CaP incluye la prostatectomía radical, radioterapia y opcionalmente la terapia de privación de andrógenos (ADT), los pacientes con CaP avanzado, generalmente son tratados con ADT. El objetivo molecular de la ADT es el receptor de andrógenos (AR), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. El AR es responsable de la morfogénesis completa de la glándula prostática, la secreción de factores próstata-específicos y es importante para la supervivencia, el mantenimiento y la funcionalidad de las células epiteliales secretoras mediante la regulación de la expresión de factores de crecimiento paracrinos (como FGF o EGF) en las células estromales de próstata ⁽³⁹⁾. Durante la iniciación del CaP, este control paracrino de las células epiteliales prostáticas se sustituye por una activación autocrina AR-dependiente, que proporciona una señal para el crecimiento y la supervivencia constante, así como para la angiogénesis y migración ⁽⁴⁰⁾.

En un alto porcentaje de tumores obtenidos de pacientes en los que se observa un fracaso de la ablación de andrógenos, mostraron sobreexpresión del receptor AR, con un 30% asociado a un mecanismo de amplificación y otro 30%, que presentó mutaciones en el receptor eran todos tumores metastásicos ⁽⁴¹⁾.

En adición a estas alteraciones, factores solubles que median la comunicación entre las células tumorales de la próstata y su microambiente pueden incrementar la proliferación de las células malignas en un ambiente libre de andrógenos. Factores de crecimiento, normalmente expresados por las células del estroma, tales como el factor de crecimiento de insulina (IGF-1); el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) pueden

estimular la proliferación de las células epiteliales y activar al receptor AR en ausencia de andrógenos ⁽⁴²⁾.

La castración o la ADT afecta a la producción de factores de crecimiento prostáticos por las células del estroma, que a su vez disminuye la supervivencia epitelial hasta el 75 % y también induce la apoptosis a través del bloqueo de la señalización del AR. La castración también conduce a la degeneración de los capilares y de los vasos, que a su vez mejora la regresión del tumor. Estos cambios dan lugar a un éxito clínico de la ADT dentro de los primeros 18-36 meses, sin embargo, con el tiempo, todos los CaP adquieren resistencia contra la ADT y a este estadio clínico del cáncer de próstata que se refiere a menudo como hormono resistente, independiente de andrógenos o cáncer de próstata resistente a la castración (CRPCa), es altamente resistente a la quimioterapia convencional ⁽⁴³⁾.

Aunque el CRPCa no responde a ablación hormonal, diversos mecanismos mantienen la funcionalidad del AR en el 70 % de los casos. Por ejemplo, la amplificación del gen AR y/o la sobreexpresión del AR se han encontrado en aproximadamente un tercio de CRPCa. Entre el 10 y 30 % de CRPCa, se observan mutaciones con ganancia de función del AR o variantes alternativas, aumentando la actividad o la estabilidad, el reconocimiento de ligandos o mayor afinidad hacia los andrógenos. Además, la producción autónoma de andrógenos en el tejido tumoral es otro mecanismo inusual de la activación de AR. Finalmente, el aumento de la inflamación que rodea el tumor puede promover la progresión independiente de andrógenos de CRPCa ⁽⁴⁴⁾.

Otro factor molecular en la transición hacia CRPCa es NFkB. Esta idea es apoyada por varias evidencias. En primer lugar, los pacientes con CaP que presentan niveles elevados de NFkB tienen un peor pronóstico. En segundo lugar, se observa una activación crónica de NFkB en varias líneas celulares de CRPCa. En tercer lugar, muestras de CaP muestran una activación constante de la proteína IKK1 situada río arriba de NFkB. Por último, NFkB regula la transición epitelio mesénquima, inducida por TGF beta (pieza clave en el proceso metastásico en tumores sólidos) también en CaP. A pesar de estas observaciones, el papel exacto de NFkB en el inicio y la progresión del CaP no es completamente conocido ⁽⁴⁵⁾.

De hecho, algunas líneas celulares de CaP independientes de andrógenos como PC-3 o DU145 dependen para su crecimiento de niveles constitutivamente elevados de NFkB y la inhibición de NFkB, por inhibidores farmacológicos causa la muerte masiva de las células de estas líneas celulares. Todas las líneas celulares de CaP con actividad constitutiva de NFkB tienen o bajos

niveles del AR o la falta de expresión de dicho receptor. Este hecho condujo a la idea de que la activación crónica de NFκB podría reemplazar al AR para asegurar la supervivencia y la proliferación celular en un ambiente privado de andrógenos y el bloqueo de NFκB podría ser una terapia eficaz para el tratamiento de CRPCa. En contraposición se han encontrado niveles bajos de activación de NFκB en líneas celulares dependientes de andrógenos, como LNCaP. Sin embargo, en algunos casos de CRPCa se expresan tanto NFκB como el AR, lo que sugiere que la actividad crónica de NFκB no es simplemente un reemplazo de AR y puede ejercer funciones más específicas en CaP.

La activación de AKT y NFκB ocurre durante la progresión del cáncer de próstata, sugiriendo que NFκB podría ser un marcador de agresividad en este tipo de tumor. La activación de NFκB protege a las células de la apoptosis y el tratamiento de las células LNCaP con TNFα, en ausencia de andrógenos, produce un incremento en la expresión de Bcl-2 dependiente de NFκB, lo cual se correlaciona con una resistencia a la apoptosis. En base a este antagonismo y lo observado con la expresión de Bcl-2, se puede señalar que la activación constitutiva de NFκB contribuye a la supervivencia de las células del cáncer de próstata después de la deprivación de andrógenos ⁽⁴⁶⁾.

Se ha demostrado que en células troncales de cáncer (CTC), NFκB presenta una mayor actividad que el resto de la población, sin embargo, aún no es completamente claro cómo es que NFκB puede regular a las CTC y que moléculas podrían participar en la activación de esta vía. NFκB tiene un papel clave en la formación de mamoesferas y en la iniciación del tumor mediada por CTC. En células troncales de cáncer de mama se ha demostrado que NRP-1 regula NFκB. ⁽⁴⁷⁾ Neuropilina-1 (NRP1), es un co-receptor de factores de crecimiento ligados a la tumorigenicidad de algunas CTC. Al inhibir la expresión de NRP1 se reprime severamente la activación de NFκB y la formación de mamoesferas, lo cual pone de manifiesto el papel esencial de NRP1 en cáncer y el hecho de que esta actividad está ligada a la activación de NFκB. No es el único estudio que relaciona a NFκB con las neuropilinas, de hecho existe una clara relación entre NRP1 y NFκB. Por ejemplo, en células endoteliales FGF induce NRP-1 vía NFκB ⁽⁵³⁾. Recientemente, en un estudio donde evaluaron el papel de NRP1 en el desarrollo del síndrome de Sjögren (SS), realizado en células epiteliales de las glándulas salivales humanas, demostraron que NRP-1 ejerce su función a través de la activación de NFκB ⁽⁴⁸⁾. También se ha visto que la unión de Sema3A a neuropilina-1 (NRP1) inhibe el receptor activador de NF-κB (RANKL) ⁽⁴⁹⁾.

Ambas vías son importantes en la tumorigenicidad del cáncer de próstata, si bien no se sabe si hay una conexión entre estas. A continuación se describe a la familia de Neuropilinas y su importancia en cáncer.

NEUROPILINAS.

Las neuropilinas (NRP) son receptores multifuncionales que median funciones críticas en el sistema nervioso, sistema vascular y células tumorales. NRP1 y NRP2 fueron encontradas originalmente para unir semaforinas y factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF). De hecho, las Neuropilinas son los principales componentes de complejos receptores oligoméricos, en asociación con Plexinas y receptores VEGF.

NRP1 fue identificada inicialmente como un antígeno de superficie celular neuronal ("A5") en *Xenopus laevis*; NRP2 fue identificado pocos años después en ratones. Los genes para neuropilina están presentes en todos los animales vertebrados. Las dos neuropilinas tienen una masa molecular de aproximadamente 130-140 kDa y dominios estructurales muy similares, a pesar de que su homología general es tan solo del 44% a nivel de aminoácidos. La porción extracelular de las neuropilinas media múltiples interacciones proteína-proteína, y está formada por dos dominios de unión (llamados dominios CUB o a1/a2), dos dominios homólogos a los factores de coagulación V / VIII (llamados dominios b1/b2) y un dominio meprinlike (llamado dominio MAM o c). Los dominios "a" de las neuropilinas son responsables de unir los dominios sema de las semaforinas clase 3, mientras que la unión de VEGFs a neuropilina ocurre a través de los dominios "b". Por otro parte, la porción situada entre los dominios "a" y "b" constituye un sitio de unión al dominio "Ig-like" y regiones básicas cargadas de las semaforinas secretadas (Figura 5). El dominio "c" media la homo y heterodimerización de las Neuropilinas, además, posiblemente podría participar en la interacción con otros receptores de membrana. La dimerización de Neuropilina parece ser esencial para su función. Finalmente, la región citoplásmica corta (alrededor de 45 aminoácidos) no está particularmente conservada, pero termina con una secuencia consenso de aminoácidos (-SEA) interactuando con los dominios PDZ (Homología PSD-95/Dlg/ZO-1).

Los genes de Neuropilina se caracterizan por múltiples variantes de procesamiento alternativo. Existen dos grandes isoformas de NRP2 (NRP2a y NRP2b) que tienen dominios extracelulares idénticos, pero dominios citoplásmicos y transmembrana divergentes, se expresan en una variedad de tejidos de una manera no superpuesta. La secuencia primaria de NRP2a es más cercana a la de NRP1, mientras NRP2b carece del motivo de unión PDZ y sus funciones son poco

conocidas. Además, ciertas células producen variantes solubles, que sólo contienen los dominios extracelulares "a" y "b" ⁽⁵⁰⁾.

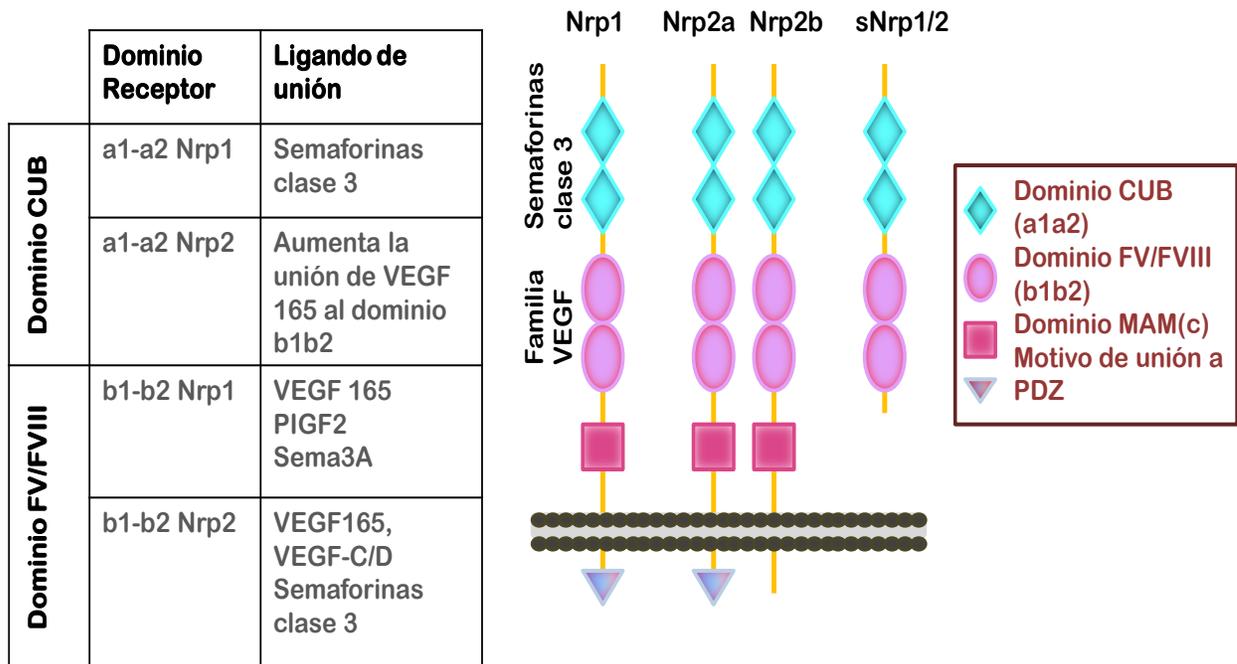


Figura 5. Representación esquemática de las Neuropilinas. Imagen modificada de Rizzolio, 2011

Las Neuropilinas actúan como co-receptores de alta afinidad para las semaforinas clase 3, en asociación con Plexinas. NRP1 y 2 muestran diferente especificidad de unión para las semaforinas de clase 3: Sema3A y Sema3F se unen con alta afinidad a homodímeros de NRP1 y NRP2, respectivamente, mientras que otras semaforinas pueden interactuar tanto con homodímeros o heterodímeros de neuropilina ⁽⁵¹⁾. Debido a que las semaforinas no pueden unirse directamente a las plexinas con alta afinidad (con la notable excepción de Sema3E), es probable que las neuropilinas participen en la unión y "presentación" de las semaforinas a los receptores de señalización de las plexinas ⁽⁵²⁾.

Además de las semaforinas, las neuropilinas se unen específicamente a los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs), y forman un complejo con sus receptores de señalización de tirosina quinasa (VEGFR) (Figura 6). Por ejemplo, en presencia de NRP1 la unión de la isoforma 165 de VEGF (VEGF165) a su receptor de alta afinidad VEGFR2 se incrementa significativamente, mejorando así las actividades mitogénicas y quimiotácticas. Debido a que los sitios de unión de

VEGF165 a Neuropilina 1 y VEGFR han sido localizados en diferentes regiones, este ligando pueden interactuar simultáneamente con ambos receptores asociados. Por otra parte, se ha sugerido que, en lugar de afectar directamente la activación de VEGFR2, NRP1 podría regular su cinética de señalización. Además de las isoformas 165 y 121 de VEGF, NRP1 puede unir miembros adicionales de la familia de VEGF, como VEGFB, VEGFE, y el factor de crecimiento placentario 2 (PlGF2). A la inversa, NRP2 interactúa con la isoforma 145 de VEGF, con VEGFC y VEGFD. A pesar de que algunos estudios proponen que las semaforinas y VEGF pueden competir por la unión a NRP1, los estudios estructurales sugieren que VEGF165 y Sema3A tienen sitios de unión separados en NRP1 y por lo tanto no compiten por la unión del receptor. Este problema es actualmente controvertido. Curiosamente, una supresión del dominio "a" de NRP1 dificulta la interacción con semaforinas, pero no con VEGF. Por otra parte, una forma mutada de NRP1 con siete sustituciones de aminoácidos en el dominio "a" ("NRP1-2ABC") se caracteriza por una fuerte reducción en la unión a semaforinas, manteniendo al mismo tiempo las interacciones con el VEGF, VEGFR2 y Plexina A1 ⁽⁵³⁾.

El papel funcional de la cola corta intracelular de las neuropilinas es poco conocido. A pesar de que no es necesaria para la unión con semaforinas o VEGF, se ha demostrado que una supresión de la secuencia C-terminal de NRP1 (dominio de unión a PDZ) reduce la formación del complejo VEGFR2/Nrp1 dependiente de VEGF165 y la respuesta en células endoteliales ⁽⁵⁴⁾. Además, la región C-terminal de las neuropilinas, interacciona con la proteína GIPC (también conocido como Synectina o NIP), y esta interacción se ha asociado en la formación del complejo VEGFR2/NRP1 en células endoteliales y la regulación de la angiogénesis dependiente de NRP1 ⁽⁵⁵⁾. Recientemente, se ha demostrado que GIPC también modula la señalización de VEGFR3, a través de su interacción con NRP2a durante el desarrollo del sistema linfático. Por lo tanto, al interactuar con GIPC / Sinectina y potencialmente con otras proteínas que contienen el dominio PDZ, las neuropilinas podría regular múltiples complejos proteicos en la membrana plasmática. Por último, varios estudios cuestionan el dogma de que las neuropilinas actúan solamente como plataformas de unión a ligandos, y han proporcionado pruebas para la señalización de VEGF a través de neuropilinas independientes de VEGFR2. Esto es particularmente relevante en células tumorales, y podría implicar una función de señalización del dominio citoplásmico de neuropilinas (a través de transductores de señales asociados actualmente desconocidos) o la asociación de las neuropilinas con moléculas de señalización transmembrana adicionales. En particular, las colas citoplásmicas de NRP1 y NRP2 son en gran medida divergentes, por lo que podrían interactuar con diversos adaptadores o transductores de señal ⁽⁵⁶⁾.

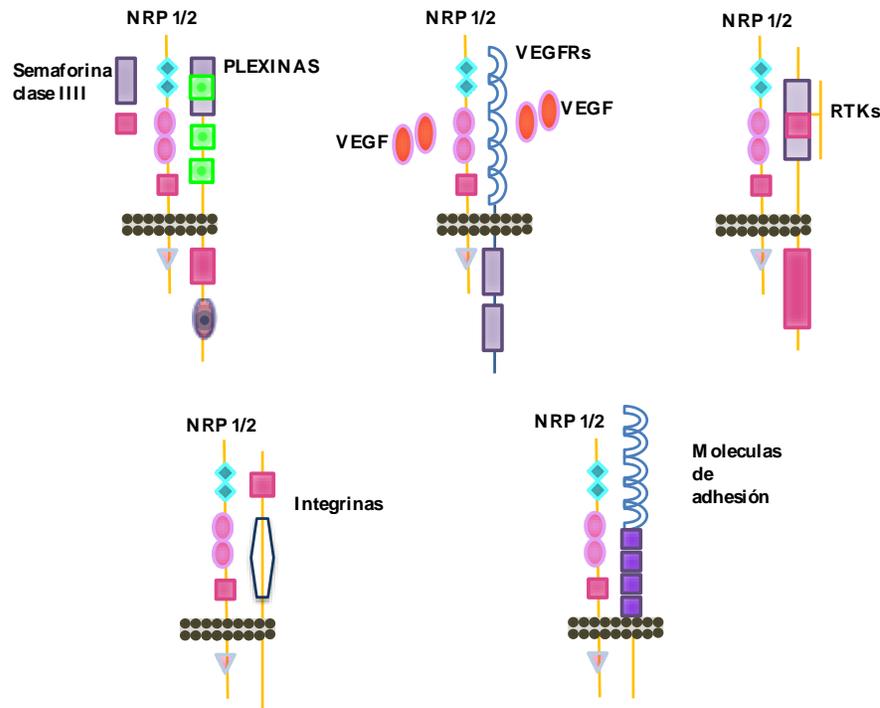


Figura. 6. Representación esquemática de los complejos moleculares que implican a las neuropilinas en la membrana plasmática de células cancerosas. Imagen modificada de Rizzolio, 2011

Las Neuropilinas se expresan ampliamente en todos los tejidos y poblaciones celulares, durante el desarrollo embrionario y en el adulto. Además, la distribución de ambas proteínas a menudo se superpone, aunque la abundancia relativa varía entre tipos de células. De hecho, los mecanismos que controlan la expresión de las neuropilinas son en gran parte desconocidos.

En particular, condiciones metabólicas anormales en las células tumorales, como la hipoxia y la privación de nutrientes pueden perturbar el destino del receptor. Por lo tanto, el impacto del estrés metabólico en el microambiente tumoral puede ser un importante mecanismo para regular la expresión de las neuropilinas y su función *in vivo*. Por ejemplo, la privación de nutrientes e hipoxia han demostrado que estimula la rápida pérdida de la expresión de NRP1 en células endoteliales y cancerosas tanto por la degradación por autofagia como a través de la actividad lisosomal ⁽⁵⁷⁾.

Recientemente, se demostró que NRP1 promueve la adhesión de las células endoteliales a la fibronectina, que es un elemento crucial en la angiogénesis. Al parecer, esta función de NRP1 no

está regulado por semaforinas o VEGF ⁽⁵⁸⁾. Otros estudios han implicado a NRP1 en la regulación de la adhesión célula-célula y la adhesión a la matriz extracelular. Ambas neuropilinas interactúan con moléculas de adhesión celular, tales como la L1-CAM y Nr-CAM, que parecen regular su función y señalización río abajo en respuesta a semaforinas (Figura 6). Además, L1-CAM y NRP1 expresadas en dos células adyacentes también pueden interactuar en trans, conduciendo a la señalización bidireccional que se presenta en la regulación neuronal, así como en células de carcinoma de ovario ⁽⁵⁹⁾.

Tanto los ratones knock-out NRP1^{-/-}, como los ratones transgénicos que sobreexpresan NRP1, muestran letalidad embrionaria entre E12.5 y E13.5 debido a defectos cardiovasculares, además de otras anomalías en el desarrollo. En los ratones knock-out, se observa una regresión vascular y agenesia, transposición de vasos grandes, desarrollo incompleto del tronco aórtico-pulmonar y desarrollo ineficiente de la red vascular en el saco vitelino. Cabe destacar que el fenotipo es similar pero menor que el observado en ratones knock-out VEGFR2 ^{-/-}, lo que indica que posiblemente NRP1 no es esencial en la fase inicial de la vasculogénesis dependiente de VEGF, pero es necesaria en la maduración posterior y remodelación de la red de vasos primarios. Ratones knock-out NRP1 específicos de células endoteliales, presentan defectos vasculares mayores y múltiples defectos cardíacos ⁽⁶⁰⁾. Los ratones que sobreexpresan NRP1, a su vez, presentan un aumento del número de vasos sanguíneos y capilares dilatados y no funcionales, con la consiguiente formación de hemorragias prolongadas, malformaciones cardíacas, además de los defectos del sistema nervioso ⁽⁶²⁾.

Los ratones knock-out NRP2 ^{-/-} son viables y tienen un fenotipo normal vascular. De hecho, muestran una ausencia o una severa reducción de los vasos linfáticos y capilares pequeños, mientras que las arterias, venas y vasos linfáticos más grandes se desarrollan normalmente. En particular, los ratones knock-out dobles NRP1/NRP2 mueren en el útero a E8.5, incluso antes que los ratones nulos de NRP1, presentan defectos en el saco vitelino, grandes zonas avasculares en la cabeza y en el tronco y hemorragias múltiples. Este fenotipo vascular se asemeja más al fenotipo de ratones knock-out VEGF y VEGFR2 ^{-/-} ⁽⁶³⁾.

Se ha demostrado que los ratones knock-out que carecen de semaforinas que dependen de los receptores de neuropilina, como Sema3A, Sema3C y Sema3F, no presentan defectos importantes en la angiogénesis en el desarrollo, aunque pueden presentar defectos en cardiogénesis. Esto sugiere que la señalización semaforina-neuropilina no es esencial para la vasculogénesis. Sin embargo, la actividad reguladora de las semaforinas dependientes de neuropilina en células

endoteliales se ha demostrado de forma consistente. Por ejemplo, Sema3A y 3F ejercen un papel importante en la inhibición de la adhesión mediada por integrinas de células endoteliales al sustrato. Sobre estas bases, Sema3A inhibe la adhesión de células endoteliales, la migración, la supervivencia y proliferación, así como la angiogénesis *in vivo* ⁽⁶⁴⁾. En particular, VEGF165 antagoniza todas estas funciones de Sema3A, aunque todavía no está claro si esto se debe a la competencia en la unión de NRP1 o la activación de vías de señalización antagónicas a través de plexinas y VEGFR. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que Sema3F puede inhibir la proliferación de células endoteliales, inducida tanto por VEGF como por bFGF; posiblemente implicando efectos antagonistas en la cascada de señalización.

En el sistema vascular, mientras NRP1 se expresa en las arterias, la expresión de NRP2 se limita al sistema linfático y en venas a niveles bajos. El desarrollo vascular linfático está regulado por VEGFR3, que es activado por su ligando VEGFC y VEGFD. NRP2 pueden interactuar directamente con el complejo de señalización implicado en la linfangiogénesis ⁽⁶⁵⁾.

La angiogénesis está además crucialmente apoyado por células no endoteliales, incluyendo células murales (como pericitos y células musculares lisas) y células derivadas de la médula ósea, reclutadas de la circulación. Es importante destacar que NRP1 se ha implicado también en esta función. De hecho, NRP1 se requiere para el reclutamiento de células de médula ósea en sitios de neoangiogénesis en respuesta a VEGF165, donde estas células median la maduración de los vasos y arteriogenesis por el mantenimiento de la activación y proliferación de células residentes de tejidos musculares lisos ⁽⁶⁶⁾.

La primera evidencia fuerte de la función de la señalización de semaforinas / neuropilina en la angiogénesis tumoral, se encontró en melanomas que sobreexpresan Sema3F, los cuales son poco vascularizados, debido a la fuerte cascada anti-angiogénica mediada por NRP2, inhibiendo el desarrollo de tumores y la diseminación metastásica ⁽⁶⁷⁾. Se ha demostrado que la expresión de Sema3A en células endoteliales sirve como un inhibidor endógeno de la angiogénesis en lesiones premalignas, la cual se pierde durante la progresión tumoral. De hecho, la inhibición farmacológica de Sema3A endógena durante el inicio angiogénico, aumenta la angiogénesis y acelera la progresión tumoral. Sema3A inhibe el crecimiento del tumor primario, la angiogénesis tumoral y la diseminación metastásica en modelos tumorales de ratón cuando se sobreexpresa en las células tumorales ⁽⁶⁸⁾.

NEUROPILINAS Y CANCER.

Las neuropilinas se expresan en una amplia variedad de líneas celulares tumorales humanas y neoplásicas. NRP1 se expresa predominantemente en los carcinomas, mientras que NRP2 habitualmente se expresa en los tumores no epiteliales, como los melanomas, leucemias y neuroblastomas. En algunos casos los dos receptores se encuentran co-expresados. Datos clínico-patológicos a menudo indican una correlación entre el aumento de expresión de neuropilinas y etapas avanzadas del tumor y por lo tanto un mal pronóstico ⁽⁶⁹⁾.

En particular, la sobreexpresión de NRP1 ha sido detectada en líneas celulares tumorales y en biopsias de tumores de diverso origen (Tabla 1), por ejemplo, de próstata, mama, vejiga, riñón, colon, páncreas, piel, ovario y pulmón, pero no en el epitelio normal correspondiente. Los altos niveles de NRP1 se han asociado significativamente con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama, y se correlaciona con un comportamiento invasivo y potencial metastásico en carcinoma gastrointestinal y carcinoma de próstata ⁽⁷⁰⁾. Pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que tienen una elevada expresión de NRP1, tienen una menor supervivencia a la enfermedad. En cáncer de páncreas, ambas neuropilinas se sobreexpresan, y esta co-expresión se asocia con un peor pronóstico. Además, NRP1 es altamente expresado en células inflamatorias infiltradas en el tumor ⁽⁷¹⁾.

NRP2 está sobreexpresada especialmente en tumores derivados de las células de la cresta neural ⁽⁷²⁾. La expresión de NRP2 es variable correlacionada con la progresión del tumor y el pronóstico en los tumores humanos. En cáncer de vejiga, la expresión de NRP2 se correlaciona con un estadio tumoral avanzado ⁽⁷³⁾, en cáncer de mama se correlaciona con mal pronóstico y formaciones metastásicas en los ganglios linfáticos ⁽⁷⁴⁾. En contraste con estos estudios, se ha demostrado que la pérdida de la expresión de NRP2 en los tumores carcinoides gastrointestinales se correlaciona con la progresión ⁽⁷⁵⁾.

Los mecanismos que inducen la sobreexpresión de las Neuropilinas en tumores humanos avanzados son poco conocidos. Sin embargo, un número de señales ambientales se han asociado en la regulación de la expresión de las neuropilinas en células tumorales *in vitro*. La hipoxia, un regulador clave de los niveles de VEGF en los tejidos, da lugar a una mayor expresión de NRP1 en células de neuroblastoma, pero disminuye la expresión en células de astrocitoma ^(76,77). El factor de crecimiento insulínico tipo 1 y EGF inducen la expresión de NRP1 en células de cáncer de colon, mientras que el factor de necrosis tumoral alfa, una citoquina que se ha demostrado que induce la

expresión de Neuropilinas en otros sistemas tumorales, no induce la expresión en estas mismas células. La activación de EGFR también se ha demostrado que regula a la alta la expresión de NRP1 en varias células tumorales. En particular, el EGF induce la expresión de NRP1 en líneas celulares de colon humano y adenocarcinoma de páncreas, al parecer a través de PI3K /Akt y p38 ⁽⁷⁸⁾.

Tabla 1. Sobreexpresión de Neuropilinas en cánceres humano

Tipo de cáncer	Neuropilina 1	Neuropilina 2
Leucemia mielode aguda	x	
Astrocitoma	x	
Cáncer de vejiga		x
Cáncer de mama	x	x
Cáncer colorrectal	x	x
Cáncer de esófago	x	
Cáncer de vesícula biliar	x	x
Cáncer gastrointestinal	x	
Glioma	x	
Cáncer de riñón	x	
Cáncer de pulmón	x	x
Cáncer de ovario	x	x
Cáncer de páncreas	x	x
Cáncer de próstata	x	
Cáncer de piel	x	

En suma, la sobreexpresión de neuropilinas es un hallazgo frecuente en los tumores avanzados, lo que puede sugerir la adquisición de una ventaja funcional a nivel celular.

Además de ser expresadas en células tumorales, las neuropilinas se expresan en células estromales normales del microambiente del tumor. Además de las células endoteliales, el último incluye los glóbulos blancos derivados de la médula ósea reclutados de la circulación. En particular, la expresión de NRP1 por las células hematopoyéticas tiene un papel indirecto en la promoción de la vasculogénesis y la angiogénesis ⁽⁷²⁾.

En particular, la expresión de NRP1 enriquece subtipos específicos de monocitos y macrófagos, tales como macrófagos asociados al tumor (TAM) y monocitos que expresan Tie-2 (TEM), ambos implicados en la progresión tumoral, aunque su papel funcional en la regulación del arresto de estas células en el microambiente del tumor no se ha dilucidado. NRP1 media contactos entre las células dendríticas y los linfocitos T a través de interacciones homofílicas y es esencial para la iniciación de la respuesta inmune primaria. NRP1 también está especialmente enriquecida en células T reguladoras (Treg), que son importantes, en la respuesta inmune anti-tumoral y participan en la generación de la tolerancia inmunológica hacia las células del cáncer ⁽⁷²⁾.

En general, la expresión NRP1 parece favorecer y sostener la proliferación en diferentes líneas de células tumorales.

Las vías de señalización de NRP1 en las células tumorales pueden implicar VEGFR2, fosfoinosítidos-3-kinasa (PI3K) y activación de Akt. VEGF puede inducir la expresión de factores de supervivencia celular, como el FAD y el HGF, en las células de cáncer (a través de NRP1) ⁽⁷⁸⁾.

Se ha demostrado que la expresión de NRP1 ayuda a mantener un fenotipo indiferenciado en células cancerosas. De hecho, mientras más agresivo es el carcinoma de células renales, mayor es la expresión de NRP1 y cuando su expresión es modulada a través de un RNA de interferencia, las células adquieren un fenotipo más diferenciado, caracterizado por la expresión de marcadores específicos del epitelio renal (como cadherinas) ⁽⁷⁵⁾.

Aunque la mayoría de los estudios han indicado un papel de las neuropilinas en la promoción de tumores, otros informes indican que NRP1 podría tener la función opuesta. Por ejemplo, una elevada expresión de NRP1 se asoció con un pronóstico más favorable en pacientes

con cáncer de colon ⁽⁷⁸⁾. Estas discrepancias se encuentran actualmente sin resolver, implicando la existencia de diferentes vías de señalización.

El papel funcional de las neuropilinas en los tumores es especialmente complejo debido a sus interacciones adicionales con integrinas, moléculas de adhesión (como L1-CAM), y receptores de tirosina quinasas (tales como c-Met y receptores TGF-Beta). En particular, la sobreexpresión de NRP1 en células de cáncer pancreático promueve la señalización de c-Met inducida por HGF, y la invasividad de las células tumorales. Por otra parte, tanto NRP1 y NRP2 pueden unirse a HGF, y NRP1 puede asociarse con c-Met, que conduce a una mayor migración de células endoteliales y una mayor proliferación. El complejo formado por NRP1 y PDGFR regula la migración de células troncales mesenquimales (MSC) y por lo tanto puede controlar la movilización de las MSC en la neovascularización y la remodelación tisular. Además, PDGF-B, a través de NRP1, controla el reclutamiento de células troncales mesenquimales y su diferenciación a pericitos. Estos datos demuestran que las Neuropilinas son plataformas de señalización en la superficie celular, potencialmente capaces de regular en múltiples niveles a las células cancerosas, así como a las células del microambiente tumoral ⁽⁷⁸⁾.

Como se mencionó anteriormente tanto la vía de NFkB como de NRP son importantes en la tumorigenicidad del cáncer de próstata, por lo cual, en este trabajo nos proponemos investigar si NFkB regula NRP-1 en cáncer de próstata y si es por medio de la vía canónica y/o no canónica.

HIPÓTESIS

La vía canónica y no canónica de NFkB regulan NRP1 en células de cáncer de próstata.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si NFkB regula NRP1 ya sea por la vía canónica o no canónica en células de cáncer de próstata.

Objetivos específicos:

- Determinar los niveles de NRP1 en células de próstata de tejido normal y canceroso
- Determinar si la vía canónica de NFkB regula Neuropilina 1
- Determinar si la vía no canónica de NFkB regula Neuropilina 1

ANTECEDENTES.

Se ha demostrado que en células troncales de cáncer (CTC), NFκB presenta una mayor actividad que el resto de la población, sin embargo, aún no es completamente claro cómo es que NFκB puede regular a las CTC y que moléculas podrían participar en la activación de esta vía. NFκB tiene un papel clave en la formación de mamoesferas y en la iniciación del tumor mediada por CTC. En células troncales de cáncer de mama se ha demostrado que NRP-1 regula NFκB. (47). Neuropilina-1 (NRP1), es un co-receptor de factores de crecimiento ligados a la tumorigenicidad de algunas CTC. Al inhibir la expresión de NRP1 se reprime severamente la activación de NFκB y la formación de mamoesferas, lo cual pone de manifiesto el papel esencial de NRP1 en cáncer y el hecho de que esta actividad está ligada a la activación de NFκB. No es el único estudio que relaciona a NFκB con las neuropilinas, de hecho existe una clara relación entre NRP1 y NFκB. Por ejemplo, en células endoteliales FGF induce NRP-1 vía NFκB (53). Recientemente, en un estudio donde evaluaron el papel de NRP1 en el desarrollo del síndrome de Sjögren (SS), realizado en células epiteliales de las glándulas salivales humanas, demostraron que NRP-1 ejerce su función a través de la activación de NFκB (48). También se ha visto que la unión de Sema3A a neuropilina-1 (NRP1) inhibe el receptor activador de NF-κB (RANKL) (49).

METODOLOGÍA.

PLÁSMIDOS USADOS

En relación a la vía canónica, utilizamos el plásmido pRcCMV-Ik β -S32/36 ⁽⁷⁹⁾, el cual contiene la secuencia que codifica para el súper-represor del factor NF κ B: un Ik β con los residuos de serinas 32 y 36 mutadas por alaninas. Debido a estas mutaciones, el inhibidor Ik β no puede fosforilarse en estos residuos y por consiguiente no se degrada, de tal manera que mantiene al factor de transcripción NF κ B inactivo en el citoplasma de las células. Como plásmido control se utilizó el vector que solo tiene clonado el promotor. Ambos contienen el gen de resistencia a G418 (Geneticina).

En el caso de la vía alternativa, para determinar si la sobre expresión de NF κ B tiene algún efecto sobre NRP1, se diseñaron plásmidos para la sobreexpresión de NIK. Como plásmido control se utilizó el vector que solo tiene clonado el promotor, ambos plásmidos contienen el gen de resistencia a G418. Para el caso contrario, es decir, para evaluar el efecto que tiene sobre NRP1 la inhibición de la vía de NF κ B, se utilizó un shRNAs para NIK el cual se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se subclonó en el vector pQCXIO (clontech) para conferir resistencia a puomicina. Como plásmido control se utilizó el vector que solo tiene clonado el promotor.

PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (MINIPREP)

Para realizar la extracción de DNA por lisis alcalina se transfirieron colonias individuales de bacterianas a 5 mL de cultivo Luria-Bertani (LB) con ampicilina y se crecieron a 37°C con agitación constante durante toda la noche. Transcurrido este tiempo los 5 mL de cultivo se centrifugaron a máxima velocidad durante un minuto. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de solución I fría (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH8, EDTA 10 mM pH8). Una vez disgregada la pastilla se agregaron 400 μ L de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 4 minutos, posteriormente se agregaron 300 μ L de solución III fría (Acetato de Potasio 5M, ácido acético y agua desionizada) mezclándolos por inversión. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos, el sobrenadante se recuperó y transfirió a un tubo limpio al cual se le agregaron 480 μ L de isopropanol durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos. La

pastilla se lavó con un 1 mL de etanol al 70% y se dejó secar al aire por un periodo de 5 minutos para después resuspenderla en 50 μ L de TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM, pH8).

Extracción de DNA plasmídico por columna

Una vez confirmadas las construcciones por restricción enzimática se extrajo DNA plasmídico siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 250mL de cultivo con el kit *EndoFree plasmid Maxi Kit* (Qiagen). El DNA que se obtuvo de esta manera fue usado para los experimentos de transfección.

DIGESTIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.

Digestión con enzimas de restricción para la construcción de plásmidos

Para poder realizar la construcción de los vectores utilizados en los experimentos de transfección fue necesario el uso de enzimas de restricción pues con ellas obtuvimos, insertamos y eliminamos los fragmentos de DNA de interés. De manera general se usaron de 3 a 5 unidades de enzima por μ g de DNA, 1 x del buffer 10x recomendado para cada enzima y agua desionizada estéril. Esta reacción se dejó incubando por un periodo de 1.5 a 24 horas a la temperatura especificada para cada enzima.

Digestión con enzimas de restricción para la comprobación de las construcciones

Después de haber purificado el DNA plasmídico de interés se sometió a una reacción de restricción que permitiera verificar si efectivamente se trataba de la construcción esperada. La reacción consistió de 3 a 5 unidades de enzima por μ g de DNA, 1x del buffer de corte 10x y agua desionizada estéril, la mezcla se dejó durante aproximadamente 2 horas incubando a la temperatura óptima para la actividad de la enzima.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS SUPERCOMPETENTES

Para la transformación de bacterias supercompetentes se descongeló una alícuota de bacterias *Escherichia coli* DH5 alpha en un baño de hielo-agua. De esta alícuota se tomaron 100 μ L y se mezclaron con 1 μ L del DNA plasmídico de interés, se dejó 30 minutos en el baño de hielo-agua para posteriormente incubarla por un tiempo exacto de 1 minuto y 45 segundos a 42°C,

inmediatamente la mezcla se colocó en un baño de hielo-agua por 2 minutos y se agregaron 900 μ L de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C para que se recuperaran. Transcurrido este tiempo se tomaron de 100 a 200 μ L para sembrarlos en cajas Petri con agar LB y el antibiótico de selección. Una vez sembradas las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Las electroforesis en gel de agarosa se usaron tanto para analizar si las construcciones se llevaron a cabo adecuadamente como para obtener fragmentos específicos de DNA. La técnica consistió en colocar geles de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA a pH8) y Gel red (1 μ L/100 mL). Como marcador de peso molecular se utilizaron 1 kb y de 100 pb (Gibco BRL). Una vez terminada la electroforesis el gel se expuso a un transiluminador de luz UV para observar el DNA y se obtuvo su registro fotográfico con una cámara digital.

CUANTIFICACIÓN DEL DNA

La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

CULTIVO CELULAR

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Línea celular derivada de carcinoma de Próstata humano PC 3 (Figura 7) representativa de un estadio andrógeno-independiente de adenocarcinoma grado IV de próstata, obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection).
- Células humanas epiteliales de próstata normales, obtenidas de ATCC (PCS-440-010)
- Células estromales normales de próstata, obtenidas de ATCC (WPMV-1 CRL-2854)

Los tres tipos celulares fueron sembradas en cajas Petri de 10 mm, en medio líquido (DMEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) v/v inactivo y mantenidas a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación. Para la realización de los ensayos los cultivos se desarrollaron entre un 60-80% de saturación de la caja de cultivo.

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**

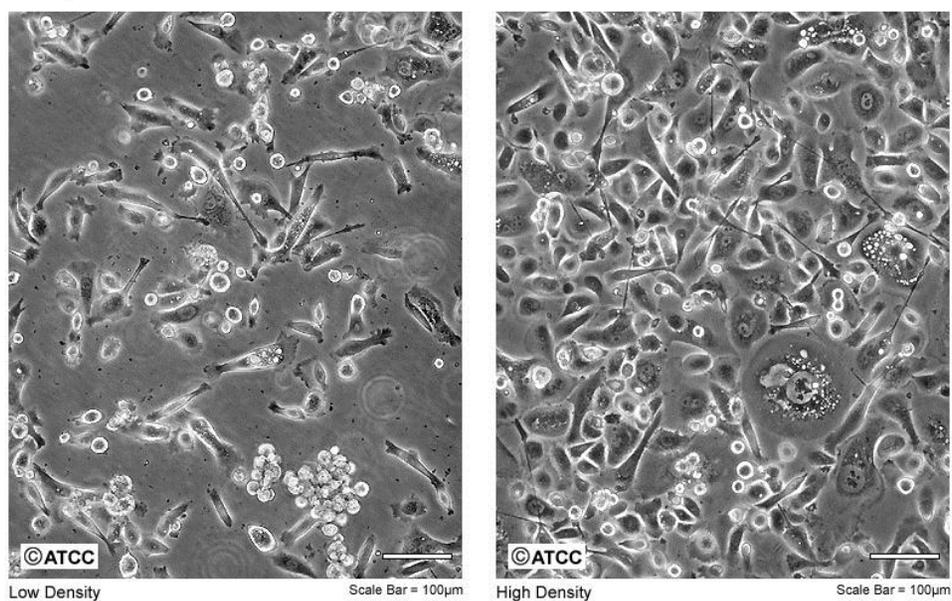


Figura 7. Células PC3

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

El día previo a la transfección se tripsinó una caja al 80% de confluencia de 10 cm de diámetro con células PC3, una porción de éstas células se ocupó para sembrar una caja de 6 pozos (500,000 células por pozo) de tal forma que al día siguiente las células estuvieran aproximadamente al 70% de confluencia y listas para ser transfectadas. Las células se mantuvieron en medio DMEM enriquecido con SFB al 5%. La transfección se llevó a cabo usando Lipofectamina LTX (6 µL por pozo) (Invitrogen), la cual se combinó con medio DMEM sin SFB y sin antibióticos y con el DNA plasmídico a analizar en condiciones de esterilidad. Las proporciones de los componentes de la mezcla de transfección fue la siguiente: por cada 2.5 µg de DNA, se agregaron 2.5 µL de PLUS™ Reagent, 480 µL de medio y 6 µL de lipofectamina LTX. Las células PC3 transfectadas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para la obtención de líneas estables, las células se seleccionaron con puromicina (1.5 µg/µL) durante 7 días o G418 (650 µg/µL) durante 20 días, según el caso.

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA total de las células se realizó usando el reactivo Trizol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR

La expresión de cada uno de los genes analizados, se validó mediante la técnica de RT-PCR.

Para la obtención del cDNA, el RNA total se retrotranscribió usando el kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 2 μ L de Buffer 10X RT, 0.8 μ L de 25X dNTP Mix (100mM), 2 μ L de Randon Primers (10X) y 1 μ L de Multi Scribe RT. Se utilizaron 2000 ng de RNA y la reacción se ajustó a 20 μ L con H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: 25°C 10 minutos, 37°C 120 minutos, 85°C 5 segundos.

En cada reacción de PCR se amplificó simultáneamente el gen problema y el gen de referencia 18S como control de carga en todas las líneas celulares. En cada reacción se utilizaron los primers indicados en la tabla 3 y AmpliTaq Gold®, GeneAmp® 10X PCR Buffer (Roche) bajo las siguientes condiciones: 2.5 μ L de Buffer 10x, 4.0 μ L de DNTP's [10mM], 2.5 μ L de Primer 1 [10pmol/ μ L], 2.5 μ L de Primer 2 [10pmol/ μ L], 1.5 μ L de MgCl₂ 25mM, 0.125 μ L de Taq Pol. 5 u/ μ L y 40.8 μ L de H₂O.

CITOMETRÍA DE FLUJO.

Los ensayos se realizaron con un citómetro FACSAria (BD biosciences, Heidelberg, Germany). Las células se desprendieron con Acutasa y se centrifugaron a 1500 rpm, se utilizaron 1 millón de células por experimento, y se utilizaron los anticuerpos CD304-APC (BDCA-4/Neuropilin-1) para determinar la expresión proteica y Mouse IgG1-APC como control de isotipo, ambos anticuerpos de MACS Miltenyi Biotec, a una concentración 1:11 en PBS al 1% de SFB.

Tabla 2. Primers utilizados.

		TM
NIK	5'-ACTTAAGTTTAGGAATCTTCCCACT-3' 5'-GAGCTTATCTCCAGGGTTGC-3'	56°C
IKB ALPHA	5'-CAAGGTGGTGATTCAGAGCA-3' 5'-GGGAGGAAAGGGAAGAAGAG-3'	58°C
18 S	5'-ACAAGTTCTGGGGGACACAG-3' 5'-AGACAGACGGGCAAAGTGAC-3'	56°C
NRP1	5'-CACCTGCCCATCTTTTGATT-3' 5'-CCTTCGTCAGGCATATTGGT-3'	57°C
NRP1 sol	5'-TCTACTTCCAGGAGGACGAGTAGTA-3' 5'-GGAGGCAGAGTCCTGTGACCAGGAT-3'	56°C

RESULTADOS

Análisis de la expresión de neuropilinas endógenas.

En primera instancia se analizó la expresión de NRP-1 membranal y las isoformas solubles de manera endógena en la línea celular PC3 y en células normales de próstata, estromales (NEs) y epiteliales (NEp). Como puede observarse en la figura 9, solo la línea celular PC3 muestra expresión de Neuropilinas, en las células normales la expresión es nula.

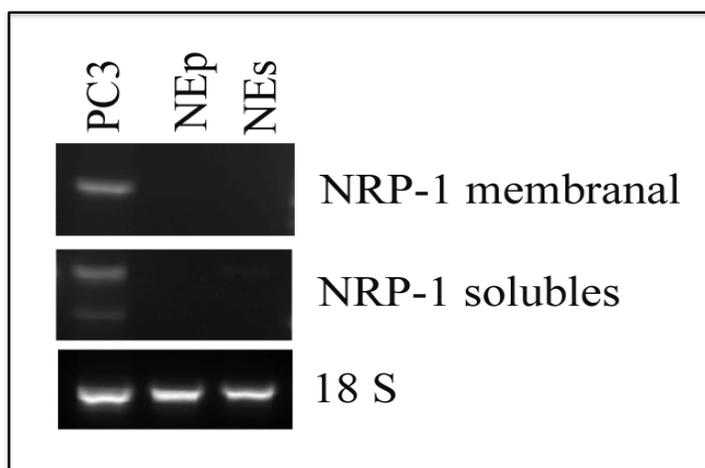


Figura 9. Expresión de NRP-1 membranal y solubles en células de cáncer de próstata. Se muestra el análisis de PCR a partir de RNA total.

Son muchos los estudios que han mostrado la expresión de NRP1 en diversas células tumorales y el nivel de expresión de NRP-1 es significativamente más alta en tejidos tumorales que en los tejidos no malignos. En muestras de carcinoma de próstata humanos, la sobreexpresión de NRP-1 es un marcador de agresividad tumoral y potencial metastásico.

Sobreexpresión de NIK

Para evaluar el efecto de la vía no canónica de NFκB sobre las neuropilinas, determinamos los efectos de la alteración en la expresión, tanto de la inhibición como de la sobreexpresión de NIK sobre la expresión de NRP1 y las isoformas solubles.

Para promover la sobreexpresión, creamos una línea celular estable que sobreexpresa NIK. Una vez seleccionadas con G418, se corroboró la expresión por RT-PCR.

En la Figura 10, se muestra el incremento en los niveles de RNAm de NIK en la línea celular transfectada.

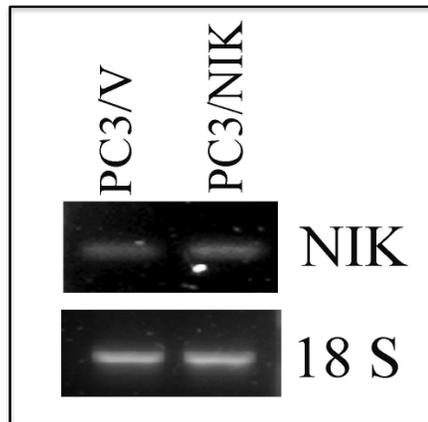


Figura 10. Sobreexpresión de NIK en células PC3. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V) y de las células transfectadas con el vector específico para NIK (PC3/NIK).

Efecto de la sobreexpresión de NIK en la expresión de neuropilinas.

Para evaluar si la sobreexpresión de NIK promueve cambios en la expresión de las neuropilinas, realizamos un análisis de expresión por RT-PCR de ambas células (PC3/V y PC3/NIK).

En la figura 11, se puede observar que la expresión forzada de NIK disminuye la expresión de NRP-1 membranal e incrementa la expresión de las isoformas solubles.

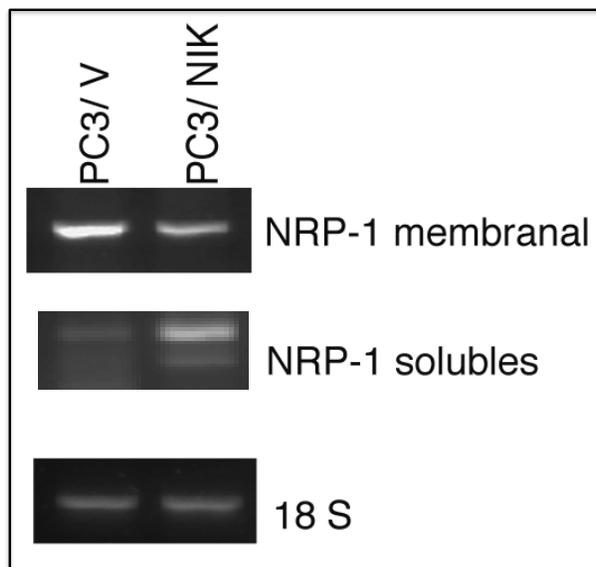


Figura 11. Niveles de NRP-1 y solubles en células PC3 con sobreexpresión de NIK y control. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V) y de células transfectadas con el vector específico para NIK (PC3/NIK).

Para determinar la expresión a nivel de proteínas de NRP1 membranal, se analizaron las muestras por citometría de flujo, detectando niveles de expresión menores en las células que sobreexpresan NIK (PC3/NIK) comparadas con las células control (Figura 11a).

Inhibición de NIK

Realizamos la inhibición de NIK a través de un shRNAs. No logramos obtener una línea estable, debido a que las células transfectadas con el shRNA para NIK murieron a los 3 días de selección, esto no ocurrió con las células transfectadas con el vector control. Debido a esto, a las 48 horas después de la transfección, realizamos la extracción de RNA total, y evaluamos si existía algún efecto sobre la expresión de NIK. En la figura 12, se puede observar la disminución en los niveles de RNAm de NIK en la línea celular transfectada.

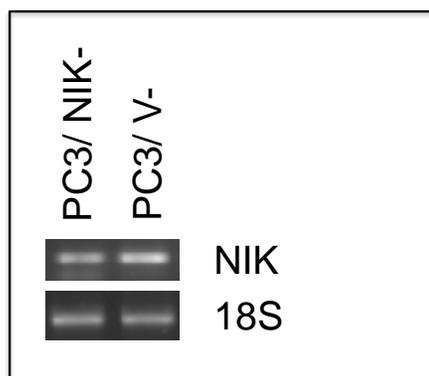


Figura 12. Inhibición de NIK en células PC3. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V-) y de las células transfectadas con el shRNA específico para NIK (PC3/NIK-).

En estas células PC3/NIK- no fue posible determinar la expresión a nivel de proteínas de NRP1 por citometría de flujo, debido a que durante el proceso de marcaje con los anticuerpos las células murieron. El experimento lo realizamos por triplicado y en todos los casos obtuvimos el mismo resultado.

Efecto de la inhibición de NIK en la expresión de neuropilinas.

Para evaluar si la inhibición de NIK promueve cambios en la expresión de las neuropilinas, realizamos un análisis de expresión por RT-PCR de ambas células (PC3/V- y PC3/NIK-)

En la figura 13 se puede observar que la inhibición de esta cinasa redujo la expresión de las isoformas solubles e incrementa la expresión de la isoforma membranal de NRP-1.

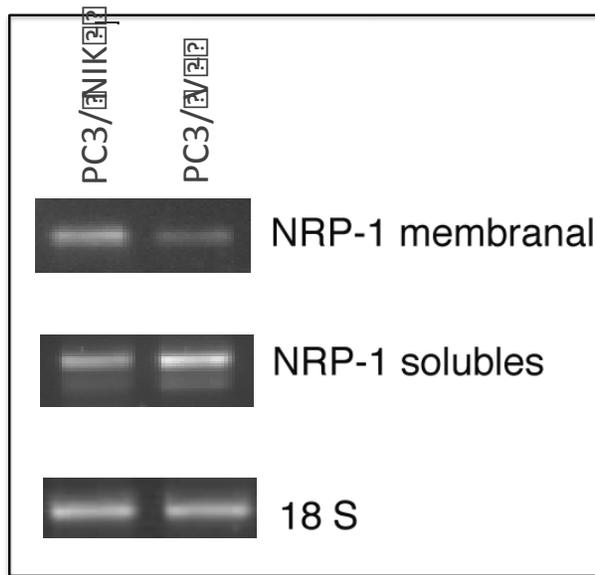


Figura 13. Niveles de NRP-1 en células PC3 con NIK inhibida. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V-) y de células transfectadas con el shRNA para NIK (PC3/NIK-).

Inhibición de la vía canónica de NFkB.

Para evaluar el efecto de la vía canónica de NFkB sobre las neuropilinas, determinamos los efectos de la alteración en la expresión, específicamente de la inhibición de esta vía sobre la expresión de NRP1 y las isoformas solubles.

Para promover la inhibición, creamos una línea celular estable que sobreexpresa un IkbAlpha mutado. Una vez seleccionadas con G418, la sobreexpresión de IkbAlpha mutada en las células transfectadas se corrobora a través de RT-PCR, ver Figura 14. La nueva línea celular estable se denominó PC3/IkBaDN. En ellas, la mayoría del factor de transcripción NFkB está secuestrado en el citoplasma.

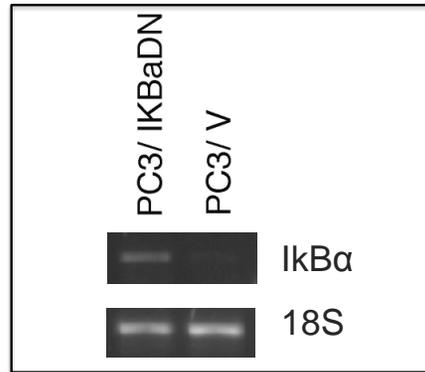


Figura 14. Inhibición de la vía canónica de NFκB. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V) y de las células transfectadas con el super represor para NFκB (PC3/IκBαDN).

Efecto de la inhibición de la vía canónica de NFκB en la expresión de neuropilinas.

Para evaluar si la inhibición de la vía canónica de NFκB promueve cambios en la expresión de las neuropilinas, realizamos un análisis de expresión por RT-PCR de ambas células (PC3/V- y PC3/ IkBaDN-)

En la figura 15, se puede observar que la inhibición de esta vía redujo la expresión de las isoformas solubles e incrementa la expresión de la isoforma membranal de NRP-1, mostrando el mismo efecto que observamos al inhibir la vía no canónica.

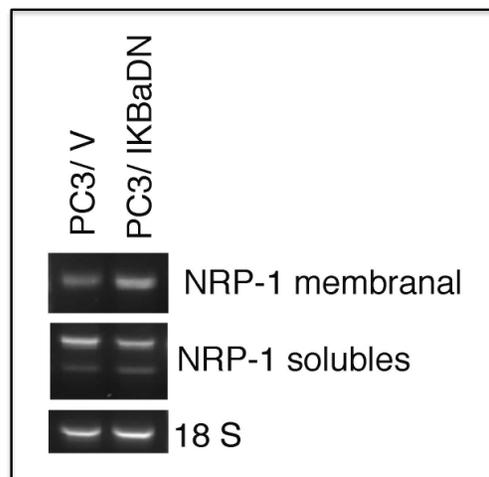


Figura 15. Expresión de NRP-1 en células PC3 con la vía canónica de NFκB inhibida. RT-PCR empleando RNA total extraído de células control transfectadas con el vector vacío (PC3/V) y de las células transfectadas con el super represor para NFκB (PC3/IκBαDN).

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos:

VÍA DE NFKB	Expresión de NRP1	Expresión de isoformas solubles
CANÓNICA INHIBIDA	↑	↓
NIK ACTIVADO	↓	↑
NIK INHIBIDO	↑	↓

DISCUSIÓN.

Cada vez existen más evidencias que apoyan la relación entre inflamación y algunas neoplasias. El cáncer de próstata frecuentemente presenta estadios inflamatorios crónicos. Sin embargo, los efectos causales que los relacionan son pocos conocidos. El factor de transcripción NFκB promueve la expresión de numerosos genes implicados en la inflamación y control del ciclo celular, supervivencia, proliferación, angiogénesis e invasividad. De esta manera, en un microambiente crónicamente inflamatorio, NFκB puede actuar tanto sobre células cancerosas como en las células inflamatorias, estableciendo ciclos de señalización entre ellas que refuerzan el microambiente inflamatorio y aportan señales de supervivencia a las células malignas. Existen evidencias que NFκB juega un papel muy importante en la iniciación y progresión del cáncer de próstata humano, existiendo una correlación entre la activación de NFκB y el grado de la agresividad del tumor.

La cascada de señalización de NFκB es vista como un blanco terapéutico contra el cáncer debido a su papel en la oncogénesis y la quimioresistencia en muchos tipos de tumores.

NFκB ha sido implicado en la progresión del cáncer de próstata a través de dos mecanismos: la promoción de metástasis a través de la expresión de MMP-9 o su promoción a través de vías andrógeno independientes a través de un mecanismo hasta ahora desconocido. Numerosos estudios han demostrado que en cáncer de próstata, así como en otros tipos de tumores, la metástasis se correlaciona directamente con el nivel de expresión de varios genes angiogénicos incluyendo; VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), IL-8 y de metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9⁽⁸⁰⁾. La expresión de proteínas MMP se asocia con mal pronóstico en una variedad de cánceres, incluyendo de próstata. Un aumento de MMP-2 y MMP-9 se asocia con la progresión del tumor, pero cómo es regulada la expresión de estos genes en cáncer de próstata es en la actualidad incierta. Se sabe sin embargo que NFκB se une al promotor MMP-9⁽⁸⁰⁾, lo cual es una evidencia mas de que la señalización de NFκB puede estar implicada en la metástasis de cáncer de próstata.

La inhibición inducida de la actividad de NFκB conduce a una disminución en la proliferación celular y la apoptosis.

Se ha demostrado que en células troncales de cáncer (CTC), NFκB presenta una mayor actividad que el resto de la población, sin embargo, aún no es completamente claro cómo es que

NFkB puede regular a las CTC y que moléculas podrían participar en la activación esta vía. NFkB tiene un papel clave en la formación de mamoesferas, y en la iniciación del tumor mediada por CTC. En células troncales de cáncer de mama se ha demostrado que NRP1 regula NFkB. (47). NRP1, es un co-receptor de factores de crecimiento ligados a la tumorigenicidad de algunas CTC. Al inhibir la expresión de NRP1 se reprime severamente la activación de NFkB y la formación de mamoesferas, lo cual pone de manifiesto el papel esencial de NRP1 en cáncer y el hecho de que esta actividad está ligada a la activación de NFkB. No es el único estudio que relaciona a NFkB con las neuropilinas, de hecho existe una clara relación entre NRP-1 y NFkappa B. Por ejemplo, en células endoteliales FGF induce NRP-1 vía NFkappaB (53). Recientemente, en un estudio donde evaluaron el papel de NRP1 en el desarrollo del síndrome de Sjögren (SS), realizado en células epiteliales de las glándulas salivales humanas, demostraron que NRP1 ejerce su función a través de la activación de NFkB (48). También se ha visto que la unión de Sema3A a NRP1 inhibe el receptor activador de NFkB (RANKL) (49).

Como la importancia biológica de la activación de NFkB, así como la expresión de NRP1 en cáncer de próstata es clara en la actualidad, se llevó a cabo este estudio para determinar si la vía de NFkB modula la expresión de neuropilinas en una línea celular de cáncer de próstata PC3.

Se investigó el efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de NFkB directamente sobre la expresión de NRP1 membranal y las isoformas solubles.

Como podemos observar la inhibición de la vía de NFkB, tanto la canónica como la alternativa, promueve un aumento en la expresión de NRP1 membranal y una disminución de la expresión de las isoformas solubles. En el caso opuesto, en donde la vía de NFkB se activo, como era esperado, ocurrió lo contrario, la actividad forzada de NIK promovió un aumento en la expresión de las isoformas solubles y una disminución de la isoforma membranal de NRP1.

Como mencionamos anteriormente, NRP1 juega un papel crítico en la angiogénesis, y la progresión del tumor. Diversos estudios demuestran que la regulación de la función de NRP1 en estos procesos es en múltiples niveles. Un mecanismo es la modulación de la expresión génica de NRP1. Otro mecanismo para la regulación de la función de NRP1 es la expresión de isoformas solubles, que a menudo actúan como antagonistas (81). Estas isoformas solubles se expresan en múltiples tejidos humanos normales [82], y algunos tejidos cancerosos.

Estudios previos han demostrado también que ya sea las isoformas solubles de NRP1 (sNRP) o una variante recombinante de NRP1 (B1B2 A1A2) pueden inhibir la unión a los receptores de VEGF en la superficie celular de VEGF165 y suprimir las actividades estimuladoras de VEGF165 en migración celular y proliferación ^(81,83).

Una de las funciones importantes de receptores de superficie celular solubles es secuestrar los ligandos afines del receptor de longitud completa, inhibiendo así los procesos fisiológicos mediados por dicho receptor. Por ejemplo, se ha observado que cuando se sobreexpresan las isoformas solubles de NRP1 en un modelo de carcinoma de próstata de rata, aumenta la apoptosis y disminuye el número y la integridad de los vasos sanguíneos, por lo tanto inhibe fuertemente la angiogénesis y la progresión tumoral ⁽⁸¹⁾.

Las sNRP son antagonistas funcionales de receptores de VEGF, lo que sugiere que estas moléculas NRP1 solubles pueden ser entidades farmacológicas útiles para regular la angiogénesis y el desarrollo neuronal durante los procesos fisiológicos y patológicos.

sNRP1 inhibe la angiogénesis tumoral dependiente de VEGF165 y también pueden inducir apoptosis mediante el secuestro de VEGF165. Se ha demostrado que VEGF165 es un factor de supervivencia tumoral y la inhibición de este promueve la apoptosis del tumor ⁽⁸⁴⁾.

Es base a estos y otros estudios, proponemos que en la línea celular de cáncer de próstata (PC3), la vía de NFκB (canónica o alternativa) modula la expresión de NRP1 y parece ser que es a través de la regulación de la expresión de las isoformas solubles, las cuales son inhibidoras y tienen funciones antagónicas de la isoforma membranal.

CONCLUSIONES.

- La inhibición de la vía canónica de NFkB en la línea celular de cáncer de próstata (PC3) promueve un incremento en la expresión de NRP1 membranar y una disminución en la expresión de las isoformas solubles.
- La inhibición de NIK en la línea celular de cáncer de próstata (PC3) promueve un incremento en la expresión de NRP1 membranar y una disminución en la expresión de las isoformas solubles.
- La expresión forzada de NIK en la línea celular de cáncer de próstata (PC3) disminuye la expresión de NRP-1 membranar e incrementa la expresión de las isoformas solubles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., Kirschenbaum, A. (2011). Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40(3): 565-575.
2. Selman, S. (2011). The McNeal prostate: a review. *Urology* 78(6): 1224-1228
3. Fine, S. W., Al-Ahmadie, H. A., et al. (2007). Anatomy of the anterior prostate and extraprostatic space: a contemporary surgical pathology analysis. *Adv Anat Pathol* 14(6): 401-407.
4. Liu AY, True LD, LaTray L, et al. (1997). Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10705-10710.
5. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG (2009). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155: 1985-1992.
6. Abrahamsson PA, Cockett AT, di Sant'Agnese PA (2008). Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8: 37-42.
7. Ahmedin Jemal, DVM, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, David Forman. (2011) *Global Cancer Statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians;61:69-90.
8. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cancer (2011).
9. Simeng Wen, Yuanjie Niu, Soo Ok Lee, Chawnshang Chan (2013). Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer Treatment Reviews*; 61:69-90.
10. Baud V, Karin M (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*; 8:33-40.
11. Wagenlehner FM, Elkahwaji JE, et al. (2007). The role of inflammation and infection in the pathogenesis of prostate carcinoma. *W BJU Int*. 100:733-7.
12. Karin M (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 441:431-6.
13. Chen CD, Sawyers CL (2002). NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol*. Apr;22(8):2862-70.

14. Joseph A. Di Donato Frank Mercurio Michael Karin (2012). NF-kappaB and the link between inflammation and cancer *Immunological Reviews* Vol. 246: 379–400
15. Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.
16. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25:6706-6716.
17. Bonizzi, G., and M. Karin. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
18. Scheidereit, C. (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25:6685-6705.
19. Hauer, J., S. Puschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers, C. Federle, and H. Engelmann. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF- kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2874- 2879.
20. Ghosh, S, and Kopp, E. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
21. Claudio, E., K. Brown, S. Park, H. Wang, and U. Siebenlist. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3:958-965.
22. Novack, D. V., L. Yin, A. Hagen-Stapleton, R. D. Schreiber, D. V. Goeddel, F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum. (2003). The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 198:771-781.
23. Schneider, G., D. Saur, J. T. Siveke, R. Fritsch, F. R. Greten, and R. M. Schmid. (2006). IKKalpha controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1-to S-phase progression. *EMBO J* 25:3801-3812.
24. Dejardin, E., N. Droin, *et al.* (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via NF-kappaB pathways. *Immunity* 17:525-535.
25. Karin, M. (2006). Nuclear factor kB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.
26. Kim, H. J., Hawke, N. and Baldwin, A. S. (2006). NFkB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ.* 13, 738–747.
27. Fan, Y., Dutta, J., Gupta, N., Fan, G. and Gelinas, C (2008). Regulation of programmed cell death by NFkB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 615, 223–250.

28. Johnson, R. F., Witzel, II and Perkins, N. D (2011). p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF κ B. *Cancer Res.* 71, 5588–5597.
29. Tan, W. *et al.* (2001) Tumour infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470, 548–553.
30. Staudt, L. M. Oncogenic activation of NF- κ B. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2, a000109 (2010).
31. Campbell, K. J., Rocha, S. and Perkins, N. D. (2004). Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF κ B. *Mol. Cell* 13, 853–865.
32. Dey, A., Tergaonkar, V. & Lane, D. P. (2008). Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF- κ B pathways. *Nature Rev. Drug Discov.* 7, 1031–1040.
33. Ravi, R. *et al.* (1998). p53-mediated repression of nuclear factor- κ B RelA via the transcriptional integrator p300. *Cancer Res.* 58, 4531–4536.
34. Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G. and Verma, I. (2002). p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1, 493–503.
35. Mauro, C. *et al.* (2011) NF κ B controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nature Cell Biol.* 13, 1272–1279.
36. O’Prey, J. *et al.* (2010). p53-mediated induction of Noxa and p53AIP1 requires NF κ B. *Cell Cycle* 9, 947–952.
37. Lee, T. L. *et al.* (2007). A novel nuclear factor- κ B gene signature is differentially expressed in head and neck squamous cell carcinomas in association with TP53 status. *Clin. Cancer Res.* 13, 5680–5691.
38. Neil D. Perkins (2010). The diverse and complex roles of NF κ B subunits in cancer. *Nature* 12, 127–142.
39. Baud V, Karin M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 8:33–40.
40. Karin M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 441:431–6.
41. Plaksin D, Baeuerle PA, Eisenbach L. (1993). KBF1 (p50 NF κ B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med.* 177:1651–62.

42. Lessard L, Karakiewicz PI, Bellon-Gagnon P, Alam-Fahmy M, et al. (2006). Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 12:5741-15.
43. Karin M, Ben-Neriah Y. (2006). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NFκB activity. *Annu Rev Immunol.*18:621-63.
44. Schalken JA. (2004). Molecular and cellular prostate biology: origin of prostate-specific antigen expression and implications for benign prostatic hyperplasia. *Int.* 93:5-9.
45. Dey, A., Wong, E. T., Bist, P., Tergaonkar, V. and Lane, D. P (2007). Nutlin-3 inhibits the NFκB pathway in a p53-dependent manner: implications in lung cancer therapy. *Cell Cycle* 6, 2178–2185.
46. Baud, V. & Karin, M (2009). Is NFκB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Rev. Drug Discov.* 8, 33–40.
47. Glinka Y, Mohammed N, Subramaniam V. (2012). Neuropilin-1 is expressed by breast cancer stem-like cells and is linked to NFκB activation and tumor sphere formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 7;425(4):775-80.
48. Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Fan F, McCarty MF, Wey J, Hicklin DJ, Ellis LM. (2012). Upregulation of neuropilin-1 by basic fibroblast growth factor enhances vascular smooth muscle cell migration in response to VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 425(4):775-80.
49. Sisto M, Lisi S, Lofrumento DD, D'Amore M, Ribatti D (2012). Neuropilin-1 is upregulated in Sjögren's syndrome and contributes to pathological neovascularization. *Histochem Cell Biol* May; 137(5):669-77.
50. Rossignol, M.; Gagnon, M.L.; Klagsbrun, M. 2000. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70, 211-222.
51. Kolodkin, A.L.; LeVengood, D.V.; Rowe, E.G.; Tai, Y.T.; Giger, R.J.; Ginty, D. D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
52. Cheng, H.J.; Bagri, A.; Yaron, A.; et al. (2001). Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron*, 32, 249-263.
53. Fuh, G.; Garcia, K.C.; de Vos, A.M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, 275, 26690-26695.

54. Prahst, C.; Heroult, M.; Lanahan, A.A.; Uziel, N.; Kessler, O.; Shraga-Heled, N.; Simons, M.; Neufeld, G.; Augustin, H.G. (2008). Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *J Biol Chem*, 283, 25110-25114.
55. Narazaki, M.; Segarra, M.; Hou, X.; Tanaka, T.; Li, X.; Tosato, G. (2010). Oligo- guanosinenucleotide induces neuropilin-1 internalization in endothelial cells and inhibits angiogenesis. *Blood*, 726, 118-127.
56. Bae, D.; Lu, S.; Taglienti, C.A.; Mercurio, A.M. (2008). Metabolic stress induces the lysosomal degradation of neuropilin-1 but not neuropilin-2. *J Biol Chem*, 283, 28074-28080.
57. Valdembri, D.; Caswell, P.T.; *et al.* (2009). Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol*, 7, e25
58. Castellani, V.; De, A.E.; Kenwrick, S.; Rougon, G. (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J*, 21, 6348-6357.
59. Mukoyama, Y.S.; Gerber, H.P.; Ferrara, N.; Gu, C.; Anderson, D.J. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation *via* neuropilin-1 mediated positive feedback. *Development*, 132, 941-952.
60. Takashima, S.; Kitakaze, M.; *et al.* (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 99, 3657- 3662.
61. Serini, G.; Valdembri, D.; *et al.* (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*, 424, 391-397.
62. Kessler, O.; Shraga-Heled, N.; Lange, T.; Gutmann-Raviv, N.; Sabo, E.; Baruch, L.; Machluf, M.; Neufeld, G. (2004). Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 64, 1008-1015.
63. Xu, Y.; Yuan, L.; *et al.* (2010). Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol*, 188, 115-130.
64. Maione, F.; Molla, F.; Meda, C.; Latini, R.; Zentilin, L.; Giacca, M.; Seano, G.; Serini, G.; Bussolino, F.; Giraudo, E (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest*, 119, 3356-3372.
65. S. Rizzolio and L. Tamagnone (2011). Multifaceted Role of Neuropilins in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18, 3563-3575

66. Wey, J.S.; Gray, M.J.; *et al.* (2005). Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br. J Cancer*, 93, 233-241.
67. Latil, A.; Bieche, I.; Pesche, S.; Valeri, A.; Fournier, G.; Cussenot, O.; Lide-reau, R. (2000). VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J Cancer*, 89, 167-171.
68. Kawakami, T.; Tokunaga, T.; *et al.* (2002). Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 2002, 95, 2196-2201.
69. Bielenberg, D.R.; Pettaway, C.A.; *et al.* (2006). Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp. Cell Res*, 312, 584-593.
70. Sanchez-Carbayo, M.; Socci, N.D.; Lozano, J.J.; Li, W.; Charytonowicz, E.; Belbin, T.J.; Prystowsky, M.B.; Ortiz, A.R.; Childs, G.; Cordon-Cardo, C. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol.*, 163, 505-516.
71. Jogi, A.; Vallon-Christersson, J.; Holmquist, L.; Borg, A.; Pahlman, S. (2003). Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp. Cell Res*, 2004, 295, 469-487.
72. Parikh, A.A.; Liu, W.B.; *et al.* (2003). Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer*, 98, 720-729.
73. Battaglia, A.; Buzzonetti, A.; Monego, G.; Peri, L.; Ferrandina, G.; Fanfani, F.; Scambia, G.; Fattorossi, A. (2008). Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology*, 123, 129-138.
74. Bachelder, R.E.; Lipscomb, E.A.; *et al.* (2003). Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res*, 63, 5230-5233.
75. Hong, T.M.; Chen, *et al.* (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 4759-4768.
76. Cao, Y.; Wang, L.; Nandy, D.; *et al.* (2008). Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. *Cancer Res*, 68, 8667-8672.
77. Kamiya, T.; *et al.* (2006). The preserved expression of neuropilin (NRP) 1 contributes to a better prognosis in colon cancer. *Oncol Rep.*, 15, 369-373.

78. Ball, S.G.; Bayley, C.; Shuttleworth, C.A.; Kielty, C.M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J*, 427, 29-40.
79. Traenckner E, Sherwin W and Patrick A. Baeuerle (1995) Phosphorylation of human I κ B on serines 32 and 36 controls I κ B-a proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *The EMBO Journal* vol.14 no.12 pp.2876-2883
80. Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, Rosier RN, *et al.* (2003). NF κ B: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Oct;(415 Suppl):S75-85.
81. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, *et al.* (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: in vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 97(6):2573-2578.
82. Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M (2000). Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70(2):211-222.
83. Mamluk R, Gechtman Z, *et al.* (2002) Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J. Biol. Chem*;277(27):24818-24825.
84. Rossignol M, Pouyssegur J, Klagsbrun M (2003). Characterization of the neuropilin-1 promoter: gene expression is mediated by the transcription factor Sp1. *J. Cell. Biochem*; 88(4):744-757.