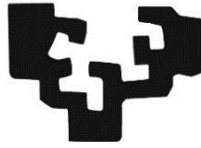


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Estudio del papel de E2F1/E2F2 en la transición epitelio-mesénquima (EMT): caracterización del fenotipo celular asociado y del mecanismo molecular subyacente

Tesis doctoral

Gartze Mentxaka Miranda
Leioa, 2019

Directoras: Ana María Zubiaga Elordieta y
Ainhoa Iglesias Ara

Gartze Mentxaka Miranda fue beneficiaria de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU13/04388). El trabajo de esta tesis ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-33551 y SAF2015-67562-R), el Gobierno Vasco (IT634-13) y la Universidad del País Vasco UPV/EHU (UFI11/20).

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 La familia E2F de factores de transcripción	13
1.1.1 Regulación transcripcional mediada por los factores E2F	14
1.1.2 Funciones de los factores E2F: Control del ciclo celular	18
1.1.2.1 Funciones de los factores E2F1-3	21
1.2 Transición epitelio-mesénquima (EMT).....	24
1.2.1 Cambios celulares y moleculares asociados al EMT.....	26
1.2.1.1 Polaridad y uniones celulares.....	26
1.2.1.2 Citoesqueleto, migración e invasión	28
1.2.2 Inductores de EMT	32
1.2.2.1 Rutas de señalización inductoras de EMT	32
1.2.2.1.1 Ruta TNF α	32
1.2.2.1.2 Ruta TGF- β	33
1.2.2.1.3 Ruta Wnt	33
1.2.2.1.4 Otras rutas.....	34
1.2.2.2 Factores de transcripción promotores de EMT.....	34
1.2.2.2.1 Papel de los factores de transcripción E2F en EMT	36
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1 Técnicas de biología celular	45
3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	45
3.1.2 Transfección	46
3.1.3 Tratamiento con TNF α	46
3.1.4 Viabilidad celular	47
3.1.5 Análisis del marcador de superficie CD44	47
3.1.6 Adhesión intercelular (formación de esferoides).....	48

3.1.7 Adhesión celular a colágeno	49
3.1.8 Ensayos de migración	49
3.1.8.1 Ensayo de migración <i>Transwell</i>	49
3.1.8.2 Ensayo de sellado de herida	50
3.1.9 Ensayos de invasión	50
3.1.9.1 Ensayo de invasión <i>Transwell</i>	50
3.1.9.2 Crecimiento invasivo de esferoides	51
3.2 Técnicas de biología molecular	51
3.2.1 Análisis de expresión de RNA	51
3.2.1.1 Extracción y purificación de RNA	51
3.2.1.2 Síntesis de cDNA	51
3.2.1.3 PCR cuantitativa	52
3.2.1.4 Secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq)	54
3.2.2 Análisis de expresión de proteína	55
3.2.2.1 Extracción de proteína	55
3.2.2.2 Cuantificación de proteína	55
3.2.2.3 <i>Western blot</i>	56
3.2.3 Inmunofluorescencia	57
3.2.4 Clonación y mutagénesis	58
3.2.5 Ensayo de luciferasa	59
3.3 Herramientas bioinformáticas	60
3.3.1 Análisis de la expresión génica diferencial	60
3.3.2 Análisis de componentes principales	60
3.3.3 Análisis de enriquecimiento	60
3.3.3.1 Motivos de unión de factores de transcripción	60
3.3.3.2 Procesos biológicos	61
3.3.3.3 Rutas de señalización	62
3.3.4 Localización de motivos de unión de factores de transcripción	62
3.4 Análisis estadísticos	62
3.5 Soluciones	63

4. RESULTADOS	65
4.1 Papel de los E2F activadores en el EMT: caracterización del sistema	67
4.1.0 Modelo celular y control positivo	67
4.1.1 Configuración experimental.....	67
4.1.2 Morfología celular	70
4.1.3 Adhesión.....	73
4.1.3.1. Adhesión intercelular	74
4.1.3.1.1 Formación de esferoides	74
4.1.3.1.2 Expresión de la proteína E-cadherina	75
4.1.3.2 Adhesión célula-matriz extracelular.....	80
4.1.3.2.1 Adhesión a colágeno	80
4.1.3.2.2 Niveles de expresión del marcador de superficie CD44.....	81
4.1.4 Migración	83
4.1.4.1 Ensayos de migración <i>Transwell</i>	83
4.1.4.2 Ensayos de sellado de herida (<i>Wound healing</i>)	86
4.1.5 Invasión	88
4.1.5.1 Ensayos de invasión <i>Transwell</i>	88
4.1.5.2 Crecimiento invasivo (esferoides).....	89
4.2 Búsqueda del mecanismo subyacente al EMT inducido por la depleción de E2F: identificación de genes desregulados en el sistema	92
4.2.1 Configuración experimental del análisis transcriptómico.....	92
4.2.2 Procesamiento de datos.....	94
4.2.3 Expresión diferencial de los miembros de la familia E2F.....	96
4.2.4 Regulación de la expresión génica por E2F1/2	97
4.2.4.1 Análisis de la región promotora de los genes diferencialmente expresados en células knockdown para E2F1/2.....	98
4.2.4.2 Análisis de los procesos biológicos regulados por E2F1 y E2F2	100
4.2.4.3 Análisis de las rutas de señalización celular reguladas por E2F1 y E2F2.....	103
4.2.5 Validación de los resultados de RNA-Seq.....	104
4.2.6 Identificación de genes de respuesta a E2F implicados en el proceso de EMT	107
4.3 SLUG como mediador del proceso de EMT en células knockdown para E2F1 y E2F2..	110
4.3.1 Experimentos de rescate del fenotipo EMT en ausencia de SLUG	110

4.3.1.1 Implicación de SLUG en los cambios morfológicos de células knockdown para E2F1/2	111
4.3.1.2 Implicación de SLUG en la migración de células knockdown para E2F1/2	112
4.3.1.2.1 Ensayos de migración <i>Transwell</i>	112
4.3.1.2.2 Ensayos de sellado de herida	113
4.3.1.3 Implicación de SLUG en la expresión génica diferencial de células knockdown para E2F1 y E2F2	115
4.3.2 Evaluación de la regulación transcripcional de SLUG por parte de E2F1/2	116
4.3.2.1 Estudio del promotor de SLUG	116
4.3.2.2 Regulación transcripcional de SLUG dependiente de los factores E2F	118
4.3.2.3 Regulación indirecta de SLUG mediada por los factores E2F	123
5. DISCUSIÓN	127
5.1 Papel de los factores E2F en el fenotipo EMT	129
5.2 Identificación de los genes desregulados tras el silenciamiento de E2F1/2	135
5.3 SLUG como mediador del fenotipo EMT en células knockdown para E2F1/2	139
5.4 Aproximaciones futuras	144
6. CONCLUSIONES	145
7. REFERENCIAS	149
8. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	176

RESUMEN

Los factores de transcripción E2F fueron inicialmente reconocidos por su papel en el control del ciclo celular. Posteriormente, se ha puesto de manifiesto que los E2F regulan un gran número de genes involucrados en otras funciones celulares muy diversas, incluidas la diferenciación celular, la autofagia o la reparación del DNA. A pesar del esfuerzo realizado hasta la fecha, quedan aún por definir muchos aspectos relacionados con las funciones específicas y redundantes de los factores E2F que ayuden a comprender su relevancia en la fisiopatología humana. En este trabajo hemos puesto de manifiesto que los E2F activadores (E2F1/E2F2) juegan un papel relevante en la regulación del proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) en células de cáncer colorrectal, una función no descrita hasta la fecha para estos factores de transcripción.

Hemos demostrado que E2F1/E2F2 actúan como inhibidores del proceso de EMT en líneas celulares de cáncer de colon. La depleción de estos factores conduce a la desestructuración de la monocapa epitelial dando lugar a células con morfología mesenquimal. La adquisición de esta morfología viene acompañada de la deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática y una pérdida en la capacidad de adhesión intercelular. Además, mostramos que las células de cáncer de colon knockdown para E2F1/2 adquieren capacidad migratoria e invasiva. El conjunto de estos resultados pone en relieve la implicación de los factores E2F1/E2F2 en la adquisición de características asociadas al proceso de EMT.

Nuestro análisis transcriptómico pone de manifiesto la implicación de E2F1/E2F2 en la regulación de genes relacionados con la motilidad y la adhesión celular en las células HCT116. El enriquecimiento en motivos de unión E2F en el promotor de estos genes sugiere que podrían estar directamente regulados por E2F1/2. Notablemente, hemos demostrado que E2F1/2 regulan de manera negativa la expresión de SLUG, factor de transcripción promotor de EMT, en células de cáncer de colon, y que SLUG actúa como mediador del fenotipo EMT ocasionado por la ausencia de E2F1/2.

Estos resultados evidencian un papel relevante de los factores E2F1/E2F2 como reguladores negativos del proceso de EMT en células de cáncer colorrectal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La familia E2F de factores de transcripción

El factor E2 (E2F) fue identificado por primera vez hace más de tres décadas como factor de transcripción celular necesario para la activación del promotor adenoviral E2 (Kovesdi, Reichel y Nevins, 1986). Estudios posteriores demostraron que el término “E2F” engloba a una extensa familia de factores de transcripción presente en todos los organismos multicelulares (Dimova y Dyson, 2005), cuyos miembros se caracterizan por regular la expresión de numerosos genes implicados en funciones tan diversas como la replicación y reparación del DNA, el ciclo celular, la apoptosis o la autofagia, activando o reprimiendo su transcripción (Muller *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2004; Lazzerini Denchi y Helin, 2005; Infante *et al.*, 2008; Polager, Ofir y Ginsberg, 2008; Mitxelena *et al.*, 2016, 2018).

En mamíferos, la familia E2F se compone de ocho genes (E2F1-8), que dan lugar a diez proteínas distintas: E2F1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7a, 7b y 8 (**Figura 1**). La secuencia de estas proteínas se encuentra relativamente conservada, particularmente en lo que respecta al dominio de unión al DNA (DNA Binding Domain, DBD), presente en todos los miembros de la familia. Mientras que los factores E2F1-6 son los denominados miembros “clásicos” de la familia E2F por tener un único DBD, los factores E2F7-8 forman el grupo de los miembros “atípicos” al poseer dos DBD.

Los miembros clásicos de la familia E2F se unen al DNA formando heterodímeros con una de las tres proteínas de dimerización (DP1, DP2 y DP3) a través del dominio de dimerización DP (**Figura 1**). Esta dimerización permite a los E2F unirse al DNA con una gran afinidad y actuar como reguladores de la transcripción (Helin *et al.*, 1993; La Thangue, 1994; Magae *et al.*, 1996). Por el contrario, los miembros atípicos de la familia no heterodimerizan con las proteínas DP, sino que homodimerizan o heterodimerizan entre ellos y utilizan sus dos DBD para unirse al DNA y regular la transcripción (Di Stefano, Jensen y Helin, 2003; Maiti *et al.*, 2005).

Los miembros de la familia E2F1-5 presentan además un dominio de transactivación en la región carboxilo terminal (**Figura 1**), que permite activar la transcripción de sus genes diana. Dentro de esta región de transactivación se encuentra el dominio de unión a proteínas “pocket” (PP), familia formada por las proteínas de la familia Retinoblastoma (pRB, p107 y p130). Cuando esta familia de proteínas se encuentra unida a los E2F, el dominio de transactivación queda oculto y no se permite la activación de la expresión génica por parte de los E2F.

Las proteínas E2F se localizan en su mayoría en el núcleo celular gracias a la señal de localización nuclear presente en su secuencia (**Figura 1**). E2F4 y E2F5 carecen de esta señal y poseen una

secuencia de exportación nuclear, por lo que dependen de su unión con las PP para ser transportados al núcleo y poder llevar a cabo su función como reguladores de la transcripción.

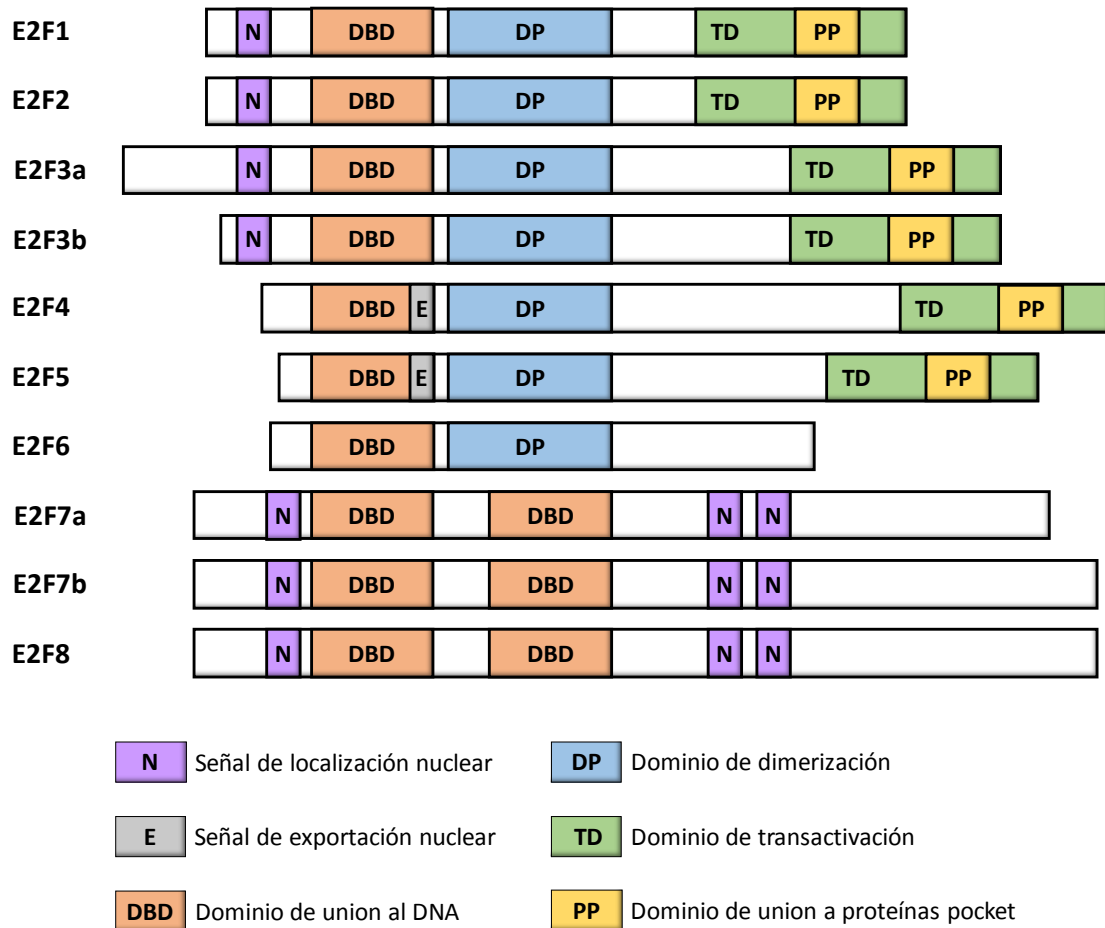


Figura 1: Representación esquemática de la familia E2F de factores de transcripción. Se encuentran representados los dominios principales de las proteínas E2F (modificado de Lv *et al.*, 2017).

1.1.1 Regulación transcripcional mediada por los factores E2F

Los factores de transcripción E2F regulan la transcripción mediante su unión a la región promotora de sus genes diana, donde activan o reprimen la transcripción. El motivo de unión al DNA presente en los promotores de los genes regulados por E2F posee una secuencia consenso conservada en mamíferos (TTTXXCGC, donde X puede ser C o G). Existe, sin embargo, evidencia de que los factores E2F son capaces de unirse al DNA en promotores que no presentan este motivo consenso (Weinmann *et al.*, 2002; Bieda *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Rabinovich *et al.*, 2008), aunque el conocimiento sobre este tipo de uniones es escaso. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los E2F pueden ser reclutados en el DNA a través de su interacción

con otras proteínas, no siendo precisa en estos casos la presencia de sitios E2F en el promotor (Lin *et al.*, 1996; Valdez *et al.*, 2011). En cualquiera de los casos, estudios a nivel genómico indican que los E2F se unen mayoritariamente a la región promotora proximal de sus genes diana (desde -1000pb hasta +500pb desde el inicio de la transcripción), crítica para la regulación de la expresión génica (Bieda *et al.*, 2006; Lee, Bhinge y Iyer, 2011; Westendorp *et al.*, 2012; Laresgoiti *et al.*, 2013).

El mecanismo molecular más conocido a través del cual los factores E2F regulan la transcripción de sus genes diana está basado en su interacción con las proteínas de la familia retinoblastoma pRB, p107 y p130 (PP). Los complejos E2F/PP más estudiados están constituidos por E2F1-3/pRB, E2F4-5/p130 y E2F4-5/p107 (Helin *et al.*, 1993; Lees *et al.*, 1993; Beijersbergen *et al.*, 1994; Hijmans *et al.*, 1995; Ikeda, Jakoi y Nevins, 1996; Infante *et al.*, 2008; Laresgoiti *et al.*, 2013). Cuando las PP se encuentran hipofosforiladas, éstas se unen con alta afinidad a los E2F a través de un dominio de unión específico, reprimiendo la transcripción por varios mecanismos distintos. El primero es el denominado “inhibición de la activación de E2F”: PP se une al dominio de unión específico que se encuentra embebido en el dominio de transactivación (TD) de E2F, bloqueando así la capacidad de E2F de reclutar la maquinaria necesaria para la transcripción a los promotores de sus genes diana (**Figura 2A**) (Flemington, Speck y Kaelin, 1993; Helin, Harlow y Fattaey, 1993). El segundo mecanismo es el denominado “represión activa de la actividad E2F”. En este caso, los complejos E2F1-3/PP reclutan modificadores de la cromatina tales como las histonas deacetilasas HDAC1/2 o el complejo SIN3B/ HDAC, así como histonas metiltransferasas (HMT) como HP1 y SUV39H, cuyas modificaciones promueven la condensación de la cromatina y, por tanto, la represión génica (**Figura 2A**) (Weintraub, Prater y Dean, 1992; Qin *et al.*, 1995; Trouche *et al.*, 1997; Brehm *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1998; Dahiya *et al.*, 2000; Narita *et al.*, 2003; Litovchick *et al.*, 2007; Schmit *et al.*, 2007; Talluri y Dick, 2012; Uchida, 2016).

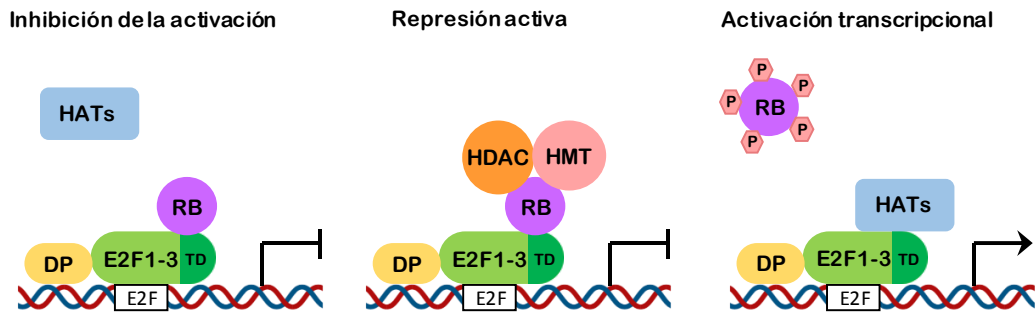
Además de los factores mencionados arriba, los complejos en los que participan E2F4-5 reclutan un conjunto de proteínas para formar el complejo DREAM (del inglés, *dimerization partner (DP), RB-like, E2F and multi-vulval class B (MuvB)*) (Fischer y Müller, 2017). El complejo DREAM participa en la represión de la expresión génica durante la fase G0, pero a diferencia de los complejos pRB-HDAC/HMT, no actúa a través de modificadores de histonas, sino que promueve el reclutamiento en las regiones promotoras de H2A.Z (Latorre *et al.*, 2015), una variante de la histona H2A, lo que reduce el acceso al DNA de la RNA polimerasa al provocar la compactación de los nucleosomas (Marques *et al.*, 2010).

La activación transcripcional mediada por los factores E2F se produce tras su disociación de las PP (Farkas *et al.*, 2002; Burke *et al.*, 2010; Liban *et al.*, 2016). E2F1, E2F2 y E2F3 han sido considerados como los principales activadores de la transcripción, ya que la sobreexpresión de cualquiera de ellos es suficiente para activar la transcripción de genes clásicos de respuesta a E2F (Trimarchi y Lees, 2002), mientras que la sobreexpresión de E2F4 y E2F5 no da lugar a los mismos niveles de inducción de la expresión génica, posiblemente porque carecen de dominios de localización nuclear que los conduzcan al núcleo (Magae *et al.*, 1996; Lindeman *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1997; Verona *et al.*, 1997). Los factores E2F1-3, enlazados a sus proteínas DP, se unen a la región promotora de sus genes diana y reclutan a través de su dominio de transactivación (TD) complejos proteicos con actividad histona acetiltransferasa (HAT) (**Figura 2A**). La acetilación de las colas de las histonas estimula la transcripción al provocar una conformación menos compacta de la cromatina, permitiendo así la entrada de la RNA polimerasa. Se ha observado que E2F1 es capaz de unirse a la histona acetiltransferasa GCN5, lo que promueve la activación de un reportero dependiente de E2F en experimentos de transfección transitoria (Lang *et al.*, 2001). Otros autores han demostrado que la histona acetiltransferasa Tip60 interacciona con E2F1 en experimentos de sobreexpresión. La expresión ectópica de E2F1 resulta en el reclutamiento de cinco subunidades del complejo Tip60 (Tip60, TRRAP, p400, Tip48 and Tip49) en los promotores regulados por los E2F (Taubert *et al.*, 2004).

E2F1-3 son capaces de interactuar con otras proteínas, además de pRB, y así regular su actividad. Por ejemplo, durante la progresión del ciclo celular, los factores E2F1-3 interactúan con el complejo CDK2/ciclina A a través del dominio de unión de ciclina A presente en su estructura (Krek *et al.*, 1994; Krek, Xu and Livingston, 1995). Como resultado, se produce la fosforilación de los complejos E2F/DP, con la subsecuente disociación del complejo y la pérdida de afinidad de E2F por el DNA (Dymlacht *et al.*, 1997). La inhibición de la actividad de E2F1 por el complejo CDK2/ciclina A durante la fase S es necesaria para permitir a las células entrar en fase G2 del ciclo celular (Xu *et al.*, 1994; Kitagawa *et al.*, 1995). Por otra parte, parece existir una sinergia funcional entre el factor E2F1 y la proteína SP1 (Lin *et al.*, 1996). E2F1 es capaz de estimular la transcripción mediada por SP1, incluso en promotores que únicamente contienen sitios SP1. Esta cooperación se produce a través de la interacción física entre E2F1 y SP1 (Lin *et al.*, 1996) (**Figura 2B**). Por su parte, E2F2 y E2F3 interactúan específicamente con YY1 y RYBP (Schlisio *et al.*, 2002). La activación transcripcional de Cdc6, mediador de replicación del DNA, ocurre únicamente cuando E2F2 o E2F3 interactúan con YY1, una vez unidos al promotor mediante la proteína RYBP (**Figura 2B**). Estudios similares han observado que E2F3 y TFE3 actúan de manera sinérgica para activar la expresión de la subunidad p68 de la DNA polimerasa α , y que

esa activación es dependiente de la interacción física entre ambos factores de transcripción (Giangrande *et al.*, 2003).

A Regulación transcripcional dependiente de RB



B Regulación transcripcional independiente de RB

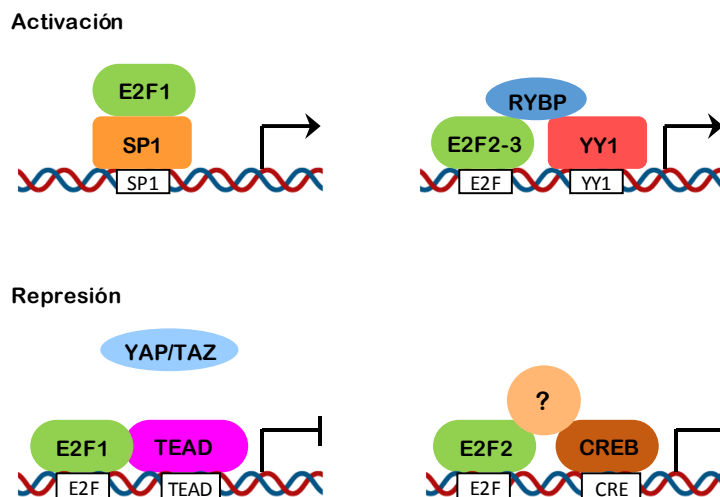


Figura 2: Regulación transcripcional mediada por las interacciones de los E2F activadores. (A) Se representan los principales complejos proteicos formados por los E2F activadores que participan en la regulación transcripcional dependiente de RB. (B) Se ilustran varios ejemplos de interacciones de los E2F activadores con diversas proteínas, dando lugar a una regulación transcripcional independiente de RB.

La interacción de los E2F activadores con otras proteínas no se limita únicamente a la modulación de su capacidad de activación transcripcional, sino que también tiene efecto sobre su actividad represora. En células epiteliales de próstata humana, E2F1 reprime el promotor del receptor androgénico de manera independiente de RB y sin necesidad de su dominio de unión al DNA (Valdez *et al.*, 2011). Los autores atribuyen esta capacidad a su interacción con DNMT1. La represión de E2F1 independiente de RB también se ha observado sobre los genes activadores de plasminógeno (Koziczak, Krek y Nagamine, 2000). La inhibición directa del promotor de estos genes por parte de E2F1 no requiere de su dominio de transactivación ni de la presencia de las

proteínas RB. De manera interesante, al mutar los lugares AP-1 del promotor de estos genes, la represión mediada por E2F1 es abolida, sugiriendo la necesidad de interacción de E2F1 con proteínas reclutadas en estos lugares del promotor. Asimismo, E2F1 es considerado como un represor de la vía Hippo debido a su interacción con TEAD1 (P. Zhang *et al.*, 2017). El factor YAP, en conjunto con TEAD1, dirige la regulación transcripcional de la vía Hippo gracias a la unión del complejo al promotor de sus genes diana a través del dominio de unión al DNA de TEAD1. La interacción de E2F1 con TEAD1 impide la formación de dicho complejo y por tanto la transcripción mediada por YAP asociada a la vía Hippo (**Figura 2B**), encargada del control del crecimiento y homeostasis tisular. Por otro lado, E2F2 coopera con CREB en la regulación transcripcional de sus genes diana (Laresgoiti *et al.*, 2013). La unión al DNA de CREB en el promotor de *Mcm5* y *Chk1* es necesaria para la represión de estos genes mediada por E2F2. No se ha demostrado interacción directa entre E2F2 y CREB, posiblemente por tratarse de una interacción débil en la que participan otras proteínas, además de E2F2 y CREB (**Figura 2B**). Estos ejemplos ponen de manifiesto la complejidad de la regulación transcripcional mediada por los E2F, y apoyan la idea de que dicha regulación requiere de la integración de señales procedentes de las interacciones entre distintos factores de transcripción.

Por su parte, el grupo de factores represores E2F6, E2F7 y E2F8 carecen de dominio de transactivación, donde también se localiza el dominio de unión a proteínas pocket, por lo tanto, ejercen su función represora de manera independiente de la familia de proteínas RB. E2F6 es un miembro clásico de la familia, que dimeriza con DP, y actúa como represor formando complejos con diversos conjuntos de proteínas entre los que se incluyen el complejo represor Polycomb 1 (PRC1) y complejo represor Polycomb 2 (PRC2) (Trimarchi *et al.*, 2001; Attwooll *et al.*, 2005; Leung y Nevins, 2012). E2F7 y E2F8 son los miembros atípicos de la familia y se caracterizan por poseer dos dominios de unión al DNA, al cual se unen formando homodímeros o heterodímeros entre ellos (Di Stefano, Jensen y Helin, 2003; Maiti *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Sus mecanismos de represión no se conocen en profundidad. Diversos estudios han demostrado que E2F7 ejerce su regulación transcripcional a través de su interacción con otros co-represores tales como CTBP1 y CTBP2, a través de los cuales recluta a las proteínas con función deacetilasa HDAC1/2 (Liu *et al.*, 2013; Zalmas *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014), con la subsecuente represión génica.

1.1.2 Funciones de los factores E2F: Control del ciclo celular

La familia de factores de transcripción E2F es principalmente conocida por su papel en la regulación del ciclo celular. Los E2F, junto con sus proteínas de dimerización (DP), y eventualmente con la familia de proteínas RB, se unen a la región promotora de diversos genes

a lo largo de los distintos estadios del ciclo celular, asegurando la correcta expresión temporal de sus genes diana y controlando así la adecuada progresión del ciclo celular (Dimova y Dyson, 2005).

De acuerdo con el modelo actual de regulación del ciclo celular, en células quiescentes (G0), la transcripción génica requerida para la entrada y progresión en el ciclo se encuentra reprimida por complejos formados por proteínas pocket hipofosforiladas unidas a los factores E2F (Weinberg, 1995; Trimarchi y Lees, 2002) y a un diverso grupo de proteínas modificadoras de la cromatina (Uchida, 2016; Fischer y Müller, 2017). Se ha demostrado que los complejos represores presentes durante esta fase están formados por E2F4-5 (Figura 3) (Takahashi, Rayman y Dynlacht, 2000; Wells *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2004), así como por E2F1-3 (Figura 3), dependiendo del tipo celular (Infante *et al.*, 2008; Laresgoiti *et al.*, 2013). Mientras que los primeros son más prevalentes en fibroblastos, los segundos son igual de prevalentes en células linfoides.

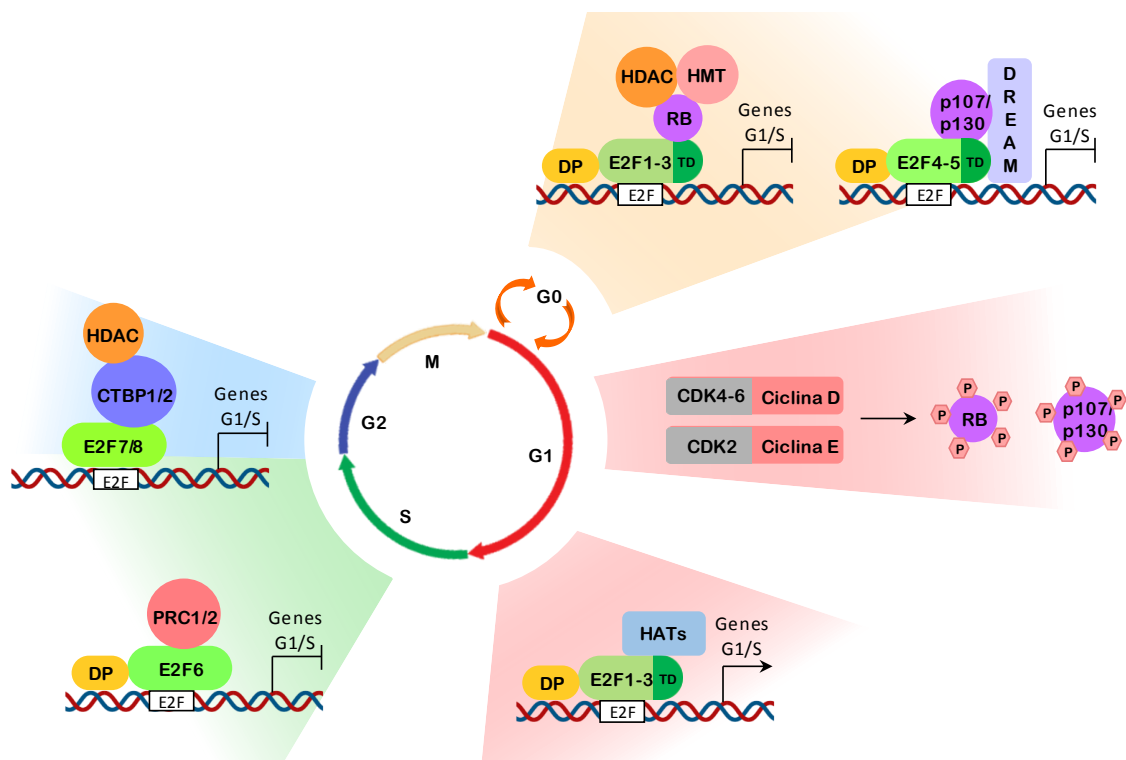


Figura 3: Modelo de regulación transcripcional asociada al ciclo celular ejercida por los E2F y las proteínas pocket. Durante las fases G0 y G1, los complejos formados por E2F1-3 y E2F4-5 y las proteínas pocket hipofosforiladas mantienen la represión de los genes de respuesta a E2F. Tras estimulación mitogénica, se produce la fosforilación secuencial de las proteínas pocket por los complejos CDK/Ciclina, provocando la liberación de los E2F. Estos eventos conducen a la activación transcripcional mediada por E2F1-3, que conduce a las células hacia la entrada y progresión en la fase S. La transcripción específica de los genes de transición G1/S es atenuada durante las fases S y G2 por la acción de E2F6 y E2F7/8.

La estimulación de células quiescentes mediada por factores de crecimiento activa diversas cascadas de señalización que conducen a la activación de los complejos CDK/ciclina, permitiendo así su entrada en el ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2001). Una de estas vías de señalización es la RAS-MAPK, por medio de la cual las quinasas MAP fosforilan a los factores de transcripción MYC y AP-1, lo que lleva a la activación transcripcional de la ciclina D1, CDK4 y CDK6 (Coleman, Marshall y Olson, 2004; Bretones, Delgado y León, 2015). Durante la fase G1 temprana, los nuevos complejos proteicos formados por CDK4-6/ciclina D1 son capaces de monofosforilar a las proteínas pocket (Narasimha *et al.*, 2014). Se piensa que esta monofosforilación es suficiente para disociar a algunos E2F de sus complejos represores, dando lugar a la expresión de algunos de sus genes diana, como la ciclina E (Ohtani, DeGregori y Nevins, 1995). Durante la fase G1 tardía, la ciclina E se une al CDK2 y juntos multifosforilan a pRB previamente monofosforilado, dando lugar a la completa disociación de los complejos E2F/RB (Narasimha *et al.*, 2014). Los complejos CDK4-6/ciclina D y CDK2/ciclina E también fosforilan a p107 y p130 (**Figura 3**) (Beijersbergen *et al.*, 1995; Mayol, Garriga y Graña, 1995) dando lugar a la liberación de E2F4 y E2F5, que son exportados del núcleo al citoplasma (Lindeman *et al.*, 1997; Gaubatz *et al.*, 2001; Apostolova *et al.*, 2002), por lo que se cree que no participan mayoritariamente en la inducción transcripcional de genes diana.

La liberación de E2F1-3 durante la fase G1 tardía y la activación transcripcional asociada, constituye un evento crucial en la superación del punto de restricción y la entrada en fase S (Johnson *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 2008; Bertoli, Skotheim y de Bruin, 2013). Los genes de transición a la fase S que son activados cumplen funciones relacionadas con la replicación del DNA (p. ej. MCM2-7, CDC6, PCNA, POLA1-2), síntesis de nucleótidos (p. ej. DHFR, TK), o progresión del ciclo (p. ej. CCNE1-2, CDC7, CHEK1) (Slansky *et al.*, 1993; DeGregori, Kowalik y Nevins, 1995; Leone *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002). Cabe destacar que E2F1-3 se unen a los promotores de sus propios genes, activando su transcripción y dando lugar a un bucle de retroalimentación positiva que amplifica su función de activación transcripcional en la transición G1/S (Johnson, Ohtani y Nevins, 1994; DeGregori, Kowalik y Nevins, 1995; Sears, Ohtani y Nevins, 1997; Adams *et al.*, 2000). Cuando las células avanzan en la fase S, los E2F represores (E2F6-8) son inducidos por E2F1-3, y sustituyen a E2F1-3 en los promotores de sus genes diana reprimiendo la transcripción de los genes G1/S una vez finalizada la síntesis y replicación del DNA (**Figura 3**) (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano, Jensen y Helin, 2003; Giangrande *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005; Westendorp *et al.*, 2012; Mitxelena *et al.*, 2016).

Aproximaciones experimentales genómicas a gran escala han permitido la identificación de un gran número de genes diana de E2F a partir de la década de los 2000. Estas aproximaciones

experimentales incluyen el empleo de micromatrices (*microarrays*) de oligonucleótidos de DNA para la detección de cambios en la expresión génica provocados por la sobreexpresión o inactivación de los E2F (Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001; Polager *et al.*, 2002; Stanelle *et al.*, 2002; Young, Nagarajan y Longmore, 2003; Iglesias *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011), ensayos a nivel genómico de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos para E2F (Weinmann *et al.*, 2001, 2002; Ren *et al.*, 2002) o, más recientemente, la combinación de diversos métodos, incluyendo estudios de RNA-Seq, ChIP-Seq, proteómica o análisis de bases de datos genómicos masivos (Infante *et al.*, 2008; Thomassen, Tan y Kruse, 2008; Azkargorta *et al.*, 2010; Lee, Bhinge y Iyer, 2011; Johnson *et al.*, 2012; Westendorp *et al.*, 2012; Laresgoiti *et al.*, 2013; Hollern *et al.*, 2014; Mitxelena *et al.*, 2016). Además de ampliar la lista de genes diana de E2F implicados en la replicación del DNA y entrada en fase S, estas aproximaciones experimentales permitieron encontrar genes regulados por E2F en las fases G2 y mitosis, sugiriendo que sus funciones en el control del ciclo celular se extienden más allá de la regulación y la progresión de la fase S. No solo eso, se descubrió que los E2F regulaban un gran número de genes involucrados en funciones celulares distintas a la regulación del ciclo celular, incluyendo la diferenciación celular, la reparación del DNA, la autofagia o la apoptosis.

1.1.2.1 Funciones de los factores E2F1-3

Numerosos experimentos realizados *in vitro* han demostrado la capacidad de E2F1-3 de activar la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular cuando se encuentran en condiciones de sobreexpresión, por lo que se han venido considerando promotores de la proliferación e inhibidores de la diferenciación celular (Trimarchi y Lees, 2002; Fang y Han, 2006). La culminación del estado de diferenciación terminal se asocia con la parada, y en última instancia, con la salida irreversible del ciclo celular (Myster y Duronio, 2000; Ruijtenberg y van den Heuvel, 2016). En este sentido, se ha observado, por ejemplo, que las propiedades proliferativas de E2F1 reprimen la habilidad de queratinocitos en proliferación de responder a estímulos de diferenciación e inhibe la expresión de genes específicos de la diferenciación (Dicker *et al.*, 2000), o que el silenciamiento de E2F3 mediado por miR-152 inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de mioblastos (Gan *et al.*, 2018).

Este modelo clásico donde se ha asignado a E2F1-3 una función activadora de la entrada y progresión en el ciclo celular ha sido cuestionado por resultados obtenidos con modelos *in vivo*. Así, nuestro grupo ha demostrado que la pérdida individual de E2F1 y de E2F2, o de manera más drástica, la pérdida combinada de E2F1 y E2F2 produce resultados opuestos a los esperados,

puesto que da lugar a la sobreexpresión de genes diana y a la aceleración de la proliferación celular en varios tipos celulares (Murga *et al.*, 2001; Infante *et al.*, 2008; Iglesias-Ara *et al.*, 2010; Laresgoiti *et al.*, 2013). Estos resultados han sido posteriormente confirmados por otros autores (Chong *et al.*, 2009; Pusapati *et al.*, 2009; P. Zhang *et al.*, 2017) y sugieren que la función principal de estos factores *in vivo* es el de mantener a las células en estado quiescente y reprimir su entrada en el ciclo celular.

El papel inhibitorio de la diferenciación celular de estos E2F activadores también se ha visto cuestionado. Curiosamente, la ausencia combinada de E2F1 y E2F2 *in vivo* conduce a una pérdida del estado diferenciado en distintos contextos celulares, particularmente en el páncreas de ratones knockout para E2F1/2 (Iglesias *et al.*, 2004; Iglesias-Ara *et al.*, 2015). La arquitectura del páncreas de estos ratones muestra severas anormalidades al producirse una pérdida de los distintos tipos de células especializadas, incluyendo la desaparición de los islotes de Langerhans o la disminución y pérdida de polaridad de las células acinares, así como la presencia de células con características en transición entre células endocrinas y exocrinas. Asimismo, se produce un aumento de la cantidad de grasa y tejido fibrótico en la zona. Como resultado se observa un páncreas atrófico incapaz de generar insulina, y el desarrollo de diabetes en estos ratones (Iglesias *et al.*, 2004). La ausencia de E2F1-2 provoca, además, la aceleración de la replicación del DNA, causando estrés replicativo, senescencia celular y apoptosis dependiente de p53 (Iglesias-Ara *et al.*, 2010, 2015). Otros autores también han observado la formación de complejos represores E2F1-3/pRB en células en diferenciación, reprimiendo así la transcripción de sus genes diana y facilitando la salida del ciclo celular (Chong *et al.*, 2009). El conjunto de estos estudios otorga a E2F1-3 un papel importante en la inducción y el mantenimiento de la diferenciación celular.

Merece destacarse el hecho de que, las células pancreáticas de ratones knockout para E2F1/2 muestran una deslocalización llamativa de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática (datos no publicados) (**Figura 4**). La E-cadherina forma parte de las uniones intercelulares epiteliales y su ausencia de la membrana plasmática ocasiona la pérdida de adhesión célula-célula (van Roy y Berx, 2008). Por lo tanto, la regulación de E-cadherina es clave en diversos procesos biológicos, particularmente durante el desarrollo embrionario (van Roy y Berx, 2008; Lim y Thiery, 2012; Schneider y Kolligs, 2015). Las células pertenecientes a distintas capas embrionarias deben reorganizarse y migrar para conformar los diferentes órganos y tejidos. La deslocalización de E-cadherina de la membrana plasmática permite la disociación inicial de las células de su tejido de origen y posibilita la migración. Por ejemplo, la disminución de los niveles de E-cadherina es necesaria durante los procesos de gastrulación (Burdal, Damsky y Pedersen,

1993; Zohn *et al.*, 2006; Hirano *et al.*, 2008) y de formación de la cresta neural (Taneyhill, 2008; Dady, Blavet y Duband, 2012). Tras el proceso de desarrollo, cuando los órganos y tejidos se encuentran formados, la presencia de E-cadherina en la membrana plasmática refuerza la cohesión entre células epiteliales y contribuye al mantenimiento de la homeostasis tisular (Schneider *et al.*, 2010; Serrill, Sander y Shih, 2018). De manera patológica, la migración e invasión celular asociada a la metástasis también requieren de la deslocalización de E-cadherina de la membrana plasmática (Onder *et al.*, 2008; Canel *et al.*, 2013; Schneider y Kolligs, 2015).

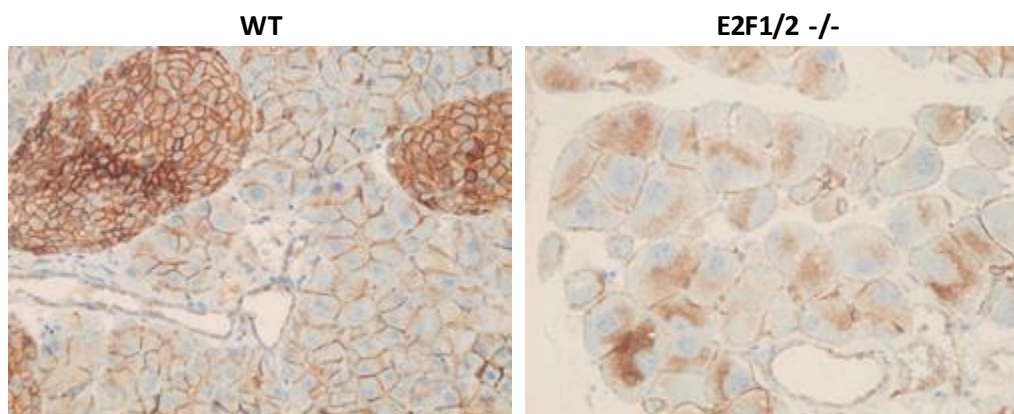


Figura 4: Deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática en páncreas de ratones knockout para E2F1/2. En la figura se muestran imágenes representativas de secciones de páncreas de ratones macho de dos meses de edad, salvajes (WT) y E2F1/2 $-/-$, teñidas con anticuerpo anti-E-cadherina. Las secciones están visualizadas con un microscopio óptico empleando una magnificación de 400x.

El conjunto de transformaciones celulares que experimentan tanto las células embrionarias como las células tumorales necesarias para su disociación del tejido adyacente y adquisición de capacidad migratoria es posible gracias a un proceso en el que células de origen epitelial adquieren características mesenquimales. Este proceso de transdiferenciación se conoce como transición epitelio-mesénquima (EMT) (Lim y Thiery, 2012; Mittal, 2018). La deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática es considerada como un hito en el progreso del EMT (Peinado, Portillo y Cano, 2004). La participación de los factores E2F en diversos procesos de diferenciación celular, así como la deslocalización de la E-cadherina en células pancreáticas con características de células desdiferenciadas de ratones knockout para E2F1 y E2F2 nos induce a pensar en la posible implicación de estos E2F en este proceso de transición epitelio-mesénquima, un tema muy poco analizado hasta la fecha, y cuyo estudio constituye el objetivo de la presente tesis. A continuación, se revisan en detalle los diversos eventos que constituyen el progreso del EMT, así como la relación de los E2F con este proceso de la que se tiene conocimiento hasta el momento.

1.2 Transición epitelio-mesénquima (EMT)

La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico en el que células epiteliales experimentan múltiples cambios bioquímicos a través de los cuales adquieren características mesenquimales (Kalluri y Weinberg, 2009; Nieto, 2009; Thiery *et al.*, 2009). Durante este proceso, las células epiteliales pierden su polaridad apical-basal, así como sus uniones célula-célula características para adoptar una morfología mesenquimal que permite y promueve la capacidad migratoria e invasiva (**Figura 5**). El EMT es un proceso fisiológico que ocurre durante el desarrollo embrionario y durante la reparación de heridas en tejidos adultos (Lim y Thiery, 2012; Stone *et al.*, 2016). De manera patológica, el EMT facilita la progresión e invasión tumoral promoviendo la metástasis (Mittal, 2018), y puede provocar fibrosis en diversos órganos durante el proceso de reparación de heridas (Thiery *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2016).

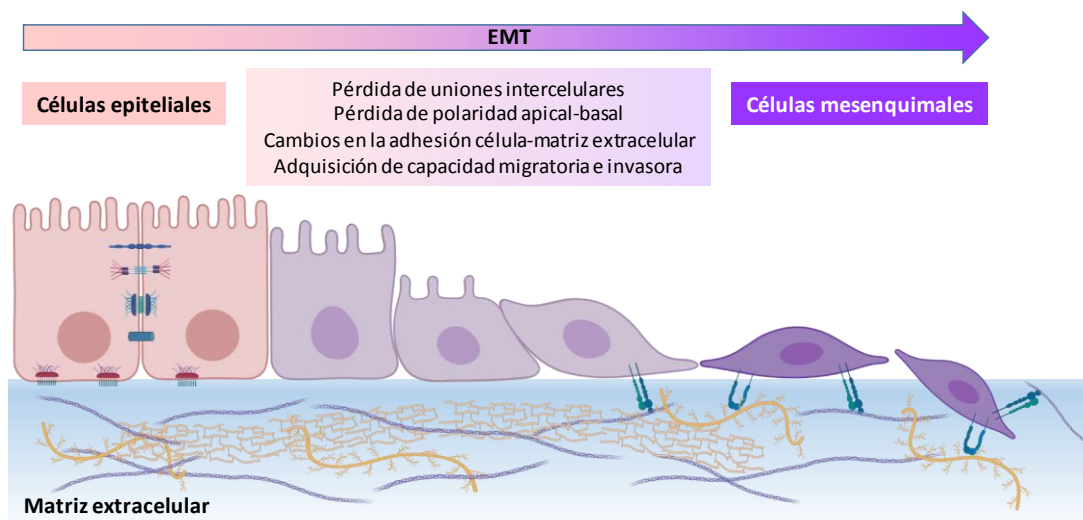


Figura 5: Representación esquemática del proceso de EMT. Las células epiteliales pierden sus uniones intercelulares y polaridad apical-basal. Al mismo tiempo, se produce una reestructuración del citoesqueleto celular y se facilitan nuevos contactos con la matriz extracelular que posibilitan la migración e invasión.

El concepto de EMT fue descrito por primera vez por Greenburg y Hay, que demostraron en experimentos *in vitro* cómo el microambiente experimentado por cultivos celulares epiteliales tenía un profundo efecto en su morfología y capacidades migratorias (Greenburg y Hay, 1982). La primera evidencia de EMT *in vivo* vino de la mano del embrión de pollo, donde la activación del EMT era esencial para la regulación de la formación del mesodermo durante la gastrulación y la migración de células desde el tubo neural para formar la cresta neural (Nieto *et al.*, 1994). Trabajos posteriores siguen resaltando la contribución del EMT a la regulación de diversos eventos durante el desarrollo (Lim y Thiery, 2012; Gros y Tabin, 2014). En individuos adultos, el programa de EMT es importante en la regeneración tisular y reparación de heridas. Durante este

proceso, queratinocitos epiteliales experimentan EMT para poder migrar al lugar de la herida, y allí proliferar y volver a su estado basal epitelial, restaurando así la integridad de la barrera epitelial como parte de un proceso conocido como reepitelización (Stone *et al.*, 2016). Además, los miofibroblastos, cuyo origen también depende del proceso de EMT (Iwano *et al.*, 2002), juegan un papel esencial en la cicatrización de la herida, secretando proteínas asociadas a la matriz extracelular, tales como las fibras de colágeno (Hinz y Gabbiani, 2003). En un proceso normal de reparación de heridas, los miofibroblastos entran en apoptosis una vez la reepitelización se ha completado. De manera patológica, señales de EMT sostenidas en el tiempo pueden dar lugar a una excesiva secreción de fibras de colágeno por parte de los miofibroblastos, provocando fibrosis en diversos órganos (Thiery *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2016).

El EMT es un proceso necesario durante la progresión tumoral hacia una mayor malignización. Durante la metástasis, las células abandonan el tumor primario, atraviesan la matriz extracelular y se introducen en vasos sanguíneos o linfáticos, proceso denominado intravasación. A través de los conductos sanguíneos o linfáticos las células metastáticas llegan a un nuevo destino, donde, tras producirse la extravasación, proliferan en su nuevo asentamiento y forman una metástasis (Sahai, 2007). Los cambios celulares asociados al EMT propician en gran medida la consecución de estos acontecimientos (Mittal, 2018). Para ello, el EMT promueve la disolución de las uniones intercelulares de las células epiteliales, así como la reorganización del citoesqueleto y cambios morfológicos asociados a la adquisición de capacidad migratoria e invasora. Estos cambios permiten a las células disociarse del tumor o tejido de origen, invadir la matriz extracelular y adentrarse en el sistema sanguíneo y/o linfático. Estas células tumorales circulantes se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos de los órganos metastáticos y comienzan la extravasación y migración por el tejido parenquimático, donde finalmente se asientan. Sorprendentemente, observaciones procedentes de estudios clínicos evidencian un fenotipo epitelial de las células que conforman la metástasis (Rubin *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2004; Christiansen y Rajasekaran, 2006; Chao, Shepard y Wells, 2010). Este hecho es actualmente explicado apelando a la capacidad de las células mesenquimales que conforman la metástasis de revertir el proceso de EMT y volver a adquirir un fenotipo epitelial, a través del proceso denominado transición mesénquima-epitelio (MET) (Thiery, 2002; Yao, Dai y Peng, 2011; Bonnomet *et al.*, 2012; Gunasinghe *et al.*, 2012; Stankic *et al.*, 2013). La vuelta al fenotipo epitelial permitiría a las células metastáticas adherirse al nuevo epitelio y adaptarse a su nuevo entorno. De esta manera, el EMT/MET constituye un proceso transitorio y reversible, aludiendo al concepto de plasticidad epitelio-mesenquimal (Brabletz, 2012). De acuerdo con esta idea, las

células pueden experimentar procesos de EMT parciales, exhibiendo un amplio espectro de fenotipos epiteliales/mesenquimales (Chaffer *et al.*, 2016; Nieto *et al.*, 2016).

1.2.1 Cambios celulares y moleculares asociados al EMT

1.2.1.1 Polaridad y uniones celulares

Las células del tejido epitelial se caracterizan por poseer una polaridad apical-basal característica, con tres zonas diferenciadas en su membrana plasmática: apical, lateral y basal (Giepmans y van IJzendoorn, 2009). Las uniones intercelulares localizadas en estos dominios mantienen una gran cohesión entre células, y permiten que el tejido epitelial actúe como una barrera de protección frente a factores externos. Los tipos de uniones intercelulares presentes en el tejido epitelial son las uniones ocluyentes en la zona lateral apical, uniones adherentes, desmosomas, uniones gap en el dominio lateral y hemidesmosomas en el dominio basal (Giepmans y van IJzendoorn, 2009). En contraposición, las células mesenquimales se caracterizan por su polaridad antero-posterior, poca presencia de uniones intercelulares, una morfología celular alargada y, en ocasiones, prolongaciones citoplasmáticas (Abercrombie, 1978).

Con el inicio del EMT, los diferentes tipos de uniones epiteliales se desensamblan, y las proteínas que formaban parte de estos complejos se relocalizan o se degradan (Huang, Guilford y Thiery, 2012). De manera temprana en el proceso de EMT, PAR6, proteína que forma parte de las uniones ocluyentes, es fosforilada por el receptor tipo II de TGF β (T β RII) en respuesta a TGF β , y recluta a SMURF1, que provoca la ubiquitinación y degradación de RHOA y la disolución de las uniones ocluyentes (Ozdamar *et al.*, 2005). La desaparición de las uniones ocluyentes es reforzada mediante la represión transcripcional de claudinas y ocludinas por factores de transcripción promotores de EMT (Ikenouchi *et al.*, 2003). Por su parte, la disolución de los desmosomas parece estar vinculada a la deslocalización de desmoplaquinas y desmogleinas (Savagner, Yamada y Thiery, 1997), y a la represión transcripcional de placofilinas (Aigner *et al.*, 2007). Las uniones gap también se ven comprometidas al producirse una reducción de los niveles de conexinas (Bax *et al.*, 2011).

Uno de los hitos más consensuados en el progreso del EMT es la deslocalización de la proteína E-cadherina de las uniones adherentes. Con el inicio del EMT, los principales factores de transcripción que orquestan su progresión, esto es, las familias SNAI (SNAIL y SLUG), ZEB (ZEB1 y ZEB2) y TWIST1, reprimen transcripcionalmente a E-cadherina (Batlle *et al.*, 2000; Grootclaes y Frisch, 2000; Comijn *et al.*, 2001; Bolos *et al.*, 2003; Peinado, Olmeda y Cano, 2007; Vesuna

et al., 2008). El desmantelamiento de las uniones adherentes provocada por la pérdida de E-cadherina trae consigo la activación de la vía de Wnt, al liberar a la proteína β -catenina de estos complejos (**Figura 6**). La proteína β -catenina, que actúa como enlace entre la E-cadherina y el citoesqueleto de actina en las uniones adherentes, se acumula en el citoplasma y finalmente se traslada al núcleo celular. Allí, β -catenina actúa como factor de transcripción con la familia TCF/LEF de cofactores (Behrens *et al.*, 1996; Korinek *et al.*, 1997). La transcripción asociada a la activación de la vía Wnt contribuye a su vez al progreso del EMT (Brabletz *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2019; Dongre y Weinberg, 2019). De esta manera, la pérdida de E-cadherina de las uniones adherentes juega un doble papel en la progresión del EMT: por un lado, provoca la disolución de las uniones adherentes, lo que lleva a la pérdida de la polaridad y adhesión celular, y a su vez, contribuye a la activación transcripcional de la vía Wnt mediada por β -catenina.

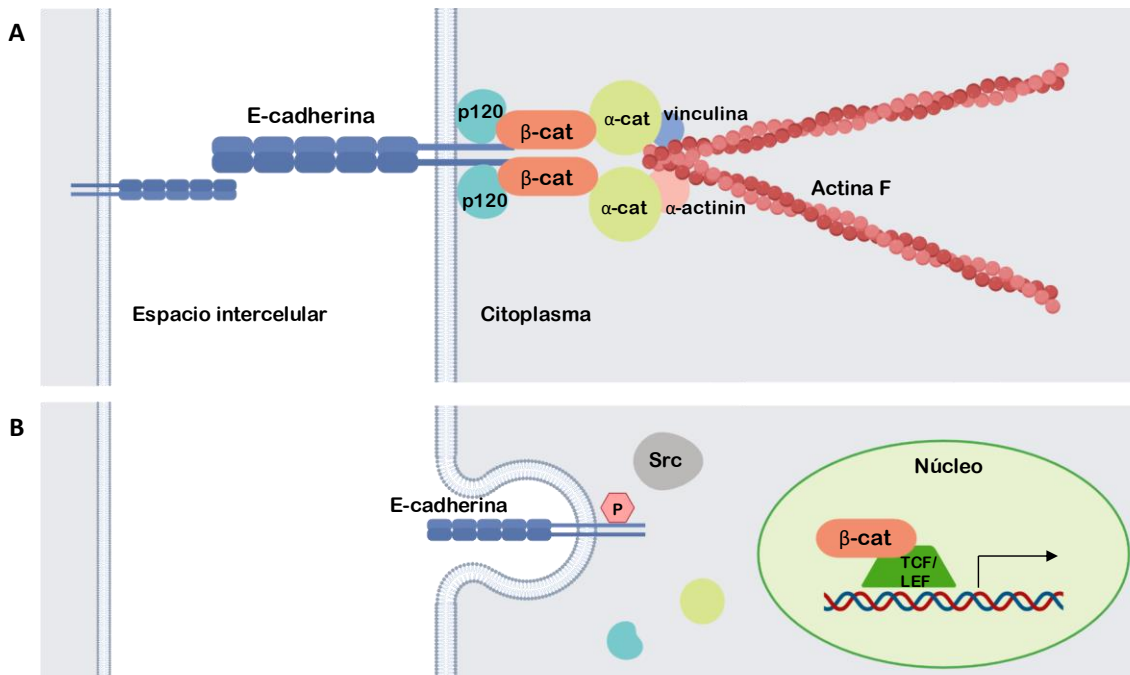


Figura 6: Representación esquemática de unión adherente y consecuencias de su desmantelamiento. (A) Se representan las principales proteínas involucradas en las uniones adherentes. (B) se ilustra un posible proceso de desmantelamiento de estas uniones como consecuencia de la endocitosis de E-cadherina mediada por la fosforilación de su dominio citoplasmático por Src. La β -catenina se traslada al núcleo celular donde actúa como regulador transcripcional junto con los cofactores TCF/LEF.

Aunque la regulación transcripcional parece ser el tipo de regulación que mayoritariamente explica las modulaciones que experimenta E-cadherina durante el EMT, esta proteína puede ser regulada a distintos niveles. Algunos trabajos han reportado que los niveles de expresión de E-cadherina no se ven alterados durante el EMT (Bakin *et al.*, 2000; Bhowmick, Ghiassi, *et al.*,

2001). Otros factores, como su estabilización mediante otras proteínas, modifican la velocidad de degradación de las cadherinas. La catenina p120 es capaz de estabilizar a E-cadherina y otras cadherinas (Reynolds, 2007). En su ausencia, los niveles de expresión de E-cadherina no se modifican, mientras que los niveles proteicos se ven disminuidos por un aumento en su velocidad de degradación (Davis, Ireton y Reynolds, 2003; Xiao *et al.*, 2003), lo que puede provocar la desestabilización de las uniones adherentes. Por otro lado, E-cadherina puede ser internalizada como consecuencia de la fosforilación de su dominio citoplasmático mediado por Src (**Figura 6B**) (W. Liu *et al.*, 2015). La fosforilación de otros miembros de las uniones adherentes por proteínas tirosina-quinasa (PTKs) también puede provocar la endocitosis de E-cadherina y desmantelamiento de las uniones adherentes (Adam, 2015). Durante la gastrulación, el proceso de desregulación de E-cadherina debe ocurrir de manera veloz, por lo que la represión transcripcional por sí sola no es suficiente para disminuir sus niveles proteicos a tiempo. En este caso, E-cadherina es regulada a nivel post-traducciona mediante su interacción con la proteína interactora de p38, la quinasa MAP-p38 y la proteína FERM (Zohn *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2008).

Tras la pérdida de E-cadherina de las uniones intercelulares, ésta es sustituida por otra proteína de la familia, la N-cadherina, lo que altera las características de la adhesión celular (Wheelock *et al.*, 2008). Con este intercambio, las células experimentando EMT pierden su capacidad de adhesión a otras células epiteliales y adquieren afinidad por otras células mesenquimales a través de interacciones homotípicas con otras N-cadherinas. Estas interacciones son más débiles que las interacciones homotípicas entre E-cadherinas, facilitando la migración e invasión celular (Theveneau y Mayor, 2012).

1.2.1.2 Citoesqueleto, migración e invasión

El desmantelamiento de las uniones intercelulares trae consigo cambios en la estructura del citoesqueleto, ya que los distintos complejos de adhesión se encuentran anclados al citoesqueleto de actina o filamentos intermedios. Durante el EMT el citoesqueleto se reorganiza para permitir la elongación dinámica y motilidad celular (Thiery y Sleeman, 2006; Yilmaz y Christofori, 2009; Sun *et al.*, 2015).

Las GTPasas RHO regulan la dinámica y reorganización de los filamentos de actina durante el EMT. Tras la activación de RHO, la quinasa dependiente de RHO (ROCK) coopera con DIA1 para promover la polimerización de actina (Narumiya, Tanji y Ishizaki, 2009). Las GTPasas RHO, junto con otras proteínas, también intervienen en la conversión de la polaridad apical-basal epitelial a una polaridad antero-posterior (Nelson, 2009; Godde *et al.*, 2010). Para alcanzar la polaridad

direccional, los complejos PAR y Scribble junto con los complejos PATJ y Crumbs se relocalizan en la parte anterior celular, donde RAC1 y CDC42 promueven la formación de la formación de prolongaciones citoplasmáticas (**Figura 7A**). Por su parte, RHOA se localiza en la parte posterior celular y facilita la disolución de uniones celulares y la retracción celular (Nelson, 2009). Por otro lado, los filamentos intermedios, anclados a los desmosomas, también sufren modificaciones. Durante el EMT, los filamentos intermedios del tipo I, característicos de células epiteliales y ricos en queratinas, son sustituidos por filamentos del tipo III, característicos de células mesenquimales y formados por vimentina (Kim y Coulombe, 2007; Sun *et al.*, 2015; Robert, Hookway y Gelfand, 2016). La disminución de los niveles de expresión de las citoqueratinas 8 y 18 (KRT8 y KRT18) y el aumento de la expresión de vimentina (VIM) son considerados como marcadores asociados al EMT (Kidd, Shumaker y Ridge, 2013; C.-Y. Liu *et al.*, 2015; Polioudaki *et al.*, 2015). La reorganización de los filamentos intermedios está asociada al aumento de la capacidad migratoria de las células (Mendez, Kojima y Goldman, 2010; Lamouille, Xu y Derynck, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Durante el proceso de migración, las células establecen contactos con la matriz extracelular a través de uniones denominadas adhesiones focales. Estas uniones focales se materializan mediante la unión de integrinas celulares a componentes de la matriz extracelular (**Figura 7B**). En la progresión del EMT, se producen cambios de expresión de diversas integrinas (Margadant y Sonnenberg, 2010; Mamuya y Duncan, 2012). Por ejemplo las integrinas conformadas con la subunidad $\beta 1$ que interaccionan con colágeno del tipo I ($\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$) o con fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) se ven incrementadas (Maschler *et al.*, 2005; Koenig *et al.*, 2006). La subunidad $\beta 1$ desempeña un papel importante en los procesos migratorios durante el desarrollo embrionario, incluyendo la migración de retinoblastos y neuroblastos (Clegg *et al.*, 2003). Por otro lado, la integrina epitelial $\alpha 6\beta 4$ media los contactos con la lámina basal y algunos estudios han observado una reducción de su expresión durante el EMT (Yang *et al.*, 2009). Por el contrario, otros trabajos relacionan la presencia de $\alpha 6\beta 4$ con un aumento de la capacidad invasiva celular (Yoon, Shin y Mercurio, 2006), por lo que existe cierta controversia en cuanto al rol de esta integrina. Además de posibilitar la migración a través del establecimiento de las adhesiones focales, las integrinas actúan como importantes vías de señalización intracelular (Harburger y Calderwood, 2009). Este es el caso de la integrina $\beta 1$, necesaria para la señalización mediada por TGF β y activación de p38MAPK necesaria para la inducción de EMT (Bhowmick, Zent, *et al.*, 2001).

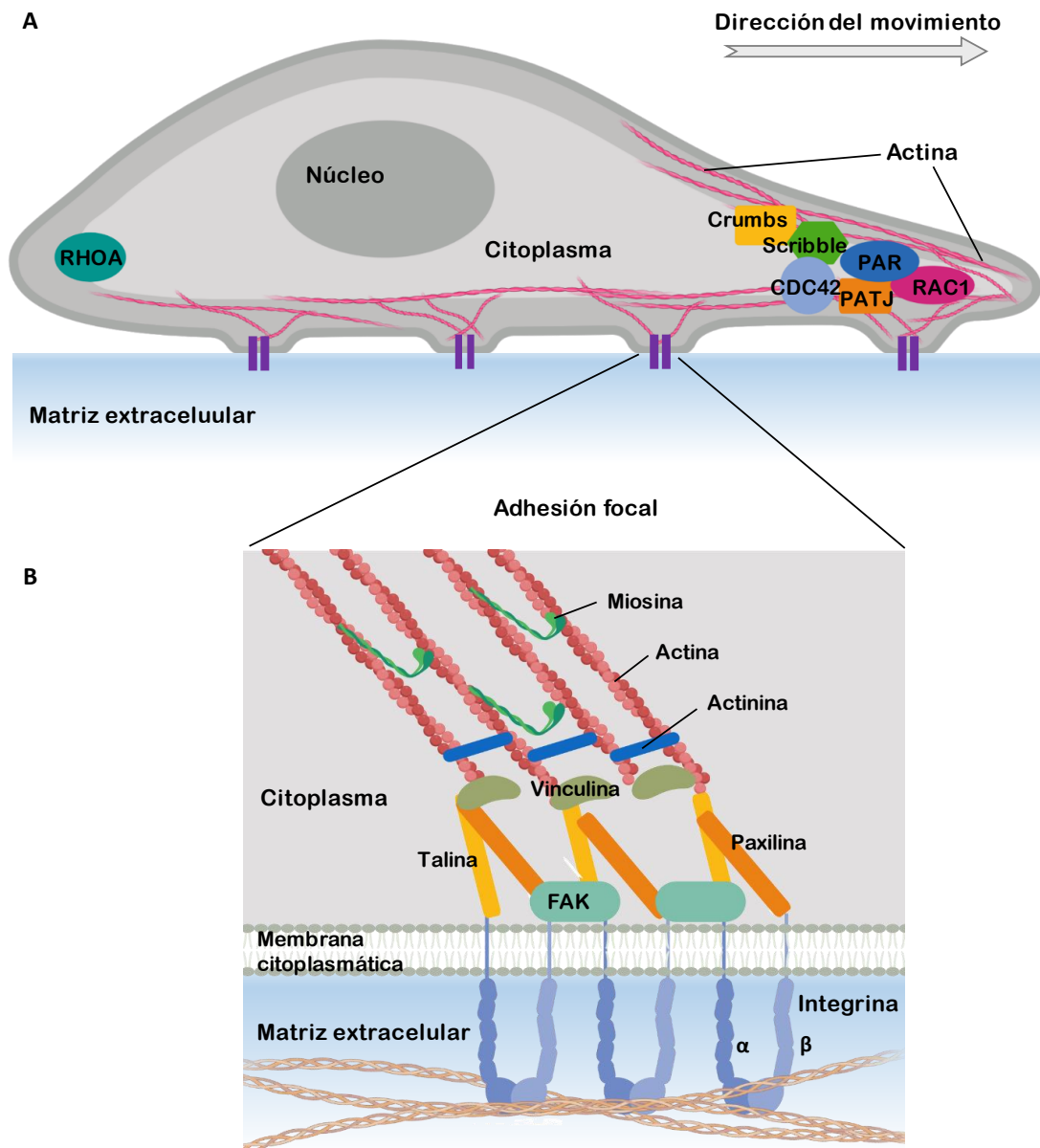


Figura 7: Representación esquemática de célula migratoria y adhesión focal. (A) Se representa una célula migratoria y los principales complejos proteicos involucrados en la consecución de su polaridad antero-posterior. (B) Detalle de adhesión focal en el que se muestran las principales proteínas que la componen.

Otra molécula que contribuye al establecimiento de contactos con la matriz extracelular es la glicoproteína transmembrana CD44. La unión de CD44 al ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular, induce cambios conformacionales que activan la señalización intracelular y promueven la migración e invasión celular (Xu *et al.*, 2015; Senbanjo y Chellaiah, 2017; Chen *et al.*, 2018). Aunque el ácido hialurónico se considera su ligando más específico, CD44 es capaz de unirse a otras moléculas de la matriz extracelular (Verfaillie *et al.*, 1994; Toyama-Sorimachi *et al.*, 1995; Knutson *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996). CD44 está ampliamente expresado en embriones de pollo durante la migración de diferentes linajes celulares (Corbel, Lehmann y

Davison, 2000). Además, numerosos trabajos relacionan positivamente los niveles de CD44 con la progresión del EMT en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de vejiga (G. Yu *et al.*, 2014), próstata (Klarmann *et al.*, 2009), páncreas (Jiang *et al.*, 2015), hígado (Fernando *et al.*, 2015), estómago (D. Yu *et al.*, 2014) y colon (Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso continúan siendo en gran medida desconocidos. Estudios *in vitro* en células de cáncer colorrectal indican que CD44 induce EMT a través de la activación de la señalización PI3K-Akt y MAPK-Ras-Erk1/2 (Kim *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2016). En células gástricas tumorales se ha observado un mecanismo distinto (D. Yu *et al.*, 2014). La familia de microRNAs miR-106b se encuentra sobreexpresada en las células CD44 positivas. Esta familia de microRNAs inhibe al represor SMAD7, activando así la vía TGF β /SMAD y promoviendo el EMT, si bien se desconoce si CD44 es causa o consecuencia de la activación de dicha vía. La inducción de CD44 se correlaciona con los factores de transcripción promotores de EMT SNAIL (Kidan *et al.*, 2017), SLUG (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2010), ZEB1 (Wu *et al.*, 2013), y TWIST1 (Way *et al.*, 2014), aunque no hay constancia de la unión directa a su promotor, por lo que esta inducción estaría mediada por otras proteínas. De manera interesante, E-cadherina, gen diana de estos factores de transcripción inductores de EMT, actúa como represor de la actividad de CD44, interrumpiendo la interacción de CD44 con el ácido hialurónico (Xu y Yu, 2003). Es más, la pérdida de E-cadherina en células de cáncer de próstata induce la expresión de CD44 y Egr-1 (Deep *et al.*, 2014), regulador de la actividad promotora de CD44 (Maltzman, Carman y Monroe, 1996; Fitzgerald y O'Neill, 1999).

El aumento de la capacidad migratoria durante el EMT se ve acompañado por la adquisición de capacidad invasiva, lo que permite a las células atravesar la matriz extracelular. Las proteínas más estudiadas asociadas a la degradación de la matriz extracelular son la familia de las metaloproteinasas (MMPs) (Gilles *et al.*, 2013). Esta capacidad de degradación de la matriz extracelular permite la remodelación de tejidos durante el desarrollo (Apte y Parks, 2015), lo cual fue observado por primera vez en la reabsorción de la cola de *Xenopus* (Gross y Lapierre, 1962). Durante el EMT, la expresión de diversas MMPs se ve alterada, particularmente la MMP-2 y MMP-9 (Jorda *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2009; Radisky y Radisky, 2010; Lamouille *et al.*, 2012), encargadas de la degradación de la membrana basal. Varios estudios han mostrado una regulación directa de las MMPs por factores de transcripción asociados al EMT. Así, la regulación de MMP-2 por parte de SNAIL ha sido demostrada en células de carcinoma escamoso (Yokoyama *et al.*, 2003). La regulación de MMPs también ha sido asociada, sin establecer la conexión con el proceso de EMT, a los factores de transcripción de la familia ETS (Singh *et al.*, 2002). Otros estudios demuestran la implicación de β -catenina/TCF en la regulación transcripcional de las

MMPs (Brabletz *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1999; Marchenko *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002).

1.2.2 Inductores de EMT

1.2.2.1 Rutas de señalización inductoras de EMT

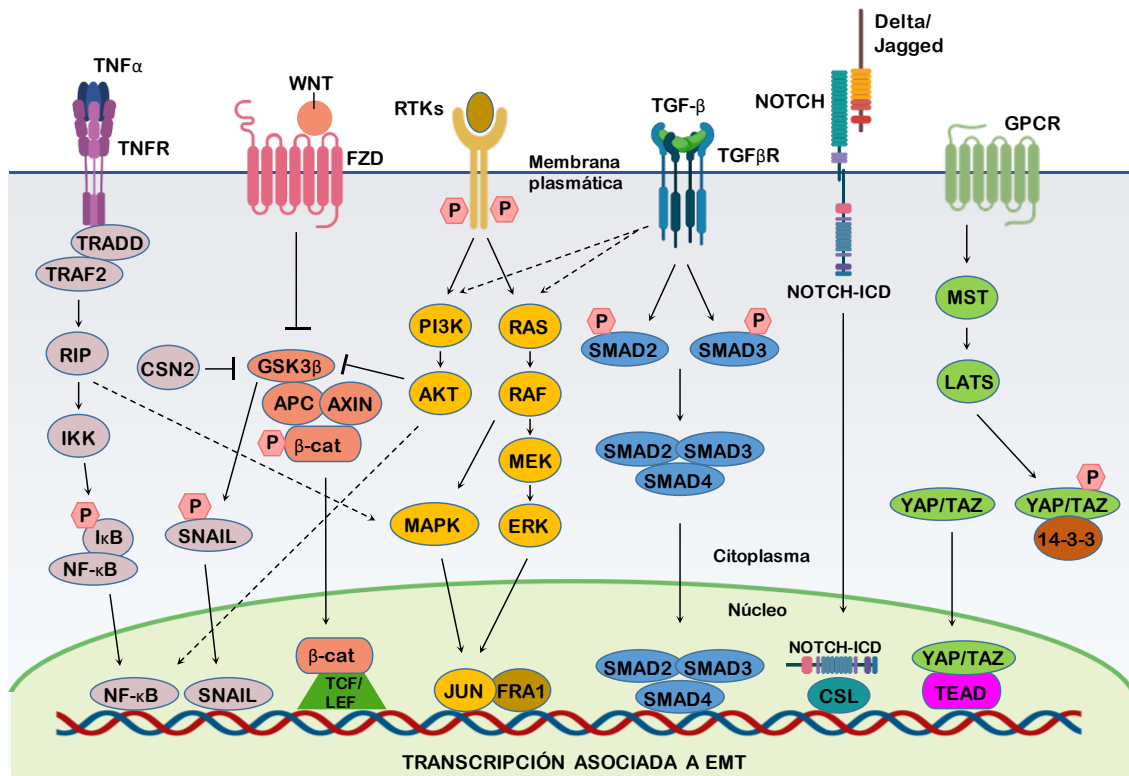


Figura 8: Principales rutas de señalización inductoras de EMT. Se muestran, de manera esquemática, las proteínas principales que participan en cada ruta en el ámbito de la membrana plasmática, citoplasma y núcleo. De izquierda a derecha, se representan las rutas TNF α , Wnt, PI3K/AKT, Ras/MAPK, TGF- β , Notch, y Hippo (Modificada de Dongre y Weinberg, 2019).

1.2.2.1.1 Ruta TNF α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es un importante activador de la vía canónica de NF- κ B (Figura 8). La activación de la vía se produce cuando TNF α se une a los receptores TNF α I y II (TNFR1 y TNFR2) dando lugar a su trimerización y al reclutamiento de TRADD a su dominio citoplasmático. Se inicia así una cascada de señalización (Figura 8) que conduce a la liberación de NF- κ B (Wu y Zhou, 2010; Hayden y Ghosh, 2014), que es trasladado al núcleo donde actúa como factor de transcripción. La regulación transcripcional asociada a NF- κ B incluye una gran cantidad de genes diana implicados en procesos inflamatorios, proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Yang, Wu y Wang, 2016). Entre estos genes se encuentran SNAIL, ZEB1, TWIST y el propio TNF α , lo que permite mantener la activación de esta vía una vez que el

EMT ha sido activado. Además, SNAIL es regulado por TNF α mediante mecanismos post-traduccionales (Wu y Zhou, 2010). Así, TNF α , a través de NF- κ B activa transcripcionalmente a CSN2 que inhibe a GSK-3 β , impidiendo el marcaje para ubiquitinación de SNAIL. De esta manera, TNF α estabiliza a SNAIL, impidiendo su degradación (Wu *et al.*, 2009). La inhibición de GSK-3 β impide también la degradación de β -catenina (Wu y Pan, 2010), que se acumula y entra en el núcleo donde activa la transcripción asociada a la vía Wnt. Finalmente, la activación de la cascada de señalización de TNF α también activa la vía MAPK (Aggarwal, 2003; Wu y Zhou, 2010), promotora de EMT.

1.2.2.1.2 Ruta TGF- β

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) juega un papel central en la inducción del EMT en diversos tejidos (Xu, Lamouille y Derynck, 2009; Dongre y Weinberg, 2019). TGF- β se une a los receptores TGF- β tipo I y II (TGF β R1 y TGF β R2), dando lugar a la activación de proteínas SMAD y su transporte al núcleo (**Figura 8**), donde funcionan como factores de transcripción regulando la expresión de una gran cantidad de genes, entre los que se encuentran SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST (Son y Moon, 2010; Lamouille, Xu y Derynck, 2014; Dongre y Weinberg, 2019). Estos factores, a su vez, pueden activar la expresión del propio TGF- β , estableciendo un circuito de retroalimentación positiva de la vía, lo que permite mantener la expresión del programa EMT una vez que ha sido activado (Dhasarathy *et al.*, 2011; Grande *et al.*, 2015; Dongre y Weinberg, 2019). Por otro lado, TGF- β activa cascadas de señalización no dependientes de la familia SMAD, tales como las vías de GTPasas RHO, Ras/MAPK o PI3K/AKT (Derynck y Zhang, 2003; Moustakas y Heldin, 2005; Son y Moon, 2010), que también contribuyen al progreso del EMT.

1.2.2.1.3 Ruta Wnt

La proteína β -catenina es la principal efectora de la regulación transcripcional de la vía canónica de señalización Wnt (**Figura 8**). La activación de la ruta Wnt, bien por estimulación de los receptores FZD o por mutaciones en algún componente de la vía, conduce a la inhibición de GSK3 β , evitando la fosforilación y degradación de β -catenina (Kishida *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002; Wu y Pan, 2010), que se acumula en el citoplasma y finalmente es transportada al núcleo celular. Allí, β -catenina actúa como factor de transcripción con la familia TCF/LEF de cofactores (Behrens *et al.*, 1996; Korinek *et al.*, 1997). La transcripción asociada a la activación de la vía Wnt contribuye al progreso del EMT (Brabletz *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2019; Dongre y Weinberg, 2019). Entre los genes regulados directa o indirectamente por la ruta Wnt se encuentran los factores de transcripción SNAIL, SLUG y TWIST (Yook *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Dongre y Weinberg, 2019), promotores de EMT. Además, como dianas de la ruta se ha

identificado a miembros de la propia vía de señalización Wnt, proporcionando una autorregulación positiva de la ruta tras su activación (Logan y Nusse, 2004).

1.2.2.1.4 Otras rutas

Otras vías cuya señalización se encuentra asociada con la progresión de EMT son las rutas Hippo, Notch, Ras/MAPK o PI3K/AKT (**Figura 8**). Cuando la ruta Hippo no se encuentra activa, YAP/TAZ evitan ser fosforiladas por LATS1/2, y se trasladan al núcleo para activar la transcripción mediante su unión a TEAD (Lei *et al.*, 2008; Varelas, 2014). La señalización Notch desencadena una serie de eventos proteolíticos que dan lugar a la activación del dominio intracelular de NOTCH (NOTCH-ICD), que es trasladado al núcleo donde se asocia con otras proteínas y activa la expresión de sus genes diana, entre los que se encuentran SNAIL y SLUG (Leong *et al.*, 2007; Sahlgren *et al.*, 2008). Por otro lado, la activación de receptores asociados a tirosina-quinazas (RTKs) da lugar a la activación de las cascadas de señalización Ras/MAPK y PI3K/AKT, afectando a la expresión de los reguladores de EMT (Garg, 2013; Dongre y Weinberg, 2019).

1.2.2.2 Factores de transcripción promotores de EMT

Los cambios en la expresión génica asociados a la adquisición de características mesenquimales y represión de características epiteliales que se producen durante el EMT involucran a las familias SNAI, ZEB y TWIST de factores de transcripción (**Tabla 1**), también conocidos como reguladores maestros del EMT (Craene y Berx, 2013; Lamouille, Xu y Derynck, 2014; Zheng y Kang, 2014). La contribución de cada factor de transcripción al EMT depende del tipo celular y de las rutas de señalización iniciadoras del EMT (Lamouille, Xu y Derynck, 2014; Stemmler *et al.*, 2019a). Frecuentemente, estos factores de transcripción son capaces de regularse entre ellos, y cooperan funcionalmente en sus genes diana (Peinado, Olmeda y Cano, 2007).

Los factores de transcripción SNAI1 (también conocido como SNAIL) y SNAI2 (también conocido como SLUG) activan el programa EMT durante el desarrollo, la fibrosis y el cáncer (Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005). SNAIL y SLUG actúan principalmente como represores transcripcionales de genes epiteliales mediante la unión a secuencias E-box de sus genes diana a través de los dominios zinc-finger de la región carboxilo terminal (Nieto, 2002; Harney *et al.*, 2009). Una de las dianas transcripcionales más importantes de ambos factores es el gen de la E-cadherina (CDH1), ya que su pérdida constituye un hito en la progresión del EMT (Batlle *et al.*, 2000; Bolos *et al.*, 2003). Claudinas, ocludinas, citoqueratinas y otras proteínas epiteliales son también reprimidas por la familia SNAIL (Xu, Lamouille y Derynck, 2009). Además de su conocido papel represor, SNAIL puede activar directamente la transcripción de genes mesenquimales (Rembold

et al., 2014; Wu *et al.*, 2017). Aunque aún no se conocen genes directamente activados por SLUG, se ha observado que SLUG es capaz de activar su propio promotor a través de su unión a los elementos E-box (Kumar *et al.*, 2015), por lo que es probable que en el futuro se encuentren otros genes regulados positivamente por SLUG. La inducción transcripcional de SNAIL y SLUG se produce en respuesta a la activación de diversas cascadas de señalización involucradas en la detonación del EMT, tales como la señalización TGF- β , TNF α , Wnt/ β -catenina y Notch. Algunos de los factores de transcripción activados por estas vías que se unen directamente al promotor de SNAIL y regulan su expresión son los SMAD (Brandl *et al.*, 2010), NF- κ B (Cichon y Radisky, 2014) o N1ICD (dominio intracelular de NOTCH) (Sahlgren *et al.*, 2008). Por su parte, el promotor de SLUG recluta a los factores de transcripción SMAD (Brandl *et al.*, 2010), β -catenina/TCF (Yang *et al.*, 2013), AP-1 (c-Jun/Fra-1 o c-Jun/ATF-2) (Chen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016) o N1ICD/CSL (Leong *et al.*, 2007). Sin embargo, no se conocen por completo los mecanismos que regulan la expresión de SNAIL y SLUG durante el EMT, y se siguen encontrando nuevos factores de transcripción involucrados en esta tarea (Laffin *et al.*, 2008; Yin, DeWille y Hai, 2008; Tanno *et al.*, 2010; Herreros-Villanueva *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Zhan *et al.*, 2019).

Tabla 1: Factores de transcripción promotores de EMT. Se indican los principales grupos de genes modulados transcripcionalmente por estos factores durante el EMT así como las rutas de señalización que inducen su actividad (Modificado de Lamouille, Xu y Derynck, 2014)

Factor de transcripción	Regulación transcripcional durante el EMT		Rutas de señalización activadoras
	Subexpresión	Sobreexpresión	
SNAIL/SLUG	E-cadherina, claudinas, ocludinas, citoqueratinas, Crumbs3, PALS1, PATJ, citoqueratinas, desmoplaquina, placofilina	N-cadherina, fibronectina, colageno, MMP15, MMP2, MMP9, ZEB1, ZEB2, TWIST1, SLUG	TGF- β , TNF α , Wnt/ β -catenina, Notch, PI3K/AKT
ZEB1/2	E-cadherina, claudinas, Crumbs3, TJP1, TJP3, placofilina	N-cadherina, MMPs	TGF- β , Wnt/ β -catenina, RAS/MAPK
TWIST1	E-cadherina, claudinas, ocludinas, desmoplaquina	N-cadherina, fibronectina, integrinas	Wnt, MAPK

Los factores de transcripción de la familia ZEB, ZEB1 y ZEB2, también activan o reprimen la transcripción asociada al EMT (Xu, Lamouille y Derynck, 2009). Además de reprimir de manera directa la expresión de E-cadherina (Grootelclaes y Frisch, 2000) y otras proteínas involucradas en las uniones epiteliales (claudina-4 y TJP3) (Vandewalle *et al.*, 2005) modulan de manera indirecta la expresión de placofilinas, metaloproteinasas, vimentina o N-cadherina (Vandewalle *et al.*, 2005; Bindels *et al.*, 2006; Taki *et al.*, 2006). Al igual que la familia SNAIL, ZEB1 y ZEB2 se unen a la región reguladora de sus genes diana a través de dominios E-box (Wong, Gao y Chan, 2014). Frecuentemente, la expresión de ZEB se produce tras la activación de SNAIL, de manera consistente con el hecho de que SNAIL1 activa la transcripción de ZEB1 (Lamouille, Xu y Derynck, 2014). Además, la expresión de ZEB es inducida en respuesta a la señalización TGF- β , Wnt o RAS-MAPK (Peinado, Olmeda y Cano, 2007; Xu, Lamouille y Derynck, 2009; Sánchez-Tilló *et al.*, 2011, 2015). La inducción de ZEB mediada por TGF- β involucra al factor de transcripción ETS1, que se activa en respuesta a la vía MAPK (Shirakihara, Saitoh y Miyazono, 2007).

El factor de transcripción TWIST1 también es considerado un regulador maestro del EMT ya que reprime directamente la expresión de E-cadherina (Vesuna *et al.*, 2008) y se ha observado que puede activar la transcripción de N-cadherina en determinados contextos (Oda, Tsukita y Takeichi, 1998; Rosivatz *et al.*, 2002; Alexander *et al.*, 2006). Los factores TWIST actúan formando dímeros, y su actividad depende en gran medida de la composición de dichos dímeros. TWIST1 y TWIST2 pueden formar homodímeros o heterodímeros junto con las proteínas E12 o E47, y se unen al DNA a través de dominios E-box (Xu, Lamouille y Derynck, 2009; Lamouille, Xu y Derynck, 2014). TWIST es activado por diversas señales durante el desarrollo y la progresión tumoral. Notablemente, el factor HIF1 α induce la expresión de TWIST bajo condiciones de hipoxia (Yang *et al.*, 2008). La vía de señalización Wnt también activa la expresión de TWIST (Howe *et al.*, 2003; Reinhold *et al.*, 2006; Sun y Liu, 2017).

1.2.2.2.1 Papel de los factores de transcripción E2F en EMT

Poco es sabido de la implicación de los factores E2F en el proceso de EMT. Algunos trabajos han relacionado directamente a E2F1 con la inducción de EMT en células tumorales. Al silenciar E2F1 en células de cáncer pulmonar, Wang y colaboradores han observado un aumento de marcadores epiteliales y disminución de marcadores mesenquimales, y lo han atribuido a una disminución de los niveles de ZEB2, que estaría directamente regulado por E2F1 (T. Wang *et al.*, 2017). En células procedentes de melanomas, se ha relacionado la inducción de EMT con la expresión de miR-224-452 mediada por E2F1. La expresión de este microRNA reduce los niveles de TXNIP, una proteína supresora de metástasis (Knoll *et al.*, 2014). Por otro lado, la

defosforilación de RB mediante el tratamiento con inhibidores de CDKs se ha asociado con la inhibición de EMT, basado en cambios en los niveles de expresión de E-cadherina y N-cadherina, en un estudio en líneas celulares de cáncer de mama (Egger *et al.*, 2016). Esta inhibición estaría mediada por el reclutamiento de RB al promotor de ZEB1, reprimiendo su expresión. Otros estudios corroboran la represión de ZEB1 por el complejo RB/E2F, bien de manera directa (Liu *et al.*, 2007) o indirecta (Dean *et al.*, 2015), aunque no establecen conexiones con el fenotipo EMT. Por tanto, en las células tumorales, la presencia o ausencia de RB, o su grado de fosforilación podrían estar modulando la posible contribución de los factores E2F al proceso de EMT. Alternativamente, los factores E2F podrían estar regulando el EMT de una manera independiente de RB.

Las evidencias preliminares recogidas por nuestro grupo de investigación al caracterizar los ratones knockout para E2F1 y E2F2 atribuiría a estos E2Fs un papel inhibitorio del proceso de EMT. Entre estas evidencias caben citar, la deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática de células pancreáticas, la pérdida de polaridad de las células acinares o la pérdida de uniones intercelulares (Iglesias *et al.*, 2004 y datos no publicados). Estas evidencias sugieren un papel importante para los E2F en la modulación del EMT.

El objetivo de esta tesis consiste en esclarecer el papel de los E2F activadores en el proceso de EMT, así como analizar los mecanismos moleculares subyacentes.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los factores de transcripción E2F fueron inicialmente reconocidos por su papel en el control del ciclo celular. Posteriormente, se ha puesto de manifiesto que los E2F regulan un gran número de genes involucrados en otras funciones celulares muy diversas, incluidas la diferenciación celular, la autofagia o la reparación del DNA (Muller *et al.*, 2001; Polager *et al.*, 2002; Polager, Ofir y Ginsberg, 2008). A pesar del esfuerzo realizado hasta la fecha, quedan aún por definir muchos aspectos relacionados con las funciones específicas y redundantes de los factores E2F que ayuden a comprender su relevancia en la fisiopatología humana.

Nuestro grupo ha observado que la inactivación simultánea de E2F1/2 *in vivo* conduce a una pérdida del estado diferenciado en distintos contextos celulares, particularmente en el páncreas de ratones knockout para E2F1/2 (Iglesias *et al.*, 2004; Iglesias-Ara *et al.*, 2015), caracterizado por el deterioro de la estructura y polaridad acinar, así como la pérdida de adhesión intercelular y adquisición de morfología más redondeada. Estas características vienen asociadas a una deslocalización llamativa de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática. La deslocalización de E-cadherina constituye un hito en el proceso de transdiferenciación EMT (Peinado, Portillo y Cano, 2004), por lo que la ausencia de E2F1/2 podría estar desencadenando dicho proceso.

En base a estos antecedentes, se formula la hipótesis de que los factores E2F desempeñan un papel relevante en el proceso de EMT a través de la regulación transcripcional de sus genes diana.

Para analizar esta hipótesis se han establecido los siguientes objetivos:

- Caracterizar el fenotipo celular asociado al proceso de EMT controlado por los factores E2F.
- Analizar el mecanismo molecular subyacente al EMT inducido tras la pérdida de E2F, mediante la identificación y caracterización de genes de respuesta a E2F involucrados en este proceso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Técnicas de biología celular

3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular de carcinoma colorrectal humano HCT116 fue amablemente cedida por Antonio Postigo (IDIBAPS). La línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano DLD-1 fue adquirida en ATCC. Las principales mutaciones que portan estas líneas celulares se encuentran recogidas en la **Tabla 2**.

La línea celular HCT116 fue mantenida en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con un 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (FBS) (Gibco). La línea celular DLD-1 fue mantenida en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con un 10% (vol/vol) de FBS. Ambas líneas se mantuvieron a 37°C en un incubador con humedad saturante y con un 5% de CO₂.

Las células fueron sembradas a diferentes concentraciones y en pocillos de distintos tamaños en función del tipo de experimento, como se detalla en cada apartado. Para ello, las células en cultivo se levantaron mediante incubación con tripsina-EDTA (Sigma) durante 5 minutos a 37°C, y se resuspendieron en medio de cultivo con FBS para inhibir el efecto de la tripsina. La densidad celular de la suspensión fue calculada mediante conteo con azul de tripano (Sigma) en la cámara de Neubauer. Las células cuya membrana plasmática se encontró dañada permitieron el paso del azul de tripano y se tiñeron de este color. Se consideraron como vivas y se utilizaron en el cálculo de la densidad celular todas aquellas células no teñidas de azul.

Tabla 2: Principales mutaciones presentes en las líneas celulares utilizadas en este trabajo. La nomenclatura que expresa la variación en la secuencia de DNA se describe en Dunnen y Antonarakis, 2000. La información acerca de las mutaciones de las líneas celulares se encuentra recogida en la base de datos COSMIC (Tate *et al.*, 2019) y en Ikediobi *et al.*, 2006.

	HCT116	DLD-1
RB1	salvaje	salvaje
APC	salvaje	c.4248delC, c.6496C>T
CTNNB1	c.133_135delTCT	salvaje
TP53	salvaje	c.C1101-2A>C, c.722C>T
RAS	c.38G>A	c.38G>A
CDKN2A	c.68_69insG, c.220delG	salvaje
PIK3CA	c.3140A>G	c.1633G>A, c.1645G>A
BRCA2	c.8021_8022insA	c.3599_3600delGT, c.5351delA

3.1.2 Transfección

Para llevar a cabo el silenciamiento de genes endógenos utilizamos pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) de Ambion (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 3**). Como control, se transfectó un oligonucleótido con una secuencia sin especificidad para ninguna molécula de RNA humano (siCTRL) (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 3**).

Para la transfección de los siRNAs se utilizó el reactivo de transfección *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, el reactivo de transfección se mezcló con medio de cultivo *Optimem* (Gibco) (2 µl de reactivo de transfección + 150 µl de *Optimem* por cada pocillo de 35mm) y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla de reactivo de transfección/*Optimem* se añadió a otro tubo que contenía 0.3 µl de siRNA (50 µM) diluido en 150 µl de *Optimem*. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y fue añadida a las células (250 µl por pocillo de 35mm).

Tabla 3: Lista de los siRNAs utilizados en este trabajo

siRNA	Referencia (Ambion)
siE2F1	s4406
siE2F2	s4408
siE2f3	s65237
siE2F7	s44665
siE2F8	s36212
siRB1	s522
siSNAI2	s13127
siCTNNB1	s437
siCTRL	4390844

3.1.3 Tratamiento con TNF α

Como control positivo de inducción de EMT las células se trataron con 25 ng/ml de TNF α (BioVision). Las células tratadas con TNF α se transfectaron con siCTRL con el fin de que todas las condiciones experimentales fuesen comparables.

3.1.4 Viabilidad celular

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35mm (Corning) a una concentración de 75.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. A las 24, 48, 72 y 96 horas se levantaron las células con tripsina-EDTA y se resuspendieron en medio completo. Se diluyó una alícuota de estas células en azul de tripano y el conteo celular se llevó a cabo en la cámara de Neubauer. Se consideraron como vivas todas aquellas células no teñidas de azul. Se llevaron a cabo tres contajes por cada condición experimental y cada tiempo, con los que se calculó una media por experimento.

Los experimentos de viabilidad celular paralelos a los experimentos de migración celular *Transwell* se llevaron a cabo de la siguiente manera: las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35mm a una concentración de 80.000 células/pocillo, e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Aproximadamente 65 horas después, se retiró el medio de cada pocillo y se guardó para su posterior uso. Se levantaron las células con tripsina-EDTA y cada pocillo se resuspendió en su medio, retirado anteriormente. Se contaron las células y se sembraron 200 μ l a una concentración de 200.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas, las células se levantaron con tripsina-EDTA y se resuspendieron en medio completo. Se diluyó una alícuota de estas células en azul de tripano y el conteo celular se llevó a cabo en la cámara de Neubauer. Se llevaron a cabo tres contajes por cada condición experimental, con los que se calculó una media por experimento.

3.1.5 Análisis del marcador de superficie CD44

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 80.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. A distintos tiempos (72, 96 y 120 horas), las células se levantaron con tripsina-EDTA y se trasladaron a placas de 96 pocillos con fondo cónico (Sarstedt) a razón de 200000 células/pocillo (en un volumen máximo de 200 μ l) para proceder con la tinción del marcador de superficie CD44. Las células se centrifugaron a 2500 rpm para retirar el medio, y se lavaron primero con PBS 1X y seguidamente con BSA 1% en PBS. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 100 μ l de inmunoglobulina G humana (Sigma) a 10 μ g/ml con el fin de bloquear futuras uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras 20 minutos de incubación se añadieron a los pocillos 10 μ l del anticuerpo CD44 marcado con fluorocromo FITC (Miltenyi Biotec), o su control de isotipo IgG1-FITC (Miltenyi

Biotec), y se incubaron otros 20 minutos, a 4°C en oscuridad. Las células se centrifugaron a 2500 rpm para retirar el volumen sobrante de los anticuerpos y se lavaron 2 veces con BSA 1% en PBS. Para fijar la tinción se añadieron 100 µl de paraformaldehído al 2% en PBS 1X por pocillo, y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se guardaron a 4°C y oscuridad hasta su paso por el citómetro de flujo.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton & Dickinson). Los datos generados por el citómetro se procesaron con el programa Summit 4.3 (Beckman Coulter).

3.1.6 Adhesión intercelular (formación de esferoides)

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 200.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Tras 18 horas las células se levantaron con tripsina-EDTA, se contaron y se llevaron a una concentración de 35 células/µl. Las células se mezclaron con un 6% de metilcelulosa (Sigma M0387) y se colocaron en gotitas de 25 µl (unas 700 células/gota) bajo la tapa de placas de 100 mm. Esta disposición permitió la formación de un sistema en suspensión que lleva a las células a mantenerse unidas y formar esferoides. En la base de la placa de 100 mm se añadieron 8 ml de PBS 1X para evitar que se secan las gotas. Las gotas se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO $_2$ durante 48 horas. A continuación, se recogieron los esferoides arrastrando con cuidado las gotas de la tapa con 5 ml de medio completo, y se centrifugaron durante 15 segundos a 500 rpm para poder aspirar el sobrenadante. Los esferoides se resuspendieron en un mix de Colágeno I bovino (Advanced BioMatrix). El mix y sus componentes se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de preparación. Los componentes se añadieron en este orden (por ml): 556.5 µl de Colágeno I bovino, 200 µl de DMEM 5X (Gibco), 213.5 µl de agua mili-Q filtrada y 30 µl de NaOH 0.1 N. Los componentes fueron mezclados mediante pipeteo y las burbujas se eliminaron aplicando el vacío en el tubo cerrado a través de una aguja atravesando el tapón. Se sembraron 300 µl por pocillo del mix conteniendo esferoides en placas de 24 pocillos. Tras incubar los esferoides a 37°C durante 4 horas para gelificar el colágeno, se tomaron fotografías de cada esferoide mediante microscopía óptica a través del objetivo 4x.

3.1.7 Adhesión celular a colágeno

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 200.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Al cabo de 72 horas las células se levantaron con tripsina-EDTA y se trasladaron a pocillos de 22 mm (placas de 12 pocillos) previamente incubados durante 1 hora con Colágeno I de cola de rata (Corning 354236) diluido a 50 μ g/ml en ácido acético 0.02 N. Tras 30 minutos, se retiró el medio y los pocillos se lavaron 2 veces con PBS 1X. Las células aún adheridas a los pocillos se fijaron con formalina al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Después de retirar la formalina y lavar los pocillos con PBS 1X, se añadieron 500 μ l de una solución de cristal violeta (Sigma) al 0.1% en metanol al 20% para teñir las células, que se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente y agitación. Tras lavar con agua destilada y secar al aire los pocillos, se disolvieron los precipitados en ácido acético al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A mayor cantidad de células, el disolvente contrajo un tono violeta más oscuro. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 595 nm, utilizando placas de 96 pocillos con triplicados técnicos de cada condición.

3.1.8 Ensayos de migración

3.1.8.1 Ensayo de migración *Transwell*

Las células fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 80.000 células/pocillo (HCT116) y 140.000 células/pocillo (DLD-1), y fueron inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Aproximadamente 65 horas después, se retiró el medio de cada pocillo y se guardó para su posterior uso. Se levantaron las células con tripsina-EDTA y cada pocillo se resuspendió en su medio, retirado anteriormente. Se contaron las células y se sembraron 200 μ l a una concentración de 200.000 células/ml de cada condición en insertos de 8.0 μ m (Falcon) (para placas de 24 pocillos), previamente sumergidos durante 30 minutos a 37°C en 30 μ g/ml de colágeno tipo I de cola de rata (Gibco). En el compartimento bajo el inserto se añadieron 500 μ l de medio de cultivo completo. Tras 24 horas de la siembra de las células en los insertos, se eliminaron las células no migratorias de la parte superior del inserto mediante un bastoncillo con algodón. Las células migratorias, ahora situadas en la parte inferior del inserto, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS1 X. El fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje con DAPI (Vectashield). Los núcleos se visualizaron en el microscopio de

fluorescencia Zeiss Axioskop y las imágenes fueron sacadas con la cámara digital Nikon DS-Qi1Mc y el programa informático NIS-Elements F. Se sacaron 10 imágenes aleatorias con el objetivo 20x a cada condición y se contó el total de núcleos migrados.

3.1.8.2 Ensayo de sellado de herida

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 500.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Cuando las células se encontraron confluentes, aproximadamente 72 horas después, se procedió a romper la monocapa celular trazando una línea con una punta de pipeta estéril y se tomaron fotografías de la herida (0 horas) a través del objetivo 4x del microscopio óptico Leica DM IL LED. Tras 24 horas de incubación, se tomaron nuevas fotografías de la herida. El área de la herida a las 0 y 24 horas fue calculada con la herramienta Wound Healing Tool instalada en el programa ImageJ.

3.1.9 Ensayos de invasión

3.1.9.1 Ensayo de invasión *Transwell*

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35mm a una concentración de 80.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs, como se indica en el apartado 3.1.2. Aproximadamente 65 horas después, se retiró el medio de cada pocillo y se guardó para su posterior uso. Se levantaron las células con tripsina-EDTA y cada pocillo se resuspendió en su medio, retirado anteriormente. Se contaron las células y se sembraron 200 μ l a una concentración de 200.000 células/ml de cada condición en insertos de 8.0 μ m (Falcon) (para placas de 24 pocillos), previamente incubados durante 2 horas a 37°C sumergidos en 300 μ g/ml de Matrigel (BD Bioscience). En el compartimento bajo el inserto se añadieron 500 μ l de medio de cultivo completo. Tras 48 horas de la siembra de las células en los insertos, se eliminaron las células no invasoras de la parte superior del inserto mediante un bastoncillo con algodón. Las células invasoras, ahora situadas en la parte inferior del inserto, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X. El fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje con DAPI (Vectashield). Los núcleos se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop y las imágenes fueron sacadas con la cámara digital Nikon DS-Qi1Mc y el programa informático NIS-Elements F. Se sacaron 10 imágenes aleatorias con el objetivo 20x a cada condición y se contó el total de núcleos migrados.

3.1.9.2 Crecimiento invasivo de esferoides

Los experimentos de crecimiento invasivo de esferoides comenzaron por la formación de esferoides, detallada en el apartado 3.1.6. Tras completar la formación de esferoides y la toma de fotografías de los mismos, se añadieron 500 μ l de medio completo sobre los pocillos y se incubaron durante 72 horas, tras las cuales se volvieron a fotografiar. El área de cada esferoide a ambos tiempos se midió utilizando el programa ImageJ.

3.2 Técnicas de biología molecular

3.2.1 Análisis de expresión de RNA

El RNA (en especial el mRNA) es un material biológico muy frágil e inestable, por lo que toda la manipulación de las muestras de RNA se llevó a cabo en condiciones libres de RNAsas.

3.2.1.1 Extracción y purificación de RNA

Las células fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 80.000 células/pocillo (HCT116) y 150.000 células/pocillo (DLD-1), y fueron inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. La extracción de RNA total a los distintos tiempos se llevó a cabo utilizando el reactivo *Trizol* (Life Technologies). Las células se lisaron añadiendo 1 ml de *Trizol* por pocillo de 35mm, volumen que se transfirió a un tubo Eppendorf. A continuación, se añadieron 400 μ l de cloroformo (Sigma), los tubos se agitaron y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 10000 revoluciones por minuto (rpms) durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió el RNA contenido en la fase acuosa a un tubo nuevo.

El RNA se purificó usando el kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este proceso permite la purificación tanto de RNA mensajero como pequeños RNAs.

La concentración del RNA purificado se calculó mediante el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. El RNA se mantuvo a -80°C hasta su uso.

3.2.1.2 Síntesis de cDNA

La transcripción reversa del RNA se hizo mediante el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de 1 μ g de RNA

previamente extraído y purificado. Los productos de la transcripción reversa se conservaron a -20°C hasta el momento del análisis mediante qPCR.

3.2.1.3 PCR cuantitativa

Para determinar la abundancia relativa de mRNAs específicos se utilizó la PCR cuantitativa (qPCR) mediante la química *SYBR Green*. *SYBR Green* es un reactivo que actúa como tinción fluorescente ya que se une al DNA de doble hebra y juntos emiten luz a una longitud de onda de 520 nm. Durante la reacción de PCR, *SYBR Green* se une a cada nueva copia de DNA de doble hebra que se produce durante los ciclos de amplificación, dando lugar a un incremento de la fluorescencia proporcional a la cantidad inicial de la secuencia a amplificar.

Debido a la naturaleza de unión no específica del *SYBR Green*, es importante que los cebadores sean específicos para una determinada secuencia y que amplifiquen únicamente cDNA, evitando amplificaciones de DNA genómico que pudiera estar presente en la reacción. Para ello, cada cebador de la pareja fue diseñado sobre exones diferentes con un intrón de gran tamaño entre ellos. En nuestro caso, diseñamos los cebadores utilizando la herramienta *PrimerQuest* de la página web *Integrated DNA Technologies* (<https://eu.idtdna.com/site>).

Las muestras de cDNA se mezclaron con cebadores específicos para cada gen (**Tabla 4**) y con *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) que contiene, entre otros componentes, *SYBR Green*, polimerasa *AmpliAq Gold DNA* y dNTPs con una mezcla de dUTP/dTTP. Para cada pareja de cebadores se añadió una muestra sin cDNA (No Template Control, NTC) para detectar posibles contaminaciones. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el termociclador *QuantStudio3* (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa de PCR: un primer ciclo de 10 minutos a 95°C necesario para la activación de la polimerasa; un segundo ciclo de 40 repeticiones consistentes en 15 segundos a 95°C para la desnaturalización del DNA seguido de 1 minuto a 60°C para permitir el anillamiento de los cebadores a su secuencia y la polimerización; finalmente las muestras pasan por un ciclo de disociación en el que la temperatura va aumentando gradualmente desde 60 hasta 90°C para detectar una posible presencia de productos inespecíficos.

Tabla 4: Lista de cebadores para qPCR utilizados en este trabajo. Todos los cebadores se utilizaron a una concentración de 300 nM.

Gen a amplificar	Cebadores	
	Directo (Secuencia 5' – 3')	Reverso (Secuencia 5' – 3')
E2F1	TGACATCACCAACGTCCTTGA	CTGTGCGAGGTCCTGGGTC
E2F2	ACGTGCTGGAAGGCATCC	GCTCCGTGTTTCATCAGCTCC
E2F3	AAGCCCTCCAGAAACAAGAC	TTGTAGGCTCTCTATTGAGTCAGGC
SNAI2	GGTTGCTTCAAGGACACATTAG	GCAGATGAGCCCTCAGATTT
ITGA2	CAAGTGAACAGTTTGGCTATGC	CACATCTCCCATTTCGGTTCTC
KLF4	ACCTACACAAAGAGTCCCATC	ATCTGAGCGGGCGAATTT
ABCB10	GCCATTCGTGTCTACCTCAT	GCCTCAGAATGGAGGAGAATAA
CD151	GGCACTGTCGTCATGGT	GATGATGAGGAGCAGGATGAA
RHOB	GACACCGACGTCATTCTCAT	TGGGACAGAAGTGCTTCAC
SMAD6	CCTACCGTGTGCTGCAA	AGGAGACAGCCGAGAGTAG
KRT8	GCAGATCAAGACCCTCAACA	CACTGGTCTCCAGCATCTT
KRT18	AGATCGAGGCTCTCAAGGA	CATCTACCTCCACGGTCAAC
TJP3	ATCATTCCCAACCAGAGCAG	GTCTTCTTGGCTCCTCGAC
CTNNB1	CAGAGTGCTGAAGGTGCTATC	CCTGAGAGTCCAAAGACAGTTC
GAPDH	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG
VPS29	CTCTGGCTGGTGTGTTTCATA	CTGTCCAACAGTCACAACCTTC

El método de qPCR permite cuantificar la fluorescencia obtenida en un punto específico durante la fase de amplificación exponencial, fase en la que la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad inicial de cDNA. Este punto se denomina umbral (*threshold*). La cantidad relativa inicial de una secuencia de cDNA específica se calcula teniendo en cuenta el número de ciclos necesarios (C_T) para que la fluorescencia alcance el umbral.

La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó utilizando el método de comparación de C_T ($\Delta\Delta C_T$) en el que el C_T de una muestra se normaliza tanto con respecto al C_T de ese mismo gen en condiciones control, como con respecto al C_T del gen de referencia. Los niveles de expresión relativa fueron expresados como $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$. Los genes de referencia utilizados fueron GAPDH, ampliamente utilizado en otros estudios como gen de referencia en experimentos de expresión génica, y VPS29, recomendado por la estabilidad en su expresión en diferentes tejidos (Eisenberg y Levanon, 2013) y confirmado como gen estable en nuestras condiciones de estudio mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq).

3.2.1.4 Secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq)

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35mm a una concentración de 80.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α , como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. A las 24, 48 y 96 horas se establecieron puntos de recogida de RNA. En cada tiempo, se retiró el medio de los pocillos, se lavó una vez con PBS 1X y se añadió 1 ml de Trizol por pocillo de 35mm para lisar las células. El lisado de células en Trizol se transfirió a tubos Eppendorf y se guardó a -80°C. Una vez recogidas las muestras de todos los tiempos, se descongelaron y se continuó con el protocolo de extracción, purificación y cuantificación de RNA tal y como se indica en el apartado 3.2.1.1.

La calidad del RNA fue analizada en un Bioanalyzer 2100 (Agilent) en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco. Es esencial para experimentos de RNA-Seq garantizar la integridad de las moléculas de RNA, ya que una degradación diferencial de las muestras puede ser confundida con una expresión génica diferencial. Para determinar la calidad del RNA se utilizó el valor del número de integridad del RNA (RIN), calculado por el Bioanalyzer 2100. El RIN se calcula en base al perfil electroforético del RNA total, en el que los distintos componentes del RNA (como las diferentes subunidades del RNA ribosómico) dan lugar a señales de diversa intensidad en base al nivel de degradación. Estos perfiles se comparan con perfiles preestablecidos con una degradación conocida. El valor del RIN varía de 1 a 10, siendo 10 el valor que indica mayor calidad de las muestras. Se recomienda que para experimentos de RNA-Seq el valor del RIN sea superior a 8. Todas las muestras de RNA extraídas para nuestro RNA-Seq presentaron un valor de RIN de 10.

Las muestras se enviaron al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) del Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona, donde se llevó a cabo el RNA-Seq. Allí, la calidad del RNA volvió a ser analizada tras el envío, manteniéndose unos valores de RIN entre 9.4 y 10. Se prepararon librerías de cDNA a partir del RNA total enviado utilizando el kit TruSeq® Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se partió de 0.5 μ g de RNA total por muestra que se puso en contacto con microesferas magnéticas con cadenas oligo(dT) para enriquecer la muestra de mRNA con cola poli(A). A continuación, el mRNA se fragmentó usando cationes divalentes a altas temperaturas obteniendo fragmentos de entre 80 y 250 nucleótidos, con un pico mayoritario de 130 nucleótidos. La síntesis de la primera hebra de cDNA se llevó a cabo mediante transcripción reversa con cebadores hexámeros aleatorios. La segunda hebra de cDNA se sintetizó en presencia de dUTP en vez de dTTP. Los extremos romos de la doble hebra de cDNA fueron adenilados en el extremo 3' y

adaptadores indexados de Illumina fueron ligados. El producto de la ligación se enriqueció mediante 15 ciclos de PCR, y la librería final fue validada en el Bioanalyzer 2100 (Agilent) utilizando el protocolo DNA 7500.

Las 24 librerías fueron secuenciadas en el equipo HiSeq2000 (Illumina) mediante el método de lecturas pareadas, leyendo 76 nucleótidos de ambos extremos de cada fragmento de cDNA con el kit TruSeq SBS v4 (Illumina). Se obtuvo una media de 29 millones de lecturas pareadas por muestra. Análisis derivados de la secuenciación como la asignación de bases (*base calling*) y la asignación de un valor de calidad de la lectura se llevaron a cabo mediante el programa Real Time Analysis del fabricante (Illumina), y se obtuvieron las secuencias en formato FASTQ mediante el programa CASAVA (Illumina).

3.2.2 Análisis de expresión de proteína

3.2.2.1 Extracción de proteína

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35 mm a una concentración de 80.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con siRNAs, como se indica en el apartado 3.1.2. A diferentes tiempos, los pocillos se lavaron con PBS 1X mientras eran mantenidos en hielo, y las células se lisaron con una pala de plástico (scraper) con tampón de lisis de proteína (ver apartado 3.5 Soluciones). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C. A continuación, los tubos se centrifugaron a 13000 rpms durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. La proteína extraída se mantuvo a -80°C hasta su uso.

3.2.2.2 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el kit colorimétrico *DC Protein Assay* (Bio-Rad), basado en el método de cuantificación Lowry. El ensayo tiene lugar en dos pasos. En primer lugar, el cobre reacciona con las proteínas en un ambiente alcalino. Después, el cobre asociado a las proteínas reduce la folina hasta generar un color azul, siendo la intensidad del color azul proporcional a la cantidad de proteína. La longitud de onda de absorción de la folina reducida por cobre es de 750nm. La lectura colorimétrica de las muestras se realizó en el espectrofotómetro PowerWave x340 (Bio-tek). Para conocer la concentración proteica absoluta, se prepararon rectas patrón de concentración conocida a base de albúmina de suero bovino (BSA)

3.2.2.3 Western blot

Se diluyeron 20 µg de cada muestra con tampón de carga de proteína 6X (ver apartado 3.5 Soluciones) y se hirvieron durante 5 minutos para su desnaturalización inmediatamente antes de la electroforesis.

Las proteínas se separaron según su peso molecular en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (ver apartado 3.5 Soluciones) en el sistema electroforético MiniPROTEAN Tetra Cell Vertical (Bio-Rad) a un amperaje constante de 25 mA por gel en tampón de migración (ver apartado 3.5 Soluciones). Como marcador de peso molecular se utilizó BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Life Technologies).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad). Para la transferencia se utilizó el Mini Trans-Blot Cell transfer system (Bio-Rad) en tampón de transferencia 1X (ver apartado 3.5 Soluciones) durante 2 horas a 100 V en un ambiente frío. A continuación, la membrana se tiñó con Ponceau S (Sigma) para comprobar el éxito de la transferencia y posibles diferencias de carga entre muestras.

Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo TBS-T (ver apartado 3.5 soluciones) con leche desnatada en polvo diluida al 5% durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 5**) diluido en la solución de bloqueo con leche desnatada en polvo diluida al 5% (E-cadherina, N-cadherina, KRT18, HSP90) o con BSA diluido al 3% (SLUG, ITGA2), durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación con TBS-T a temperatura ambiente y se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla 5**) en solución de bloqueo durante 1h en agitación a temperatura ambiente. Se volvieron a realizar 3 lavados como se indica previamente.

La detección de los anticuerpos unidos a sus proteínas específicas se llevó a cabo usando Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) en el lector de quimioluminiscencia ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). La cuantificación se hizo mediante análisis de densitometría utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

Tabla 5: Lista de anticuerpos utilizados para *Western blot* en este trabajo.

Anticuerpo	Función	Dilución	Origen	Proveedor	Referencia
E-cadherina	Primario	1:1000	Ratón	BD Biosciences	610181
N-cadherina	Primario	1:1000	Ratón	BD Biosciences	610920
SNAI2 (Slug)	Primario	1:1000	Conejo	Cell Signaling	9585T
KRT18	Primario	1:1000	Ratón	Cell Signaling	1674546T
ITGA2	Primario	1:500	Ratón	Santa Cruz	sc-74466
HSP90	Primario	1:1000	Ratón	Santa Cruz	sc-13119
Anti-mouse-HRP	Secundario	1:3000	Cabra	Santa Cruz	sc-3697
Anti-rabbit-HRP	Secundario	1:3000	Cabra	Santa Cruz	sc-2030

3.2.3 Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos de cristal, a una concentración de 80.000 células/pocillo, y fueron inmediatamente transfectadas con siRNAs o tratadas con TNF α como se indica en los apartados 3.1.2 y 3.1.3. Tras 72 horas, las células se lavaron con 1 ml de PBS 1X, se fijaron en formaldehído al 3.7% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se volvieron a lavar con 1 ml de PBS 1X. A continuación, las células adheridas al cubreobjetos se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con 1 ml de PBS 1X. Como solución de bloqueo se añadió a cada pocillo 1 ml de BSA 3% en PBS y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de evitar futuras uniones inespecíficas del anticuerpo. Tras retirar la solución de bloqueo del pocillo, se añadieron 74 μ l de anticuerpo primario E-Cadherina (BD Biosciences) diluido 1:50 en solución de bloqueo. Los 74 μ l se pipetearon sobre el cubreobjetos formando una cúpula de líquido, que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron dos veces con PBS 1X, y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, Mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) en dilución 1:400 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Se lavaron las muestras dos veces con PBS 1X y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de cristal con medio de montaje con DAPI (Vectashield). Las fotografías de las muestras se tomaron a través del microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop con la cámara digital Nikon DS-Qi1Mc y el programa informático NIS-Elements F.

3.2.4 Clonación y mutagénesis

Para construir el vector luciferasa reportero que contiene el promotor salvaje de SLUG, clonamos dicha región en el plásmido luciferasa pGL2-Basic (Promega). Para ello, amplificamos mediante PCR la región comprendida entre -793 y +107 (900 pb) desde el inicio de la transcripción a partir de DNA genómico humano de la línea celular HeLa. Los cebadores utilizados (**Tabla 6**) portaban la secuencia de los sitios de restricción MluI y HindIII así como una secuencia líder invariable que facilita el proceso de digestión de los enzimas de restricción. El fragmento amplificado se digirió con los enzimas de restricción MluI y HindIII y fue clonado en el sitio de multiclonación del plásmido pGL2-Basic.

Tabla 6: Cebadores utilizados para la amplificación de la región promotora de SLUG. La región amplificada comprende 900 pb (-793, +107) y se amplificó a partir de DNA genómico humano de la línea celular HeLa. En azul se indica la secuencia MluI, en verde la secuencia HindIII y en gris la secuencia líder.

Nombre	Orientación	Secuencia 5'- 3'
promSLUG_MluI_F	Directo (Forward)	TGCAGACGCGTGTGGTTCCAAATGACAGTTACC
promSLUG_HindIII_R	Reverso (Reverse)	TGCAGAAGCTGCGGTCCCTACAGCATC

Para generar un segundo vector luciferasa idéntico al anterior, pero con los sitios de unión de E2F mutados, llevamos a cabo mutagénesis dirigida utilizando el kit QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se diseñaron tres cebadores en sentido directo (forward) complementarios a los sitios de unión E2F predichos por ConSite, pero que incluían las mutaciones puntuales deseadas (**Tabla 7**). A partir de estos cebadores se sintetizó mediante PCR la hebra mutante utilizando el plásmido salvaje como plantilla. Este DNA parental salvaje fue eliminado mediante digestión con 1µl del enzima DpnI (incubación de 5 minutos a 37°C). La precisión de ambas construcciones fue confirmada mediante secuenciación de DNA.

Tabla 7: Cebadores utilizados para el ensayo de mutagénesis dirigida de los sitios de unión E2F de la región promotora de SLUG. En rojo se indican los nucleótidos modificados con respecto a la secuencia original.

Nombre	Orientación	Secuencia 5'- 3'
promSLUG_E2Fmut1_F	Directo (Forward)	GCGCTGCCCTGGCGCACAGAAGCCCTGAGTAGCG
promSLUG_E2Fmut2_F	Directo (Forward)	CTCCGCGCTCACAGGCGCCTTTGTCGTACAGATGCCCCCTCCTT
promSLUG_E2Fmut3_F	Directo (Forward)	AGGCGCCGGCCCGTCCGCAAGACTCACCTGAGCAC

3.2.5 Ensayo de luciferasa

Las células HCT116 fueron sembradas en pocillos de 35mm a una concentración de 100.000 células/pocillo e inmediatamente transfectadas con 500 ng del vector luciferasa de luciérnaga conteniendo el promotor salvaje o mutante de SLUG (pWT y pMUT), 25 ng del vector luciferasa de Renilla (pRL-TK) y cantidades variables de plásmidos de expresión (pE2F1, pE2F2, pE2F4 y pE2F7) o su correspondiente plásmido control (pCMV) (**Tabla 8**). Por cada μg de DNA plasmídico (vector luciferasa de luciérnaga + vector luciferasa de Renilla + plásmidos de expresión) se utilizaron 2.5 μl de reactivo de transfección *XtremeGENE HD* (Roche) según las indicaciones del fabricante. La mezcla de DNA plasmídico y reactivo de transfección se incubó en 100 μl de medio de cultivo *Optimem* durante 15 minutos a temperatura ambiente y fue añadida a las células. En aquellos experimentos que requerían de silenciamiento génico, se procedió a la transfección de siRNAs como se indica en el apartado 3.1.2 dos horas antes de la transfección de los vectores luciferasa de luciérnaga y Renilla.

La lectura de la actividad luciferasa se llevó a cabo en el luminómetro (Clarity, BioTek) 24 horas después de la transfección utilizando el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los datos fueron normalizados en base a la eficiencia de la transfección, estimada mediante la actividad luciferasa de Renilla en cada muestra, y expresados como unidades relativas de luz (Relative Light Units, RLU).

Tabla 8: Lista de vectores utilizados en este trabajo.

Vector	Nombre en figuras	Tipo de vector	Procedencia
pGL2-SLUG-WT-LUC	pSLUG-WT-LUC	Luciferasa	Construido durante este trabajo
pGL2-SLUG-MUT-LUC	pSLUG-MUT-LUC	Luciferasa	Construido durante este trabajo
pRL-TK	pRL	Control de transfección y viabilidad celular	Promega
pRc-CMV-HA-E2F1	pE2F1	Expresión	Invitrogen
pRc-CMV-HA-E2F2	pE2F2	Expresión	Invitrogen
pRc-CMV-HA-E2F4	pE2F4	Expresión	Invitrogen
pCMV6-XL5-E2F7	pE2F7	Expresión	OriGene
pCMV6-XL5	pCMV	Control de expresión (vector vacío)	OriGene modificado de pCMV6-XL5-E2F7

3.3 Herramientas bioinformáticas

3.3.1 Análisis de la expresión génica diferencial

El análisis de la expresión génica diferencial fue llevado a cabo por Koldo García (Biodonostia). Las secuencias se alinearon contra la versión hg19 del genoma utilizando como transcriptoma de referencia el Gencode 19 mediante la herramienta de alineamiento TopHat. Se utilizó el programa Trimmomatic para mejorar el alineamiento y evitar errores por posibles fallos de lectura al inicio de las secuencias. El número de lecturas alineadas con cada locus (*counts*) se calculó mediante HTSeq, y se analizaron los transcritos que tuvieron más de 5 lecturas en, al menos, la mitad de las muestras analizadas. La normalización de los *counts* se llevó a cabo mediante RUVSeq utilizando como genes de referencia los 10987 genes que menores diferencias de expresión presentaban. Una vez que contamos con los *counts* normalizados, la expresión diferencial se calculó mediante el test exacto edgeR y reducción de la varianza DESeq2 implementados en los paquetes de R (R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>), y consideramos como genes desregulados aquellos que presentaban diferencias de expresión para ambos métodos con una $P < 0.05$ (valor ajustado de P , Benjamini y Hochberg, 1995).

3.3.2 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales se llevó a cabo utilizando las muestras normalizadas a partir de los 10987 genes que presentaron menores diferencias de expresión entre las muestras problema y las muestras control mediante la función *prcomp* implementada en el lenguaje R, escalando las variables para normalizarlas.

3.3.3 Análisis de enriquecimiento

3.3.3.1 Motivos de unión de factores de transcripción

La identificación de los motivos de unión de factores de transcripción (transcription factor binding sites, TFBS) sobrerrepresentados en las regiones reguladoras de los genes diferencialmente expresados tras los distintos tratamientos se llevó a cabo utilizando la herramienta informática DiRE (<https://dire.dcode.org/>) (Gotea y Ovcharenko, 2008). Se

analizaron por separado los genes sobreexpresados y subexpresados de los distintos puntos temporales a partir de los resultados del RNA-Seq.

Esta herramienta alinea los genes de la lista emitida con el genoma de referencia y selecciona un conjunto de elementos reguladores candidatos de estos loci basándose en el patrón de conservación entre especies. A continuación, DiRE determina la localización de los TFBS utilizando matrices de peso posicionales (PWM) de 400 familias de vertebrados disponibles en la base de datos TRANSFAC Professional. El análisis DiRE compara la distribución de los TFBS de la lista de genes enviados con la distribución de los TFBS de 7500 genes humanos seleccionados aleatoriamente por DiRE utilizados como fondo génico (background).

DiRE calcula el grado del enriquecimiento de TFBS en las regiones promotoras de acuerdo a dos valores: *presencia* (porcentaje de los genes diferencialmente expresados que contienen un TFBS determinado en su región reguladora) e *importancia* (producto de la *presencia* y un factor denominado *peso* que tiene en cuenta la distribución de los TFBS en la lista de genes problema y en los genes del fondo génico contra los que se comparan (Pennacchio *et al.*, 2007)).

3.3.3.2 Procesos biológicos

La identificación de los procesos biológicos enriquecidos en los subconjuntos de genes diferencialmente expresados tras los distintos tratamientos se calculó utilizando la herramienta informática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang, Sherman y Lempicki, 2009b, 2009a). DAVID permite identificar procesos biológicos sobrerrepresentados en un conjunto de genes problema calculando el porcentaje de genes pertenecientes a un proceso biológico concreto con respecto al número total de genes problema y comparándolo después con el porcentaje total de genes clasificados en ese mismo proceso biológico con respecto al conjunto del genoma.

Para la agrupación de conjuntos de genes en categorías o términos según su función y para la obtención del porcentaje total de genes clasificados en el mismo término considerando el conjunto del genoma, DAVID utiliza la base de datos del proyecto Gene Ontology (GO). Los términos de procesos biológicos se clasifican de una manera jerárquica desde los más generales a los más específicos, siendo el nivel 1 el menos específico y el nivel 5 el más específico. En este caso, se utilizó el nivel 3 de procesos biológicos (GOTERM_BP_3) para llevar a cabo el análisis.

Se analizaron las listas de genes sobreexpresados y subexpresados (separada o conjuntamente) de los distintos puntos temporales obtenidas a partir de los resultados del RNA-Seq. La búsqueda de términos enriquecidos se llevó a cabo utilizando un filtro de significación estadística de

$P < 0.05$ (valor de P ajustado, Benjamini y Hochberg 1995). El número mínimo de genes en cada término se estableció en 10, 20 o 30, dependiendo del número total de genes en la lista emitida.

3.3.3.3 Rutas de señalización

La identificación de las rutas de señalización enriquecidas en los subconjuntos de genes diferencialmente expresados tras los distintos tratamientos se calculó utilizando la herramienta informática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang, Sherman y Lempicki, 2009b, 2009a). DAVID permite identificar rutas de señalización sobrerrepresentadas en un conjunto de genes problema calculando el porcentaje de genes que participan en una ruta con respecto al número total de genes problema y comparándolo después con el porcentaje total de genes que participan en esa misma ruta de señalización con respecto al conjunto del genoma. Para la agrupación de conjuntos de genes en rutas señalizadoras y para la obtención del porcentaje total de genes clasificados en esas mismas rutas considerando el conjunto del genoma, DAVID utiliza la base de datos del proyecto Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Se analizaron las listas de genes diferencialmente expresados para cada tratamiento y punto temporal obtenidas a partir de los resultados del RNA-Seq. La búsqueda de rutas de señalización enriquecidas se llevó a cabo utilizando un filtro de significación estadística de $P < 0.05$ (valor de P ajustado, Benjamini y Hochberg 1995). El número mínimo de genes en cada ruta de señalización se estableció en 5 o 10, dependiendo del número total de genes en la lista emitida.

3.3.4 Localización de motivos de unión de factores de transcripción

La localización de motivos de unión E2F en el promotor de SLUG se llevó a cabo mediante la herramienta informática ConSite (<http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite>) (Sandelin, Wasserman y Lenhard, 2004). ConSite obtiene los perfiles de unión de cada factor de transcripción de la base de datos JASPAR. Utilizando la opción de “analizar una única secuencia”, se insertó manualmente la secuencia del promotor de SLUG comprendida entre -1000/+500 pares de bases desde el lugar de inicio de la transcripción y se detectaron todos aquellos motivos de unión E2F con un porcentaje de similitud mínima del 75%.

3.4 Análisis estadísticos

Los datos están presentados como la media \pm su desviación estándar (SD). La significación de la diferencia entre dos grupos fue calculada utilizando la prueba t pareada de Student.

3.5 Soluciones

PBS 1X (pH 7.6)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

1.8 mM KH_2PO_4

8.1 mM Na_2HPO_4

Tampón de lisis de proteína

10 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2)

1 mM EDTA

1 mM EGTA

150 mM NaCl

1% NP-40 (v/v)

10 mM β -glicerofosfato

10 mM PMSF

10 mM Na_3VO_4

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptina

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinina

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatina

Tampón de carga de proteína 6X

350 mM Tris-HCl pH 6.8

34.4% Glicerol (v/v)

10% SDS (w/v)

10% β -mercaptoetanol (v/v)

0.06% Azul de bromofenol (w/v)

Geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Gel de apilamiento

63 mM Tris HCl pH6.8

0.1% SDS (v/v)

5% Acrilamida

0.1% TEMED

0.1% APS

Gel de resolución

376 mM Tris HCl pH8.8

0.1% SDS (v/v)

Acrilamida (% variable)

0.04% TEMED

0.1% APS

Tampón de migración

0.25 mM Tris base

1.92 mM Glicina

1% SDS

Tampón de transferencia

120 mM Tris base

40 mM Glicina

20% Metanol

Solución de bloqueo TBS-T (Tris Buffered Saline – Tween) (pH 7.6)

20 mM Tris base

137 mM NaCl

0.05% Tween

4. RESULTADOS

4.1 PAPEL DE LOS E2F ACTIVADORES EN EL EMT: CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA

4.1.0 Modelo celular y control positivo

Con el objetivo de definir con claridad el mecanismo por el que los factores de transcripción E2F activadores regulan el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), en este trabajo de tesis doctoral se ha utilizado una aproximación experimental *in vitro*. Se han empleado líneas celulares inmortalizadas y transformadas, que permiten un manejo más sencillo y la utilización de una mayor variedad de recursos experimentales que los cultivos de células primarias o ensayos *in vivo* con ratones knockout para E2F. Las líneas celulares HCT116 y DLD-1, carcinoma y adenocarcinoma colorrectal respectivamente (Brattain *et al.*, 1981; Dexter *et al.*, 1981), conservan características típicamente epiteliales como son el crecimiento de las células estrechamente unidas entre sí formando una monocapa o altos niveles de E-cadherina en las uniones intercelulares, por lo que diversos autores han utilizado estas líneas celulares para el estudio del proceso de EMT (Wang *et al.*, 2013; Rokavec *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

Como control positivo de inducción de EMT utilizamos el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citoquina proinflamatoria producida mayoritariamente por macrófagos, y que está involucrada en la progresión tumoral precisamente por su capacidad de promover el proceso de EMT (Sethi, Sung y Aggarwal, 2008; Balkwill, 2009; Mikami *et al.*, 2015). Otros autores también han utilizado TNF α como inductor de EMT en las líneas celulares HCT116 y DLD-1 (Wang *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2015; Komiya *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

4.1.1 Configuración experimental

Para determinar la implicación de los factores de transcripción E2F en el proceso de EMT se procedió a transfectar las células HCT116 en crecimiento exponencial con pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) específicos para estos genes (siE2F1, siE2F2 y siE2F3) con el fin de silenciarlos tanto individual como simultáneamente, tal y como se describe en el apartado 3.1.2 de Materiales y Métodos. Como control de silenciamiento, las células se transfectaron con un siRNA con una secuencia sin especificidad para ninguna molécula conocida de RNA humano (siCTRL). Tras la transfección, se analizaron a distintos tiempos una serie de características típicamente alteradas en el proceso de EMT: morfología celular, adhesión celular, capacidad de

migración e invasión (**Figura 9A**). En paralelo a los experimentos de caracterización del fenotipo se comprobó la eficacia del silenciamiento. Para ello, durante los cinco días siguientes a la transfección se tomó diariamente una muestra de cultivo para extraer RNA y analizar mediante RT-qPCR los niveles de RNA de E2F1-3. Una recopilación de dichos resultados se muestra en la **Figura 9B**. El silenciamiento de E2F1 alcanzó el 80% de su expresión y se mantuvo en el tiempo, con un ligero aumento de su expresión a las 96 y 120 horas. El silenciamiento de E2F2 se situó inicialmente en un 60% de los niveles detectados en las muestras tratadas con siCTRL, y se mantuvo en valores similares hasta las 72 horas. Para las 120 horas, el porcentaje de silenciamiento se redujo considerablemente. El silenciamiento de E2F3 se situó inicialmente en torno al 50% de su expresión, sin embargo, su eficacia fue disminuyendo significativamente a partir de las 48 horas (**Figura 9B**). Merece destacarse que el porcentaje de silenciamiento de cada gen obtenido tanto en los cultivos transfectados con siRNAs específicos para un único miembro de la familia E2F, como en los cultivos con una mezcla de los tres siRNAs (siE2F1, siE2F2, siE2F3) fue muy similar (**Figura 9B**). El empleo del silenciamiento múltiple permite evitar posibles compensaciones funcionales entre los miembros activadores de la familia E2F, por lo que se ha utilizado de manera rutinaria en este trabajo de tesis doctoral.

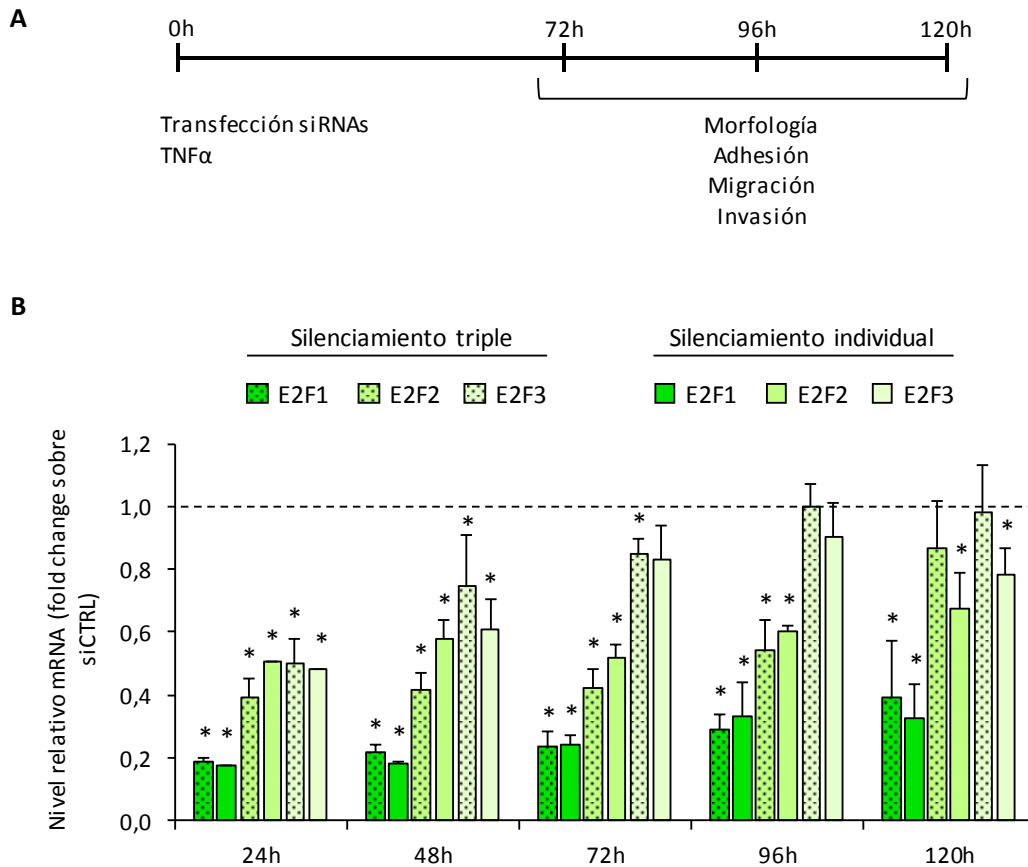


Figura 9: Configuración experimental y efectividad del silenciamiento de E2F1-3. (A) Diagrama representativo de la configuración experimental empleada durante el apartado 1.1 de Resultados. (B) Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1, siE2F2 y siE2F3 individual o simultáneamente. En intervalos de 24 h se extrajo RNA, y mediante RT-qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión (media \pm SD) de más de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$). El silenciamiento de E2F1 y E2F2 fue efectivo y duradero en el tiempo. El silenciamiento de E2F3 fue menos efectivo y desapareció con el tiempo.

De igual modo, se comprobó si el silenciamiento individual de cada E2F daba lugar a una regulación cruzada entre los tres E2F activadores. Para ello, se analizó el nivel de expresión de E2F1-3 en cada condición de silenciamiento individual (**Figura 10**). El silenciamiento de E2F1 no causó alteraciones relevantes en la expresión de E2F2 y E2F3. El silenciamiento de E2F2 tampoco alteró la expresión de E2F1 y E2F3, a excepción de cierta reducción de la expresión de E2F3 a las 48 horas tras la transfección. El silenciamiento de E2F3 no modificó la expresión de E2F1 y E2F2. Estos resultados sugieren la ausencia de regulación cruzada entre los E2F activadores en nuestro paradigma experimental.

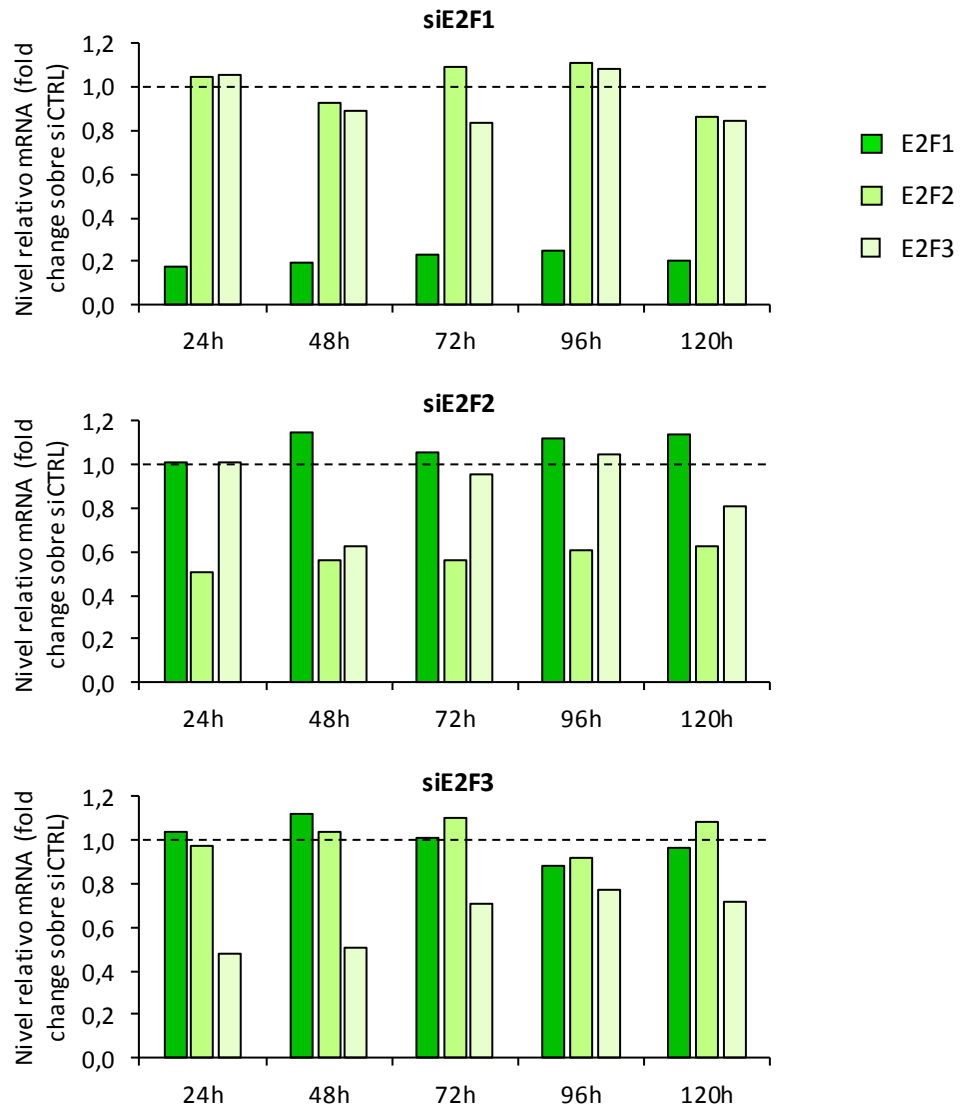


Figura 10: Ausencia de regulación cruzada entre los miembros activadores de la familia E2F. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1, siE2F2 o siE2F3. En intervalos de 24 h se extrajo RNA, y mediante RT-qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de un único experimento. Los silenciamientos individuales no dieron lugar a regulaciones cruzadas entre los miembros de la familia.

4.1.2 Morfología celular

El proceso de EMT transforma células epiteliales, que forman monocapas compactas, en células mesenquimales separadas entre sí, alargadas y móviles, cambios que se asocian con el aumento de la capacidad de diseminación de células tumorales (Leggett *et al.*, 2016). Nuestra primera aproximación para analizar la contribución de los E2F activadores al proceso de EMT consistió en comparar la morfología de las células transfectadas simultáneamente con siRNAs específicos para E2F1, E2F2 y E2F3 (siE2F1/2/3) con la morfología celular tras la transfección con siCTRL. Al cabo de 72 horas se analizaron las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica. Como

control positivo de inducción del proceso de EMT, se emplearon células HCT116 tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/ml) durante 72 horas. Las células tratadas con siCTRL conservaron las características de las monocapas epiteliales, mientras que, como era de esperar, las células tratadas con $\text{TNF}\alpha$ se encontraron separadas entre sí y con una morfología más alargada (**Figura 11**), coincidiendo con un fenotipo esperable en un proceso de EMT. De manera destacada, se observó que las células transfectadas con siRNAs específicos para E2F1-3 mostraban características similares a las tratadas con $\text{TNF}\alpha$, es decir, presentaban una morfología más mesenquimal (**Figura 11**).

Con el objetivo de conocer la contribución de cada miembro activador de la familia de E2F al mantenimiento de la morfología celular epitelial, se procedió a silenciar de manera independiente cada uno de ellos, y a analizar las características morfológicas de las células mediante microscopía óptica. Observamos que la morfología de las células transfectadas con siE2F1 era muy similar a la obtenida con el triple silenciamiento, al apreciarse células más separadas entre sí y alargadas que en el control negativo transfectado con siCTRL (**Figura 11**). En los cultivos transfectados con siE2F2 las células se mostraron menos compactas en comparación con las células transfectadas con siCTRL, aunque este fenotipo era menos acusado que en las células transfectadas con siE2F1 (**Figura 11**). En un cultivo paralelo, las células se transfectaron con siE2F1 y siE2F2 simultáneamente. Se pudo comprobar que la morfología de las células sometidas al silenciamiento doble de E2F1 y E2F2 era similar al de las células sometidas al triple silenciamiento (**Figura 11**). Por último, en el caso de la transfección con siE2F3, las células se mantuvieron unidas formando una monocapa continua, de manera similar al control (**Figura 11**).

El escaso nivel del silenciamiento individual de E2F3 sostenido en el tiempo, sumado a la ausencia de un fenotipo asociado a cambio morfológicos en esta condición nos dio pie a prescindir de dicho tratamiento experimental en los sucesivos ensayos. Asimismo, el escaso nivel de silenciamiento de E2F3 tras la transfección triple de siE2F1/2/3 sugiere que los resultados obtenidos relacionados con los cambios morfológicos puedan ser atribuibles fundamentalmente a la depleción de E2F1 y E2F2. El conjunto de estos resultados reveló la implicación de los factores de transcripción E2F, particularmente E2F1, y en cierta medida E2F2, en el mantenimiento de las características morfológicas epiteliales de las células HCT116. Habida cuenta de estos resultados, el resto de los experimentos de esta tesis se han realizado bajo condiciones de silenciamiento de E2F1 y E2F2.

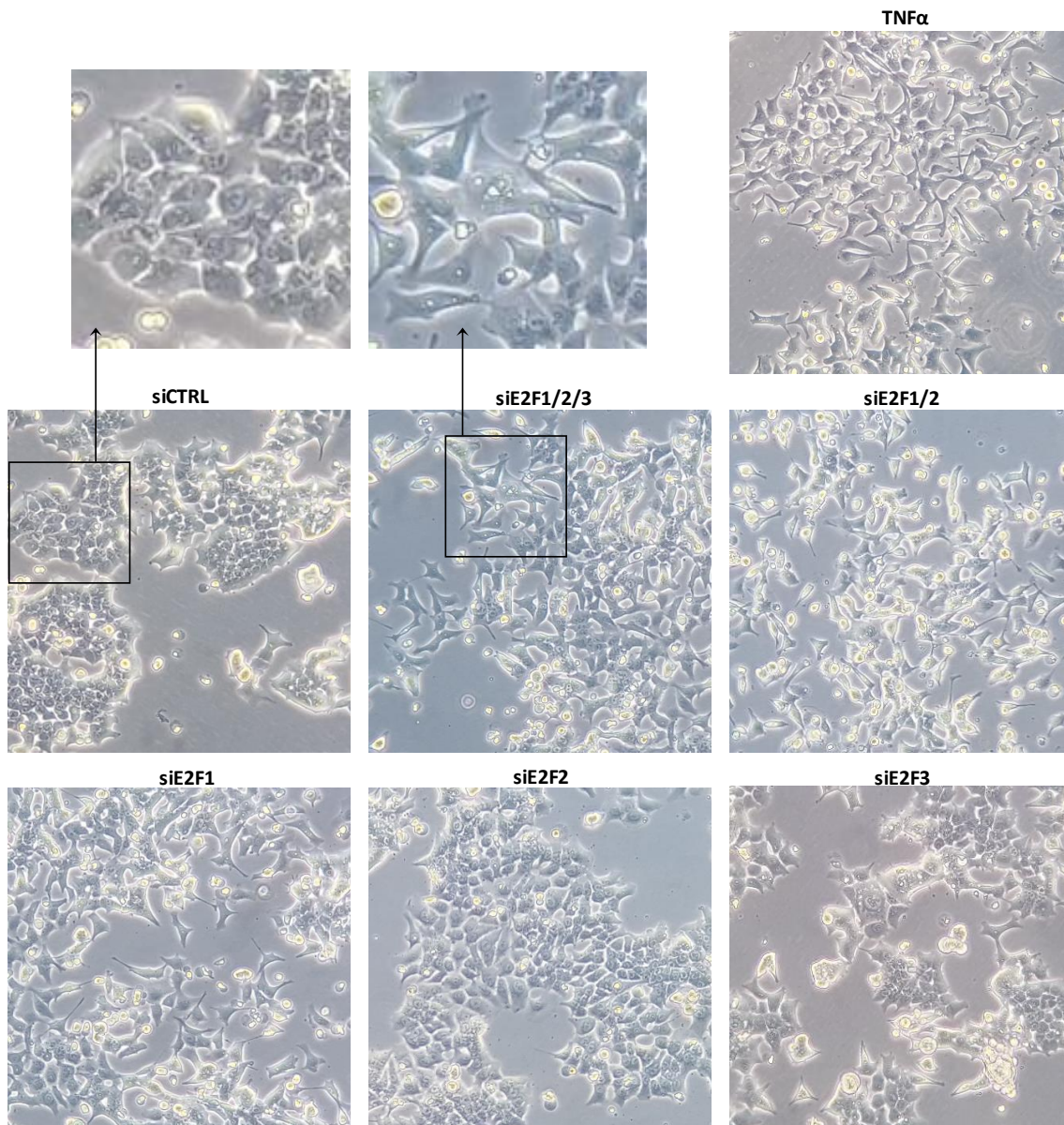


Figura 11: Cambios morfológicos inducidos por el silenciamiento de los E2F. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1, siE2F2 o siE2F3 simultánea e individualmente o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h de tratamiento se tomaron fotografías a través de un microscopio óptico con el objetivo 10x. Las células transfectadas con siE2F1/2/3, con siE2F1/2 o con siE2F1 se mostraron más separadas y alargadas que las transfectadas con siCTRL, presentando un fenotipo similar a las tratadas con TNF α , consistente con un proceso de EMT.

Para evaluar la replicabilidad de los resultados obtenidos y comprobar que no eran exclusivos de las células HCT116, utilizamos la línea celular DLD-1, inmortalizada y transformada. Esta línea celular procede de un adenocarcinoma colorrectal y conserva su fenotipo epitelial característico, lo que la hace adecuada para el estudio de EMT (Hahn *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2016). Tras someter a las células DLD-1 a las mismas condiciones experimentales que las indicadas arriba para las células HCT116, se observó que las células tratadas con siCTRL conservaron las

características de las monocapas epiteliales, mientras que las células transfectadas con siE2F1/2 se encontraron separadas entre sí y con una morfología más alargada (**Figura 12**), de igual manera que ocurría en la línea celular HCT116. Estos resultados refuerzan la idea de que los factores E2F1/2 juegan un papel relevante en el mantenimiento del fenotipo epitelial.

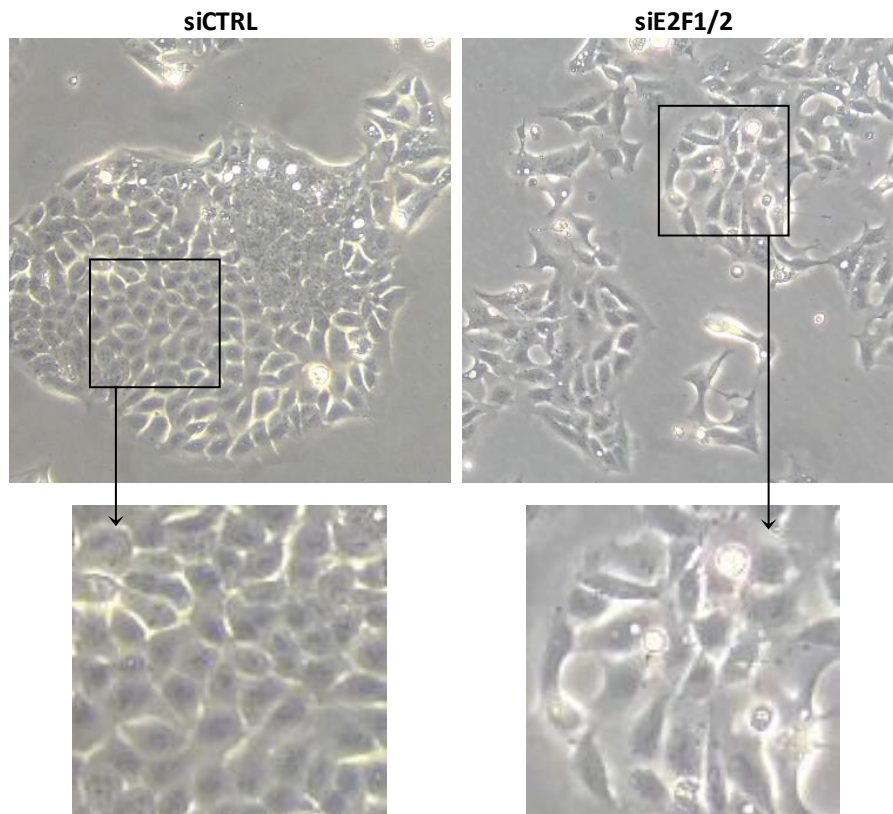


Figura 12: Cambios morfológicos inducidos por el silenciamiento de E2F1/2 en la línea celular DLD-1. Las células DLD-1 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. A las 72 h se tomaron fotografías a través de un microscopio óptico con el objetivo 10x. Las células siE2F1/2 se encontraron más separadas y alargadas que las células siCTRL.

4.1.3 Adhesión

La desintegración de la monocapa epitelial provocada por el silenciamiento de E2F1/2 sugeriría que se estaban produciendo cambios a nivel de adhesión celular. La adhesión celular engloba tanto a proteínas y complejos encargados de la adhesión célula-célula (adhesión intercelular) como a aquellos que dirigen la adhesión de las células a la matriz extracelular, formada principalmente por colágeno. Los complejos encargados de regular la adhesión intercelular y la adhesión a la matriz extracelular son distintos. Por ejemplo, mientras que la E-cadherina es una de las principales proteínas encargadas de la unión célula-célula, otras familias moleculares

(integrinas, fibronectina) se encargan de formar uniones con la matriz extracelular (Hynes, 2002; Pokutta y Weis, 2007).

4.1.3.1. Adhesión intercelular

4.1.3.1.1 Formación de esferoides

Una aproximación experimental que permite evaluar la adhesión intercelular consiste en disgregar las monocapas celulares en cultivo y medir su capacidad para volver a unirse entre sí y formar esferoides. Para analizar la capacidad de las células knockdown para E2F1/2 de formar esferoides, se transfectaron los cultivos de HCT116 con siE2F1/2 o con siCTRL. En un cultivo paralelo, las células se trataron con TNF α . Al cabo de 18 horas, se recogieron las células y se dispusieron en gotas en suspensión conteniendo un 6% de metilcelulosa (700 células/gota). Este sistema de siembra en gotas en suspensión conduce a las células a mantenerse unidas, formándose adhesiones entre ellas y creándose de este modo agregados celulares llamados esferoides. Las células en gotas en suspensión se incubaron durante 48 horas y se tomaron fotografías de los esferoides formados tras este tiempo (**Figura 13A**).

Las células transfectadas con siCTRL formaron esferoides fácilmente visibles mediante microscopía óptica, mientras que las células tratadas con TNF α no fueron capaces de formar esferoides (**Figura 13B**), de manera consistente con la capacidad de este mediador para inhibir la adhesión intercelular (Montesano *et al.*, 2005). Las células knockdown para E2F1/2 fueron capaces de formar esferoides. No obstante, en dos de los tres experimentos realizados (experimentos 1 y 3), se observó un tamaño ligeramente menor de los esferoides knockdown para E2F1/2 que el de los formados por las células tratadas con siCTRL (**Figura 13B y Figura 13C**), sugiriendo cierta pérdida en la capacidad de adhesión célula-célula. Es necesario un mayor número de experimentos que corrobore esta tendencia.

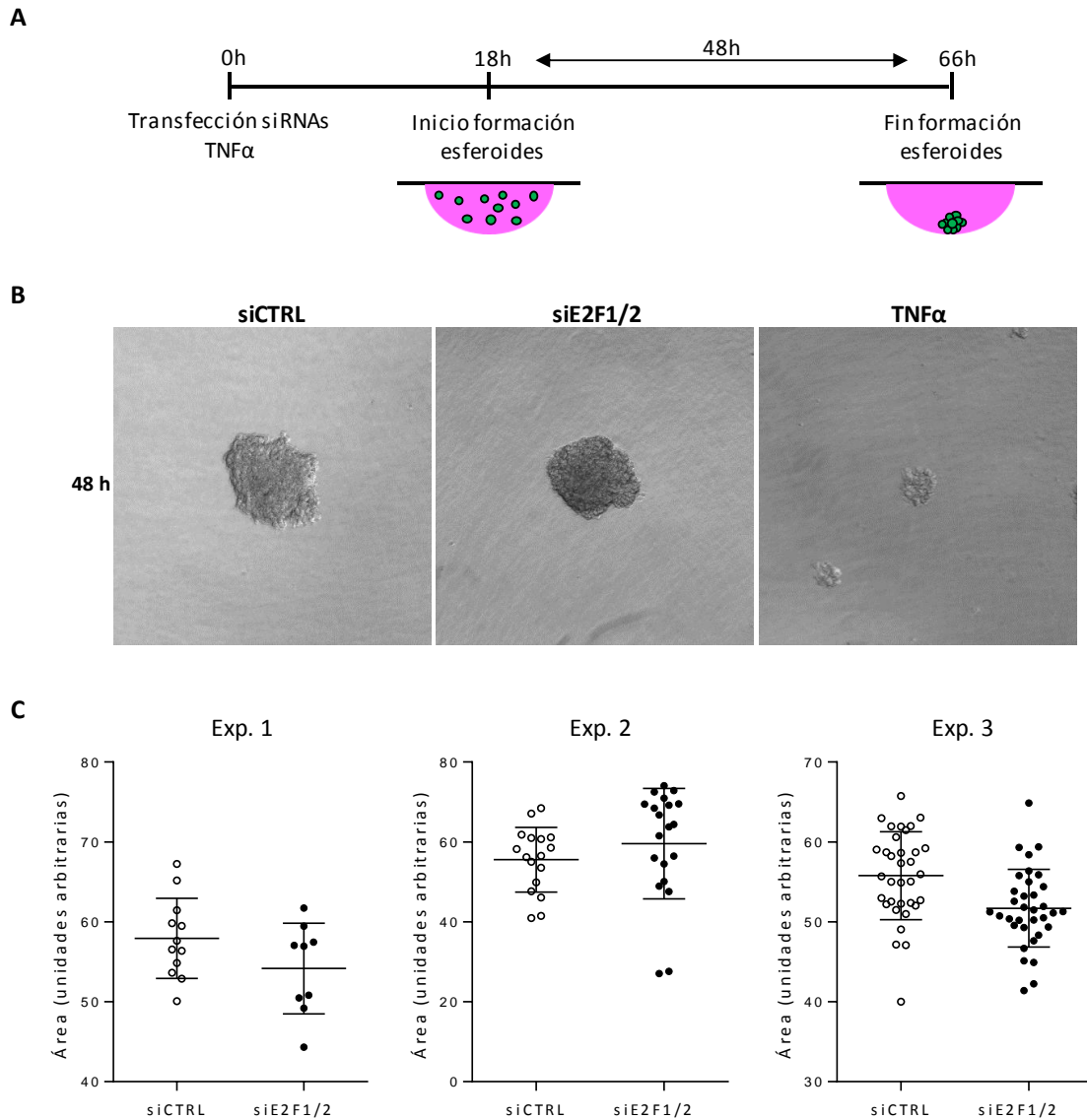


Figura 13: Efecto del silenciamiento de E2F1/2 en la capacidad de formación de esferoides (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2 o se trataron con 25 ng/ml de TNFα. A las 18 h las células se contaron y se dispusieron en gotas de 25 μ l (700 células/gota) con 6% de metilcelulosa bajo la tapa de una placa de 100 mm, donde se formaron los esferoides durante 48 h en incubación a 37°C y 5% CO₂. Tras las 48 h de incubación se tomaron imágenes de cada esferoide. (B) Imágenes representativas de cada condición tomadas mediante microscopía óptica con objetivo 4x a las 48 h de formación de esferoides. Las células tratadas con TNFα no fueron capaces de formar esferoides, mientras que las células siE2F1/2 formaron esferoides ligeramente menores que las siCTRL (C) Los gráficos representan el área de cada esferoide al finalizar su formación (48h) en tres experimentos independientes (media \pm SD).

4.1.3.1.2 Expresión de la proteína E-cadherina

La E-cadherina es una proteína que participa en las uniones intercelulares del tipo *zonula adherens*, y su deslocalización, reducción de sus niveles o sustitución por otras cadherinas, típicamente la N-cadherina, son eventos bien documentados durante el proceso de EMT, y que

contribuyen a la pérdida de adhesión intercelular (Frixen *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 1998; Gravidal *et al.*, 2007; van Roy y Berx, 2008; Hanahan y Weinberg, 2011).

Para examinar la localización y los niveles de la proteína E-cadherina en nuestro sistema, se llevó a cabo en primer lugar un experimento de detección de E-cadherina en cultivos de HCT116 mediante inmunofluorescencia. Las células se transfectaron con siE2F1/2 o siCTRL, o se trataron con TNF α en un cultivo paralelo. Transcurridas 72 horas desde la transfección, las células se tiñeron con el anticuerpo anti-E-cadherina seguido de un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo, y se analizaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia. Las células siCTRL conservaron bien definida la presencia de E-cadherina en la membrana plasmática celular, mientras que su presencia se encontró difuminada en las células tratadas con el control positivo TNF α (**Figura 14A**). Las células knockdown para E2F1/2 mostraron un fenotipo similar a las células tratadas con TNF α , es decir, la E-cadherina se mostró deslocalizada de la membrana plasmática celular (**Figura 14A**).

El ensayo de localización de E-cadherina mediante inmunofluorescencia se repitió utilizando la línea celular DLD-1 (**Figura 14B**). En este caso, también se observó una deslocalización de la E-cadherina de la membrana plasmática tras el silenciamiento de E2F1/2, aunque el fenotipo fue más moderado que en el caso de las células HCT116. Curiosamente, tras el silenciamiento de E2F1/2 se formaron acúmulos perinucleares de E-cadherina en las células DLD-1. El conjunto de estos resultados indica que el silenciamiento de E2F1/2 contribuye a la deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática.

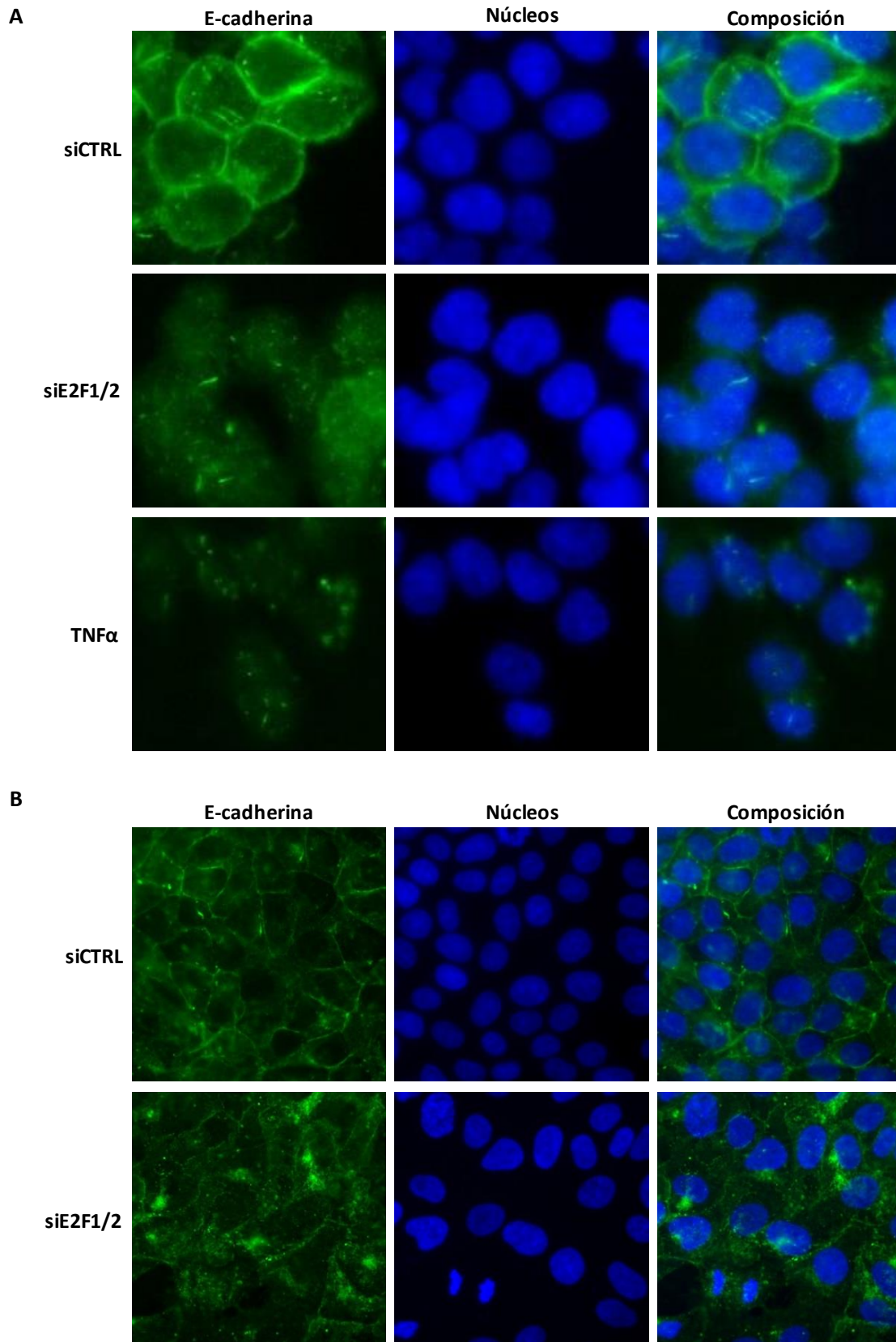


Figura 14: Deslocalización de E-cadherina inducido por el silenciamiento de E2F1/2. Las células HCT116 (A) y DLD-1 (B) se sembraron sobre cubreobjetos de cristal y se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2 o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h de tratamiento las células se fijaron con formaldehído 3.7%, se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% y se incubaron con anticuerpo anti-E-

cadherina seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo Alexa Fluor 488. Las muestras se montaron con medio de montaje con DAPI. Se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia con el objetivo 20x. (A) Imágenes representativas de las células HCT116 tomadas a las 72 h del inicio del tratamiento. (B) Imágenes representativas de las células DLD-1 tomadas a las 72 h del inicio del tratamiento.

La detección de la proteína E-cadherina mediante inmunofluorescencia muestra su deslocalización de la membrana plasmática tras el silenciamiento de E2F1/2, pero no permite cuantificar fácilmente cambios en la cantidad total de proteína celular. Por ello, se recogió proteína a varios tiempos tras los silenciamientos (siCTRL, siE2F1/2, siE2F1 y siE2F2) y los niveles de E-cadherina se cuantificaron mediante *Western blot* (**Figura 15A**). Como puede apreciarse en las **Figura 15B** y **Figura 15C**, el silenciamiento simultáneo de E2F1 y E2F2 causó un efecto en los niveles de E-cadherina, observándose una disminución significativa a tiempos largos (120h). Por otra parte, el silenciamiento individual de E2F1 y E2F2 no tuvo un efecto significativo en los niveles de E-cadherina.

Seguidamente se cuantificaron los niveles de la proteína N-cadherina. De manera inversa a E-cadherina, los niveles de N-cadherina aumentaron en las células knockdown para E2F1/2 (**Figura 15B** y **Figura 15C**). También en este caso, el fenotipo se observó a tiempos largos. Por otro lado, el silenciamiento individual de E2F1 y E2F2 no tuvo efecto en el incremento de los niveles de N-cadherina.

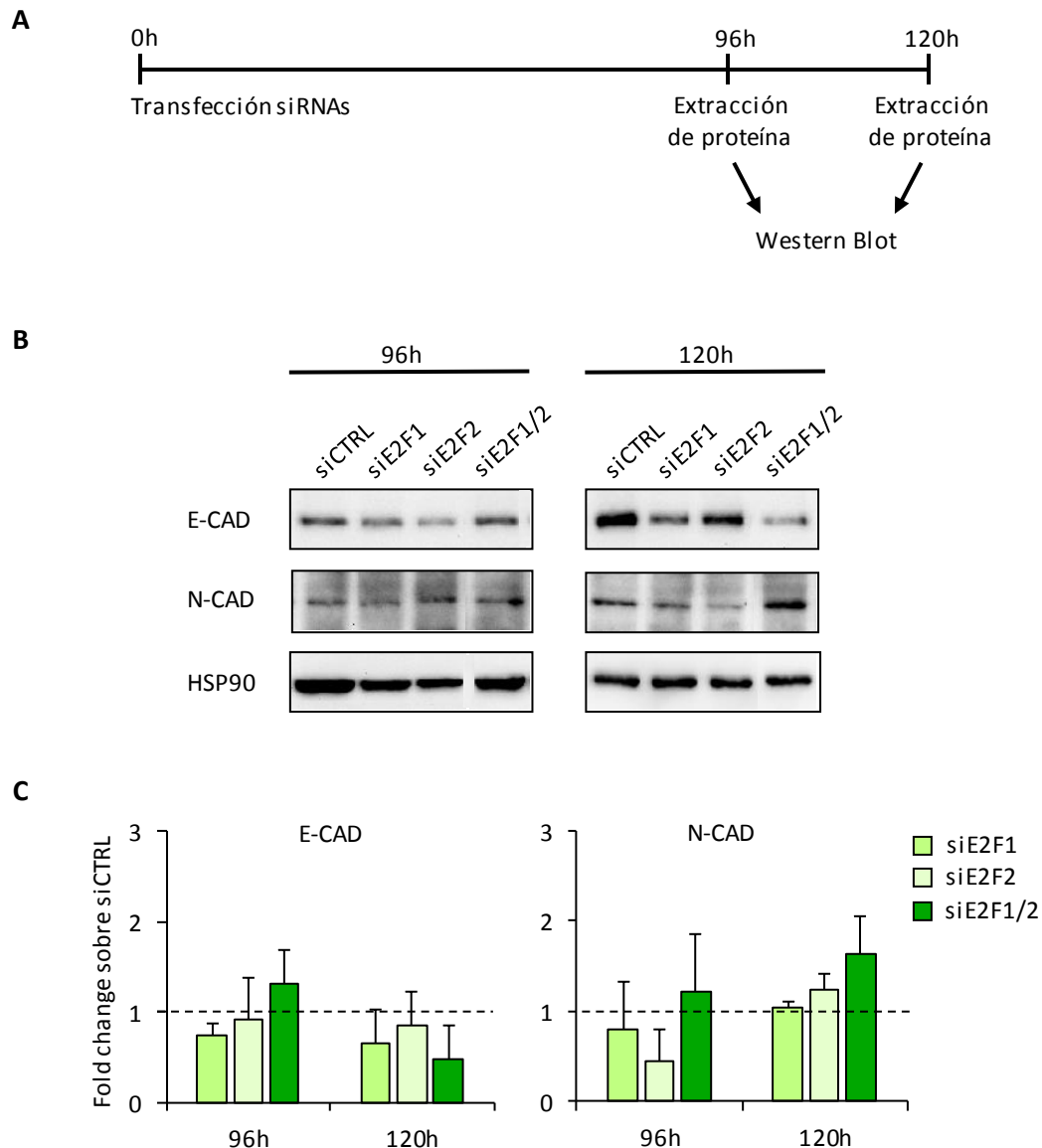


Figura 15: Alteración de los niveles de E-cadherina y N-cadherina inducidos por el silenciamiento de E2F1/2. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o con siE2F1 y/o siE2F2. Se recogió proteína a varios tiempos. (B) *Western blot* representativo con anticuerpos específicos para E-cadherina (E-CAD), N-cadherina (N-CAD) y HSP90 como control de carga. (C) Los gráficos representan el nivel relativo sobre el siCTRL de los niveles de proteína E-cadherina y N-cadherina (media \pm SD) de tres experimentos independientes. Los datos se encuentran corregidos teniendo en cuenta las diferencias en el control de carga HSP90. El nivel de proteína E-cadherina disminuye a las 120 h en la condición siE2F1/2, mientras que el nivel de N-cadherina aumenta a este tiempo.

En su conjunto, estos resultados muestran que el silenciamiento simultáneo de E2F1/2 provocó una deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana celular tras 72 horas, seguido de una disminución de los niveles celulares de E-cadherina a las 120 horas y de un incremento de los niveles de N-cadherina, de manera consistente con las características típicas de un proceso de EMT.

4.1.3.2 Adhesión célula-matriz extracelular

4.1.3.2.1 Adhesión a colágeno

Las uniones célula-matriz extracelular son especialmente importantes para la motilidad celular, ya que posibilitan la migración en procesos como el EMT. Uno de los principales componentes de esta matriz extracelular es el colágeno, por lo que analizar la capacidad de unión de las células a colágeno podría suponer una buena analogía de su capacidad de unión a la matriz extracelular.

Para analizar la adhesión célula-matriz extracelular en nuestro sistema, se transfectaron las células con siE2F1/2 o siCTRL y 72 horas después se recogieron y replaquearon en igual número en pocillos bañados con colágeno tipo I. Tras permanecer 30 minutos en contacto con el colágeno, las células que permanecieron adheridas se tiñeron con cristal violeta. En paralelo, se cultivaron las células tratadas con TNF α siguiendo el mismo procedimiento (**Figura 16A**). Con un análisis colorimétrico se pudo determinar que las células sometidas al silenciamiento de E2F1/2 se mantuvieron adheridas a la placa en menor número que las siCTRL, es decir, perdieron capacidad de adhesión al colágeno. Las células tratadas con TNF α se comportaron de manera opuesta y se adhirieron en mayor medida al colágeno, aunque las diferencias no fueron significativas (**Figura 16B**).

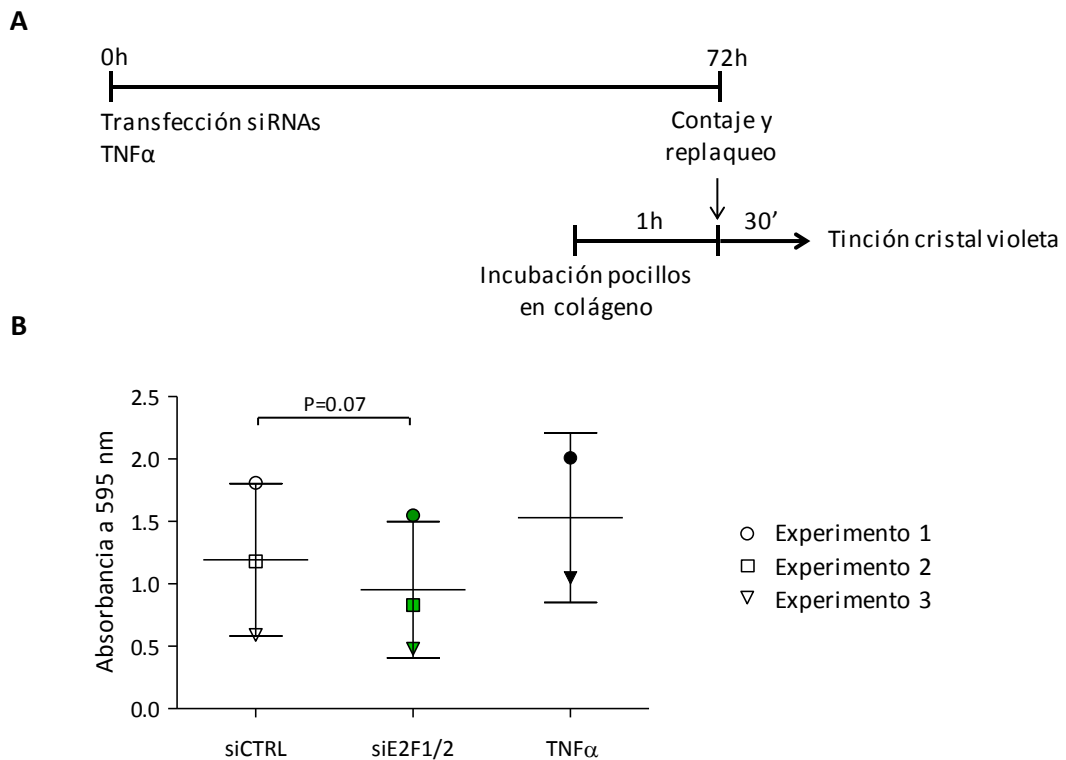


Figura 16: Pérdida de adhesión a colágeno inducida por el silenciamiento de E2F1/2. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o con siE2F1/2 o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h las células se replaquearon en igual número en pocillos bañados con colágeno de rata tipo I. Tras 30' en estos pocillos se retiró el medio y las células adheridas

se tiñeron con cristal violeta. Los niveles de cristal violeta se midieron en un espectrofotómetro a 595 nm. (B) El gráfico representa los valores de absorbancia a 595 nm (media \pm SD) de tres experimentos independientes.

4.1.3.2.2 Niveles de expresión del marcador de superficie CD44

El receptor de membrana CD44 interacciona con el ácido hialurónico, uno de los componentes más abundantes de la matriz extracelular además del colágeno, por lo que su estudio nos aporta nueva información sobre la interacción célula-matriz extracelular. Elevados niveles de CD44 (CD44-high) se han relacionado con un aumento de las capacidades migratorias de las células y el proceso de EMT (Lokeshwar, Lokeshwar y Block, 1995; Kim *et al.*, 2012; Ju, Chiou y Su, 2014).

Para detectar los niveles de CD44, se transfectaron las células con siE2F1/2 o siCTRL o se trataron con TNF α , y tras 72, 96 y 120 horas, se aplicó una tinción de superficie mediante incubación con el anticuerpo anti-CD44 marcado con fluorocromo FITC. Los niveles de expresión en superficie de CD44 se analizaron mediante citometría de flujo (**Figura 17A**). Las células knockdown para E2F1/2, al igual que las tratadas con TNF α , presentaron mayor proporción de células CD44-high que las células siCTRL a las 120 horas de ser tratadas (**Figura 17B y Figura 17D**).

Curiosamente, de acuerdo a los datos recogidos de un único experimento, el silenciamiento individual de E2F1 da lugar a un porcentaje de células CD44-high equivalente al obtenido tras el silenciamiento simultáneo de E2F1 y E2F2, mientras que el silenciamiento individual de E2F2 muestra niveles de CD44-high similares a los de las células siCTRL (**Figura 17C y Figura 17D**).

Por lo tanto, los factores E2F, particularmente E2F1, están involucrados en la regulación del antígeno de superficie CD44, implicado en la modulación de las capacidades adhesivas célula-matriz extracelular que facilitan la migración celular.

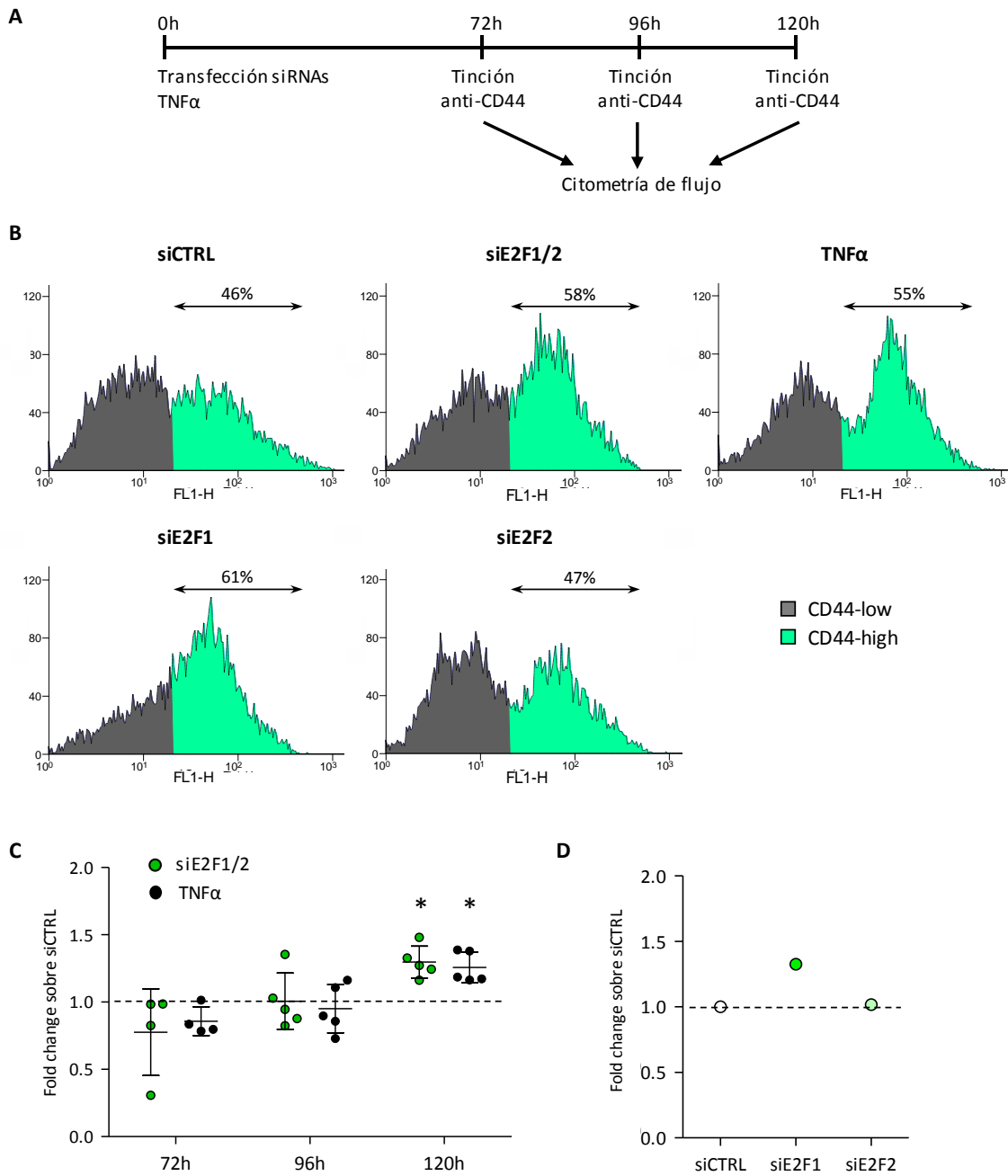


Figura 17: Aumento del porcentaje de células CD44-high inducido por el silenciamiento de E2F1/2. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1 y/o siE2F2 o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72, 96 y 120 h se aplicó una tinción de superficie con el anticuerpo anti-CD44 marcado con FITC. Los niveles de CD44 se detectaron mediante citometría de flujo. (B) Histogramas representativos de cada condición a las 120 h. (C) El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL del porcentaje de células CD44-high (media \pm SD) para cada condición y tiempo en diversos experimentos (*, $P < 0.05$). Las células siE2F1/2 y las tratadas con TNF α presentaron mayor proporción de células CD44-high que las células siCTRL a las 120 horas. (D) Nivel relativo sobre el siCTRL del porcentaje de células CD44-high para cada condición a las 120h. Los valores representan un único experimento. La condición siE2F1 presentó mayor proporción de células CD44-high que las células siCTRL.

4.1.4 Migración

4.1.4.1 Ensayos de migración *Transwell*

La migración es una de las características fundamentales que adquieren las células que experimentan un proceso de EMT y que facilita la progresión tumoral. Uno de los experimentos más utilizados para evaluar la migración celular es el ensayo de migración *Transwell*, en el que un inserto (*transwell*) separa el pocillo de cultivo en dos compartimentos. Las células se siembran en el compartimento superior, mientras que el compartimento inferior se llena con un medio de cultivo quimioatrayente. De esta manera, las células con capacidad migratoria se desplazan desde el compartimento superior al inferior, a partir del cual serán cuantificadas.

Al cabo de 72 horas de aplicar los tratamientos (siCTRL, siE2F1/2, siE2F1, siE2F2, TNF α) sobre las células HCT116, se recogieron las células y seguidamente se sembraron en igual número para todas las condiciones experimentales en la parte superior de los insertos (**Figura 18A**), utilizando el medio de cultivo consumido en el que se habían incubado durante las 72 horas previas, mientras que la parte inferior del pocillo se llenó con medio completo. Tras 24 horas de incubación, se descartaron las células no migratorias que permanecían en la parte superior del inserto, mientras que el fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje conteniendo DAPI (**Figura 18A**), permitiendo la visualización de los núcleos de las células con capacidad migratoria mediante microscopía de fluorescencia. El silenciamiento simultáneo de E2F1/2 aumentó significativamente el número de células migratorias en comparación a las células tratadas con siCTRL, en un rango similar que al del tratamiento con TNF α . El silenciamiento individual de E2F1 o E2F2 aumentó ligeramente el porcentaje de células migratorias aunque no de manera significativa (**Figura 18B y Figura 18C**).

Los experimentos de migración *Transwell* se repitieron en la línea celular DLD-1. Al igual que en el caso de las células HCT116, los resultados obtenidos con las células DLD-1 mostraron una mayor capacidad migratoria de las células knockdown para E2F1/2 en comparación con las células control (**Figura 18D**). El conjunto de estos resultados sugiere que los factores de transcripción E2F1/2 regulan negativamente la capacidad migratoria de las células HCT116 y DLD-1.

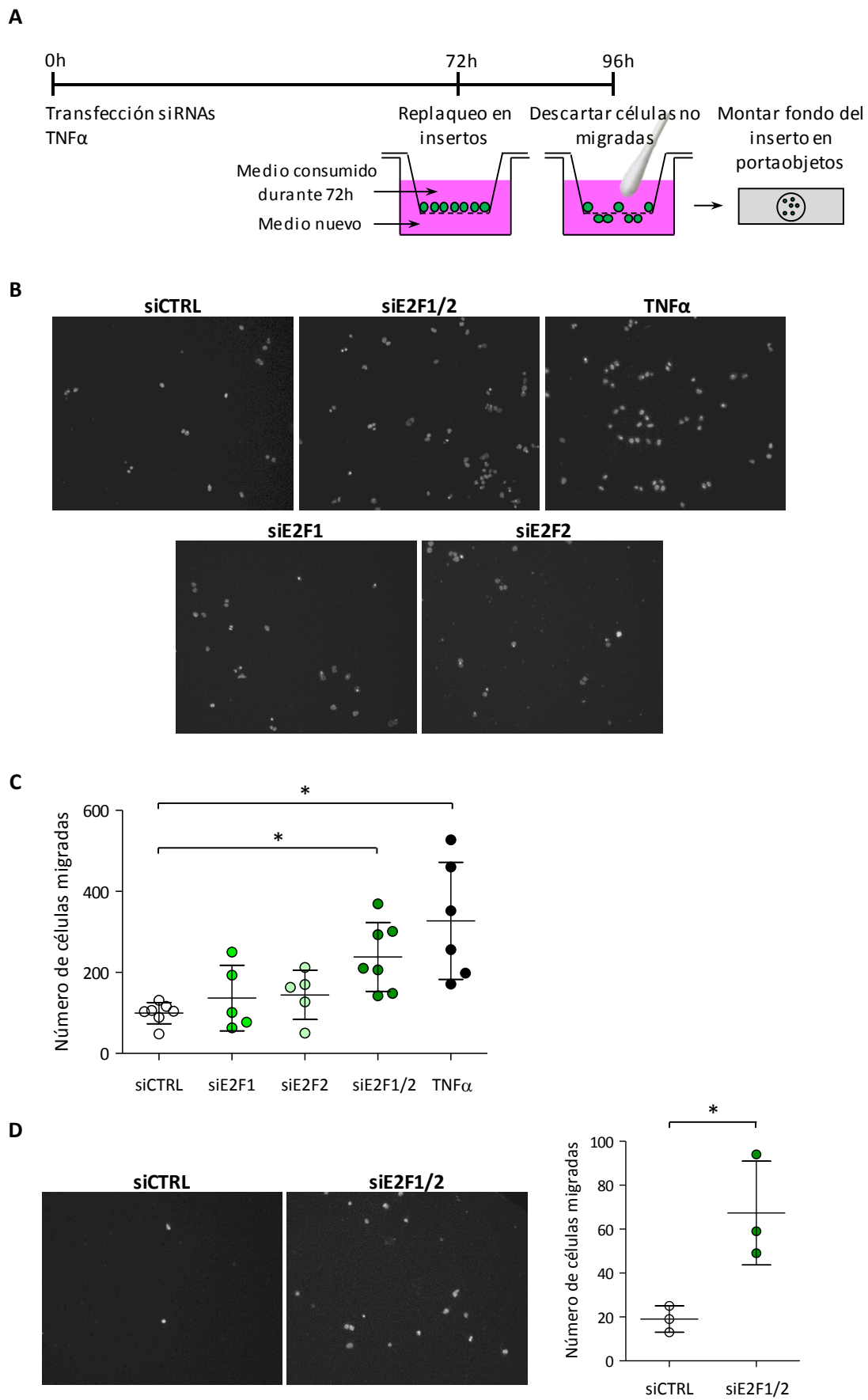


Figura 18: Aumento de la capacidad migratoria en experimentos de migración *Transwell* inducido por el silenciamiento de E2F1/2. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 y DLD-1 se

transfectaron con siCTRL o siE2F1 y/o siE2F2 o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h las células se replaquearon en igual número en los insertos y se dejaron migrar durante 24 h. Se eliminaron las células no migratorias de la parte superior del inserto y el fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje con DAPI. Por cada experimento y condición se tomaron 10 imágenes aleatorias con el objetivo 20x y se contó el número total de núcleos que habían experimentado migración. (B) Imágenes representativas de los núcleos de las células HCT116 migratorias de cada condición tomadas mediante un microscopio de fluorescencia. (C) El gráfico representa el número de células HCT116 migradas (media \pm SD) en varios experimentos independientes (*, P<0.05). (D) Imágenes representativas de los núcleos de células migratorias y cuantificación gráfica de tres experimentos independientes en células DLD-1 (*, P<0.05).

De manera paralela al ensayo de migración *Transwell* se llevaron a cabo experimentos de conteo celular para asegurarnos de que las diferencias de migración observadas no se debían a otros factores como posibles diferencias en la capacidad de proliferación fruto de los distintos tratamientos. El protocolo de transfección celular para siE2F o de tratamiento con TNF α fue paralelo al del ensayo de migración. Al cabo de 72 horas desde la transfección, las células se replaquearon en igual número en otros pocillos (200.000 células/ml), y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas más, el mismo tiempo que en el ensayo de migración *Transwell*. A partir de ese momento, se determinó el número de células viables mediante conteo celular (**Figura 19A**). La viabilidad de las células knockdown para E2F1/2 fue sensiblemente menor que la de las células siCTRL, y de un rango similar al de las tratadas con TNF α (**Figura 19B**). Estos resultados indican que el aumento observado en la capacidad migratoria tras el silenciamiento de E2F1/2 no fue debido a una mayor tasa proliferativa de estas células. De hecho, se podría considerar que subestimamos el aumento de su capacidad de migración, al que podríamos aplicar un factor de corrección acorde con su disminución proliferativa.

las células tratadas con TNF α (**Figura 20B y Figura 20C**). El silenciamiento individual de E2F1 también condujo a un aumento significativo del área cubierta de la herida, si bien este aumento fue inferior al registrado tras el silenciamiento simultáneo de E2F1 y E2F2. El silenciamiento individual de E2F2 no condujo a un aumento significativo del porcentaje del área cubierta (**Figura 20B y Figura 20C**). Por lo tanto, la ausencia simultánea de E2F1/2, y en particular la de E2F1, aumenta la capacidad de migración de las células HCT116. Estos resultados apoyan a los obtenidos mediante ensayos de migración *Transwell*.

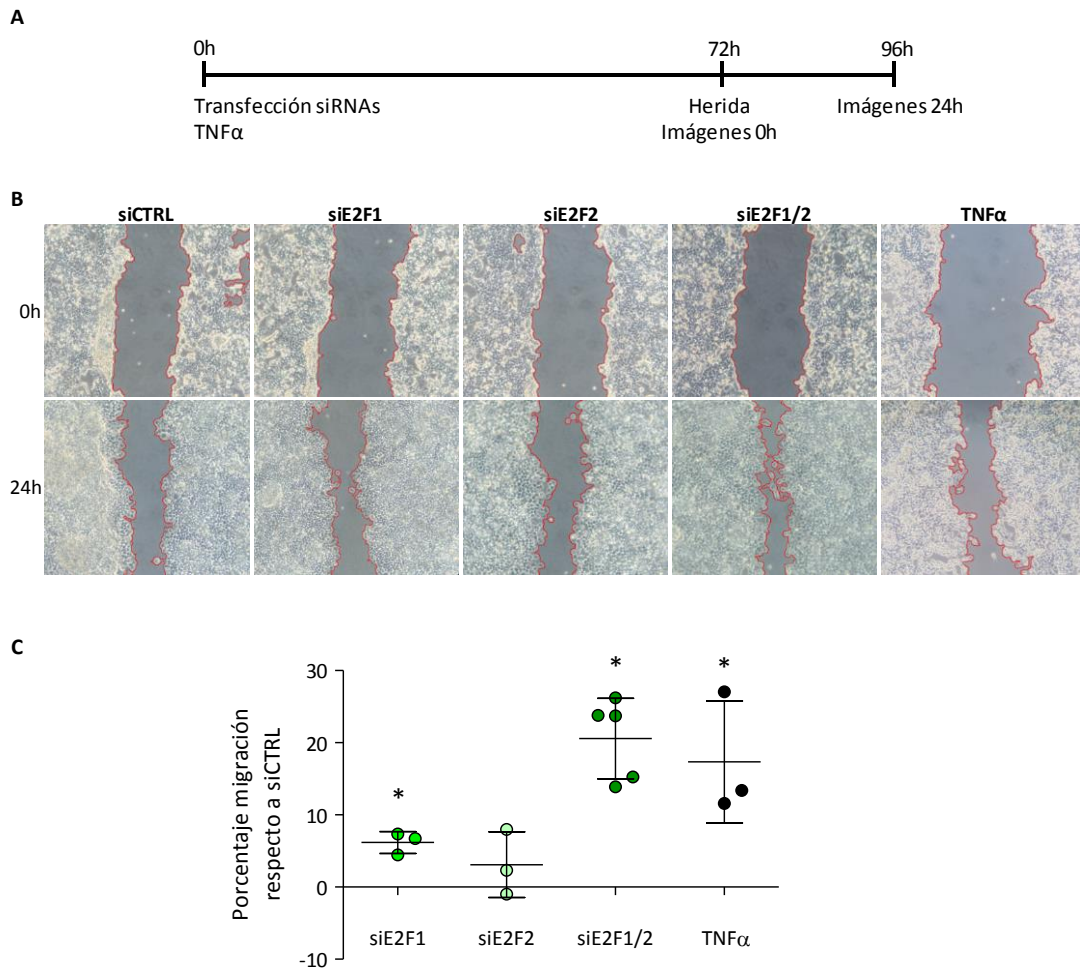


Figura 20: Aumento de la capacidad migratoria inducida por el silenciamiento de E2F1/2 en ensayos de sellado de herida. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1 y/o siE2F2 o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h la monocapa celular confluyente se rompió mediante una punta de pipeta estéril y se tomaron imágenes de la herida (0h). Tras 24 h de incubación se volvieron a tomar imágenes. (B) Imágenes representativas de cada condición tomadas a través de un microscopio óptico. Las células siE2F1/2 y siE2F1 fueron capaces de cubrir mayor parte de la herida que las células siCTRL, de manera similar a las células tratadas con TNF α . (C) El gráfico representa el aumento porcentual del área de herida cubierta por cada condición (media \pm SD) con respecto al siCTRL de varios experimentos independientes (*, $P < 0.05$).

4.1.5 Invasión

4.1.5.1 Ensayos de invasión *Transwell*

El aumento de la motilidad celular y cambios en las capacidades adhesivas observados en los experimentos mostrados previamente nos llevaron a preguntarnos si la ausencia de los E2Fs dotaba a las células HCT116 de capacidad invasiva. La invasión celular consiste en la capacidad de las células de atravesar la matriz extracelular, una propiedad muy relevante durante la metástasis. Para evaluar esta propiedad llevamos a cabo experimentos *Transwell* similares a los utilizados para determinar la capacidad de migración celular (apartado 1.1.4.1 Ensayos de migración *Transwell*), con la diferencia de que los insertos se habían recubierto previamente con Matrigel (BD Bioscience), una sustancia que emula una matriz extracelular (**Figura 21A**).

Las células HCT116 se transfectaron con siE2F1/2 o con siCTRL, y se mantuvieron en cultivo durante 72 horas, al cabo de las cuales se recogieron y replaquearon en igual número en los insertos recubiertos con Matrigel. Al cabo de 24 horas, se descartaron las células que permanecían en la cara superior del inserto, y se examinó la cara inferior para contabilizar el número de células que habían atravesado el Matrigel. Los resultados revelaron que el silenciamiento de E2F1/2 confirió a las células una mayor capacidad para atravesar la matriz extracelular con respecto al siCTRL al haberse contabilizado un mayor número de células en la cara inferior del inserto (**Figura 21B y Figura 21C**). Estos resultados sugieren que E2F1/2 reprimen la capacidad invasiva de las células HCT116.

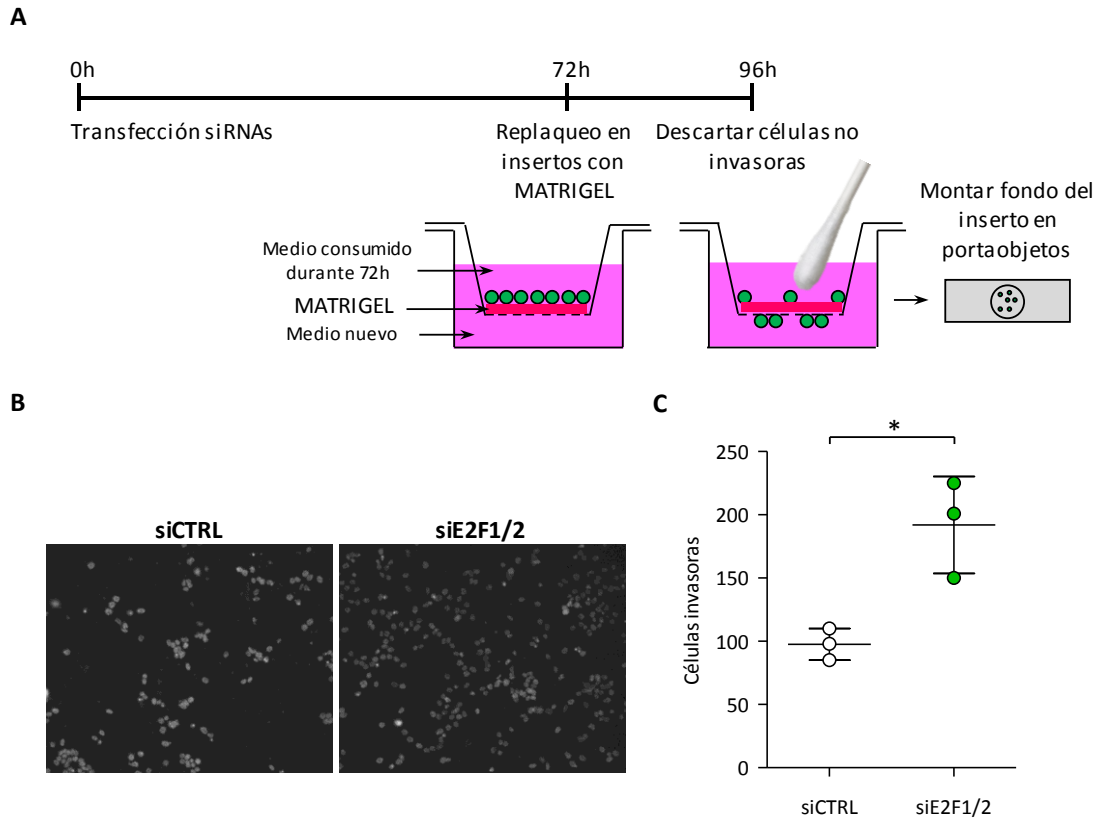


Figura 21: Aumento de la capacidad invasiva inducida por el silenciamiento de E2F1/2 en ensayos *Transwell*. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. A las 72 h se replaquearon en igual número en los insertos previamente incubados con Matrigel y se dejaron migrar durante 48 h. Se eliminaron las células no migrantes de la parte superior del inserto y el fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje con DAPI. Por cada experimento y condición se tomaron 10 imágenes aleatorias con el objetivo 20x y se contaron los núcleos totales migrados. (B) Imágenes de los núcleos (células) invasivas representativas de cada condición tomadas mediante un microscopio de fluorescencia. (C) El gráfico representa el número de células invasivas (media \pm SD) en cada condición en tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$).

4.1.5.2 Crecimiento invasivo (esferoides)

Una aproximación muy informativa para determinar la capacidad invasiva de las células consiste en aplicar el método de invasión en 3D, que cuenta con la ventaja de imitar mejor la estructura y microambiente de un tumor (Edmondson *et al.*, 2014). El método consistió en cuantificar el crecimiento invasivo de esferoides que han sido embebidos en una matriz de colágeno. La formación de estos esferoides se consiguió de igual modo que en el apartado 4.1.3.1.1 Formación de esferoides, a partir de células transfectadas con siE2F1/2 o con siCTRL. En este caso, los esferoides formados se transfirieron a una matriz de colágeno donde permanecieron en incubación durante 72 horas. Se tomaron imágenes al iniciar y finalizar la incubación y se midió el incremento del área de cada esferoide (**Figura 22A**).

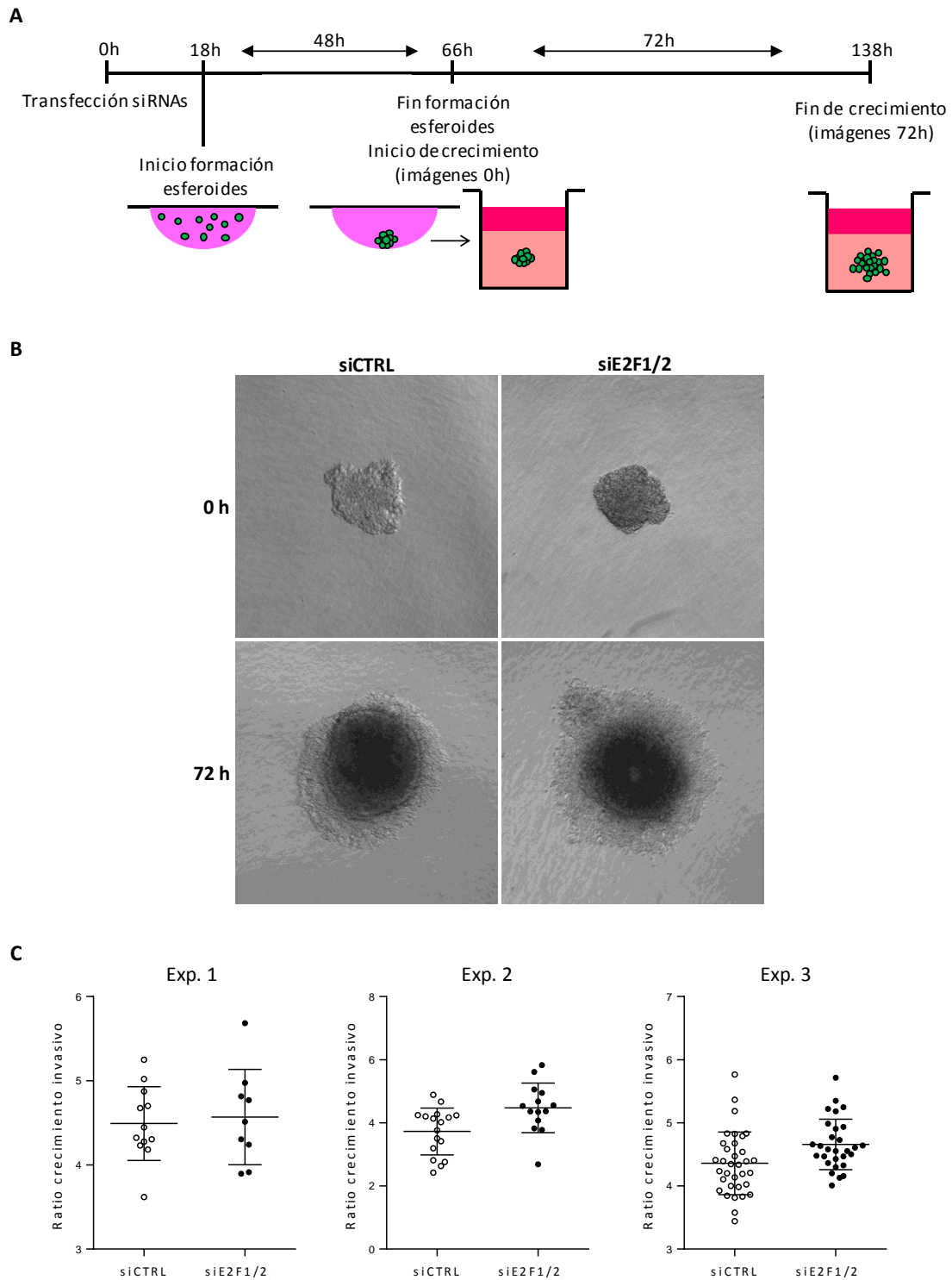


Figura 22: Efecto del silenciamiento de E2F1/2 en la capacidad de crecimiento invasivo. (A) Diagrama experimental esquemático. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. A las 18 h se contaron las células y se dispusieron en gotas de 25 μ l (700 células/gota) con 6% de metilcelulosa bajo la tapa de una placa de 100 mm, donde se formaron los esferoides durante 48 h. Seguidamente, los esferoides se recogieron e incubaron en una matriz de colágeno I bovino a 37°C y 5% CO₂ durante 72 h (tiempo de crecimiento). Las imágenes se tomaron al inicio (0h) y final (72h) del tiempo de crecimiento. (B) Imágenes representativas de cada condición tomadas mediante microscopía óptica con objetivo 4x. (C) Los gráficos representan la tasa de crecimiento invasivo de cada esferoide en tres experimentos independientes (media \pm SD), calculado a partir de las diferencias en el área de cada esferoide entre las

0h y 72h de crecimiento. La tasa de crecimiento invasivo de los esferoides siE2F1/2 tiende a ser ligeramente mayor que el de siCTRL aunque no de manera significativa.

Los esferoides knockdown para E2F1/2 aumentaron ligeramente su ratio de crecimiento invasivo con respecto a los esferoides siCTRL, medido como incremento del área de cada esferoide, si bien es cierto que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, particularmente debido a la heterogeneidad de los datos obtenidos en el experimento 1 (**Figura 22B y Figura 22C**).

Hay que tener en cuenta que en este tipo de experimento la medición de invasión está estrechamente ligada al crecimiento o proliferación celular. Por ello, en paralelo a los experimentos de crecimiento invasivo de los esferoides se examinó la viabilidad de los cultivos celulares. Se encontró que las células tratadas con siE2F1/2 mostraron una reducción del 23% en el número de células a las 72 horas (tiempo de crecimiento del esferoide) en relación a los cultivos siCTRL (**Figura 23**). Este resultado sugiere que podríamos estar subestimando la tasa de crecimiento invasivo de los esferoides knockdown para E2F1/2. Si aplicáramos un factor de corrección proporcional a la disminución de su capacidad proliferativa con respecto a los esferoides tratados con siCTRL, la tasa de crecimiento invasivo de los esferoides tratados con siE2F1/2 sería sustancialmente mayor que el observado. Por lo tanto, estos resultados apoyan la idea de que la ausencia de E2F1/2 promueve la capacidad invasiva de las células HCT116.

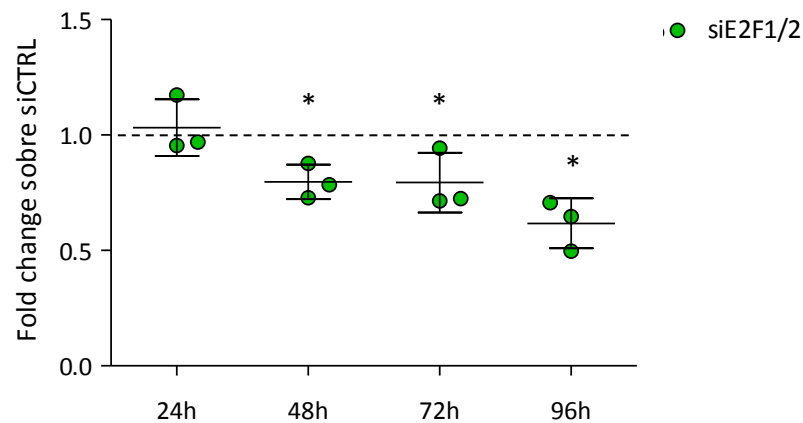


Figura 23: Viabilidad celular a lo largo del tiempo. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. A las 24, 48, 72 y 96 h se recogieron y se contaron en la cámara de Neubauer, tras ser teñidas con azul de tripano. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de conteo (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$). La viabilidad celular disminuye con respecto al siCTRL a lo largo del tiempo en las células transfectadas con siE2F1/2.

4.2 BÚSQUEDA DEL MECANISMO SUBYACENTE AL EMT INDUCIDO POR LA DEPLECIÓN DE E2F: IDENTIFICACIÓN DE GENES DESREGULADOS EN EL SISTEMA

Los resultados mostrados en el apartado anterior indican que la ausencia de los factores E2F1/2 promueve un proceso del tipo EMT en las células de cáncer colorrectal HCT116 y DLD-1. La implicación de los E2Fs en este proceso es prácticamente desconocida. Para identificar el mecanismo subyacente capaz de promover el fenotipo EMT observado tras la depleción de E2F1/2, se decidió analizar el transcriptoma de células knockdown para E2F1 y E2F2 a varios tiempos, y compararlo con el transcriptoma de células control (siCTRL).

4.2.1 Configuración experimental del análisis transcriptómico

El análisis transcriptómico se realizó con datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) en la línea celular HCT116, caracterizada en detalle en el apartado anterior. Como condiciones experimentales se emplearon el silenciamiento simultáneo de E2F1 y E2F2 (siE2F1/2), con el que se habían obtenido los resultados fenotípicos más sólidos, y su silenciamiento control (siCTRL), así como el tratamiento con TNF α como control positivo de inducción de EMT. En cuanto a los puntos temporales a estudiar, se escogieron los tiempos de 24, 48 y 96 horas después de los tratamientos. El punto temporal de 24 horas es un punto temprano en cuanto al desarrollo del fenotipo EMT, pero que puede aportar información relevante sobre la desregulación génica más temprana y directa causada por las distintas condiciones experimentales, mientras que los puntos temporales de 48 horas y, particularmente, el de 96 horas aportan información de los cambios más tardíos y, en ocasiones, indirectos, cuando el fenotipo EMT está más establecido.

A los tiempos indicados tras los tratamientos, se extrajo y purificó el RNA total. Este esquema experimental (**Figura 24A**) se repitió 3 veces de manera independiente, obteniendo 3 replicados biológicos de cada condición y tiempo. La integridad del RNA de cada muestra se analizó mediante el valor RIN. Todas las muestras alcanzaron la máxima puntuación, es decir, un valor RIN de 10, indicativo de un RNA de gran pureza.

Para asegurar la calidad y homogeneidad de las muestras recogidas, se comprobó la efectividad del silenciamiento de E2F1 y E2F2 en todas ellas (**Figura 24B**). Asimismo, se determinó la inducción del marcador CD44 en cada experimento, con objeto de verificar el establecimiento del fenotipo EMT en las células sometidas al silenciamiento de E2F1/2 (**Figura 24C**). Los resultados obtenidos se encontraron dentro de los rangos esperables de acuerdo con resultados

anteriores, tanto de silenciamiento de los E2F como de inducción de CD44, lo cual indicó la idoneidad de las muestras.

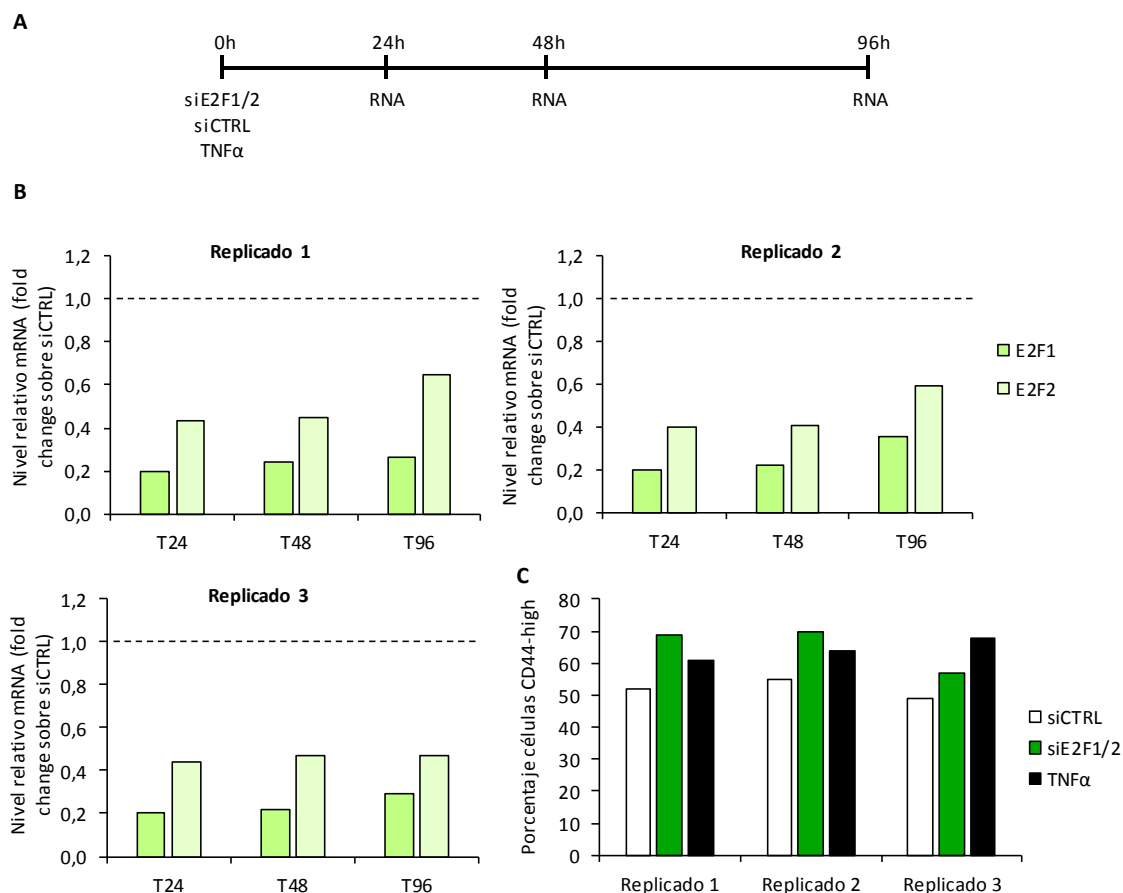


Figura 24: Configuración experimental del RNA-Seq y comprobación de la idoneidad de las muestras. (A) Configuración experimental de la extracción de RNA para el RNA-Seq. Las células HCT116 se transfirieron con siCTRL o siE2F1/2 o se trataron con 25 ng/ml de TNFα. A las 24, 48 y 96 h las células se recogieron con TRIzol para extraer y purificar el RNA total. (B) Comprobación de la efectividad del silenciamiento de E2F1/2. El RNA extraído se purificó y con él se sintetizó cDNA. Mediante qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión. El silenciamiento de E2F1 y E2F2 fue efectivo y duradero en el tiempo. (C) Comprobación de la inducción de CD44. A las 120 h tras los tratamientos se aplicó a las células una tinción de superficie con el anticuerpo anti-CD44 marcado con FITC. Los niveles de CD44 se detectaron mediante citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de células CD44-high para cada condición en cada replicado. Las células siE2F1/2 y las tratadas con TNFα presentaron mayor proporción de células CD44-high que las células siCTRL.

Finalmente, y tras comprobar la idoneidad de todas las muestras obtenidas, se decidió utilizar un total de 24 muestras para la secuenciación masiva de RNA: triplicados biológicos en los 3 tiempos (24, 48, 96 horas) de cada una de las condiciones experimentales (siE2F1/2 y TNFα) y duplicados biológicos de la condición siCTRL. La secuenciación del RNA se llevó a cabo en el equipo HiSeq2000 (Illumina) mediante el método de lecturas pareadas.

4.2.2 Procesamiento de datos

Se obtuvo una media de 29 millones de lecturas pareadas por muestra, de las cuales el 80% se alinearon de manera única con el genoma de referencia, lo cual constituye un valor elevado muy aceptable en este tipo de experimentos (Conesa *et al.*, 2016). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó la herramienta TopHat (Trapnell, Pachter y Salzberg, 2009). El número de lecturas alineadas con cada locus (*counts*) se calculó mediante HTSeq (Anders, Pyl y Huber, 2015), y se analizaron los transcritos que tuvieron más de 5 lecturas en, al menos, la mitad de las muestras analizadas. La normalización de los *counts* se llevó a cabo mediante RUVSeq utilizando como genes de referencia los 10.987 genes que presentaron menores diferencias de expresión entre las muestras problema y las muestras control. La **Figura 25** representa la distribución de las muestras normalizadas mediante un análisis de componentes principales. Las muestras de cada condición experimental (siCTRL, siE2F1/2 y TNF α) se distribuyeron diferencialmente, pudiéndose agrupar cada condición en un área del gráfico. Las muestras transfectadas con siCTRL se situaron en la zona central mientras que las muestras problema transfectadas con siE2F1/2 y las muestras del control positivo tratadas con TNF α se distribuyeron a ambos lados. Esta distribución nos indica que, a pesar de desarrollar un fenotipo similar, los genes desregulados para las muestras siE2F1/2 y TNF α son, en gran medida, distintos. Definimos una de las muestras siCTRL a tiempo 24 horas como un valor atípico (*outlier*) al situarse significativamente alejada del resto de muestras siCTRL, y prescindimos de ella en los sucesivos análisis.

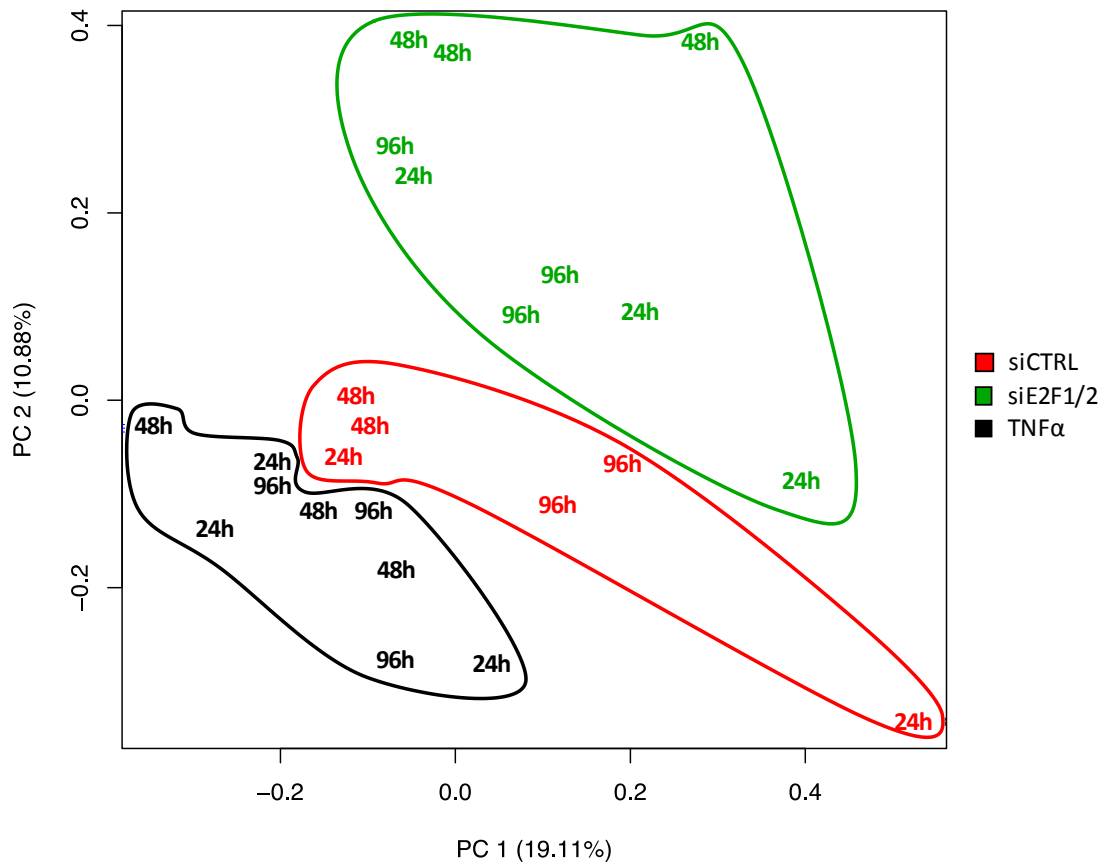


Figura 25: Distribución de las muestras normalizadas en un análisis de componentes principales. La normalización de los counts se llevó a cabo mediante RUVSeq utilizando como genes de referencia los 10987 genes que menores diferencias de expresión presentaron. Las muestras de cada condición experimental se distribuyeron diferencialmente, indicado diferencias en la regulación génica entre las distintas condiciones. La muestra siCTRL 24h de la esquina inferior derecha se consideró como valor atípico o *outlier*.

Tras la normalización de los *counts*, la expresión diferencial se calculó mediante el test exacto edgeR y reducción de la varianza DESeq2 implementados en los paquetes de R. Consideramos como genes desregulados aquellos que presentaban diferencias de expresión para ambos métodos con una $P < 0.05$ (valor de P ajustado, Benjamini and Hochberg, 1995). En la **Tabla 9** se representa el número de genes diferencialmente expresados para cada condición y tiempo, así como el número de genes diferencialmente expresados comunes para ambas condiciones.

El número de genes diferencialmente expresados tras el silenciamiento de E2F1/2 o el tratamiento con TNF α con respecto a siCTRL fue elevado en prácticamente todos los tiempos, con un pico de genes desregulados a las 48 horas en el caso del silenciamiento de E2F, y a las 96 horas en el caso del tratamiento con TNF α (**Tabla 9**). Curiosamente, el número de genes comúnmente desregulados entre las dos condiciones inductoras de EMT fue inicialmente reducido, aunque aumentó con el tiempo, lo que sugiere que las vías por las que se induce EMT tras la estimulación por TNF α o tras la depleción de E2F1 y E2F2 son en gran parte distintas.

Tabla 9: Número de genes diferencialmente expresados para cada condición y tiempo con respecto a siCTRL, y número de genes diferencialmente expresados comunes a ambas condiciones.

	siE2F1/2	TNF α	Comunes
24 h	604	697	71
48 h	1664	247	105
96 h	873	1282	359

4.2.3 Expresión diferencial de los miembros de la familia E2F

Antes de profundizar en el análisis de los datos del RNA-Seq, se examinó la expresión de E2F1 y E2F2 en la lista de genes desregulados en la condición siE2F1/2. Se comprobó que E2F1 y E2F2 se encontraban significativamente subexpresados a todos los tiempos tras el silenciamiento (**Tabla 10**), condición necesaria para poder atribuir a dicha inhibición el origen de la desregulación génica observada.

Tabla 10: Fold change sobre siCTRL (DESeq2) de los genes E2F en la condición siE2F1/2 a todos los tiempos tras el silenciamiento. "sc", sin cambio.

	E2F1	E2F2	E2F7	E2F8
24 h	0,41	0,41	0,55	sc
48 h	0,45	0,39	0,66	0,71
96 h	0,52	0,60	sc	sc

El resto de los miembros de la familia E2F no mostraron cambios en su expresión como consecuencia del silenciamiento de E2F1/2, con la excepción de E2F7 y E2F8, cuyos niveles se encontraron subexpresados a las 24 y 48 horas (**Tabla 10**). Esta desregulación génica es consistente con los resultados descritos en la literatura, puesto que E2F7 y E2F8 contienen motivos de unión a E2F en sus promotores, y se ha demostrado que E2F1/2 son reguladores positivos de su expresión (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano, Jensen y Helin, 2003; Christensen *et al.*, 2005).

Atendiendo a estos resultados, se consideró la posibilidad de que la subexpresión de E2F7/8 fuese directamente responsable del fenotipo EMT provocado por el silenciamiento de E2F1/2. Con el fin de investigar esta posibilidad, se procedió a la depleción de E2F7/8 en las células HCT116. Para ello, se utilizaron siRNA específicos para dichos genes (siE2F7 y siE2F8), utilizados

en estudios previos en el laboratorio (Mitzelena *et al.*, 2016, 2018), y se siguió un protocolo de transfección análogo al utilizado para el silenciamiento de E2F1/2. El silenciamiento conjunto de E2F7 y E2F8 (siE2F7/8) dio lugar a un fenotipo apoptótico a partir de las 48 horas desde la transfección (**Figura 26**), pero en ningún caso se observó que las células adquirieran un fenotipo mesenquimal. Este resultado descarta la hipótesis en la que E2F7 y E2F8 serían los principales responsables del establecimiento del fenotipo EMT en ausencia de E2F1/2.

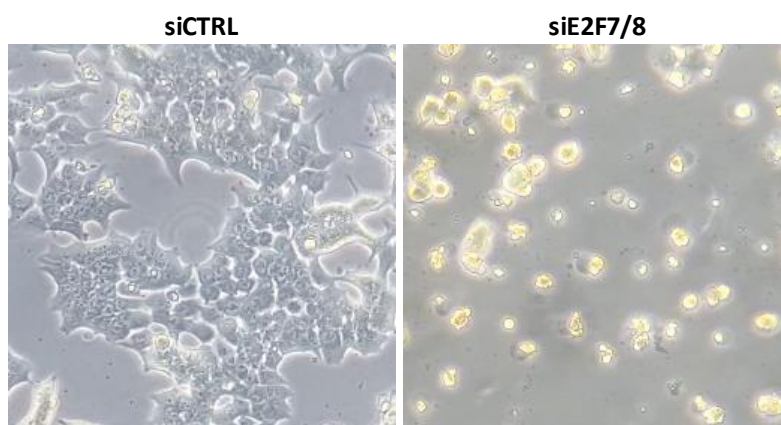


Figura 26: Efecto del silenciamiento simultáneo de E2F7 y E2F8 en las células HCT116. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o con siE2F7/8. A las 72 h de tratamiento se tomaron fotografías a través de un microscopio óptico con el objetivo 10x. Las células transfectadas con siE2F7/8 mostraron un fenotipo apoptótico.

4.2.4 Regulación de la expresión génica por E2F1/2

Tradicionalmente, E2F1/2 han sido considerados como activadores transcripcionales (Trimarchi y Lees, 2002). Sin embargo, nuestro grupo y otros después, han demostrado que E2F1 y E2F2 desempeñan un papel crítico en el control de la proliferación y el mantenimiento de la quiescencia celular mediante la regulación negativa de la expresión génica (Iglesias *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Chong *et al.*, 2009; Laresgoiti *et al.*, 2013). Por lo tanto, sus mecanismos de regulación de la expresión génica parecen ser diversos dependiendo del contexto celular. En nuestro sistema, el efecto del silenciamiento de E2F1/2 varía en cuanto al número y la proporción de genes sobreexpresados y subexpresados a lo largo del tiempo tras el silenciamiento (**Figura 27**). Si se considera el punto temporal más temprano (24 horas) se observa la mayor diferencia en la proporción de genes sobreexpresados y subexpresados: el número de genes subexpresados (467) fue casi cuatro veces superior al de genes sobreexpresados (137), sugiriendo en este caso un papel mayoritariamente activador de los genes E2F1/2. A tiempos más largos tras el silenciamiento (48 y 96 horas), las proporciones entre genes sobreexpresados y subexpresados están más igualadas que a tiempos cortos (55%-45% a las 48 horas y 49%-51% a las 96 horas), lo cual sugiere una regulación tanto negativa como

positiva de la expresión génica por parte de E2F1 y E2F2 durante el establecimiento del fenotipo EMT.

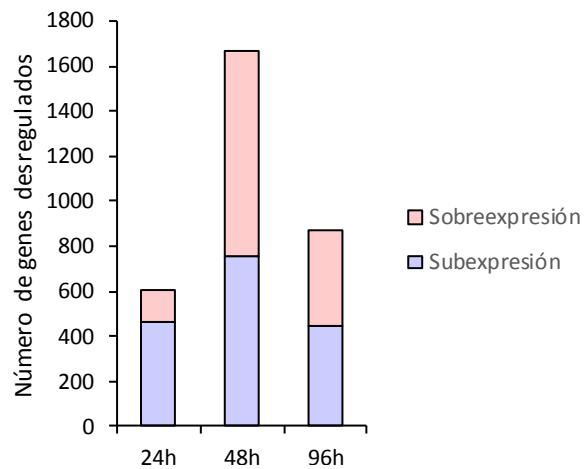


Figura 27: Número de genes subexpresados y sobreexpresados en la condición siE2F1/2 a cada tiempo tras el silenciamiento. A las 24 h casi el 80% de los genes desregulados se encontraron subexpresados, mientras que a las 48 y 96 horas las proporciones se encontraron igualadas.

4.2.4.1 Análisis de la región promotora de los genes diferencialmente expresados en células knockdown para E2F1/2

Para profundizar en el análisis de la regulación génica ejercida por E2F1/2 en el conjunto de genes desregulados, analizamos los elementos reguladores de la región promotora de los genes diferencialmente expresados en ausencia de E2F1/2. Para ello, se utilizó la herramienta informática DiRE (Gotea y Ovcharenko, 2008), que calcula el grado del enriquecimiento de motivos de unión de factores de transcripción (transcription factor binding sites, TFBS) en las regiones promotoras de acuerdo a dos valores: *presencia* (porcentaje de los genes diferencialmente expresados que contienen un TFBS determinado en su región reguladora) e *importancia* (producto de la *presencia* y un factor denominado *peso* que tiene en cuenta la distribución de los TFBS en la lista de genes problema y en los genes del fondo (background) génico contra los que se comparan (Pennacchio *et al.*, 2007)). La *importancia*, al estar compuesta por los valores de *presencia* y *peso*, se trata de una medida integradora del valor de cada TFBS en el conjunto. Llevamos a cabo el análisis sobre los genes diferencialmente expresados a todos los tiempos tras el silenciamiento, y analizando de manera independiente el subconjunto de genes sobreexpresados y subexpresados. Los resultados mostraron un enriquecimiento de motivos de unión E2F en los genes subexpresados a las 24 y 48 horas (**Figura 28**), sugiriendo un papel para E2F1/2 como activadores transcripcionales a dichos tiempos. Curiosamente, la tendencia se invirtió a las 96 horas, mostrando un enriquecimiento considerable de motivos de unión E2F en los genes sobreexpresados (**Figura 28**).

Además de E2F, también se identificaron otros factores de transcripción cuyos motivos de unión se encontraban enriquecidos, como es el caso de HIF1 en los genes sobreexpresados a las 24 horas o de SP1 en los genes sobreexpresados a las 48 horas. Sin embargo, ninguno de ellos se mostró enriquecido en más de un tiempo, por lo que se hace difícil determinar su contribución al perfil de expresión génica obtenido en el experimento.

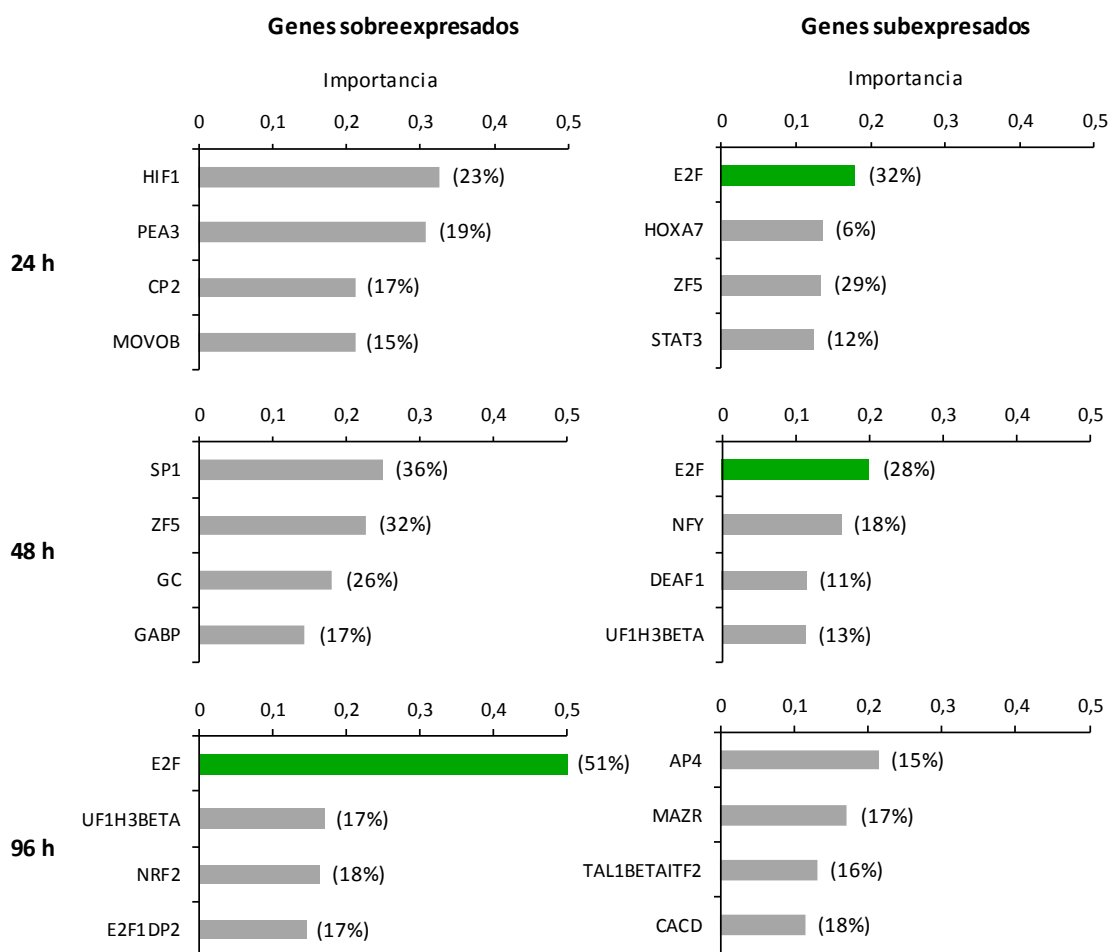


Figura 28: Enrichimiento de motivos de unión de factores de transcripción (TFBS) en las regiones promotoras de los genes diferencialmente expresados en la condición siE2F1/2. El análisis se llevó a cabo con la herramienta informática DiRE. El eje X representa la *importancia* de cada TFBS, mientras que la *presencia* se representa entre paréntesis al lado de cada barra. Se representan únicamente los cuatro TFBS con mayor *importancia*. Los motivos de unión E2F fueron los más sobrerrepresentados en los genes subexpresados a las 24 y 48 h y en los genes sobreexpresados a las 96 h, en base tanto a la *importancia* como a la *presencia*.

Los resultados del análisis de la región promotora de los genes diferencialmente expresados en las células tratadas con TNF α se encuentran recogidos en la **Figura suplementaria 1**. Cabe destacar el enriquecimiento en motivos de unión de factores de la familia NF- κ B en los genes sobreexpresados a las 24 y 48 horas, de acuerdo con el papel de TNF α como liberador de NF- κ B, que es trasladado al núcleo donde actúa como factor de transcripción.

4.2.4.2 Análisis de los procesos biológicos regulados por E2F1 y E2F2

A continuación, nos preguntamos en qué procesos biológicos estaban participando los genes desregulados tras el silenciamiento de E2F1 y E2F2. Con este fin, se clasificaron los genes diferencialmente expresados de acuerdo con sus ontologías génicas (*gene ontology*, GO) utilizando para ello la herramienta informática DAVID (Huang, Brad T. Sherman and Lempicki, 2009a; Huang, Brad T. Sherman and Lempicki, 2009b). Los análisis de enriquecimiento mediante GO nos ayudan a estudiar grandes volúmenes de datos permitiéndonos agrupar conjuntos de genes en categorías según su función, y calculando posteriormente qué categorías se encuentran sobrerrepresentadas en nuestra muestra respecto al conjunto de genes clasificados en la misma categoría considerando el conjunto del genoma. Así, podemos detectar procesos biológicos sobrerrepresentadas en los que intervienen los genes diferencialmente expresados procedentes de experimentos de RNA-Seq.

Los genes diferencialmente expresados en la condición experimental siE2F1/2 mostraron un enriquecimiento diferencial en función del punto temporal (**Tabla 11**). A las 24 horas, los procesos biológicos sobrerrepresentados se incluían en términos relacionadas mayoritariamente con el ciclo celular. A las 48 y 96 horas aparecieron otro tipo de procesos, relacionados con el fenotipo observado, como son la motilidad y la adhesión celular (**Tabla 11**), y se redujeron significativamente los relacionados con la progresión del ciclo celular. Para analizar más en detalle este enriquecimiento, se examinaron por separado los grupos de genes sobreexpresados y subexpresados. Los términos relacionados con el ciclo celular agrupaban a genes subexpresados a las 24 y 48 horas y, en menor medida, a los sobreexpresados a las 96 horas, coincidiendo con los conjuntos de genes enriquecidos en motivos de unión de E2F (**Tabla 11 y Figura 28**). Los términos relacionados con el fenotipo EMT agruparon en su mayoría a genes sobreexpresados a las 48 y 96 horas. Estos resultados sugieren la existencia de dos fases en la regulación transcripcional mediada por los factores E2F1 y E2F2. En una primera fase (24h - 48h) el silenciamiento de estos E2F conduce a una reducción en la expresión de genes diana encargados de la progresión del ciclo celular, lo que conlleva a una disminución de la proliferación celular (**Figura 23**). En una segunda fase (48h - 96h), el silenciamiento de E2F conduce a una sobreexpresión de genes implicados en la motilidad celular y la adhesión, lo cual es consistente con el establecimiento del fenotipo EMT en estas células. Por tanto, los factores E2F1/2 estarían funcionando como reguladores positivos de genes del ciclo celular y como reguladores negativos de genes de motilidad y adhesión celular.

Tabla 11: Procesos biológicos enriquecidos en el conjunto de genes diferencialmente expresados en la condición experimental siE2F1/2. El análisis se llevó a cabo con la herramienta informática DAVID, utilizando la jerarquía de nivel 3 de procesos biológicos (GOTERM_BP_3). Cada proceso biológico va acompañado de su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE). Se representan las 7 categorías con mayor FE para cada conjunto de genes. Todas las categorías representadas cumplen con una significación estadística de $P < 0.05$ (puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado). Azul: términos relacionados con el ciclo celular. Naranja: términos relacionados con EMT.

	Todos		Sobreexpresados		Subexpresados	
	Proceso biológico	FE	Proceso biológico	FE	Proceso biológico	FE
24 h	División celular	2,3	Respuesta a substrato inorgánico	3,7	División celular	2,6
	Transición de fase del ciclo celular	2,1	Regulación del transporte transmembrana	3,6	Transición de fase del ciclo celular	2,5
	Proceso relacionado con microtúbulos	2,1	Desarrollo de estructuras tubulares	3,5	Proceso relacionado con microtúbulos	2,4
	Proceso mitótico	2	Respuesta a hormona	2,7	Proceso mitótico	2,3
	Desarrollo cerebral	1,9	Regulación negativa de transducción de señal	2,7	Regulación del ciclo celular	2
	Desarrollo de órgano hematopoyético o linfoide	1,8	Regulación negativa de la respuesta a estímulos	2,6	Ciclo celular	2
	Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,8	Regulación negativa de la comunicación celular	2,5	Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,9
48 h	Establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular	2,8	Organización de las uniones celulares	3	Regulación positiva del ciclo celular	2,5
	Organización de las uniones celulares	2,2	Regulación positiva de la motilidad celular	2,3	División celular	2,3
	Regulación de la estabilidad proteica	2,1	Adhesión célula-substrato	2,3	Regulación del ciclo celular	2
	Regulación negativa del desarrollo del Sistema nervioso	2	Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	2,3	Proceso mitótico	2
	Regulación de las uniones	2	Establecimiento de la localización de orgánulos	2,3	Regulación negativa de muerte celular	1,9
	Crecimiento celular en desarrollo	2	Regulación positiva de la locomoción	2,3	Transición de fase del ciclo celular	1,9
	Regulación positiva de la motilidad celular	1,9	Coagulación	2,1	Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,8
96 h	Crecimiento celular en desarrollo	2,6	Organización de las uniones celulares	3,8	Organización de la estructura extracelular	3,1
	Organización de las uniones celulares	2,5	Respuesta a estrés oxidativo	3,2	Desarrollo cerebral	2,1
	Organización de la estructura extracelular	2,5	Organización de filamentos de actina	2,9	Desarrollo de la cabeza	2,1
	Regulación de la respuesta celular a estímulos de crecimiento	2,5	Respuesta a substrato inorgánico	2,6	Desarrollo del corazón	2,1
	Crecimiento relacionado con morfogénesis	2,4	Regulación negativa de muerte celular	2,6	Regulación negativa de la diferenciación celular	2
	Proliferación de células epiteliales	2,3	Regulación positiva de la motilidad celular	2,5	Regulación negativa de procesos del desarrollo	1,9
	Aprendizaje de la memoria	2,2	Transición de fase del ciclo celular	2,4	Desarrollo de la estructura muscular	1,9

■ Términos relacionados con el ciclo celular

■ Términos relacionados con EMT

Los genes incluidos en las funciones biológicas o términos enriquecido tras el tratamiento con siE2F1/2 referidos en la **Tabla 11** se pueden consultar en la **Tabla suplementaria 1**.

El hecho de que exista un enriquecimiento en motivos de unión E2F en ciertos subgrupos de genes, como aquellos subexpresados a las 24 y 48 horas y sobreexpresado a las 96 horas (**Figura 28**), indica que una parte significativa de los genes pertenecientes a estos subgrupos podrían estar directamente regulados por E2F1/2. No es de extrañar que en estos subgrupos exista un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con el ciclo celular (**Tabla 11**), apoyando la evidencia bibliográfica que presenta a los E2F como reguladores transcripcionales cuyos genes diana incluyen en gran medida a aquellos relacionados con el ciclo celular (Helin, 1998; Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001).

Atendiendo al considerable incremento en el enriquecimiento de motivos de unión E2F en la región promotora del subconjunto de genes sobreexpresados a las 96 horas (**Figura 28**), y al hecho de que para este subconjunto de genes se encontrasen enriquecidos en procesos biológicos relacionados tanto con el ciclo celular como con el EMT (**Tabla 11**), se volvió a llevar a cabo un análisis de la región promotora de este subgrupo eliminando esta vez los genes pertenecientes a términos relacionados con el ciclo celular. Este nuevo análisis reveló que los motivos de unión E2F continuaban encontrándose entre los más sobrerrepresentados, con una *presencia* del 41% y una *importancia* de 0.18% (**Figura 29**). Estos resultados sugieren la existencia de genes implicados en la adquisición del fenotipo EMT que presentan motivos de unión E2F y que podrían estar directamente regulados por E2F1/2.

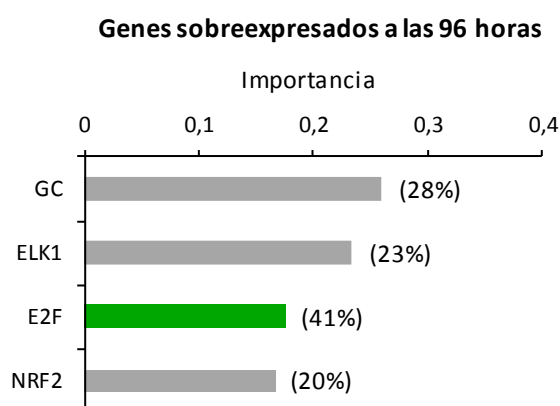


Figura 29: Enriquecimiento de motivos de unión de factores de transcripción (TFBS) en las regiones promotoras de los genes sobreexpresados a las 96 h prescindiendo de genes englobados en procesos biológicos relacionados con el ciclo celular, en la condición siE2F1/2. El análisis se llevó a cabo con la herramienta informática DiRE. El eje X representa la *importancia* de cada TFBS, mientras que la *presencia* se representa entre paréntesis al lado de cada barra. Se representan únicamente los cuatro TFBS con mayor *importancia*. Los motivos de unión E2F continuaron encontrándose entre los más sobrerrepresentados.

Los resultados del análisis de enriquecimiento de procesos biológicos en las células tratadas con TNF α se encuentran recogidos en la **Tabla suplementaria 2**. En este caso, los procesos biológicos relacionados con el fenotipo EMT se vieron enriquecidos desde las 24 horas tras el tratamiento y hasta las 96 horas. Además, aparecieron enriquecidos otros procesos biológicos relacionados con la respuesta inmunitaria celular, de acuerdo con el papel de TNF α como citoquina implicada en la regulación de células inmunitarias (Chu, 2013). Los genes incluidos en las funciones biológicas o términos enriquecidos tras el tratamiento con TNF α referidos en la **Tabla suplementaria 2** se pueden consultar en la **Tabla suplementaria 3**.

4.2.4.3 Análisis de las rutas de señalización celular reguladas por E2F1 y E2F2

Para examinar más en profundidad la función de los genes diferencialmente expresados en nuestras condiciones experimentales, analizamos las rutas de señalización celular alteradas y enriquecidas en cada condición y tiempo tras el silenciamiento. Para ello, se utilizó la base de datos KEGG Pathway, a través de la herramienta informática DAVID. En primer lugar, se identificaron las rutas más enriquecidas en cada punto temporal. A las 24 horas, las rutas sobrerrepresentadas en ausencia de E2F1/2 presentaron apartados relacionados con el ciclo celular o rutas alteradas en cáncer, mientras que a las 48 y 96 horas encontramos términos relacionados con el EMT, en su mayoría vinculados a la adhesión celular (**Tabla 12**), respaldando los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento por proceso biológico (**Tabla 11**). Además, encontramos sobrerrepresentadas vías como Hippo, VEGF o Wnt, cuya señalización aberrante se relaciona con malignización celular y con EMT (Lei *et al.*, 2008; Diepenbruck *et al.*, 2014; Xiao, Wu y Hu, 2016; Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Entre las categorías más enriquecidas tras el tratamiento con TNF α encontramos sobrerrepresentada a todos los tiempos la ruta de TNF, lo que resulta un buen control de la adecuación del método de análisis. Además, de acuerdo con la literatura, la vía TNF activa la ruta NF- κ B (revisado por Hayden and Ghosh, 2014), enriquecida también en todos los tiempos en nuestro análisis (**Tabla 12**). Las vías reguladoras comunes a siE2F1/2 y TNF α comienzan siendo escasas a las 24 horas y van aumentando con el tiempo (**Tabla 12**), de acuerdo con el número de genes diferencialmente expresados comunes a ambas condiciones (**Tabla 9**). Todos estos resultados parecen indicar que la ausencia de E2F1/2 activa el proceso de EMT a través de vías de señalización distintas a las conocidas mediante TNF α , y que ambos recorridos presentan cierta convergencia en el tiempo con la activación de genes necesarios para el proceso de EMT, mostrando la heterogeneidad de dicho proceso.

Tabla 12: Rutas enriquecidas en el conjunto de genes diferencialmente expresados en cada condición experimental y comunes a ambas condiciones. El análisis se llevó a cabo a partir de la base de datos KEGG Pathway con la herramienta informática DAVID. Cada ruta reguladora va acompañada de su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE). Se representan las 7 categorías con mayor FE para cada conjunto de genes, así como las categorías comúnmente enriquecidas en ambas condiciones. Todas las categorías representadas cumplen con una significación estadística de $P < 0.05$ (puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado).

	siE2F1/2		TNF α		Comunes
	Ruta reguladora	FE	Ruta reguladora	FE	Ruta reguladora
24 h	<ul style="list-style-type: none"> • Vía señalización p53 5,5 • Cáncer pancreático 4,3 • Ciclo celular 4,1 • Cáncer de pulmón de células pequeñas 3,8 • Meiosis ovocitaria 3,3 • Vía señalización Hippo 2,4 • MicroRNAs en cáncer 1,9 		<ul style="list-style-type: none"> • Vía señalización TNF 5,3 • Vía señalización NF-κB 5 • Cáncer de pulmón de células pequeñas 4 • Diferenciación osteoclástica 3,6 • Infección virus Epstein-Barr 3,3 • Vía señalización Rap1 3,3 • Melanogénesis 3,1 		<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de pulmón de células pequeñas • Vías reguladoras en cáncer • Vía señalización Hippo
48 h	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de vejiga 3,4 • Vía señalización p53 3,3 • Uniones adherentes 3 • Cáncer de pulmón de células pequeñas 2,6 • Invasión bacteriana de células epiteliales 2,5 • Cáncer pancreático 2,5 • Vía señalización VEGF 2,5 		<ul style="list-style-type: none"> • Vía señalización NF-κB 8,7 • Vía señalización receptor tipo NOD 7,4 • Cáncer de pulmón de células pequeñas 7,3 • Vía señalización adipocitoquinas 6,9 • Vía señalización TNF 6,4 • Apoptosis 5,5 • Infección virus Epstein-Barr 4,5 		<ul style="list-style-type: none"> • Vías reguladoras en cáncer • Cáncer de pulmón de células pequeñas • Vía señalización MAPK • Interacciones receptor-matriz extracelular • Vía señalización Ras • Carcinogénesis viral
96 h	<ul style="list-style-type: none"> • Uniones adherentes 3,5 • Metabolismo central del carbono en cáncer 3,2 • Interacciones receptor-matriz extracelular 2,8 • Proteoglicanos en cáncer 2,8 • Adhesión focal 2,7 • Vía señalización Wnt 2,6 • Ciclo celular 2,6 		<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de pulmón de células pequeñas 2,9 • Infección virus Epstein-Barr 2,6 • Vía señalización NF-κB 2,5 • Vía señalización adipocitoquinas 2,5 • Vía señalización TNF 2,4 • Apoptosis 2,3 • Proteoglicanos en cáncer 2,3 		<ul style="list-style-type: none"> • Proteoglicanos en cáncer • Adhesión focal • Vías reguladoras en cáncer • Vía señalización Rap1 • Interacciones receptor-matriz extracelular • Cáncer de pulmón de células pequeñas • Guía de axón • Sinapsis glutamatérgica • Vías de señalización reguladoras de pluripotencia de células madre • Vía señalización TGF-β

Los genes incluidos en las rutas de señalización enriquecidas tras el tratamiento con siE2F1/2 y TNF α referidas en la **Tabla 12** se pueden consultar en la **Tabla suplementaria 4**.

4.2.5 Validación de los resultados de RNA-Seq

Los resultados de desregulación génica obtenidos en el experimento de RNA-Seq fueron validados mediante RT-qPCR en muestras independientes. Con este fin, se seleccionaron 10 genes diferencialmente expresados en la condición siE2F1/2 y cuya función biológica estuviese relacionada con el EMT (**Tabla 13**).

Tabla 13: Genes seleccionados para la validación del RNA-Seq. En la tabla se muestran los genes, su relación con el EMT y su nivel relativo sobre el siCTRL (DESeq2) en la condición siE2F1/2. Sombreados en verde se encuentran los valores de sobreexpresión y en rosa los valores de subexpresión. “sc”, sin cambio.

Gen	Relación con EMT	Fold change	
		48h	96h
SNAI2	Represor transcripcional, regulador maestro de EMT	4,08	3,20
ITGA2	Integrina. Adhesión a la matriz extracelular	2,30	1,42
KLF4	Previene la diferenciación	1,31	1,58
ABCB10	Transportador ABC, <i>stemness</i>	1,38	sc
CD151	Adhesión, motilidad, invasión	1,25	sc
RHOB	Adhesión, motilidad, invasión	1,35	sc
SMAD6	Diferenciación	0,10	0,30
KRT8	Mantenimiento de la estructura celular, epitelial	0,73	sc
KRT18	Mantenimiento de la estructura celular, epitelial	0,74	sc
TJP3	Adhesion, uniones ocluyentes	0,63	sc

Analizamos la expresión de estos genes en ausencia de E2F1/2 con respecto al siCTRL mediante RT-qPCR a partir del RNA obtenido de 3 nuevos replicados biológicos independientes. Como gen de referencia se utilizó VPS29, recomendado por la estabilidad en su expresión en diferentes tejidos (Eisenberg y Levanon, 2013) y confirmado como gen estable en nuestro RNA-Seq. Tal y como puede observarse en la **Figura 30**, los resultados de expresión génica obtenidos mediante RT-qPCR y mediante secuenciación masiva se correlacionaron estrechamente, validando así el experimento de RNA-Seq.

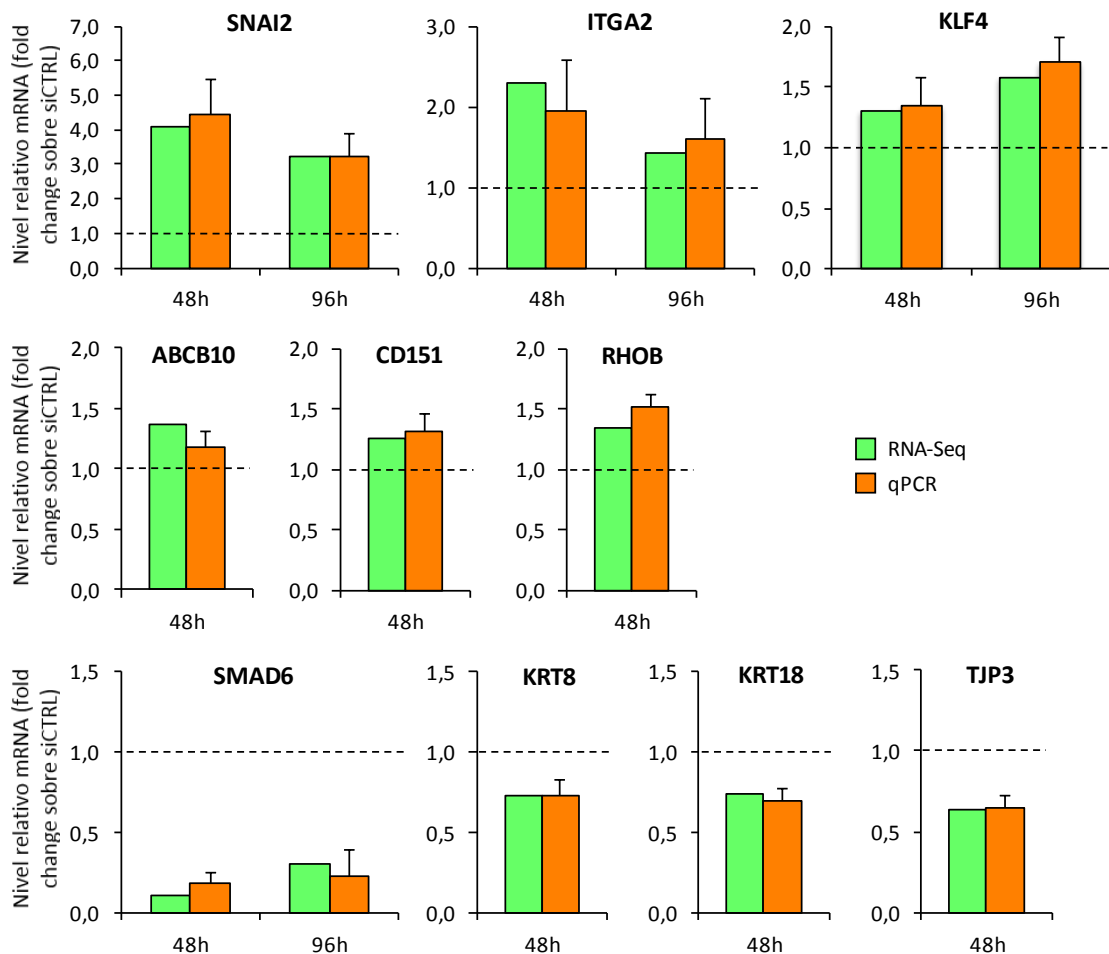


Figura 30: Validación de los resultados del RNA-Seq mediante qPCR. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. A las 48 y 96 h las células se recogieron con TRIzol para extraer y purificar el RNA total con el que se sintetizó cDNA. Mediante qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. VPS29 fue utilizado como gen de referencia. Los gráficos representan el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de la condición siE2F1/2 obtenidos mediante RNA-Seq y qPCR. En verde, los valores de expresión obtenidos mediante RNA-Seq (DESeq2), en naranja los valores de expresión (media \pm SD) obtenidos mediante qPCR en tres experimentos independientes. Los resultados obtenidos mediante ambos métodos fueron equivalentes, quedando validado el experimento de RNA-Seq.

A continuación, quisimos comprobar si la expresión diferencial a nivel de transcripción se correlacionaba con la expresión proteica. Para ello, analizamos los niveles de proteína mediante *Western blot* de 3 de los genes utilizados para la validación del RNA-Seq. Los resultados de desregulación génica en ausencia de E2F1/2 a nivel de RNA y de proteína fueron equivalentes (**Figura 31**), por lo que, para estos casos, la desregulación a nivel proteico se correspondió con la desregulación transcripcional.

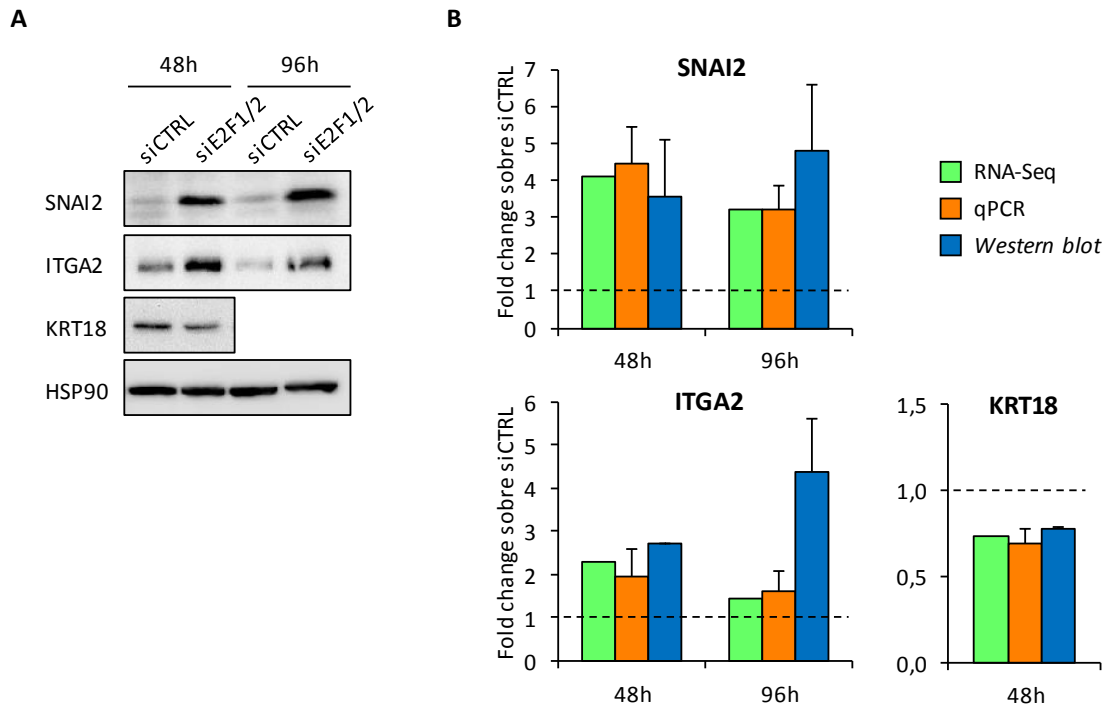


Figura 31: Comparación de los niveles de expresión proteica con los niveles de transcripción génica para la condición siE2F1/2. Las células HCT116 se transfirieron con siCTRL o siE2F1/2. A las 48 y 96 h las células se lisaron y se extrajeron las proteínas, cuyos niveles se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. (A) *Western blot* representativo. HSP90 fue utilizado como control de carga. (B) Los gráficos representan el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de mRNA y proteína. En verde, los valores de expresión de mRNA obtenidos mediante RNA-Seq (DESeq2); en naranja los valores de expresión de mRNA (media \pm SD) obtenidos mediante qPCR; en azul los valores de expresión proteica (media \pm SD) obtenidos mediante *Western blot* en tres experimentos independientes. El nivel de desregulación proteica se correspondió con la desregulación transcripcional para los 3 genes estudiados.

4.2.6 Identificación de genes de respuesta a E2F implicados en el proceso de EMT

Una vez validado el experimento de RNA-Seq y habiendo analizado el conjunto de los resultados en base al enriquecimiento de diversas categorías (TFBS, procesos biológicos, rutas reguladoras), procedimos a profundizar de manera individual en los genes diferencialmente expresados con el fin de encontrar un mecanismo a través del cual la ausencia de los factores de transcripción E2F1/2 desencadena un proceso de EMT. En análisis anteriores observamos que a las 24h de silenciamiento de los E2F los genes diferencialmente expresados desempeñaban mayoritariamente funciones relacionadas con la progresión del ciclo celular, y que a las 48 y 96 horas se producía una desregulación positiva (sobreexpresión) de genes implicados en procesos relacionados con el EMT. Dado que a las 72 horas ya podemos observar el fenotipo EMT en las células siE2F1/2, nos centramos en analizar el grupo de genes diferencialmente expresados a las 48 horas para intentar identificar el mecanismo subyacente. Para visualizar este grupo de genes representamos los datos en un gráfico tipo volcán, donde los genes diferencialmente

expresados más significativos (menor valor de p) y con mayor tasa de cambio (*fold change*) sobre el siCTRL son fácilmente identificables (**Figura 32**). En este gráfico destacan genes como NRP1, implicado en el proceso de migración (Chu *et al.*, 2014), LAMB3, implicado en las uniones célula-matriz extracelular y metástasis (Y. Wang *et al.*, 2017), HES1, implicado en diferenciación celular y metástasis (Liu, Dai y Du, 2015) o NEO1, implicado en migración y adhesión (Qu, Sun y Wang, 2018).

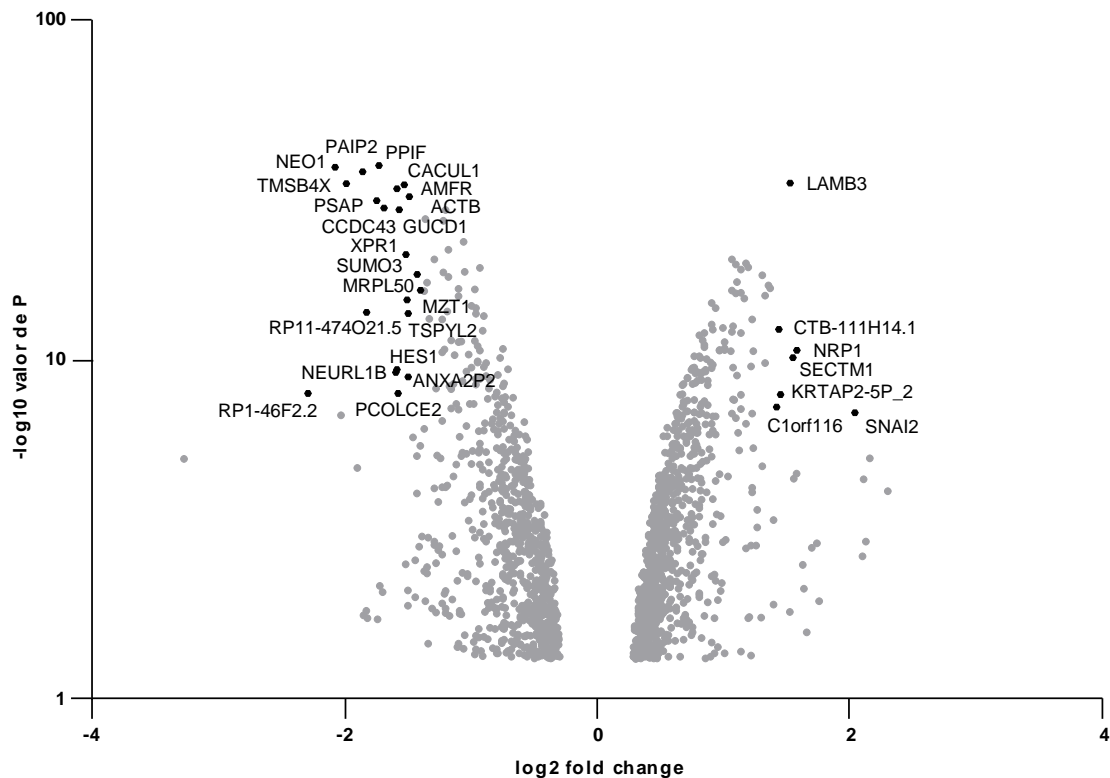


Figura 32: Representación de los genes diferencialmente expresados a las 48 horas en la condición siE2F1/2 en un gráfico tipo volcán. Los puntos negros representan genes con un valor de p ($-\log_{10}$) mayor de 6,8 y un *fold change* (\log_2) mayor de 1,4.

De manera interesante, entre los genes más significativamente sobreexpresados encontramos a SNAI2 (también conocido como SLUG), uno de los factores de transcripción considerados como maestros reguladores del EMT (Garg, 2013; Lin *et al.*, 2017; Stemmler *et al.*, 2019b). La expresión de SLUG se encuentra incrementada en una gran variedad de tumores y es considerado un indicador de mala prognosis (Elloul *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Uchikado *et al.*, 2005; Shioiri *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). Su capacidad de represión de E-cadherina propicia la progresión tumoral, debilitando las uniones célula-célula y facilitando los procesos de migración e invasión (Hajra, Chen y Fearon, 2002; Bolos *et al.*, 2003; Adhikary *et al.*, 2014).

Analizamos también la expresión de SLUG en la línea celular DLD-1 tras el silenciamiento de E2F1/2 mediante RT-qPCR. En esta línea celular, SLUG se encontró sobreexpresado a partir de las 48 horas (**Figura 33**), al igual que en la línea celular HCT116.

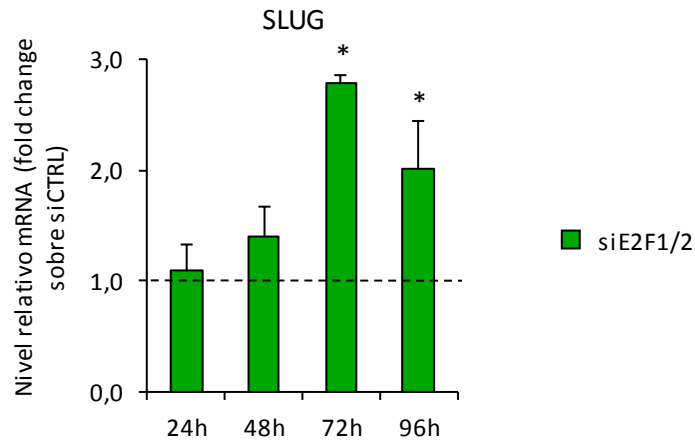


Figura 33: Expresión de SLUG en la línea celular DLD-1 en ausencia de E2F1/2. Las células DLD-1 se transfectaron con siCTRL o siE2F1/2. En intervalos de 24 h las células se recogieron con TRizol para extraer y purificar el RNA total con el que se sintetizó cDNA. Mediante qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNA utilizando la química SYBR Green. VPS29 fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión (media \pm SD) de SLUG (*, $P < 0.05$). Los resultados pertenecen a un único experimento, la desviación estándar hace referencia a los triplicados técnicos. SLUG se encontró sobreexpresado a partir de las 48 h.

El fenotipo EMT observado en las líneas celulares HCT116 y DLD-1 tras la inhibición de E2F1/2, sumado al aumento de la expresión de SLUG en ambos sistemas y a la evidencia bibliográfica que reconoce a SLUG como pieza clave detonante del proceso de EMT, sugieren que SLUG podría ser un mediador importante del proceso de EMT en ausencia de E2F1 y E2F2 en células de cáncer de colon.

4.3 SLUG COMO MEDIADOR DEL PROCESO DE EMT EN CELULAS KNOCKDOWN PARA E2F1 Y E2F2

El silenciamiento de E2F1/2 conduce a un proceso fenotípico del tipo EMT en las células HCT116 y DLD-1. A nivel molecular, el silenciamiento de E2F1/2 provoca la inducción de la expresión de SLUG, un factor de transcripción considerado como un regulador maestro del proceso de EMT. Estas evidencias nos han llevado a plantear la hipótesis de que, el proceso de EMT observado en ausencia de E2F1/2 estaría mediado principalmente por SLUG, cuya inducción reprimiría la transcripción de genes responsables de características epiteliales y activaría la transcripción de genes asociados al establecimiento de características mesenquimales. Para verificar esta hipótesis procedimos a silenciar la expresión de SLUG en la línea celular HCT116 y comprobar si se revertía el fenotipo EMT inducido por la depleción de E2F1/2.

Para silenciar la expresión de SLUG utilizamos un siRNA específico, cuya eficacia comprobamos previamente mediante RT-qPCR en la línea celular HCT116. El silenciamiento de SLUG alcanzó el 80% de la expresión total, y se mantuvo a lo largo del tiempo (**Figura 34**), quedando verificada la eficacia del silenciamiento.

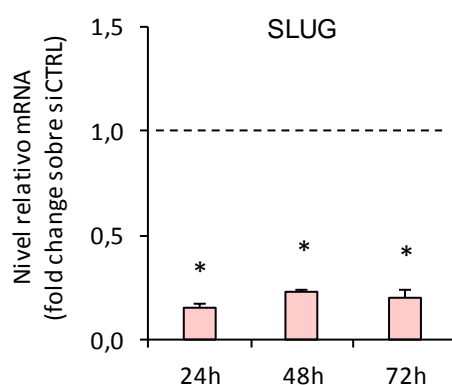


Figura 34: Efectividad del silenciamiento de SLUG. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siSLUG. En intervalos de 24 h las células se recogieron con TRIzol para extraer y purificar el RNA total con el que se sintetizó cDNA. Mediante qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. VPS29 se utilizó como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión (media \pm SD) de un único experimento. Los valores de desviación estándar hacen referencia a los triplicados técnicos (*, $P < 0.05$). El silenciamiento de SLUG fue efectivo.

4.3.1 Experimentos de rescate del fenotipo EMT en ausencia de SLUG

Los experimentos de rescate consisten en inhibir la expresión de un gen que se sospecha está implicado en un fenotipo determinado, y comprobar si se revierte dicho fenotipo. En nuestro sistema, si SLUG resulta ser el principal mediador del fenotipo EMT observado tras la depleción

de E2F1/2, el silenciamiento simultáneo de SLUG y de E2F1/2 debería revertir el fenotipo de EMT hacia características más epiteliales propias de la situación basal de la línea celular HCT116.

4.3.1.1 Implicación de SLUG en los cambios morfológicos de células knockdown para E2F1/2

En primer lugar, se examinó el grado de implicación de SLUG en los cambios morfológicos observados en ausencia de E2F1/2 en la línea celular HCT116. Para ello, se transfectaron las células con siRNAs específicos para E2F1/2 y/o para SLUG. Al cabo de 72 horas se analizó la morfología celular a través de un microscopio óptico. El silenciamiento simple de SLUG (siSLUG) dio lugar a células similares al siCTRL aunque más redondeadas y menos apretadas (**Figura 35**). Por otro lado, el silenciamiento simultáneo de SLUG y E2F1/2 (siE2F1/2/S) causó un efecto significativo en la morfología celular que podría considerarse intermedio entre el silenciamiento de E2F1/2 y el silenciamiento de SLUG (**Figura 35**). A la vista de estos resultados, SLUG podría estar actuando como mediador, aunque no de manera exclusiva, de los cambios morfológicos ocasionados por la ausencia de E2F1/2.

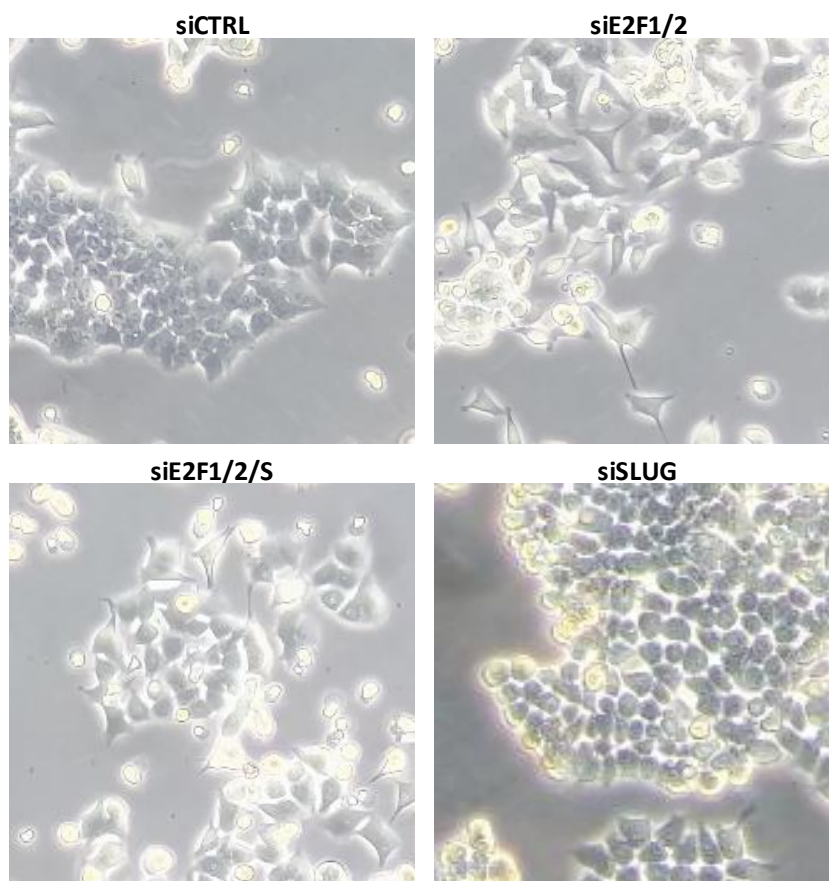


Figura 35: Papel de SLUG en la morfología de las células siE2F1/2. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S o siSLUG. A las 72 h de tratamiento se tomaron fotografías a través de un microscopio óptico con el objetivo 10x. SLUG no parece ser el mediador, o al menos de manera exclusiva, de los cambios morfológicos ocasionados por la ausencia de E2F1/2.

4.3.1.2 Implicación de SLUG en la migración de células knockdown para E2F1/2

La capacidad migratoria es una de las características más importantes que adquieren las células que experimentan un proceso de EMT, ya que permite el progreso de la metástasis y la diseminación tumoral. Los cambios moleculares, morfológicos y de adhesión que se producen durante el EMT confluyen en la adquisición de motilidad celular. Por ello, realizamos experimentos de rescate vía SLUG centrándonos en esta característica fenotípica.

4.3.1.2.1 Ensayos de migración *Transwell*

Para evaluar la implicación de SLUG en el fenotipo migratorio ocasionado por la ausencia de E2F1/2, llevamos a cabo ensayos de rescate de migración *Transwell*, en los que las células migran en respuesta a un estímulo quimioatractivo. Al cabo de 72 horas de la inducción de los diversos silenciamientos (siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S, siSLUG) o de tratamiento con TNF α , las células HCT116 se sembraron en igual número (40.000 células/inserto) por cada condición experimental en la parte superior de los insertos, donde se dejaron migrar durante 24 horas. Los núcleos de las células migradas teñidos con DAPI se observaron a través de un microscopio de fluorescencia. Tal y como se ha descrito en un capítulo previo, la depleción de E2F1/2 dio lugar a una mayor actividad migratoria de las células a través del inserto. Por otro lado, el silenciamiento de SLUG no produjo un incremento en la capacidad migratoria de las células, si bien lo contrario. Curiosamente, el silenciamiento conjunto de SLUG y E2F1/2 revirtió el fenotipo migratorio de las células siE2F1/2 hasta los niveles del siCTRL (**Figura 36A y Figura 36B**).

De manera paralela al ensayo de migración *Transwell* llevamos a cabo experimentos de conteo celular para comprobar que las diferencias de migración observadas no se debían a otros factores como posibles cambios en la viabilidad celular fruto de los distintos tratamientos. Se siguió un protocolo de manipulación celular paralelo al del ensayo de migración, en el que se determinaron los cambios en la viabilidad celular entre las distintas condiciones durante las 24 horas en las que las células estaban sometidas a migración en el ensayo *Transwell* paralelo. La viabilidad de las células siE2F1/2, siE2F1/2/S y siSLUG fue sensiblemente menor que la de las células siCTRL, pero sin diferencias significativas entre las tres condiciones (**Figura 36C**), lo que nos permitió hacer una comparación directa entre ellas. Teniendo en cuenta todos estos resultados concluimos que la eliminación de SLUG revirtió el aumento de la capacidad migratoria de las células siE2F1/2, y puso de manifiesto su papel como mediador de este fenotipo.

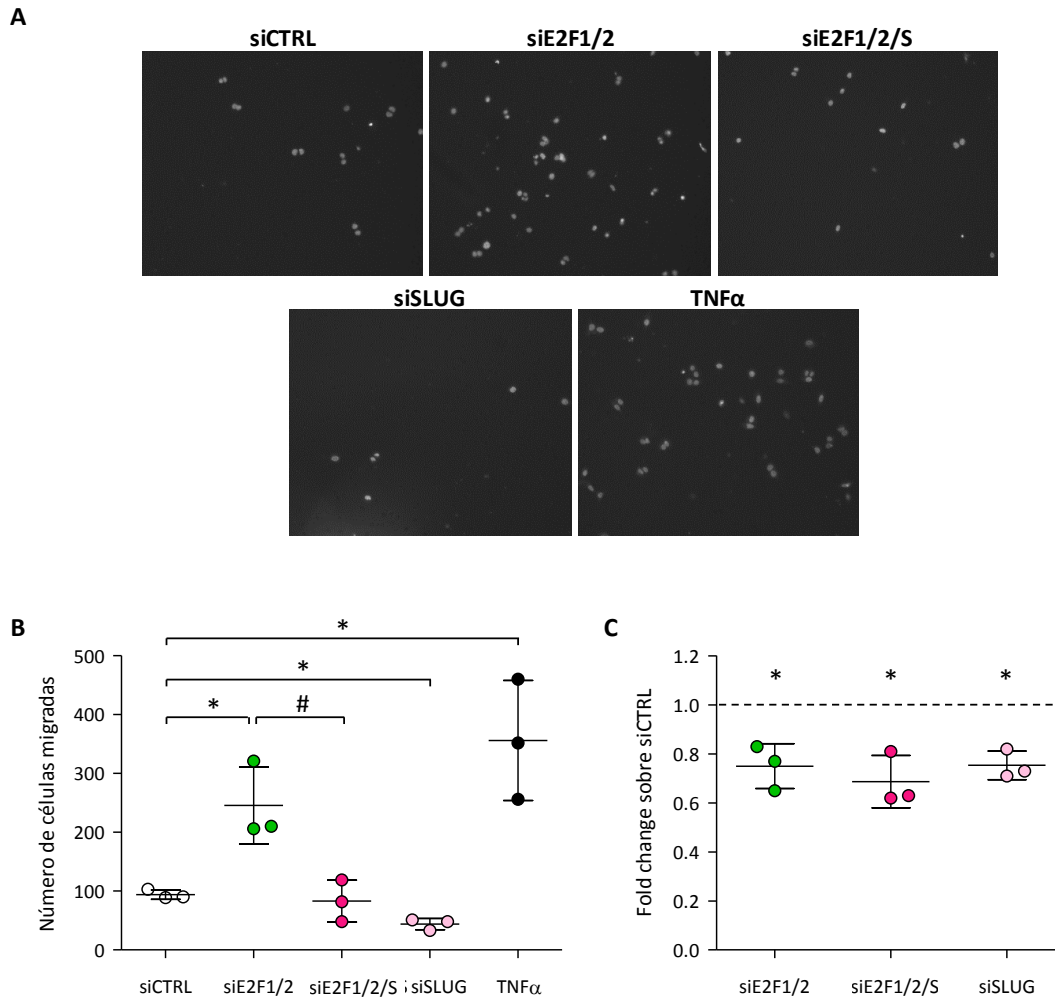


Figura 36: Papel de SLUG en el fenotipo migratorio inducido por el silenciamiento de E2F1/2 en ensayos *Transwell*. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S, o siSLUG, o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h las células se replaquearon en igual número en insertos y se dejaron migrar durante 24 h. Se eliminaron las células no migrantes de la parte superior del inserto y el fondo del inserto se montó sobre un portaobjetos con medio de montaje con DAPI. Por cada experimento y condición se tomaron 10 imágenes aleatorias a través de un microscopio de fluorescencia con el objetivo 20x y se contaron los núcleos totales migrados. (A) Imágenes representativas de los núcleos de las células migratorias de cada condición. (B) El gráfico representa el número de células migradas (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ entre las condiciones indicadas). SLUG revirtió el aumento de la capacidad migratoria de las células siE2F1/2. (C) A las 72 h de ser transfectadas las células HCT116 se levantaron y se volvieron a sembrar en igual número en placas de 96 pocillos. 24 h después se contaron en la cámara de Neubauer, teñidas con azul de tripano. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de viabilidad celular (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL).

4.3.1.2.2 Ensayos de sellado de herida

Para corroborar el papel de SLUG como mediador del aumento de la capacidad migratoria celular en ausencia de E2F1/2 llevamos a cabo ensayos de rescate del tipo sellado de herida en los que las células migran para cerrar una herida aplicada a una monocapa confluyente de células sin necesidad de un estímulo quimioatrayente. Aplicamos la herida a las monocapas celulares

72 horas después de tratar las células (siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S, siSLUG, TNF α), y las dejamos migrar durante 24 horas. Mediante fotografías de microscopía óptica tomadas al inicio y al final del tiempo de migración se calculó el porcentaje del área de la herida que llegaron a cubrir las células. El silenciamiento simultáneo de SLUG y siE2F1/2 consiguió revertir el aumento del porcentaje del área cubierta observado en ausencia de los E2Fs (**Figura 37A y Figura 37B**). Más aun, las condiciones en las que SLUG se encontró silenciado (siE2F1/2/S y siSLUG) cubrieron menor proporción del área que las células control, a pesar de que la viabilidad celular en la condición siE2F1/2 y en las condiciones siE2F1/2/S y siSLUG fue prácticamente la misma (**Figura 36C**). En cualquier caso, el aumento de la capacidad migratoria de las células siE2F1/2 desaparece en ausencia de SLUG, poniendo de manifiesto su papel como mediador en este fenotipo. Estos resultados apoyan a los obtenidos a través de ensayos de migración *Transwell*.

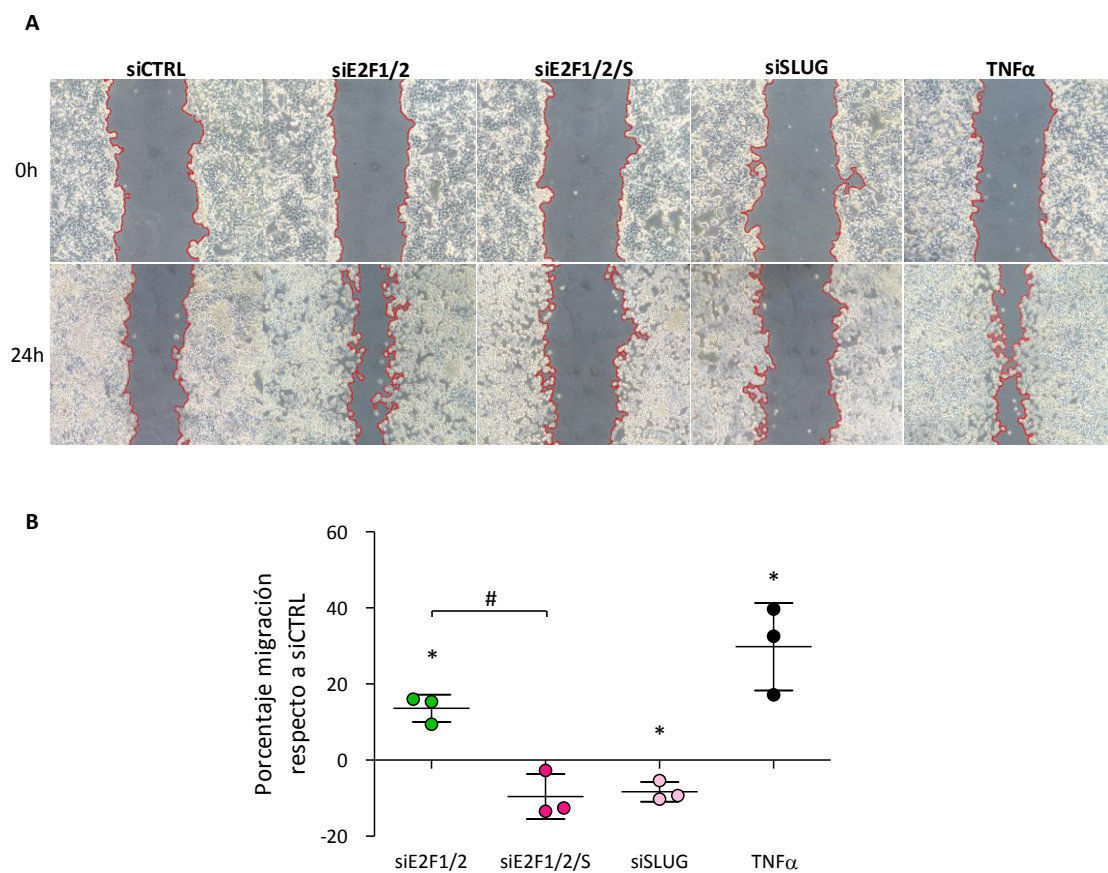


Figura 37: Papel de SLUG en el fenotipo migratorio inducido por el silenciamiento de E2F1/2 en ensayos de sellado de herida. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S o siSLUG o se trataron con 25 ng/ml de TNF α . A las 72 h la monocapa celular confluyente se rompió mediante una punta de pipeta estéril y se tomaron imágenes de la herida (0h). Tras 24 h de incubación se volvieron a tomar imágenes. (A) Imágenes representativas de cada condición tomadas a través de un microscopio óptico. (B) El gráfico representa el aumento porcentual del área de herida cubierta por cada condición con respecto al siCTRL. Se muestran los valores (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ entre las condiciones indicadas).

4.3.1.3 Implicación de SLUG en la expresión génica diferencial de células knockdown para E2F1 y E2F2

Dado que SLUG contribuye al fenotipo observado en las células silenciadas para E2F1/2, cabría esperar que este factor de transcripción ocupase un lugar aguas arriba en la cascada de desregulación génica existente. Para comprobar en qué medida SLUG estaría mediando la expresión diferencial asociada al fenotipo EMT, analizamos, en presencia o ausencia de SLUG, la expresión de genes cuyas funciones están asociadas al fenotipo EMT y que se encontraron desregulados en el experimento de RNA-Seq (**Tabla 13**). La expresión desregulada de varios genes tras el silenciamiento de E2F1/2 no parece estar mediada por SLUG. Este es el caso de *KLF4*, *SMAD6*, *KRT8*, *KRT18* o *TJP3*. Por otro lado, la ausencia simultánea de E2F1/2 y SLUG revirtió la sobreexpresión de los genes *ITGA2*, *RHOB*, *CD151* y *ABCB10* provocada por el silenciamiento de los E2Fs (**Figura 38**), confirmando a SLUG como un mediador de la desregulación génica de estos genes. El hecho de que la reducción en los niveles de expresión de *ITGA2*, *ABCB10* y *CD151* en la condición siE2F1/2/S no alcanzara los valores de la condición siSLUG sugiere que su expresión se encuentra regulada por otros factores además de SLUG.

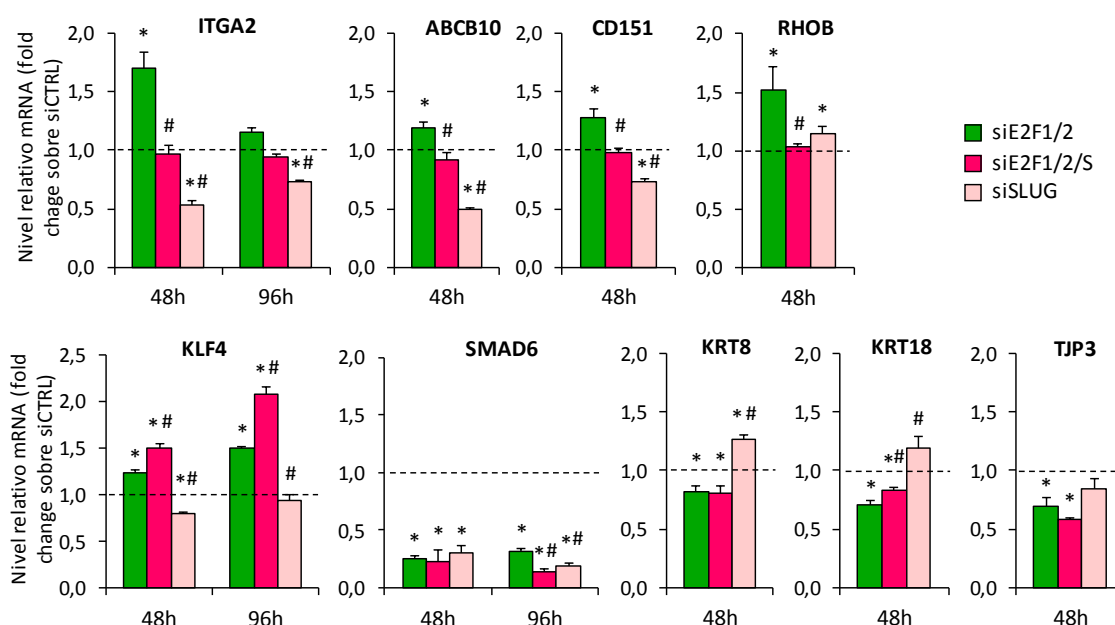


Figura 38: Papel de SLUG en la expresión diferencial inducida por el silenciamiento de E2F1/2. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2, siE2F1/2/S o siSLUG. A las 48 y 96 h se extrajo RNA y mediante RT-qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. VPS29 fue utilizado como gen de referencia. Los gráficos representan el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión (media \pm SD) de un único experimento. Los valores de desviación estándar hacen referencia a los triplicados técnicos (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a siE2F1/2). SLUG revirtió la desregulación génica inducida por siE2F1/2 en los genes representados.

4.3.2 Evaluación de la regulación transcripcional de SLUG por parte de E2F1/2

4.3.2.1 Estudio del promotor de SLUG

Habiendo verificado que SLUG contribuye al fenotipo EMT inducido por la ausencia de E2F1/2 nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar la posibilidad de una regulación directa de la expresión génica de SLUG por parte de E2F1/2.

En primer lugar, se analizó la región promotora de SLUG en busca de sitios con secuencia consenso de unión para los factores de transcripción E2F mediante la herramienta informática ConSite (Sandelin, Wasserman y Lenhard, 2004). Restringimos nuestra búsqueda a la región comprendida entre -1000/+500 pares de bases desde el lugar de inicio de la transcripción, teniendo en cuenta que los miembros de la familia E2F son mayoritariamente reclutados en la región proximal de sus genes diana (Rabinovich *et al.*, 2008; Lee, Bhinge y Iyer, 2011; Laresgoiti *et al.*, 2013). En esta región encontramos tres sitios con secuencia consenso de unión para los factores E2F con una similitud del 75% o superior con la secuencia canónica (**Tabla 14**), abriendo la puerta a una posible unión directa de los factores de transcripción E2F al promotor de SLUG.

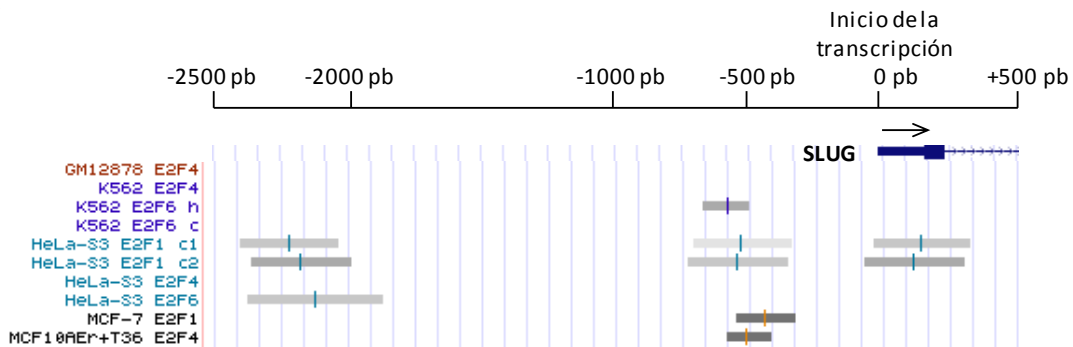
Tabla 14: Lugares consenso de unión de los factores de transcripción E2F en la región promotora de SLUG predichos por ConSite. Se indica el % de similitud con la secuencia consenso (TTTSSCGC) y la posición de la secuencia con respecto al lugar de inicio de la transcripción en pares de bases.

Secuencia	% similitud con la secuencia consenso	Posición desde el inicio de la transcripción
TCTGCCGC	81	+45
CTTCCCGC	79	-502
CTTCGCGG	76	-611

A continuación, utilizamos la herramienta informática UCSC Genome Browser (Kent *et al.*, 2002) (versión del genoma hg19) para visualizar lugares de unión de factores de transcripción al genoma detectados mediante experimentos de *ChIP-sequencing*, cuyos resultados están disponibles en la base de datos del proyecto ENCODE (Hudson y Snyder, 2006; Euskirchen *et al.*, 2007). Descubrimos que se habían detectado uniones de los factores de transcripción E2F a la región promotora de SLUG que se solapaban con los predichos por ConSite en diversas líneas celulares (**Figura 39A**). Además, se detectaron uniones E2F en torno a las -2000/-2500 pares de bases desde el lugar de inicio de la transcripción (**Figura 39A**). Estos datos reforzaron la idea de una posible unión directa de los factores de transcripción E2F al promotor de SLUG en nuestro sistema.

Además de los lugares de unión de los factores E2F pudimos visualizar uniones de otros factores de transcripción detectadas en el promotor de SLUG (**Figura 39B**). Algunos de estos factores (resaltados en color azul) se encuentran entre los genes diferencialmente expresados en nuestro experimento de RNA-Seq.

A



B

Factor de transcripción	-2550/-2000 pb	-500/0 pb	Factor de transcripción	-2550/-2000 pb	-500/0 pb
BRCA1	✓	✗	NFYA	✗	✓
CEBPB	✓	✓	NFYB	✗	✓
CHD2	✓	✓	NR3C1	✗	✓
CTBP2	✗	✓	NRF1	✓	✗
EBF1	✗	✓	RAD21	✓	✓
ELF1	✗	✓	RCOR1	✓	✓
EP300	✓	✗	REST	✗	✓
EZH2	✗	✓	RFX5	✗	✓
FOS	✓	✗	SMARCB1	✓	✗
GATA2	✗	✓	SMARCC1	✓	✗
GATA3	✗	✓	SMC3	✓	✗
GTF2F1	✓	✓	STAT3	✗	✓
JUN	✓	✓	TAF1	✗	✓
JUND	✓	✗	TBP	✗	✓
KAP1	✗	✓	TCF7L2	✓	✓
MAX	✓	✓	USF2	✓	✗
MAZ	✓	✗	ZKSCAN1	✓	✗
MXI1	✓	✗	ZNF217	✗	✓
MYC	✓	✓			

Figura 39: Unión de factores de transcripción a la región promotora de SLUG detectados mediante *ChIP-sequencing* en el proyecto ENCODE. (A) Lugares de unión de los factores de transcripción E2F. Imagen modificada del visualizador de UCSC Genome Browser. Las barras en tonos grises indican el lugar de unión de los factores E2F en el promotor de SLUG, con su origen puntual más probable en la línea vertical coloreada. Los tonos grises de las barras se corresponden con la intensidad de la señal. A la izquierda se indica la línea celular y el factor de transcripción concreto que corresponde a cada barra. (B) La tabla muestra otros factores de transcripción unidos a la región promotora de SLUG. Los genes resaltados en azul figuran entre los diferencialmente expresados en el experimento de RNA-Seq.

4.3.2.2 Regulación transcripcional de SLUG dependiente de los factores E2F

Los datos del proyecto ENCODE han detectado la unión de los factores E2F a la región promotora de SLUG. Para determinar si los factores E2F poseen la capacidad de regular transcripcionalmente la expresión de SLUG, se llevaron a cabo experimentos de luciferasa como gen reportero. Estos experimentos consisten en examinar la activación o represión del gen de la luciferasa clonado en un plásmido, y cuya región promotora ha sido sustituida por la del gen en estudio, de manera que si se consigue activar dicho promotor se produce la proteína luciferasa que permitirá la formación de luz, cuantificable en un luminómetro. Para estos experimentos, se construyó un plásmido basado en el vector pGL2-Basic conteniendo la región promotora de SLUG que incluía los tres sitios de unión para E2F de la región proximal (-793/+107) predichos por ConSite aguas arriba del gen que codifica la luciferasa (pSLUG-WT-LUC). Además, generamos un segundo plásmido luciferasa idéntico al anterior en el que se mutaron los sitios de unión a E2F (pSLUG-MUT-LUC) (**Figura 40**). Como hemos presentado durante esta tesis, la ausencia de E2F1/2 provoca la sobreexpresión de SLUG en las líneas celulares HCT116 y DLD-1. Si la unión de los E2F al promotor de SLUG estuviera asociada a una actividad transcripcional, se esperaría que la ausencia de estos E2Fs conllevara un incremento de la actividad luciferasa.



Figura 40: Representación esquemática de la versión salvaje y mutada de la región promotora de SLUG clonada en el plásmido luciferasa pGL2-Basic. En rojo se representan las mutaciones puntuales introducidas con respecto a la versión salvaje.

Comenzamos a evaluar la regulación de SLUG por parte de E2F1/2 en las células HCT116 con un experimento en el que se silenciaron los factores E2F y se transfectó el plásmido luciferasa en su versión salvaje o mutada. Al cabo de 24 horas, las muestras se lisaron y se procesaron para detectar en el luminómetro la actividad luciferasa generada en las distintas condiciones. En ausencia simultánea de E2F1/2 la actividad luciferasa regulada por el promotor salvaje de SLUG

se vio incrementada (**Figura 41**). Este resultado se encuentra en consonancia con resultados anteriores en los que, el silenciamiento de E2F1/2 daba lugar a una sobreexpresión de SLUG. Los silenciamientos individuales de los E2F no provocaron el aumento de la actividad luciferasa. Al utilizar el plásmido con los sitios de unión E2F mutados el aumento de la actividad luciferasa en ausencia simultánea de E2F1/2 se redujo significativamente (**Figura 41**), sin llegar a revertir el efecto por completo hasta el nivel del siCTRL. Este resultado sugiere que la ausencia combinada de E2F1 y E2F2 activa transcripcionalmente el promotor de SLUG, en parte a través de los motivos de unión E2F presentes en su región reguladora.

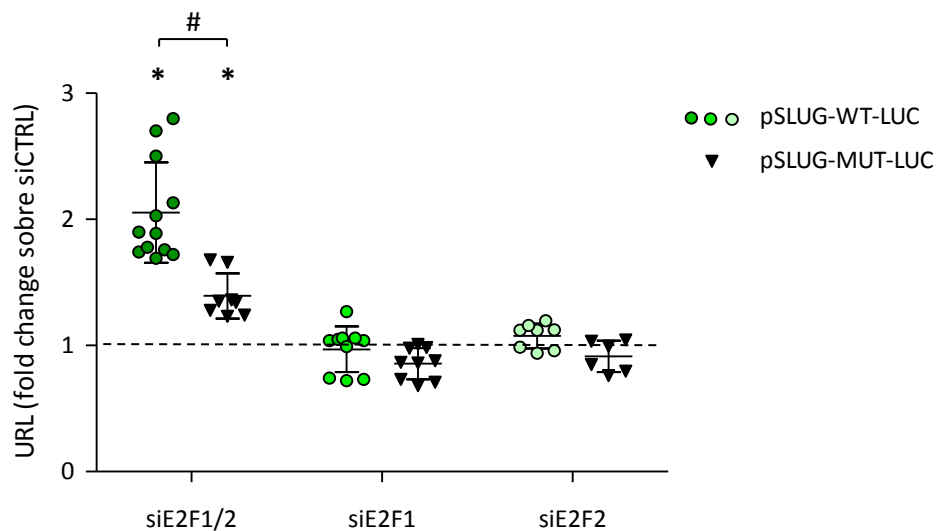


Figura 41: Actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG en ausencia de E2F1/2. Las células HCT116 se sembraron y seguidamente se transfectaron con siCTRL o siE2F1 y/o siE2F2. Al cabo de 2 h las células se transfectaron con el plásmido luciferasa de luciérnaga portando el promotor de SLUG salvaje o mutado y con el plásmido luciferasa de *Renilla* como control de transfección. Tras 24 h desde la última transfección las muestras se lisaron y se procesaron para medir la actividad luciferasa en el luminómetro. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de las unidades relativas de luz (URL) calculadas como la tasa de la actividad luciferasa luciérnaga/*Renilla*. Se muestran los valores de unidades relativas de luz (media \pm SD) de varios experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a la versión salvaje del promotor de SLUG).

Como hemos comprobado a lo largo de esta tesis, la ausencia de E2F1/2 da lugar a la sobreexpresión de SLUG. A continuación, quisimos confirmar esta regulación represora en el promotor de SLUG mediante la sobreexpresión de los E2F. Para ello, se transfectaron las células HCT116 con plásmidos de expresión (pE2F1 y pE2F2) y se analizó su efecto sobre el promotor salvaje y mutado de SLUG midiendo la actividad luciferasa resultante. La sobreexpresión de E2F1 y E2F2 dio lugar a una disminución de la actividad luciferasa del plásmido salvaje de manera dependiente de la dosis (**Figura 42**). E2F1 causó el mayor efecto. De esta manera, confirmamos que los factores E2F actúan como represores de la actividad de SLUG. Atendiendo a la actividad luciferasa del plásmido mutado, observamos una leve recuperación tras la sobreexpresión de

E2F1, si bien no se alcanzaron los niveles de actividad luciferasa de las muestras control (**Figura 42**), lo que sugiere que parte de la actividad represiva de E2F1 y E2F2 es independiente de los sitios E2F del promotor de SLUG.

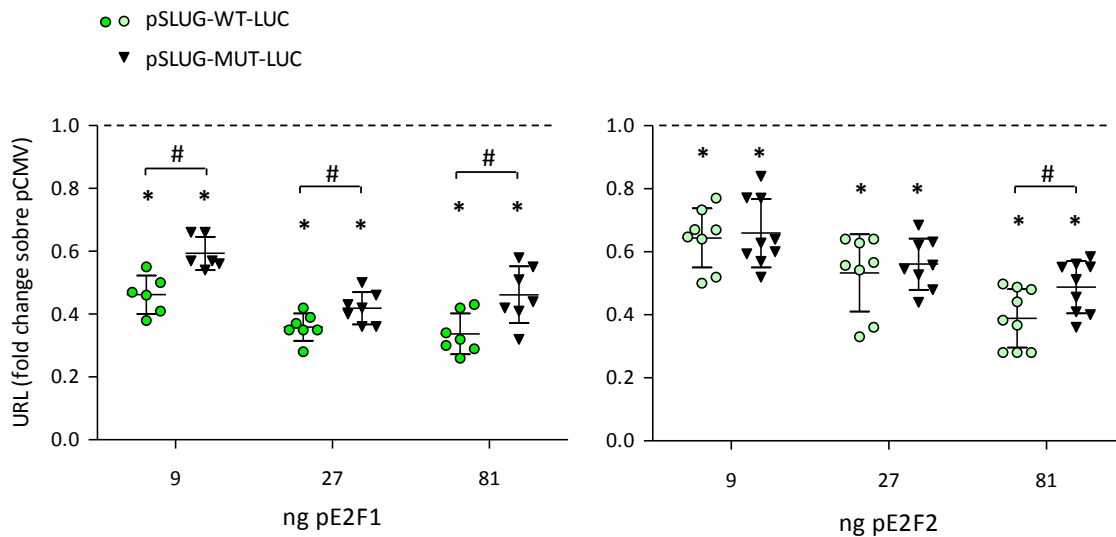


Figura 42: Actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG sobreexpresando E2F1 y E2F2. Las células HCT116 se sembraron y seguidamente se transfectaron con distintas cantidades de plásmidos de expresión de E2F1, E2F2 o plásmido vacío (pCMV), el plásmido luciferasa de luciérnaga portando el promotor de SLUG salvaje o mutado y el plásmido luciferasa de *Renilla* como control de transfección. Tras 24 las muestras se lisaron y se procesaron para medir la actividad luciferasa en el luminómetro. Los gráficos representan el nivel relativo sobre el pCMV de las unidades relativas de luz (URL) calculadas como la tasa de la actividad luciferasa luciérnaga/*Renilla*. Se muestran los valores de unidades relativas de luz (media \pm SD) de varios experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a la versión salvaje del promotor de SLUG).

E2F1-3 han sido tradicionalmente considerados como activadores transcripcionales (Trimarchi y Lees, 2002), aunque hoy se conoce que también ejercen funciones como represores (Iglesias *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Chong *et al.*, 2009; Laresgoiti *et al.*, 2013). Esta función represora de E2F1-3 se materializa principalmente mediante su unión a RB, que da lugar a la formación de complejos represores que se unen al DNA a través de los motivos de unión E2F. E2F1/2 actúan como represores de la actividad de SLUG en nuestro sistema, en parte a través de los motivos de unión E2F presentes en su región reguladora. Se quiso determinar si esta represión estaba mediada por RB. Para ello, llevamos a cabo experimentos de luciferasa utilizando un siRNA específico para RB en las células HCT116, y utilizando los plásmidos luciferasa con el promotor salvaje y mutante de SLUG. El silenciamiento de RB (siRB) no tuvo efecto sobre la actividad luciferasa (**Figura 43A**), lo cual sugiere que la actividad represora transcripcional de E2F1/2 no está mediada por su interacción con RB, puesto que esperaríamos un incremento de la actividad luciferasa tras la depleción de RB, al quedar libres los factores E2F.

En el mismo sentido, el silenciamiento simultáneo de los E2F y RB (siE2F1/2/RB) dio lugar a una activación de la actividad luciferasa similar al silenciamiento de E2F1/2 (**Figura 43A**).

En experimentos paralelos se analizaron los niveles de expresión de SLUG a nivel de mRNA detectados mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de los E2F y RB (**Figura 43B**). El silenciamiento individual de RB no dio lugar a cambios significativos en la expresión de SLUG, mientras que el silenciamiento conjunto de los E2F y RB resultó en la sobreexpresión de SLUG, mayor que la sobreexpresión tras el silenciamiento de E2F1/2. El conjunto de estos resultados sugiere que la represión de la actividad de SLUG ejercida por E2F1/2 no estaría principalmente mediada por RB, si bien podría contribuir a ello.

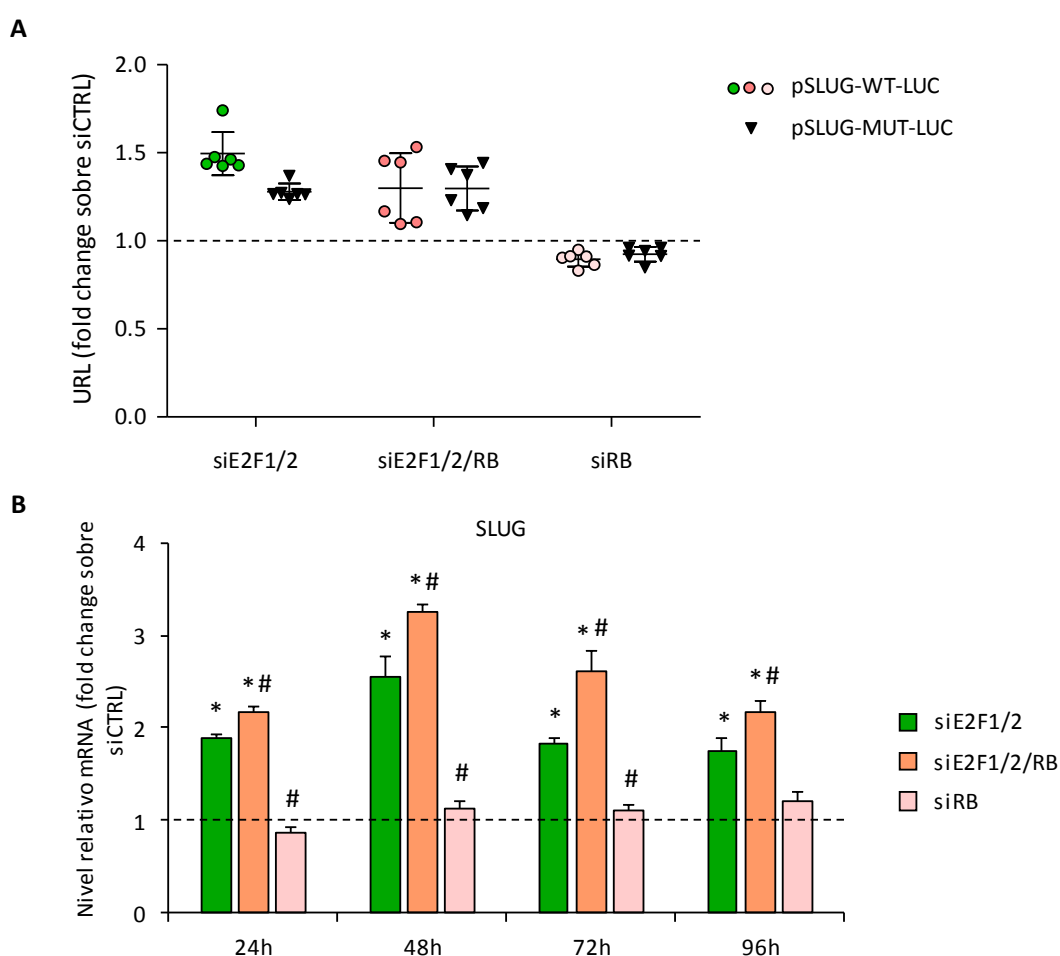


Figura 43: Regulación de la expresión de SLUG en ausencia de E2F1/2 mediada por RB. (A) Las células HCT116 se sembraron y seguidamente se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2 y/o siRB. Al cabo de 2 h las células se transfectaron con el plásmido luciferasa de luciérnaga portando el promotor de SLUG salvaje o mutado y con el plásmido luciferasa de *Renilla* como control de transfección. Tras 24 h desde la última transfección las muestras se lisaron y se procesaron para medir la actividad luciferasa en el luminómetro. El gráfico representa el nivel relativos sobre el siCTRL de las unidades relativas de luz calculadas (URL) como la tasa de la actividad luciferasa luciérnaga/*Renilla*. Se muestran los valores de unidades relativas de luz (media \pm SD) de varios experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a la versión salvaje del promotor de SLUG). (B) Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2 y/o siRB. Cada 24 h se extrajo RNA, se purificó y con él se sintetizó

cDNA. Mediante qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. VPS29 fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de SLUG (media \pm SD) de un único experimento. Los valores de desviación estándar hacen referencia a los triplicados técnicos (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a siE2F1/2).

Mientras que E2F1-3 han sido tradicionalmente considerados como los E2F activadores (Trimarchi y Lees, 2002), el resto de miembros de la familia E2F (E2F4-8) son más conocidos por su actividad represora, dividiéndose en los miembros clásicos de la familia (E2F4-6) por tener un único dominio de unión al DNA, y los miembros atípicos (E2F7-8) que cuentan con dos dominios de unión al DNA y no están regulados por RB. Quisimos determinar si los E2F considerados tradicionalmente como represores mostraban actividad represora sobre el promotor de SLUG. Para ello, se seleccionó a E2F4, un miembro clásico de la familia y cuya expresión no está regulada por otros factores E2F (Ginsberg *et al.*, 1994; Sardet *et al.*, 1995; Dimova y Dyson, 2005), y a E2F7, miembro atípico cuya expresión está regulada positivamente por E2F1/2 (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano, Jensen y Helin, 2003) (**Tabla 10**). La expresión ectópica de E2F4 y E2F7 solo redujo ligeramente la actividad luciferasa mediada por el promotor de SLUG (**Figura 44**). Dado que el efecto represor de E2F4 y E2F7 sobre el promotor de SLUG es significativamente menor que el producido por E2F1/2, nuestras evidencias sugieren que la regulación de SLUG está mediada específicamente por E2F1/2.

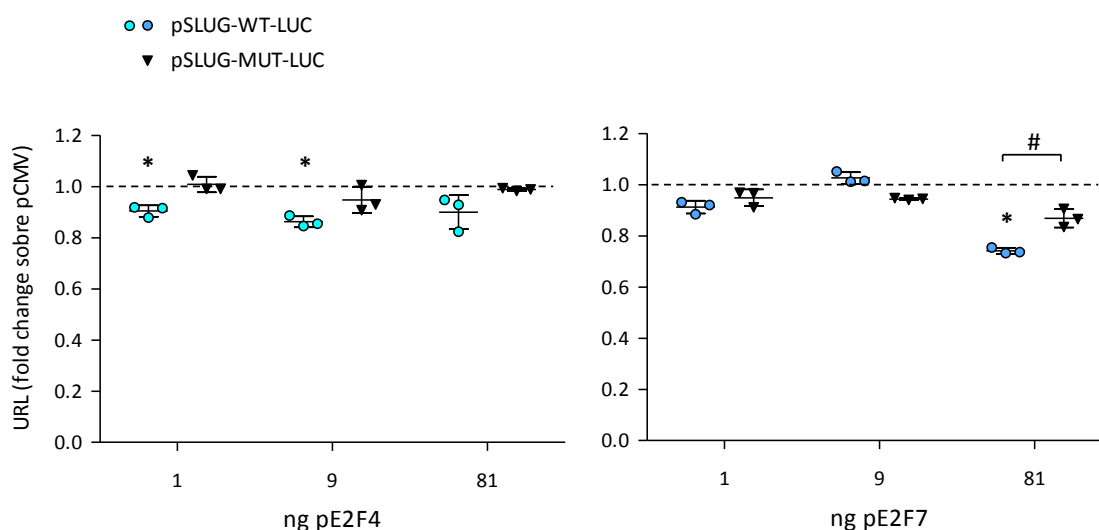


Figura 44: Actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG sobreexpresando E2F4 y E2F7. Las células HCT116 se sembraron y seguidamente se transfectaron con distintas cantidades de plásmidos de expresión de E2F4, E2F7 o plásmido vacío (pCMV), el plásmido luciferasa de luciérnaga portando el promotor de SLUG salvaje o mutado y el plásmido luciferasa de *Renilla* como control de transfección. Tras 24 h las muestras se lisaron y se procesaron para medir la actividad luciferasa en el luminómetro. Los gráficos representan el nivel relativo sobre el pCMV de las unidades relativas de luz calculadas como la tasa de la actividad luciferasa luciérnaga/*Renilla*. Se muestran los valores de unidades relativas de luz (URL) (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a la versión salvaje del promotor de SLUG).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, concluimos que la regulación de SLUG por parte de los E2F tendría un componente de regulación transcripcional directa por parte de E2F1/2, si bien es cierto que este tipo de regulación no parece depender exclusivamente de los motivos E2F, y estaría complementada por otros mecanismos indirectos que involucrarían a otros factores de transcripción reguladores del promotor de SLUG. Estos mecanismos indirectos explicarían que la actividad transcripcional del promotor de SLUG portando mutaciones en los motivos E2F, impidiendo la unión de los factores E2F al DNA, siguiera estando reprimida al sobreexpresar E2F1 o E2F2.

4.3.2.3 Regulación indirecta de SLUG mediada por los factores E2F

La regulación de SLUG mediada por los E2F solo se explica de manera parcial por medio de una unión directa a sus motivos de unión. Parecen existir otros mecanismos de regulación indirecta dirigidos por E2F1/2 que ayudarían a explicar su relación con SLUG. Para intentar descifrar estos mecanismos de regulación indirecta nos ayudamos de los análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas expuestos en el apartado anterior. Dos de las vías alteradas en ausencia de E2F1/2 y cuya función se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de EMT fueron la vía Hippo y la vía Wnt (Lei *et al.*, 2008; Diepenbruck *et al.*, 2014; Xiao, Wu y Hu, 2016; Sun *et al.*, 2017). Entre ambas vías existe una regulación cruzada en la que la activación de la vía Hippo inhibe la señalización Wnt/ β -catenina (revisado por Kim and Jho, 2014). Cuando la vía Wnt se encuentra activa, se produce una acumulación de β -catenina en el núcleo celular, donde actúa como co-activador transcripcional. Diversos autores relacionan la activación de la vía Wnt/ β -catenina con la inducción de SLUG, señalando a SLUG como diana directa de β -catenina (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2005; Saegusa *et al.*, 2009; Heallen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015). De hecho, la inspección visual de los datos de ENCODE nos ha permitido detectar una unión robusta del heterodímero TCF/ β -catenina en el promotor de SLUG, lo que refuerza la idea de que dicha regulación es directa. La activación de la vía Wnt/ β -catenina en nuestro sistema estaría en consonancia con el hecho de que E2F1 es un represor de

esta vía (Morris *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). La ausencia de los E2Fs podría estar activando la vía Wnt dando lugar a la sobreexpresión de SLUG.

Para comprobar el papel de β -catenina como mediador en la regulación de SLUG en ausencia de E2F1/2 realizamos nuevos experimentos luciferasa en los que, además de los E2F, eliminamos a β -catenina del sistema. Es necesario apuntar que las células HCT116 expresan una forma de β -catenina mutada que le confiere una activación constitutiva (Ilyas *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997). Transfectamos las células HCT116 con un siRNA específico para β -catenina (siCAT) y comprobamos la efectividad del silenciamiento mediante RT-qPCR (**Figura 45A**). A continuación, llevamos a cabo experimentos de luciferasa transfectando las células para silenciar a los E2F y β -catenina individual y simultáneamente, y utilizando los plásmidos luciferasa con el promotor salvaje y mutante de SLUG. El silenciamiento individual de β -catenina no tuvo efecto sobre la actividad luciferasa (**Figura 45B**). Sorprendentemente, se encontró que el silenciamiento simultáneo de los E2Fs y β -catenina (siE2F1/2/CAT) no redujo la actividad luciferasa del promotor salvaje de SLUG, sino que la aumentó ligeramente (**Figura 45B**). Estos resultados nos indican que el aumento en la actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG provocado por la ausencia de los E2F no estaría mediado por β -catenina. En experimentos paralelos se analizaron los niveles de expresión de SLUG a nivel de mRNA detectados mediante RT-qPCR tras el silenciamiento de los E2F y β -catenina (**Figura 45C**). El silenciamiento individual de β -catenina dio lugar a la sobreexpresión de SLUG, y el silenciamiento conjunto de los E2Fs y β -catenina dio lugar a una mayor sobreexpresión de SLUG, mayor que la adición de las tasas de sobreexpresión individuales. Teniendo en cuenta todos estos resultados, el aumento de la expresión de SLUG en ausencia de E2F1/2 no parece estar mediado por un aumento de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina, al contrario, el silenciamiento de β -catenina conduce a la sobreexpresión de SLUG en la línea celular HCT116. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que las vías de E2F y de Wnt interactúan para regular negativamente la expresión de SLUG en células de cáncer de colon.

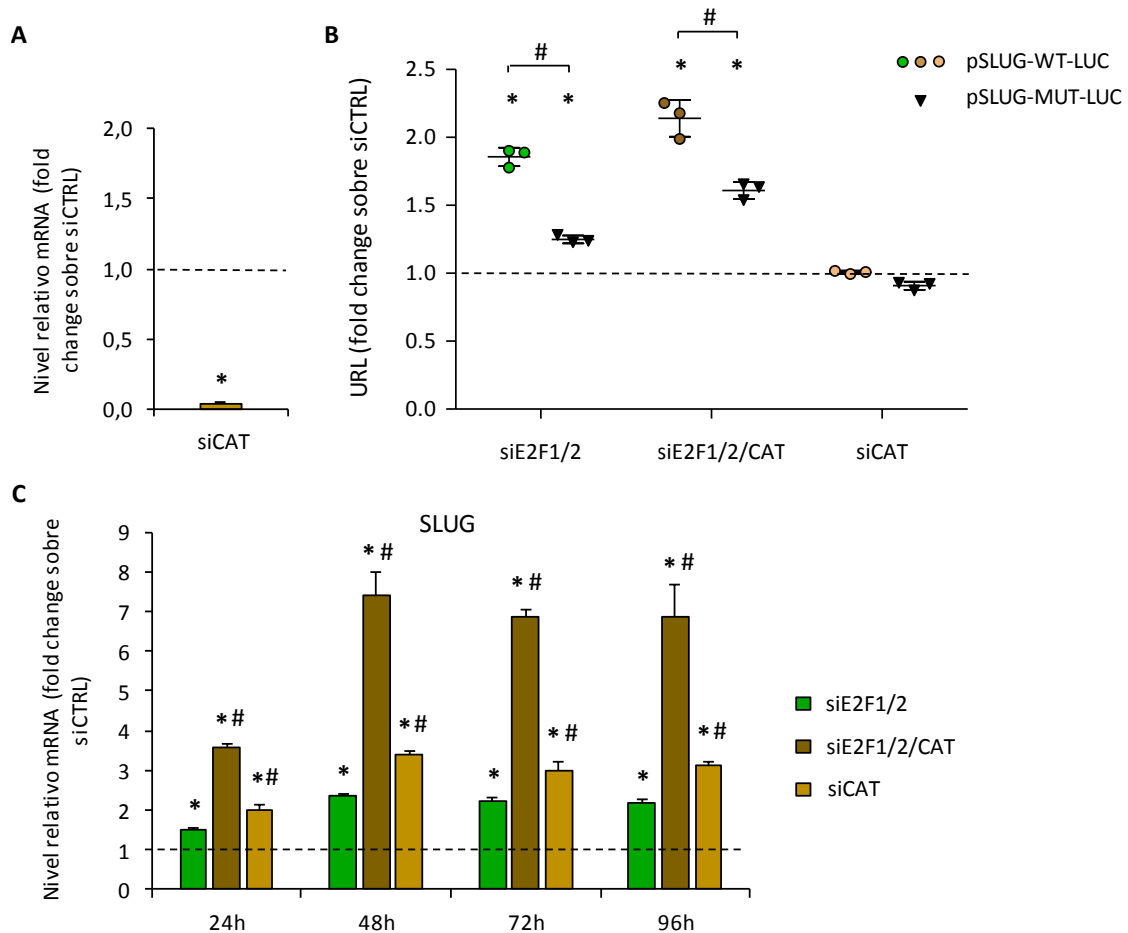


Figura 45: Regulación de la expresión de SLUG en ausencia de E2F1/2 mediada por β -catenina. (A) Efectividad del silenciamiento de β -catenina. Las células HCT116 se transfectaron con siCTRL o siCAT. A las 24 h se extrajo RNA y mediante RT-qPCR se determinó la abundancia relativa de mRNAs utilizando la química SYBR Green. VPS29 fue utilizado como gen de referencia. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de β -catenina (media \pm SD) de un único experimento. Los valores de desviación estándar hacen referencia a los triplicados técnicos (*, $P < 0.05$). El silenciamiento de β -catenina fue efectivo. (B) Las células HCT116 se sembraron y seguidamente se transfectaron con siCTRL, siE2F1/2 y/o siCAT. Al cabo de 2 h las células se transfectaron con el plásmido luciferasa de luciérnaga portando el promotor de SLUG salvaje o mutado y con el plásmido luciferasa de *Renilla* como control de transfección. Tras 24 h desde la última transfección las muestras se lisaron y se procesaron para medir la actividad luciferasa en el luminómetro. El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de las unidades relativas de luz calculadas como la tasa de la actividad luciferasa luciérnaga/*Renilla*. Se muestran los valores de unidades relativas de luz (media \pm SD) de tres experimentos independientes (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a la versión salvaje del promotor de SLUG). (C) El gráfico representa el nivel relativo sobre el siCTRL de los valores de expresión de SLUG (media \pm SD) de un único experimento. Los valores de desviación estándar hacen referencia a los triplicados técnicos (*, $P < 0.05$ con respecto a siCTRL; #, $P < 0.05$ con respecto a siE2F1/2). El silenciamiento de β -catenina indujo la expresión de SLUG.

5. DISCUSIÓN

5.1 Papel de los factores E2F en el fenotipo EMT

Se conoce poco a cerca de la implicación de los factores de transcripción E2F en el proceso de EMT. En este trabajo hemos puesto de manifiesto el papel de los E2F activadores (E2F1/E2F2) en diversos aspectos fenotípicos relacionados con el proceso de EMT, tales como la morfología celular, adhesión, migración e invasión, en líneas celulares de cáncer de colon. Hemos demostrado que E2F1/2, además de regular genes implicados en el control del ciclo celular, también regulan directa o indirectamente la transcripción de genes relacionados con el EMT. Entre estos genes se encuentra SLUG, que actúa en gran medida como mediador del proceso de EMT inducido por la ausencia de E2F1/2.

La depleción de E2F1/E2F2 en líneas celulares de carcinoma colorrectal provoca importantes cambios morfológicos en las células. La desestructuración de la monocapa epitelial dando lugar a células separadas entre sí, y con una morfología más alargada se ajusta a lo esperable en un proceso de transición epitelio-mesénquima (Pino *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). Además, el conocido inductor de EMT TNF α (Wang *et al.*, 2013; L. Yu *et al.*, 2014) provoca una morfología muy similar a la obtenida en ausencia de los E2F.

El fenotipo morfológico asociado a características mesenquimales más significativo se produce tras la depleción de E2F1, otorgando a este factor un papel importante en el mantenimiento de la morfología epitelial en células de cáncer colorrectal. La depleción individual de E2F2 afecta en menor medida al fenotipo morfológico de estas células. Sin embargo, el silenciamiento combinado de E2F1 y E2F2 tiene un efecto superior al de los silenciamientos individuales en gran parte de las variables analizadas asociadas al EMT (migración *Transwell*, sellado de herida, cambios en los niveles proteicos de E-cadherina y N-cadherina), lo cual sugiere que E2F1 y E2F2 comparten la función de regular negativamente el proceso de EMT en células de cáncer colorrectal. Por otra parte, el silenciamiento de E2F3 no ocasiona cambios en la morfología celular, y el silenciamiento combinado de E2F1, E2F2 y E2F3 no acentúa los cambios fenotípicos observados tras el silenciamiento concomitante de E2F1 y E2F2. Esto podría ser debido a que el silenciamiento de E2F3 no fue duradero en el tiempo (los niveles de E2F3 se reconstituyeron a las 48h tras la transfección con siRNAs), o bien porque E2F3 no tiene competencias en este ámbito, las cuales recaerían específicamente sobre E2F1 y E2F2. Por ello, la contribución de E2F3 en el fenotipo EMT no ha sido valorada durante este trabajo. Sería preciso el empleo de otras moléculas de siRNAs más efectivas u otras aproximaciones alternativas para silenciar

efectivamente E2F3 de una manera más duradera para determinar con mayor certeza el papel de E2F3 en la regulación del EMT.

El desmantelamiento de la monocapa epitelial en favor de células separadas y alargadas tras la depleción de E2F1/2 va acompañado de la deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática, así como de una reducción más tardía de los niveles proteicos de E-cadherina y el aumento de los niveles de N-cadherina. La deslocalización de la proteína E-cadherina de la membrana plasmática es considerada un hito en el progreso del EMT (Peinado, Portillo y Cano, 2004). Diversos estudios apuntan a una represión transcripcional directa de la expresión de E-cadherina por parte de los factores de transcripción promotores de EMT: SNAIL, SLUG, ZEB y TWIST (Batlle *et al.*, 2000; Grooten et al., 2000; Comijn *et al.*, 2001; Bolos *et al.*, 2003; Peinado, Olmeda y Cano, 2007; Vesuna *et al.*, 2008), impidiendo su localización en la membrana plasmática.

Por otro lado, otros estudios también han observado la pérdida de E-cadherina de la membrana plasmática sin registrar cambios en los niveles de expresión a nivel de RNA o proteína (Lochter *et al.*, 1997; Bakin *et al.*, 2000; Bhowmick, Ghossein, *et al.*, 2001; Peinado, Quintanilla y Cano, 2003; Symowicz *et al.*, 2007). La depleción de E2F1/2 no conduce a una reducción significativa de los niveles de E-cadherina a nivel de mRNA, lo que sugiere que los factores de transcripción promotores de EMT no están implicados en este proceso. Un mecanismo de disolución de las uniones adherentes que no involucra cambios transcripcionales de sus integrantes consiste en la fosforilación de tirosinas de E-cadherina o de otros componentes de estas uniones (Adam, 2015) mediado por las proteínas tirosina-quinasa (PTKs). De manera interesante, PTK6 y PTK2, involucradas en el mantenimiento y fosforilación de elementos de las uniones adherentes (Palka-Hamblin *et al.*, 2010; Adam, 2015; Haines, Beard y Wu, 2015; McGinnis y Kinsey, 2015), se encuentran sobreexpresadas significativamente tras el silenciamiento de E2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), lo cual podría dar lugar a la alteración en los patrones de fosforilación de dichas uniones. Además, la fosfatasa PTPN14, conocida por su función reguladora de la fosforilación de tirosinas de las uniones adherentes, y cuya sobreexpresión conduce al desmantelamiento de las uniones adherentes y al fenotipo EMT (Khew-Goodall y Wadham, 2005) se encuentra sobreexpresada en ausencia de E2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), presentándose como un posible colaborador en el desmantelamiento de las uniones adherentes y la deslocalización de E-cadherina de la membrana plasmática.

La expresión diferencial de las dos principales isoformas de actina citoplasmática, la β -actina (ACTB) y γ -actina (ACTG1) en células knockdown para E2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), sugieren

asimismo una importante reestructuración del citoesqueleto de actina en estas células, donde se encuentran ancladas las uniones adherentes. La reorganización del citoesqueleto de actina, necesaria por otra parte para la adquisición de capacidad migratoria de las células, podría estar comprometiendo la estabilidad de las uniones adherentes (Ivanov *et al.*, 2005; Ayollo *et al.*, 2009; Meng y Takeichi, 2009) y, por tanto, colaborando con la deslocalización de E-cadherina de la membrana plasmática tras el silenciamiento de E2F1/2. La posterior disminución de los niveles proteicos de E-cadherina es atribuible a su degradación lisosómica (Kowalczyk y Nanes, 2012).

Los experimentos realizados hasta la fecha apuntan a que la adhesión célula-célula medida en base a su capacidad de formar esferoides exhibe una tendencia a disminuir en ausencia de E2F1/2. Algunos autores indican la necesidad del establecimiento de uniones célula-célula mediadas por E-cadherina para la formación de esferoides en diversas líneas celulares (Lin *et al.*, 2006; Luebke-Wheeler *et al.*, 2009; Smyrek *et al.*, 2019). No obstante, si bien el grado de deslocalización de E-cadherina de la membrana plasmática es similar tanto en células tratadas con siE2F1/2 como en células tratadas con TNF α , la capacidad para formar esferoides de ambas condiciones experimentales es diferente. Mientras que las células tratadas con TNF α pierden casi por completo la capacidad de formación de esferoides, las células silenciadas para E2F1/2 siguen formando esferoides, aunque tienden a ser de menor tamaño que aquellos formados por las células tratadas con siCTRL. Esto hace pensar que E-cadherina no es la única mediadora de las uniones célula-célula durante la formación de esferoides. Un estudio reciente, ha analizado las moléculas implicadas en la formación de esferoides en varias líneas celulares de cáncer de colon (Stadler *et al.*, 2018). Sorprendentemente, las tres líneas celulares estudiadas difieren en las moléculas de adhesión esenciales requeridas para la formación de esferoides. De manera interesante, la proteína P-cadherina parece ser esencial para la formación de esferoides en la línea celular HCT116. Su pérdida imposibilita la formación de esferoides específicamente en las células HCT116, sin alterar la expresión y distribución de otras moléculas de adhesión como la E-cadherina (Stadler *et al.*, 2018). Nuestros resultados de expresión diferencial indican que P-cadherina (CDH3) se encuentra subexpresada a nivel de RNA en las células tratadas con TNF α , no así en las células silenciadas para E2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**). Así, una regulación diferencial de P-cadherina en respuesta a las distintas condiciones experimentales (siE2F1/2 o TNF α) en nuestro sistema explicaría las diferencias observadas en la capacidad de formación de esferoides en ausencia de E-cadherina.

La adhesión intercelular y la adhesión célula-matriz extracelular son mecanismos que se regulan de manera interdependiente (Weber, Bjerke y DeSimone, 2011). Diversos autores apuntan a la

existencia de una retroalimentación negativa entre ambos sistemas, de manera que cuando se alteran las uniones célula-célula se facilitan otras uniones célula-matriz extracelular, lo que permite la migración de las células en procesos como el de EMT (von Schlippe *et al.*, 2000; Burute y Thery, 2012; Livshits, Kobiela y Fuchs, 2012). El establecimiento de contactos mediados principalmente por integrinas, tales como los contactos focales, entre las células y los componentes de la matriz extracelular posibilitan la migración celular. Los experimentos de adhesión a colágeno (componente de la matriz extracelular) de células knockdown para E2F1/2 señalan una pérdida en la capacidad adhesiva al colágeno de estas células. Esta pérdida de adhesión a colágeno se observa también en queratinocitos de ratones knockout para E2F1 (D'Souza *et al.*, 2002). Sin embargo, la disminución en la adhesión a colágeno no parece interferir con la capacidad migratoria de las células silenciadas para E2F1/2 en nuestros experimentos de migración *Transwell* y de sellado de herida. Es más, la capacidad migratoria de estas células es mayor que la de sus homólogas con silenciamiento control, lo que sugiere que estas células continúan estableciendo otro tipo de contactos con el sustrato que posibilitan su migración.

La composición de las integrinas que intervienen en los contactos proporciona especificidad a la unión célula-matriz extracelular (Takada, Ye y Simon, 2007). Las distintas combinaciones de heterodímeros α y β de integrinas posibilitan la adhesión a los diferentes componentes de la matriz extracelular, tales como laminina, fibronectina, distintos tipos de colágeno, tenascina u osteopontina, entre otros. Nuestros resultados de RNA-Seq detectan una expresión diferencial de diversas subunidades de integrinas tras el tratamiento con siE2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), sugiriendo una modulación en los contactos focales que permiten la migración celular. Estos contactos pueden ser diversos y no exclusivamente dependientes de adhesión al colágeno tipo I utilizado durante los experimentos de adhesión. De hecho, otros estudios han demostrado que los tratamientos celulares pueden dar lugar a la alteración diferencial de la capacidad de adhesión en función del ligando (Jin *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2015). Por lo tanto, la disminución de la capacidad de adhesión a colágeno tipo I tras la depleción de E2F1/2 podría ser compensada con la formación de contactos involucrados en la adhesión a otras moléculas. Sería conveniente un análisis de la capacidad de adhesión de las células siE2F1/2 a otros componentes de la matriz extracelular.

Las células tratadas con TNF α presentan una tendencia opuesta a la de las células tratadas con siE2F1/2, aumentando ligeramente su capacidad de adhesión a colágeno tipo I, si bien de manera no significativa al contar únicamente con datos de dos experimentos. La desregulación génica de las subunidades de las integrinas en las células tratadas con TNF α difiere en parte de

la observada en las células siE2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), lo cual podría estar contribuyendo a un comportamiento diferencial de ambas condiciones experimentales en relación a la adhesión de colágeno tipo I. En definitiva, el silenciamiento de los E2Fs y el tratamiento con TNF α parecen activar rutas moleculares distintas en cuanto a los mecanismos de adhesión se refiere, mostrando diferencias fenotípicas tanto a nivel de adhesión célula-célula (formación de esferoides) como de célula-matriz extracelular (adhesión a colágeno tipo I).

Nuestros experimentos señalan un aumento de la presencia de CD44 en la superficie celular tras 120 horas del silenciamiento de E2F1/2. Este aumento se produce al mismo tiempo que la disminución de los niveles proteicos de E-cadherina. La correlación negativa entre los niveles de E-cadherina y CD44 se ha observado en otros estudios (Le Bras *et al.*, 2011; Deep *et al.*, 2014). En la literatura, el aumento de los niveles de CD44 se correlaciona con el proceso de EMT y, a pesar de que los mecanismos moleculares involucrados continúan siendo en gran medida desconocidos, su presencia en la membrana plasmática se relaciona con la activación de cascadas de señalización promotoras de EMT, y con el aumento de la capacidad migratoria celular (Kim *et al.*, 2012; McFarlane *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2016). Sin embargo, el tardío aumento de la expresión de CD44 en la superficie de las células siE2F1/2 hace pensar en este incremento como una consecuencia más que la causa de la adquisición de este fenotipo. Además, el aumento de los niveles de CD44 es posterior a la adquisición de capacidad migratoria de las células knockdown para E2F1/2 por lo que su presencia en la membrana plasmática no parece indispensable para la migración celular en este caso. Hay que tener en cuenta que la proteína CD44 tiene distintas isoformas, y un cambio en la expresión de estas isoformas, de CD44v a CD44s, se ha relacionado con el proceso de EMT (Brown *et al.*, 2011; Mima *et al.*, 2013). El anticuerpo utilizado en nuestros experimentos para la detección de CD44 reconoce todas sus isoformas, de manera que no detectaría una posible sustitución de una isoforma por otra en la membrana plasmática previa a las 120 horas.

Los diversos cambios celulares y moleculares que se producen en ausencia de E2F1/2 en las células de cáncer de colon HCT116 y DLD-1 usadas a lo largo de esta tesis dan como resultado un aumento en su capacidad migratoria e invasiva, demostrado a través de ensayos de migración e invasión *Transwell* y ensayos de sellado de herida. Ambos métodos experimentales otorgan a las células siE2F1/2 una capacidad migratoria e invasiva entre dos y tres veces superior a las células control, similar a los resultados obtenidos con TNF α . En el mismo sentido, los resultados obtenidos en los experimentos de crecimiento invasivo de esferoides embebidos en una matriz de colágeno mostraron una tendencia de los esferoides knockdown para E2F1/2 a aumentar su

tasa de crecimiento invasivo con respecto a los esferoides siCTRL, si bien es cierto que las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se debe tener en cuenta que, en estas aproximaciones experimentales, particularmente en esta última, la medición de invasión está estrechamente ligada con la proliferación celular, y que las células siE2F1/2 muestran una disminución en su capacidad proliferativa durante los tiempos en los que se realizaron este tipo de experimentos. A pesar de esta reducción proliferativa, las células y los esferoides siE2F1/2 se mostraron más invasivos y es posible que una capacidad invasiva aún mayor de las células knockdown para E2F1/2 quedara enmascarada por su menor capacidad proliferativa.

En general, la escasa literatura que relaciona a los factores E2F con el EMT los presenta como factores promotores del proceso que fomentan la migración e invasión celular, así como la adquisición de características asociadas a células mesenquimales (Knoll *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016; T. Wang *et al.*, 2017). Cambios morfológicos semejantes a los descritos en este trabajo se han observado en líneas celulares de cáncer pulmonar metastático en ausencia de E2F1 (T. Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, la adquisición de este fenotipo morfológico no se ha asociado con la progresión del EMT, sino que, al contrario, estas células ven reducida su capacidad de migración e invasión (Li *et al.*, 2014), y reducen otros marcadores asociados al EMT (T. Wang *et al.*, 2017). Al contrario de lo descrito en estos estudios, los resultados de esta tesis otorgan a E2F1/2 un papel inhibitorio del proceso de EMT en las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116 y DLD-1, obteniendo resultados similares en ambas líneas. Es posible que, un contexto celular específico asociado al cáncer de colon de lugar a una regulación también específica por parte de los factores E2F en relación con el EMT. Una característica recurrente y específica de este tipo de cáncer, en contraposición con otros tipos tumorales, es la presencia de la proteína RB libre de mutaciones (salvaje) (Gope *et al.*, 1990; Wildrick y Boman, 1994; Yamamoto *et al.*, 1999), tal y como ocurre en las líneas celulares HCT116 y DLD-1. Algunos autores han propuesto que la presencia de RB salvaje en tumores colorrectales mantiene una baja actividad E2F, impidiendo la apoptosis asociada a altos niveles de E2F1 y previniendo la inhibición de β -catenina (Yamamoto *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2008). Otros autores argumentan que, a pesar de los altos niveles celulares de RB salvaje, la mayor proporción se encuentra fosforilado, dejando libres a los E2F y fomentando la proliferación celular (Vasaikar *et al.*, 2019). Por lo tanto, la razón por la cual la forma salvaje de RB es positivamente seleccionada en células de cáncer colorrectal continúa siendo objeto de debate. En cualquier caso, esta particularidad podría estar afectando al comportamiento de los E2F en este contexto celular.

Otra característica que se reitera en el cáncer colorrectal es la señalización aberrante de la vía Wnt/ β -catenina (Schatoff, Leach y Dow, 2017), tal y como ocurre en las líneas celulares HCT116 y DLD-1 (Tanaka *et al.*, 2017). Mientras que las células HCT116 portan una mutación en β -catenina que la mantiene constitutivamente activa (Ilyas *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997), las células DLD-1 poseen una mutación en APC, que da lugar a una proteína truncada (Yang *et al.*, 2006). A pesar de las diferencias causales, las células HCT116 y DLD-1 presentan una actividad basal de β -catenina elevada y similar entre ambas líneas celulares (Tanaka *et al.*, 2017). La presencia de RB salvaje unida a una activación constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina establece un contexto celular singular en las líneas celulares de cáncer colorrectal -incluidas las células HCT116 y DLD-1 utilizadas en este trabajo-, un contexto celular específico en el que los factores E2F actuarían como inhibidores del proceso de EMT.

5.2 Identificación de los genes desregulados tras el silenciamiento de E2F1/2

Tras demostrar la participación de E2F1/2 en un proceso con características de EMT en células de cáncer colorrectal, y ante la limitada información disponible hasta el momento con respecto a esta observación, se llevó a cabo un análisis del transcriptoma de las células HCT116 knockdown para E2F1/2 con el fin de identificar el mecanismo subyacente al EMT. Mediante un experimento de RNA-Seq se detectaron los genes diferencialmente expresados a las 24, 48 y 96 horas tras los tratamientos (siCTRL, siE2F1/2, TNF α). La elección de estos puntos temporales responde al objetivo de estudiar un punto temprano en cuanto al desarrollo del fenotipo EMT (24 horas) que puede aportar información relevante sobre la desregulación génica más temprana y directa causada por las distintas condiciones experimentales, así como puntos temporales más tardíos (48 y 96 horas) cuando el fenotipo EMT está siendo establecido. El tiempo de establecimiento del fenotipo EMT a partir de las 48 horas tras la depleción de E2F1/2, basado principalmente en la constatación de cambios morfológicos celulares apreciables, está en consonancia con otros estudios que analizan este fenotipo tras 48 o 72 horas de sus tratamientos celulares (Bates y Mercurio, 2003; Pino *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013, 2014).

Tras la secuenciación masiva del transcriptoma de las diversas condiciones experimentales a los distintos tiempos y el procesamiento de los datos obtenidos, el análisis de componentes principales llevado a cabo con las muestras normalizadas exhibe una distribución diferencial de

las tres condiciones experimentales. Hay que señalar un alejamiento notable de una de las muestras correspondiente a la condición siCTRL tras 24 horas de tratamiento. El análisis de la expresión diferencial incluyendo esta muestra daba lugar únicamente a 38 genes desregulados de forma significativa en ausencia de E2F1/2 a las 24 horas, una cifra muy alejada de las obtenidas a las 48 horas (1664) y 96 horas (873) para esta misma condición. Las diferencias existentes entre las dos muestras siCTRL tras 24 horas de tratamiento forzaban a que únicamente los genes con una desregulación más robusta mostrasen una expresión diferencial estadísticamente significativa. La decisión de prescindir de la muestra que se diferencia significativamente del resto en base al análisis de componentes principales, aboca al cálculo de la expresión diferencial a partir de una única muestra control para este tiempo, lo cual es necesario tener en cuenta en el análisis e interpretación de los resultados. En cualquier caso, el número e identidad de los genes desregulados a las 24 h que se obtienen tras la eliminación del *outlier* están más en consonancia con los datos obtenidos en los otros tiempos analizados, y con lo esperable en base a otros experimentos transcriptómicos en los que se detectan genes de respuesta a E2F1/E2F2 (Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001; Polager *et al.*, 2002; Stanelle *et al.*, 2002).

Los resultados de RNA-Seq confirman la subexpresión de E2F1 y E2F2 en todos los tiempos analizados. Los miembros de la familia E2F7 y E2F8 también se encuentran entre los genes subexpresados, de manera coherente con la inactivación de E2F1/2. Los factores E2F7/8 poseen motivos de unión E2F en sus promotores, y se ha demostrado que E2F1/2 son reguladores positivos de su expresión (de Bruin *et al.*, 2003; Di Stefano, Jensen y Helin, 2003; Christensen *et al.*, 2005). Dado que nuestros experimentos otorgan a los E2F activadores un papel inhibitorio del EMT, en contraste con la literatura, que los presenta como promotores del mismo (Knoll *et al.*, 2014; T. Wang *et al.*, 2017), era posible que la desregulación indirecta de los E2F represores E2F7/8 fuese realmente la responsable del fenotipo observado. Sin embargo, el silenciamiento celular únicamente de E2F7/8 no dio lugar a cambios morfológicos asociados al fenotipo EMT, sino que produjo un gran aumento de la muerte celular a partir de las 48 horas. Este fenotipo apoptótico en ausencia de E2F7/8 ha sido previamente descrito en otros trabajos (Zalmas *et al.*, 2008; Thurlings *et al.*, 2017). En cualquier caso, la subexpresión indirecta de E2F7/8 no parece responsable de la inducción de EMT en nuestro sistema, recayendo este papel exclusivamente sobre E2F1/2.

La depleción de E2F1/2 da lugar a una mayor proporción de genes subexpresados a las 24 horas, sugiriendo un papel mayoritariamente activador de E2F1/2 en este punto temporal, en consonancia con otros estudios (Muller *et al.*, 2001; Polager *et al.*, 2002). Curiosamente, a las 48

y 96 horas, la proporción de genes desregulados positiva y negativamente se iguala. Estudios de nuestro grupo en referencia a la desregulación génica de células extraídas de ratones knockout para E2F1/2 muestran una proporción similar de genes subexpresados y sobreexpresados con respecto a los ratones salvajes o incluso una proporción mayor de genes sobreexpresados (Iglesias *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011). Por lo tanto, por un lado, parece existir una respuesta inmediata tras la inducción o depleción de E2F1/2 en la que se produce una desregulación génica asociada al papel como activadores transcripcionales de estos E2F. Sin embargo, la depleción constitutiva o prolongada en el tiempo de estos E2F daría lugar a una estabilización del programa transcripcional en el que la proporción de genes regulados positiva y negativamente tiende a igualarse.

Apoyando esta idea en la que la ausencia de E2F1/2 provoca una desregulación génica diferencial dependiente del tiempo tras la transfección, encontramos los resultados de enriquecimiento de funciones biológicas en los grupos de genes subexpresados y sobreexpresados a los distintos tiempos, que sugieren una regulación transcripcional bifásica tras la depleción de E2F1/2. Durante una primera fase (24-48 horas tras la depleción) se produce una subexpresión de genes reguladores del ciclo celular, de acuerdo con el papel de activación transcripcional de este tipo de genes tradicionalmente atribuido a E2F1/2 en líneas celulares (Helin, 1998; Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). De acuerdo con esta noción, estos grupos de genes subexpresados a las 24 y 48 horas, se encuentran enriquecidos en motivos de unión E2F, en consonancia con la conocida regulación directa por parte de E2F1/2 de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Slansky *et al.*, 1993; DeGregori, Kowalik y Nevins, 1995; Leone *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002). Durante una segunda fase (48-96 horas), aumenta la expresión de genes relacionados con el fenotipo EMT en células knockdown para E2F1/2, atribuyendo a E2F1/2 un papel mayoritariamente inhibitor de los genes asociados con la adhesión y motilidad celular. De manera muy llamativa, encontramos un robusto enriquecimiento de motivos E2F en el grupo de genes sobreexpresados a las 96 horas, donde encontramos genes con funciones relacionadas tanto con el ciclo celular como con el EMT. Además, el enriquecimiento de motivos de unión E2F en este grupo de genes se sigue manteniendo incluso tras eliminar del análisis aquellos genes pertenecientes a términos relacionados con el ciclo celular, indicando una posible regulación directa de genes implicados en adhesión y motilidad celular por parte de E2F1/2. El enriquecimiento en motivos de unión E2F en el grupo de genes sobreexpresados a las 96 horas, en contraste con una presencia mayoritaria de estos motivos de unión en los grupos de genes subexpresados a las 24 y 48 horas, así como una desregulación génica diferencial en base al enriquecimiento en funciones biológicas a partir de las 48 horas, ponen de manifiesto

un evidente cambio en la regulación de los genes de respuesta a E2F dependiente del tiempo tras la transfección. Aunque por el momento no podemos explicar este fenómeno de manera satisfactoria, es posible que la regulación transcripcional de genes relacionados con la adhesión y motilidad celular dependa de la cooperación de E2F con otros factores, cuya expresión esté regulada durante una primera fase tras la depleción de E2F1/2.

El análisis de enriquecimiento de rutas señaladoras también refleja una sobrerrepresentación de rutas relacionadas con la progresión del EMT principalmente a partir de las 48 horas tras la depleción de E2F1/2, a excepción de la vía de señalización Hippo que aparece enriquecida desde las 24 horas. Esta vía de señalización es capaz de inducir el proceso de EMT cuando se encuentra alterada, a través de la regulación transcripcional asociada a los factores y cofactores de transcripción YAP, TAZ y TEAD, los cuales pueden activar la transcripción de genes implicados en las uniones intercelulares, migración y reorganización del citoesqueleto (Lei *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Diepenbruck *et al.*, 2014). Nuestras evidencias apuntan a que los factores E2F regulan, directa o indirectamente, la expresión de componentes de la vía de Hippo (**Tabla suplementaria 4**). La alteración inicial de esta ruta tras el silenciamiento de E2F1/2 podría estar colaborando en la posterior inducción génica relacionada con el EMT. A partir de las 48 horas constatamos un enriquecimiento en rutas de señalización asociadas a las uniones adherentes, adhesiones focales e interacciones con la matriz extracelular, de acuerdo con el fenotipo observado.

Nuestros resultados sugieren que los desencadenantes del fenotipo EMT observado son distintos como consecuencia del silenciamiento de los E2F y el tratamiento con TNF α , en base al número de genes comunes desregulados y las rutas señaladoras enriquecidas en cada caso, si bien comparten numerosos genes y vías. Inicialmente (24 horas), ambos tratamientos comparten 71 genes en común. Este número se va incrementando hasta los 359 a las 96 horas, indicando una convergencia de los genes diferencialmente expresados. De igual manera, los elementos comunes en el enriquecimiento de rutas señaladoras se ven incrementados con el paso del tiempo. La fuerte activación de la vía NF- κ B dirigiría desde un inicio la regulación génica tras el tratamiento con TNF α . No hemos detectado un aumento en la expresión de factores de transcripción promotores de EMT (SNAIL, SLUG, ZEB, TWIST) en respuesta a TNF α , al igual que otros estudios en los que las células HCT116 han sido tratadas con TNF α , donde se ha sugerido que la inducción del fenotipo EMT podría depender de la estabilización de SNAIL a nivel de proteína (Wang *et al.*, 2013). Aunque la activación de la vía NF- κ B se mantiene hasta las 96 horas tras la adición de TNF α , a partir de las 48 horas comienzan a aparecer elementos comúnmente enriquecidos en ambas condiciones experimentales, tales como las vías RAS, MAPK, RAP1, TGF-

β. Estas vías interconectan diversas cascadas de señalización y ejercen como nexo de unión en la comunicación cruzada entre las rutas que participan en la promoción del EMT (Aggarwal, 2003; Derynck y Zhang, 2003; Son y Moon, 2010; Y.-L. Zhang *et al.*, 2017; Dongre y Weinberg, 2019), favoreciendo posiblemente la convergencia de la expresión génica diferencial entre ambos tratamientos.

La desregulación de 10 de numerosos genes identificados en el análisis transcriptómico (SLUG, ITGA2, KLF4, ABCB10, CD151, RHOB, SMAD6, KRT8, KRT18, TJP3) ha quedado validada mediante RT-qPCR. Curiosamente, la mayoría de estos genes se encontraron también desregulados en células pancreáticas de ratones knockout para E2F1/2, las cuales habían perdido sus características de células diferenciadas (Iglesias *et al.*, 2004), mostrando cierto paralelismo entre ambos sistemas. Varios trabajos han descrito que la vía de RB/E2F modula la expresión de ZEB, uno de los reguladores transcripcionales promotores del proceso EMT (Liu *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2015; Egger *et al.*, 2016; T. Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, este gen no se encuentra entre los genes diferencialmente expresados tras la depleción de E2F1/2 (**Tabla suplementaria 5**), lo cual parece descartarlo como posible regulador de EMT en nuestro sistema. Este hecho, unido a la evidencia mostrada en esta tesis de que E2F1/2 reprimen la expresión de SLUG, y el novedoso papel de los E2F activadores como inhibidores del proceso de EMT, apuntan a un mecanismo singular por el que E2F1/2 modulan el proceso de EMT en células de cáncer colorrectal.

5.3 SLUG como mediador del fenotipo EMT en células knockdown para E2F1/2

El trabajo de esta tesis ha demostrado que SLUG actúa como mediador en la inducción del fenotipo migratorio en ausencia de E2F1/2 en las líneas celulares de cáncer colorrectal, lo cual es consistente con su papel promotor de la migración reflejado en la literatura (Shih y Yang, 2011; Yao *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Iwasaki *et al.*, 2018). Queda por determinar si la ausencia de E2F1/2 resulta en la activación de SLUG de manera dependiente del contexto celular en células de cáncer colorrectal, lo que explicaría el papel inhibitorio de estos E2F de la adquisición de la capacidad migratoria y de otras características asociadas al proceso de EMT, y por tanto, las diferencias observadas en este aspecto con respecto a otros estudios.

La implicación de SLUG en el proceso de EMT inducido tras la depleción de E2F1/2 queda de manifiesto a través de experimentos de rescate del fenotipo. El silenciamiento conjunto de

E2F1/2 y SLUG revierte por completo el fenotipo migratorio de las células HCT116 knockdown para E2F1/2 tanto en ensayos de migración *Transwell* como en ensayos de sellado de herida. Curiosamente, el silenciamiento individual de SLUG en ambos tipos de experimento, e incluso el silenciamiento conjunto de E2F1/2 y SLUG en los ensayos de sellado de herida, dieron lugar a una migración celular incluso menor que en la condición control. Esta observación la podemos explicar, en parte, teniendo en cuenta el descenso en la viabilidad celular que afecta a dichas condiciones con respecto al siCTRL o asumiendo que de manera basal SLUG desempeña una función en la migración celular.

SLUG también actúa como mediador de los cambios morfológicos ocasionados por la ausencia de E2F1/2, aunque no de manera exclusiva, ya que la morfología tipo EMT de las células siE2F1/2 se revierte parcialmente tras la ausencia conjunta de los E2F y SLUG, indicando la participación de otros factores, bien aguas arriba o de manera paralela a SLUG, en la consecución de este fenotipo. En consonancia con este concepto, SLUG actúa como un mediador de la desregulación génica de una parte de los genes relacionados con el fenotipo EMT. De los 9 genes validados mediante RT-qPCR, 4 de ellos (ITGA2, ABCB10, CD151, RHOB) recuperaron niveles de expresión similares al control tras el silenciamiento conjunto de los E2F y SLUG, denotando su posicionamiento aguas abajo en la regulación génica mediada por SLUG. De manera interesante, la reducción en los niveles de expresión de ITGA2, ABCB10 y CD151 tras el silenciamiento simple de SLUG va más allá que la producida por el silenciamiento conjunto de los E2F y SLUG, sugiriendo que su expresión se encuentra regulada por otros factores además de SLUG tras la depleción de E2F1/2.

El conjunto de los resultados de este trabajo demuestra que E2F1/2 reprimen transcripcionalmente a SLUG. La depleción de E2F1/2 induce la expresión de mRNA de SLUG a niveles cuatro veces superiores con respecto a las células control. Apoyando estos resultados, la ausencia de E2F1/2 conduce a la inducción del promotor de SLUG (-793/+107) clonado en un plásmido reportero de luciferasa. Esta inducción transcripcional, de aproximadamente el doble en comparación con las células siCTRL, es sensiblemente menor que la detectada a nivel de mRNA. Las razones para esta diferencia pueden radicar en que la detección de la expresión de SLUG a nivel de mRNA está sujeta a una variedad más amplia de regulaciones. Por ejemplo, la regulación de SLUG puede afectar a regiones fuera de la zona clonada del promotor, incluidos motivos de unión E2F detectados a unas -2000 pb desde el inicio de la transcripción (que no han sido incluidos en el vector reportero utilizado), o puede estar sujeta a mecanismos postranscripcionales involucrados en la estabilidad del RNA.

Mientras que el silenciamiento simultáneo de E2F1/2 da lugar al aumento de la actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG, el silenciamiento individual de E2F1 y E2F2 no induce dicha actividad, poniendo de manifiesto la existencia de mecanismos de compensación funcional entre ambos factores de transcripción. Experimentos de sobreexpresión de E2F1 y E2F2 confirman la capacidad represora de estos E2F del promotor de SLUG, al producirse una disminución de la actividad luciferasa. Esta represión es específica de los factores E2F1 y E2F2, ya que la sobreexpresión de otros miembros de la familia E2F, tales como E2F4 y E2F7, no conduce a una disminución significativa de la actividad luciferasa bajo el promotor de SLUG (**Figura 44**).

Sorprendentemente, la represión del promotor de SLUG mediada por E2F1/2 parece ser independiente de RB, como demuestran los ensayos de luciferasa y de expresión de mRNA donde el silenciamiento de RB no conduce a un aumento en la expresión de SLUG. Es más, parece existir cierta sinergia en la represión ejercida por ambos sistemas, que puede apreciarse en los resultados de expresión de mRNA detectado por RT-qPCR, no así en los ensayos de luciferasa, quizás debido a la restricción de la zona promotora estudiada en los ensayos de luciferasa.

A pesar de que la interacción con RB es uno de los mecanismos más conocidos mediante el cual los E2F activadores ejercen la represión transcripcional, sabemos que estos E2F también son capaces de reprimir genes diana de manera independiente de RB, bien mediante su interacción con otras proteínas (Koziczak, Krek y Nagamine, 2000; Valdez *et al.*, 2011; Laresgoiti *et al.*, 2013; P. Zhang *et al.*, 2017), o bien mediante la regulación de otros factores de transcripción que podrían regular secundariamente al promotor de SLUG. Nuestra hipótesis apuntaba a la inducción de SLUG a través de β -catenina en ausencia de E2F1/2, ya que E2F1 es un represor conocido de esta proteína (Morris *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011), y β -catenina ha demostrado, por su parte, activar transcripcionalmente a SLUG (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2005; Saegusa *et al.*, 2009; Heallen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015). Además, el desmantelamiento de las uniones intercelulares en ausencia de E2F1/2 propiciaría una mayor deslocalización de β -catenina de la membrana plasmática, que se acumularía en el citoplasma y se trasladaría en mayor medida al núcleo, lo que estaría en consonancia con el aumento observado de la expresión de SLUG. Sin embargo, nuestros experimentos muestran que la inducción de la expresión de SLUG en células knockdown para E2F1/2 no está mediada por β -catenina, ya que el silenciamiento conjunto de E2F y β -catenina no conduce a una reducción en la expresión de mRNA de SLUG ni de la actividad luciferasa bajo su promotor, sino todo lo contrario. Hay que señalar que la línea celular HCT116 expresa una forma de β -catenina

mutada que impide que sea fosforilada por GSK3 β y posteriormente degradada, lo que le confiere una activación constitutiva (Ilyas *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997). Es posible que el silenciamiento a nivel de mRNA de β -catenina detectado en nuestro estudio no se traduzca en una reducción de sus niveles de proteicos, lo que podría explicar los niveles elevados de SLUG tras el knockdown de β -catenina. Sin embargo, la expresión de SLUG no solo no se reduce, sino que aumenta tras el silenciamiento de β -catenina, y de manera más evidente tras el silenciamiento conjunto de los E2F y β -catenina, indicando que ambas vías actuarían de manera sinérgica en la regulación de SLUG. Estos datos entran en contradicción con la conocida inducción transcripcional de SLUG por parte de β -catenina, y sugieren que β -catenina regula negativamente a SLUG en este contexto. Más estudios serán necesarios para entender este fenómeno. Entre estos estudios incluiríamos la monitorización de la expresión de SLUG tras la sobreexpresión de β -catenina y/o su cofactor TCF así como la repetición de este tipo de experimentos en la línea celular DLD-1, con el objetivo de verificar su replicabilidad en otra línea celular de cáncer colorrectal.

Además de β -catenina, se han descrito otros factores que regulan el promotor de SLUG (Leong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Brandl *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2018). La interacción de E2F1/2 con alguno de estos factores podría provocar la represión de SLUG mediada por los E2F de manera independiente de RB. El hecho de que la represión ejercida por E2F1/2 sobre el promotor de SLUG sea dependiente únicamente de manera parcial de los motivos de unión E2F, refuerza la idea de la necesidad de interacción de estos E2F con otras proteínas para ejercer su represión. Otros estudios han demostrado que la mutación de lugares de unión para AP-1 inhibe la capacidad represora de E2F1, independiente de RB, sobre el promotor de los genes activadores de plasminógeno (Koziczak, Krek y Nagamine, 2000). Es más, E2F1 es capaz de reprimir promotores clonados que únicamente contienen sitios AP-1. La sobreexpresión de c-Jun, activador junto a otros factores de los sitios AP-1, induce la expresión de estos promotores, efecto que es revertido con la sobreexpresión de E2F1. El adaptador CBP, también implicado en la transactivación a través de motivos AP-1, interacciona con E2F1 (Trouche y Kouzarides, 1996). Los autores discuten la posibilidad de que la interacción de E2F1 con CBP impida la transactivación mediada por los sitios AP-1. De manera interesante, SLUG contiene sitios AP-1 en su promotor (Shih y Yang, 2011), y la expresión de SLUG responde a la presencia o ausencia de c-Jun de manera dependiente de los sitios AP-1 de la región proximal (Chen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016). Por lo tanto, es posible que la represión de SLUG en nuestro sistema dependa en parte de la interacción de E2F1/2 con proteínas que intervienen en la regulación de SLUG a través de otros lugares de unión al promotor distintos de los motivos E2F, como AP-1. De hecho,

la expresión de JUN se encuentra incrementada desde las 48 horas tras la depleción de E2F1/2, lo que propiciaría la activación de SLUG a través de sitios AP-1 en ausencia de E2F1/2.

Siguiendo un mecanismo análogo, la interacción de E2F1 con TEAD es capaz de reprimir la expresión transcripcional asociada a la vía Hippo mediada por YAP, impidiendo su unión al DNA (P. Zhang *et al.*, 2017). Curiosamente, se ha descrito de manera recientemente que YAP/TEAD activan la expresión de SLUG mediante la unión de TEAD a su promotor (Yu *et al.*, 2018). La interacción de E2F1 con TEAD podría estar contribuyendo a la represión de SLUG en nuestro sistema, impidiendo su activación transcripcional mediada por YAP. Yu y colaboradores definen el motivo de unión de TEAD en el promotor de SLUG alrededor de las -1300 pb, el cual quedaría fuera de nuestro promotor clonado y no explicaría la represión observada en los experimentos de luciferasa, pero esta interacción podría estar modulando la expresión de SLUG detectada a nivel de mRNA. Por otra parte, otros estudios han demostrado la capacidad de YAP/TEAD2 de unirse a motivos de unión AP-1 (Diepenbruck *et al.*, 2014), dejando la puerta abierta a la implicación de YAP/TEAD en la inducción de SLUG en ausencia de E2F1/2.

La represión de SLUG por parte de E2F1/2 abre una vía al entendimiento de la regulación contexto-específica mediada por los factores E2F en la inhibición del proceso de EMT en células de cáncer colorrectal (**Figura 46**). No obstante, serán necesarios más estudios que ayuden a esclarecer los mecanismos a través de los cuales E2F1/2 regulan la expresión de SLUG, e identificar otros genes involucrados en la adquisición de este fenotipo.

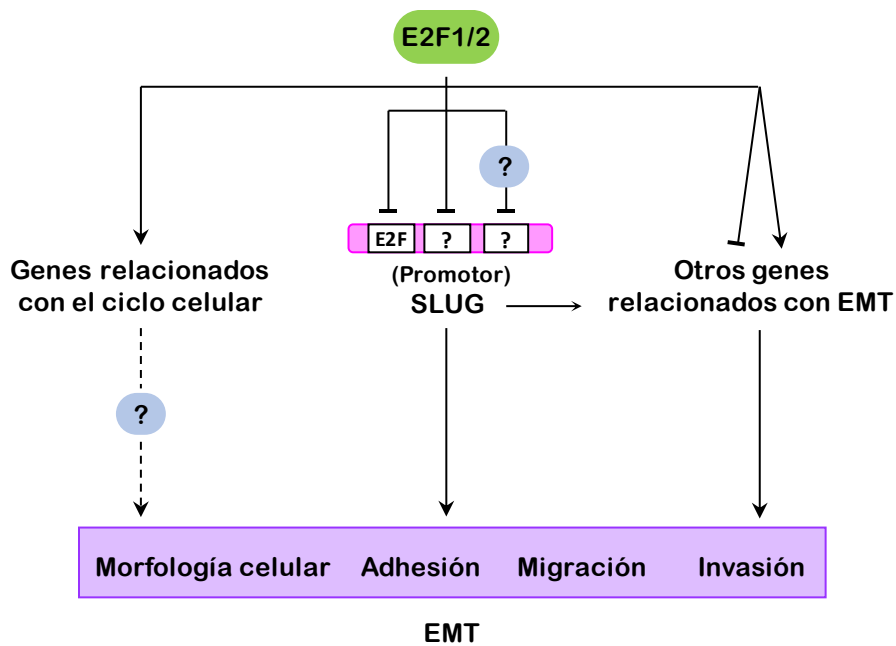


Figura 46: Modelo propuesto a cerca del papel inhibitorio de los factores E2F1/2 en el proceso de EMT en células de cáncer colorrectal.

5.4 Aproximaciones futuras

En este trabajo, hemos puesto de manifiesto la implicación de los factores de transcripción E2F1/2 en el proceso de EMT en líneas celulares de cáncer colorrectal. Además, hemos demostrado que los factores E2F1/2 reprimen transcripcionalmente a SLUG en este contexto. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los E2F ejercen esta represión continúan siendo una incógnita y serán objeto de próximos estudios.

La adquisición de capacidad migratoria e invasora, característica del fenotipo EMT, ha quedado demostrada en líneas celulares de cáncer colorrectal en ausencia de E2F1/2. Será relevante comprobar si esta capacidad invasiva es también ejercida *in vivo*. La implantación de estas células silenciadas para E2F1/2 en ratón (xenotrasplante) constituye una aproximación experimental que permitiría comparar la capacidad invasiva de estas células *in vivo* con respecto a células control. En este sentido, la generación de tumores colorrectales a través de la administración de dextran sulfato y azoximetano en ratones knockout para E2F1/2 y ratones salvajes, posibilitaría comparar la invasividad de dichos tumores de manera más fisiológica.

Finalmente, el estudio de la expresión y grado de actividad fisiopatológica de los E2F en muestras de tumores colorrectales humanos, primarios y metastáticos, nos permitiría examinar la posible existencia de una correlación entre la actividad E2F y la invasividad asociada a la metástasis, y valorar su idoneidad como biomarcadores pronóstico.

6. CONCLUSIONES

1. E2F1/E2F2 participan en el mantenimiento de las características epiteliales de líneas celulares de cáncer de colon y regulan negativamente su capacidad migratoria e invasiva. La ausencia de E2F1/E2F2 da lugar a células con características mesenquimales y altamente migratorias, de manera consistente con un proceso de EMT.
2. E2F1/E2F2 regulan la expresión de genes relacionados con la motilidad y la adhesión celular en células de cáncer de colon. La presencia de motivos de unión a E2F en los promotores de muchos de ellos sugiere, además, una regulación transcripcional directa por parte de E2F1/E2F2. Su desregulación podría dar cuenta del fenotipo EMT desarrollado en ausencia de E2F1/E2F2.
3. E2F1/E2F2 reprimen la actividad transcripcional del gen *SNAI2* (SLUG). Esta represión se produce parcialmente a través de los motivos de unión E2F que posee en su promotor y de manera independiente de RB, lo cual sugiere que parte de esta represión se produce a través de la interacción de los E2F con otros factores de transcripción que regulan el promotor de SLUG, o de manera más indirecta, a través de la regulación de la expresión de otros factores por parte de E2F.
4. SLUG actúa como mediador de cambios morfológicos, aumento de la migración celular y cambios en la expresión génica ocasionados por la ausencia de E2F1/E2F2. El silenciamiento de SLUG rescata en gran medida el fenotipo EMT inducido por el knockdown de E2F1/E2F2.

7. REFERENCIAS

- Abercrombie, M. (1978) «Fibroblasts.», *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*. BMJ Publishing Group, 12, pp. 1-6.
- Adam, A. P. (2015) «Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation», *Mediators of Inflammation*, 2015, pp. 1-24. doi: 10.1155/2015/272858.
- Adams, M. R. *et al.* (2000) «Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus.», *Molecular and cellular biology*, 20(10), pp. 3633-9. doi: 10.1128/mcb.20.10.3633-3639.2000.
- Adhikary, A. *et al.* (2014) «Inhibition of Epithelial to Mesenchymal Transition by E-cadherin Up-regulation via Repression of Slug Transcription and Inhibition of E-cadherin Degradation», *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), pp. 25431-25444. doi: 10.1074/jbc.M113.527267.
- Aggarwal, B. B. (2003) «Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword», *Nature Reviews Immunology*, 3(9), pp. 745-756. doi: 10.1038/nri1184.
- Aigner, K. *et al.* (2007) «The transcription factor ZEB1 (δ EF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression», *FEBS Letters*, 581(8), pp. 1617-1624. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.026.
- Alexander, N. R. *et al.* (2006) «N-cadherin Gene Expression in Prostate Carcinoma Is Modulated by Integrin-Dependent Nuclear Translocation of Twist1», *Cancer Research*, 66(7), pp. 3365-3369. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3401.
- Anders, S., Pyl, P. T. y Huber, W. (2015) «HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data», *Bioinformatics*, 31(2), pp. 166-169. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Apostolova, M. D. *et al.* (2002) «Active Nuclear Import and Export Pathways Regulate E2F-5 Subcellular Localization», *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), pp. 34471-34479. doi: 10.1074/jbc.M205827200.
- Apte, S. S. y Parks, W. C. (2015) «Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future», *Matrix Biology*, 44-46, pp. 1-6. doi: 10.1016/j.matbio.2015.04.005.
- Attwooll, C. *et al.* (2005) «A Novel Repressive E2F6 Complex Containing the Polycomb Group Protein, EPC1, That Interacts with EZH2 in a Proliferation-specific Manner», *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), pp. 1199-1208. doi: 10.1074/jbc.M412509200.
- Ayollo, D. V. *et al.* (2009) «Rearrangements of the Actin Cytoskeleton and E-Cadherin-Based Adherens Junctions Caused by Neoplastic Transformation Change Cell-Cell Interactions», *PLoS ONE*. Editado por D. Hartl, 4(11), p. e8027. doi: 10.1371/journal.pone.0008027.
- Azkargorta, M. *et al.* (2010) «Differential Proteomics Analysis Reveals a Role for E2F2 in the Regulation of the Ahr Pathway in T Lymphocytes», *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10), pp. 2184-2194. doi: 10.1074/mcp.M110.001263.
- Bakin, A. V. *et al.* (2000) «Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration», *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), pp. 36803-36810. doi: 10.1074/jbc.M005912200.
- Balkwill, F. (2009) «Tumour necrosis factor and cancer», *Nature Reviews Cancer*, 9(5), pp. 361-371. doi: 10.1038/nrc2628.
- Barrallo-Gimeno, A. y Nieto, M. A. (2005) «The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer», *Development*, 132(14), pp. 3151-3161. doi: 10.1242/dev.01907.
- Bates, R. C. y Mercurio, A. M. (2003) «Tumor Necrosis Factor- α Stimulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Human Colonic Organoids», *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), pp. 1790-1800. doi: 10.1091/mbc.e02-09-0583.
- Battle, E. *et al.* (2000) «The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells», *Nature Cell Biology*, 2(2), pp. 84-89. doi: 10.1038/35000034.

- Bax, N. A. M. *et al.* (2011) «Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells», *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(12), pp. 2675-2683. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01266.x.
- Behrens, J. *et al.* (1996) «Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1», *Nature*, 382(6592), pp. 638-642. doi: 10.1038/382638a0.
- Beijersbergen, R. L. *et al.* (1994) «E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo.», *Genes & Development*, 8(22), pp. 2680-2690. doi: 10.1101/gad.8.22.2680.
- Beijersbergen, R. L. *et al.* (1995) «Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes.», *Genes & Development*, 9(11), pp. 1340-1353. doi: 10.1101/gad.9.11.1340.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995) «Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing», *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 57(1), pp. 289-300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M. y de Bruin, R. A. M. (2013) «Control of cell cycle transcription during G1 and S phases», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), pp. 518-528. doi: 10.1038/nrm3629.
- Bhat-Nakshatri, P. *et al.* (2010) «SLUG/SNAI2 and Tumor Necrosis Factor Generate Breast Cells With CD44+/CD24- Phenotype», *BMC Cancer*, 10(1), p. 411. doi: 10.1186/1471-2407-10-411.
- Bhowmick, N. A., Zent, R., *et al.* (2001) «Integrin β_1 Signaling Is Necessary for Transforming Growth Factor- β Activation of p38MAPK and Epithelial Plasticity», *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 46707-46713. doi: 10.1074/jbc.M106176200.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., *et al.* (2001) «Transforming Growth Factor- β_1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism», *Molecular Biology of the Cell*. Editado por C.-H. Heldin, 12(1), pp. 27-36. doi: 10.1091/mbc.12.1.27.
- Bieda, M. *et al.* (2006) «Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome», *Genome Research*, 16(5), pp. 595-605. doi: 10.1101/gr.4887606.
- Bindels, S. *et al.* (2006) «Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells», *Oncogene*, 25(36), pp. 4975-4985. doi: 10.1038/sj.onc.1209511.
- Bolos, V. *et al.* (2003) «The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors», *Journal of Cell Science*, 116(3), pp. 499-511. doi: 10.1242/jcs.00224.
- Bonnomet, A. *et al.* (2012) «A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer», *Oncogene*, 31(33), pp. 3741-3753. doi: 10.1038/onc.2011.540.
- Brabletz, T. *et al.* (1999) «beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer.», *The American journal of pathology*, 155(4), pp. 1033-8. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65204-2.
- Brabletz, T. *et al.* (2001) «Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), pp. 10356-10361. doi: 10.1073/pnas.171610498.
- Brabletz, T. (2012) «To differentiate or not — routes towards metastasis», *Nature Reviews Cancer*, 12(6), pp. 425-436. doi: 10.1038/nrc3265.
- Brandl, M. *et al.* (2010) «IKK controls canonical TGF- β -SMAD signaling to regulate genes expressing SNAIL and SLUG during EMT in Panc1 cells», *Journal of Cell Science*, 123(24), pp. 4231-4239. doi: 10.1242/jcs.071100.
- Le Bras, G. F. *et al.* (2011) «CD44 Upregulation in E-Cadherin-Negative Esophageal Cancers Results in Cell Invasion», *PLoS ONE*. Editado por A. I. Marcus, 6(11), p. e27063. doi: 10.1371/journal.pone.0027063.

- Brattain, M. G. *et al.* (1981) «Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma.», *Cancer research*, 41(5), pp. 1751-6.
- Brehm, A. *et al.* (1998) «Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription», *Nature*, 391(6667), pp. 597-601. doi: 10.1038/35404.
- Bretones, G., Delgado, M. D. y León, J. (2015) «Myc and cell cycle control», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), pp. 506-516. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013.
- Brown, R. L. *et al.* (2011) «CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression», *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), pp. 1064-1074. doi: 10.1172/JCI44540.
- de Bruin, A. *et al.* (2003) «Identification and Characterization of E2F7, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation», *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), pp. 42041-42049. doi: 10.1074/jbc.M308105200.
- Burdsal, C. A., Damsky, C. H. y Pedersen, R. A. (1993) «The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak.», *Development (Cambridge, England)*, 118(3), pp. 829-44.
- Burke, J. R. *et al.* (2010) «Phosphorylation-induced Conformational Changes in the Retinoblastoma Protein Inhibit E2F Transactivation Domain Binding», *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp. 16286-16293. doi: 10.1074/jbc.M110.108167.
- Burute, M. y Thery, M. (2012) «Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions.», *Current opinion in cell biology*, 24(5), pp. 628-36. doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.003.
- Cam, H. *et al.* (2004) «A Common Set of Gene Regulatory Networks Links Metabolism and Growth Inhibition», *Molecular Cell*, 16(3), pp. 399-411. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.037.
- Canel, M. *et al.* (2013) «E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis», *Journal of Cell Science*, 126(2), pp. 393-401. doi: 10.1242/jcs.100115.
- Chaffer, C. L. *et al.* (2016) «EMT, cell plasticity and metastasis», *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(4), pp. 645-654. doi: 10.1007/s10555-016-9648-7.
- Chao, Y. L., Shepard, C. R. y Wells, A. (2010) «Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition», *Molecular Cancer*, 9(1), p. 179. doi: 10.1186/1476-4598-9-179.
- Chen, C. *et al.* (2018) «The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications», *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), p. 64. doi: 10.1186/s13045-018-0605-5.
- Chen, H. *et al.* (2009) «Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway Regulates Breast Cancer Cell Migration by Maintaining slug Expression», *Cancer Research*, 69(24), pp. 9228-9235. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1950.
- Chong, J.-L. *et al.* (2009) «E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells», *Nature*, 462(7275), pp. 930-934. doi: 10.1038/nature08677.
- Christensen, J. *et al.* (2005) «Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription», *Nucleic Acids Research*, 33(17), pp. 5458-5470. doi: 10.1093/nar/gki855.
- Christiansen, J. J. y Rajasekaran, A. K. (2006) «Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis», *Cancer Research*, 66(17), pp. 8319-8326. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410.
- Chu, W.-M. (2013) «Tumor necrosis factor», *Cancer Letters*, 328(2), pp. 222-225. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.
- Chu, W. *et al.* (2014) «Neuropilin-1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Stimulating Nuclear Factor-Kappa B and Is Associated with Poor Prognosis in Human Oral Squamous Cell

- Carcinoma», *PLoS ONE*. Editado por J. W. Lee, 9(7), p. e101931. doi: 10.1371/journal.pone.0101931.
- Cichon, M. A. y Radisky, D. C. (2014) «ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail», *Oncotarget*, 5(9), pp. 2827-38. doi: 10.18632/oncotarget.1940.
- Clegg, D. O. *et al.* (2003) «Integrins in the development function and dysfunction of the nervous system», *Frontiers in Bioscience*, 8(4), p. 1020. doi: 10.2741/1020.
- Coleman, M. L., Marshall, C. J. y Olson, M. F. (2004) «RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), pp. 355-366. doi: 10.1038/nrm1365.
- Comijn, J. *et al.* (2001) «The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.», *Molecular cell*, 7(6), pp. 1267-78.
- Conacci-Sorrell, M. *et al.* (2003) «Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions», *The Journal of Cell Biology*, 163(4), pp. 847-857. doi: 10.1083/jcb.200308162.
- Conesa, A. *et al.* (2016) «A survey of best practices for RNA-seq data analysis», *Genome Biology*, 17(1), p. 13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8.
- Corbel, C., Lehmann, A. y Davison, F. (2000) «Expression of CD44 during early development of the chick embryo.», *Mechanisms of development*, 96(1), pp. 111-4.
- Craene, B. De y Berx, G. (2013) «Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression», *Nature Reviews Cancer*, 13(2), pp. 97-110. doi: 10.1038/nrc3447.
- Crawford, H. C. *et al.* (1999) «The metalloproteinase matrilysin is a target of β -catenin transactivation in intestinal tumors», *Oncogene*, 18(18), pp. 2883-2891. doi: 10.1038/sj.onc.1202627.
- D'Souza, S. J. A. *et al.* (2002) «E2F-1 Is Essential for Normal Epidermal Wound Repair», *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 10626-10632. doi: 10.1074/jbc.M111956200.
- Dady, A., Blavet, C. y Duband, J.-L. (2012) «Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo», *Developmental Dynamics*, 241(8), pp. 1333-1349. doi: 10.1002/dvdy.23813.
- Dahiya, A. *et al.* (2000) «Role of the LXCXE binding site in Rb function.», *Molecular and cellular biology*, 20(18), pp. 6799-805. doi: 10.1128/mcb.20.18.6799-6805.2000.
- Das, V. *et al.* (2019) «The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective», *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), pp. 14535-14555. doi: 10.1002/jcp.28160.
- Davis, M. A., Ireton, R. C. y Reynolds, A. B. (2003) «A core function for p120-catenin in cadherin turnover», *The Journal of Cell Biology*, 163(3), pp. 525-534. doi: 10.1083/jcb.200307111.
- Dean, K. C. *et al.* (2015) «An Rb1-dependent amplification loop between Ets1 and Zeb1 is evident in thymocyte differentiation and invasive lung adenocarcinoma», *BMC Molecular Biology*, 16(1), p. 8. doi: 10.1186/s12867-015-0038-4.
- Deep, G. *et al.* (2014) «SNAI1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin», *Molecular Cancer*, 13(1), p. 37. doi: 10.1186/1476-4598-13-37.
- DeGregori, J., Kowalik, T. y Nevins, J. R. (1995) «Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes.», *Molecular and cellular biology*, 15(8), pp. 4215-24. doi: 10.1128/mcb.15.8.4215.
- Delgado, I. *et al.* (2011) «A role for transcription factor E2F2 in hepatocyte proliferation and timely liver regeneration», *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(1), pp. G20-G31. doi: 10.1152/ajpgi.00481.2010.
- Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003) «Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family

- signalling», *Nature*, 425(6958), pp. 577-584. doi: 10.1038/nature02006.
- Dexter, D. L. *et al.* (1981) «Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma», *The American Journal of Medicine*, 71(6), pp. 949-956. doi: 10.1016/0002-9343(81)90312-0.
- Dhasarathy, A. *et al.* (2011) «The Transcription Factors Snail and Slug Activate the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway in Breast Cancer», *PLoS ONE*. Editado por Q. Wu, 6(10), p. e26514. doi: 10.1371/journal.pone.0026514.
- Dicker, A. J. *et al.* (2000) «E2F-1 induces proliferation-specific genes and suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes», *Oncogene*, 19(25), pp. 2887-2894. doi: 10.1038/sj.onc.1203610.
- Diepenbruck, M. *et al.* (2014) «Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition», *Journal of Cell Science*, 127(7), pp. 1523-1536. doi: 10.1242/jcs.139865.
- Dimova, D. K. y Dyson, N. J. (2005) «The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces», *Oncogene*, 24(17), pp. 2810-2826. doi: 10.1038/sj.onc.1208612.
- Dongre, A. y Weinberg, R. A. (2019) «New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), pp. 69-84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- Dunnen, J. T. den y Antonarakis, S. E. (2000) «Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion», *Human Mutation*, 15(1), pp. 7-12. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N.
- Dynlacht, B. D. *et al.* (1997) «Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases.», *Molecular and cellular biology*, 17(7), pp. 3867-75. doi: 10.1128/mcb.17.7.3867.
- Edmondson, R. *et al.* (2014) «Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors», *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207-218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Egger, J. V. *et al.* (2016) «Dephosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) inhibits cancer cell EMT via Zeb», *Cancer Biology & Therapy*, 17(11), pp. 1197-1205. doi: 10.1080/15384047.2016.1235668.
- Eisenberg, E. y Levanon, E. Y. (2013) «Human housekeeping genes, revisited», *Trends in Genetics*, 29(10), pp. 569-574. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.010.
- Elloul, S. *et al.* (2005) «Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma», *Cancer*, 103(8), pp. 1631-1643. doi: 10.1002/cncr.20946.
- Euskirchen, G. M. *et al.* (2007) «Mapping of transcription factor binding regions in mammalian cells by ChIP: Comparison of array- and sequencing-based technologies», *Genome Research*, 17(6), pp. 898-909. doi: 10.1101/gr.5583007.
- Fang, Z. H. y Han, Z. C. (2006) «The transcription factor E2F: a crucial switch in the control of homeostasis and tumorigenesis.», *Histology and histopathology*, 21(4), pp. 403-13. doi: 10.14670/HH-21.403.
- Farkas, T. *et al.* (2002) «Distinct Phosphorylation Events Regulate p130- and p107-mediated Repression of E2F-4», *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), pp. 26741-26752. doi: 10.1074/jbc.M200381200.
- Fernando, J. *et al.* (2015) «A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells», *International Journal of Cancer*, 136(4), pp. E161-E172. doi: 10.1002/ijc.29097.
- Ferreira, R. *et al.* (1998) «The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), pp. 10493-10498. doi: 10.1073/pnas.95.18.10493.

- Fischer, M. y Müller, G. A. (2017) «Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes», *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(6), pp. 638-662. doi: 10.1080/10409238.2017.1360836.
- Fitzgerald, K. A. y O'Neill, L. A. (1999) «Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Egr-1.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(8), pp. 4920-7.
- Flemington, E. K., Speck, S. H. y Kaelin, W. G. (1993) «E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), pp. 6914-6918. doi: 10.1073/pnas.90.15.6914.
- Frixen, U. H. *et al.* (1991) «E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.», *The Journal of cell biology*, 113(1), pp. 173-85.
- Fukushima, K. *et al.* (2015) «Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor α induces high malignant potential in colon cancer cell line», *Cancer Science*, 106(8), pp. 1000-1007. doi: 10.1111/cas.12703.
- Gan, M. *et al.* (2018) «miR-152 regulates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by targeting E2F3», *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 54(4), pp. 304-310. doi: 10.1007/s11626-017-0219-1.
- Garg, M. (2013) «Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer.», *World journal of stem cells*. Baishideng Publishing Group Inc, 5(4), pp. 188-95. doi: 10.4252/wjsc.v5.i4.188.
- Gaubatz, S. *et al.* (2001) «E2F4 Is Exported from the Nucleus in a CRM1-Dependent Manner», *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), pp. 1384-1392. doi: 10.1128/MCB.21.4.1384-1392.2001.
- Giangrande, P. H. *et al.* (2003) «Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor.», *Molecular and cellular biology*, 23(11), pp. 3707-20. doi: 10.1128/mcb.23.11.3707-3720.2003.
- Giangrande, P. H. *et al.* (2004) «A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription», *Genes & Development*, 18(23), pp. 2941-2951. doi: 10.1101/gad.1239304.
- Giepmans, B. N. G. y van IJzendoorn, S. C. D. (2009) «Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), pp. 820-831. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.07.015.
- Gilles, C. *et al.* (2013) «Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition», en *Rise and Fall of Epithelial Phenotype*. Boston, MA: Springer US, pp. 297-315. doi: 10.1007/0-387-28671-3_20.
- Ginsberg, D. *et al.* (1994) «E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107.», *Genes & Development*, 8(22), pp. 2665-2679. doi: 10.1101/gad.8.22.2665.
- Godde, N. J. *et al.* (2010) «Cell Polarity in Motion: Redefining Mammary Tissue Organization Through EMT and Cell Polarity Transitions», *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), pp. 149-168. doi: 10.1007/s10911-010-9180-2.
- Gope, R. *et al.* (1990) «Increased Expression of the Retinoblastoma Gene in Human Colorectal Carcinomas Relative to Normal Colonic Mucosa», *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 82(4), pp. 310-314. doi: 10.1093/jnci/82.4.310.
- Gordon, K. J. *et al.* (2009) «Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2», *Carcinogenesis*, 30(2), pp. 238-248. doi: 10.1093/carcin/bgn274.
- Gotea, V. y Ovcharenko, I. (2008) «DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes», *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), pp. W133-W139. doi: 10.1093/nar/gkn300.
- Grande, M. T. *et al.* (2015) «Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease», *Nature Medicine*, 21(9), pp. 989-

997. doi: 10.1038/nm.3901.

Gravdal, K. *et al.* (2007) «A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer», *Clinical Cancer Research*, 13(23), pp. 7003-7011. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1263.

Greenburg, G. y Hay, E. D. (1982) «Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells», *The Journal of Cell Biology*, 95(1), pp. 333-339. doi: 10.1083/jcb.95.1.333.

Grooteclaes, M. L. y Frisch, S. M. (2000) «Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis», *Oncogene*, 19(33), pp. 3823-3828. doi: 10.1038/sj.onc.1203721.

Gros, J. y Tabin, C. J. (2014) «Vertebrate Limb Bud Formation Is Initiated by Localized Epithelial-to-Mesenchymal Transition», *Science*, 343(6176), pp. 1253-1256. doi: 10.1126/science.1248228.

Gross, J. y Lapiere, C. M. (1962) «COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(6), pp. 1014-1022. doi: 10.1073/pnas.48.6.1014.

Gunasinghe, N. P. A. D. *et al.* (2012) «Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer», *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), pp. 469-478. doi: 10.1007/s10555-012-9377-5.

Hahn, S. *et al.* (2013) «SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition», *The EMBO Journal*, 32(23), pp. 3079-3095. doi: 10.1038/emboj.2013.236.

Haines, R. J., Beard, R. S. y Wu, M. H. (2015) «Protein tyrosine kinase 6 mediates TNF α -induced endothelial barrier dysfunction», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), pp. 190-196. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.057.

Hajra, K. M., Chen, D. Y.-S. y Fearon, E. R. (2002) «The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer.», *Cancer research*, 62(6), pp. 1613-8.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) «Hallmarks of Cancer: The Next Generation», *Cell*, 144(5), pp. 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Harburger, D. S. y Calderwood, D. A. (2009) «Integrin signalling at a glance», *Journal of Cell Science*, 122(2), pp. 159-163. doi: 10.1242/jcs.018093.

Harney, A. S. *et al.* (2009) «Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), pp. 13667-13672. doi: 10.1073/pnas.0906423106.

Hayden, M. S. y Ghosh, S. (2014) «Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines», *Seminars in Immunology*, 26(3), pp. 253-266. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004.

He, J.-G. *et al.* (2017) «Aurora-A Regulates Progression and Metastasis of Colorectal Cancer by Promoting Slug Activity», *Technology in Cancer Research & Treatment*. SAGE Publications, 16(6), pp. 766-775. doi: 10.1177/1533034616682172.

Heallen, T. *et al.* (2011) «Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size», *Science*, 332(6028), pp. 458-461. doi: 10.1126/science.1199010.

Helin, K. *et al.* (1993) «Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation.», *Genes & Development*, 7(10), pp. 1850-1861. doi: 10.1101/gad.7.10.1850.

Helin, K. (1998) «Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors.», *Current opinion in genetics & development*, 8(1), pp. 28-35.

Helin, K., Harlow, E. y Fattaey, A. (1993) «Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the

- retinoblastoma protein.», *Molecular and cellular biology*, 13(10), pp. 6501-8. doi: 10.1128/mcb.13.10.6501.
- Herreros-Villanueva, M. *et al.* (2013) «SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells», *Oncogenesis*, 2(8), pp. e61-e61. doi: 10.1038/oncsis.2013.23.
- Hijmans, E. M. *et al.* (1995) «E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo.», *Molecular and cellular biology*, 15(6), pp. 3082-9. doi: 10.1128/mcb.15.6.3082.
- Hinz, B. y Gabbiani, G. (2003) «Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling», *Thrombosis and Haemostasis*, 90(12), pp. 993-1002. doi: 10.1160/TH03-05-0328.
- Hirano, M. *et al.* (2008) «EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition», *The Journal of Cell Biology*, 182(6), pp. 1217-1230. doi: 10.1083/jcb.200712086.
- Hollern, D. P. *et al.* (2014) «The E2F Transcription Factors Regulate Tumor Development and Metastasis in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer», *Molecular and Cellular Biology*, 34(17), pp. 3229-3243. doi: 10.1128/MCB.00737-14.
- Howe, L. R. *et al.* (2003) «Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation.», *Cancer research*, 63(8), pp. 1906-13.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. y Lempicki, R. A. (2009a) «Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists», *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp. 1-13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. y Lempicki, R. A. (2009b) «Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources», *Nature Protocols*, 4(1), pp. 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Huang, R. Y.-J., Guilford, P. y Thiery, J. P. (2012) «Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition», *Journal of Cell Science*, 125(19), pp. 4417-4422. doi: 10.1242/jcs.099697.
- Huang, T.-S. *et al.* (2015) «A Regulatory Network Involving β -Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling», *STEM CELLS*, 33(5), pp. 1419-1433. doi: 10.1002/stem.1944.
- Hudson, M. E. y Snyder, M. (2006) «High-throughput methods of regulatory element discovery», *BioTechniques*, 41(6), pp. 673-681. doi: 10.2144/000112322.
- Hynes, R. O. (2002) «Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.», *Cell*, 110(6), pp. 673-87. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
- Iglesias-Ara, A. *et al.* (2010) «Accelerated DNA replication in E2F1- and E2F2-deficient macrophages leads to induction of the DNA damage response and p21CIP1-dependent senescence», *Oncogene*, 29(41), pp. 5579-5590. doi: 10.1038/onc.2010.296.
- Iglesias-Ara, A. *et al.* (2015) «E2F1 and E2F2 prevent replicative stress and subsequent p53-dependent organ involution», *Cell Death & Differentiation*, 22(10), pp. 1577-1589. doi: 10.1038/cdd.2015.4.
- Iglesias, A. *et al.* (2004) «Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice», *Journal of Clinical Investigation*, 113(10), pp. 1398-1407. doi: 10.1172/JCI18879.
- Ikeda, M. A., Jakoi, L. y Nevins, J. R. (1996) «A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), pp. 3215-3220. doi: 10.1073/pnas.93.8.3215.
- Ikediobi, O. N. *et al.* (2006) «Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set», *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), pp. 2606-2612. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0433.
- Ikenouchi, J. *et al.* (2003) «Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition:

direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail», *Journal of Cell Science*, 116(10), pp. 1959-1967. doi: 10.1242/jcs.00389.

Ilyas, M. *et al.* (1997) «-Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), pp. 10330-10334. doi: 10.1073/pnas.94.19.10330.

Imai, T. *et al.* (2004) «Elevated expression of E-cadherin and α -, β -, and γ -catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas», *Human Pathology*, 35(12), pp. 1469-1476. doi: 10.1016/j.humpath.2004.09.014.

Infante, A. *et al.* (2008) «E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence.», *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(24), pp. 3915-27. doi: 10.4161/cc.7.24.7379.

Ishida, S. *et al.* (2001) «Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis», *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), pp. 4684-4699. doi: 10.1128/MCB.21.14.4684-4699.2001.

Ivanov, A. I. *et al.* (2005) «Differential Roles for Actin Polymerization and a Myosin II Motor in Assembly of the Epithelial Apical Junctional Complex», *Molecular Biology of the Cell*, 16(6), pp. 2636-2650. doi: 10.1091/mbc.e05-01-0043.

Iwano, M. *et al.* (2002) «Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis», *Journal of Clinical Investigation*, 110(3), pp. 341-350. doi: 10.1172/JCI15518.

Iwasaki, K. *et al.* (2018) «Chronic hypoxia-induced slug promotes invasive behavior of prostate cancer cells by activating expression of ephrin-B1», *Cancer Science*, 109(10), pp. 3159-3170. doi: 10.1111/cas.13754.

Jiang, W. *et al.* (2015) «CD44 Regulates Pancreatic Cancer Invasion through MT1-MMP», *Molecular Cancer Research*, 13(1), pp. 9-15. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0076.

Jin, M. *et al.* (2000) «Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha.», *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(13), pp. 4324-32.

Johnson, D. G. *et al.* (1993) «Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase», *Nature*, 365(6444), pp. 349-352. doi: 10.1038/365349a0.

Johnson, D. G., Ohtani, K. y Nevins, J. R. (1994) «Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression.», *Genes & Development*, 8(13), pp. 1514-1525. doi: 10.1101/gad.8.13.1514.

Johnson, J. L. *et al.* (2012) «Regulation of Matrix Metalloproteinase Genes by E2F Transcription Factors: Rb-Raf-1 Interaction as a Novel Target for Metastatic Disease», *Cancer Research*, 72(2), pp. 516-526. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2647.

Jorda, M. *et al.* (2005) «Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor», *Journal of Cell Science*, 118(15), pp. 3371-3385. doi: 10.1242/jcs.02465.

Ju, S.-Y., Chiou, S.-H. y Su, Y. (2014) «Maintenance of the stemness in CD44+ HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression», *Stem Cell Research*, 12(1), pp. 86-100. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.011.

Kalluri, R. y Weinberg, R. A. (2009) «The basics of epithelial-mesenchymal transition», *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104.

Kent, W. J. *et al.* (2002) «The Human Genome Browser at UCSC», *Genome Research*, 12(6), pp. 996-1006. doi: 10.1101/gr.229102.

Khew-Goodall, Y. y Wadham, C. (2005) «A Perspective on Regulation of Cell-Cell Adhesion and Epithelial-Mesenchymal Transition: Known and Novel», *Cells Tissues Organs*, 179(1-2), pp. 81-86. doi: 10.1159/000084512.

- Kidan, N. *et al.* (2017) «Ectopic Expression of Snail and Twist in Ph+ Leukemia Cells Upregulates CD44 Expression and Alters Their Differentiation Potential», *Journal of Cancer*, 8(19), pp. 3952-3968. doi: 10.7150/jca.19633.
- Kidd, M. E., Shumaker, D. K. y Ridge, K. M. (2013) «The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer», *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(1), p. 130827094923003. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.
- Kim, H. *et al.* (2012) «CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion», *International Journal of Oncology*, 41(1), pp. 211-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1453.
- Kim, M. y Jho, E.-H. (2014) «Cross-talk between Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways: a brief review.», *BMB reports*, 47(10), pp. 540-5. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.10.177.
- Kim, S. y Coulombe, P. A. (2007) «Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm», *Genes & Development*, 21(13), pp. 1581-1597. doi: 10.1101/gad.1552107.
- Kishida, S. *et al.* (1998) «Axin, a Negative Regulator of the Wnt Signaling Pathway, Directly Interacts with Adenomatous Polyposis Coli and Regulates the Stabilization of β -Catenin», *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), pp. 10823-10826. doi: 10.1074/jbc.273.18.10823.
- Kitagawa, M. *et al.* (1995) «Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2.», *Oncogene*, 10(2), pp. 229-36.
- Klarmann, G. J. *et al.* (2009) «Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature», *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(5), pp. 433-446. doi: 10.1007/s10585-009-9242-2.
- Knoll, S. *et al.* (2014) «E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation», *EMBO reports*, 15(12), pp. 1315-1329. doi: 10.15252/embr.201439392.
- Knutson, J. R. *et al.* (1996) «CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes.», *Molecular Biology of the Cell*, 7(3), pp. 383-396. doi: 10.1091/mbc.7.3.383.
- Koenig, A. *et al.* (2006) «Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells», *Cancer Research*, 66(9), pp. 4662-4671. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2804.
- Komiya, Y. *et al.* (2016) «The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition», *Oncogenesis*, 5(9), pp. e258-e258. doi: 10.1038/oncsis.2016.59.
- Korinek, V. *et al.* (1997) «Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC-/- Colon Carcinoma», *Science*, 275(5307), pp. 1784-1787. doi: 10.1126/science.275.5307.1784.
- Kovesdi, I., Reichel, R. y Nevins, J. R. (1986) «Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation», *Cell*, 45(2), pp. 219-228. doi: 10.1016/0092-8674(86)90386-7.
- Kowalczyk, A. P. y Nanes, B. A. (2012) «Adherens Junction Turnover: Regulating Adhesion Through Cadherin Endocytosis, Degradation, and Recycling», en *Sub-cellular biochemistry*, pp. 197-222. doi: 10.1007/978-94-007-4186-7_9.
- Koziczak, M., Krek, W. y Nagamine, Y. (2000) «Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1.», *Molecular and cellular biology*, 20(6), pp. 2014-22. doi: 10.1128/mcb.20.6.2014-2022.2000.
- KREK, W. *et al.* (1994) «Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase», *Cell*, 78(1), pp. 161-172. doi: 10.1016/0092-8674(94)90582-7.
- Krek, W., Xu, G. y Livingston, D. M. (1995) «Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint», *Cell*, 83(7), pp. 1149-1158. doi: 10.1016/0092-

8674(95)90141-8.

- Kumar, B. *et al.* (2015) «Auto-regulation of Slug mediates its activity during epithelial to mesenchymal transition», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(9), pp. 1209-1218. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.07.006.
- Laffin, B. *et al.* (2008) «Loss of Single-minded-2s in the Mouse Mammary Gland Induces an Epithelial-Mesenchymal Transition Associated with Up-Regulation of Slug and Matrix Metalloprotease 2», *Molecular and Cellular Biology*, 28(6), pp. 1936-1946. doi: 10.1128/MCB.01701-07.
- Lamouille, S. *et al.* (2012) «TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion», *Journal of Cell Science*, 125(5), pp. 1259-1273. doi: 10.1242/jcs.095299.
- Lamouille, S., Xu, J. y Derynck, R. (2014) «Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), pp. 178-196. doi: 10.1038/nrm3758.
- Lang, S. E. *et al.* (2001) «E2F Transcriptional Activation Requires TRRAP and GCN5 Cofactors», *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), pp. 32627-32634. doi: 10.1074/jbc.M102067200.
- Laresgoiti, U. *et al.* (2013) «E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes», *Nucleic Acids Research*, 41(22), pp. 10185-10198. doi: 10.1093/nar/gkt821.
- Latorre, I. *et al.* (2015) «The DREAM complex promotes gene body H2A.Z for target repression», *Genes & Development*, 29(5), pp. 495-500. doi: 10.1101/gad.255810.114.
- Lazzerini Denchi, E. y Helin, K. (2005) «E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis», *EMBO reports*, 6(7), pp. 661-668. doi: 10.1038/sj.embor.7400452.
- Lee, B.-K., Bhinge, A. A. y Iyer, V. R. (2011) «Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis», *Nucleic Acids Research*, 39(9), pp. 3558-3573. doi: 10.1093/nar/gkq1313.
- Lee, J. D. *et al.* (2007) «The FERM protein Epb4.115 is required for organization of the neural plate and for the epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak of the mouse embryo», *Development*, 134(11), pp. 2007-2016. doi: 10.1242/dev.000885.
- Lee, Yunhee *et al.* (2016) «TMPRSS4 induces invasion and proliferation of prostate cancer cells through induction of Slug and cyclin D1», *Oncotarget*, 7(31), pp. 50315-50332. doi: 10.18632/oncotarget.10382.
- Lees, J. A. *et al.* (1993) «The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors.», *Molecular and cellular biology*, 13(12), pp. 7813-25. doi: 10.1128/mcb.13.12.7813.
- Leggett, S. E. *et al.* (2016) «Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition.», *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 8(11), pp. 1133-1144. doi: 10.1039/c6ib00139d.
- Lei, Q.-Y. *et al.* (2008) «TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway», *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), pp. 2426-2436. doi: 10.1128/MCB.01874-07.
- Leone, G. *et al.* (1998) «E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase», *Genes & Development*, 12(14), pp. 2120-2130. doi: 10.1101/gad.12.14.2120.
- Leong, K. G. *et al.* (2007) «Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin», *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), pp. 2935-2948. doi: 10.1084/jem.20071082.
- Leung, J. Y. y Nevins, J. R. (2012) «E2F6 Associates with BRG1 in Transcriptional Regulation», *PLoS ONE*. Editado por F. Kashanchi, 7(10), p. e47967. doi: 10.1371/journal.pone.0047967.
- Li, C. *et al.* (2019) «HIF-1 α /VEGF signaling-mediated epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis is critically involved in anti-metastasis effect of luteolin in melanoma cells», *Phytotherapy Research*, 33(3), pp. 798-807. doi: 10.1002/ptr.6273.

- Li, J. *et al.* (2008) «Synergistic Function of E2F7 and E2F8 Is Essential for Cell Survival and Embryonic Development», *Developmental Cell*, 14(1), pp. 62-75. doi: 10.1016/j.devcel.2007.10.017.
- Li, Z. *et al.* (2014) «Differential regulation of MMPs by E2F1, Sp1 and NF-kappa B controls the small cell lung cancer invasive phenotype», *BMC Cancer*, 14(1), p. 276. doi: 10.1186/1471-2407-14-276.
- Liang, Y.-X. *et al.* (2016) «E2F1 promotes tumor cell invasion and migration through regulating CD147 in prostate cancer», *International Journal of Oncology*, 48(4), pp. 1650-1658. doi: 10.3892/ijo.2016.3364.
- Liban, T. J. *et al.* (2016) «Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family», *Journal of Molecular Biology*, 428(20), pp. 3960-3971. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.017.
- Lim, J. y Thiery, J. P. (2012) «Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development», *Development*, 139(19), pp. 3471-3486. doi: 10.1242/dev.071209.
- Lin, J.-C. *et al.* (2018) «The STAT3/Slug Axis Enhances Radiation-Induced Tumor Invasion and Cancer Stem-like Properties in Radioresistant Glioblastoma», *Cancers*, 10(12), p. 512. doi: 10.3390/cancers10120512.
- Lin, R.-Z. *et al.* (2006) «Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin», *Cell and Tissue Research*, 324(3), pp. 411-422. doi: 10.1007/s00441-005-0148-2.
- Lin, S. Y. *et al.* (1996) «Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction.», *Molecular and cellular biology*, 16(4), pp. 1668-75. doi: 10.1128/mcb.16.4.1668.
- Lin, Y. *et al.* (2017) «Stabilization of the transcription factors slug and twist by the deubiquitinase dub3 is a key requirement for tumor metastasis.», *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(43), pp. 75127-75140. doi: 10.18632/oncotarget.20561.
- Lindeman, G. J. *et al.* (1997) «The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), pp. 5095-5100. doi: 10.1073/pnas.94.10.5095.
- Litovchick, L. *et al.* (2007) «Evolutionarily Conserved Multisubunit RBL2/p130 and E2F4 Protein Complex Represses Human Cell Cycle-Dependent Genes in Quiescence», *Molecular Cell*, 26(4), pp. 539-551. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.015.
- Liu, B. *et al.* (2013) «Interaction of E2F7 Transcription Factor with E2F1 and C-terminal-binding Protein (CtBP) Provides a Mechanism for E2F7-dependent Transcription Repression», *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), pp. 24581-24589. doi: 10.1074/jbc.M113.467506.
- Liu, C.-Y. *et al.* (2015) «Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation», *Oncotarget*, 6(18), pp. 15966-83. doi: 10.18632/oncotarget.3862.
- Liu, C. *et al.* (2002) «Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.», *Cell*, 108(6), pp. 837-47. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00685-2.
- Liu, H. *et al.* (2017) «Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Morphology and Mechanical Properties of HCT116 Human Colon Cancer Cells Investigated by Atomic Force Microscopy», *Scanning*, 2017, pp. 1-7. doi: 10.1155/2017/2027079.
- Liu, W. *et al.* (2015) «The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets», *Oncotarget*, 6(34), pp. 35522-41. doi: 10.18632/oncotarget.5849.
- Liu, Y. *et al.* (2007) «The zinc finger transcription factor ZFX1A is linked to cell proliferation by Rb-E2F1», *Biochemical Journal*, 408(1), pp. 79-85. doi: 10.1042/BJ20070344.
- Liu, Z.-H., Dai, X.-M. y Du, B. (2015) «Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance.», *Cancer biology & therapy*. Taylor & Francis, 16(3), pp. 353-9. doi: 10.1080/15384047.2015.1016662.
- Livshits, G., Kobiak, A. y Fuchs, E. (2012) «Governing epidermal homeostasis by coupling cell-cell

- adhesion to integrin and growth factor signaling, proliferation, and apoptosis», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), pp. 4886-4891. doi: 10.1073/pnas.1202120109.
- Lochter, A. *et al.* (1997) «Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells», *The Journal of Cell Biology*, 139(7), pp. 1861-1872. doi: 10.1083/jcb.139.7.1861.
- Logan, C. Y. y Nusse, R. (2004) «THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE», *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp. 781-810. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Lokeshwar, B. L., Lokeshwar, V. B. y Block, N. L. (1995) «Expression of CD44 in prostate cancer cells: association with cell proliferation and invasive potential.», *Anticancer research*. International Institute of Anticancer Research, 15(4), pp. 1191-8.
- Luebke-Wheeler, J. L. *et al.* (2009) «E-Cadherin Protects Primary Hepatocyte Spheroids from Cell Death by a Caspase-Independent Mechanism», *Cell Transplantation*, 18(12), pp. 1281-1287. doi: 10.3727/096368909X474258.
- Lv, L. *et al.* (2016) «Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells», *Tumor Biology*, 37(7), pp. 8811-8824. doi: 10.1007/s13277-015-4755-6.
- Lv, Y. *et al.* (2017) «E2F8 is a Potential Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma», *Journal of Cancer*, 8(7), pp. 1205-1213. doi: 10.7150/jca.18255.
- Magae, J. *et al.* (1996) «Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members.», *Journal of cell science*, 109 (Pt 7), pp. 1717-26.
- Maiti, B. *et al.* (2005) «Cloning and Characterization of Mouse *E2F8*, a Novel Mammalian *E2F* Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation», *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp. 18211-18220. doi: 10.1074/jbc.M501410200.
- Maltzman, J. S., Carman, J. A. y Monroe, J. G. (1996) «Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes.», *Molecular and cellular biology*, 16(5), pp. 2283-94. doi: 10.1128/mcb.16.5.2283.
- Malumbres, M. y Barbacid, M. (2001) «To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer», *Nature Reviews Cancer*, 1(3), pp. 222-231. doi: 10.1038/35106065.
- Mamuya, F. A. y Duncan, M. K. (2012) « α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation», *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), pp. 445-455. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01419.x.
- Marchenko, G. N. *et al.* (2002) «Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin.», *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 363(Pt 2), pp. 253-62. doi: 10.1042/0264-6021:3630253.
- Margadant, C. y Sonnenberg, A. (2010) «Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing», *EMBO reports*, 11(2), pp. 97-105. doi: 10.1038/embor.2009.276.
- Marques, M. *et al.* (2010) «Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription», *Epigenetics*, 5(4), pp. 267-272. doi: 10.4161/epi.5.4.11520.
- Martin, T. A. *et al.* (2005) «Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer», *Annals of Surgical Oncology*, 12(6), pp. 488-496. doi: 10.1245/ASO.2005.04.010.
- Maschler, S. *et al.* (2005) «Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization», *Oncogene*, 24(12), pp. 2032-2041. doi: 10.1038/sj.onc.1208423.
- Mayol, X., Garriga, J. y Graña, X. (1995) «Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-

related protein p130.», *Oncogene*, 11(4), pp. 801-8.

McFarlane, S. *et al.* (2015) «CD44-mediated activation of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices», *Oncotarget*, 6(34), pp. 36762-73. doi: 10.18632/oncotarget.5461.

McGinnis, L. K. y Kinsey, W. H. (2015) «Role of focal adhesion kinase in oocyte-follicle communication», *Molecular Reproduction and Development*, 82(2), pp. 90-102. doi: 10.1002/mrd.22446.

Mendez, M. G., Kojima, S.-I. y Goldman, R. D. (2010) «Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition», *The FASEB Journal*, 24(6), pp. 1838-1851. doi: 10.1096/fj.09-151639.

Meng, W. y Takeichi, M. (2009) «Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), pp. a002899-a002899. doi: 10.1101/cshperspect.a002899.

Mikami, S. *et al.* (2015) «Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas», *International Journal of Cancer*, 136(7), pp. 1504-1514. doi: 10.1002/ijc.29137.

Mima, K. *et al.* (2013) «High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy», *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 20(4), pp. 429-434. doi: 10.1007/s00534-012-0580-0.

Mittal, V. (2018) «Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis», *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), pp. 395-412. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

Mitxelena, J. *et al.* (2016) «E2F7 regulates transcription and maturation of multiple microRNAs to restrain cell proliferation», *Nucleic Acids Research*, 44(12), pp. 5557-5570. doi: 10.1093/nar/gkw146.

Mitxelena, J. *et al.* (2018) «An E2F7-dependent transcriptional program modulates DNA damage repair and genomic stability», *Nucleic Acids Research*, 46(9), pp. 4546-4559. doi: 10.1093/nar/gky218.

Montesano, R. *et al.* (2005) «Tumour necrosis factor α confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells», *Journal of Cell Science*, 118(15), pp. 3487-3500. doi: 10.1242/jcs.02467.

Morin, P. J. *et al.* (1997) «Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC», *Science*, 275(5307), pp. 1787-1790. doi: 10.1126/science.275.5307.1787.

Morris, E. J. *et al.* (2008) «E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8.», *Nature*. NIH Public Access, 455(7212), pp. 552-6. doi: 10.1038/nature07310.

Moustakas, A. y Heldin, C.-H. (2005) «Non-Smad TGF- signals», *Journal of Cell Science*, 118(16), pp. 3573-3584. doi: 10.1242/jcs.02554.

Muller, H. *et al.* (2001) «E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis», *Genes & Development*, 15(3), pp. 267-285. doi: 10.1101/gad.864201.

Müller, H. *et al.* (1997) «Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization.», *Molecular and cellular biology*, 17(9), pp. 5508-20. doi: 10.1128/mcb.17.9.5508.

Murga, M. *et al.* (2001) «Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity.», *Immunity*, 15(6), pp. 959-70.

Myster, D. L. y Duronio, R. J. (2000) «To differentiate or not to differentiate?», *Current biology : CB*, 10(8), pp. R302-4. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00435-8.

Narasimha, A. M. *et al.* (2014) «Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation», *eLife*, 3. doi: 10.7554/eLife.02872.

Narita, Masashi *et al.* (2003) «Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence.», *Cell*, 113(6), pp. 703-16. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00401-x.

Narumiya, S., Tanji, M. y Ishizaki, T. (2009) «Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation,

- metastasis and invasion», *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), pp. 65-76. doi: 10.1007/s10555-008-9170-7.
- Nelson, W. J. (2009) «Remodeling Epithelial Cell Organization: Transitions Between Front-Rear and Apical-Basal Polarity», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(1), pp. a000513-a000513. doi: 10.1101/cshperspect.a000513.
- Nieto, M. *et al.* (1994) «Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene», *Science*, 264(5160), pp. 835-839. doi: 10.1126/science.7513443.
- Nieto, M. A. (2002) «The snail superfamily of zinc-finger transcription factors», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), pp. 155-166. doi: 10.1038/nrm757.
- Nieto, M. A. (2009) «Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives», *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8-9-10), pp. 1541-1547. doi: 10.1387/ijdb.072410mn.
- Nieto, M. A. *et al.* (2016) «EMT: 2016», *Cell*, 166(1), pp. 21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- Oda, H., Tsukita, S. y Takeichi, M. (1998) «Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during *Drosophila* Gastrulation», *Developmental Biology*, 203(2), pp. 435-450. doi: 10.1006/dbio.1998.9047.
- Ohtani, K., DeGregori, J. y Nevins, J. R. (1995) «Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), pp. 12146-12150. doi: 10.1073/pnas.92.26.12146.
- Onder, T. T. *et al.* (2008) «Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways», *Cancer Research*, 68(10), pp. 3645-3654. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.
- Ozdamar, B. *et al.* (2005) «Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity», *Science*, 307(5715), pp. 1603-1609. doi: 10.1126/science.1105718.
- Palka-Hamblin, H. L. *et al.* (2010) «Identification of β -catenin as a target of the intracellular tyrosine kinase PTK6», *Journal of Cell Science*, 123(2), pp. 236-245. doi: 10.1242/jcs.053264.
- Pan, C.-M. *et al.* (2016) «Oncostatin M suppresses metastasis of lung adenocarcinoma by inhibiting SLUG expression through coordination of STATs and PIASs signalings», *Oncotarget*, 7(37), pp. 60395-60406. doi: 10.18632/oncotarget.10939.
- Peinado, H., Olmeda, D. y Cano, A. (2007) «Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?», *Nature Reviews Cancer*, 7(6), pp. 415-428. doi: 10.1038/nrc2131.
- Peinado, H., Portillo, F. y Cano, A. (2004) «Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis», *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), pp. 365-375. doi: 10.1387/ijdb.041794hp.
- Peinado, H., Quintanilla, M. y Cano, A. (2003) «Transforming Growth Factor β -1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines», *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), pp. 21113-21123. doi: 10.1074/jbc.M211304200.
- Pennacchio, L. A. *et al.* (2007) «Predicting tissue-specific enhancers in the human genome.», *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(2), pp. 201-11. doi: 10.1101/gr.5972507.
- Perl, A.-K. *et al.* (1998) «A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma», *Nature*, 392(6672), pp. 190-193. doi: 10.1038/32433.
- Pino, M. S. *et al.* (2010) «Epithelial to Mesenchymal Transition Is Impaired in Colon Cancer Cells With Microsatellite Instability», *Gastroenterology*, 138(4), pp. 1406-1417. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.010.
- Pokutta, S. y Weis, W. I. (2007) «Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell

- Contacts», *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), pp. 237-261. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104241.
- Polager, S. *et al.* (2002) «E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis», *Oncogene*, 21(3), pp. 437-446. doi: 10.1038/sj.onc.1205102.
- Polager, S., Ofir, M. y Ginsberg, D. (2008) «E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes», *Oncogene*, 27(35), pp. 4860-4864. doi: 10.1038/onc.2008.117.
- Polioudaki, H. *et al.* (2015) «Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer», *BMC Cancer*, 15(1), p. 399. doi: 10.1186/s12885-015-1386-7.
- Pusapati, R. V. *et al.* (2009) «E2F2 suppresses Myc-induced proliferation and tumorigenesis», *Molecular Carcinogenesis*, 49(2), p. n/a-n/a. doi: 10.1002/mc.20584.
- Qin, X. Q. *et al.* (1995) «The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action.», *Molecular and cellular biology*, 15(2), pp. 742-55. doi: 10.1128/mcb.15.2.742.
- Qu, H., Sun, H. y Wang, X. (2018) «Neogenin-1 Promotes Cell Proliferation, Motility, and Adhesion by Up-Regulation of Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 Via Activating the Rac1/PI3K/AKT Pathway in Gastric Cancer Cells», *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(4), pp. 1457-1467. doi: 10.1159/000492255.
- Rabinovich, A. *et al.* (2008) «E2F in vivo binding specificity: Comparison of consensus versus nonconsensus binding sites», *Genome Research*, 18(11), pp. 1763-1777. doi: 10.1101/gr.080622.108.
- Radisky, E. S. y Radisky, D. C. (2010) «Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer», *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), pp. 201-212. doi: 10.1007/s10911-010-9177-x.
- Reinhold, M. I. *et al.* (2006) «The Wnt-inducible Transcription Factor Twist1 Inhibits Chondrogenesis», *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), pp. 1381-1388. doi: 10.1074/jbc.M504875200.
- Rembold, M. *et al.* (2014) «A conserved role for Snail as a potentiator of active transcription», *Genes & Development*, 28(2), pp. 167-181. doi: 10.1101/gad.230953.113.
- Ren, B. *et al.* (2002) «E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints.», *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(2), pp. 245-56. doi: 10.1101/gad.949802.
- Reynolds, A. B. (2007) «p120-catenin: Past and present», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(1), pp. 2-7. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.019.
- Robert, A., Hookway, C. y Gelfand, V. I. (2016) «Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters», *BioEssays*, 38(3), pp. 232-243. doi: 10.1002/bies.201500142.
- Rokavec, M. *et al.* (2014) «IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis», *Journal of Clinical Investigation*, 124(4), pp. 1853-1867. doi: 10.1172/JCI73531.
- Rosivatz, E. *et al.* (2002) «Differential Expression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Regulators Snail, SIP1, and Twist in Gastric Cancer», *The American Journal of Pathology*, 161(5), pp. 1881-1891. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64464-1.
- van Roy, F. y Berx, G. (2008) «The cell-cell adhesion molecule E-cadherin», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23), pp. 3756-3788. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1.
- Rubin, M. A. *et al.* (2001) «E-cadherin expression in prostate cancer: A broad survey using high-density tissue microarray technology», *Human Pathology*, 32(7), pp. 690-697. doi: 10.1053/hupa.2001.25902.
- Ruijtenberg, S. y van den Heuvel, S. (2016) «Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression», *Cell Cycle*, 15(2), pp.

196-212. doi: 10.1080/15384101.2015.1120925.

Saegusa, M. *et al.* (2009) «Requirement of the Akt/ β -Catenin Pathway for Uterine Carcinosarcoma Genesis, Modulating E-Cadherin Expression Through the Transactivation of Slug», *The American Journal of Pathology*, 174(6), pp. 2107-2115. doi: 10.2353/ajpath.2009.081018.

Sahai, E. (2007) «Illuminating the metastatic process», *Nature Reviews Cancer*, 7(10), pp. 737-749. doi: 10.1038/nrc2229.

Sahlgren, C. *et al.* (2008) «Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), pp. 6392-6397. doi: 10.1073/pnas.0802047105.

Sakai, D. *et al.* (2005) «Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by beta-catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling», *Development, Growth and Differentiation*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 47(7), pp. 471-482. doi: 10.1111/j.1440-169X.2005.00821.x.

Sánchez-Tilló, E. *et al.* (2011) «-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), pp. 19204-19209. doi: 10.1073/pnas.1108977108.

Sánchez-Tilló, E. *et al.* (2015) «ZEB1 and TCF4 reciprocally modulate their transcriptional activities to regulate Wnt target gene expression», *Oncogene*, 34(46), pp. 5760-5770. doi: 10.1038/onc.2015.352.

Sandelin, A., Wasserman, W. W. y Lenhard, B. (2004) «ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison.», *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 32(Web Server issue), pp. W249-52. doi: 10.1093/nar/gkh372.

Sardet, C. *et al.* (1995) «E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), pp. 2403-2407. doi: 10.1073/pnas.92.6.2403.

Savagner, P., Yamada, K. M. y Thiery, J. P. (1997) «The Zinc-Finger Protein Slug Causes Desmosome Dissociation, an Initial and Necessary Step for Growth Factor-induced Epithelial-Mesenchymal Transition», *The Journal of Cell Biology*, 137(6), pp. 1403-1419. doi: 10.1083/jcb.137.6.1403.

Schatoff, E. M., Leach, B. I. y Dow, L. E. (2017) «WNT Signaling and Colorectal Cancer», *Current Colorectal Cancer Reports*, 13(2), pp. 101-110. doi: 10.1007/s11888-017-0354-9.

von Schlippe, M. *et al.* (2000) «Functional interaction between E-cadherin and α v-containing integrins in carcinoma cells.», *Journal of cell science*, 113 (Pt 3), pp. 425-37.

Schlisio, S. *et al.* (2002) «Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function.», *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 21(21), pp. 5775-86. doi: 10.1093/emboj/cdf577.

Schmit, F. *et al.* (2007) «LINC, a Human Complex That is Related to pRB-Containing Complexes in Invertebrates Regulates the Expression of G₂/M Genes», *Cell Cycle*, 6(15), pp. 1903-1913. doi: 10.4161/cc.6.15.4512.

Schneider, M. R. *et al.* (2010) «A Key Role for E-cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation», *PLoS ONE*. Editado por H. Algül, 5(12), p. e14325. doi: 10.1371/journal.pone.0014325.

Schneider, M. R. y Kolligs, F. T. (2015) «E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: Insights from mouse models», *BioEssays*, 37(3), pp. 294-304. doi: 10.1002/bies.201400141.

Sears, R., Ohtani, K. y Nevins, J. R. (1997) «Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals.», *Molecular and cellular biology*, 17(9), pp. 5227-35. doi: 10.1128/mcb.17.9.5227.

Senbanjo, L. T. y Chellaiah, M. A. (2017) «CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.

- Serrill, J. D., Sander, M. y Shih, H. P. (2018) «Pancreatic Exocrine Tissue Architecture and Integrity are Maintained by E-cadherin During Postnatal Development», *Scientific Reports*, 8(1), p. 13451. doi: 10.1038/s41598-018-31603-2.
- Sethi, G., Sung, B. y Aggarwal, B. B. (2008) «TNF: a master switch for inflammation to cancer.», *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, pp. 5094-107.
- Shih, J.-Y. y Yang, P.-C. (2011) «The EMT regulator slug and lung carcinogenesis», *Carcinogenesis*, 32(9), pp. 1299-1304. doi: 10.1093/carcin/bgr110.
- Shiomi, M. *et al.* (2006) «Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients», *British Journal of Cancer*, 94(12), pp. 1816-1822. doi: 10.1038/sj.bjc.6603193.
- Shirakihara, T., Saitoh, M. y Miyazono, K. (2007) «Differential Regulation of Epithelial and Mesenchymal Markers by δ EF1 Proteins in Epithelial–Mesenchymal Transition Induced by TGF- β », *Molecular Biology of the Cell*. Editado por C.-H. Heldin, 18(9), pp. 3533-3544. doi: 10.1091/mbc.e07-03-0249.
- Singh, S. *et al.* (2002) «ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis.», *Current drug targets*, 3(5), pp. 359-67.
- Slansky, J. E. *et al.* (1993) «A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter.», *Molecular and cellular biology*, 13(3), pp. 1610-8. doi: 10.1128/mcb.13.3.1610.
- Smyrek, I. *et al.* (2019) «E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity», *Biology Open*, 8(1), p. bio037051. doi: 10.1242/bio.037051.
- Son, H.-J. y Moon, A. (2010) «Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion», *Toxicological Research*, 26(4), pp. 245-252. doi: 10.5487/TR.2010.26.4.245.
- Stadler, M. *et al.* (2018) «Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells», *Scientific Reports*, 8(1), p. 1151. doi: 10.1038/s41598-018-19384-0.
- Stanalle, J. *et al.* (2002) «Gene expression changes in response to E2F1 activation», *Nucleic Acids Research*, 30(8), pp. 1859-1867. doi: 10.1093/nar/30.8.1859.
- Stankic, M. *et al.* (2013) «TGF- β -Id1 Signaling Opposes Twist1 and Promotes Metastatic Colonization via a Mesenchymal-to-Epithelial Transition», *Cell Reports*, 5(5), pp. 1228-1242. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.014.
- Di Stefano, L., Jensen, M. R. y Helin, K. (2003) «E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes», *The EMBO Journal*, 22(23), pp. 6289-6298. doi: 10.1093/emboj/cdg613.
- Stemmler, M. P. *et al.* (2019a) «Non-redundant functions of EMT transcription factors», *Nature Cell Biology*, 21(1), pp. 102-112. doi: 10.1038/s41556-018-0196-y.
- Stemmler, M. P. *et al.* (2019b) «Non-redundant functions of EMT transcription factors», *Nature Cell Biology*, 21(1), pp. 102-112. doi: 10.1038/s41556-018-0196-y.
- Stone, R. C. *et al.* (2016) «Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis», *Cell and Tissue Research*, 365(3), pp. 495-506. doi: 10.1007/s00441-016-2464-0.
- Sun, B. O. *et al.* (2015) «Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression.», *Biomedical reports*. Spandidos Publications, 3(5), pp. 603-610. doi: 10.3892/br.2015.494.
- Sun, J. *et al.* (2017) «GOLPH3 induces epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling pathway in epithelial ovarian cancer», *Cancer Medicine*, 6(4), pp. 834-844. doi: 10.1002/cam4.1040.
- Sun, X. y Liu, Y. (2017) «Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway may contribute to cervical

- cancer pathogenesis via upregulation of Twist», *Oncology Letters*, 14(4), pp. 4841-4844. doi: 10.3892/ol.2017.6754.
- Symowicz, J. *et al.* (2007) «Engagement of Collagen-Binding Integrins Promotes Matrix Metalloproteinase-9–Dependent E-Cadherin Ectodomain Shedding in Ovarian Carcinoma Cells», *Cancer Research*, 67(5), pp. 2030-2039. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2808.
- Takada, Y., Ye, X. y Simon, S. (2007) «The integrins», *Genome Biology*, 8(5), p. 215. doi: 10.1186/gb-2007-8-5-215.
- Takahashi, M. *et al.* (2002) «Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers», *Oncogene*, 21(38), pp. 5861-5867. doi: 10.1038/sj.onc.1205755.
- Takahashi, Y., Rayman, J. B. y Dynlacht, B. D. (2000) «Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression.», *Genes & development*, 14(7), pp. 804-16.
- Taki, M. *et al.* (2006) «Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells.», *International journal of oncology*, 28(2), pp. 487-96.
- Talluri, S. y Dick, F. A. (2012) «Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere», *Cell Cycle*, 11(17), pp. 3189-3198. doi: 10.4161/cc.21263.
- Tanaka, N. *et al.* (2017) «APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer», *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(4), pp. 752-762. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0578.
- Tanaka, S. *et al.* (2016) «Snail1 expression in human colon cancer DLD-1 cells confers invasive properties without N-cadherin expression», *Biochemistry and Biophysics Reports*, 8, pp. 120-126. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.08.017.
- Taneyhill, L. A. (2008) «To adhere or not to adhere», *Cell Adhesion & Migration*, 2(4), pp. 223-230. doi: 10.4161/cam.2.4.6835.
- Tanno, B. *et al.* (2010) «Expression of Slug Is Regulated by c-Myb and Is Required for Invasion and Bone Marrow Homing of Cancer Cells of Different Origin», *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), pp. 29434-29445. doi: 10.1074/jbc.M109.089045.
- Tate, J. G. *et al.* (2019) «COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer», *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D941-D947. doi: 10.1093/nar/gky1015.
- Taubert, S. *et al.* (2004) «E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1.», *Molecular and cellular biology*, 24(10), pp. 4546-56. doi: 10.1128/mcb.24.10.4546-4556.2004.
- La Thangue, N. B. (1994) «DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control.», *Current opinion in cell biology*, 6(3), pp. 443-50.
- Theveneau, E. y Mayor, R. (2012) «Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells», *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), pp. 677-684. doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.002.
- Thiery, J. P. (2002) «Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression», *Nature Reviews Cancer*, 2(6), pp. 442-454. doi: 10.1038/nrc822.
- Thiery, J. P. *et al.* (2009) «Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease», *Cell*, 139(5), pp. 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Thiery, J. P. y Sleeman, J. P. (2006) «Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), pp. 131-142. doi: 10.1038/nrm1835.
- Thomassen, M., Tan, Q. y Kruse, T. A. (2008) «Gene expression meta-analysis identifies metastatic

pathways and transcription factors in breast cancer», *BMC Cancer*, 8(1), p. 394. doi: 10.1186/1471-2407-8-394.

Thurlings, I. *et al.* (2017) «Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer», *Oncogene*, 36(6), pp. 829-839. doi: 10.1038/onc.2016.251.

Toyama-Sorimachi, N. *et al.* (1995) «A Novel Ligand for CD44 Is Serglycin, a Hematopoietic Cell Lineage-specific Proteoglycan», *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7437-7444. doi: 10.1074/jbc.270.13.7437.

Trapnell, C., Pachter, L. y Salzberg, S. L. (2009) «TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq», *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1105-1111. doi: 10.1093/bioinformatics/btp120.

Trimarchi, J. M. *et al.* (2001) «The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), pp. 1519-1524. doi: 10.1073/pnas.041597698.

Trimarchi, J. M. y Lees, J. A. (2002) «Sibling rivalry in the E2F family», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(1), pp. 11-20. doi: 10.1038/nrm714.

Trouche, D. *et al.* (1997) «RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), pp. 11268-11273. doi: 10.1073/pnas.94.21.11268.

Trouche, D. y Kouzarides, T. (1996) «E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), pp. 1439-1442. doi: 10.1073/pnas.93.4.1439.

Uchida, C. (2016) «Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures», *BioMed Research International*, 2016, pp. 1-11. doi: 10.1155/2016/5959721.

Uchikado, Y. *et al.* (2005) «Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.», *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(3), pp. 1174-80.

Valdez, C. D. *et al.* (2011) «Repression of androgen receptor transcription through the E2F1/DNMT1 axis.», *PLoS one*. Editado por D. G. Tang, 6(9), p. e25187. doi: 10.1371/journal.pone.0025187.

Vandewalle, C. *et al.* (2005) «SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions», *Nucleic Acids Research*, 33(20), pp. 6566-6578. doi: 10.1093/nar/gki965.

Varelas, X. (2014) «The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease», *Development*, 141(8), pp. 1614-1626. doi: 10.1242/dev.102376.

Vasaikar, S. *et al.* (2019) «Proteogenomic Analysis of Human Colon Cancer Reveals New Therapeutic Opportunities», *Cell*, 177(4), pp. 1035-1049.e19. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.030.

Verfaillie, C. M. *et al.* (1994) «Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor.», *Blood*, 84(6), pp. 1802-11.

Verona, R. *et al.* (1997) «E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization.», *Molecular and cellular biology*, 17(12), pp. 7268-82. doi: 10.1128/mcb.17.12.7268.

Vesuna, F. *et al.* (2008) «Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), pp. 235-241. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.151.

Wang, H. *et al.* (2013) «Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) Induced by TNF- α Requires AKT/GSK-3 β -Mediated Stabilization of Snail in Colorectal Cancer», *PLoS ONE*. Editado por S. P. Chellappan, 8(2), p. e56664. doi: 10.1371/journal.pone.0056664.

Wang, H. *et al.* (2014) «LIM and SH3 Protein 1 Induces TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal

- Transition in Human Colorectal Cancer by Regulating S100A4 Expression», *Clinical Cancer Research*, 20(22), pp. 5835-5847. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0485.
- Wang, T. *et al.* (2017) «Transcription factor E2F1 promotes EMT by regulating ZEB2 in small cell lung cancer», *BMC Cancer*, 17(1), p. 719. doi: 10.1186/s12885-017-3701-y.
- Wang, Y. *et al.* (2017) «Upregulated LAMB3 increases proliferation and metastasis in thyroid cancer», *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, pp. 37-46. doi: 10.2147/OTT.S149613.
- Way, T.-D. *et al.* (2014) «Emodin represses TWIST1-induced epithelial–mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways», *European Journal of Cancer*, 50(2), pp. 366-378. doi: 10.1016/j.ejca.2013.09.025.
- Weber, G. F. *et al.* (1996) «Receptor-Ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1)», *Science*, 271(5248), pp. 509-512. doi: 10.1126/science.271.5248.509.
- Weber, G. F., Bjerke, M. A. y DeSimone, D. W. (2011) «Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks», *Journal of Cell Science*, 124(8), pp. 1183-1193. doi: 10.1242/jcs.064618.
- Weinberg, R. A. (1995) «The retinoblastoma protein and cell cycle control», *Cell*, 81(3), pp. 323-330. doi: 10.1016/0092-8674(95)90385-2.
- Weinmann, A. S. *et al.* (2001) «Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters.», *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 21(20), pp. 6820-32. doi: 10.1128/MCB.21.20.6820-6832.2001.
- Weinmann, A. S. *et al.* (2002) «Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis», *Genes & Development*, 16(2), pp. 235-244. doi: 10.1101/gad.943102.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A. y Dean, D. C. (1992) «Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element», *Nature*, 358(6383), pp. 259-261. doi: 10.1038/358259a0.
- Wells, J. *et al.* (2000) «Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells.», *Molecular and cellular biology*, 20(16), pp. 5797-807. doi: 10.1128/mcb.20.16.5797-5807.2000.
- Westendorp, B. *et al.* (2012) «E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression», *Nucleic Acids Research*, 40(8), pp. 3511-3523. doi: 10.1093/nar/gkr1203.
- Wheelock, M. J. *et al.* (2008) «Cadherin switching», *Journal of Cell Science*, 121(6), pp. 727-735. doi: 10.1242/jcs.000455.
- Wildrick, D. M. y Boman, B. M. (1994) «Does the human retinoblastoma gene have a role in colon cancer?», *Molecular carcinogenesis*, 10(1), pp. 1-7.
- Wong, T.-S., Gao, W. y Chan, J. Y.-W. (2014) «Transcription Regulation of E-Cadherin by Zinc Finger E-Box Binding Homeobox Proteins in Solid Tumors», *BioMed Research International*, 2014, pp. 1-10. doi: 10.1155/2014/921564.
- Wu, D. y Pan, W. (2010) «GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling», *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), pp. 161-168. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.002.
- Wu, K. *et al.* (2013) «Silibinin inhibits β -catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial–mesenchymal transition and stemness», *Cellular Signalling*, 25(12), pp. 2625-2633. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.028.
- Wu, W.-S. *et al.* (2017) «Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP 9 and ZEB1», *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 17753. doi: 10.1038/s41598-017-18101-7.
- Wu, Y. *et al.* (2009) «Stabilization of Snail by NF- κ B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion», *Cancer Cell*, 15(5), pp. 416-428. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.016.

- Wu, Y. *et al.* (2012) «Expression of Wnt3 Activates Wnt/ -Catenin Pathway and Promotes EMT-like Phenotype in Trastuzumab-Resistant HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells», *Molecular Cancer Research*, 10(12), pp. 1597-1606. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0155-T.
- Wu, Y. y Zhou, B. P. (2010) «TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion», *British Journal of Cancer*, 102(4), pp. 639-644. doi: 10.1038/sj.bjc.6605530.
- Wu, Z. *et al.* (2011) «E2F1 suppresses Wnt/ β -catenin activity through transactivation of β -catenin interacting protein ICAT», *Oncogene*, 30(37), pp. 3979-3984. doi: 10.1038/onc.2011.129.
- Xiao, C., Wu, C.-H. y Hu, H.-Z. (2016) «LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/beta-catenin signaling pathway.», *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(13), pp. 2819-24.
- Xiao, K. *et al.* (2003) «Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells», *The Journal of Cell Biology*, 163(3), pp. 535-545. doi: 10.1083/jcb.200306001.
- Xie, W. *et al.* (2009) «E2F1 represses β -catenin/TCF activity by direct up-regulation of Siah1», *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), pp. 1719-1727. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00423.x.
- Xu, H. *et al.* (2015) «The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development.», *OncoTargets and therapy*. Dove Press, 8, pp. 3783-92. doi: 10.2147/OTT.S95470.
- Xu, J., Lamouille, S. y Derynck, R. (2009) «TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition», *Cell Research*, 19(2), pp. 156-172. doi: 10.1038/cr.2009.5.
- Xu, M. *et al.* (1994) «Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation.», *Molecular and cellular biology*, 14(12), pp. 8420-31. doi: 10.1128/mcb.14.12.8420.
- Xu, X. *et al.* (2007) «A comprehensive ChIP chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members», *Genome Research*, 17(11), pp. 1550-1561. doi: 10.1101/gr.6783507.
- Xu, Y. y Yu, Q. (2003) «E-cadherin Negatively Regulates CD44-Hyaluronan Interaction and CD44-mediated Tumor Invasion and Branching Morphogenesis», *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp. 8661-8668. doi: 10.1074/jbc.M208181200.
- Yamada, M. *et al.* (2002) «A 63-Base Pair DNA Segment Containing an Sp1 Site but Not a Canonical E2F Site Can Confer Growth-dependent and E2F-mediated Transcriptional Stimulation of the Human ASK Gene Encoding the Regulatory Subunit for Human Cdc7-related Kinase», *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), pp. 27668-27681. doi: 10.1074/jbc.M202884200.
- Yamamoto, H. *et al.* (1999) «Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis.», *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5(7), pp. 1805-15.
- Yang, J. *et al.* (2006) «Adenomatous Polyposis Coli (APC) Differentially Regulates β -Catenin Phosphorylation and Ubiquitination in Colon Cancer Cells», *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), pp. 17751-17757. doi: 10.1074/jbc.M600831200.
- Yang, M.-H. *et al.* (2008) «Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis», *Nature Cell Biology*, 10(3), pp. 295-305. doi: 10.1038/ncb1691.
- Yang, M. *et al.* (2013) «A double-negative feedback loop between Wnt- β -catenin signaling and HNF4 α regulates epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma», *Journal of Cell Science*, 126(24), pp. 5692-5703. doi: 10.1242/jcs.135053.
- Yang, W. *et al.* (2018) «SETDB1 induces epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma by directly binding with Snail promoter», *Oncology Reports*, 41(2), pp. 1284-1292. doi: 10.3892/or.2018.6871.

- Yang, Y., Wu, J. y Wang, J. (2016) *A database and functional annotation of NF- κ B target genes*, *Int J Clin Exp Med*.
- Yao, C. *et al.* (2016) «IGF/STAT3/NANOG/Slug Signaling Axis Simultaneously Controls Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness Maintenance in Colorectal Cancer», *STEM CELLS*, 34(4), pp. 820-831. doi: 10.1002/stem.2320.
- Yao, D., Dai, C. y Peng, S. (2011) «Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation», *Molecular Cancer Research*, 9(12), pp. 1608-1620. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0568.
- Yao, G. *et al.* (2008) «A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point», *Nature Cell Biology*, 10(4), pp. 476-482. doi: 10.1038/ncb1711.
- Yilmaz, M. y Christofori, G. (2009) «EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion», *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), pp. 15-33. doi: 10.1007/s10555-008-9169-0.
- Yin, X., DeWille, J. W. y Hai, T. (2008) «A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development», *Oncogene*, 27(15), pp. 2118-2127. doi: 10.1038/sj.onc.1210861.
- Yokoyama, K. *et al.* (2003) «Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas.», *International journal of oncology*, 22(4), pp. 891-8.
- Yook, J. I. *et al.* (2005) «Wnt-dependent Regulation of the E-cadherin Repressor Snail», *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), pp. 11740-11748. doi: 10.1074/jbc.M413878200.
- Yoon, S.-O., Shin, S. y Mercurio, A. M. (2006) «Ras Stimulation of E2F Activity and a Consequent E2F Regulation of Integrin $\alpha_6 \beta_4$ Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells», *Cancer Research*, 66(12), pp. 6288-6295. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0826.
- Young, A. P., Nagarajan, R. y Longmore, G. D. (2003) «Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway», *Oncogene*, 22(46), pp. 7209-7217. doi: 10.1038/sj.onc.1206804.
- Yu, D. *et al.* (2014) «miR-106b modulates cancer stem cell characteristics through TGF- β /Smad signaling in CD44-positive gastric cancer cells», *Laboratory Investigation*, 94(12), pp. 1370-1381. doi: 10.1038/labinvest.2014.125.
- Yu, G. *et al.* (2014) «MicroRNA-34a functions as an anti-metastatic microRNA and suppresses angiogenesis in bladder cancer by directly targeting CD44», *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), p. 779. doi: 10.1186/s13046-014-0115-4.
- Yu, L. *et al.* (2014) «Tumor necrosis factor α induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF- κ B signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer», *Oncology Reports*, 31(1), pp. 321-327. doi: 10.3892/or.2013.2841.
- Yu, M. *et al.* (2015) «In PC3 prostate cancer cells ephrin receptors crosstalk to β 1-integrins to strengthen adhesion to collagen type I», *Scientific Reports*, 5(1), p. 8206. doi: 10.1038/srep08206.
- Yu, M. *et al.* (2018) «YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting Slug transcription via the transcription co-factor TEAD», *Cell Death & Disease*. Nature Publishing Group, 9(5). doi: 10.1038/S41419-018-0515-Z.
- Yu, Q. *et al.* (2010) «Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma», *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), p. 119. doi: 10.1186/1756-9966-29-119.
- Zalmas, L.-P. *et al.* (2013) «E2F-7 couples DNA damage-dependent transcription with the DNA repair process», *Cell Cycle*, 12(18), pp. 3037-3051. doi: 10.4161/cc.26078.
- Zalmas, L. P. *et al.* (2008) «DNA-damage response control of E2F7 and E2F8», *EMBO reports*, 9(3), pp. 252-259. doi: 10.1038/sj.embor.7401158.

- Zhan, J. *et al.* (2019) «HOXB13 networking with ABCG1/EZH2/Slug mediates metastasis and confers resistance to cisplatin in lung adenocarcinoma patients», *Theranostics*, 9(7), pp. 2084-2099. doi: 10.7150/thno.29463.
- Zhang, H. *et al.* (2009) «TEAD Transcription Factors Mediate the Function of TAZ in Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition», *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp. 13355-13362. doi: 10.1074/jbc.M900843200.
- Zhang, L. *et al.* (2010) «Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration», *FEBS Letters*, 584(22), pp. 4646-4654. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.038.
- Zhang, P. *et al.* (2017) «A Balance of Yki/Sd Activator and E2F1/Sd Repressor Complexes Controls Cell Survival and Affects Organ Size», *Developmental Cell*, 43(5), pp. 603-617.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.033.
- Zhang, Y.-L. *et al.* (2017) «Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion.», *Cancer biology & medicine*. Chinese Anti-Cancer Association, 14(1), pp. 90-99. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0086.
- Zhao, B. *et al.* (2008) «TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control», *Genes & Development*, 22(14), pp. 1962-1971. doi: 10.1101/gad.1664408.
- Zhao, L.-J. *et al.* (2014) «CtBP2 proteome: Role of CtBP in E2F7-mediated repression and cell proliferation», *Genes & Cancer*, 5(1-2), p. 31. doi: 10.18632/genesandcancer.2.
- Zheng, H. y Kang, Y. (2014) «Multilayer control of the EMT master regulators», *Oncogene*, 33(14), pp. 1755-1763. doi: 10.1038/onc.2013.128.
- Zohn, I. E. *et al.* (2006) «p38 and a p38-Interacting Protein Are Critical for Downregulation of E-Cadherin during Mouse Gastrulation», *Cell*, 125(5), pp. 957-969. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.048.

8. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

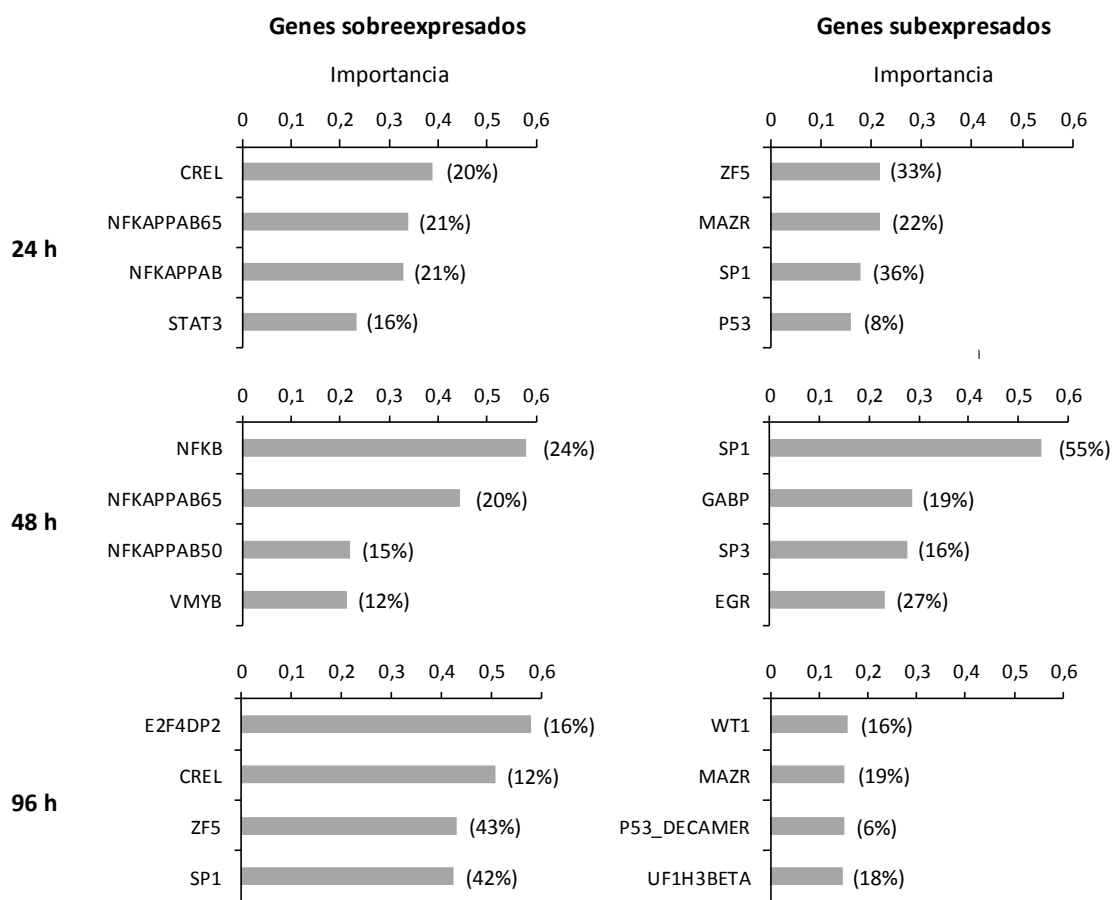


Figura suplementaria 1: Enriquecimiento de motivos de unión de factores de transcripción (TFBS) en las regiones promotoras de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con TNF α . El análisis se llevó a cabo con la herramienta informática DiRE. El eje X representa la *importancia* de cada TFBS, mientras que la *presencia* se representa entre paréntesis al lado de cada barra. Se representan únicamente los cuatro TFBS con mayor *importancia*.

Tabla suplementaria 1: Procesos biológicos enriquecidos en el conjunto de genes diferencialmente expresados en la condición experimental siE2F1/2. Detalle de la **Tabla 11**. Se incluyen las funciones biológicas enriquecidas (términos), su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE), significación estadística (p, puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado) y los genes pertenecientes a cada función biológica enriquecida.

24 horas - Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes
División celular	2,3	1,00E-04	ARF6, ASPM, BORA, BRCA2, CCND3, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CENPF, CKAP2, CNTRL, E2F7, FBXO5, HELLS, KIF14, NEDD1, NEK2, NUF2, RAB10, RALA, ROPN1B, SMC4, TOP2A, WEE1, WNT3A
Transición de fase del ciclo celular	2,1	1,50E-03	BORA, CACUL1, CCNE2, CCP110, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPF, CEP152, CNTRL, DLGAP5, E2F1, E2F7, FBXO5, HMMR, KIF14, NBN, NEDD1, NEK2, PIM1, RRM2, SKP2, WEE1
Proceso relacionado con microtúbulos	2,1	7,70E-04	ASPM, BIRC3, BRCA2, CCP110, CCSAP, CDK1, CEP120, CEP152, CHORDC1, CKAP2, CLIP1, CLIP3, CNTLN, DLGAP5, DST, FBXO5, GAS2L3, KIF14, KPNB1, LAMP1, MZT1, NEK2, NIN, SPAG1, SSX2IP, WEE1, WNT3A
Proceso mitótico	2	7,50E-05	ASPM, BANF1, BIRC3, BORA, CACUL1, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPF, CEP152, CKAP2, CLIP1, CNTRL, DLGAP5, E2F1, E2F7, FBXO5, HELLS, HMMR, KIF14, KPNB1, MZT1, NBN, NEDD1, NEK2, NUF2, PBK, PIM1, REC8, RRM2, SKP2, SMC4, TOP2A, WEE1
Desarrollo cerebral	1,9	3,10E-03	ACTB, ASPM, BRCA2, CD9, CDK6, CENPF, CEP120, DMBX1, E2F1, FZD6, HES1, ISL1, KIF14, MAFB, MAOB, MAPKAP1, NRP2, OGDH, PADI2, PAFAH1B2, PGAP1, POMK, ROBO2, SMAD9, SSBP3, WNT3A, YWHAH
Desarrollo de órgano hematopoyético o linfoide	1,8	2,40E-03	ANXA2, BRCA2, BTK, CBFEB, CDK6, CEBPA, CIAPIN1, DLL4, EPB42, ESCO2, HDAC9, HES1, HMGB2, IL18R1, KITLG, KLF2, MAFB, MKNK2, OSTM1, PIK3R1, PIP4K2A, PTPRZ1, PYGO1, RC3H2, RTKN2, SSBP3, TMEM64, TOP2A, TPD52, WNT3A
Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,8	7,60E-03	ANXA2, ARF6, ATAD2, CCP110, CENPF, CKAP2, CLIP3, EPHA4, FBXO5, KIF14, NBN, NEK2, NTN1, PAQR3, PINK1, PPIF, ROBO2, SACS, SEMA3D, SEMA3E, THBS1, TMSB4X, WNT3A, YWHAH
24 horas – Genes sobrexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Respuesta a sustrato inorgánico	3,7	2,00E-02	AKR1C3, KLF2, MAOB, MET, NDRG1, PINK1
Regulación del transporte transmembrana	3,6	4,70E-02	DMD, DPP6, KCNIP4, OPR1, SCN4B
Desarrollo de estructuras tubulares	3,5	1,30E-02	CHI3L1, IGFBP5, KLF2, MET, NTN1, ROBO2, TNC

Respuesta a hormona	2,7	2,40E-02	AKR1C3, IGFBP5, MAOB, PADI2, PTPN1, REN, ROBO2, TNC
Regulación negativa de transducción de señal	2,7	9,90E-03	DMD, GATSL2, IGFBP5, IL1R2, MAPKAP1, PADI2, PINK1, PODNL1, PTPN1, SERPINE1
Regulación negativa de la respuesta a estímulos	2,6	5,30E-03	DMD, GATSL2, IGFBP5, IL1R2, MAPKAP1, MET, PADI2, PINK1, PODNL1, PTPN1, ROBO2, SERPINE1
Regulación negativa de la comunicación celular	2,5	1,60E-02	DMD, GATSL2, IGFBP5, IL1R2, MAPKAP1, PADI2, PINK1, PODNL1, PTPN1, SERPINE1
24 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Division celular	2,6	1,40E-05	ARF6, ASPM, BORA, BRCA2, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CENPF, CKAP2, CNTRL, E2F7, FBXO5, HELLS, KIF14, NEDD1, NEK2, NUF2, RAB10, RALA, ROPN1B, SMC4, TOP2A, WEE1, WNT3A
Transición de fase del ciclo celular	2,5	1,30E-04	BORA, CACUL1, CCNE2, CCP110, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPF, CEP152, CNTRL, DLGAP5, E2F1, E2F7, FBXO5, HMMR, KIF14, NBN, NEDD1, NEK2, PIM1, RRM2, SKP2, WEE1
Proceso relacionado con microtúbulos	2,4	4,80E-05	ASPM, BIRC3, BRCA2, CCP110, CCSAP, CDK1, CEP120, CEP152, CHORDC1, CKAP2, CLIP1, CLIP3, CNTLN, DLGAP5, DST, FBXO5, GAS2L3, KIF14, KPNB1, LAMP1, MZT1, NEK2, NIN, SPAG1, SSSX2IP, WEE1, WNT3A
Proceso mitótico	2,3	3,70E-06	ASPM, BIRC3, BORA, CACUL1, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPF, CEP152, CKAP2, CLIP1, CNTRL, DLGAP5, E2F1, E2F7, FBXO5, HELLS, HMMR, KIF14, KPNB1, MZT1, NBN, NEDD1, NEK2, NUF2, PBK, PIM1, REC8, RRM2, SKP2, SMC4, TOP2A, WEE1
Regulación del ciclo celular	2	1,40E-04	ANGEL2, ASPM, BORA, BRCA2, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CEBPA, CENPF, CEP120, CHORDC1, DLGAP5, E2F1, E2F2, E2F7, FBXO5, HES1, KIF14, LIN54, LIN9, MFN2, NBN, NEK2, PGGT1B, PIM1, SKP2, THBS1, TOP2A, TSPYL2, WEE1
Ciclo celular	2	5,10E-07	ANGEL2, ARF6, ASPM, BIRC3, BORA, BRCA2, CACUL1, CCAR1, CCNE2, CCP110, CCSAP, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, CEBPA, CENPF, CENPQ, CEP120, CEP152, CHORDC1, CKAP2, CLIP1, CLOCK, CNTRL, DLGAP5, E2F1, E2F2, E2F7, ESCO2, FBXO5, HELLS, HES1, HMMR, KIF14, KPNB1, LIN54, LIN9, MFN2, MKI67, MZT1, NBN, NEDD1, NEK2, NUF2, PBK, PGGT1B, PIM1, PRDM5, RALA, REC8, ROPN1B, RRM2, SKP2, SMC4, THBS1, TOP2A, TSPYL2, WEE1
Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,9	8,40E-03	ANXA2, ARF6, ATAD2, CCP110, CENPF, CKAP2, CLIP3, EPHA4, FBXO5, KIF14, NBN, NEK2, PAQR3, PPIF, SACS, SEMA3D, SEMA3E, THBS1, TMSB4X, WNT3A, YWHAH
48 horas – Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes

Establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular	2,8	2,30E-08	ACTR3, ARF4, ARF6, CAP1, CDC42, CLIC4, CTNNA1, DYNLT1, FERMT1, FSCN1, FSCN3, GBF1, GOLPH3, GPSM2, HES1, ILK, KIF2C, LIN7C, LLLG2, MAP1B, MAP4, MAP7, MAPKAP1, MPP7, MSN, MYH9, MYO18A, NDE1, NUMA1, PARD6B, PARVA, PTK2, PTK7, RAB10, RAP1B, SDCCAG8, SLC9A3R1, WEE1
Organización de las uniones celulares	2,2	1,70E-06	ACTB, ACTG1, ANK2, ARHGEF7, CD151, CD9, CDC42, CDH1, CDH24, CNTNAP1, COL17A1, CTNNA1, DSG2, FERMT2, FLOT1, FSCN1, GJB2, HIPK1, ILK, ITGA2, ITGB1BP1, ITGB4, LAMA3, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MARVELD2, MPP7, MYADM, NUMB, PARD6B, PERP, PLEC, PTK2, PTPN13, PTPRK, RAB8B, RASSF8, S100A10, SDC4, SNAI2, SORBS1, THBS1, VCL
Regulación de la estabilidad proteica	2,1	1,60E-05	AAK1, ANK2, AURKA, BAG3, CDC42, CHEK2, CLU, CREBL2, DACT1, DERL1, GIPC1, HCFC1, HSPA1A, HSPA1B, ID1, ISOC2, LAMP1, LAMP2, MAPK1, MDM2, MYLIP, PEX2, PIK3R1, PINK1, RASSF1, RNF128, SEL1L, SENP2, SH3GLB1, STX12, STXBP1, SUMO1, TADA3, TAF9B, TCP1, TERT, USP13, USP19, USP2
Regulación negativa del desarrollo del Sistema nervioso	2	1,80E-05	ADCY6, ARF6, B2M, C16orf45, CERS2, CTDSP1, CTNNA1, DICER1, DIXDC1, DYNLT1, EIF2AK3, EPHA4, FKBP4, GPR161, HES1, HMGA2, ID1, LGALS1, MDM2, MED1, NGFR, NRP1, NTN1, PAQR3, PRKACB, PTK2, RNF10, RTN4, RYK, SEMA3C, SEMA3F, SEMA3G, SEMA4D, SEMA6B, SEMA7A, SORL1, SOX9, STAT3, TERT, TSPO, VIM, WNT3, YWHAH
Regulación de las uniones	2	9,10E-06	ADD1, AIDA, AKTIP, AMFR, ANXA2, ARHGEF7, AURKA, B2M, CDC42, CDON, DACT1, DERL1, DNAJB2, E2F1, EBF2, EPHA4, FLOT1, HES1, HIPK2, HMBX1, HMGA2, HMGB2, ID1, IFIT1, ITGA2, ITGB1BP1, JUN, KLF4, LFNG, MEF2C, MEPCE, NEK2, NRP1, PER2, PLAUR, RALB, RARA, S100A10, SENP2, SORL1, SPAG9, SUMO1, TDG, TERT, TICAM1, TNKS, TRAF2, TRIM6
Crecimiento celular en desarrollo	2	5,80E-04	AURKA, BMPR2, CRABP2, CYFIP1, G6PD, ILK, IMPACT, ITGB1, LIMK1, MAP1B, MAP2K4, MEX3C, NRP1, NRP2, NTN1, PDLIM5, PPP3CB, RARG, RTN4, RYK, SEMA3C, SEMA3F, SEMA3G, SEMA4D, SEMA6B, SEMA7A, SOX9, SYT17, VCL, WNT3
Regulación positiva de la motilidad celular	1,9	2,40E-06	ACVR1B, ARHGEF7, BMPR2, CCAR1, COL18A1, CPNE3, CREB3, CYR61, EGFR, EPB41L4B, ETS1, F2R, F2RL1, F3, FAM110C, FAM83H, FGFR1, GAS6, GPLD1, HSPB1, IGF1R, IKBKAP, IL1R1, IL6R, ILK, ITGA2, ITGA3, ITGB1BP1, JUN, KITLG, LAMC2, LGALS3, MAPK1, MDM2, MET, MYADM, NRP1, NRP2, NSMF, NTN1, NUMB, PIK3R1, PLAUR, PTK2, RAB25, RHOB, S100A14, SASH1, SDCBP, SEMA3C, SEMA3F, SEMA3G, SEMA4D, SEMA6B, SEMA7A, SERPINE1, SNAI2, SOX9, SPAG9, SPHK1, TERT, THBS1
48 horas – Genes sobreexpresados			
Términos	FE	p	Genes

Organización de las uniones celulares	3	8,60E-08	ACTG1, ANK2, CD151, CDC42, CDH1, COL17A1, CTNNA1, DSG2, FERMT2, FSCN1, GJB2, ILK, ITGA2, ITGB1BP1, ITGB4, LAMA3, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MARVELD2, MYADM, NUMB, PARD6B, PERP, PLEC, PTK2, PTPN13, PTPRK, S100A10, SDC4, SNAI2, VCL
Regulación positiva de la motilidad celular	2,3	8,90E-07	ACVR1B, BMPR2, CPNE3, CREB3, CYR61, EGFR, ETS1, F2R, F2RL1, F3, FAM110C, FAM83H, FGFR1, GAS6, IL1R1, IL6R, ILK, ITGA2, ITGA3, ITGB1BP1, JUN, LAMC2, LGALS3, MAPK1, MET, MYADM, NRP1, NSMF, NTN1, NUMB, PLAU, PTK2, RAB25, RHOB, S100A14, SDCBP, SEMA3C, SEMA7A, SERPINE1, SNAI2, SPAG9
Adhesión célula-substrato	2,3	5,00E-05	ANGPT2, AXL, CDC42, COL17A1, CRK, CYR61, FERMT2, FGFR1, GAS6, ILK, ITGA2, ITGA3, ITGB1, ITGB1BP1, ITGB4, LAMC1, LGALS1, MYADM, PARVA, PLAU, PRKX, PTK2, PTPRK, PXN, S100A10, SDC4, SERPINE1, UNC13D, VAMP3, VCL
Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	2,3	1,80E-06	ACVR1B, BMPR2, CPNE3, CREB3, CYR61, EGFR, ETS1, F2R, F2RL1, F3, FAM110C, FAM83H, FGFR1, GAS6, IL1R1, IL6R, ILK, ITGA2, ITGA3, ITGB1BP1, JUN, LAMC2, LGALS3, MAPK1, MET, MYADM, NRP1, NSMF, NTN1, NUMB, PLAU, PTK2, RAB25, RHOB, S100A14, SDCBP, SEMA3C, SEMA7A, SERPINE1, SNAI2, SPAG9
Establecimiento de la localización de orgánulos	2,3	1,80E-06	ACTR3, ADORA2B, BLOC1S2, BTBD9, CD59, CDC23, CDC42, CHMP3, CHMP4C, DCTN2, DENND1A, DNAJC5, DYNC1H1, DYNLT1, GBF1, IL4R, ITSN1, KIF1B, LGLL2, MAP1B, MAP4, MCFD2, MYH9, NTN1, PTK2, RAB6A, RABGEF1, RAP1B, SEC22B, SPIRE1, STX2, TC2N, TMEM230, TRAPPC2, TRAPPC4, TRAPPC6B, TRAPPC9, UNC13B, VAMP3, VAMP8, YWHAZ
Regulación positiva de la locomoción	2,3	2,00E-06	ACVR1B, BMPR2, CPNE3, CREB3, CYR61, EGFR, ETS1, F2R, F2RL1, F3, FAM110C, FAM83H, FGFR1, GAS6, IL1R1, IL6R, ILK, ITGA2, ITGA3, ITGB1BP1, JUN, LAMC2, LGALS3, MAPK1, MET, MYADM, NRP1, NSMF, NTN1, NUMB, PLAU, PTK2, RAB25, RHOB, S100A14, SDCBP, SEMA3C, SEMA7A, SERPINE1, SNAI2, SPAG9
Coagulación	2,1	1,50E-04	ACTG1, ANXA5, AXL, CAPZA1, CD59, CDC42, CLIC1, EHD1, F2R, F2RL1, F3, GAS6, GGCX, H3F3A, ILK, ITGA2, MAPK1, MYH9, MYL9, PLAU, PLAUR, PRKAR2A, PROS1, RHOB, SERPINE1, SH2B3, STX2, TC2N, TFPI, VCL, VPS45, YWHAZ
48 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Regulación positiva del ciclo celular	2,5	7,70E-06	AURKA, CCNB1, CDC25C, CDK1, CENPV, CHEK2, E2F1, E2F7, E2F8, FAM83D, FGFR2, GATA6, HCFC1, HES1, KIF14, MDM2, MED1, MEPCE, PGGT1B, PIM1, RAD21, RARA, SPHK1, TBX3, TCF3, TERT, TP53, USP19, USP2, USP22, XRCC3, ZNF385A
División celular	2,3	1,60E-07	ARF6, AURKA, BORA, CABLES1, CABLES2, CCNB1, CCNB3, CCNE2, CCNF, CCSAP, CDC25C, CDCA2, CDCA4, CDCA7L, CDK1, CDK6, CENPC, CENPF, CENPV, CHEK2,

			CNTRL, DIXDC1, E2F7, E2F8, FAM64A, FAM83D, FGFR2, HELLS, INCENP, KIF14, KIF18B, KIF20A, KIF2C, KLHL22, LRRCC1, NCAPD2, NDE1, NEK2, NUF2, NUMA1, PTCH1, PTTG1, RAB10, RAD21, REEP4, TNKS, TOP2A, UBE2S, WEE1, ZWINT
Regulación del ciclo celular	2	2,90E-09	AURKA, BORA, CABLES1, CABLES2, CCNB1, CCNB3, CCNE2, CCNF, CCSAP, CDC25C, CDK1, CDK18, CDK6, CDKN2C, CEBPA, CENPF, CENPV, CHEK2, DACT1, E2F1, E2F2, E2F7, E2F8, FAM83D, FEM1B, FGFR2, FOXM1, FZD3, GATA6, HBP1, HCFC1, HERC5, HES1, HEXIM2, ICK, KIF14, KLHL22, LIN54, LIN9, MDM2, MED1, MEPCE, MFN2, MKI67, NBN, NEK2, PER2, PGGT1B, PHACTR4, PID1, PIM1, PRKACB, PTCH1, RAD21, RARA, SKP2, SLC25A33, SLC9A3R1, SOX9, SPHK1, STAT3, STIL, TBX3, TCF3, TERT, THBS1, TNKS, TOP2A, TP53, TSPYL2, USP19, USP2, USP22, WEE1, XRCC3, ZNF385A, ZWINT
Proceso mitótico	2	9,90E-08	ABCB1, AURKA, BORA, CACUL1, CCNB1, CCNB3, CCNE2, CCNF, CCSAP, CDC25C, CDCA2, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPC, CENPF, CENPV, CEP152, CHEK2, CNTRL, DACT1, E2F1, E2F7, FAM64A, FAM83D, FOXM1, GPM2, HELLS, INCENP, KIF14, KIF18B, KIF20A, KIF2C, KLHL22, KPNB1, LRRCC1, MDM2, MEPCE, MZT1, NBN, NCAPD2, NDE1, NEK2, NUF2, NUMA1, NUP210, ODF2, PID1, PIM1, PTTG1, RAD21, REEP4, RRM2, SKP2, STIL, TCF3, TERT, TNKS, TOP2A, TP53, TUBA4A, TUBGCP3, UBE2S, WDR62, WEE1, XRCC3, ZNF385A, ZWINT
Regulación negativa de muerte celular	1,9	6,20E-07	AARS, ADORA1, ADORA2A, ANGPTL4, AURKA, BAG3, BCL6, BNIP2, CBX4, CD44, CDK1, CIAPIN1, CLU, CPEB4, DAPK1, FGFR2, FZD3, GATA6, HELLS, HIPK3, HMGB2, HSPA1A, HSPA1B, HSPB1, ID1, IGF1R, IMPACT, KIF14, KITLG, KRT18, LGMN, MALT1, MDM2, MED1, MEF2C, MYO18A, NGFR, NOS3, NQO1, PIK3R1, PIM1, PPIF, PSAP, RARA, RARG, RRM2B, SEMA4D, SIRT5, SLC25A4, SLC39A10, SMAD6, SORL1, SOX9, SPHK1, SQSTM1, STAT3, STIL, STXBP1, TBX3, TERT, THBS1, TLE1, TP53, TRAF2, UNC5B, ZNF385A
Transición de fase del ciclo celular	1,9	1,60E-04	ABCB1, AURKA, BORA, CACUL1, CCNB1, CCNB3, CCNE2, CDC25C, CDK1, CDK6, CDKN2C, CENPF, CEP152, CHEK2, CNTRL, DACT1, E2F1, E2F7, FAM83D, FOXM1, KIF14, KLHL22, MDM2, MEPCE, NBN, NDE1, NEK2, ODF2, PID1, PIM1, RRM2, SKP2, TCF3, TERT, TP53, TUBA4A, UBE2S, WEE1, XRCC3, ZNF385A
Regulación negativa de la organización de componentes celulares	1,8	3,10E-04	ANXA2, ARF6, CCNB1, CCNF, CENPF, CERS2, CLU, DACT1, DNAJB1, EHMT2, EPHA4, FKBP4, HSPA1A, HSPA1B, ID1, IMPACT, INSIG1, KIF14, KLHL22, MDM2, NBN, NEK2, NGFR, PAQR3, PCSK9, PID1, PPIF, PPP2R5A, SEMA3F, SEMA3G, SEMA4D, SEMA6B, SMAD6, SORL1, SPTBN2, SPTBN4, THBS1, TMSB4X, TNKS, VIM, WNT3, XRCC3, YWHAH
96 horas – Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes

Crecimiento celular en desarrollo	2,6	1,60E-04	ABL1, ALCAM, CRABP2, DRAXIN, EFNA5, EMX1, G6PD, ITGB1, LHX2, MAP2K4, NRP1, NRP2, PLXNB1, RTN4, SEMA3C, SEMA3G, SEMA7A, SOX9, SYT17, TNFRSF12A, VCL
Organización de las uniones celulares	2,5	2,50E-05	ACE, ACTG1, ACTN4, ANK2, CD9, CNTNAP1, EFNA5, FLNA, FLNC, GJB2, ITGA2, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MARVELD2, MICALL2, MYADM, NF2, PLEC, S100A10, SLK, SMAD3, SNAI2, TJP1, TNS1, VCL, WNT11
Organización de la estructura extracelular	2,5	1,00E-06	ABL1, ANTXR1, APBB2, CAPN2, CD44, COL13A1, COL18A1, COL27A1, COL6A1, COL7A1, COL9A3, CTSL, DPP4, ELF3, FGF2, FOXC1, HAS3, ITGA2, ITGA7, ITGAX, ITGB1, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LAMC2, LAMC3, LRP1, OLFML2A, SMAD3, SOX9, SPARC, SULF2, TEX14, TIMP2, TLL2, VCAN
Regulación de la respuesta celular a estímulos de factores de crecimiento	2,5	7,20E-05	ABL1, BCL9L, CD109, DKK1, FBN3, FGF2, HES1, HIPK2, HSPA5, LTBP1, LTBP4, MSX1, NEO1, PEG10, PRDM16, PTPN1, RBPJ, RBPMS2, RNF165, SMAD3, SMAD6, SULF2, TGFBR3, TOB1, XBP1
Crecimiento relacionado con morfogénesis	2,4	5,10E-04	ABL1, ALCAM, CRABP2, DRAXIN, EFNA5, EMX1, ITGB1, KDM5B, LHX2, NRP1, NRP2, PLXNB1, RTN4, SEMA3C, SEMA3G, SEMA7A, SOX9, SYT17, TNFRSF12A, VCL, WNT11
Proliferación de células epiteliales	2,3	1,50E-05	C5AR1, CCND1, CD109, EFN2, EGFR, EPB41L4B, EPHA2, F3, FERMT1, FGF2, HMGA2, ID2, JUN, KDM5B, LAMB1, LAMC1, MAPK1, NGFR, NRARP, NRP1, NRP2, PGF, SCN5A, SFN, SNAI2, SOX9, SPARC, SULF2, TGFA, TGFBR3, VASH2, WNT16, XBP1, ZFP36L1
Aprendizaje de la memoria	2,2	1,20E-03	ABL1, AMFR, ASIC1, ATP8A1, CASP3, DKK1, EGFR, FOSL1, GMFB, GRIN2B, ITGB1, ITPR3, JUN, NTSR1, PAIP2, POMK, PPP1R1B, PRKCG, PRNP, SHANK1, ZNF385A
96 horas – Genes sobreexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Organización de las uniones celulares	3,8	1,30E-06	ACTG1, ACTN4, ANK2, FLNA, FLNC, GJB2, ITGA2, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MARVELD2, MYADM, NF2, PLEC, S100A10, SLK, SMAD3, SNAI2, TJP1, VCL
Respuesta a estrés oxidativo	3,2	8,80E-07	ABL1, ANXA1, AXL, CASP3, DHCR24, EGFR, FANCD2, FOSL1, GJB2, GPX8, JUN, KLF4, KPNA4, MCL1, MET, NFE2L1, PPP2CB, PRNP, PXN, SESN2, SLC25A24, STC2, TXNRD1, VRK2, WNT16, XBP1
Organización de filamentos de actina	2,9	8,40E-05	ABL1, ACTN4, ACTR3, CAP1, EZR, FLNA, GMFB, ITGB1, LIMA1, MICAL2, MYADM, NCKAP1, NF2, PALM2-AKAP2, S100A10, SMAD3, SYNPO2, TMSB10, TPM4, TWF1
Respuesta a sustrato inorgánico	2,6	1,90E-05	ABL1, ANXA1, ANXA7, AXL, CASP3, CCND1, CLIC4, EGFR, FOSL1, HSPA5, ITPR3, JUN, KLF4, KPNA4, MAOB, MET, MT1E, MT2A, NDRG1, PPP2CB, PRNP, RAD51, S100A16, SLC25A24, TXNRD1, XRCC4

Regulación negativa de muerte celular	2,6	1,90E-09	ABL1, ANXA1, APBB2, ASNS, AXL, BCL2L12, BRCA1, CASP3, CAST, CLCF1, DHCR24, DNAJC5, EGFR, FGF2, FHL2, FLNA, GPAM, HERPUD1, HIGD1A, HIPK2, HMGA2, HSPA5, ITGB1, JUN, KLF4, MAP2K4, MCL1, MET, NAA15, NRP1, NTSR1, PEA15, PRNP, PTPN1, RAD18, SCRT2, SFN, SGMS1, SH3RF1, SIAH2, SMAD3, SNAI2, TGFA, THOC6, TMBIM1, WNT16, WNT9A, XBP1, XRCC2
Regulación positiva de la motilidad celular	2,5	3,90E-04	ACTN4, ANXA3, EGFR, F3, FAM83H, FGF2, HSPA5, IL6R, ITGA2, JUN, KIF20B, LAMC2, MAPK1, MET, MYADM, NRP1, SEMA3C, SEMA7A, SMAD3, SNAI2, XBP1
Transición de fase del ciclo celular	2,4	3,40E-05	ANXA1, ARPP19, ATAD5, CCND1, CDC23, CDT1, CENPE, CTDSP1, EGFR, HMGA2, HMMR, INO80, ITGB1, MASTL, MCM10, MCM2, MCM5, MCM6, MCM7, NPAT, ORC3, PKMYT1, PPAT, SFN, TTK, TUBA1A, UBE2E1, ZFP36L1
96 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Organización de la estructura extracelular	3,1	4,60E-06	ANTXR1, CD44, COL13A1, COL18A1, COL27A1, COL6A1, COL7A1, COL9A3, DPP4, ELF3, FOXC1, ITGA7, ITGAX, LAMB1, LAMC3, LRP1, OLFML2A, SOX9, SPARC, SULF2, TEX14, TIMP2, TLL2
Desarrollo cerebral	2,1	9,90E-05	ALDH1A3, ARNT2, BMP7, C5AR1, CACNA1A, CD9, CDH22, DIXDC1, DKK1, DRAXIN, E2F1, EMX1, FOXC1, G6PD, HES1, ID2, LAMB1, LHX2, LRP1, MSX1, NOTCH3, NRP2, OGDH, PITX2, POMK, SCN5A, SERPINE2, SMARCA1, SPTBN2, SSBP3, SYNGR3, WLS
Desarrollo de la cabeza	2,1	1,10E-04	ALDH1A3, ARNT2, BMP7, C5AR1, CACNA1A, CD9, CDH22, DIXDC1, DKK1, DRAXIN, E2F1, EMX1, FOXC1, G6PD, HES1, ID2, LAMB1, LHX2, LRP1, MSX1, NOTCH3, NRP2, OGDH, PITX2, POMK, SCN5A, SERPINE2, SMARCA1, SPTBN2, SSBP3, SYNGR3, TRABD2A, WLS
Desarrollo del corazón	2,1	1,90E-03	BMP7, CPE, DKK1, FHOD3, FOXC1, G6PD, HES1, ID2, ID3, LTBP1, MSX1, NEBL, NRP2, PITX2, PLCE1, RYR1, SCN5A, SCUBE1, SMAD6, SOX9, SPARC, TGFB3, WNT11
Regulación negativa de la diferenciación celular	2	8,40E-04	ADAMTS7, BMP7, DIXDC1, DKK1, DRAXIN, E2F1, EFNA5, G6PD, HES1, HIST1H4K, ID2, ID3, INPP5D, LRP1, LRP4, MSX1, NGFR, NOTCH3, NR2F1, NRARP, PRDM16, RBPMS2, SEMA3G, SOX9, STAT3, TOB1, TRIB2, TRIM6
Regulación negativa de procesos del desarrollo	1,9	8,10E-04	ADAMTS7, BMP7, DIXDC1, DKK1, DRAXIN, EFNA5, FGFR3, FOXC1, G6PD, HES1, HIST1H4K, ID2, ID3, INPP5D, LGMN, LRP1, LRP4, LUC7L, MSX1, NGFR, NOTCH3, NR2F1, NRARP, PRDM16, RBPMS2, SEMA3G, SOX9, SPARC, STAT3, TLL2, WNT11
Desarrollo de la estructura muscular	1,9	5,20E-03	DKK1, FHOD3, FOXC1, G6PD, HES1, ID3, ITGA7, LUC7L, MSX1, MYH14, MYH15, NEBL, NEK5, OBSCN, PITX2, RBPMS2, RNF165, RYR1, SOX9, TCF3, TGFB3, TLL2, TRIM54, ZBTB18

Tabla suplementaria 2: Procesos biológicos enriquecidos en el conjunto de genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con TNF α . El análisis se llevó a cabo con la herramienta informática DAVID, utilizando la jerarquía de nivel 3 de procesos biológicos (GOTERM_BP_3). Cada proceso biológico va acompañado de su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE). Se representan las 7 categorías con mayor FE para cada conjunto de genes. Todas las categorías representadas cumplen con una significación estadística de P<0.05 (puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado). Naranja: términos relacionados con EMT.

	Todos		Sobreexpresados		Subexpresados	
	Proceso biológico	FE	Proceso biológico	FE	Proceso biológico	FE
24 h	Regulación de quimiotaxis	4,6	Activación de la respuesta inmune innata	6,3	Desarrollo de la estructura del músculo	3,0
	Respuesta a estímulo mecánico	4,1	Regulación positiva de la respuesta defensiva	4,7	Regulación del movimiento de componentes celulares	2,7
	Activación de la respuesta inmune innata	3,9	Regulación positiva de la motilidad celular	4,6	Regulación de la motilidad celular	2,5
	Regulación positiva de la motilidad celular	3,6	Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	4,5	Regulación positiva de proliferación celular	2,4
	Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	3,5	Regulación positiva de la locomoción	4,5	Respuesta a compuestos de nitrógeno	2,2
	Regulación positiva de la locomoción	3,5	Respuesta a bacterias	4,2	Respuesta a compuestos orgánicos con nitrógeno	2,2
	Regulación de las uniones	3,4	Producción de citoquinas	4	Regulación de la morfogénesis de la estructura anatómica	2,1
48 h	Producción de citoquinas	3,5	Activación de la respuesta inmune innata	6,8	Regulación de los niveles de hormonas	3,9
	Regulación de la producción de citoquinas	3,4	Regulación positiva de la motilidad celular	5,3	Desarrollo de estructuras tubulares	3,5
	Regulación de la motilidad celular	3,3	Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	5,1	Desarrollo de la estructura del músculo	3,5
	Activación de linfocitos	3,1	Regulación positiva de la locomoción	5,1	Respuesta a compuestos orgánicos con nitrógeno	3,3
	Adhesión célula-célula en un organismo	3,1	Regulación de la producción de citoquinas	5,1	Morfogénesis embrionaria	3,2
	Adhesión celular en un organismo	3,1	Organización de la estructura extracelular	5,1	Respuesta a compuestos de nitrógeno	3,1
	Regulación del movimiento de componentes celulares	3	Regulación positiva de la respuesta defensiva	5	Adhesión celular en un organismo	3,1
96 h	Organización de las uniones celulares	2,2	Segregación cromosómica	2,9	Desarrollo del corazón	2,2
	Desarrollo del riñón	2,2	Proceso mitótico	2,6	Regulación de la secreción celular	2
	Regulación de las uniones	2,1	Transición de fase del ciclo celular	2,5	Desarrollo de la estructura del músculo	2
	Adhesión célula-substrato	2	Regulación del ciclo celular	2,4	Proceso metabólico de ácidos orgánicos	1,9
	Activación de la respuesta inmune innata	2	Regulación positiva de la respuesta defensiva	2,3	Secreción celular	1,9
	Respuesta celular a estímulo externo	1,9	Regulación negativa de muerte celular	2,2	Regulación positiva de transporte	1,8
	Respuesta a virus	1,9	División celular	2,2	Proceso metabólico de lípidos celulares	1,8

Tabla suplementaria 3: Procesos biológicos enriquecidos en el conjunto de genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con TNF α . Detalle de la Tabla suplementaria 2. Se incluyen las funciones biológicas enriquecidas (términos), su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE), significación estadística (p, puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado) y los genes pertenecientes a cada función biológica enriquecida.

24 horas - Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes
Regulación de quimiotaxis	4,6	1,30E-08	ANGPT2, C5AR1, CD74, CSF1, CXCL1, DAPK2, F3, FGF1, GPR183, ITGA2, KLRC4-KLRK1, PDGFB, S100A14, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3G, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3, TIAM1, WNT3A
Respuesta a estímulo mecánico	4,1	2,30E-07	ANGPT2, BDKRB1, CNTNAP2, DENND5B, EDN1, ETS1, ETV1, FOSB, FOSL1, HDAC4, IRF1, ITGA2, JUN, JUNB, MMP7, NFKB1, NFKBIA, PKD1L2, SOX9, TNFRSF10A, TNFRSF10B
Activación de la respuesta inmune innata	3,9	2,90E-08	BIRC2, BIRC3, CYLD, FLOT1, IFIH1, IKBKE, IRAK2, IRF1, ITGAM, KLRC4-KLRK1, MALT1, MAP2K6, NFKB1, NFKBIA, PRKACB, PSMB9, PSME1, PSME2, RELB, RFTN1, S100A14, TICAM1, TNFAIP3, TNIP1, TRAF3
Regulación positiva de la motilidad celular	3,6	2,60E-11	ATP8A1, BDKRB1, BMP2, C5AR1, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, DAPK2, EDN1, EPHA1, ETS1, F3, FGF1, HDAC4, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, ITGA2B, JUN, KITLG, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, S100A14, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3G, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3, SOX9, SYNE2, TIAM1
Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	3,5	5,70E-11	ATP8A1, BDKRB1, BMP2, C5AR1, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, DAPK2, EDN1, EPHA1, ETS1, F3, FGF1, HDAC4, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, ITGA2B, JUN, KITLG, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, S100A14, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3G, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3, SOX9, SYNE2, TIAM1
Regulación positiva de la locomoción	3,5	6,50E-11	ATP8A1, BDKRB1, BMP2, C5AR1, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, DAPK2, EDN1, EPHA1, ETS1, F3, FGF1, HDAC4, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, ITGA2B, JUN, KITLG, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, S100A14, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3G, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3, SOX9, SYNE2, TIAM1
Regulación de las uniones	3,4	2,40E-07	B2M, BCL3, BMP2, DACT1, DKK1, EPHB6, FLOT1, HDAC4, HES1, ID1, ID2, IFIT1, ITGA2, JUN, MEF2C, NFKBIA, PDGFB, PITX2, PLAUR, PLK2, PPP3CA, SMAD3, TCF7L2, TIAM1, TICAM1, WNT3A
24 horas – Genes sobreexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Activación de la respuesta inmune innata	6,3	4,10E-10	BIRC2, BIRC3, CYLD, IFIH1, IKBKE, IRAK2, IRF1, ITGAM, MALT1, NFKB1, NFKBIA, PSMB9, PSME1, PSME2, RELB, RFTN1, TICAM1, TNFAIP3, TNIP1, TRAF3

Regulación positiva de la respuesta defensiva	4,7	1,50E-09	BIRC2, BIRC3, CYLD, ETS1, IFIH1, IKBKE, IL6ST, IRAK2, IRF1, ITGA2, ITGAM, MALT1, NFKB1, NFKBIA, PSMB9, PSME1, PSME2, RELB, RFTN1, SERPINE1, TICAM1, TNFAIP3, TNIP1, TRAF3
Regulación positiva de la motilidad celular	4,6	2,10E-09	BMP2, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, EDN1, ETS1, F3, FGF1, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, JUN, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, SEMA3C, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3
Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	4,5	3,50E-09	BMP2, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, EDN1, ETS1, F3, FGF1, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, JUN, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, SEMA3C, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3
Regulación positiva de la locomoción	4,5	3,90E-09	BMP2, CD74, CSF1, CXCL1, CYR61, EDN1, ETS1, F3, FGF1, HDAC9, ICAM1, ILK, IRS2, ITGA2, JUN, LAMC2, MCAM, PDGFB, PLAU, SEMA3C, SEMA4B, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3
Respuesta a bacterias	4,2	2,50E-10	ABR, AXL, B2M, BCL3, CD96, CXCL1, DUSP10, EDN1, ERAP1, HLA-A, HLA-B, ICAM1, IRAK2, JUN, JUNB, MALT1, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, OPTN, REN, SBNO2, SERPINE1, TBXA2R, TICAM1, TNFAIP3, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF9
Producción de citoquinas	4	8,00E-11	AXL, B2M, BCL3, BIRC2, BIRC3, CD55, CD74, CD83, CD96, CYLD, HLA-A, HLA-B, IFIH1, IKBKE, IL6ST, IRF1, MALT1, NFKB1, NFKB2, NMI, PANX1, PNP, RELB, RFTN1, SEMA7A, SERPINE1, SMAD3, TICAM1, TNFAIP3, TNFRSF9, TRAF3, TRIM16
24 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Desarrollo de la estructura del músculo	3,0	8,00E-06	ARID5B, BARX2, EGR1, ETV1, FGF9, FLOT1, GDF15, HDAC4, HES1, ITGA7, JAG1, MBNL3, MEF2C, MKX, NEBL, NEK5, OBSCN, PITX2, PLCB1, PPP3CA, SOX9, TCF7L2, WNT3A
Regulación del movimiento de componentes celulares	2,7	5,00E-06	ADORA1, AKAP9, ARHGAP18, ATP8A1, BDKRB1, C5AR1, DAPK2, DSC2, EPHA1, GPR183, GSN, HDAC4, ITGA2B, JAG1, KITLG, KLRC4-KLRK1, NRG4, PDE4B, PITX2, PLCB1, S100A14, SEMA3D, SEMA3G, SLK, SOX9, SYNE2, TIAM1, WNT3A
Regulación de la motilidad celular	2,5	8,20E-05	ADORA1, ARHGAP18, ATP8A1, BDKRB1, C5AR1, DAPK2, EPHA1, GPR183, GSN, HDAC4, ITGA2B, JAG1, KITLG, KLRC4-KLRK1, NRG4, PITX2, PLCB1, S100A14, SEMA3D, SEMA3G, SLK, SOX9, SYNE2, TIAM1
Regulación positiva de proliferación celular	2,4	1,00E-04	ALDH3A1, C5AR1, EGR1, EPHA1, FGF17, FGF9, GPR183, HDAC4, HES1, HMGNS5, ID1, ID2, KITLG, LRG1, LTBP3, MEF2C, MLXIPL, PHIP, PID1, PITX2, SOX4, SOX9, TIAM1, VASH2, VIPR1, WNT3A
Respuesta a compuestos de nitrógeno	2,2	2,30E-04	AANAT, ABAT, AKAP9, ALDH3A1, C5AR1, CDH1, EGR1, FLOT1, FOSB, GSTM2, ID1, IFIT1, JAG1, LIN28B, MEF2C,

			PDE3A, PDE4B, PDK4, PHIP, PID1, PLCB1, PPP3CA, PRKACB, SESN3, SOX9, TIAM1
Respuesta a compuestos orgánicos con nitrógeno	2,2	1,40E-03	AANAT, ABAT, AKAP9, ALDH3A1, C5AR1, CDH1, EGR1, FOSB, GSTM2, ID1, JAG1, MEF2C, PDE3A, PDE4B, PDK4, PHIP, PID1, PPP3CA, PRKACB, SESN3, SOX9, TIAM1
Regulación de la morfogénesis de la estructura anatómica	2,1	2,10E-04	ANGPTL4, ANKRD6, ARHGAP18, C5AR1, DACT1, DUSP6, EPHA1, FLOT1, GDF15, GSN, HES1, ID1, ITGA7, LRG1, MEF2C, MNS1, NGEF, PHIP, PID1, PPP3CA, RHOU, SEMA3D, SEMA3G, SOX9, SPP1, TCF7L2, TIAM1, VASH2, WNT3A
48 horas – Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes
Producción de citoquinas	3,5	1,20E-07	AXL, B2M, BIRC2, BIRC3, CD55, CD83, CDH3, CLU, CYLD, EGR1, EPHB6, FLOT1, IL6ST, LTBP3, MALT1, NFKB1, NFKB2, PANX1, REL, RELB, SEMA7A, SMAD3, TLR3, TNFAIP3, TNFRSF9, TRAF3
Regulación de la producción de citoquinas	3,4	1,40E-06	AXL, B2M, BIRC2, BIRC3, CD83, CDH3, CLU, CYLD, EGR1, FLOT1, IL6ST, MALT1, NFKB1, NFKB2, PANX1, REL, RELB, SEMA7A, SMAD3, TLR3, TNFAIP3, TNFRSF9, TRAF3
Regulación de la motilidad celular	3,3	4,50E-08	ABL2, ADORA1, BMP2, C16orf45, CDK6, CLIC4, CXCL1, CYR61, EPHA1, EPPK1, ETS1, F3, FGF2, GSN, HDAC9, IRS2, ITGAV, JAG1, LAMC2, PDGFB, PHLDA2, PLAU, S100A14, SDC4, SEMA7A, SMAD3, SOX9, SP100, TIAM1
Activación de linfocitos	3,1	2,30E-06	AXL, B2M, CD55, CD59, CD83, CDK6, EGR1, EPHB6, GSN, HDAC9, HES1, ID2, IGFBP2, IL6ST, IRS2, KLF6, LEPR, MALT1, PRF1, RELB, SDC4, SMAD3, SOX4, TNFAIP3
Adhesión célula-célula en un organismo	3,1	4,50E-07	ASS1, B2M, CD55, CD59, CD83, CDH1, CDH3, CDK6, CYR61, EGR1, EPHB6, ETS1, FLOT1, GSN, HES1, IGFBP2, IL6ST, ITGAV, LEPR, LMO7, MALT1, PLEKHA7, RELB, SDC4, SMAD3, SOX4, SOX9
Adhesión celular en un organismo	3,1	1,50E-07	ASS1, AXL, B2M, CD55, CD59, CD83, CDH1, CDH3, CDK6, CYR61, EGR1, EPHA1, EPHB6, ETS1, FLOT1, GSN, HES1, IGFBP2, IL6ST, ITGAV, LEPR, LMO7, MALT1, PLEKHA7, RELB, SDC4, SMAD3, SOX4, SOX9
Regulación del movimiento de componentes celulares	3	2,70E-07	ABL2, ADORA1, BMP2, C16orf45, CDK6, CLIC4, CXCL1, CYR61, EPHA1, EPPK1, ETS1, F3, FGF2, GSN, HDAC9, IRS2, ITGAV, JAG1, LAMC2, PDGFB, PHLDA2, PLAU, S100A14, SDC4, SEMA7A, SMAD3, SOX9, SP100, TIAM1
48 horas – Genes sobrexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Activación de la respuesta inmune innata	6,8	4,70E-06	BIRC2, BIRC3, CYLD, IRAK2, MALT1, NFKB1, NFKBIA, RELB, TLR3, TNFAIP3, TRAF3
Regulación positiva de la motilidad celular	5,3	2,20E-06	BMP2, CXCL1, CYR61, ETS1, F3, FGF2, HDAC9, IRS2, ITGAV, LAMC2, PDGFB, PLAU, SEMA7A, SMAD3

Regulación positiva del movimiento de componentes celulares	5,1	2,90E-06	BMP2, CXCL1, CYR61, ETS1, F3, FGF2, HDAC9, IRS2, ITGAV, LAMC2, PDGFB, PLAU, SEMA7A, SMAD3
Regulación positiva de la locomoción	5,1	3,10E-06	BMP2, CXCL1, CYR61, ETS1, F3, FGF2, HDAC9, IRS2, ITGAV, LAMC2, PDGFB, PLAU, SEMA7A, SMAD3
Regulación de la producción de citoquinas	5,1	2,60E-08	AXL, B2M, BIRC2, BIRC3, CD83, CYLD, IL6ST, MALT1, NFKB1, NFKB2, PANX1, REL, RELB, SEMA7A, SMAD3, TLR3, TNFAIP3, TNFRSF9, TRAF3
Organización de la estructura extracelular	5,1	5,90E-05	COL12A1, CYR61, ETS1, FGF2, ITGAV, LAMB3, LAMC2, NFKB2, PDGFB, SMAD3, VCAN
Regulación positiva de la respuesta defensiva	5	1,00E-05	BIRC2, BIRC3, CYLD, ETS1, IL6ST, IRAK2, MALT1, NFKB1, NFKBIA, RELB, TLR3, TNFAIP3, TRAF3
48 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Regulación de los niveles de hormonas	3,9	9,70E-04	ADORA1, CRABP2, EGR1, KLK6, POR, SLC2A1, SOX4, SYT7, TIAM1, TRERF1
Desarrollo de estructuras tubulares	3,5	1,00E-03	ASS1, CAT, GRHL2, HES1, ID1, ID2, JAG1, PTK7, SOX4, SOX9, ST14
Desarrollo de la estructura del músculo	3,5	1,20E-03	ASS1, EGR1, FLOT1, GDF15, HES1, JAG1, KRT8, MYH14, OBSCN, SOX9
Respuesta a compuestos orgánicos con nitrógeno	3,3	2,70E-04	ASS1, CAT, CDH1, COL6A1, EGR1, EHMT2, ID1, IGFBP2, JAG1, PID1, POR, SORT1, SOX9, TIAM1
Morfogénesis embrionaria	3,2	3,40E-03	COL6A1, CRABP2, GRHL2, HES1, ID2, MMP15, PTK7, SOX4, SOX9, ST14
Respuesta a compuestos de nitrógeno	3,1	2,70E-04	ASS1, CAT, CDH1, COL6A1, EGR1, EHMT2, FLOT1, ID1, IGFBP2, JAG1, PID1, POR, SORT1, SOX9, TIAM1
Adhesión celular en un organismo	3,1	8,70E-04	ASS1, CDH1, CDH3, EGR1, EPHA1, EPHB6, FLOT1, GSN, HES1, IGFBP2, PLEKHA7, SOX4, SOX9
96 horas – Todos los genes (sobrexpresados y subexpresados)			
Términos	FE	p	Genes
Organización de las uniones celulares	2,2	4,50E-05	ACE, ACTB, ACTG1, CAV1, CDH1, CNTNAP1, CORO1C, ECT2, EFNA5, FERMT2, FLNA, FLNC, FLOT1, GRHL2, ITGA6, ITGB4, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MICALL2, MPP7, MYADM, NF2, OCLN, PARD6B, PERP, PLEC, SDC4, SLK, SMAD3, TJP1, TLN2, VMP1
Desarrollo del riñón	2,2	3,20E-05	ACE, ACTA2, ADAMTS16, ARID5B, BCL2L11, BMP2, BMP4, CA2, CAT, EFN2, EGR1, FGF2, FOXC1, FOXD1, GLI2, GLIS2, HES1, HOXB7, ID2, ID3, JAG1, LIF, LRP4, LZTS2, MYC, PBX1, PCSK9, PDGFB, PKD2, SDC4, SMAD3, SMAD6, SOX4, SOX9, WNK4
Regulación de las uniones	2,1	3,00E-05	ACE, AURKB, B2M, BAK1, BMP2, BMP4, CAPRIN2, CAV1, CDK5, DKK1, DOT1L, DVL1, EPHB6, FLOT1, HDAC4, HERPUD1, HES1, ID1, ID2, IFIT1, JUN, KLF4, LIF, MYC,

			NFKBIA, NRG1, PDGFB, PITX2, PPARA, PPP3CA, PTPRF, SMAD3, TCF7L2, TIAM1, TICAM1, TRAF2, TRIB3, WNT3A
Adhesión célula-substrato	2	1,00E-04	AXL, BCL2L11, CD44, CD96, CDK5, CDK6, CIB1, CORO1C, CSF1, CYR61, DOCK5, EFNA5, EPHA1, FERMT2, FLNA, FZD4, ID1, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB4, KIF14, LAMB1, LAMC1, MICALL2, MYADM, NF2, PLAU, PLEKHA2, SDC4, SLK, SMAD3, SMAD6, SORBS3, THBS3, TIAM1, TNFRSF12A
Activación de la respuesta inmune innata	2	5,80E-04	BIRC2, BIRC3, CAV1, CYLD, FLOT1, HSPA1B, IKBKE, IRAK2, IRF1, KLRC4-KLRK1, MALT1, MAPKAPK3, NFKB1, NFKBIA, PSMB2, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, RELB, RFTN1, SMPDL3B, TICAM1, TLR3, TNFAIP3, TNIP1, TRAF3, UBQLN1
Respuesta celular a estímulo externo	1,9	9,10E-04	ASNS, ATF3, ATG7, AXL, BAG3, BAK1, CAV1, CYP24A1, DSC2, FOSL1, HDAC4, ICAM1, IRF1, ITGA6, JUN, MAP2K4, MMP7, MYBBP1A, NFKB1, NUA2, PCSK9, PIM1, PMAIP1, PPARG, PRKAA2, SLC2A1, SOX9, TLR3, TNFRSF10A, UPP1
Respuesta a virus	1,9	3,00E-04	ACTA2, AP1M1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3G, ATG7, B2M, BCL2L11, BIRC2, BIRC3, CCDC130, CDK6, DDX21, FOSL1, GLI2, HLA-A, IFIT1, IFNGR2, IKBKE, IRF1, ITGAX, MICB, NPC2, OAS3, PMAIP1, POLR3A, POLR3G, PPM1B, PRF1, SERINC5, STAT2, TICAM1, TLR3, TNFAIP3, TPT1, TRIM38
96 horas – Genes sobreexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Segregación cromosómica	2,9	2,80E-07	AHCTF1, AURKB, CDC20, CDCA8, CENPA, CENPE, CENPI, CENPN, CENPO, CLIP1, DLGAP5, ECT2, FANCM, INO80, KIF14, KPNB1, NCAPG, NCAPH, NDC1, NR3C1, NUP98, PDS5A, PRC1, RAD18, RANGAP1, SKA1, SMC3, SPDL1, STAG2, TRIP13, TTK, UBE2C
Proceso mitótico	2,6	9,20E-15	ALMS1, ANLN, ASPM, ASUN, AURKB, BACH1, BIRC2, BIRC3, CCND1, CCNF, CD2AP, CDC20, CDCA8, CDK6, CDT1, CENPA, CENPE, CENPN, CEP135, CLIP1, DLGAP5, FLNA, FOXM1, HAUS2, INO80, ITGB1, KIF14, KIF20B, KPNB1, LATS2, MCM10, MELK, MYBL2, NBN, NCAPG, NCAPH, NDC1, NPAT, NR3C1, NUP155, NUP98, OPTN, ORC3, ORC6, PDGFB, PDS5A, PIM1, PKMYT1, PLK4, PPP1R1C, PRC1, PRKDC, PSMB2, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, RBBP8, SBDS, SKA1, SMC3, SPDL1, SSNA1, STAG2, TGFA, TOPBP1, TTK, TUBA4A, UBE2C, UBE2E1, UBE2E2, USP16, WDR43, WNT10B, WNT9A, ZFP36L1
Transición de fase del ciclo celular	2,5	6,30E-08	ALMS1, ANLN, BACH1, CCND1, CDC20, CDK6, CDT1, CENPE, CEP135, DLGAP5, FOXM1, HAUS2, INO80, ITGB1, KIF14, LATS2, MCM10, MELK, NBN, NPAT, OPTN, ORC3, ORC6, PIM1, PKMYT1, PLK4, PPP1R1C, PRKDC, PSMB2, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, RBBP8, SSNA1, TOPBP1, TTK, TUBA4A, UBE2C, UBE2E1, UBE2E2, WNT10B, ZFP36L1

Regulación del ciclo celular	2,4	3,00E-12	ANLN, APBB2, ASNS, ASPM, ASUN, AURKB, BAK1, BAP1, BCL2L11, BIRC2, BMP2, CAV2, CCND1, CCNF, CDC20, CDK6, CDT1, CENPE, CYLD, DLGAP5, DOT1L, ECT2, ETS1, FGF2, FIGNL1, FOSL1, FOXM1, GPR3, INO80, IRF1, ITGB1, JUN, KIF14, KIF20B, LATS2, MAP2K1, MFN2, MKI67, MYBBP1A, MYBL2, MYC, NBN, NOTCH2, NR4A1, PDGFB, PES1, PIM1, PKMYT1, PLK4, PPP1R1C, PRKAA2, PRKDC, PSMB2, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, PTPN11, RBL1, SMAD3, SMC3, STAG2, SVIL, TGFA, TNFAIP3, TOPBP1, TTK, UBE2C, UBE2E1, UBE2E2, USP16, WNT10B, WNT9A, ZFHX3, ZFP36L1
Regulación positiva de la respuesta defensiva	2,3	3,40E-05	BIRC2, BIRC3, CAV1, CLOCK, CYLD, ETS1, HSPA1B, IKBKE, IL6ST, IRAK2, IRF1, MALT1, MAPKAPK3, NFKB1, NFKBIA, POLR3G, PSMB2, PSMB7, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, RELB, RFTN1, TICAM1, TLR3, TNFAIP3, TNIP1, TRAF3, UBQLN1
Regulación negativa de muerte celular	2,2	2,60E-09	ALMS1, APBB2, API5, ASNS, AURKB, AXL, BAG3, BCL2L12, BIRC2, BIRC3, CAST, CAV1, CD59, CFLAR, CHST11, CIB1, CYR61, FGF2, FIGNL1, FLNA, GLI2, GRINA, HERPUD1, HSPA1B, ICAM1, IL31RA, IL6ST, IRS2, ITGAV, ITGB1, JUN, KIF14, KLF4, MALT1, MAP2K4, MYC, NAA15, NFKB1, NFKBIA, NOTCH2, NR4A1, NRG1, NUAKE2, PEA15, PIM1, PPIF, PRKAA2, PRKDC, PSMC1, RAD18, REL, SCRT2, SIAH2, SMAD3, SOCS2, SOD2, SQSTM1, TGFA, TMBIM1, TMEM109, TNFAIP3, TNFRSF10A, TRAF2, VHL, WNT9A, YBX3
División celular	2,2	3,90E-06	AHCTF1, ANLN, ASPM, ASUN, AURKB, CCND1, CCNF, CD2AP, CDC20, CDCA4, CDCA8, CDK6, CENPA, CENPE, CIB1, ECT2, FGF2, HAUS2, INO80, KIF14, KIF20B, LATS2, MYC, MYH9, NCAPG, NCAPH, NR3C1, PARD6B, PDGFB, PDS5A, PPP1R1C, PRC1, RBBP8, SKA1, SMC3, SPDL1, STAG2, SVIL, TGFA, TUBA1C, UBE2C, USP16
96 horas – Genes subexpresados			
Términos	FE	p	Genes
Desarrollo del corazón	2,2	6,50E-05	ADAM19, ARMC4, BMP4, CAMK2D, CPE, EFN2, FGF9, FHOD3, FOXC1, GPER1, GRHL2, HES1, HEXIM1, ID1, ID2, ID3, JAG1, NEBL, PDLIM5, PITX2, PKD2, PPARA, PPARG, RYR1, SCUBE1, SMAD6, SOX4, SOX9, SPARC, TEAD2, WNT3A
Regulación de la secreción celular	2	1,10E-04	ANXA1, CACNA1A, CACNA1G, CACNA2D2, CARD8, CD58, CDK5, DOC2A, DPYSL2, GPER1, HADH, ICA1, IL17RB, IL1RAPL1, KCNN4, LGI3, LIF, MAOB, PLA2G6, PPP3CA, RAB27B, SLC2A1, SNCG, SOX4, SSTR5, SYT1, SYT17, SYT7, SYTL1, TCF7L2, TIAM1, TNFRSF21, TRPV6, VSNL1, WLS
Desarrollo de la estructura del músculo	2	3,50E-04	ARID5B, BMP4, BTG2, CACNA2D2, CAMK2D, CDK5, EFN2, EGR1, ETV1, FGF9, FHOD3, FLOT1, FOXC1, GPER1, HDAC4, HES1, ID3, JAG1, LIF, LUC7L, MKX, NEBL,

			NEK5, OBSCN, OLFM2, PDLIM5, PITX2, PPP3CA, RYR1, SOX9, TCF7L2, WNT3A
Proceso metabólico de ácidos orgánicos	1,9	1,60E-05	AASS, ACOT11, ACSF2, ACSL1, ACSL3, ACSL5, ACSM3, ACSS2, ADSSL1, ALDH3A2, ALDH5A1, ALDH7A1, ANXA1, CACNA1A, CBR4, CSAD, CYB5A, CYP4F12, D2HGDH, DECR1, ECHDC2, FABP6, FN3K, GBA2, GGT7, GSTM2, HADH, HDAC4, HLCS, IDH1, LTA4H, MGST2, MLXIPL, MTHFR, OGDHL, PADI3, PCCA, PLA2G4B, PPARA, PPARG, SCD, SLC1A3, SLC27A1, SLC2A1, SUOX, TST, TYSND1, UROS
Secreción celular	1,9	1,80E-05	ABCA12, ANK1, ANXA1, BAIAP3, CACNA1A, CACNA1G, CACNA2D2, CARD8, CD58, CDK5, DOC2A, DPYSL2, EPHB6, FZD4, GPER1, HADH, ICA1, IL17RB, IL1RAPL1, KCNN4, LGI3, LIF, MAOB, NISCH, OLFM2, PCDH7, PLA2G6, PPP3CA, RAB27B, SERPINE2, SLC1A1, SLC1A3, SLC2A1, SNCG, SOX4, SPARC, SSTR5, SYT1, SYT17, SYT7, SYTL1, TCF7L2, TIAM1, TIMP3, TMSB4X, TNFRSF21, TRPV6, VAMP1, VSNL1, WLS
Regulación positiva de transporte	1,8	1,90E-04	ABCA12, ACSL3, ANK3, ANXA1, ATP2C2, ATP8A1, BDKRB1, BMP4, CACNA1G, CARD8, CD58, CDH1, CDK5, DNM1, DPYSL2, FLOT1, GLRX, GPER1, GSTM2, HES1, IL17RB, ITGAX, KCNN4, LGALS3, MICALL2, NTF3, OPR1, PCSK9, PKD2, PLA2G6, PPARG, PPP3CA, PRSS8, RAB27B, RHOU, SGK2, SLC26A6, SOX4, SYT1, SYT7, TCF7L2, VSNL1, WLS, WNK4, WNT3A
Proceso metabólico de lípidos celulares	1,8	6,20E-05	ACOT11, ACP6, ACSF2, ACSL1, ACSL3, ACSL5, ACSM3, ACSS2, ALDH3A2, ALDH5A1, ANXA1, ARSD, CAT, CBR4, CHKB, CYP3A5, CYP4F12, DECR1, ECHDC2, FABP6, FDFT1, FGF17, FGF9, GBA2, GGT7, GPC2, GSTM2, HADH, IDH1, INPP5D, IP6K2, KITLG, LTA4H, MGST2, MLXIPL, ORMDL3, PCCA, PCSK9, PLA2G4B, PLA2G6, PLCB2, PPARA, PPARG, RETSAT, SCD, SERINC5, SH3YL1, SLC27A1, SMPDL3B, ST6GALNAC2, TYSND1

Tabla suplementaria 4: Rutas enriquecidas en el conjunto de genes diferencialmente expresados en cada condición experimental. Detalle de la Tabla 12. El análisis se llevó a cabo a partir de la base de datos KEGG Pathway con la herramienta informática DAVID. Se incluyen las rutas enriquecidas, su enriquecimiento o *fold enrichment* (FE), significación estadística (p, puntuación EASE, test exacto de Fisher modificado) y los genes pertenecientes a cada ruta enriquecida.

siE2F1/2 - 24 horas			
Rutas	FE	p	Genes
Vía señalización p53	5,5	5,50E-04	CCND3, CCNE2, CDK1, CDK6, RRM2, RRM2B, SERPINE1, THBS1
Cáncer pancreático	4,3	1,30E-02	BRCA2, CDK6, E2F1, E2F2, PIK3R1, RALA
Ciclo celular	4,1	3,10E-04	CCND3, CCNE2, CDC7, CDK1, CDK6, CDKN2C, E2F1, E2F2, SKP2, WEE1, YWHAH
Cáncer de pulmón de células pequeñas	3,8	9,70E-03	BIRC3, CCNE2, CDK6, E2F1, E2F2, PIK3R1, SKP2
Meiosis ovocitaria	3,3	9,80E-03	CCNE2, CDK1, CPEB2, CPEB4, FBXO5, PPP2R1B, REC8, YWHAH
Vía señalización Hippo	2,4	4,40E-02	ACTB, CCND3, FZD6, PPP2R1B, SERPINE1, TEAD1, WNT3A, YWHAH
MicroRNAs en cáncer	1,9	4,40E-02	CCNE2, CD44, CDK6, DICER1, E2F1, E2F2, MET, PIM1, RPS6KA5, THBS1, TNC, WNT3A
siE2F1/2 - 48 horas			
Términos	FE	p	Genes
Cáncer de vejiga	3,4	4,90E-04	CCND1, CDH1, DAPK1, E2F1, E2F2, EGFR, FGFR3, MAPK1, MDM2, RASSF1, THBS1, TP53
Vía señalización p53	3,3	8,40E-06	CCNB1, CCNB3, CCND1, CCND3, CCNE2, CDK1, CDK6, CHEK2, MDM2, PERP, PMAIP1, RRM2, RRM2B, SERPINB5, SERPINE1, SFN, THBS1, TP53, TP53I3
Uniones adherentes	3	7,40E-05	ACTB, ACTG1, CDC42, CDH1, CTNNA1, EGFR, FARP2, FGFR1, IGF1R, LMO7, MAPK1, MET, PTPN1, SNAI2, SORBS1, SSX2IP, VCL, WASF3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	2,6	2,50E-04	CCND1, CCNE2, CDK6, COL4A5, E2F1, E2F2, ITGA2, ITGA3, ITGB1, LAMA3, LAMA4, LAMB3, LAMC1, LAMC2, PIK3R1, PTK2, SKP2, TP53, TRAF2
Invasión bacteriana de células epiteliales	2,5	7,90E-04	ACTB, ACTG1, ARHGEF26, CAV2, CDC42, CDH1, CLTB, CLTC, CRK, CTNNA1, ILK, ITGB1, MET, PIK3R1, PTK2, PXN, VCL
Cáncer pancreático	2,5	3,00E-03	CCND1, CDC42, CDK6, E2F1, E2F2, EGFR, MAPK1, MAPK9, PIK3R1, RAD51, RALB, RALBP1, STAT3, TP53
Vía señalización VEGF	2,5	5,00E-03	CDC42, HSPB1, MAPK1, MAPK13, MAPKAPK2, MAPKAPK3, NFATC2, NOS3, PIK3R1, PPP3CB, PTK2, PXN, SPHK1

siE2F1/2 – 96 horas			
Términos	FE	p	Genes
Uniones adherentes	3,5	5,60E-04	ACTG1, ACTN4, EGFR, FARP2, IGF1R, MAPK1, MET, PTPN1, SMAD3, SNAI2, TJP1, VCL
Metabolismo central del carbono en cáncer	3,2	3,50E-03	EGFR, FGFR3, G6PD, HK1, HKDC1, MAPK1, MET, RET, SLC1A5, SLC2A1
Interacciones receptor-matriz extracelular	2,8	3,10E-03	CD44, COL27A1, COL6A1, HMMR, ITGA2, ITGA7, ITGB1, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LAMC2, LAMC3
Proteoglicanos en cáncer	2,8	3,50E-06	ACTG1, ANK1, ANK2, CASP3, CCND1, CD44, CTSL, EGFR, EZR, FGF2, FLNA, FLNB, FLNC, IGF1R, ITGA2, ITGB1, ITPR3, MAPK1, MET, PLCE1, PRKCG, PTPN11, PXN, STAT3, WNT11, WNT16, WNT9A
Adhesión focal	2,7	6,20E-06	ACTG1, ACTN4, CAPN2, CCND1, COL27A1, COL6A1, CRK, EGFR, FLNA, FLNB, FLNC, IGF1R, ITGA2, ITGA7, ITGB1, JUN, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LAMC2, LAMC3, MAPK1, MET, PGF, PRKCG, PXN, VCL
Vía señalización Wnt	2,6	1,30E-02	CCND1, DKK1, FOSL1, FRAT2, GPC4, JUN, PLCB2, PRICKLE1, PRKCG, TBL1XR1, WNT11, WNT16, WNT9A
Ciclo celular	2,6	9,20E-04	ABL1, CCND1, CCNE2, CDC23, E2F1, E2F2, MCM2, MCM5, MCM6, MCM7, ORC3, PKMYT1, RBL1, SFN, SMAD3, TTK
TNFα – 24 horas			
Términos	FE	p	Genes
Vía señalización TNF	5,3	3,50E-08	BCL3, BIRC2, BIRC3, CFLAR, CSF1, CXCL1, EDN1, ICAM1, JAG1, JUN, JUNB, MAP2K3, MAP2K6, NFKB1, NFKBIA, TNFAIP3, TRAF1, TRAF3
Vía señalización NF-κB	5	3,10E-06	BIRC2, BIRC3, CFLAR, ICAM1, MALT1, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, PLAU, RELB, TICAM1, TNFAIP3, TRAF1, TRAF3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	4	3,40E-04	BIRC2, BIRC3, CCND1, ITGA2, ITGA2B, LAMB3, LAMC2, NFKB1, NFKBIA, TRAF1, TRAF3
Diferenciación osteoclástica	3,6	6,50E-05	CSF1, CYLD, FOSB, FOSL1, IFNGR2, JUN, JUNB, MAP2K6, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, OSCAR, PPP3CA, RELB, SQSTM1
Infección virus Epstein-Barr	3,3	4,70E-04	HLA-A, HLA-B, ICAM1, JUN, MAP2K3, MAP2K6, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, RELB, TNFAIP3, TRAF3
Vía señalización Rap1	3,3	2,80E-06	ANGPT2, CALML6, CDH1, CSF1, FGF1, FGF17, FGF9, GRIN2B, ID1, ITGA2B, ITGAM, KITLG, MAP2K3, MAP2K6, PDGFB, PLCB1, PLCB4, RASGRP3, RRAS, SIPA1L3, SKAP1, TIAM1
Melanogénesis	3,1	4,40E-03	CALML6, EDN1, FZD9, KITLG, PLCB1, PLCB4, PRKACB, TCF7L2, WNT16, WNT3A

TNFα – 48 horas			
Términos	FE	p	Genes
Vía señalización NF- κ B	8,7	3,80E-07	BIRC2, BIRC3, CFLAR, MALT1, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, PLAU, RELB, TNFAIP3, TRAF3
Vía señalización receptor tipo NOD	7,4	1,20E-03	BIRC2, BIRC3, CXCL1, NFKB1, NFKBIA, TNFAIP3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	7,3	2,70E-05	BIRC2, BIRC3, CDK6, ITGAV, LAMB3, LAMC2, NFKB1, NFKBIA, TRAF3
Vía señalización adipocitoquinas	6,9	4,80E-04	IRS2, LEPR, NFKB1, NFKBIA, NFKBIE, PRKAA2, SLC2A1
Vía señalización TNF	6,4	2,10E-05	BIRC2, BIRC3, CFLAR, CXCL1, JAG1, MAP2K4, NFKB1, NFKBIA, TNFAIP3, TRAF3
Apoptosis	5,5	1,20E-02	BIRC2, BIRC3, CFLAR, NFKB1, NFKBIA
Infección virus Epstein-Barr	4,5	1,80E-03	MAP2K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, RELB, TNFAIP3, TRAF3
TNFα – 96 horas			
Términos	FE	p	Genes
Cáncer de pulmón de células pequeñas	2,9	1,90E-04	APAF1, BIRC2, BIRC3, CCND1, CDK6, ITGA6, ITGAV, ITGB1, LAMB1, LAMB3, LAMC1, LAMC2, MYC, NFKB1, NFKBIA, TRAF2, TRAF3
Infección virus Epstein-Barr	2,6	7,60E-05	CD44, CD58, HLA-A, ICAM1, JUN, MAP2K3, MAP2K4, MYC, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, PSMC1, PSMC2, PSMC4, PSMD11, PSMD14, RELB, TNFAIP3, TRAF2, TRAF3, VIM
Vía señalización NF- κ B	2,5	2,30E-03	BIRC2, BIRC3, CFLAR, ICAM1, LAT, MALT1, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, PLAU, RELB, TICAM1, TNFAIP3, TRAF2, TRAF3
Vía señalización adipocitoquinas	2,5	7,80E-03	ACSL1, ACSL3, ACSL5, IRS2, NFKB1, NFKBIA, NFKBIE, PPARA, PRKAA2, PTPN11, SLC2A1, TRAF2
Vía señalización TNF	2,4	9,40E-04	BIRC2, BIRC3, CFLAR, CREB3L2, CSF1, CXCL1, ICAM1, JAG1, JUN, LIF, MAP2K1, MAP2K3, MAP2K4, NFKB1, NFKBIA, TNFAIP3, TRAF2, TRAF3
Apoptosis	2,3	2,50E-02	APAF1, BIRC2, BIRC3, CAPN2, CFLAR, NFKB1, NFKBIA, TNFRSF10A, TNFRSF10D, TRAF2
Proteoglicanos en cáncer	2,3	1,40E-05	ACTB, ACTG1, ANK1, ANK3, CAMK2D, CAV1, CAV2, CCND1, CD44, FGF2, FLNA, FLNC, FZD4, HBEGF, ITGAV, ITGB1, ITPR3, MAP2K1, MSN, MYC, PDCD4, PLAU, PTPN11, RPS6, RPS6KB2, RRAS, SDC4, TIAM1, TIMP3, WNT10B, WNT3A, WNT9A

Tabla suplementaria 5: Expresión diferencial de diversos genes implicados en el fenotipo EMT tras el silenciamiento de E2F1/2 o tratamiento con TNF α . Se muestra el nivel relativo sobre el siCTRL (DESeq2) de cada gen a las 24, 48 y 96 horas tras los tratamientos. En rosa, datos de sobreexpresión. En azul datos de subexpresión. "sc", sin cambio.

Genes	siE2F1/2			TNF α		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
ACTB	0,39	0,36	sc	sc	sc	1,32
ACTG1	sc	1,36	1,33	sc	sc	1,33
CDH1	sc	1,35	sc	0,71	0,47	0,44
CDH3	sc	sc	sc	sc	0,66	sc
ITGA2B	sc	sc	sc	0,27	sc	sc
ITGA3	sc	1,25	sc	sc	sc	sc
ITGA6	sc	sc	sc	sc	sc	0,52
ITGA7	sc	sc	0,58	0,66	sc	sc
ITGAM	sc	sc	sc	2,49	sc	sc
ITGAV	sc	sc	sc	sc	1,66	1,38
ITGAX	sc	sc	0,49	sc	sc	0,41
ITGB1	sc	1,55	1,60	sc	sc	1,62
ITGB4	sc	1,53	sc	sc	sc	0,58
PTK2	sc	1,23	sc	sc	sc	sc
PTK6	sc	1,94	sc	sc	sc	sc
PTPN14	sc	1,64	1,35	sc	sc	sc
SNAI1	sc	sc	sc	sc	sc	sc
TWIST1	sc	sc	sc	sc	sc	sc
ZEB1	sc	sc	sc	sc	sc	sc
ZEB2	sc	sc	sc	sc	sc	sc