



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Evaluación del papel funcional de la proteína p32 en la promoción del fenotipo maligno en células de cáncer de colon”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Msc. Carlos Alejandro Egusquiza Alvarez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
[Facultad de Química, UNAM](#)

Dr. Enrique Ortega Soto
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Abril, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

p32 es una proteína multifuncional y multicompartamental que se encuentra sobreexpresada en múltiples adenocarcinomas, incluyendo los tumores malignos de colon. Altos niveles de expresión de p32 se han correlacionado con un mal pronóstico en cáncer colorrectal. Sin embargo, las funciones ejercidas por p32 en células de cáncer de colon no han sido caracterizadas. En el presente trabajo demostramos que p32 está sobreexpresada en células de cáncer de colon cuando se compara con células no malignas de colon. Las células cancerosas de colon también presentan niveles superiores de la proteína en el núcleo y en el sobrenadante en comparación con los niveles encontrados en células no malignas. Demostramos que p32 regula los niveles de expresión de genes estrechamente relacionados con el fenotipo maligno tales como *HAS-2* y *PDCD4*. Notablemente, se observó que el knockdown de p32 afecta negativamente la activación de la vía de señalización Akt/mTOR, inhibe la capacidad de migración de células malignas de colon y las sensibiliza a la muerte celular inducida por estrés oxidativo y por agentes quimioterapéuticos, pero no a la muerte producida por estrés nutricional. Adicionalmente, el knockdown de p32 disminuyó significativamente la capacidad clonogénica y la tumorigénesis *in vivo* en un modelo de xenotransplante murino de células de cáncer de colon. Además, encontramos que la inhibición farmacológica de p32 con el inhibidor intracelular M36 o con el Ac.M. 60.11 afectan negativamente diferentes rasgos de malignidad de las células de cáncer de colon tales como viabilidad, proliferación y clonogenicidad. En conjunto, nuestros resultados demuestran que p32 es un promotor esencial del fenotipo maligno en células de cáncer colorrectal y una diana terapéutica potencial para el tratamiento de este tipo de cáncer.

Palabras clave: p32/gC1qR/HABP1, cancer colorrectal, expresión génica, vía Akt/mTOR, migración, muerte celular, colonogénesis, tumorigénesis, inhibición farmacológica.

Abstract

p32 is a multifunctional and multicompartamental protein found upregulated in multiple adenocarcinomas, including colorectal malignancy. High levels of p32 expression have been correlated with poor prognosis in colorectal cancer. However, the functions performed by p32 in colorectal cancer have not been characterized. Here we show that p32 is overexpressed in colorectal cancer cell lines compared to non-malignant colon cells. Colon cancer cells also display higher nuclear and secreted levels of p32 than the levels found in non-malignant cells. Moreover, we demonstrate that p32 regulates genes' expression levels tightly related to malignant phenotypes such as *HAS-2* and *PDCD4*. Remarkably, we demonstrate that knockdown of p32 negatively affects Akt/mTOR signaling activation, inhibits colon malignant cells' migration ability, and sensitizes them to cell death induced by oxidative stress and chemotherapeutic agents, but not to cell death produced by nutritional stress. In addition, the knockdown of p32 significantly decreased clonogenic capacity and *in vivo* tumorigenesis in a xenograft mice model of colon cancer cells. Furthermore, we found that the pharmacological inhibition of p32 with the intracellular inhibitor M36 or with the Mab 60.11 negatively affects malignancy traits such as viability, proliferation and clonogenicity of colon cancer cells. Altogether, our results demonstrate that p32 is an essential promoter of malignant phenotype in colorectal cancer cells and a potential therapeutic target for the treatment of this type of cancer.

Keywords: p32/gC1qR/HABP1, colorectal cancer, genic expression, Akt/mTOR pathway migration, cell death, clonogenesis, tumorigenesis, pharmacological inhibition

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1. Cáncer.....	1
1.1.1. Características generales del Cáncer.....	1
1.1.2. Cáncer colorrectal	2
1.2. Descubrimiento de p32	3
1.3. Estructura y propiedades bioquímicas de p32	4
1.4. Gen <i>C1QBP</i>	6
1.5. Localización subcelular de p32.....	8
1.6. Ligandos.....	10
1.7. Funciones biológicas de p32	14
1.7.1. Regulación del metabolismo y la dinámica mitocondrial	14
1.7.2. Regulación de la apoptosis.....	17
1.7.3. Regulación del splicing y otras funciones nucleares	18
1.7.4. Papel en infección, respuesta inmune e inflamación.	19
1.7.5. Papel en señalización celular	21
1.8. Papel de p32 en cáncer	24
1.9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
Objetivos Específicos.....	30
2. Materiales y métodos	31
2.1. Anticuerpos y reactivos.....	31
2.2. Líneas celulares	31
2.3. Obtención de células knockdown de p32	32
2.4. Western blot.....	32
2.5. Fraccionamiento subcelular y determinación de p32 en el sobrenadante.....	32
2.6. RT-PCR	33
2.7. Microscopía confocal de Inmunofluorescencia	33
2.8. Citometría de flujo	34
2.8.1. Evaluación de los niveles de expresión intracelular y en la superficie celular de p32....	34

2.8.2. Ensayos de evaluación de proliferación con CFSE.....	34
2.9. Microarreglo de genes	34
2.10. Ensayos de migración por cierre de herida.....	35
2.11. Ensayos de viabilidad y análisis de apoptosis	35
2.12. Evaluación de las vías de señalización Akt/mTOR y de las MAP cinasas	36
2.13. Ensayos de formación de colonias	37
2.14. Ensayos de tumorigénesis en ratones desnudos	38
2.15. Análisis estadístico	38
3. Resultados	39
3.1. La proteína p32 se sobreexpresa en células de cáncer de colon con respecto a células no malignas de colon.....	39
3.2. El knockdown de p32 induce cambios en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo maligno en células de cáncer de colon RKO y SW480	42
3.3. El knockdown de p32 afecta negativamente la activación de la vía de señalización Akt/mTOR en células de cáncer de colon RKO y SW480.....	45
3.4. El knockdown de p32 afecta la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon RKO y SW480	48
3.5. El knockdown de p32 sensibiliza a las células RKO y SW480 a la muerte inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos, pero no a la muerte inducida por estrés nutricional...	49
3.6. El knockdown de p32 afecta la capacidad clonogénica y tumorigénica de las células de cáncer de colon RKO y SW480	55
3.7. La inhibición farmacológica de p32 afecta negativamente el fenotipo maligno de las células de cáncer de colon	57
3.7.1. El inhibidor farmacológico M36 afecta la viabilidad y capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon RKO, HCT116, SW480 y SW620.....	57
3.7.2. El inhibidor farmacológico M36 ejerce un efecto citostático sobre las células de cáncer de colon RKO	61
3.7.3. El inhibidor farmacológico M36 inhibe la activación de las vías de señalización Akt-mTOR y MAPK en células de cáncer de colon RKO	64
3.7.4. El inhibidor farmacológico M36 afecta negativamente la expresión de proteínas claves en la regulación de la dinámica mitocondrial en células de cáncer de colon RKO	66
3.7.5. El anticuerpo monoclonal 60.11 afecta negativamente la viabilidad y capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon de origen metastásico SW620.....	67
4. Discusión	68
5. Conclusiones.....	72
6. Perspectivas	73
8. Referencias bibliográficas	74

1. Introducción

1.1. Cáncer

1.1.1. Características generales del Cáncer

El cáncer constituye en la actualidad una de las primeras causas de muerte a nivel mundial tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Las predicciones epidemiológicas realizadas sugieren que las cifras de pacientes aquejados de esta enfermedad aumentarán hasta el doble en los próximos 50 años, si se mantienen las tendencias encontradas hasta el momento (1). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer estima que globalmente 1 de cada 5 personas desarrollan cáncer durante su vida. Solamente en el 2020, más de 19 millones de personas fueron diagnosticados con dicha enfermedad y más de 9.9 millones de personas fallecieron a causa de ésta a nivel mundial (2). Todos estos datos epidemiológicos dejan clara la necesidad de continuar estudiando y profundizando en las causas y mecanismos patofisiológicos de la aparición y la progresión de esta penosa enfermedad.

La OMS define al cáncer como un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos. A nivel celular y molecular está bien definido que, a pesar de la gran diversidad de genotipos y fenotipos existentes, los tumores malignos presentan una serie de características que son comunes a casi todos si no a todos los tipos de cáncer. Entre las principales características de los tumores se encuentran: el sostenimiento de señales de proliferación, la evasión de supresores del crecimiento, el desarrollo de mecanismos de resistencia a la muerte celular, el desarrollo de inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, así como la activación de mecanismos de invasión y metástasis. Otros rasgos no menos importantes comunes a la mayoría de los tipos de cáncer son la desregulación del metabolismo energético celular y la evasión del sistema inmune. Adicionalmente, se conoce que en la base de todos estos rasgos se encuentran la inestabilidad genómica y la alta tasa de mutación en las células cancerosas; así como la inflamación promovida por el tumor. Igualmente, se ha encontrado suficiente evidencia de que los componentes celulares y moleculares del microambiente tumoral son claves en la progresión del cáncer (3). Recientemente, se han propuesto como nuevos rasgos comunes de los tumores malignos: la reprogramación epigenética no mutacional y el desbloqueo de la plasticidad fenotípica. Además, se propone que la existencia de los microbiomas polimórficos y las células senescentes en el microambiente tumoral

tienen una influencia crucial en la aparición y progresión de los tumores malignos (4). En resumen, a pesar de la gran diversidad que existe entre los diferentes tipos de tumores malignos, al punto de considerarse como un grupo de enfermedades y no una enfermedad única, existen una serie de rasgos moleculares y celulares que son comunes a todos los tipos de cáncer (Figura 1.1). El hallazgo de nuevas moléculas que promuevan estos rasgos de malignidad es crucial, ya que permite encontrar nuevos blancos terapéuticos para su tratamiento.

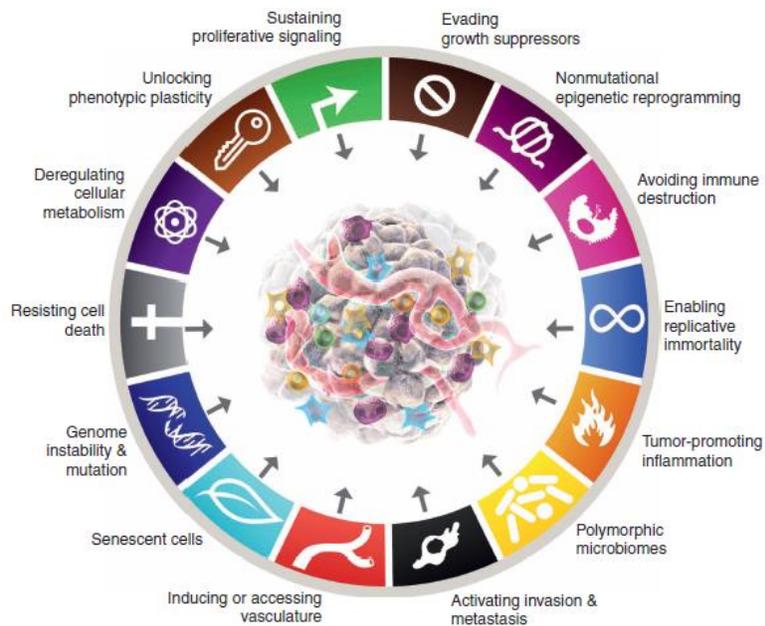


Figura 1.1. Rasgos distintivos del cáncer (Tomado de Hanahan, 2022).

1.1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es una enfermedad que incluye a los tumores malignos que se desarrollan en todos los segmentos del intestino grueso (colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide) y en el recto. En la actualidad esta enfermedad constituye el tercer tipo de cáncer más frecuente (10% de los casos detectados) y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo (9,4% de las muertes por cáncer) según datos publicados por GLOBOCAN a finales del 2020 (2). La quimioterapia y la cirugía constituyen actualmente las principales estrategias terapéuticas existentes para el cáncer colorrectal. Sin embargo, para muchos pacientes, principalmente en etapas avanzadas de la enfermedad, las terapias clásicas establecidas no son suficientes. Esto conlleva en muchos casos a la muerte de los pacientes. Es por ello, que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es crucial. En este sentido, las terapias dirigidas constituyen nuevas alternativas prometedoras. En éstas, la

estrategia es inhibir de manera específica por diferentes vías a moléculas que son claves para la promoción del fenotipo maligno. El desarrollo de inhibidores de varias moléculas oncogénicas como el EGF o el VEGF se ha implementado con éxito en la terapia del cáncer colorrectal. Sin embargo, no son suficientes y es esencial el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar nuevas terapias dirigidas contra este tipo de tumores malignos (5). Precisamente, en el presente trabajo nos hemos propuesto realizar una caracterización de las funciones de una proteína denominada p32/gC1qR/HABP1 en la promoción del fenotipo maligno en cáncer de colon.

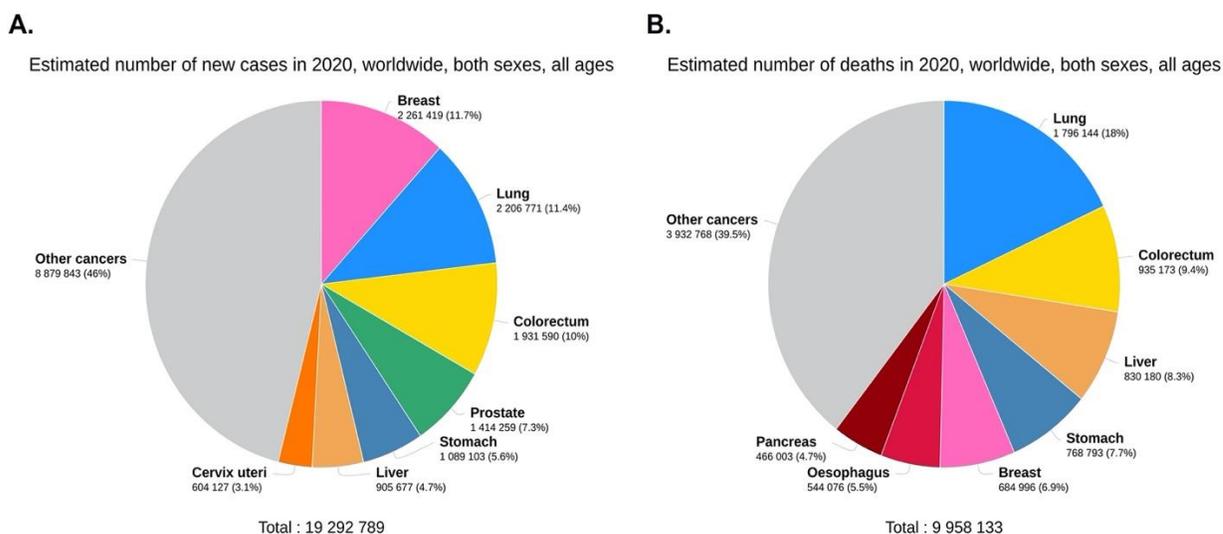


Figura 1.2. El cáncer colorrectal constituye el tercer tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado a nivel mundial (10% de los casos) (A) y la segunda causa de muerte por cáncer (9.4% de las muertes) (B). (Tomado de GLOBOCAN, 2020).

1.2. Descubrimiento de p32

La proteína p32 fue descubierta por tres grupos de investigación de manera independiente, debido a su capacidad de interactuar con diferentes ligandos. Por ello, la proteína tiene varios nombres y está reportada en la literatura de manera indistinta como p32, gC1qR, HABP1 o C1QBP. D'Souza y Datta, en el año 1985, purificaron dicha proteína a través de columnas de afinidad por ácido hialurónico a partir de hígado y cerebro de ratas adultas (6,7). Posteriormente Datta y su grupo de investigación la purificaron a partir de riñón de rata y realizaron una caracterización parcial de sus propiedades bioquímicas. Debido a que la encontraron por su capacidad de unir ácido hialurónico la denominaron Proteína de unión a ácido hialurónico-1 (HABP-1) (8). Igualmente, Krainer y

colaboradores co-purificaron a esta proteína junto con el factor de splicing ASF/SF2 en el año 1991 y la denominaron p32 debido a su peso aparente de 32 kDa en electroforesis SDS-PAGE (9). Por otro lado, Berhane Ghebrehiwet y colaboradores, quienes trabajaban en la búsqueda de los receptores de C1q (proteína que inicia la vía clásica de activación del sistema del complemento), encontraron una proteína que se expresa en la membrana de las células Raji (línea celular de linfocitos B), que se une específicamente a la cabeza globular de C1q y tiene capacidad de inhibir la lisis de eritrocitos mediada por el complemento. Dicha proteína fue aislada y su cDNA fue clonado por el mencionado grupo de investigación, quien la denominó Receptor de la cabeza globular de C1q (gC1qR) (10). Interesantemente, gC1qR, p32 y HABP1, a pesar de haber sido encontradas en escenarios biológicos muy diferentes, son una misma proteína, con secuencia aminoacídica idéntica y codificadas por el mismo gen (10,11).

1.3. Estructura y propiedades bioquímicas de p32

La proteína p32 se sintetiza como una pre-proteína de 282 residuos aminoacídicos. Posterior a su síntesis sufre un proceso de maduración por corte proteolítico de 73 residuos en su extremo N-terminal, quedando como una proteína madura de 209 residuos aminoacídicos (10,12). La proteína madura es altamente cargada y acídica, con un punto isoeléctrico calculado de 4.15. Esto es debido a que hay un predominio de aminoácidos ácidos en la variante madura (28 (Glu), 20 (Asp) vs 16 (Lys), 5 (His) y 4 (Arg)), lo cual contrasta con la región N-terminal cortada de la pre-proteína donde no se encuentra ningún residuo de cadena lateral acídica, pero sí 11 residuos de Arginina. La proteína madura presenta una única Cys, por lo que no es posible que forme enlaces disulfuro intracatenarios. Su peso molecular en electroforesis SDS-PAGE es de aproximadamente 32 kDa, a diferencia del peso calculado por su secuencia aminoacídica que es de 24.3 kDa. Este retraso en la migración en SDS-PAGE se atribuye a la gran cantidad de aminoácidos polares con carga negativa que presenta la proteína. Además, en su secuencia existen 3 sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 114 (Asn-Gly-Thr), 136 (Asn-Asn-Ser) y 223 (Asn-Tyr-Thr) (8,10). De hecho, se ha demostrado en células Raji que la poza de membrana plasmática de p32, a diferencia de la poza intracelular, da positiva para una tinción PAS (del inglés Periodic Acid Schiff), así como que es sensible a la digestión con endoglicosidasas H y F. Evidencias que prueban que la variante de superficie celular de la proteína se encuentra N-glicosilada (13).

La cristalización y determinación de la estructura 3D de p32 en el año 1999 por Jiang y colaboradores marca un antes y un después en el entendimiento de la estructura de la proteína. Estos

autores reportan la estructura del cristal de p32 determinada a 2.25 Å de resolución. El análisis revela que p32 adopta un plegamiento novel con 7 cadenas- β anti paralelas (designadas como β 1- β 7) que forman una hoja β antiparalela altamente retorcida, con la cadena β 1 en una posición casi perpendicular a β 7. Esta hoja β está flanqueada por una α -hélice N-terminal (α A) y 2 α -hélices C-terminal (α B y α C). Las tres α -hélices se localizan hacia el mismo lado de la hoja β . La hélice α B y la porción N-terminal de la hélice α C establecen extensas interacciones hidrofóbicas con la hoja beta, lo que permite estabilizar la estructura terciaria del monómero. También en este trabajo se demuestra que la proteína forma un homotrímero, donde los tres monómeros idénticos se asocian en una estructura cuaternaria en forma de dona con una distribución asimétrica de cargas en su superficie. A pesar de que la proteína es acídica, los residuos con carga negativa están predominantemente localizados hacia una cara de la dona y el poro, mientras que en la otra cara predominan los residuos no cargados o con carga positiva. Jiang y colaboradores proponen que esta asimetría de cargas pudiera tener implicaciones funcionales, teniendo cada lado de la dona funciones diferentes. El trímero en forma de dona tiene un diámetro exterior de aproximadamente 75 Å y un grosor de alrededor de 30 Å. El diámetro interno de la dona es de aproximadamente 20 Å, pero los lazos que conectan las cadenas β 6 y β 7 de cada monómero parcialmente cubren el poro, reduciendo el diámetro interior a unos 10 Å. Para el mantenimiento de la estructura cuaternaria, la hélice α A establece interacciones con la hélice α B antiparalela del monómero adyacente y la región C-terminal de la hélice α C se empaqueta contra la parte posterior de la hoja beta también del monómero adyacente. La mayoría de estas interacciones son de tipo hidrofóbicas, a excepción del par electrostático Arg 246- Asp 79. En resumen, la arquitectura del trímero se puede visualizar como si las hojas β formaran una bobina en forma de hiperboloide con las hélices α envolviéndolas a su alrededor y con una distribución asimétrica de cargas en su superficie.

En la estructura descrita por Jiang *et al.*, el único residuo de Cys (Cys-186) de la proteína no se encuentra accesible para la formación de enlaces disulfuro intercatenarios y por tanto, estos no parecen ser importante para la estabilidad del homotrímero (14). Sin embargo, Jha *et al.* demostraron en el año 2002 que, si bien las interacciones que se establecen entre las subunidades del homotrímero son del tipo no covalentes, hay una pequeña fracción de la proteína que se encuentra en forma de dímero de trímeros (hexamérica) y esta interacción entre dos trímeros se establece a través de puentes disulfuro que involucran a la Cys-186. Se plantea en este trabajo que bajo condiciones nativas (cercanas a pH 7.2 y a la fuerza iónica fisiológica), la proteína tiene un radio hidrodinámico mayor y por tanto la estructura es menos compacta que bajo las condiciones

usadas por Jiang *et al.* Con base en esto, sugieren que en condiciones fisiológicas cercanas a la normalidad, la Cys-186 puede estar expuesta y disponible para la formación de enlaces disulfuro que unan a dos trímeros (15).

Por otro lado, se ha encontrado que mutantes de p32 donde se llevan a cabo deleciones de las regiones 74-95, 204-218 y 212-223 se pliegan de manera incorrecta y son incapaces de formar el homotrímero. La región 74-95 en el extremo N-terminal forma parte de la estructura coiled-coil que previamente había sido reportada como esencial para las interacciones entre las subunidades del homotrímero. Las otras dos regiones mutadas forman parte de la cadena β_6 , así como del loop que une las cadenas β_6 y β_7 y que se proyecta hacia el interior del poro de la dona. El resultado anterior sugiere que esta región de la proteína es importante en el mantenimiento de la integridad del homotrímero. A diferencia de esto, las deleciones en los loops β_3 - β_4 , β_4 - β_5 y β_5 - β_6 no afectaron la integridad del homotrímero (16).

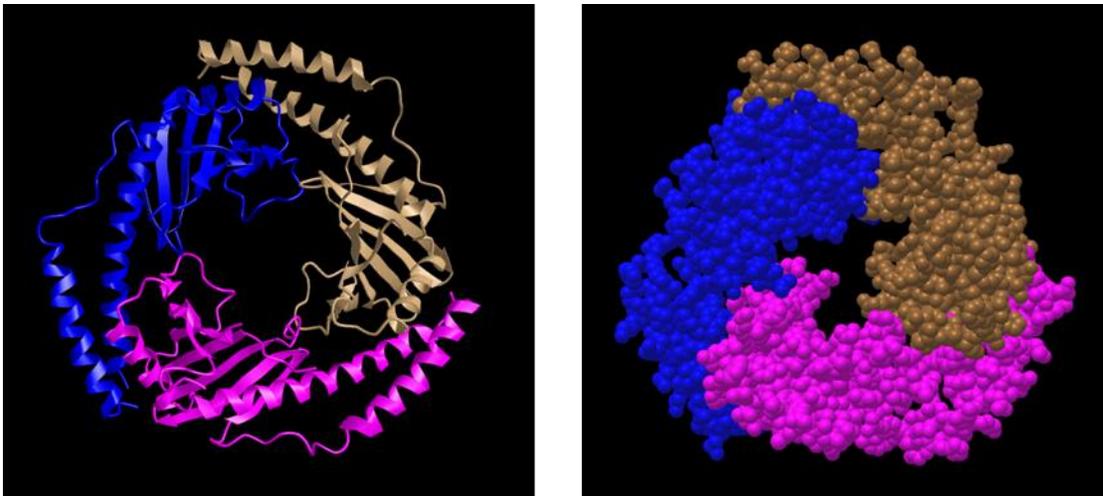


Figura 1.3. Estructura tridimensional en forma de dona de la proteína p32. La proteína es un homotrímero donde cada monómero (representado aquí en azul, marrón o violeta) está formado por una hoja beta altamente plegada, flanqueada por una hélice alfa en el extremo N-terminal y dos hélices alfa en el extremo C-terminal. (Tomado de PDB).

1.4. Gen *CIQBP*

El gen que codifica para la proteína p32 se denomina *CIQBP* (del inglés *Clq Binding Protein*), nombre que también es usado en publicaciones y bases de datos para referirse a la proteína. *CIQBP* tiene una longitud total de aproximadamente 6 kb y está constituido por 6 exones y 5 intrones. Se transcribe a un RNAm que luego de ser procesado tiene una longitud de 1.5 kb (17). El gen se encuentra ubicado en el cromosoma 11 en ratones (17) y en la banda 13.3 del brazo corto del

cromosoma 17 (17p13.3) en humanos (18,19). Interesantemente, la delección de partes o de toda la región cromosomal 17p es una de las anomalías más frecuentes en cáncer. Diversos genes supresores de tumor se encuentran en la misma región cromosomal que *CIQBP* (18).

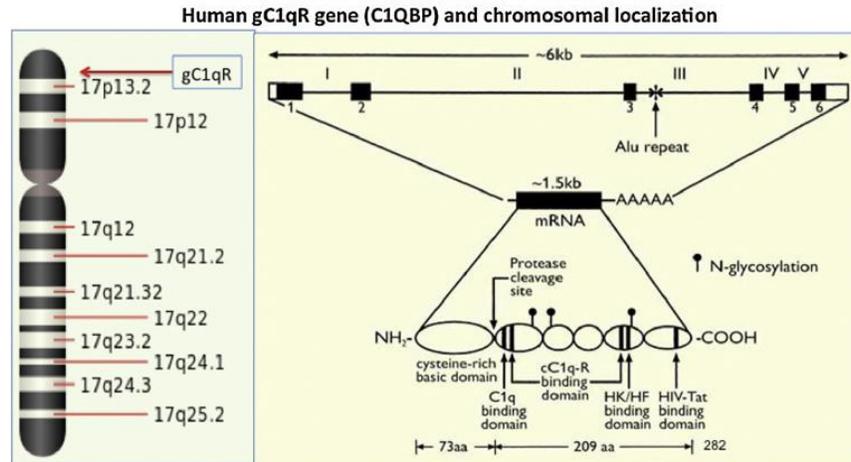


Figura 1.4. El gen que codifica para p32 (*CIQBP*) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 en humanos y está formado por 6 exones y 5 intrones de 6kb. Luego del splicing, el ARNm tiene un peso molecular de 1.5 kb. (Tomado de Ghebrehiwet & Peerschke, 2014)

El gen *CIQBP* está altamente conservado en la evolución en eucariontes. Se han encontrado homólogos de este gen en levaduras, *Caenorhabditis elegans*, rata, ratón, mono y humano (14,20). Además, la secuencia de cDNA de humanos y roedores presenta un 89.9% de identidad mientras que los genes de roedores tienen un 99% de identidad entre ellos, lo que refuerza el hecho de que *CIQBP* tiene un alto grado de conservación. Las diferencias entre las secuencias están principalmente confinadas hacia la región N-terminal mientras que en el extremo C-terminal hay una región de 60 residuos donde hay identidad total entre las 3 especies. Igualmente, los sitios de N-glicosilación se encuentran totalmente conservados (21). Por otro lado, se ha reportado la existencia de pseudogenes de *CIQBP* en humanos en los cromosomas 21, 15, 11 y 4. La existencia de un pseudogen de p32 se ha reportado también en ratones y ratas, con un 88 y 86% de homología con respecto al pseudogen humano del cromosoma 21 (22). La figura 1.5 muestra el alineamiento múltiple de secuencias de la proteína p32 donde se corrobora el alto grado de conservación de p32 y por tanto del gen *CIQBP* a lo largo de la evolución de los eucariontes. Este alto grado de conservación del gen en eucariontes sugiere que la proteína ha cumplido a lo largo de la evolución funciones celulares esenciales.

227 NTDSL**D**WAL**Y**D-HLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEH**Q**EYITFLEDLKS**F**VKS**Q**- 282 *Homo sapiens*
 226 NTDSL**D**WAL**Y**D-HLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEH**Q**EYITFLEDLKS**F**VKS**Q**- 281 *Gorilla gorilla*
 224 NTDSL**D**WAL**Y**D-HLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEH**Q**EYITFLEDLKS**F**VKS**Q**- 279 *Rattus norvegicus*
 224 NTDSL**D**WAL**Y**D-HLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEH**Q**EYITFLEDLKS**F**VKN**Q**- 279 *Mus musculus*
 215 NTDSL**D**WAL**Y**D-HLMDFLADRGVDNTFADELMELSTALEH**Q**EYIK**F**LEDLGT**F**VK**C**K- 270 *Danio rerio*
 207 AGD**V**LD**G**Y**L**Y**D**-LLINLLEEK**G**IS**Q**E**F**AEKLSDLATAHE**H**TSY**I**GLLEKLS**K**F**T**AG**G**k 263 *Drosophila melanogaster*
 181 S**G**K**Y**I**D**P**L**H**D**I**L**F**V**R**Y**L**E**E**R**G**L**D**A**R**F**C**K**T**L**V**A**Y**A**T**H**Y**E**H**S**Q**Y**V**G**L**L**D**K**I**K**F**I**S**K**-- 236 *Caenorhabditis elegans*

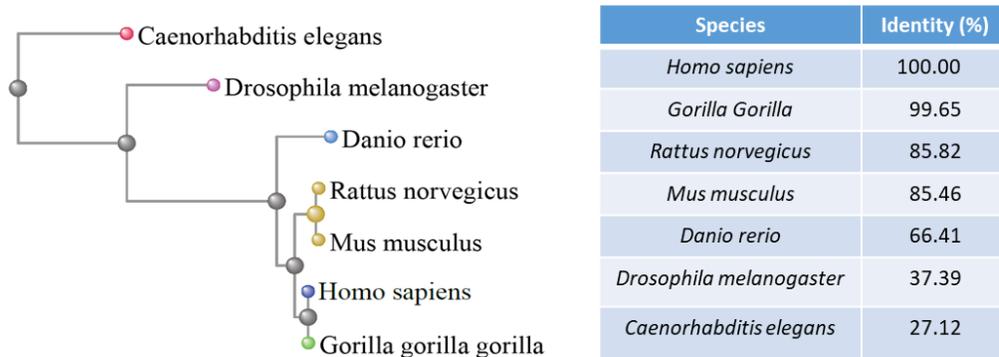


Figura 1.5. El gen C1QBP y la proteína que codifica (p32) se encuentran altamente conservados en la evolución de eucariontes. La figura muestra el resultado de un alineamiento múltiple de secuencias de p32 en organismos eucariontes representativos con su correspondiente árbol filogenético y la tabla de porcentajes de identidad. (Tomado de Egusquiza-Alvarez & Robles-Flores, 2022)

1.5. Localización subcelular de p32

La localización celular de p32 constituye uno de los temas más polémicos de discusión entre los diferentes grupos que la investigan. Los estudios iniciales apuntaban claramente a su presencia en membrana citoplasmática (10,11) y en núcleo (9). Sin embargo, una serie de evidencias generaron polémica sobre si p32 podía ser o no una proteína de superficie celular. Esto debido fundamentalmente a que en la secuencia aminoacídica de la proteína madura no existe ningún motivo de secuencia convencional compatible con un segmento transmembranaral, ni un sitio consenso para el anclaje a GPI (23,24). Además, la carencia de anclaje a GPI ha sido demostrada experimentalmente (23). Sumado a esto, se encontró que la región N-terminal que es escindida por procesamiento postraduccionaral proteolítico para dar lugar a la proteína madura, contiene una señal de localización a mitocondria. Adicionalmente, se demostró que p32 luego de su síntesis se transloca a mitocondria y que co-localiza con el marcador mitocondriaaral piruvato deshidrogenasa. Igualmente p32 se encuentra asociada a mitoplastos, lo que sugiere que la proteína madura de 209 aa, se encuentra en la matriz mitocondriaaral o asociada a la membrana mitocondriaaral interna (25).

Igualmente se encontró que Mam33p, el análogo de p32 en *Saccharomyces cerevisiae*, se localiza en mitocondria, donde juega un importante papel en el mantenimiento de la fosforilación oxidativa (20,26). Otros autores encuentran que la proteína se localiza principalmente en el citoplasma asociada a las mitocondrias, pero que también puede ser detectada en el núcleo en forma de gránulos y túbulos (27). De modo que pareciera poco probable que una proteína mitocondrial y nuclear, sin ningún segmento transmembranal, ni sitios de anclaje a GPI pudiera encontrarse en la superficie celular. Por lo que p32 empezó a considerarse por algunos autores como una proteína exclusivamente intracelular.

Sin embargo, existen evidencias que demuestran que la proteína sí se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática, al menos en ciertos tipos celulares: i- el marcaje de superficie de linfocitos B con un agente impermeable biotinilado mostró que la proteína p32 quedaba marcada con biotina, ii-Análisis por FACS y escaneo láser confocal microscópico con los anticuerpos específicos contra p32 (AcM 60.11 o 74.5.2) mostraron una tinción específica del 98% de las células Raji con más de un 95% de viabilidad. Además, análisis tridimensionales de las mismas células por microscopía confocal mostraron una distribución de la tinción que fue consistente con expresión en superficie, iii-p32 endotelial se une a I¹²⁵-HK de manera específica y esta unión es inhibida de manera dosis-dependiente por el AcM 74.5.2 que reconoce los residuos 204-218 de p32, iv-p32 nativa purificada de membrana de células Raji se encuentra glicosilada, a diferencia de la poza intracelular de la proteína, v-la expresión en superficie celular de p32 se incrementa por efecto de citocinas pro-inflamatorias como Interferón- γ y TNF- α . Toda esta evidencia deja en claro que p32 además de ser una proteína intracelular es también una proteína de superficie celular, localización desde la cual puede interactuar con múltiples ligandos extracelulares (13). Aun así, sigue siendo intrigante cómo la proteína se puede asociar a la membrana plasmática, teniendo en cuenta sus características estructurales. Se postula que lo haga a través de mecanismos no tradicionales, muy probablemente por interacción directa con proteínas integrales de membrana (24,28). Ghebrehiwet y colaboradores postulan, con base en el análisis de la estructura tridimensional de la proteína y la distribución asimétrica de los residuos aminoacídicos cargados, que una de las caras de la dona en la estructura cuaternaria, la que tiene predominio de cargas negativas, se encuentra mirando hacia el medio extracelular (la denomina cara S); mientras que la otra cara, neutral con ciertas cargas positivas, se encuentra hacia la monocapa externa de la membrana citoplasmática (la denomina cara M). Interesantemente, los sitios de unión de los ligandos extracelulares C1q, HK, HIV-Tat y proteína del core del HCV se encuentran

mayoritariamente distribuidos hacia la denominada cara S. Lo que es totalmente congruente con su hipótesis (29). Además, existen reportes que demuestran que la proteína se secreta y que cumple funciones como proteína soluble (8,13). La variante soluble de p32 se puede unir a la membrana de un modo específico y dosis-dependiente. Esta unión a la superficie celular se ve afectada cuando se llevan a cabo deleciones en los dominios 144-148, 174-180, 190-202 y 196-202, lo que sugiere fuertemente que estos dominios son claves para la unión de la proteína soluble a la superficie celular. Interesantemente, el dominio 174-180, que se encuentra hacia la cara M de la proteína, está altamente conservado en la evolución (16). Con base en todo lo descrito, se propone que p32 pertenece a una clase de proteínas inicialmente dirigidas a la mitocondria, pero posteriormente exportadas a diferentes compartimentos celulares a través de mecanismos específicos aún no entendidos del todo. A esta clase de proteínas se le ha designado como “proteínas celulares multifuncionales y multicompartamentales” (13).

1.6. Ligandos

Una de las características más notables de p32 es su capacidad de interactuar con una cantidad considerable de ligandos de diferente naturaleza y localización. Se ha demostrado su interacción con componentes de la matriz extracelular, proteínas del suero, de la superficie celular, citosólicas, mitocondriales, nucleares; así como con diferentes antígenos microbianos y virales (Ver Tabla 1).

Tabla 1.1-Principales ligandos reportados para la proteína p32 en sus diferentes localizaciones subcelulares

Ligandos	Función propuesta	Referencia
Ligandos extracelulares		
gC1q	Proteína que se une a inmunocomplejos e induce la activación de la vía clásica de la activación del complemento. p32, a través de la interacción con la cabeza globular de C1q, inhibe la actividad hemolítica mediada por el complemento.	(10)
Ácido hialurónico (HA)	Mucopolisacárido ácido de la matriz extracelular implicado en diferenciación celular, embriogénesis, transición epitelial-mesenchimal, reacciones inmunológicas y cáncer. p32, al igual que otras hialadherinas, está involucrada en varios procesos mediados por el HA como adhesión, migración, formación de tumores sólidos y señalización celular.	(30,31)
Fibrinógeno/Fibrina	p32 inhibe la polimerización de fibrina, evento molecular clave en el proceso de coagulación	(32)
Vitronectina	p32 y vitronectina podrían actuar de un modo cooperativo en procesos de cierre de herida y defensa inmunológica	(33)
H-kininógeno/Factor XII	p32 participa en el ensamblaje de la vía de formación de kinina en células endoteliales al servir como plataforma en la superficie celular para H-kininógeno y Factor XII	(34)
Lyp-1	Péptido autodirigido a tumor , p32 funciona como receptor del mismo y permite su internalización	(35)
Ligandos de membrana citoplasmática		
Calreticulina (CR)/ cC1qR	Calreticulina, proteína que se une al tallo (tipo colágeno) de C1q es capaz de formar complejos con p32/gC1qR y se puede asociar con ésta en la superficie celular. Ambos tienen capacidad de unirse a C1q por regiones diferentes, gC1qR por su cabeza globular y cC1qR por su tallo tipo colágeno.	(23)

CD44v6	p32 interactúa con CD44v6 en balsas lipídicas ricas en caveolina en células de cáncer de páncreas. Este complejo favorece la autofosforilación del receptor del factor de crecimiento insulinoide (IGFR) y la activación de las vías de transducción de señales río abajo de este receptor.	(36)
Integrina $\alpha_v\beta_3$	p32 exógena se adhiere a la superficie celular de células de melanoma a través de su interacción con la integrina $\alpha_v\beta_3$. Esta interacción induce río abajo la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF κ B, lo que promueve aumentos en los niveles de expresión de la metaloproteinas MT1-MMP y la consecuente activación de la metaloproteinas MMP-2.	(37)
Formación de complejos con cC1qR, integrinas y CD44	Se propone que gC1qR (p32) en complejo con cC1qR (calreticulina) (ambas proteínas que no contienen segmentos transmembranales) se puedan asociar con proteínas integrales de membrana como Integrinas y CD44 para activar vías río abajo y promover funciones una vez que se unen a su ligando extracelular C1q. En las células endoteliales se demuestra que estos complejos pueden mediar la adhesión y dispersión celular inducida por C1q.	(38)
mLgl-2 y PKCa	p32 forma un complejo con mLgl-2 y PKC atípicas (PKCa), aumenta la actividad de PKCa, la fosforilación de mLgl-2 y de este modo regula la polaridad celular	(39)
MT1-MMP	Metaloproteinas anclada a la membrana citoplasmática, implicada en la degradación de la matriz extracelular y receptores de superficie, con un rol esencial en malignidad. p32 es susceptible a la proteólisis catalizada por MT1-MMP, sin embargo cuando la actividad enzimática de MT1-MMP está inhibida, p32 coprecipita con la proteasa y ésta última puede funcionar como su receptor membranal. p32 puede interactuar con MT1-MMP por su porción intracelular y se postula que participa en la presentación de la proteasa en la superficie celular.	(40)
DC-SIGN	C1q y gC1qR/p32 se asocian con DC-SIGN (lectina tipo C) en precursores de las células dendríticas sanguíneas y en las células dendríticas inmaduras. A través de DC-SIGN, el complejo C1q/gC1qR pudiera activar diferentes vías de transducción de señales, que se cree pueden influir en las funciones y la diferenciación de las células dendríticas.	(41)
Receptor GABA _A	p32 interactúa con el lazo intracelular de la subunidad β del canal iónico Receptor del Ácido Gamma Amino Butírico (GABA _A). Dentro del sitio de interacción se encuentra el residuo de Ser 410, lo que sugiere un rol regulatorio de p32 sobre GABA _A , ya sea en biosíntesis o en funciones de la proteína madura.	(42)
Receptor α -1- β adrenérgico	p32 interactúa con una región rica en Arg del tallo carboxilo-terminal citoplasmático del GPCR receptor α -1- β adrenérgico. p32 regula la expresión y localización subcelular del receptor.	(43)
Ligandos citoplasmáticos		
PKC	p32 interactúa con diferentes isoformas de PKC (α , β , δ , ϵ , θ , ζ , μ). p32 regula negativamente la actividad de cinasa de PKC μ , a través de interactuar con su dominio de cinasa, probablemente restringiendo el acceso de los sustratos de PKC μ por impedimento estérico en compartimentos específicos de la célula como la mitocondria. Por otro lado, p32 puede estimular la actividad de cinasa de PKC θ y PKC δ <i>in vitro</i> . Se ha demostrado que p32 no es sustrato de ninguna de las PKC hepáticas evaluadas.	(44,45)
smARF	p32 interactúa con la proteína mitocondrial smARF y la estabiliza, regulando negativamente su tasa de degradación. Como consecuencia se promueve la autofagia y la disipación del potencial de membrana mitocondrial inducido por smARF.	(46)
Citocromo b2	p32 puede unirse a la sorting signal del citocromo b2, que dirige a esta proteína al espacio intermembranas.	(20)
HrK	p32 interactúa con HrK y está involucrado en la regulación de la apoptosis mediada por esta última.	(47)
CDC-25	p32 induce cambios morfológicos y modula el ciclo celular de la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , a través de su interacción con la proteína CDC 25.	(48)
Parkina	p32 interactúa con Parkina y puede regular sus niveles a través de la autofagia. p32 regula la morfología y dinámica mitocondrial a través de su interacción con Parkina.	(49)
TFAM	p32 se asocia con el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) que es un activador clave de la transcripción mitocondrial y participa en la replicación del genoma mitocondrial.	(50)
RECQ4	RECQ4 es una helicasa esencial que está involucrada en la síntesis de DNA mitocondrial y nuclear.	

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

	p32 interactúa con RECQ4 y regula negativamente su transporte desde núcleo a mitocondria. La mutación de RECQ4 más comúnmente asociada a cáncer afecta su interacción con p32 y trae como consecuencia una mayor acumulación de RECQ4 en mitocondria, con un consecuente aumento de los niveles de síntesis de DNA mitocondrial.	(51)
ULK1	p32 regula la estabilidad de ULK1, al formar un complejo proteico con esta última. A través de esta interacción se regula el control de calidad mitocondrial por mitofagia y el metabolismo mitocondrial.	(52)
Mcl-1	p32 es un ligando antagonista de Mcl-1, que puede regular positivamente la apoptosis y el influjo mitocondrial de Ca ²⁺ en células HeLa frente a tratamiento con luz UV.	(53)
RNAasa H1	p32 se une a la RNAasa mitocondrial H1 y aumenta su actividad hidrolítica, reduciendo la afinidad de la enzima por el sustrato heteroduplex y aumentando el turnover, pero no tiene efecto en los patrones de clivaje.	(54)
MRPP1	p32 coimmunoprecipita con MRPP1, una RNAasa P mitocondrial asociada con el procesamiento del pre rRNA mitocondrial	(54)
Ciclofilina D	p32 interactúa con la proteína Ciclofilina D, implicada en la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Es probable que la interacción de p32 con esta proteína medie su efecto inhibitorio en la formación del poro en fibroblastos.	(55)
RAP80	RAP80 interactúa con p32, la depleción de RAP80 reduce los niveles de p32, afectando así la biosíntesis de proteínas mitocondriales, el consumo de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y la integridad de este organelo.	(56)
Curcumina	La interacción de Curcumina con p32 es probable que sea un mecanismo a través del cual se puede regular la quimiorresistencia a doxorubicina en células de cáncer de colon.	(57)
Ligandos nucleares		
Factor de Splicing SF2/ASF	Miembro de la familia de los factores de splicing SR. Promueve el splicing constitutivo y regula el splicing alternativo. p32 fue co-purificado con este factor, aunque inicialmente no se le adjudicó ninguna función directa en el proceso de splicing, posteriormente se encontró que inhibe la actividad promotora o represora del factor de splicing ASF/SF2, a través de impedir su fosforilación y unión al RNA.	(9,58)
SRp30c	p32 puede unirse al factor de splicing SRp30c que, al igual que SF2/ASF pertenece a la familia de los factores SR; sin embargo, no modula sus funciones.	(58)
Receptor de Lámina B (p58)	p32 forma parte de un complejo de proteínas asociadas a p58 o receptor de lámina B, proteína de la membrana nuclear interna. p32 pudiera estar funcionando en este caso como un componente de enlace entre la membrana nuclear y los factores de splicing como SF2.	(59)
Cinasa tipo CDK (CDC2L5)	CDC2L5 es una cinasa tipo CDK que se localiza principalmente en los speckles nucleares, interactúa directamente con p32 y puede regular el splicing constitutivo y alternativo del pre-mRNA, probablemente a través de la regulación del factor de splicing ASF/SF2.	(60)
U2AF26	p32 se une al factor de splicing U2AF26 y promueve su entrada a núcleo. Se cree que esta interacción es importante para la regulación del splicing alternativo.	(61)
CBF/NF- γ	p32 interactúa con la subunidad B de CBF (CCAAT Binding Factor) e inhibe la transcripción mediada por este último. p32 no afecta la capacidad de unión al DNA de CBF.	(62)
FOXC1	p32 funciona como un regulador negativo de la activación transcripcional mediada por FOXC1, a través de la interacción directa con dicho factor de transcripción. p32 no afecta la capacidad de FOXC1 de unirse al DNA.	(63)
TFIIB	Proteína clave en la formación del complejo de iniciación de la transcripción. Evidencias sugieren que p32 pudiera funcionar como un coactivador transcripcional, reclutando a TFIIB al complejo de inicio de la transcripción.	(64)
p53	gen supresor de tumor y factor de transcripción que regula la expresión de múltiples genes asociados al fenotipo maligno. p32 se une a p53 e inhibe su tetramerización, promoviendo su salida del núcleo e impidiendo así la transcripción de sus genes diana.	(65)
Antígenos virales		
Core Protein V-Adenovirus	CPVA funciona como puente entre la cápside y el core del virus. p32 forma parte de un sistema de	

(CPVA)	transporte hacia el núcleo y CPVA secuestra este sistema para favorecer la liberación del genoma del virus en el núcleo.	(27)
HIV-1 Tat	Tat es esencial para la expresión génica y replicación del virus HIV. Las evidencias sugieren que p32 puede funcionar como un intermediario entre Tat y TFIIB, permitiendo la transactivación inducida por Tat.	(64)
HIV-1 Rev	p32 interactúa directamente con el dominio básico de la proteína Rev del virus HIV. Los datos sugieren que p32 funciona como un mediador de la actividad de Rev en el splicing de RNA.	(66)
HIV-1 gp41	El motivo 3S de la proteína gp41 se une a gC1qR/p32 en la superficie de las células TCD4 ⁺ no infectadas. Esta interacción activa sucesivamente a las proteínas PI3K, NADPH oxidasa y p190A RhoGAP. La activación de esta vía induce la translocación de la proteína Nkp44L desde el citoplasma hacia la membrana plasmática de las células TCD4 ⁺ no infectadas, lo que activa a las células NK a destruir a las TCD4 ⁺ . Se propone como un mecanismo través del cual las células infectadas con VIH promueven la muerte de células CD4 ⁺ no infectadas aun con el virus, una de las principales causas de disminución del título de células T CD4 ⁺ en pacientes con VIH.	(67)
Epstein-Barr Virus EBNA-1	La proteína p32 interactúa directamente con EBNA-1 del virus Epstein-Bar. Esta interacción puede contribuir a la transactivación mediada por EBNA-1.	(68)
Herpes simplex virus ORF P	ORF P interactúa con p32, a través de esta interacción ORF P podría interferir con la actividad de los splicesomas de las células hospederas.	(69)
Core Protein HCV	La Core Protein de HCV se une a p32 (gC1QR) en la superficie de linfocitos T e inhibe su proliferación, teniendo así un efecto inmunosupresor.	(70)
Capside protein, Rubella virus	La CP de Rubella virus interactúa a través de su dominio N-terminal (altamente conservado entre cepas) con la región C-terminal de p32. p32 al estar sobreexpresado en las células hospederas favorece la infectividad de Rubella Virus	(71)
Hantaan Virus (HTNV)	HTNV es un hantavirus altamente patógeno. El mismo se une a p32 /gC1qR en la superficie de sus células diana. Esta interacción media la infección viral en cultivos celulares.	(72)
Antígenos bacterianos		
Proteína A, <i>S. aureus</i>	La Proteína A de <i>S. Aureus</i> se une a p32/gC1qR en la superficie celular de las plaquetas. Dicha interacción es clave para la patogenicidad de <i>S. Aureus</i> .	(73)
Inl B, <i>L. monocytogenes</i>	InlB es una proteína de <i>L. monocytogenes</i> que promueve la entrada del patógeno a la célula hospedera de mamífero. Se ha demostrado que la interacción de InlB con p32/gC1qR es esencial para la función antes descrita. Por tanto, p32 constituye un receptor promotor de la entrada del patógeno.	(74)
Exosporium, <i>B. cereus</i>	Las esporas de <i>B. cereus</i> contienen sitios de unión para p32/gC1qR. La interacción parece ser esencial al menos para las etapas iniciales de unión y entrada de las esporas de <i>B. cereus</i> .	(75)
Hialuronidasa, <i>S. pneumoniae</i>	p32/HABP1 es un inhibidor competitivo de la Hialuronidasa de <i>S. Pneumoniae</i> , lo que constituye una importante línea de defensa contra la invasión bacteriana , a través de la protección del ácido hialurónico, importante componente de la matriz extracelular.	(76)
Antígenos de protozoos		
<i>P. falciparum</i>	p32 constituye un receptor de citoadherencia para la adhesión de los eritrocitos infectados con <i>P. falciparum</i> a células endoteliales y a plaquetas. La adhesión a las células endoteliales permite el secuestro del microorganismo en órganos vitales del hospedero mientras que la unión a plaquetas a través de p32 favorece la formación de coágulos. Los dos factores mencionados anteriormente son mecanismos patogénicos claves en la malaria. Los ligandos del parásito que median la interacción de los eritrocitos infectados con p32 aun no han sido identificados.	(77)

Sumado a la gran cantidad de ligandos que puede unir, p32 presenta una considerable flexibilidad estructural. Dicha plasticidad puede jugar un importante papel en regular su unión a diferentes

ligandos (78). Además, la existencia de la proteína en diferentes estados de oligomerización puede tener implicaciones en la interacción con sus ligandos y por tanto en sus funciones (15).

Con base en lo previamente descrito se puede afirmar que p32 es una proteína ubicua y multicompartamental, altamente conservada en la evolución de eucariontes, con una considerable flexibilidad estructural y que presenta múltiples sitios de interacción para una amplia gama de ligandos de diferente naturaleza. Sin duda, estas propiedades de la proteína explican en gran medida su multifuncionalidad, una de las características más importantes de la misma.

1.7. Funciones biológicas de p32

El alto grado de conservación evolutiva de p32 en eucariontes (14,20–22) y el hecho de que ratones deficientes de p32 presenten letalidad a mitad de la gestación asociado con un defecto de desarrollo severo del embrión (79), indican que la proteína cumple funciones claves en el organismo eucarionte. La capacidad de p32 de interactuar con una cantidad significativa de ligandos funcionalmente divergentes (Ver Tabla 1) sugiere que la proteína es un modulador de múltiples funciones celulares a través de la interacción proteína-proteína y es incluso considerada por diversos autores como una proteína con función chaperona. Debido precisamente a estos roles multifacéticos de p32 es difícil definir su función precisa en la célula, sin embargo, a continuación, describiremos brevemente sus principales funciones: las mejor definidas y más ampliamente caracterizadas.

1.7.1. Regulación del metabolismo y la dinámica mitocondrial

Debido a que p32 es una proteína cuya localización canónica es la mitocondria, muchas de las funciones adjudicadas a ella están relacionadas con la regulación del metabolismo mitocondrial, así como con la morfología y dinámicas de este organelo. La principal función adjudicada a p32 en la mitocondria es el mantenimiento de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), lo que fue inicialmente demostrado a través de la disrupción del gen p30 (homólogo de p32 en levadura), lo cual retardó el crecimiento celular en glicerol, pero no en glucosa y afectó la capacidad de síntesis de ATP de estos organismos unicelulares. La afectación del crecimiento de la levadura fue restaurada mediante la introducción del cDNA de p32 humano (20). Adicionalmente, se ha demostrado que fibroblastos de ratones knockout de p32 muestran una actividad severamente afectada de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, pero no del complejo II. Esto se debe a que p32 cumple un papel crucial en la biosíntesis de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, probablemente

porque p32 es requerido para el correcto funcionamiento del mitoribosoma con el RNA mitocondrial. Estos fibroblastos deficientes de p32 presentan además mitocondrias con aberraciones morfológicas (79). Interesantemente, otros autores han encontrado que p32 forma complejos con la RNAasa H1 y que dichos complejos están involucrados en el procesamiento del pre-rRNA mitocondrial, otro resultado que apunta hacia un importante papel de p32 en la biosíntesis de proteínas mitocondriales (54). En un trabajo reciente se ha encontrado también en fibroblastos de ratón, que el knockout de p32 induce un cambio metabólico de OXPHOS a glicólisis y un decrecimiento en la tasa de utilización de lípidos, probablemente debida a afectaciones en la β -oxidación de ácidos grasos (80). Sin embargo, es muy interesante que ratones heterocigóticos para p32, a diferencia de los ratones knockout, no presentan afectaciones del desarrollo embrionario y en cambio son resistentes a la obesidad y muestran una mayor sensibilidad a la insulina cuando son sometidos a dietas altas en grasa. A nivel metabólico, la delección de un único alelo de p32 condujo a una disminución en la tasa de oxidación completa de la glucosa y como respuesta compensadora un aumento en la oxidación de ácidos grasos y en la glicólisis. Todo ello sugiere que p32 juega un rol crítico en la homeostasis energética a nivel celular y de organismo (81). Adicionalmente, se ha demostrado que la maduración de células dendríticas es regulada por los niveles de citrato de un modo dependiente de p32. En este caso, p32 interactúa con el componente E2 del complejo de la Piruvato Deshidrogenasa y regula positivamente la actividad de esta enzima. En correspondencia con los trabajos anteriores mencionados, se encuentra que en células dendríticas depletadas de p32 se produce una disminución de los niveles de proteínas de la cadena respiratoria, así como un cambio metabólico de OXPHOS a glicólisis (82).

Al igual que en levaduras, fibroblastos de ratón y células dendríticas; en diferentes contextos celulares asociados a patologías se ha encontrado que p32 regula el metabolismo mitocondrial. La depleción de la expresión de p32 provocó disfunción cardíaca de ratones adultos y neonatos como consecuencia de la afectación drástica en la morfología y metabolismo mitocondrial. Además, los cardiomiocitos murinos deficientes de p32 mostraron niveles incrementados de ornitina y disminuidos de citrulina, lo que sugiere que el ciclo de la urea fue afectado en estas células. Particularmente se encontró una disminución de la actividad de la enzima mitocondrial Ornitina Transcarbamilasa en células depletadas de p32 (83). Células tumorales de mama depletadas de p32 igualmente cambian su metabolismo de OXPHOS a glicólisis y presentan una afectación en la capacidad de sintetizar polipéptidos implicados en OXPHOS que son codificados por el DNA mitocondrial (84). Congruente con estos resultados, otros autores encuentran que células HeLa

knockdown de p32 presentan una capacidad de OXPHOS atenuada, tipificada por niveles de ATP, respiración basal y capacidad respiratoria máxima reducidos (85). Un interesante trabajo recientemente publicado muestra que pacientes que sufren colitis ulcerativa presentan una baja expresión de p32 en las criptas del colon acompañada por disfunción mitocondrial y por tanto deficiencia energética, lo que conduce a defectos en la maduración de las células calciformes. Además, se presenta en este trabajo evidencia experimental *in vitro* de que la función mitocondrial regulada por p32 promueve la diferenciación de las células calciformes (86). De conjunto, los resultados obtenidos por diferentes autores en diversos contextos fisiológicos normales y patológicos muestran que p32 juega un papel crucial en la biosíntesis de proteínas codificadas en la mitocondria y por ende en el metabolismo energético mitocondrial, fundamentalmente en la Fosforilación Oxidativa.

Interesantemente, se ha encontrado que los niveles de p32 afectan no solo el metabolismo sino también la dinámica mitocondrial. En tanto, la sobreexpresión de p32 en células HeLa se asocia con una morfología mitocondrial más fibrilar, la disminución de los niveles de esta proteína conduce a una morfología fragmentada y punteada. Esta fragmentación mitocondrial aumentada en células depletadas de p32 indica que la proteína pudiera ser un modulador negativo de la fisión mitocondrial y/o positivo de la fusión mitocondrial. En congruencia con esto, se ha encontrado que las células HeLa depletadas de p32 presentan una disminución considerable de los niveles de las proteínas Mfn1 y Mfn2, implicadas en la fusión de la membrana mitocondrial externa (85). Mientras que, en neuronas, p32 puede regular la morfología y dinámica mitocondrial promoviendo la degradación por autofagia de Parkina, una proteína implicada en la fisión mitocondrial y la mitofagia. En este caso, la depleción de p32 también provocó la fragmentación mitocondrial (49). Recientemente se ha demostrado que la ablación de p32 en fibroblastos de ratón produce hinchamiento y fragmentación de las mitocondrias en estas células, acompañado de varias características que denotan disfunción del metabolismo mitocondrial. Interesantemente, estos autores encuentran que p32 inhibe el procesamiento proteolítico mediado por OMA-1 de OPA-1 (Dinamina tipo GTPasa que media la fusión de la membrana mitocondrial interna), mecanismo a través del cual p32 puede controlar la morfología mitocondrial (80). Toda la evidencia acumulada demuestra sin lugar a duda que p32 juega un rol crucial en la regulación de la morfología, la dinámica y el metabolismo mitocondrial.

1.7.2. Regulación de la apoptosis

El papel de p32 como regulador de la apoptosis ha sido un tema polémico entre los diferentes grupos que lo investigan, ya que mientras varios estudios apuntan a p32 como un promotor de muerte, otros demuestran claramente su papel como inhibidor de este proceso. En el año 2003, Meenakshi *et al.* encuentran que la sobreexpresión de p32 en fibroblastos de rata induce una vacuolación extensa, inhibición de la proliferación, así como inducción de apoptosis medida por TUNEL, inducción de la expresión de BAX y análisis de FACs (87). En trabajos posteriores de este mismo grupo se demuestra que la sobreexpresión de p32 es esencial para la apoptosis mediada por Cis-platino en células HeLa (88), así como que la inducción de apoptosis en fibroblastos luego de la sobreexpresión de p32 es mediada por un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial (89). En congruencia con estos resultados se encontró que la interacción de p32 con Hrk es importante para la inducción de la apoptosis mediada por esta última (47). Igualmente, se observó que p32 se une y estabiliza a la proteína pro-muerte celular smARF, aunque en este caso la muerte inducida es principalmente mediada por autofagia (46). Interesantemente, se ha encontrado que p32 regula positivamente el influjo mitocondrial de Ca^{2+} y la apoptosis inducida por luz UV en células HeLa (53).

Todos los trabajos previamente enunciados apuntan a un papel pro-muerte apoptótica de p32. Sin embargo, los resultados obtenidos en otros trabajos demuestran claramente una función anti-apoptótica de la proteína. McGee y colaboradores publican en 2011, dos interesantes trabajos donde muestran a p32 como proteína implicada en la evasión de la apoptosis en diferentes contextos celulares. Primeramente, demuestran mediante estudios de ganancia o pérdida de función en fibroblastos, que p32 inhibe la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (esencial para que se inicie la vía apoptótica intrínseca) y la apoptosis cuando las células son tratadas con H_2O_2 . La regulación negativa ejercida por p32 sobre la formación de este poro parece estar mediada por su unión a ciclofilina D, proteína vinculada directamente con la formación del poro (55). Posteriormente, estos autores demuestran que p32 inhibe la apoptosis inducida por staurosporina en fibroblastos, así como la apoptosis inducida por doxorubicina en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 (90). Por otro lado, en células HeLa, el knockdown de p32 generó efectos diferenciales sobre la muerte celular en dependencia del tipo de estrés al que la célula fue sometida. Mientras las células depletadas de p32 fueron más sensibles al estrés hiperosmótico inducido con sorbitol o al tratamiento con cis-platino, éstas resultaron ser más resistentes al tratamiento con arsenito. Este resultado sugiere fuertemente que el papel pro o anti-

apoptótico de p32 depende no solo del tipo celular en cuestión sino del tipo de estímulo inductor de apoptosis (85). En un trabajo reciente donde se evalúan las funciones de p32 en músculo esquelético se demostró que la depleción de p32 en células musculares de cabra, promueve la apoptosis de las mismas (91). Desde otra perspectiva del asunto, un interesante trabajo provee evidencia de que la translocación de p32 a mitocondria y/o núcleo puede ser bloqueada a través de la formación de un complejo citoplasmático con calreticulina en células troncales de artrópodos infectadas con virus y en células humanas cancerosas. La retención de p32 en el citoplasma por la formación de estos complejos constituye un mecanismo de evasión de apoptosis en células hospederas infectadas con virus y en células tumorales. Según esta perspectiva del tema, la localización subcelular de p32 determinará si esta promueve o no la apoptosis (92). Resumiendo, podemos afirmar que p32 tiene un importantísimo rol como regulador de la apoptosis celular, sin embargo, si actúa como promotor o inhibidor del proceso depende en gran medida del tipo celular, localización subcelular, entorno molecular y del contexto fisiológico en el que la célula en cuestión se encuentre.

1.7.3. Regulación del splicing y otras funciones nucleares

Como se ha mencionado antes, p32 fue descubierta al ser co-purificada con el factor de splicing ASF/SF2 (ahora SRSF1) de extractos de células HeLa (9). Aunque en los estudios iniciales no se le adjudicó a p32 un papel en el splicing, hoy en día se conoce que la proteína está implicada en la regulación de este proceso. ASF/SF2 es un miembro de la familia SR de factores de splicing que puede promover el splicing constitutivo y regular el splicing alternativo. Esta familia de factores puede actuar como activador o represor del splicing en dependencia de la región del pre-mRNA a la que se unan. El estatus de fosforilación de estos factores de splicing modula su capacidad de reconocimiento del pre-mRNA, de ensamblaje del spliceosome y de catálisis del splicing. Se ha demostrado que p32 tiene la capacidad de inhibir al factor ASF/SF2 e inactivar de este modo sus efectos represores o activadores del splicing. La inhibición ejercida por p32 sobre ASF/SF2 la realiza a través de modular dos funciones fundamentales de esta proteína. En primer lugar, p32 inhibe la capacidad de ASF/SF2 de unirse al pre-mRNA y de este modo inhibe su rol como iniciador de la formación del pre-spliceosome. Adicionalmente, la interacción de p32 con ASF/SF2 bloquea la fosforilación de este último, modificación postraduccional que es clave para las interacciones proteína-proteína mediadas por ASF/SF2 durante el ensamblaje del spliceosome. Por tanto, p32 constituye un regulador del splicing que funciona como subunidad moduladora de la actividad de ASF/SF2, secuestrando al factor en un complejo inactivo. Interesantemente, p32 se puede unir también a otro factor de splicing de la familia SR, el SRp30c, pero no modula sus

funciones, por lo que el efecto ejercido por p32 sobre ASF/SF2 no parece ser general para todos los integrantes de la familia de factores SR (58). La interacción de p32 con p58 (Receptor de lámina B) en la cara interna de la membrana nuclear sugiere que p32 pudiera ser un componente de enlace entre la membrana nuclear y estructuras intranucleares involucradas en el splicing del RNA (59). Adicionalmente, se ha encontrado que p32 interactúa con la Cinasa tipo CDK CDC2L5, proteína con dominio SR que se encuentra en los speckles y regula el splicing en células NIH3T3 y HeLa (60). Igualmente, se ha comprobado que p32 interactúa con el factor de splicing U2AF26 y promueve el importe nuclear del mismo. Esta interacción pudiera tener importantes implicaciones en la regulación del splicing alternativo (61). En resumen, se puede afirmar que p32 regula el proceso de splicing constitutivo y alternativo a través de la interacción y modulación de las funciones y/o localización de diferentes factores de splicing, principalmente SRSF1.

También desde el núcleo, es conocido que p32 puede interactuar y modular la función de diferentes factores de transcripción como TFIIB, CBF/NF- κ B y FOXO1 (Ver Tabla 1). Interesantemente, en un trabajo reciente se ha demostrado que p32 puede unirse al factor de transcripción y gen supresor tumoral p53 y modular negativamente la transcripción de sus genes diana. p32 se une específicamente al dominio de tetramerización de p53, impidiendo la formación del tetrámero y de este modo induciendo su salida a citoplasma, con la consecuente degradación de p53 en proteosoma (65). Un interesante estudio ha demostrado que p32 es requerido para el procesamiento de los pre-RNA ribosomales en las fases nucleolares tempranas de la biogénesis ribosomal. Su papel principal en este proceso es regular la unión de Nop32 y fibrilarina a las partículas pre-ribosomales (93). La proteína p32 es por tanto reguladora de la expresión génica vía modulación positiva o negativa de la actividad de diferentes factores de transcripción y a través de su participación en el proceso de biogénesis ribosomal.

1.7.4. Papel en infección, respuesta inmune e inflamación.

Diversos estudios han demostrado claramente el rol ejercido por p32 en diferentes procesos infecciosos de virus, bacterias e incluso del protozoo *Plasmodium Falciparum* (ver Tabla 1). Múltiples trabajos han mostrado como los virus utilizan a la proteína p32 como parte de su proceso infeccioso de diferentes modos: i- para favorecer la entrada del virus a la célula hospedera a través de la interacción con p32 en la superficie celular, como en el caso de *Hantaan Virus* (72) y *Rubella Virus* (71), ii- como mecanismo inmunosupresor, tal es el caso del virus de la hepatitis C (70) y del VIH (67), que a través de la interacción con p32 en la superficie de células T, afecta la proliferación

o viabilidad de estas células, iii- utilizando a p32 para promover la transactivación génica o el proceso de splicing modulado por diferentes proteínas virales como ocurre con las proteínas Tat (64) o Rev (66) del HIV y iv-utilizando a p32 como mecanismo de transporte intracelular como ocurre en el caso del adenovirus (27). Así mismo, diferentes bacterias como *S. aureus* también utilizan a p32 como parte del mecanismo de entrada a sus células hospederas (73). Mientras que se ha encontrado que p32 es un inhibidor competitivo de la hialuronidasa de *S. pneumoniae*, funcionando en este caso como un mecanismo de protección contra el patógeno (76). Por otro lado, se ha demostrado que p32 participa en mecanismos patogénicos claves de *P. falciparum*, el protozoo que produce la malaria, ya que promueve la adhesión de los eritrocitos infectados a células endoteliales y a plaquetas, lo cual conlleva a la entrada del microorganismo en órganos vitales del hospedero y a la formación de coágulos. En resumen, se puede afirmar que p32 participa en el proceso patogénico de múltiples microorganismos a través de mecanismos diferentes que van desde la entrada a la célula hospedera, movilidad intracelular y dentro del organismo hasta el estar involucrado en mecanismos de la biología molecular del patógeno como la transactivación génica y el splicing.

Más allá de su relación directa con los mecanismos patógenos e inmunosupresores de los microorganismos, p32 desde su descubrimiento ha sido asociada con la regulación de la respuesta inmunológica y la inflamación. Es importante recordar que p32 fue descubierta como receptor de la cabeza globular de C1q en células Raji, lo cual se vio asociado con su capacidad de inhibir la activación del sistema del complemento (10). Múltiples estudios han demostrado que varios de los efectos ejercidos por C1q sobre diferentes células implicadas en procesos inflamatorios y en la respuesta inmunológica como linfocitos, monocitos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales y células dendríticas; están mediados al menos en parte por su receptor gC1qR/p32 (28). Por ejemplo, la unión de C1q a sus receptores en células endoteliales promueve la activación de éstas, lo que resulta en la expresión de moléculas de adhesión como las E-selectinas, ICAM-1 y VCAM-1, así como secreción de las citocinas IL-6, IL-8 y MCP-1. Además, esta interacción promueve la adhesión y la dispersión de las células endoteliales que conlleva a la formación de tubos (28,38). Interesantemente, se ha encontrado que p32 junto con otras proteínas provee una plataforma en la superficie de las células endoteliales para la activación del sistema kinin/kallikrein que conduce a la generación de bradikinina, que entre otras funciones aumenta la permeabilidad vascular, proceso esencial para la inflamación y la respuesta inmune. La interacción de C1q con sus receptores también se ha visto relacionada con la inhibición de la secreción de IL-1 en linfocitos, así como con

la diferenciación de monocitos a célula presentadoras de antígeno profesionales (28). Adicionalmente, se ha encontrado que p32 inhibe la producción de IL-12 a nivel de RNA y proteína por parte de los monocitos, macrófagos y células dendríticas a través de interferir con la señalización de TLR-6 mediante la activación de la vía PI3K-AKT (94). Por tanto, la evidencia acumulada hasta el momento sugiere que p32 tiene un importante papel en los mecanismos patógenos de diferentes microorganismos, así como en la regulación de procesos inflamatorios y de la respuesta inmunológica.

1.7.5. Papel en señalización celular

Diversos trabajos han mostrado el importante papel ejercido por p32 en la señalización celular a diferentes niveles en cada una de las diversas localizaciones subcelulares y entornos fisiológicos donde se ha encontrado. En algunos contextos se ha demostrado que la proteína secretada se une a receptores membranales como un ligando, activando vías río abajo de estos receptores. Ese es el caso en células de melanoma, donde se ha encontrado que p32 se une a la superficie celular e interactúa con la integrina $\alpha\beta3$. Río abajo de esta interacción se produce la activación de NF κ B que involucra la fosforilación de NIK e I κ B α , lo que conlleva a un aumento de la expresión de la metaloproteínasa MMP1 y mayor activación de la MMP2, ambas implicadas en invasividad a través de la degradación de la matriz extracelular (37). En otros trabajos se le ha adjudicado un papel como receptor que, al no atravesar la membrana plasmática, utiliza correceptores para transducir la señal. En este sentido es bien conocido que, uno de sus ligandos extracelulares, el polisacárido ácido hialurónico, es capaz de promover la fosforilación de p32/HABP1 en linfocitos. Adicionalmente, se ha encontrado que el ácido hialurónico promueve la activación de PLC γ e incrementos en los niveles de IP3. Estos efectos pueden ser inhibidos cuando las células son tratadas con un anticuerpo específico versus p32/HABP1. Todo lo cual sugiere que p32/HABP1 funciona como un receptor de ácido hialurónico que de algún modo transduce la señal hacia el interior celular y media los efectos fisiológicos del polisacárido (95). Igualmente, la interacción de C1q con sus receptores en superficie p32/gC1qR y Calreticulina/cC1qR se cree que puede activar diferentes vías de transducción de señales río abajo a través de la interacción de estos receptores con diferentes proteínas integrales de membrana como integrinas, CD44 y la lectina DC-SIGN (38,41). Estos hallazgos son de gran importancia para entender la función de p32 como receptor debido a la carencia de un segmento transmembranal en su estructura. Como se mencionó previamente, gC1qR/p32 desde la superficie celular puede inhibir la producción de IL-12 en macrófagos y células dendríticas. Esta función la lleva a cabo a través de activar la vía PI3K/Akt desde la superficie

celular, lo que produce un crosstalk negativo sobre la actividad del receptor TLR4. Todo lo cual constituye una prueba adicional de la capacidad de p32 de activar vías de transducción de señales desde la superficie (94).

Igualmente se ha visto su papel como modulador de la actividad de determinados receptores desde el interior celular como proteína periférica en la cara intracelular de la membrana plasmática. Al respecto se ha demostrado que p32 es capaz de regular positivamente la autofosforilación de diferentes RTKs a través de su anclaje a balsas lipídicas por interacción con CD44. Los mecanismos moleculares e interacciones a través de los cuales p32 puede regular positivamente la autofosforilación de estos receptores en las balsas lipídicas aún no se conocen. Sin embargo, se han demostrado sus efectos río abajo en la activación de las vías PI3K-Akt-mTor y la vía de las MAP cinasas (36,96). En congruencia con esto, se ha encontrado que la depleción de p32 en cardiomiocitos induce una disminución en la tasa de fosforilación de la proteína S6K, blanco directo de mTor (83). Por otro lado, se ha visto que p32 puede modular positiva o negativamente la actividad de importantes proteínas implicadas en la señalización celular desde el interior de la célula como diferentes isoformas de PKC (ver Tabla 1) (39,44,45), de modo que puede modular la actividad de una proteína pivotal donde confluyen múltiples vías de transducción de señales. Por último, se ha reportado que p32 es un sustrato endógeno de ERK y que es transportada al núcleo luego de una estimulación mitogénica de las células, lo que demuestra que p32 es un componente de la vía de las MAP cinasas (97). De conjunto, todos los hallazgos mostrados en esta sección demuestran claramente el importante papel de p32 en la transducción de señales a diferentes niveles actuando como ligando, proteína receptora, modulador intracelular de receptores y de proteínas pivotaes de diferentes vías de transducción de señales, así como siendo diana directa de una vía central como la vía de las MAP cinasas (Figura 1.6)

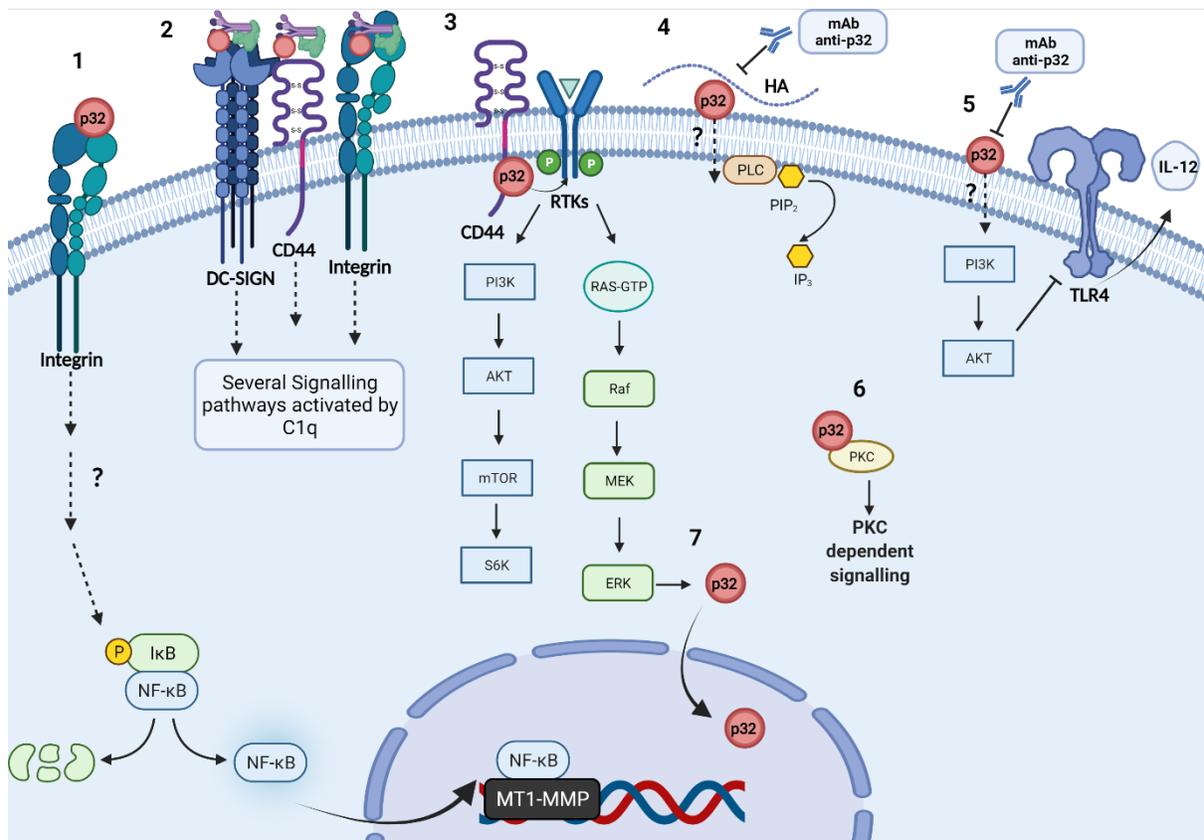


Figura 1.6. Papel de p32 en la señalización celular. p32 ejerce varias funciones en la señalización celular a diferentes niveles como ligando, receptor, regulador intracelular de receptores, regulador de moléculas moduladoras como PKC y diana de efectores río abajo de vías de señalización. Algunas de las principales vías de señalización que involucran a p32 son: 1- p32 extracelular interactúa con la integrina $\alpha v \beta 3$ y promueve la activación río abajo de NF- κ B, que se transloca al núcleo promoviendo la expresión de la metaloproteína MT1-MMP, crucial para la degradación e invasión de la matriz extracelular; 2-C1q activa múltiples vías de señalización celular interactuando con sus receptores p32/gC1qR y calreticulina/cC1QR, que utilizan diferentes co-receptores como DC-SIGN, CD44 e Integrinas para transducir la señal; 3- p32 se recluta a las balsas lipídicas de caveolina después de la activación de los RTKs, a través de su interacción con CD44 de la monocapa interna de la membrana, lo que potencia la autofosforilación de los RTKs y promueve la activación de varias vías de señalización río abajo de éstos, como las vías PI3K-Akt-mTOR-S6K y MAPK; 4-El ácido hialurónico (HA) a través de su interacción con p32 en la superficie celular puede activar río abajo a PLC γ , induciendo un incremento en los niveles de IP $_3$, efecto que es inhibido por un anticuerpo monoclonal anti-p32; 5- La vía de señalización de PI3K-Akt es activada por p32 desde la superficie celular induciendo una disminución en los niveles de expresión de IL-12 vía una intercomunicación negativa con el receptor TLR4, efecto que es inhibido por un anticuerpo monoclonal anti-p32; 6- p32 interactúa con diferentes isoformas de PKC y modula la señalización celular dependiente de éstas; 7- p32 es una diana de ERK. Después de la activación inducida por mitógeno, ERK induce la translocación de p32 al núcleo (Tomado de Egusquiza-Alvarez & Robles-Flores, 2022).

1.8. Papel de p32 en cáncer

Diversos reportes muestran que la multifacética proteína p32 se encuentra sobre-expresada en una variedad de tumores de origen epitelial y en células de origen canceroso con respecto a sus contrapartes no malignas (35,98–102). Estos hallazgos conllevaron a muchos autores a replantearse la idea inicial existente de que p32 podría ser un gen supresor tumoral, debido a su localización en una región cromosómica donde abundan genes supresores tumorales tales como p53 y BRCA (18), así como a estudios iniciales que sugerían que p32 era una proteína pro-apoptótica (47,87,88). Hoy en día, luego de múltiples estudios en células tumorales de diferentes orígenes, así como a resultados clínicos, se conoce que p32 puede promover rasgos de malignidad en diferentes tipos de células tumorales.

Rubinstein y colaboradores en 2004 mostraron claramente mediante tinción inmunohistoquímica que los adenocarcinomas de tiroides, colon, páncreas, estómago, esófago y pulmón tienen una expresión marcadamente superior de p32 con respecto a sus contrapartes histológicas no malignas. Mientras que no encontraron una expresión diferencial en carcinomas renales, de endometrio y de próstata. Aunque en este punto no se había explorado a profundidad el rol de p32 en cáncer, estos primeros hallazgos sugirieron que p32 podría tener un papel como promotor de malignidad (98). Congruente con estos resultados, en un trabajo posterior se encontró una alta expresión de p32 en tumores de origen epitelial de mama, pulmón, hígado, próstata y colon, así como en carcinoma escamoso y basal de la piel. Interesantemente, también se encontró una expresión incrementada de p32 en lesiones inflamatorias y células con una alta tasa de división celular; mientras que en tumores de origen mesenquimal (excepto osteoblastos) no se encontró una sobreexpresión de la proteína (99). Adicionalmente, en estudios de carcinogénesis inducida con benzo[a]pireno en ratón, se encontró que p32/HABP1 se acumula en el tejido subescamoso inflamatorio durante la fase de iniciación del tumor. Con la progresión del tumor, la proteína se encuentra también sobreexpresada en tejido papilomático y acantótico. Mientras que, en la fase metastásica, los niveles altos de p32 están confinados a las islas metastásicas, pero desaparecen gradualmente de la masa circundante. Estos hallazgos sugieren que p32 tiene un rol en la regulación de la metástasis probablemente a través de regular la adhesión celular a ácido hialurónico, proceso parcialmente dependiente de las variaciones en los niveles de expresión de p32 en la superficie celular en cada etapa de la progresión tumoral (103). Fogal *et al.* corroboran que varios tumores de origen epitelial sobreexpresan a p32 con respecto a sus contrapartes no malignas y adicionalmente muestran que las células de origen tumoral presentan una expresión incrementada de p32 en la superficie celular.

También demuestran que algunos tumores contienen una subpoblación de macrófagos/ células mieloides asociados con los vasos linfáticos tumorales que expresan a p32. Estos resultados muestran que p32 no es solamente un marcador de la superficie de células cancerosas sino también de componentes importantes del microambiente tumoral como los vasos linfáticos asociados al tumor (35). Adicionalmente, Peerschke y colaboradores han demostrado que los niveles elevados de p32 no se encuentran solamente en el tejido tumoral sino también en el suero de pacientes de cáncer de páncreas metastásico con respecto a los individuos sanos (104). Interesantemente, un análisis multiómico sistemático publicado en 2019 mostró que los niveles de expresión del gen *CIQBP* además de estar significativamente elevados en muestras de origen maligno con respecto a sus contrapartes no malignas, correlacionan negativamente con la supervivencia de los pacientes que padecen cáncer de mama, pulmón, colon y vejiga, así como linfomas (100). Estos resultados están en congruencia con los obtenidos en otros estudios clínicos previamente publicados donde se demuestra que existe una correlación negativa entre la expresión de p32 y la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de mama (105–107), ovario (108), endometrio (109) y cérvico-uterino (110). En congruencia, un análisis bioinformático realizado en la base de datos *PrognScan* permite corroborar que existe una correlación negativa entre el grado de expresión de p32 y la supervivencia de los pacientes aquejados de cáncer de mama, colorrectal, de pulmón y melanoma (Figura 1.7). De conjunto, toda la evidencia encontrada demuestra que los tumores malignos de origen epitelial sobrepresan a p32 y esta sobrepresión correlaciona negativamente con la supervivencia de los pacientes. Por lo tanto, esta proteína tiene un valor potencial como marcador diagnóstico en cáncer. Adicionalmente estos datos sugieren fuertemente que p32 juega roles importantes en las células tumorales como promotor de fenotipo maligno.

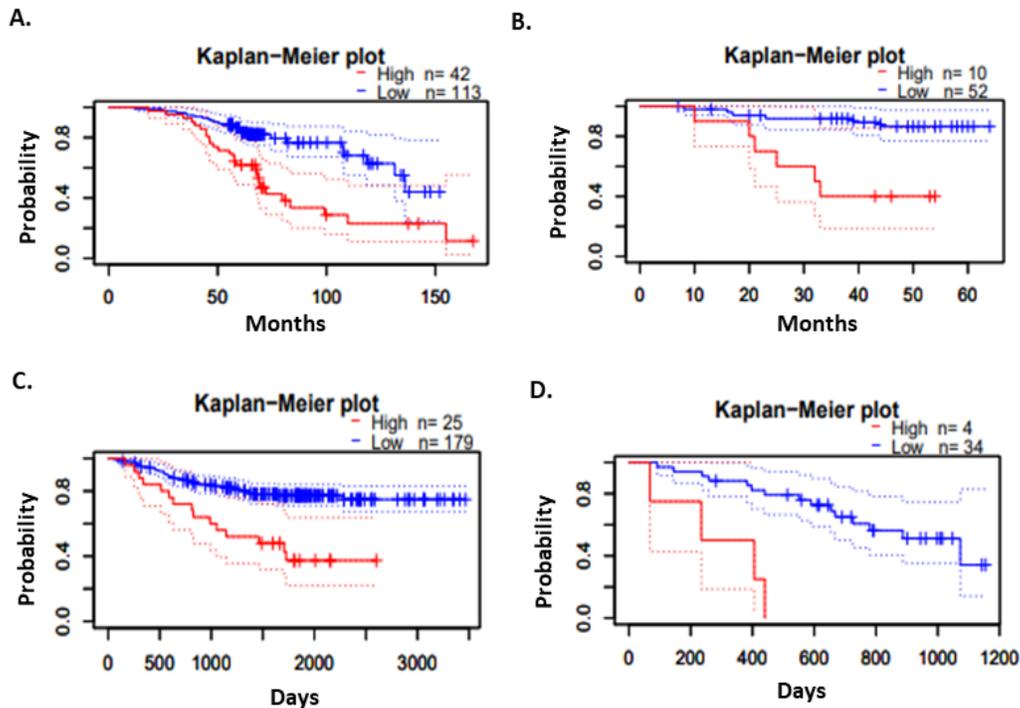


Figura 1.7. Los niveles de expresión de p32 correlacionan negativamente con la supervivencia de los pacientes de cáncer de mama ($p = 0.005240$) (A), colorrectal ($p = 0.008218$) (B), de pulmón ($p = 0.01794$) (C) y melanoma ($p = 0.003145$) (D) de acuerdo con las gráficas de Kaplan-Meier obtenidas de la base de datos *PrognScan*. (Tomado de Egusquiza-Alvarez & Robles-Flores, 2022).

Fig. 3 p32/gC1qR/HABP1 expression levels negatively correlates with patient survival in breast (A), colorectal (B), lung (C) and skin (D) cancer according with Kaplan-Meier graphics obtained from *PrognScan* database

Adicional a los resultados de origen clínico obtenidos, varios estudios de ganancia o pérdida de función han demostrado el papel oncogénico de p32 en ciertos tipos de células cancerosas. Una buena parte de esta evidencia se ha obtenido en modelos celulares de cáncer de mama. Interesantemente, en un trabajo publicado por Fogal *et al.* en el año 2010 se demuestra en células de cáncer de mama que la depleción de p32 promueve la glicólisis, induce una disminución en la tasa de OXPHOS y a su vez disminuye la capacidad tumorigénica de dichas células. Además sugieren que p32 pudiera funcionar como un regulador del balance entre OXPHOS y glicólisis en células tumorales (84). Adicionalmente, McGee y colaboradores demuestran en 2011 que el knockdown de p32 en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 sensibiliza a las células a la muerte inducida por doxorubicina. Además, a través de ensayos de cierre de herida, encuentran que la depleción de p32 inhibe significativamente la capacidad migratoria *in vitro* de las células previamente mencionadas (90). Otro trabajo que confirma el importante papel de p32 como

promotor de malignidad en células de cáncer de mama fue publicado por Zhang y colaboradores en 2013. En el mismo se demuestra que la interacción de p32 en la membrana citoplasmática con PKC ζ promueve la quimiotaxis y metástasis de células de cáncer de mama inducida por EGF. Además, estos autores encuentran una relación directa entre la expresión de CIQBP y la metástasis distal en un análisis patológico en cáncer de mama (111).

Por otro lado, en células de glioma se ha demostrado que la expresión de p32 es regulada positivamente por el oncogen regulador del metabolismo tumoral c-Myc, debido a que éste puede unirse directamente a la región promotora del gen *CIQBP* y promover su expresión. Interesantemente, p32 contribuye a la adicción a la glutamina mediada por c-Myc en estas células, a la vez que promueve su proliferación *in vitro* y su capacidad tumorigénica *in vivo*. Además en pacientes con diferentes tipos de cáncer de cerebro se encuentra una correlación positiva entre los niveles de expresión de p32 y los de c-Myc, así como un aumento de los niveles de expresión de p32 con el grado de avance de la enfermedad (102).

Así mismo, en células de cáncer hepático HepG2 se ha demostrado que la sobreexpresión de p32/HABP1 incrementa la proliferación celular a la vez que activa la expresión de múltiples proteínas asociadas con supervivencia tales como CD44 y HAS-2, lo que conduce a una mayor síntesis de ácido hialurónico y formación de HA cable. Adicionalmente, la sobreexpresión de p32 condujo a una mayor tasa de activación de la vía de las MAP cinasas y de Akt, así como a una actividad incrementada de genes reguladores del ciclo celular como ciclina D1. Todos ellos son mecanismos esenciales para la supervivencia y proliferación de la célula tumoral (112). Otros autores han encontrado que *CIQBP* es un gen diana directo de la Zinc Finger Protein (ZNF32) y media los efectos protectores de esta última frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células de carcinoma hepático. Esto lo hace a través de mantener el potencial de membrana mitocondrial e inactivar la vía de p38 MAPK (113).

Adicionalmente, en células de cáncer de pulmón A549 se ha demostrado que p32 participa en la formación de lamelipodios inducida por los RTKs, a través de promover desde balsas lipídicas la autofosforilación y la activación de vías río abajo de estos receptores. Debido a que los lamelipodios son estructuras esenciales para la migración celular, la depleción de p32 condujo a una menor tasa migratoria *in vitro* y a una menor capacidad tumorigénica y metastásica *in vivo* de estas células de cáncer pulmonar (96). Igualmente se ha demostrado que p32 exógena promueve la migración de células de melanoma metastásico a través de su interacción con la integrina $\alpha_v\beta_3$ en la

superficie celular. Como consecuencia de esta interacción se estimula la señalización mediada por NF κ B, lo que promueve la expresión de la metaloproteína MMP1 con la consecuente activación de MMP2, ambas implicadas en la capacidad invasiva de las células tumorales a través de la degradación de la matriz extracelular (37). En concordancia con todo lo previamente enunciado, en un trabajo más reciente publicado por Shi y colaboradores se encontró que p32 media la metástasis hepática del cáncer pancreático a través de regular la señalización celular inducida por el IGF-1 luego de su interacción con su receptor, el RTK IGF-1R. Al igual que se había encontrado en células de cáncer de pulmón, los autores demuestran claramente que el IGF-1 induce la movilización de p32 hacia las balsas lipídicas ricas en caveolina y desde allí en interacción con CD44v6, promueve la autofosforilación del IGFR y la consecuente activación de las vías río abajo de este receptor como las vías de PI3K y de las MAP cinasas. Como consecuencia, p32 promueve en estas células la proliferación, evasión de la apoptosis, así como la capacidad migratoria e invasiva *in vitro* inducida por IGF-1 en células de cáncer pancreático. Importantemente, p32 promueve la capacidad de las células pancreáticas de hacer metástasis a hígado *in vivo* (36).

Dado que se ha demostrado que p32 es secretada por las células tumorales y que debido a su carácter pleiotrópico esta proteína puede regular a diversos tipos celulares, se sugiere que p32 pueda tener un importante papel en la regulación del microambiente tumoral, influyendo en importantes aspectos de éste como la inflamación asociada al tumor, la evasión del sistema inmune y la angiogénesis. Se cree que la variante secretada de p32 se pueda unir a células que se encuentran en el microambiente tumoral tales como los linfocitos T CD4⁺ y células endoteliales, modulando las funciones de éstas (28). A través de sus diversos efectos pro-inflamatorios mencionados previamente como la regulación del sistema del complemento y la generación de bradikinina, p32 puede potenciar la inflamación en el microambiente tumoral y promover la malignidad. En un estudio reciente se ha demostrado que p32/gC1qR media la evasión del sistema inmune de células de mieloma múltiple a través de inhibir parcialmente los efectos anti-proliferación de C1q (114). Por otro lado, un anticuerpo monoclonal específico contra p32 desarrollado por Kim y colaboradores tuvo un efecto anti-angiogénico al inhibir la formación de tubos, migración celular, formación de lamelipodios y activación de los RTK en células HUVEC (115). Todo ello sugiere fuertemente que p32 es una proteína pro-angiogénica y teniendo en cuenta que la misma puede ser liberada al microambiente tumoral, no se descarta que en este contexto tenga un importante papel en la formación de nuevos vasos sanguíneos que inervan a un tumor en crecimiento.

Sin embargo, en otros tipos de células tumorales se han encontrado funciones anti-oncogénicas para p32. Particularmente, en carcinoma cervical de células escamosas se ha encontrado que p32 regula negativamente la viabilidad, migración y proliferación celular (116). Además, se ha encontrado que p32 suprime la adhesión celular y la capacidad metastásica de células de carcinoma renal (117). Estos resultados dejan en evidencia que el papel de p32 en malignidad es dependiente del contexto fisiológico y del tipo de tejido u órgano donde se desarrolle el tumor.

1.9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en la evidencia previamente enunciada, está bien demostrado que la proteína p32 se encuentra sobreexpresada tanto en líneas celulares malignas de colon como en biopsias de pacientes aquejados de este tipo de tumor, con respecto a sus contrapartes no malignas (98–100). Además, se ha encontrado una correlación negativa entre el grado de sobreexpresión de la proteína y la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de colon (100). Sin embargo, a diferencia de otros tipos de cáncer, las funciones que ejerce p32 sobre el fenotipo maligno en células de cáncer de colon no se han estudiado a profundidad hasta el momento. Todo lo cual nos condujo a nuestra pregunta de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Dado que la proteína p32 se sobre-expresa en adenocarcinomas de origen colorrectal y correlaciona negativamente con la supervivencia de pacientes, ¿La sobreexpresión de p32 promueve el fenotipo maligno en células de cáncer de colon?

Como una respuesta tentativa a esta pregunta, planteamos nuestra hipótesis.

HIPOTESIS

La proteína p32 es promotora de malignidad en células de cáncer de colon, por lo que el bloqueo de la expresión o la inhibición farmacológica de dicha proteína afectará el fenotipo maligno de estas células.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el papel funcional de la proteína p32 en la promoción del fenotipo maligno en células de cáncer de colon.

Objetivos Específicos

1. Evaluar los niveles de expresión y la localización subcelular de p32 en líneas celulares de colon (normales vs cancerosas).
2. Evaluar el efecto del knockdown de p32 sobre la expresión de genes asociados al fenotipo maligno.
3. Evaluar el efecto del bloqueo de la expresión de p32 sobre la activación de la vía promotora de malignidad Akt-mTORC en células de cáncer de colon.
4. Evaluar el efecto del bloqueo de la expresión de p32 sobre la capacidad de migración *in vitro* de células cancerosas de colon.
5. Analizar el papel que juega p32 en la resistencia a muerte en respuesta a estrés oxidativo, estrés nutricional y agentes químicos citotóxicos en células malignas de colon.
6. Evaluar el papel de p32 en la capacidad clonogénica y tumorigénica de células de cáncer de colon.
7. Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de p32 sobre el fenotipo maligno de células de cáncer de colon.

2. Materiales y métodos

2.1. Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos utilizados en este estudio incluyen anti-p-mTOR de conejo, anti-mTOR de conejo, anti-p-p70 S6 cinasa murino, anti-p70 S6 cinasa murino, anti-p-ERK de conejo, anti-ERK de conejo, anti-CD44 de conejo, anti-PARP cortada de conejo, anti-caspasa-3 cortada de conejo y anti-p21 de conejo. Todos los anteriores fueron obtenidos de *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, EE.UU.). Los anticuerpos anti-p32 (gC1qR) murino, anti-mitofusina-2 murino y anti-lámina-b de conejo fueron comprados a *Abcam* (Cambridge, MA, EE. UU.). Los anticuerpos anti-Akt de conejo, anti-Phospho-Akt murino, anti-DRP1 murino y anti-OPA-1 murino se adquirieron de *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, TX, EE. UU.). El anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina de ratón fue comprado a la compañía *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE. UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina fue donado por el Dr. José Manuel Hernandez-Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN y es producido en su laboratorio. Los conjugados de peroxidasa de rábano picante-IgG anti-ratón y anti-conejo de cabra fueron comprados a *Pierce* (Rockford, IL, EE. UU.). El Temsirolimus (CCI-779) y el 5-fluorouracilo (5-FU) se adquirieron de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE. UU.). El inhibidor de p32 (M36) fue comprado a *MedChemExpress* (New Jersey, EE. UU.).

2.2. Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de colon utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: RKO, SW480, SW620 y HCT116. Como control de células de colon no malignas se utilizó la línea celular 112CoN. Las células RKO, HCT116 y 112CoN se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos (200 mg/ml de estreptomina y 120 mg/ml de penicilina) y L-glutamina 2 mM. Las células SW480 y SW620 se mantuvieron en DMEM F-12 suplementado con SFB al 10%, antibióticos y glutamina 2 mM. Todas las células se obtuvieron de la compañía *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, EE. UU.). Las líneas celulares fueron autenticadas en junio de 2017 por un análisis de perfil de STR de ADN realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de México.

2.3. Obtención de células knockdown de p32

El bloqueo de la expresión de p32 en células RKO y SW480 se realizó mediante la transfección estable con Lipofectamina-200 del plásmido pSIREN-RetroQ RNAi-Ready de Clontech, que genera el shRNA para la proteína p32. Como control, se realizó una transfección estable de las células RKO y SW480 con el mismo plásmido, pero sin la secuencia sh-RNA (plásmido vacío).

2.4. Western blot

Las células fueron lisadas durante 15 min a 4°C con tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH = 7,4, NaCl 150 mM, SDS al 0,1 %, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,25 %, EDTA 1 mM) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después de la centrifugación (15500 g) durante 15 min a 4°C, 40 µg del lisado total (sobrenadante de la centrifugación) fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8, 10 o 15% con SDS (SDS-PAGE) seguida de la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5 % o BSA al 3 % en TBS y se incubó durante la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. La detección se logró usando el kit SuperSignal de Pierce luego de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usó actina como control de carga de proteínas totales.

2.5. Fraccionamiento subcelular y determinación de p32 en el sobrenadante

Para determinar los niveles de p32 en la fracción nuclear y citoplasmática de células de colon malignas y no malignas, se sembraron las células 112CoN, RKO, SW480 y SW620 en placas p100 hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 400 µl de buffer de homogeneización (B1) (Hepes 10mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, 0.5% Tritón X100, pH=8) por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se colectó el lisado y se agitó en vórtex por 25 s. Se le añadió NP40 10% y se centrifugó a 800 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se almacenó (Fracción citoplasmática) mientras que el pellet fue lavado con buffer de homogeneización y centrifugado a 800 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente el pellet lavado se resuspendió en una mezcla 1:1 de buffer de homogeneización con el buffer B2 (NaCl 1M, EDTA 0.2 mM, Glicerol 20%, DTT 0.5 mM, pH=2). Se incubó por 1 hora con agitación en vórtex cada 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 1200 g x 5 min. Se recuperó el sobrenadante (Fracción nuclear). Los niveles de p32 ambas fracciones celulares se determinaron por Western blot, aplicando 100 µg de proteínas a la electroforesis. Como control de pureza de cada fracción se

evaluaron en ambas los niveles de α -tubulina (proteína citoplasmática) y de lámina-b (proteína nuclear).

Para determinar los niveles de p32 en el sobrenadante de cultivo, se colectaron los sobrenadantes de las mismas células utilizadas para el fraccionamiento celular previamente descrito. Éstos se centrifugaron a 15 500 g x 15 minutos para eliminar cualquier resto celular. Posteriormente, los mismos fueron concentrados 10 veces en Amicones-Ultra 15 con filtro de 10 kDa (Merck), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron a la electroforesis 300 μ g de proteínas de cada sobrenadante colectado y concentrado.

2.6. RT-PCR

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (*Invitrogen*). Para la realización del RT-PCR se utilizó el kit SuperScript™ III RT/Platinum® Taq, siguiendo las instrucciones del fabricante. La retro-transcripción de *GAPDH* se usó como control. Los primers utilizados para la RT-PCR se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1-Lista de los primers usados en RT-PCR

Gen	Foward primers 5'-3'	Reverse Primers 5'-3'
<i>CIQBP (p32)</i>	GCCGGGGAAAAAATCACGGTC	CACTCTCAGCCTCGTCTTCTTGTC
<i>HAS-2</i>	CAGCCTCATCTGTGGAGATGGT	TCCCAGAGGTCCACTAATGCAC
<i>TNSF-15</i>	CTCTGCACTGGGAACATGAACT	TTGGCTCAGGGTAGCTGTCTGT
<i>HOOK-1</i>	CCTGGTACCGAGCTTTCCTG	TGTCTGCAGCCAGATCATGAGG
<i>GAPDH</i>	CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA	GGATGACCTTGCCCACAGCCT

2.7. Microscopía confocal de Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos. Luego se permeabilizaron y bloquearon simultáneamente con PBS- 0.3% Triton X-100- 3% BSA durante 1 hora. A continuación, la incubación con anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4° C y luego con el anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente. Las imágenes de

inmunofluorescencia fueron capturadas con el microscopio confocal marca Nikon A1R+ STORM. El procesamiento de imágenes y los análisis posteriores se realizaron utilizando los programas *NIS Elements Viewer* e *Imagen J*.

2.8. Citometría de flujo

2.8.1. Evaluación de los niveles de expresión intracelular y en la superficie celular de p32

Las células fueron despegadas y disociadas en solución EDTA 10mM. Posteriormente se centrifugaron y el pellet se resuspendió en tampón FACS (4% SFB en PBS). Las células (2×10^5 células para cada condición) fueron permeabilizadas con Triton X-100. Se añadió el anticuerpo primario de ratón anti-p32 (1:50, Chemicon) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron dos lavados con tampones FACS frío. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón- FITC (1:100) y se incubó durante 30 minutos a 4°C (protegido de la luz). Las células se lavaron tres veces y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Las células teñidas sólo con el anticuerpo secundario se usaron como control negativo. Las células fueron analizadas en un citómetro marca Attune Nxt (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), y los datos obtenidos se procesaron con el software FlowJo (Tree Star®, Ashland, OR, EE. UU.). Un procedimiento similar, pero sin permeabilización ni fijación fue llevado a cabo para determinar los niveles de p32 en la superficie celular de células de cáncer de colon.

2.8.2. Ensayos de evaluación de proliferación con CFSE

Para determinar la tasa de proliferación celular de las células RKO en ausencia o presencia de M36 (inhibidor específico de p32) se evaluaron los niveles de CFSE de las células por citometría de flujo. Para ello, se sembraron 25 000 células RKO por pozo en placas de 6 pozos y se dejaron crecer por 24 horas. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se incubaron por 20 minutos con CFSE 1 μ M en PBS a 37°C. Luego, las células se lavaron con SFB y se dejaron en este medio por 20 minutos a 37°C para su recuperación. Después, se trataron las células por 6 días con M36, vehículo o control. Luego de esto, los niveles de CFSE fueron determinados por citometría de flujo.

2.9. Microarreglo de genes

Se tomaron muestras de ARN total de las líneas celulares RKO y SW480 (tanto control como knockdown de p32). Las mismas fueron enviadas al INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica) para análisis por microarreglos de genes. ARNs con valores de integridad de ARN (RIN) superiores a 9 fueron analizados utilizando la plataforma Affymetrix Gene ST 1.0, siguiendo

las recomendaciones del fabricante. El análisis principal fue realizado utilizando la plataforma *AltAnalyze* para la normalización, resumen y análisis de expresión diferencial. Los resultados se analizaron posteriormente utilizando los siguientes programas bioinformáticos: *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*, *The Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery (DAVID)*, *Network Analyst*, *The Candidate Cancer Gene Database (CCGD)* y la herramienta bioinformática *UALCAN* del programa *The Cancer Genome Atlas Program (TCGA)*.

2.10. Ensayos de migración por cierre de herida

Se sembraron células RKO o SW480 sh-control o sh-p32 hasta confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos durante 48 h. A continuación, utilizando una punta de pipeta estéril se realizó una herida por el centro de la monocapa celular. Luego se lavaron las células con PBS y se incubaron con medio sin suero a 37°C durante 24 horas. Se tomaron fotografías de la monocapa celular a las 0 y 24 horas después de la realización de la herida. Las fotografías obtenidas se procesaron usando el programa *Image J*.

2.11. Ensayos de viabilidad y análisis de apoptosis

Se usó el ensayo MTT para la evaluación de la viabilidad. Para ello se sembraron 1.8×10^4 células RKO (sh-control o sh-p32) por pocillo en placas de 96 pocillos. Las mismas se mantuvieron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. En el caso de línea celular SW480, se sembraron 2×10^4 células sh-control o sh-p32 por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las mismas se dejaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 h. Luego, las células RKO se trataron con H₂O₂ a concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM durante 12 h para evaluar el efecto del estrés oxidativo. Por otra parte, las células SW480 se trataron con H₂O₂ a concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM durante 16 h para evaluar el efecto del estrés oxidativo también.

Para evaluar el efecto de los agentes quimioterapéuticos en la viabilidad celular, los tratamientos con CCI-779 (Temsirolimus) se realizaron a concentraciones de 0, 5, 10, 16, 20, 25 y 35 µM para células RKO o 0, 5, 10, 12.5, 16, 20, 25 y 35 µM para las células SW480 por 24 horas. Además, las células RKO se trataron con 5-fluorouracilo (5-FU) a concentraciones de 0, 0.2, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 mM y las células SW480 se trataron con 5-FU en concentraciones de 0, 0.2, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2500 mM durante 72 h. Para evaluar el efecto del estrés nutricional, las células fueron tratadas con medio sin suero o con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) durante 12 h para las células RKO o 48 horas para las células SW480. Después de los tratamientos, se añadieron 0.5 mg/ml de MTT a las células y se incubaron durante 3 h a 37°C y 5% de CO₂,

protegidas de la luz. Posteriormente, los cristales de formazán se disolvieron en isopropanol ácido (pH=4) y se cuantificó por espectrofotometría la absorbancia a 570 nm.

Para evaluar el efecto del inhibidor M36 sobre la viabilidad de células RKO, HCT116, SW480 y SW620 igualmente se utilizó el método de MTT. En este caso se sembraron 2500 células por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron tratadas con M36 en concentraciones de 0, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 75, 100 y 150 µM o una curva control con las concentraciones correspondientes del vehículo (DMSO) por 72 horas. Como control de la especificidad del inhibidor se evaluó el efecto de este sobre las células RKO depletadas de p32 y las células 112CoN a las concentraciones de 50 y 100 µM por 72 horas. Pasado este tiempo, el procedimiento realizado fue similar al enunciado previamente.

Para determinar el efecto del anticuerpo monoclonal 60.11 (que se une específicamente a la región N-terminal de p32) sobre la viabilidad de células de cáncer de colon RKO, SW480 y SW620; se utilizó el kit de viabilidad Glo2.0. Este kit permite determinar los niveles de ATP de poblaciones celulares como una medida de la viabilidad. Se sembraron 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Pasado este tiempo, las células se incubaron por 72 horas con el AcM 60.11 a una concentración de 10 µg/ml, una IgG control a la misma concentración y un control sin tratamiento. Posteriormente, la viabilidad celular se determinó con el kit previamente mencionado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Además, la muerte celular apoptótica fue examinada por Western Blot. Esto se hizo específicamente a través de la detección de Caspasa-3 cortada y/o PARP cortada en los lisados de las células tratadas.

2.12. Evaluación de las vías de señalización Akt/mTOR y de las MAP cinasas

Se sembraron 3 x 10⁵ células RKO sh-control o sh-p32 en una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer durante 48 horas. Después de ese tiempo, las células fueron ayunadas durante 16 horas con medio libre de suero. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 10% de SFB durante 1, 3 o 6 h para evaluar la activación de la vía de señalización celular Akt/mTOR por Western blot. Para la evaluación de la tasa de activación de Akt, mTOR y p70- S6 cinasa en tiempos más largos, 1 x 10⁶ células RKO o SW480 (sh-control o sh-p32) se sembraron en placas p60 y se cultivaron en medio con SFB al 10 % durante 48 horas. Las células se lisaron y los niveles de Akt, mTOR y p70-S6 cinasa tanto fosforilados como totales fueron evaluados por Western blot.

Para evaluar el efecto del inhibidor M36 sobre la activación de las vías Akt-mTOR y de las MAPK, se sembraron 2.5×10^5 células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Las células se dejaron crecer por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente se ayunaron por 24 horas. Durante el ayuno, un grupo se pretrató con el inhibidor M36 y otro con el vehículo (a la concentración determinada como IC50 en los ensayos de viabilidad). Posteriormente, las células fueron estimuladas con SFB al 10% en presencia del inhibidor o del vehículo por 3 o 6 horas para cada condición. Como control negativo de la activación de las vías se utilizó un grupo en condiciones de ayuno. Igualmente se incluyó un control positivo de activación de las vías tratado con SFB al 10% y en ausencia tanto del inhibidor como del vehículo. La activación de las vías fue medida por Western blot de las proteínas fosforiladas y totales de Akt, mTOR, p70-S6 cinasa y ERK.

2.13. Ensayos de formación de colonias

Se sembraron 1×10^2 células RKO sh-control, RKO sh-p32, SW480 sh-control o SW480 sh-p32 por pocillo en placa de 96 pocillos en el medio de cultivo correspondiente. Las células se cultivaron a 37°C durante 10 días. Después de este tiempo, las colonias obtenidas se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con cristal violeta al 0,5 % y solución de metanol al 25 %. El número de colonias se cuantificó bajo el microscopio óptico.

Para evaluar el efecto del inhibidor M36 sobre la capacidad clonogénica, se siguió un procedimiento similar al anterior. Se sembraron 1×10^2 células RKO, HCT116, SW480 o SW620 por pocillo en placas de 96 pocillos. A las 24 horas de sembradas, un grupo fue tratado con vehículo y el otro con M36 a las concentraciones correspondientes a la IC50 de las curvas de viabilidad previamente obtenidas para cada línea celular. En cada caso, se contó con un grupo control sin ningún tratamiento. Posteriormente, el procedimiento seguido fue similar al enunciado previamente.

Con objetivo de evaluar el efecto del anticuerpo monoclonal 60.11 sobre la capacidad clonogénica de células de cáncer de colon se siguió un procedimiento similar al anterior. Se sembraron 1×10^2 células RKO, SW480 o SW620 por pocillo en placas de 96 pocillos. A las 24 horas de sembradas, un grupo fue tratado con IgG control y el otro con el AcM 60.11 a $10 \mu\text{g/ml}$. Adicionalmente, se contó con un grupo control sin ningún tratamiento. Posteriormente, el procedimiento seguido fue similar al enunciado previamente.

2.14. Ensayos de tumorigénesis en ratones desnudos

Los ratones desnudos machos de seis semanas de edad fueron inyectados por vía subcutánea en su flanco izquierdo con 1×10^6 células RKO o SW480 sh-control, y en su flanco derecho con 1×10^6 células RKO o SW480 sh-p32. Después de 4 semanas se llevó a cabo la eutanasia de los animales. Se extirparon los tumores y se determinó el peso tumoral. El experimento se realizó bajo las pautas para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

2.15. Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces usando diferentes preparaciones celulares. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se realizó un análisis estadístico de los datos usando la prueba t de Student o un ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple de medias de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando *GraphPad Prism 6*. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

3. Resultados

3.1. La proteína p32 se sobreexpresa en células de cáncer de colon con respecto a células no malignas de colon

Para investigar el papel de p32 en las células de cáncer de colon, primero se comparó el nivel de expresión de la proteína entre líneas celulares de colon malignas y no malignas mediante Western blot (WB). Este análisis reveló que las líneas celulares de cáncer de colon (RKO, SW480 y SW620) muestran una mayor expresión de p32 que la línea celular de colon no maligna (112CoN) (**Figura 3.1A**). Se obtuvo un resultado similar usando microscopía de inmunofluorescencia confocal (**Figura 3.1B**), mostrando p32 una distribución intracelular punteada, probablemente confinada a un orgánulo dentro de las células cancerosas, mientras que su distribución parece estar acoplada a fibras en células 112CoN. Interesantemente, se encontró una mayor localización nuclear de la proteína en células malignas que en células no malignas (**Figura 3.1B**). Mediante fraccionamiento celular, se pudo constatar que p32 se encuentra en mayores niveles tanto en la fracción citoplasmática como nuclear de las células cancerosas de colon con respecto a las no malignas (**Figura 3.1 C**).

Con el objetivo de evaluar la tasa de secreción de p32 de las líneas celulares de colon antes mencionadas, se evaluaron por western blot, los niveles de p32 en el sobrenadante de cultivo concentrado de las células 112CoN, RKO, SW480 y SW620. A través de esta técnica, se encontró que las células de cáncer de colon presentan niveles de secreción de p32 superiores a las células no malignas 112CoN (**Figura 3.2A**). Interesantemente, la línea celular de origen metastásico SW620 presentó la mayor tasa de secreción de p32. Por otro lado, mediante citometría de flujo sin permeabilización, se evaluaron los niveles de p32 en la superficie de las células cancerosas de colon. Interesantemente, no se encontró que la proteína p32 se encuentre adosada a la superficie celular de estos modelos de cáncer de colon (**Figura 3.2B**), a diferencia de lo que está previamente reportado e igualmente comprobado en nuestro laboratorio en células de cáncer de mama (35). En resumen, los resultados encontrados demuestran que los niveles de la proteína p32 son superiores en el sobrenadante de cultivo, la fracción citoplasmática y la fracción nuclear de las células de cáncer de colon con respecto a sus contrapartes no malignas.

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

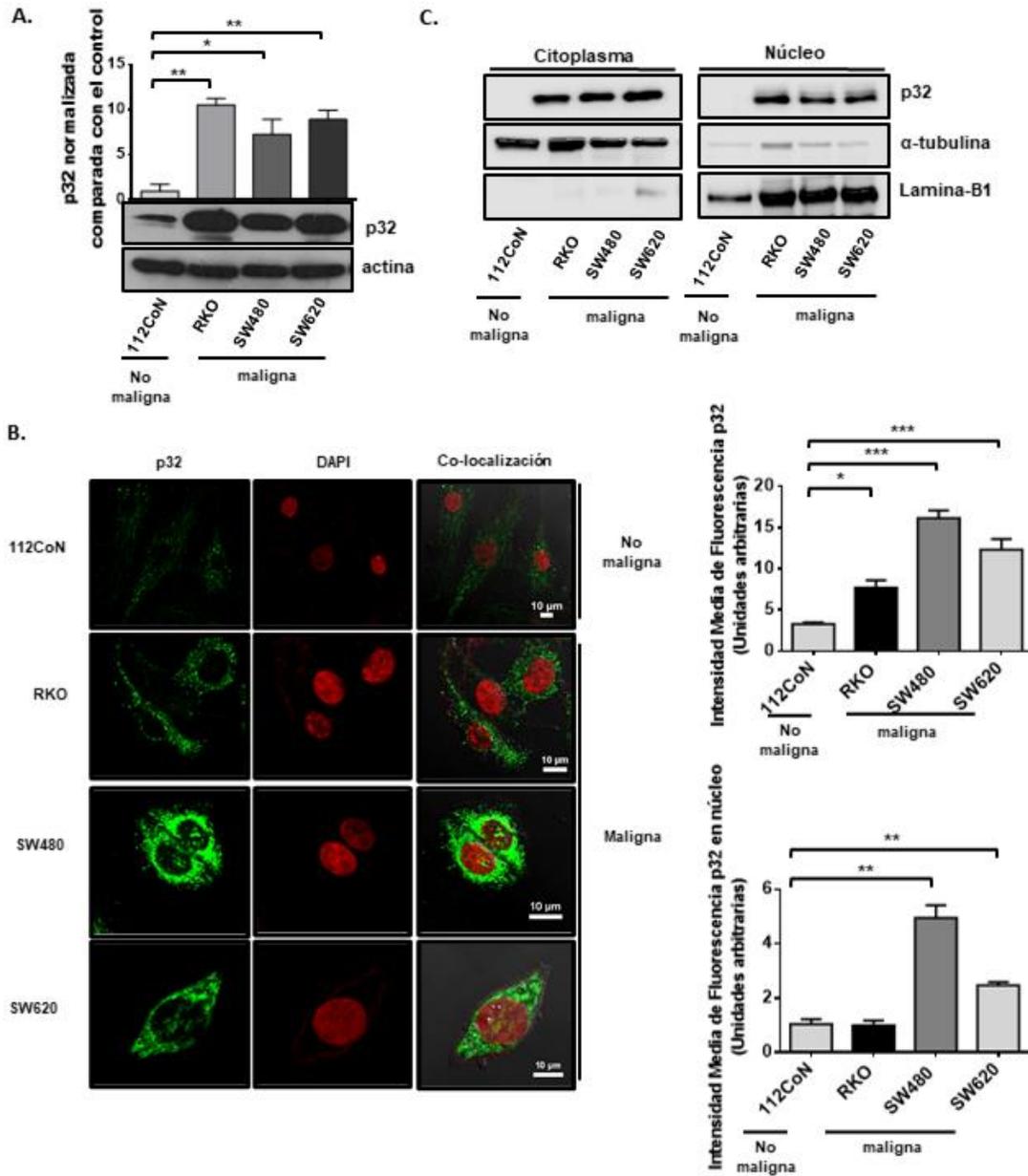


Figura 3.1. La proteína p32 se sobre-expresa en células de colon malignas en relación con células no malignas. (A) Se evaluó la expresión de p32 en células no malignas de colon 112CoN y células malignas de colon RKO, SW480 y SW620 por Western blot. Se usó actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar el cambio en los niveles de expresión de p32. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (B) Las células 112CoN, RKO, SW480 y SW620 se fijaron con PFA al 1 % y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,3 %. La expresión intracelular de p32 fue examinada por microscopía confocal de inmunofluorescencia. La expresión nuclear de p32 se evaluó mediante análisis de la co-localización entre las

señales de p32 y DAPI. Barra de escala, 10 μ m. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Se muestra también la cuantificación de los niveles de expresión totales y nucleares de p32 en células 112CoN, RKO, SW480 y SW620, medida como la intensidad de fluorescencia media en unidades arbitrarias obtenida a partir del análisis de las imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (C) Se realizó un fraccionamiento celular siguiendo el procedimiento descrito en la sección “Materiales y métodos”. Los niveles de p32 fueron evaluados tanto en la fracción nuclear como en la citoplásmica mediante Western blot para las 4 líneas celulares de colon antes mencionadas. Las proteínas α -tubulina y lamina-b1 fueron utilizadas como control de la pureza de la fracción citoplásmica y nuclear, respectivamente. Se muestran blot representativos de 3 experimentos independientes.

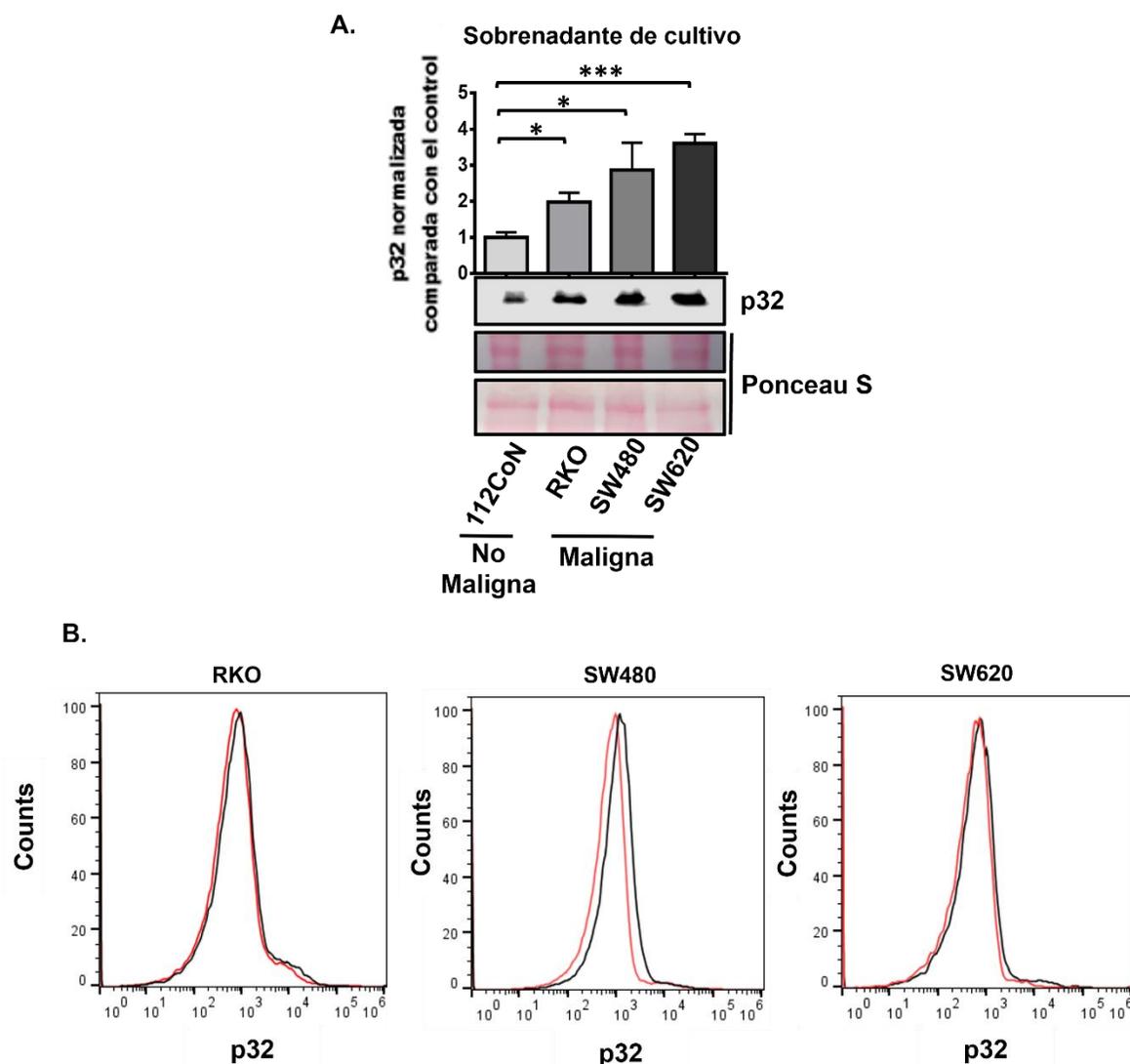


Figura 3.2. La proteína de p32 se encuentra en mayores niveles en el sobrenadante de cultivo de células malignas de colon con respecto a su contraparte no maligna, pero no se encuentra en la superficie de estas células. (A) Se

evaluaron los niveles de p32 en el sobrenadante de cultivo concentrado de las células no malignas de colon 112CoN y células malignas de colon RKO, SW480 y SW620 por Western blot. Se muestra la tinción de parte de la membrana con rojo Ponceau como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar el cambio en los niveles de expresión de p32. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$. (B) Se evaluaron los niveles de p32 en la superficie celular de las células malignas de colon RKO, SW480 y SW620 por Citometría de flujo, según se describe en la sección “Materiales y métodos”. Las curvas en color rojo de los histogramas representan la señal del control marcado sólo con anticuerpo secundario. Las curvas en color negro representan la señal de las células marcadas con anticuerpo anti-p32. Los histogramas mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

3.2. El knockdown de p32 induce cambios en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo maligno en células de cáncer de colon RKO y SW480

Teniendo en cuenta la alta expresión de p32 que se encuentra en las células de cáncer de colon, investigamos si la proteína podía tener algún efecto en la promoción del fenotipo maligno en las células de cáncer de colon. Para evaluar esto, decidimos obtener clonas knockdown de la proteína en las líneas celulares RKO y SW480 a través de la transfección estable de un plásmido que codifica un sh-RNA contra p32. La eficiencia del knockdown se evaluó usando WB. Esta técnica confirmó que la expresión de p32 se había disminuido considerablemente en las celdas RKO y SW480 transfectados con el shRNA-p32 con respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío (**Figura 3.3A**). Los resultados fueron verificados adicionalmente por RT-PCR (**Figura 3.3B**) y citometría de flujo con permeabilización celular (**Figura 3.3C**).

Con el objetivo de conocer si el bloqueo de la expresión de p32 también afectaría la expresión de otros genes, se realizó el análisis por microarreglo de genes. Los resultados obtenidos mostraron que 94 secuencias cambiaron su expresión en las células RKO sh-p32 con respecto a las células RKO sh-control. Los niveles de transcripción de 53 genes fueron regulados al alza, mientras que los de 41 genes fueron regulado a la baja A través de análisis bioinformáticos, utilizando los programas descritos en la sección “Materiales y Métodos”, se encontró que los genes modificados están asociados con el metabolismo de lípidos, la bioquímica de moléculas pequeñas y la expresión génica. Se encontró que 35 de los genes modificados están estrechamente relacionados con fenotipos malignos (**Figura 3.3D**). Interesantemente, se encontró que la depleción de p32 afectó los niveles de algunos genes con función supresora de tumoral como TNSF-15, HOOK-1, y PDCD4, cuya expresión aumentó. Mientras que los niveles de otros genes implicados en la promoción de la malignidad como HAS-2 y MSR-1 se redujeron. Para corroborar los resultados del microarreglo de genes, se evaluó por RT-PCR el cambio en los niveles de transcripción de dos genes que

disminuyeron a consecuencia del knockdown de p32 (*CIQBP* (p32) y *HAS-2*) y de dos genes que se encontraron aumentados (*TNSF-15* y *HOOK-1*). Los resultados obtenidos del RT-PCR fueron consistentes con los resultados obtenidos previamente en el microarreglo de genes, como se muestra en la **Figura 3.3E**.

CD44 es una proteína estrechamente relacionada con p32, cuyo ligando principal es el ácido hialurónico. Se ha demostrado que la unión del ácido hialurónico a CD44 aumenta los niveles de expresión de esta última (112,118). Interesantemente, encontramos que, como consecuencia del knockdown de p32, se redujeron los niveles de expresión de *HAS-2* (sintetasa de ácido hialurónico-2). Teniendo en cuenta estas consideraciones, nos preguntamos si la expresión de CD44 tendría alguna afectación en las células silenciadas de p32. Para investigar esto, evaluamos los niveles de CD44 por WB en las células RKO y SW480 depletadas de p32 con respecto a las células control. Sorprendentemente, encontramos que los niveles de CD44 se redujeron en las células SW480 depletadas de p32 en comparación con las células control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la línea celular RKO (**Figura 3.3F**). Estos resultados fueron confirmados por microscopía de inmunofluorescencia (**Figura 3.3G**). De conjunto, nuestros datos demuestran que p32 puede regular el nivel de expresión de diferentes genes asociados con el fenotipo maligno en células de cáncer de colon.

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

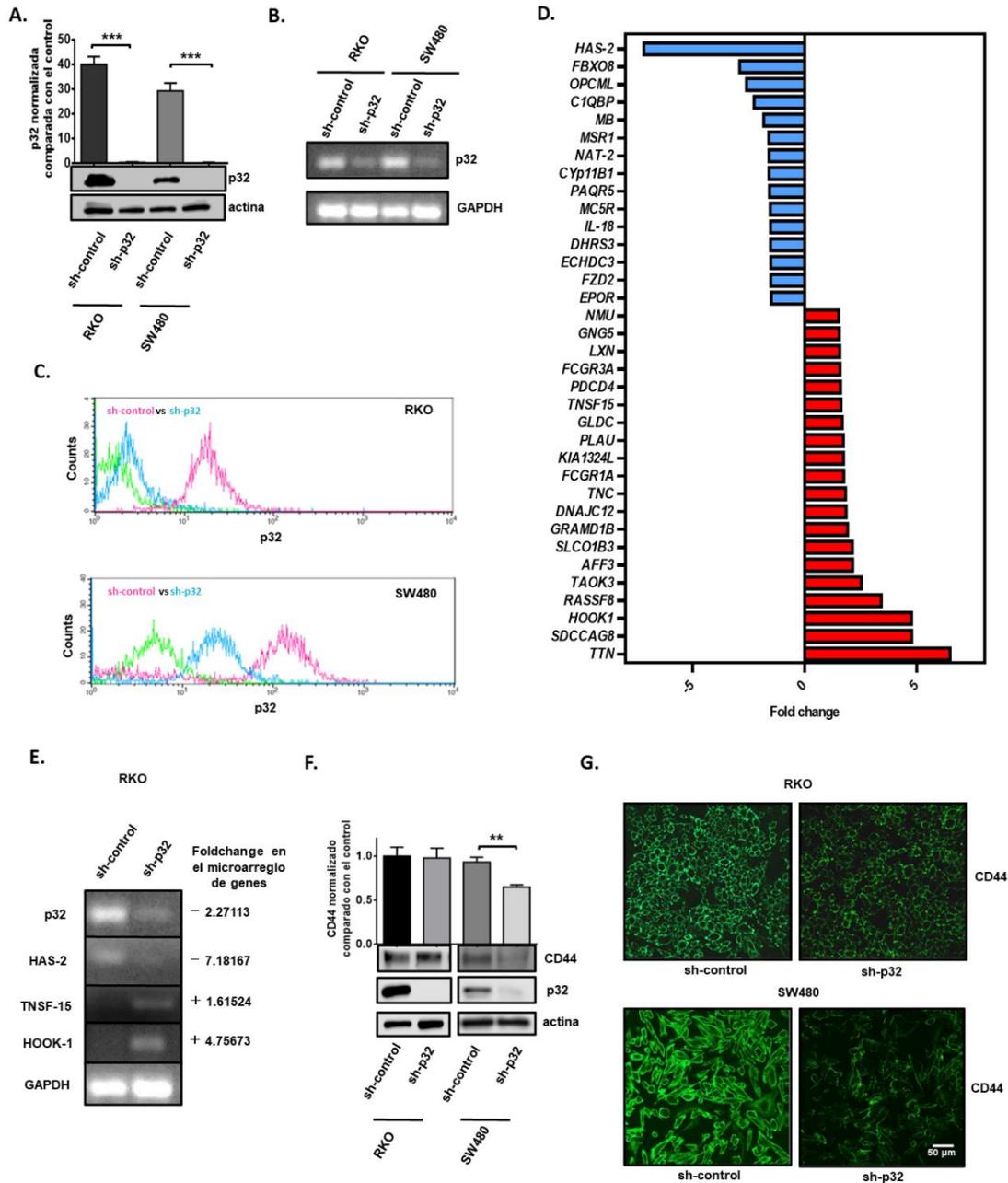


Figura 3.3. El knockdown de p32 induce cambios en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo maligno en células RKO y SW480. **(A)** La eficiencia del knockdown de p32 se evaluó en células RKO y SW480 mediante Western blot. Se usó actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar el cambio en los niveles de expresión de p32. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, ***p < 0,001. La eficiencia del knockdown también se examinó mediante RT-PCR **(B)** y citometría de flujo **(C)**. **(D)** Gráfico de Fold change de expresión de genes relacionados con fenotipo maligno que se encontraron

regulados negativamente (azul) o positivamente (rojo) en células RKO sh-p32 con respecto a las RKO sh-control. Los valores de fold change se determinaron a partir del análisis de microarreglo de genes, que fue realizado según se describe en la sección "materiales y métodos". (E) Los cambios en los niveles de los transcritos primarios de *CIQBP* (p32), *HAS-2*, *TNSF-15* y *HOOK-1* se evaluaron mediante RT-PCR a partir de ARN total extraído de células RKO sh-control y RKO sh-p32. (F) El nivel de expresión de CD44 fue evaluado en células RKO y SW480 sh-control y sh-p32 por Western blot. También se evaluaron los niveles de p32 para cada condición para verificar la eficiencia del knockdown. La actina se usó como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar el cambio en los niveles de expresión de CD44. Los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, $**p < 0,01$. (G) La expresión de CD44 en las células RKO y SW480 sh-control y sh-p32 también fue evaluada por microscopía de inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Barra de escala, 50 μ m.

3.3. El knockdown de p32 afecta negativamente la activación de la vía de señalización Akt/mTOR en células de cáncer de colon RKO y SW480

Previamente, se ha reportado en células de cáncer de páncreas y pulmón que los factores de crecimiento inducen la translocación de p32 a balsas lipídicas en la membrana citoplasmática, donde a través de su interacción con CD44, favorece la autofosforilación y activación de diferentes Receptores con actividad de Tirosina Cinasa (RTKs) (36,96). También se ha establecido que los las proteínas presentes en balsas lipídicas pueden desempeñar funciones importantes en la señalización celular y la interacción célula-célula. Interesantemente, Arielly SS. *et al.* han demostrado que p32 es la proteína más abundante en las balsas lipídicas ricas en caveolina en células de cáncer de colon (119). Teniendo en cuenta lo previamente mencionado, decidimos investigar el efecto del silenciamiento de p32 sobre la tasa de activación de la vía Akt-mTOR, que se encuentra río abajo de los RTKs y es clave para múltiples funciones asociadas a la progresión tumoral. Se usaron varios anticuerpos para detectar por Western blot, el estado de activación de Akt (fosforilada en Ser 473), mTOR (en Ser 2448) y el sustrato específico de mTORC1, la proteína cinasa ribosomal S6 (Subunidad p70) (p70-S6K, en Thr389).

Se sembraron células RKO sh-control o sh-p32 en una placa de 6 pocillos y se crecieron durante 48 horas. Después de ese tiempo, las células se ayunaron por 16 horas con medios sin suero. Luego, las células fueron estimuladas con DMEM con SFB al 10% durante 1, 3 o 6 horas para evaluar la activación de las proteínas Akt (**Figura 3.4A**), mTOR (**Figura 3.4B**) y p70-S6K (**Figura 3.4C**) por Western blot. Encontramos que las tasas de activación de Akt y de mTOR se vieron afectadas negativa y significativamente en células RKO con p32 silenciada, en comparación con células control. Como se muestra en la Figura 3A, la fosforilación de Akt resultó ser significativamente menor en células sh-p32 en comparación con células sh-control, después de 3 y 6 h de estimulación

con SFB al 10%. Las tasas de fosforilación de mTOR y de su sustrato específico p70-S6K también se encontraron disminuidas significativamente en las células depletadas de p32 con respecto al control a las 6 h de estimulación con SFB (**Figuras 3.4B, C**). Como prueba adicional, la tasa de activación de Akt, mTOR y p70-S6K se evaluó en células RKO y SW480 en tiempos más largos de estimulación con 10% de SFB (48 horas). Como se puede observar en la **Figura 3.4D**, en ambos tipos celulares la tasa de activación por fosforilación de Akt, mTOR y p70-S6K fue menor en las células depletadas de p32 en comparación con las células control. Estos resultados indican claramente que el knockdown de p32 inhibe la actividad de mTOR en células de cáncer de colon RKO y SW480 y son consistentes con el papel de p32 como un importante promotor de fenotipo maligno.

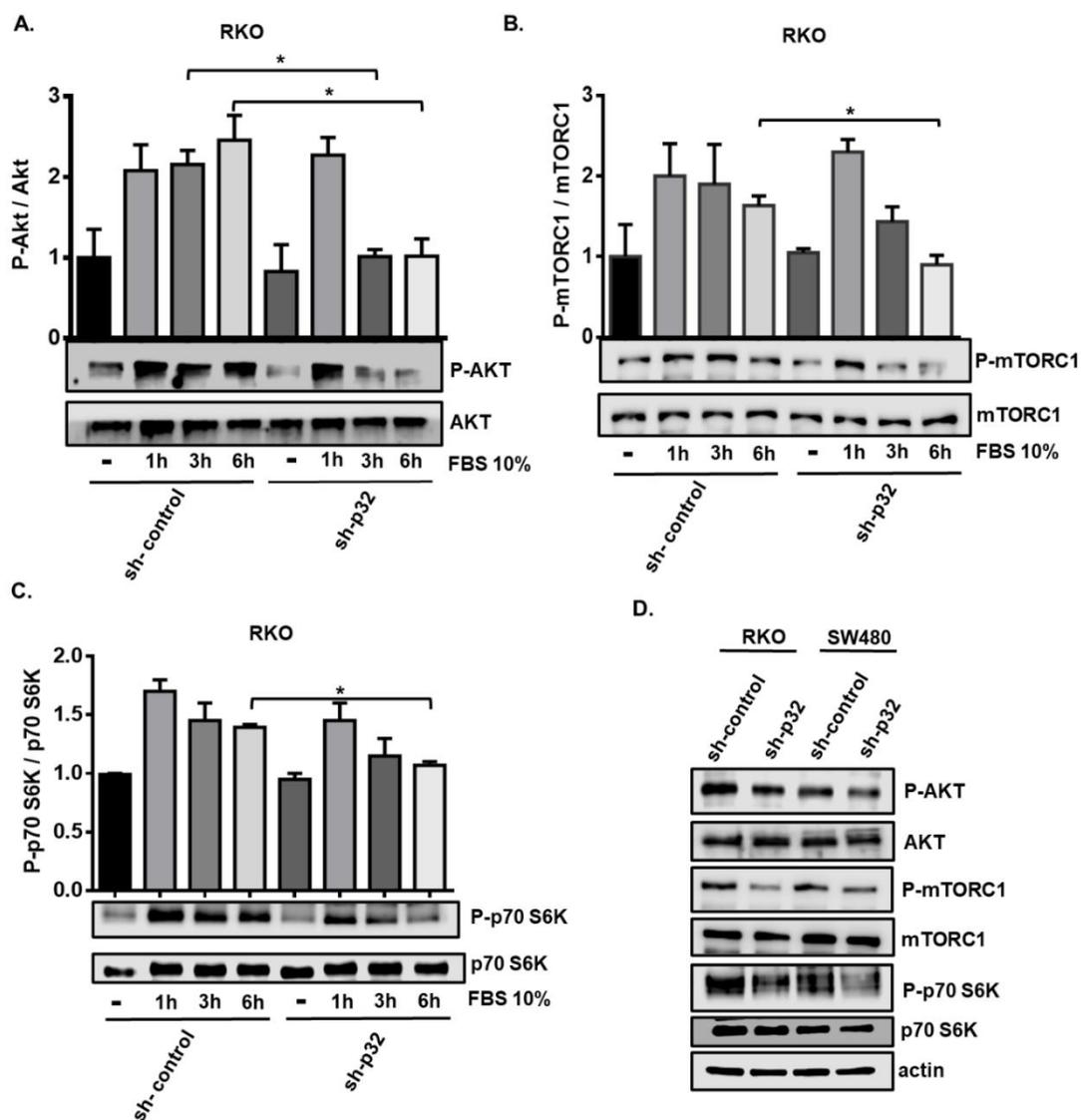


Figura 3.4. El knockdown de p32 afecta negativamente la activación de la vía de señalización Akt-mTOR en células de cáncer de colon RKO y SW480. Se sembraron 3×10^5 células RKO sh-control o sh-p32 en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. Después de ese tiempo, las células se ayunaron durante 16 horas con medio libre de suero. A continuación, las células se estimularon con DMEM con SFB al 10 % durante 1, 3 o 6 horas para evaluar la activación de las proteínas Akt (A), mTOR (B) y p70-S6K (C) mediante Western blot. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar los niveles de proteínas fosforiladas y totales. Los niveles de cada proteína fosforilada se normalizaron con respecto a su proteína total correspondiente. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, $*p < 0,05$. (D) Para la evaluación de la tasa de activación de la vía de señalización AKT-mTOR-p70S6K en tiempos más prolongados, se sembraron 1×10^6 células RKO o SW480 (sh-control o sh-p32) en placas p60 y se cultivaron en medio con FBS al 10 % durante 48 horas. Pasado ese tiempo, las células fueron lisadas y los niveles de

activación de AKT, mTOR p70-S6K fueron evaluados por Western blot. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes.

3.4. El knockdown de p32 afecta la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon RKO y SW480

Debido a que las balsas lipídicas ricas en caveolina parecen ser el sitio de acoplamiento preferencial para proteínas específicas involucradas en la adhesión focal y la metástasis del cáncer, también evaluamos la participación de p32 en los procesos de migración en células de cáncer de colon. Con este fin, se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida para comparar la capacidad migratoria de RKO y SW480 sh-control con la de las células depletadas de p32. El knockdown de p32 indujo una disminución significativa en la capacidad migratoria después de 24 horas de la apertura de la herida y en ausencia de SFB en la línea celular SW480 (**Figura 3.5A**). Se obtuvieron resultados similares para la línea celular RKO, aunque con un efecto menos significativo que en las células SW480 (**Figura 3.5B**). Estos resultados mostraron claramente que p32 promueve la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon RKO y SW480.

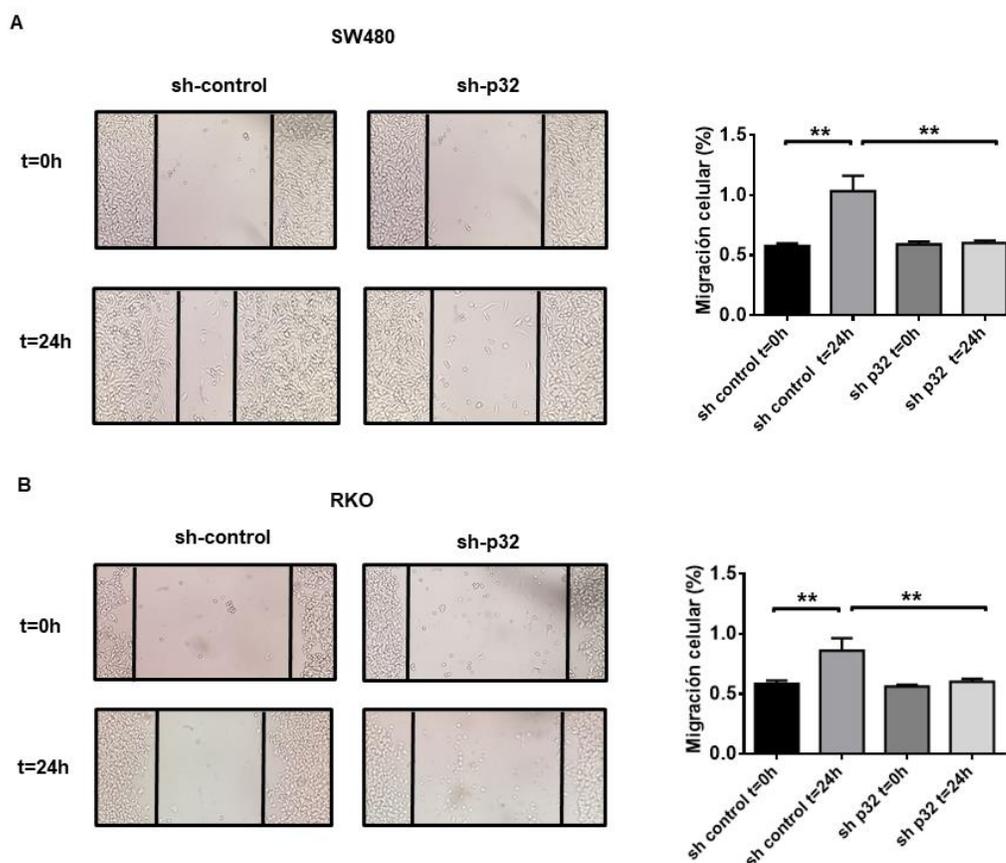


Figura 3.5. El knockdown de p32 afecta la capacidad migratoria de las células RKO y SW480. Los ensayos de cierre de herida se realizaron como se describe en la sección “Materiales y métodos” para las células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 (A) o RKO sh-control y RKO sh-p32 (B). Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, $**p < 0,01$.

3.5. El knockdown de p32 sensibiliza a las células RKO y SW480 a la muerte inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos, pero no a la muerte inducida por estrés nutricional

Para investigar a mayor profundidad el papel de p32 en la malignidad de las células de cáncer de colon, a continuación, examinamos los efectos de p32 en la capacidad de resistencia a muerte celular de las líneas celulares de cáncer de colon RKO y SW480 cuando son sometidas a diferentes tipos de estrés. Primero, evaluamos la viabilidad celular medida por MTT de células RKO o SW480 (sh-control y sh-p32) tratadas con concentraciones crecientes de H_2O_2 . Como se muestra en la **Figura 3.6A**, el ensayo de viabilidad mostró que, para ambas condiciones, hubo una disminución de

la viabilidad dependiente de la dosis en cada línea celular. A concentraciones extremas, ambas curvas se solaparon. Sin embargo, para valores intermedios de las curvas, hubo diferencias estadísticamente significativas en el grado de viabilidad observado. De acuerdo con esto, los valores de IC50 obtenidos en las células RKO fueron 1,927 mM para el sh-control y 1,051 mM para sh-p32, mientras que para las células SW480 fueron 4,6 mM para el sh-control y 1,9 mM para el sh-p32. Esto significa que se necesita aproximadamente el doble de la concentración de H₂O₂ para inducir la muerte del 50 % de las células RKO o SW480 sh-control en comparación con lo que se necesita para inducir la muerte del 50 % de las células RKO o SW480 sh-p32 (**Figura 3.6A**). Por lo tanto, estos resultados indican que el silenciamiento de p32 sensibilizó tanto a las células malignas RKO como SW480 a la muerte inducida por estrés oxidativo.

Posteriormente, se evaluó si el knockdown de p32 también sensibilizaba a las células de cáncer de colon a la muerte celular inducida por estrés nutricional o por agentes quimioterapéuticos. Para evaluar el efecto del estrés nutricional, se cultivaron células RKO o SW480 sh-control y sh-p32 durante 12 h o 48 h en medio de cultivo DMEM sin suero (ayuno), o en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), en comparación con el medio de cultivo DMEM completo como control. La supervivencia celular se evaluó utilizando la técnica MTT. Como se puede observar en la **Figura 3.6B**, la condición de ayuno por 12 o 48 horas no generó disminución en la supervivencia celular con respecto al control ni en las células RKO o SW480 sh-control ni en las células RKO o SW480 sh-p32. Por otro lado, la incubación de las células con HBSS durante 12 horas generó una disminución significativa de la viabilidad tanto en RKO o SW480 sh-control como en RKO o SW480 sh-p32 con respecto a las células control cultivadas en DMEM completo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la viabilidad de RKO o SW480 sh-control y sh-p32 tratados con HBSS (**Figura 4.6B**). Se obtuvieron resultados similares cuando el experimento se llevaron a cabo en tiempos más largos (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados indicaron que el knockdown de p32 no induce sensibilidad a la muerte celular inducida por estrés nutricional en células de cáncer de colon.

A continuación, para investigar si el knockdown de p32 sensibiliza a las células malignas a la muerte inducida por los agentes quimioterapéuticos CCI-779 (Temsirrolimus, un inhibidor de mTOR) o 5-FU (inhibidor de la biosíntesis de timidina), se trataron las células RKO y SW480 (sh-control y sh-p32) con concentraciones crecientes de CCI-779 (**Figura 3.6C**) o 5-FU (**Figura 3.6D**) durante 24 y 72 h, respectivamente. Pasado ese tiempo, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica MTT. Interesantemente, como había sido previamente reportado por nuestro laboratorio, la

resistencia mostrada por las células de cáncer de colon RKO contra el tratamiento con 5-FU o CCI-779 fue opuesta a la observada para las células SW480 (**Figuras 3.6C, D**), ya que las células RKO sh-control mostraron resistencia al tratamiento con CCI-779 pero fueron sensibles al 5-FU, mientras que las células SW480 sh-control fueron sensibles al CCI-779 pero mostraron resistencia al 5-FU, ya que las dosis inferiores a 100 mM no inhibieron significativamente la viabilidad celular. Cabe destacar que, como se puede observar en las **Figuras 3.6C, D**, la depleción de la expresión de p32 revirtió la resistencia a estos agentes, ya que sensibilizó a las células RKO a la muerte inducida por CCI-779 a dosis superiores a 20 μM y también sensibilizó a las células SW480 al tratamiento con 5-FU en comparación con las células sh-control. La IC₅₀ encontrada para las células de SW480 sh-control fue de 897,5 μM , aproximadamente 6 veces mayor que la estimada para las células sh-p32 con el mismo tratamiento (153,5 μM).

Para evaluar el efecto del estrés oxidativo o el estrés citotóxico (inducido por CCI-779 o 5-FU) sobre la inducción de apoptosis, se evaluaron mediante Western blot los niveles de caspasa-3 escindida (activa) o PARP escindida (activa). La **Figura 3.7** muestra que, como se esperaba, tanto el estrés oxidativo como el tratamiento farmacológico de las células RKO sh-control indujo la muerte celular apoptótica de éstas. Esto fue constatado como un aumento en los niveles de caspasa-3 escindida o PARP escindida. Pero sorprendentemente, también se observó que, bajo las mismas condiciones de estrés, la tasa apoptótica (visualizada a través de la caspasa-3 escindida o PARP escindida) fue mayor en las células depletadas de p32 en comparación con las células control (**Figura 3.7B, D, F**). De acuerdo con esto, las micrografías que se muestran en la **Figura 3.7A, C, E** demuestran una mayor sensibilización a la muerte apoptótica de las células con p32 silenciada que la que se encuentra en las células control. En conjunto, los datos indican que p32 promueve la resistencia a la muerte celular apoptótica inducida por estrés oxidativo (H_2O_2) y agentes quimioterapéuticos (CCI-779 o 5-FU), pero no a la muerte celular inducida por estrés nutricional.

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

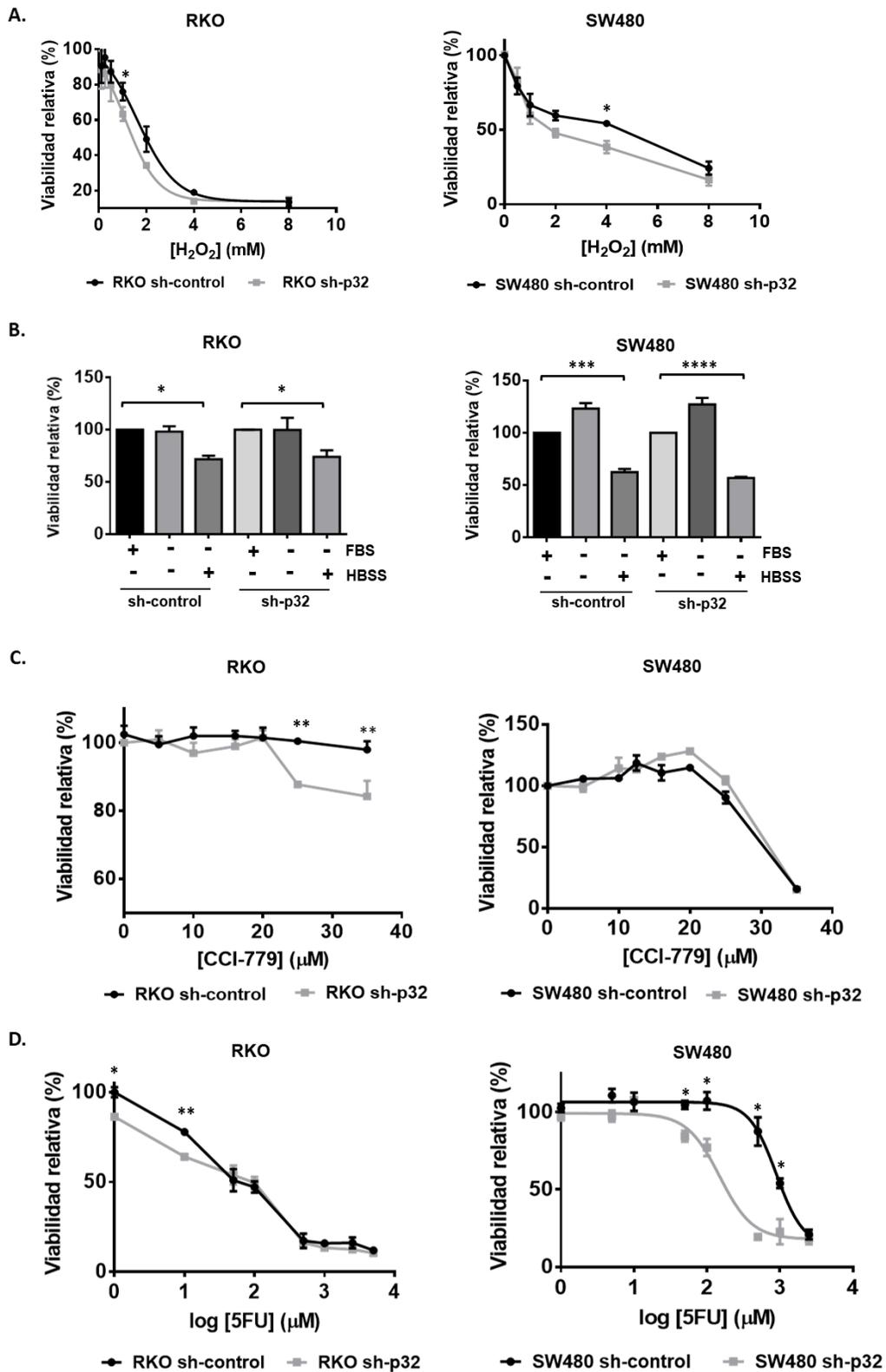


Figura 3.6. El knockdown de p32 sensibiliza a las células RKO y SW480 a la muerte celular inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos, pero no a la muerte inducida por estrés nutricional. (A) Se sembraron células RKO sh-control y RKO sh-p32 a razón de $1,8 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con H_2O_2 en concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0 mM. Después de 12 h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los datos se ajustaron a una curva de inhibición dosis-respuesta y se estimó la IC50 para cada condición. Las IC50 estimadas para RKO sh-control = 1,927 mM y para RKO sh-p32 = 1,051 mM. Cada punto de la curva representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$. Se sembraron células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 a razón de 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, las células se trataron con H_2O_2 en concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0 mM. Después de 16 h, se realizó el ensayo MTT como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada punto de la curva representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ (B) Se sembraron $1,8 \times 10^4$ células RKO sh-control y RKO sh-p32 por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con DMEM sin suero (ayuno), solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) o DMEM completo (con SFB) como control. Después de 12 h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección de "Materiales y métodos". Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, * $p < 0,05$. Se sembraron células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 a razón de 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, las células se trataron con DMEM sin suero (ayuno), solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) o DMEM completo (con SFB) como control. Después de 48 h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$. (C) Se sembraron células RKO sh-control y RKO sh-p32 a razón de $1,8 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con CCI-779 en concentraciones de 0, 5, 10, 16, 20, 25, 35 μ M. Después de 24 h, el ensayo MTT se realizó como se describe en Sección de "Materiales y Métodos". Cada punto de la curva representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$. Se sembraron células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 a razón de 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. Luego, las células se trataron con CCI-779 en concentraciones de 0, 5, 10, 12,5, 16, 20, 25, 35 μ M. Después de 24 h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección "Materiales y Métodos". Cada punto de la curva se muestra como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (D) Se sembraron células RKO sh-control y RKO sh-p32 a razón de $1,8 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con 5-fluorouracilo (5FU) a concentraciones de 0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 mM. Después de 72 h, se realizó el ensayo MTT como se describe en la sección "Materiales y Métodos". Cada punto de la curva se muestra como la media \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Se sembraron células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 a razón de 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, las células se trataron con 5-fluorouracilo (5FU) a concentraciones de 0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 2500 mM. Después de 72 h, se realizó el ensayo MTT como se describe en la sección "Materiales y Métodos". Los datos se ajustaron a una curva de inhibición dosis-respuesta y se estimó la IC50 para cada condición. Las IC50 estimadas son: IC50 SW480 sh-control = 897,5 μ M e IC50 SW480 sh-p32 = 153,5 μ M. Cada punto de la curva se muestra como la media \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0,05$.

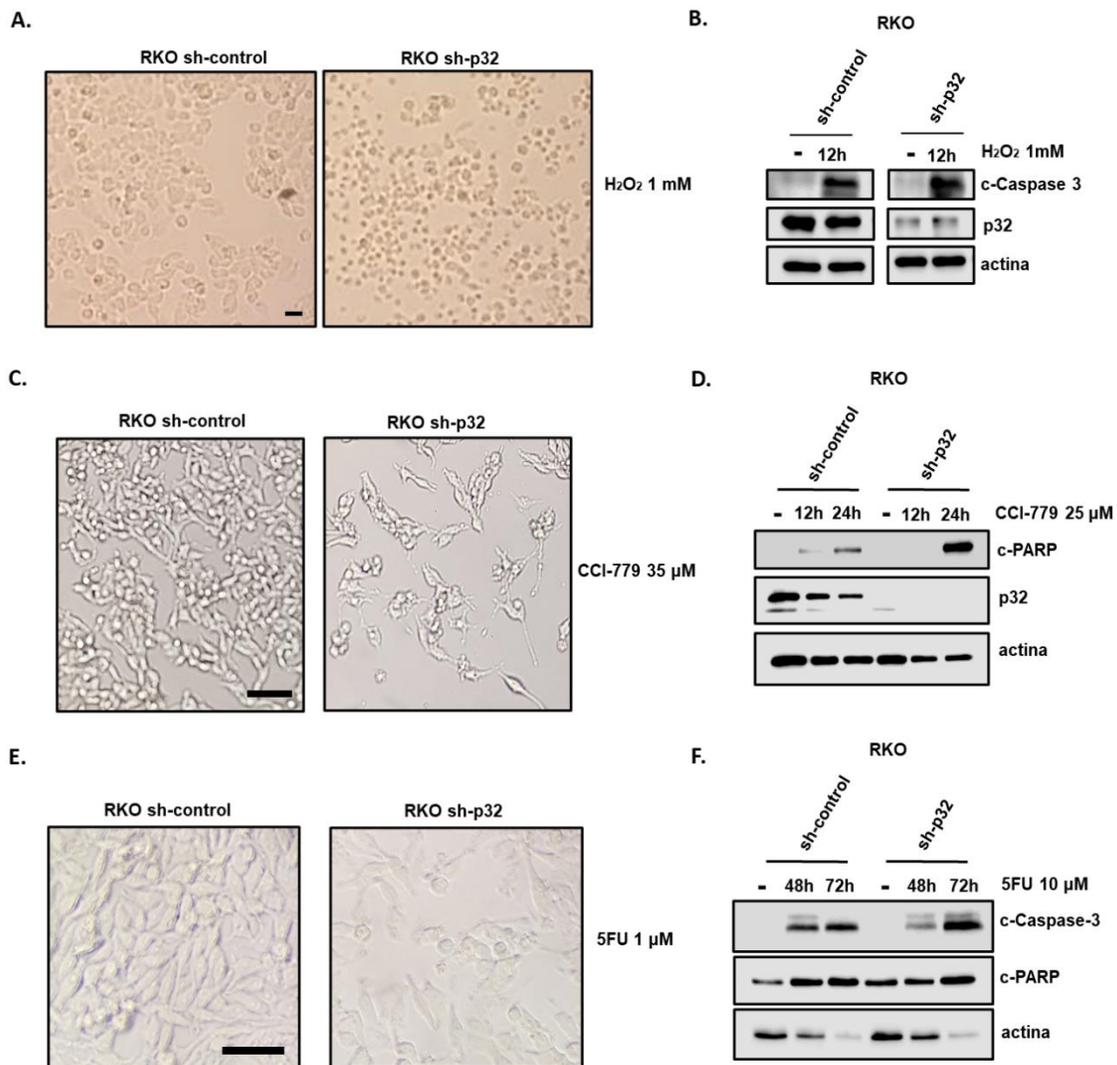


Figura 3.7. El knockdown de p32 sensibiliza a las células RKO a la muerte celular apoptótica inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos CCI-779 y 5FU (A) Micrografías representativas de células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con H_2O_2 1 mM durante 12 h. Barra de escala, 50 μm . **(B)** Análisis por Western blot de la activación de caspasa-3 mediante escisión proteolítica en células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con H_2O_2 1 mM durante 12 h. **(C)** Micrografías representativas de células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con 35 μM CCI-779 durante 24 h. Barra de escala, 50 μm . **(D)** Análisis por Western blot de la activación de PARP por escisión proteolítica en células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con 25 μM CCI-779 durante 12 o 24 h. **(E)** Micrografías representativas de células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con 5FU 1 μM durante 72 h. Barra de escala, 50 μm . **(F)** Análisis por Western blot de la activación de Caspasa-3 y PARP por escisión proteolítica en células RKO sh-control y RKO sh-p32 tratadas con 10 μM de 5FU durante 48 o 72 h.

3.6. El knockdown de p32 afecta la capacidad clonogénica y tumorigénica de las células de cáncer de colon RKO y SW480

Posteriormente, se evaluó si el knockdown de p32 afecta la capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon. Para ello, realizamos un ensayo de formación de colonias. Las fotografías y sus correspondientes gráficos de barras se muestran en las **Figuras 3.8A y B**. Los resultados demostraron que las células RKO o SW480 sh-control mostraron una mayor capacidad clonogénica que RKO o SW480 sh-p32 ya que, en cada caso, las células sh-control formaron casi el doble del número de colonias formadas por las células depletadas de p32.

Adicionalmente, para demostrar *in vivo* si el knockdown de p32 afecta la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de colon, utilizamos un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos. A seis ratones inmunocomprometidos se les inyectó en el flanco izquierdo por vía subcutánea (s.c.) 1×10^6 células de RKO sh-control y en el flanco derecho 1×10^6 RKO sh-p32. Se siguió el mismo protocolo inyectando ratones con células SW480 sh-control o sh-p32. Después de tres semanas, se sacrificó a los ratones y se pesaron los tumores formados en cada caso. Se encontró que las células de cáncer de colon control (que expresan p32) podían formar tumores con un peso significativamente mayor que los tumores formados por células con expresión reducida de p32 (**Figura 3.8 C y D**). Por lo tanto, estos experimentos mostraron claramente que el knockdown de la proteína p32 afecta negativamente la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de colon. De conjunto, nuestros resultados indican que p32 promueve la capacidad clonogénica y tumorigénica de las células de cáncer de colon. Además, los datos que se muestran aquí indican que p32 juega un papel crucial en la promoción del fenotipo maligno en las células de cáncer de colon.

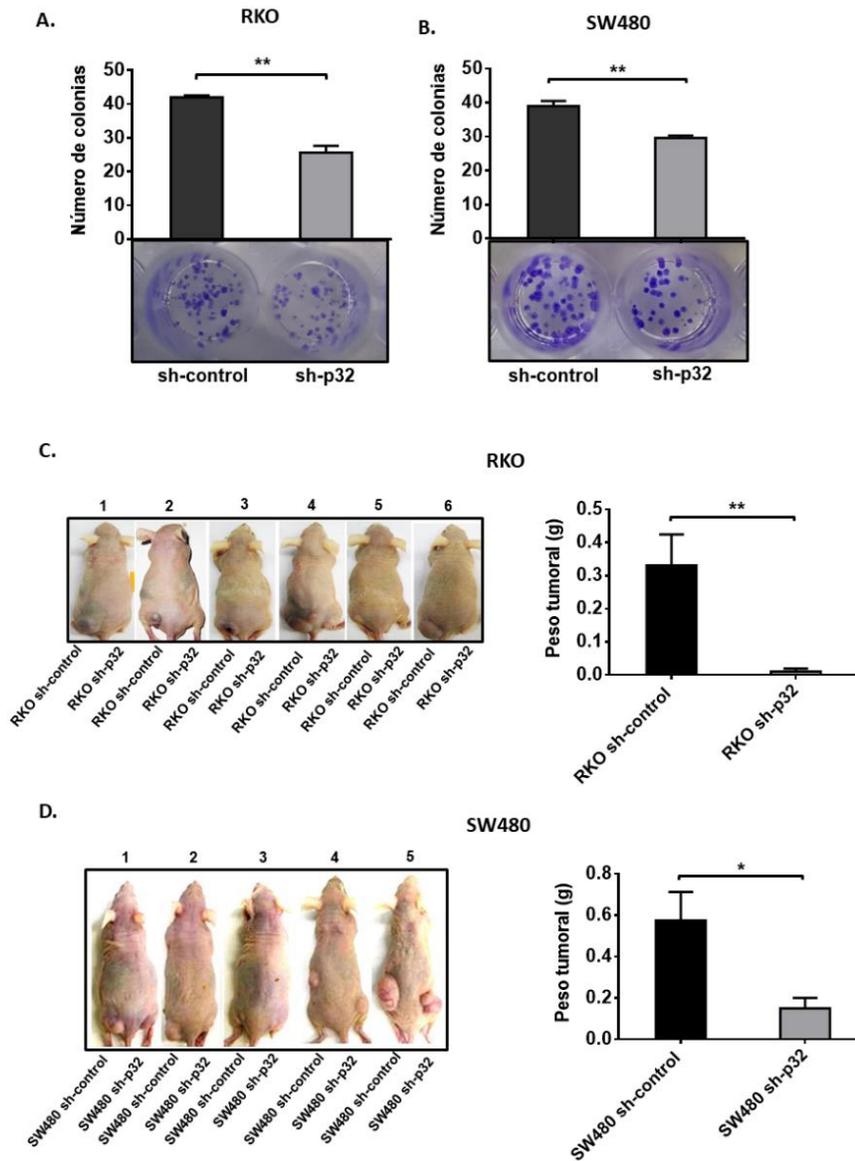


Figura 3.8. El knockdown de p32 afecta negativamente la capacidad clonogénica y tumorigénica de las células de cáncer de colon RKO y SW480. Los ensayos de formación de colonias para las células RKO sh-control y RKO-sh p32 (A) o SW480 sh-control y SW480 sh-p32 (B) se realizaron como se describe en la sección “Materiales y métodos”. Se muestran fotografías representativas de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, $**p < 0.01$. (C) La capacidad tumorigénica de las células RKO sh-control y RKO sh-p32 se evaluó en 6 ratones desnudos como se describe en la sección “Materiales y métodos”. Se muestran fotografías tomadas a los animales de experimentación justo después de la eutanasia. El gráfico representa la media \pm SEM de los pesos de los tumores formados por las células RKO sh-control o RKO sh-p32 en los 6 animales de experimentación, $**p < 0.01$. (D) La capacidad tumorigénica de las células SW480 sh-control y SW480 sh-p32 se evaluó

en 5 ratones desnudos como se describe en la sección “Materiales y métodos”. Se muestran fotografías tomadas a los animales de experimentación con tumores justo después de la eutanasia. El gráfico representa la media \pm SEM de los pesos de los tumores formados por las células SW480 sh-control o SW480 sh-p32 en los 5 animales de experimentación, * $p < 0,05$.

3.7. La inhibición farmacológica de p32 afecta negativamente el fenotipo maligno de las células de cáncer de colon

Con base en los hallazgos previamente descritos, que demuestran claramente el papel de p32 como una proteína oncogénica en células de cáncer de colon, se decidió evaluar el efecto de dos fármacos inhibidores de la proteína sobre el fenotipo maligno de células de cáncer de colon. Uno de ellos fue el inhibidor intracelular M36 que fue desarrollado a través de un modelo farmacóforo de la interacción de p32 con sus ligandos C1q y Lyp1. Previamente se ha demostrado que este inhibidor tiene la capacidad de mimetizar los efectos del knockdown de p32 en células de glioma (120). La otra estrategia farmacológica utilizada fue el tratamiento con el anticuerpo monoclonal (AcM) 60.11, dirigido contra la región N-terminal de p32. Se ha comprobado su efecto anti-proliferativo *in vitro* y anti-tumorigénico *in vivo* en modelos de cáncer de mama y mesotelioma (121,122).

3.7.1. El inhibidor farmacológico M36 afecta la viabilidad y capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon RKO, HCT116, SW480 y SW620

Con el objetivo de evaluar el efecto del inhibidor M36 sobre la viabilidad de células de cáncer de colon, se realizaron curvas dosis-respuesta en las células RKO, HCT116, SW480 y SW620 tratadas con concentraciones crecientes de M36. Como control se obtuvieron curvas de tratamiento con el vehículo DMSO a las concentraciones correspondientes. Los resultados de estos experimentos mostraron que la viabilidad de las 4 líneas celulares cancerosas de colon se afecta negativamente en presencia del inhibidor M36 (**Figura 3.9**), con un comportamiento dosis-dependiente. Se encontró además que las células más sensibles ($IC_{50} = 55.86 \mu M$) son las RKO, que interesantemente son las que presentan una mayor expresión intracelular de la proteína. Mientras que las células HCT116 presentaron una respuesta intermedia ($IC_{50} = 96.95 \mu M$) y las células malignas con más baja expresión de la proteína (SW480 y SW620) presentaron IC_{50} superiores a $100 \mu M$. Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad de las células de cáncer de colon RKO, HCT116, SW480 y SW620 tratadas con M36 con respecto a las tratadas con las concentraciones correspondientes del vehículo. Esta diferencia encontrada fue de nuevo más

marcada para las células RKO (**Figura 3.10 A, B, C, D**). Interesantemente, no se encontró que el inhibidor M36 afectara negativamente la viabilidad de las células 112CoN (células no malignas de colon con baja expresión de p32) (**Figura 3.10E**) ni de las células RKO depletadas de p32 (**Figura 3.10F**) con respecto al vehículo. Estos resultados claramente demuestran que la inhibición farmacológica de p32 afecta negativamente la viabilidad de células de cáncer de colon y que sus efectos son dependientes de los niveles de expresión intracelular de la proteína.

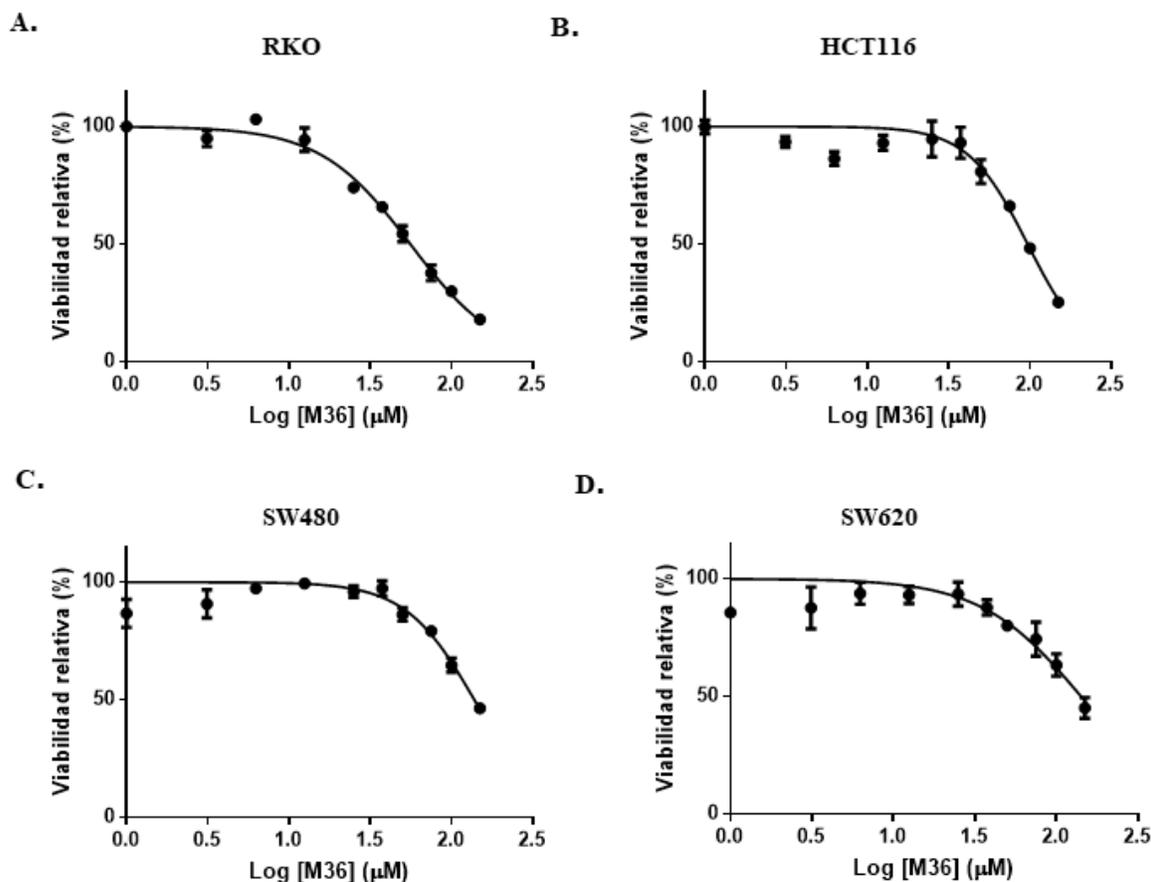


Figura 3.9. El inhibidor farmacológico M36 afecta la viabilidad de las células de cáncer de colon RKO, HCT116, SW480 y SW620. Se sembraron células RKO (A), HCT116 (B), SW480 (C) y SW620 (D) a razón de 2.5×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con el inhibidor M36 en concentraciones de 0, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 75, 100 y 150 μM . Después de 72h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los datos se ajustaron a una curva de inhibición dosis-respuesta y se estimó la IC₅₀ para cada condición. Las IC₅₀ estimadas son las siguientes: IC₅₀ (RKO) = 55.86 μM , IC₅₀ (HCT116) = 96.95 μM , IC₅₀ (SW480) = 138.3 μM e IC₅₀ (SW620) = 141.8 μM . Cada punto de la curva representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

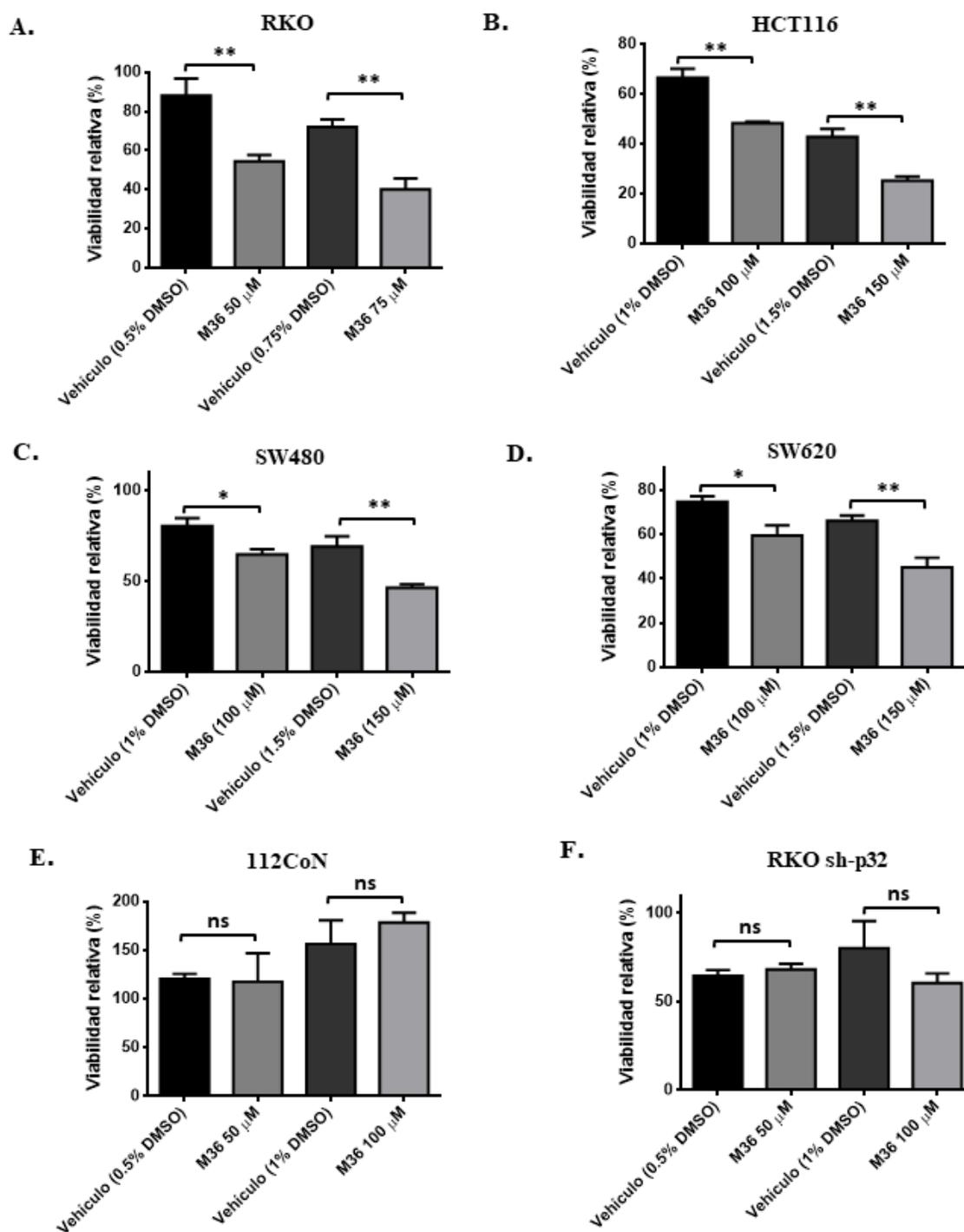


Figura 3.10. El inhibidor M36 afecta negativamente la viabilidad de las células de cáncer de colon con respecto al vehículo, pero no de las células no malignas de colon 112CoN o las células RKO depletadas de p32. Se sembraron células RKO (A), HCT116 (B), SW480 (C) y SW620 (D), 112CoN (E) y RKO sh-p32 (F) a razón de 2.5×10^3 células por

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con el inhibidor M36 en concentraciones de 50 y 100 μM (RKO, 112CoN, RKO sh-p32), de 100 y 150 μM (HCT116, SW480, SW620) o con las concentraciones correspondientes del vehículo DMSO. Después de 72h, se realizó el ensayo de MTT como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns-no significativa.

Posteriormente se evaluó, el efecto del inhibidor M36 sobre la capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon, a través de ensayos de formación de colonias. Los ensayos se realizaron en las células RKO, HCT116, SW480 y SW620 a concentraciones cercanas a las IC50 previamente obtenidas. Como resultado se encontró que el fármaco afecta la capacidad clonogénica de las 4 líneas celulares de cáncer de colon, teniendo nuevamente un efecto más marcado en la línea celular RKO (**Figura 3.11**). Adicionalmente, se encontró que el tamaño y la densidad de las colonias era relativamente menor en las células tratadas con M36 con respecto al vehículo, lo que sugiere que el fármaco presenta un efecto anti-proliferativo. En resumen, los resultados demuestran que la inhibición farmacológica de p32 afecta la viabilidad, capacidad clonogénica y proliferación celular de las células de cáncer de colon.

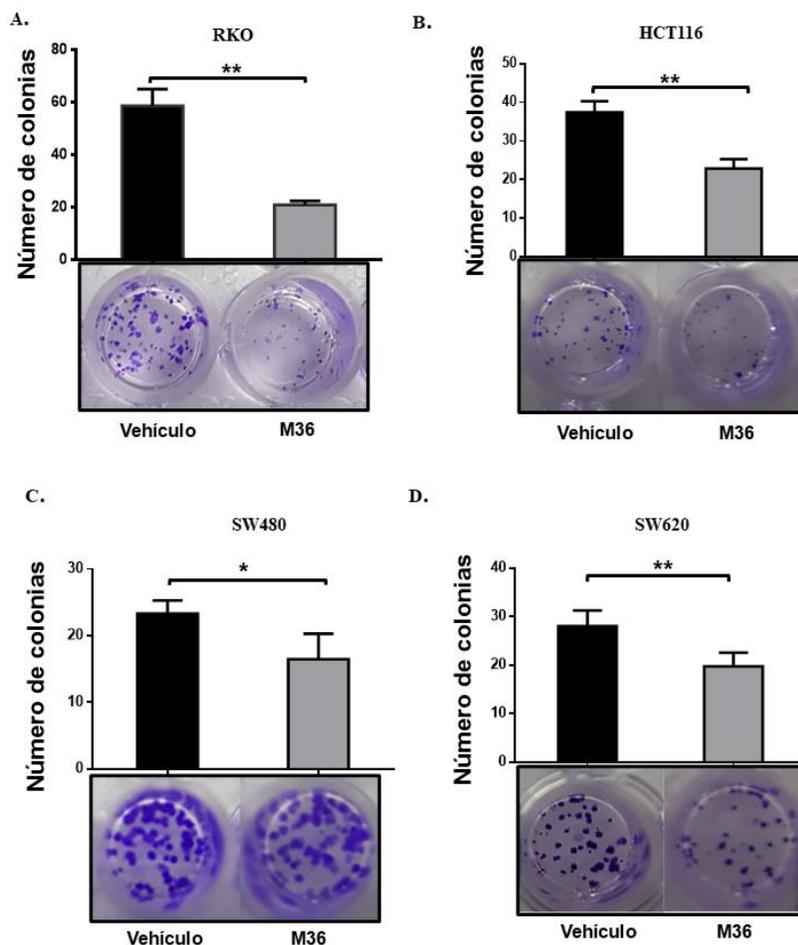


Figura 3.11. El inhibidor farmacológico M36 afecta la capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon RKO, HCT116, SW480 y SW620. Los ensayos de formación de colonias para las células RKO (A), HCT116 (B), SW480 (C) y SW620 (D) se realizaron como se describe en la sección “Materiales y métodos”. Cada línea celular fue tratada con el inhibidor M36 a una concentración cercana a la IC50 (obtenida de las curvas de viabilidad) o con el vehículo a la concentración correspondiente. Se muestran fotografías representativas de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.7.2. El inhibidor farmacológico M36 ejerce un efecto citostático sobre las células de cáncer de colon RKO

Con el objetivo de explorar a mayor profundidad los efectos ejercidos por M36 sobre las células de cáncer de colon, se decidió profundizar en los efectos del fármaco sobre las células RKO, pues presentaron una mejor respuesta al mismo. Primeramente, se exploró si la afectación negativa de la viabilidad inducida por M36 sobre las células RKO era debido a un efecto citotóxico o citostático. La primera evidencia al respecto se obtuvo de microfotografías de campo claro de las células RKO

control, tratadas con vehículo o con el inhibidor M36 a una concentración correspondiente a la IC50 de las curvas de viabilidad (**Figura 3.12A**). De aquí en adelante, todos los tratamientos están descritos a la concentración correspondiente a la IC50. Se pudo constatar en estas microfotografías que el tratamiento con M36 no ejerce un efecto citotóxico sino citostático sobre las células, pues después de 72 horas de tratamiento no se observaron células dañadas o desprendidas del sustrato. Sin embargo, se observó una disminución considerable de la densidad celular sin muerte celular, lo que sugiere que el fármaco presenta un efecto citostático sobre las células.

Como evidencia adicional de esto, se evaluó si el fármaco M36 estaba induciendo un cambio en la tasa de activación por corte proteolítico de las proteínas involucradas en la apoptosis Caspasa 3 y PARP (**Figura 3.12B**). Congruentemente se encontró que el tratamiento con M36 no aumenta la tasa de activación de estas proteínas a diferencia del control positivo tratado con H₂O₂. Estos resultados sugieren que M36 no induce la muerte apoptótica en las células RKO. Sin embargo, cuando se evaluaron los niveles de la proteína estrechamente vinculada con el arresto celular p21, se encontró un aumento significativo en los niveles de esta proteína en células tratadas con M36 con respecto al control y a las tratadas con vehículo (**Figura 3.12C**). Por último, se realizaron ensayos de proliferación con CFSE en las células RKO tratadas con M36. Se encontró que las células RKO tratadas con el fármaco por 6 días tenían una intensidad de fluorescencia de CFSE significativamente mayor que las células control o tratadas con vehículo (**Figura 3.12D**). El resultado anterior demuestra claramente que M36 está disminuyendo la capacidad proliferativa de las células de cáncer de colon RKO. **En** conjunto, estos datos sugieren fuertemente que la disminución en la viabilidad de las células de cáncer de colon tratadas con M36 se debe a que el fármaco ejerce un efecto citostático, pero no citotóxico sobre estas células.

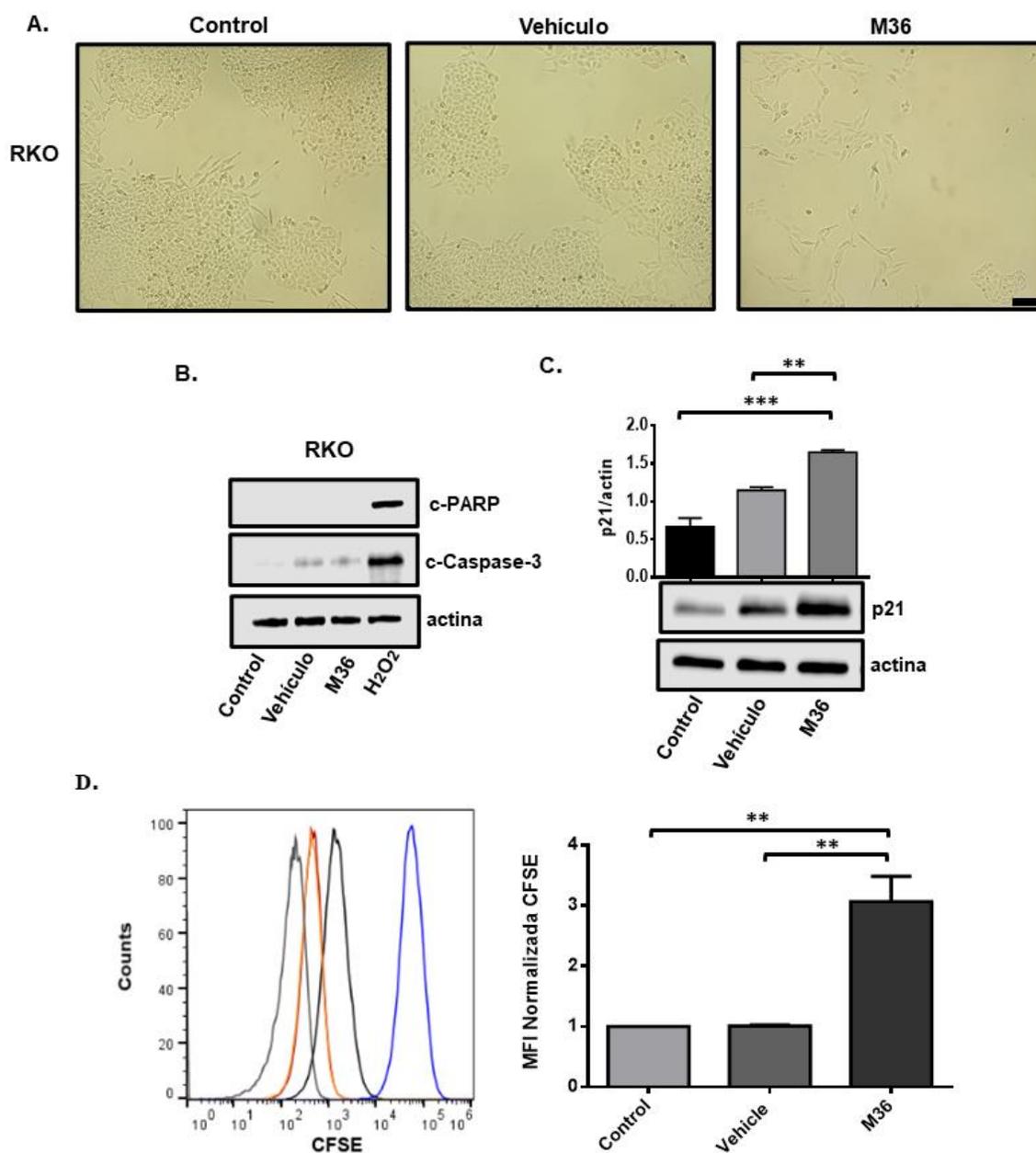


Figura 3.12. El inhibidor farmacológico M36 ejerce un efecto citostático, pero no citotóxico sobre las células de cáncer de colon RKO. (A) Se sembraron 2.5×10^4 células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Luego de 24 horas en cultivo, las células fueron tratadas con M36 ($56 \mu\text{M}$) o vehículo (0.56% de DMSO) por 72 horas. Como control se usaron células sin tratamiento cultivadas igualmente por 72 horas. Se muestran micrográficas de campo claro representativas de 3 experimentos independientes. Barra de escala, $50 \mu\text{m}$. **(B)** Se sembraron 2.5×10^4 células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Luego de 24 horas en cultivo, las células fueron tratadas con M36 ($56 \mu\text{M}$) o vehículo (0.56% de DMSO) por 72 horas. Como control negativo se usaron células sin tratamiento cultivadas igualmente por 72 horas. Como control positivo

se usaron células tratadas con H₂O₂ por 12 horas. Se evaluaron por Western blot los niveles de las proteínas PARP cortada y Caspasa 3 cortada en lisados de las células tratadas. Se usó actina como control de carga. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes. **(C)** Se sembraron 2.5*10⁴ células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Luego de 24 horas en cultivo, las células fueron tratadas con M36 (56 µM) o vehículo (0.56% de DMSO) por 72 horas. Como control negativo se usaron células sin tratamiento cultivadas igualmente por 72 horas. Se evaluaron por Western blot los niveles de la proteína p21 en lisados de las células tratadas. Se usó actina como control de carga. Los datos se presentan como los valores medios ± SEM de tres experimentos independientes, ** p < 0,01, ***p < 0,005. **(D)** Se sembraron 2.5*10⁴ células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Luego de 24 horas en cultivo, las células fueron teñidas con CFSE como se describe en la sección “Materiales y métodos”. Posteriormente las células fueron tratadas con M36 (56 µM) o vehículo (0.56% de DMSO) por 6 días. Pasado este tiempo, los niveles de CFSE fueron determinados por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como los valores medios ± SEM de la mediana de fluorescencia de tres experimentos independientes, ** p < 0,01.

3.7.3. El inhibidor farmacológico M36 inhibe la activación de las vías de señalización Akt-mTOR y MAPK en células de cáncer de colon RKO

Con base en lo previamente encontrado en nuestro trabajo y por otros autores en otros modelos celulares de que la depleción de p32 puede afectar vías que se encuentran río abajo de los RTKs como la vía Akt-mTOR y la vía de las MAP cinasas, decidimos evaluar el efecto del fármaco M36 sobre la activación de estas vías. Se encontró que el tratamiento de las células con M36 por 6 horas indujo una disminución estadísticamente significativa de la tasa de activación por fosforilación de las proteínas Akt, mTOR y p70S6K con respecto a las células tratadas con vehículo a la concentración correspondiente y al mismo tiempo (**Figura 3.13 A, B, C**). Un resultado similar fue obtenido cuando se compararon los niveles de activación de ERK de la vía de las MAP cinasas (**Figura 3.13D**). Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto inhibitor de M36 sobre p32 afecta su capacidad de promover la activación de las vías Akt-mTOR y de las MAP cinasas.

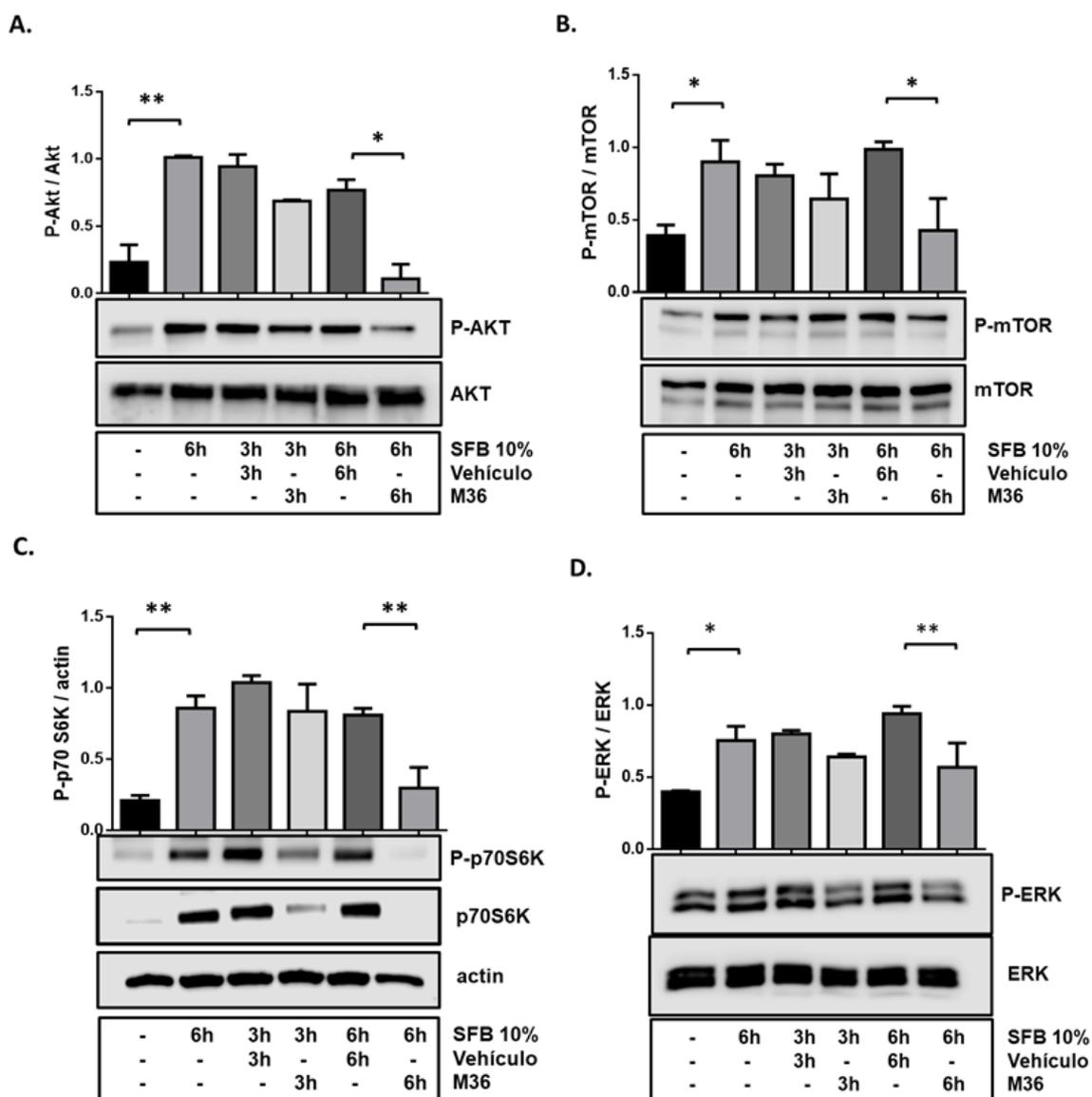


Figura 3.13. El inhibidor farmacológico M36 afecta negativamente la activación de las vías de señalización Akt-mTOR y MAPK en células de cáncer de colon RKO. Se sembraron 2.5×10^5 células RKO por pozo en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Después de ese tiempo, las células se ayunaron durante 24 horas con medio libre de suero y en los casos correspondientes se pre-trataron con el inhibidor M36 o el vehículo DMSO. A continuación, las células se estimularon con DMEM con SFB al 10 % durante 3 o 6 horas (en presencia o ausencia de M36 o vehículo) para evaluar la activación de las proteínas Akt (A), mTOR (B), p70-S6K (C) y ERK (D) mediante Western blot. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar los niveles de proteínas fosforiladas y totales. Los niveles de cada proteína fosforilada se normalizaron con respecto a su proteína total correspondiente, excepto en el caso de P-p70S6K que fue

normalizado contra actina. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.7.4. El inhibidor farmacológico M36 afecta negativamente la expresión de proteínas claves en la regulación de la dinámica mitocondrial en células de cáncer de colon RKO

Una de las funciones principales y más ampliamente reportadas en la literatura para la proteína p32 es su papel como regulador del metabolismo y la dinámica mitocondrial. Por ello, quisimos explorar si la inhibición farmacológica con M36 tenía algún efecto sobre los niveles de proteínas claves en la regulación de este proceso. Se encontró que como resultado del tratamiento de las células RKO con el inhibidor farmacológico M36, ocurre una disminución significativa de los niveles de la proteína asociada a la fisión mitocondrial DRP1 (**Figura 3.14A**). Adicionalmente, como consecuencia del tratamiento con el fármaco se encontró una disminución significativa de los niveles de las proteínas OPA1 y Mitofusina 2, asociadas con la fusión de la membrana mitocondrial interna y externa, respectivamente (**Figura 3.14B, C**). Estos datos sugieren fuertemente que la inhibición farmacológica de p32 afecta considerablemente el funcionamiento y la dinámica mitocondrial en células de cáncer de colon RKO.

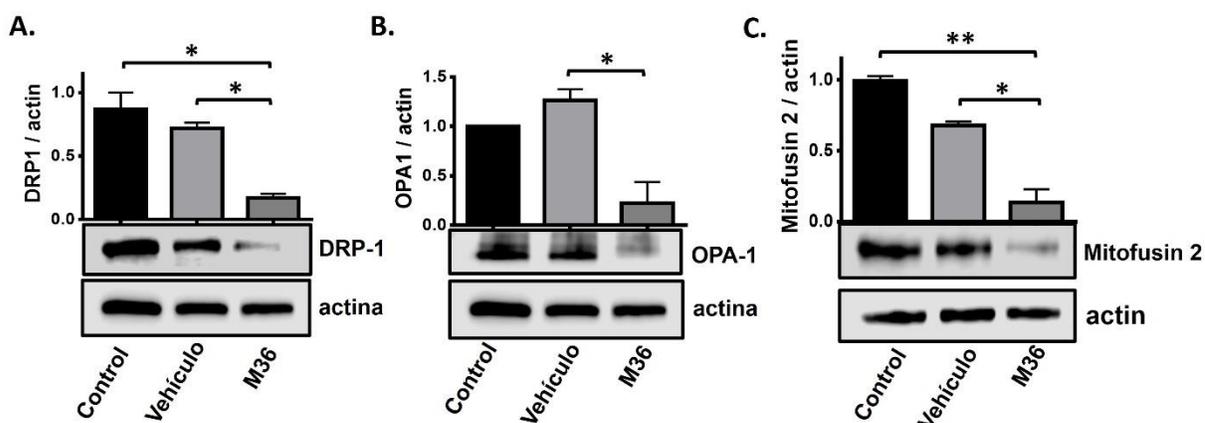


Figura 3.14. El inhibidor farmacológico M36 afecta los niveles de expresión de las proteínas asociadas con la dinámica mitocondrial DRP1, OPA1 y Mitofusina 2. Se sembraron 2.5×10^4 células RKO por pozo en placas de 6 pozos. Luego de 24 horas en cultivo, las células fueron tratadas con M36 (56 μ M) o vehículo (0.56% de DMSO) por 72 horas. Como control negativo se usaron células sin tratamiento cultivadas igualmente por 72 horas. Se evaluaron por Western blot los niveles de las proteínas DRP1 (A), OPA1 (B) y Mitofusina 2 (C) en lisados de las células tratadas. Se usó actina como control de carga. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

3.7.5. El anticuerpo monoclonal 60.11 afecta negativamente la viabilidad y capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon de origen metastásico SW620

Finalmente, se exploró el efecto del anticuerpo monoclonal 60.11 que se une a la región N-terminal de la poza extracelular de p32/gC1qR sobre la viabilidad y clonogenicidad de células de cáncer de colon. Esta evaluación se hizo sustentada en el hecho previamente demostrado (**Figura 3.2A**) de que la proteína es secretada en cantidades superiores por las células cancerosas de colon que por su contraparte no maligna. Se evaluó el efecto del anticuerpo monoclonal 60.11 sobre la viabilidad de las células RKO, SW480 y SW620 y se encontró que sólo en las células SW620 el anticuerpo tenía un efecto significativo sobre la viabilidad (Se muestran sólo los datos para las células SW620 en la **Figura 3.15A**). Se pudo constatar que el AcM 60.11 indujo una disminución significativa de la viabilidad celular de las SW620 con respecto a la IgG control. También se encontró que el tratamiento con el AcM 60.11 afecta significativamente la capacidad clonogénica de las células SW620 con respecto a las células tratadas con IgG control (**Figura 3.15B**). Por tanto, esta evidencia demuestra que la inhibición de la variante secretada de p32 con el AcM 60.11 afecta la viabilidad y la capacidad clonogénica de las células de origen metastásico SW620.

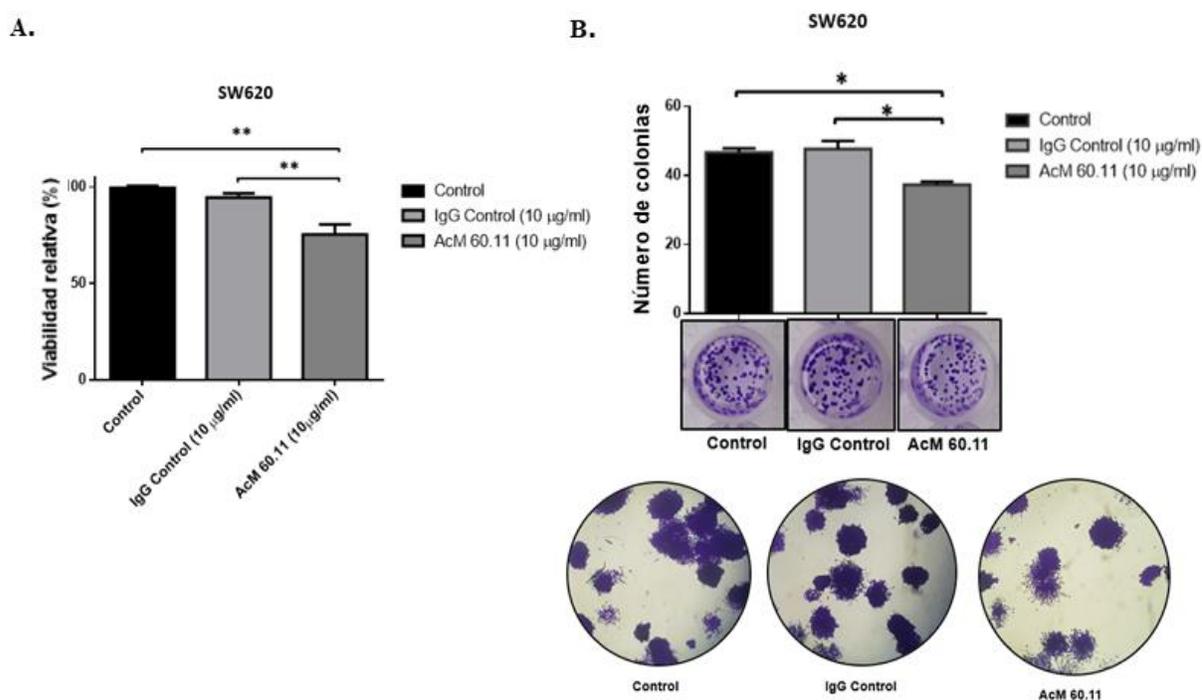


Figura 3.15. El anticuerpo monoclonal 60.11 afecta negativamente la viabilidad celular y la capacidad clonogénica de las células de cáncer de colon de origen metastásico SW620. (A) Se sembraron células SW620 a razón de 2.5×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con

Papel funcional de p32 como promotor del fenotipo maligno en células de cáncer de colon

el AcM 60.11 a una concentración de 10 µg/ml o con una IgG control a la misma concentración. Después de 72h, se realizó el ensayo de viabilidad con el kit de viabilidad GloPro 2.0 como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, ** p < 0,01. **(B)** Los ensayos de formación de colonias para las células SW620 se realizaron como se describe en la sección "Materiales y métodos". Las células fueron tratadas con el AcM 60.11 a una concentración de 10 µg/ml o una IgG control a la misma concentración. Se muestran fotografías y microfotografías representativas de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como los valores medios \pm SEM de tres experimentos independientes, *p<0.05.

4. Discusión

En este estudio, demostramos que la proteína p32 promueve múltiples rasgos de malignidad en las células de cáncer de colon. Entre estos destacan la migración celular, la resistencia a la muerte celular inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos, la capacidad clonogénica y la tumorigénesis *in vivo* de las células de cáncer colorrectal. En la base de estas funciones oncogénicas de p32 se encuentra su capacidad de promover la activación de las vías Akt-mTOR y de las MAP cinasas; así como su función reguladora de la expresión de múltiples genes asociados al fenotipo maligno. Congruentemente, también encontramos que la inhibición farmacológica de p32 afecta significativamente varios rasgos de malignidad de las células cancerosas de colon.

Interesantemente, estas funciones están estrechamente relacionadas con la localización subcelular de p32 en células de cáncer de colon. Aunque p32 es una proteína que se encuentra principalmente en la mitocondria, varios autores también la han encontrado en la membrana plasmática y en el núcleo (27,65,123). La vías de señalización PI3K/AKT y Ras/ERK están frecuentemente desreguladas en el cáncer de colon. En este estudio, empleamos células SW480 como prototipo de células de cáncer de colon impulsadas por KRAS y RKO como prototipo de células de cáncer de colon impulsadas por BRAF. Curiosamente, observamos que el bloqueo de la expresión de p32 afecta negativamente la activación de las proteínas Akt y mTORC. Esto significa que p32 potencia la activación de estas vías de señalización oncogénicas que convergen en mTORC y, por tanto, favorece la supervivencia, proliferación y crecimiento celular. El mecanismo molecular por el cual p32 puede promover la activación de las vías de señalización acopladas a mTOR puede explicarse por su presencia significativa en balsas lipídicas ricas en caveolina (CLR), dado que Arielly SS. et al. (119) reportaron que p32 es la proteína más abundante presente en CLR de células de cáncer de colon. De acuerdo con esto, otros grupos han informado que, en células de cáncer de páncreas y pulmón, los factores de crecimiento inducen la translocación de p32 a balsas lipídicas donde su interacción con CD44 favorece la autofosforilación y activación de Receptores con actividad Tirosina Cinasa (RTKs) (36,96). Además, la ubicación de p32 en las CLR de membrana también explicaría su participación en la migración celular. En este sentido, es bien sabido que las CLR son los sitios de acoplamiento preferidos para proteínas específicas involucradas en la adhesión focal y la metástasis del cáncer (96). De acuerdo con esto, en nuestro trabajo encontramos que la depleción de la expresión de p32 indujo una disminución significativa en la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon.

En cuanto a las funciones de la proteína nuclear de p32, encontramos una mayor localización nuclear de la proteína en células malignas que en no malignas, como se puede observar en la Figura 3.1. Esto puede tener importantes implicaciones funcionales para la proteína en el contexto del cáncer. Desde esta localización subcelular, se le han adjudicado diversas funciones a p32 tales como: la regulación del splicing (58) y la modulación de la actividad transcripcional de varios factores de transcripción como FOXC1 (63) y TFIIB (64). Interesantemente, un trabajo reciente ha demostrado que la interacción de p32 con el importante supresor tumoral p53 en el núcleo inhibe la tetramerización de este último y la transcripción de sus genes diana (65). Por lo tanto, no sorprende que como consecuencia del knockdown de p32 en células malignas RKO (que expresan p53 de tipo silvestre), los niveles de transcripción de genes estrechamente relacionados con fenotipos malignos también se vean alterados (Figura 3.3). Es posible que p32 regule indirectamente la expresión de estos genes en células de cáncer colorrectal al modular la actividad de diferentes factores de transcripción como p53 en el núcleo. Además, p32 puede afectar la actividad de las proteínas involucradas en importantes vías de señalización, como múltiples isoformas de PKC (44,45). Al modular la actividad de estas proteínas de señalización, p32 también podría modificar la expresión de genes asociados con el fenotipo maligno.

Entre los genes más importantes cuya expresión se encontró modificada como consecuencia del knockdown de p32 en las células RKO están *HAS-2* (que codifica para la sintasa de ácido hialurónico-2) que fue regulada a la baja, y *PDCD4*, que fue regulado al alza (Figura 3.3). Recientemente se ha descubierto que *HAS-2* es un promotor esencial del fenotipo maligno en las células de cáncer colorrectal al promover la capacidad metastásica, la resistencia a la muerte celular, la transición epitelial-mesenquimal, entre otras funciones (124). Nuestros datos sugieren que p32 induce aumentos en los niveles de expresión de *HAS-2* y *CD44*. *HAS-2* es una enzima cuya función fundamental es la síntesis de ácido hialurónico (HA) en la superficie celular. El HA se ha relacionado estrechamente con el aumento de la capacidad migratoria y metastásica de las células cancerosas. Además, *CD44* es una molécula cuyo principal ligando es el HA y favorece la migración y metástasis en diferentes tipos de cáncer (118). Es probable que el efecto favorable a la migración ejercido por p32 esté respaldado en parte por su capacidad de aumentar los niveles de cada componente del eje molecular *HAS-2/HA/CD44*. El hecho de que p32 promueva la capacidad migratoria de las células de cáncer colorrectal sugiere fuertemente que esta proteína puede desempeñar un papel pro-metastásico en este tipo de malignidad. Por otro lado, *PDCD4* es un importante gen supresor de tumores, que se encuentra en niveles bajos o ausente en las células de

cáncer de colon. La disminución de los niveles de PDCD4 se ha asociado con una mayor proliferación, migración y metástasis y una disminución de la apoptosis en cáncer colorrectal (125). Nuestros datos sugieren que p32 regula negativamente la transcripción de PDCD4 en células de cáncer de colon, ya que cuando se bloquea la expresión de p32 en células RKO, se genera un aumento en los niveles de PDCD4. Por lo tanto, las funciones promotoras de malignidad atribuidas en nuestro trabajo a p32 en células de cáncer colorrectal podrían explicarse, al menos en parte, por su capacidad para modificar significativamente los niveles de transcripción de los genes HAS-2 y PDCD4, y por su capacidad para activar las vías de señalización PI3K-Akt-mTOR y de las MAP cinasas.

También se encontró que el knockdown de p32 sensibiliza a las células de cáncer de colon a la muerte celular apoptótica inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos como CCI-779 (Temsirrolimus) y 5-FU. El papel anti-apoptótico de p32 puede ser el resultado de su participación como modulador positivo de la vía de señalización de Akt/mTORC. Además, las funciones promotoras de resistencia a muerte celular que lleva a cabo p32 posiblemente estén potenciadas en las células de cáncer de colon por su papel como regulador de la expresión de proteínas asociadas con el fenotipo maligno. HAS-2, una proteína cuyos niveles están regulados positivamente por p32, se ha demostrado recientemente que está implicada en la resistencia a la muerte celular inducida por la radiación y el oxaliplatino (124). Por otro lado, PDCD4, que está regulado a la baja por p32, es un importante promotor de la apoptosis celular inducida por diferentes factores (125). Curiosamente, la inhibición de PDCD4 por el micro-ARN mir21 ha estado involucrada en la resistencia al fármaco 5-FU en las células RKO. Por lo tanto, es muy probable que los efectos citoprotectores de p32 contra 5-FU estén mediados, al menos en parte, por la capacidad de p32 para inhibir la expresión de PDCD4. Sorprendentemente, el knockdown de p32 no sensibilizó a las células de cáncer de colon a la muerte inducida por el estrés nutricional. Una posible explicación podría ser que el estrés nutricional agudo producido por la incubación de células durante largos períodos de tiempo (superiores a 8 horas) en HBSS induce principalmente la muerte celular por autofagia (autosis), y que p32 regula procesos de muerte asociados con las mitocondrias, como la apoptosis, pero no participa en la inducción de la muerte celular por autosis. Se necesitarán estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos subyacentes al papel citoprotector de p32.

Adicionalmente, demostramos que p32 promueve la capacidad clonogénica *in vitro* y tumorigénica *in vivo* de las células malignas de colon. Los efectos pro-malignidad observados para p32 son incluso más marcados en el contexto *in vivo* que en experimentos *in vitro*, lo que sugiere que

además de la regulación de genes asociados con el fenotipo maligno, aumento de la migración, resistencia a la muerte celular y capacidad clonogénica, otros factores podrían estar potenciando las funciones oncogénicas *in vivo* de p32.

Finalmente, basados en nuestra evidencia de que p32 promueve importantes funciones oncogénicas en las células de cáncer de colon, evaluamos por primera vez el efecto sobre el fenotipo maligno de células cancerosas de colon de dos fármacos que inhiben a la proteína p32. Interesantemente, encontramos que la inhibición farmacológica intracelular con M36 afecta funciones oncogénicas claves como la viabilidad, proliferación y la capacidad clonogénica de todas las células cancerosas evaluadas. Este resultado es congruente con lo previamente encontrado por Yenugonda y colaboradores en 2017 en células de glioma (120). Adicionalmente, demostramos por primera vez que este inhibidor es capaz de afectar la activación de vías río abajo de los RTKs y la expresión de proteínas claves asociadas con la dinámica mitocondrial. Interesantemente, los resultados más marcados para M36 se encontraron en la línea celular con mayor expresión intracelular de la proteína, las RKO. Mientras que, el anticuerpo monoclonal tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad y clonogenicidad de la línea celular de origen metastásico y con mayor tasa de secreción de p32 al sobrenadante, las células SW620. Esto muestra claramente como estrategias farmacológicas, que incluso están dirigidas a un mismo blanco terapéutico, pueden ejercer efectos diferentes sobre distintos tipos celulares, aunque pertenezcan a un mismo tipo de cáncer. Lo cual es muestra de la heterogeneidad de respuestas de las células cancerosas a los fármacos y de la necesidad de terapias dirigidas y específicas. Interesantemente, en trabajos previos se ha encontrado un marcado efecto anti-tumorigénico *in vivo* para el AcM 60.11 en cáncer de mama y mesotelioma, incluso cuando los efectos *in vitro* del anticuerpo en estos modelos han sido relativamente discretos. Esto sugiere que el anticuerpo monoclonal 60.11 tiene un potencial terapéutico significativo para el tratamiento del cáncer de colon.

De conjunto, nuestros datos demuestran que p32 juega un papel importante en la promoción del fenotipo maligno en las células de cáncer de colon, lo que sugiere fuertemente que p32 puede usarse como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer colorrectal. De hecho, nuestra evidencia muestra que la inhibición farmacológica de esta proteína afecta varios rasgos del fenotipo maligno en células de cáncer de colon. Por lo tanto, el avance en la caracterización *in vivo* y clínica de estos fármacos y el desarrollo de nuevos métodos para bloquear las funciones pro-malignas de p32 constituyen estrategias prometedoras para el desarrollo de nuevos tratamientos del cáncer colorrectal.

5. Conclusiones

1. La proteína p32 se sobreexpresa en células de cáncer de colon con respecto a su contraparte no maligna y se localiza en mayores niveles tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células malignas. La tasa de secreción de la proteína es también superior en células tumorales que en no tumorales de colon.
2. La proteína p32 regula la expresión de múltiples genes asociados al fenotipo maligno y promueve la activación de la vía Akt-mTOR estrechamente asociada a malignidad.
3. La proteína p32 promueve la migración, resistencia a muerte inducida por estrés oxidativo y agentes quimioterapéuticos, así como la capacidad clonogénica de células de cáncer de colon *in vitro*.
4. La proteína p32 promueve la capacidad tumorigénica *in vivo* de células de cáncer de colon.
5. La inhibición farmacológica de p32 (con el inhibidor específico M36 o el anticuerpo monoclonal 60.11) afecta significativamente la viabilidad, así como la capacidad proliferativa y clonogénica de las células de cáncer de colon.

Con base en todos los resultados obtenidos, se puede concluir que p32 promueve el fenotipo maligno en células de cáncer colorrectal

6. Perspectivas

1. Evaluar el papel de la proteína p32 en otras importantes funciones oncogénicas no estudiadas tales como la transición epitelio-mesénquima, la angiogénesis y la metástasis *in vivo* en células de cáncer de colon.
2. Explorar otros mecanismos moleculares que subyacen a las funciones oncogénicas de p32 en células de cáncer de colon con base en los datos obtenidos a través del microarreglo de genes.
3. Evaluar el efecto de la variante de p32 secretada por células de cáncer de colon sobre otros tipos celulares que se encuentran en el microambiente tumoral como las células endoteliales, células TCD8+ y células T reguladoras.
4. Profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos citostáticos ejercidos por el fármaco M36 y el AcM 60.11 sobre las células de cáncer de colon.
5. Evaluar el potencial anti-tumorigénico y anti-metastásico *in vivo* del fármaco M36 y del AcM 60.11.

8. Referencias bibliográficas

1. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2021;18(10):663–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>
2. GLOBOCAN. GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data. Website. 2020.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
5. Xie Y, Chen Y, Fang J. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(22):1–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
6. D'Souza M, Datta K. Evidence for naturally occurring hyaluronic acid binding protein in rat liver. [Internet]. Vol. 10, *Biochemistry international*. 1985. p. 43–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580533>
7. D'Souza M DK. A novel glycoprotein that binds to hyaluronic acid. 1986. p. 79–88.
8. Gupta S1, Batchu RB DK. Purification, partial characterization of rat kidney hyaluronic acid binding protein and its localization on the cell surface. 1991;58–67.
9. Krainer AR, Mayeda A, Kozak D, Binns G. Functional Expression of Cloned Human Splicing Factor SF2 : Homology to RNA-Binding Proteins , U1 70K , and Drosophila Splicing Regulators. *Cell*. 1991;66:383–94.
10. Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EIB, Willis AC, Reid KBM. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular “heads” of C1q. *J Exp Med*. 1994;179(6):1809–21.
11. Das S, Deb TB, Kumar R, Datta K. Multifunctional activities of human fibroblast 34-kDa hyaluronic acid-binding protein. *Gene*. 1997;190(1):223–5.
12. Honoré B, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celisb JE, Leffers H. Cloning and expression of a cDNA covering the complete coding region of the P32 subunit of human

- pre-m RNA splicing factor SF2. *Gene*. 1993;134(2):283–7.
13. Ghebrehiwet B, Lim B, Kumar R, Feng X, Peerschke EIB. gC1q-R / p33 , a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins , is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev Vol 180*. 2001;180:65–77.
 14. Jiang J, Zhang Y, Krainer AR, Xu RM. Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1999;96(7):3572–7. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Jha BK, Salunke DM, Datta K. Disulfide bond formation through Cys186 facilitates functionally relevant dimerization of trimeric hyaluronan-binding protein 1 (HABP1)/p32/gC1qR. *Eur J Biochem*. 2002;269(1):298–306.
 16. B. Ghebrehiwet, J. Jesty, S. Xu, R. Vinayagasundaram UV, Y. Ji, A. Valentino, K.K. Hosszu, S. Mathew, K. Joseph, A.P. Kaplan EIP. Structure – function studies using deletion mutants identify domains of gC1qR / p33 as potential therapeutic targets for vascular permeability and inflammation. *Front Immunol*. 2011;2(November):1–9.
 17. Lim B, White RA, Hummel GS, Schwaeble W, Lynch NJ, Peerschke EIB, et al. Characterization of the murine gene of gC1qBP , a novel cell protein that binds the globular heads of C1q , vitronectin , high molecular weight kininogen and factor XII 1. *Gene*. 1998;209:229–37.
 18. Guo N, Weremowicz S, Lynch N, Lim B, Schwaeble W, Peerschke EIB, et al. Assignment of C1QBP encoding the C1 q globular domain binding protein (gCIq-R) to human chromosome 17 band p13 . 3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;77:283–4.
 19. Majumdar M, Datta K. Assignment of cDNA Encoding Hyaluronic Acid-Binding Protein 1 to Human Chromosome 17p12 – p13. *Genomics*. 1998;51:476–7.
 20. Seytter T, Lottspeich F, Neupert W, Schwarz E. Mam33p , an Oligomeric , Acidic Protein in the Mitochondrial Matrix of *Saccharomyces cerevisiae* is Related to the Human Complement Receptor gC1q-R. *Yeast*. 1998;14:303–10.
 21. Lynch NJ, Reid KBM, Berg RH Van Den, Daha MR, Leigh LAE, Ghebrehiwet B, et al.

- Characterisation of the rat and mouse homologues of gC1qBP , a 33 kDa glycoprotein that binds to the globular heads of C1q. FEBS Lett [Internet]. 1997;418(1-2):111-4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01348-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01348-3)
22. Liebert MA, Majumdar M, Bharadwaj A, Ghosh I, Ramachandran S, Datta K. Evidence for the Presence of HABP1 Pseudogene in Multiple Locations of Mammalian Genome. DNA Cell Biol. 2002;21(10):727-35.
 23. Ghebrehiwet B, Lu PD, Zhang W, Keilbaugh SA, Leigh LE, Eggleton P, et al. Evidence that the two C1q binding membrane proteins, gC1q-R and cC1q-R, associate to form a complex. J Immunol [Internet]. 1997;159(3):1429-36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233640>
 24. Berhane Ghebrehiwet, Phoebe D.Lu, Weibing Zhang, Boon-Leong Lim, Paul Eggleton, Leonora E.A: Leigh, Kenneth M.M: Reid EIBP. Identification of Functional Domains on gC1Q-R , a Cell Surface Protein That Binds to the Globular “ Heads ” of C1Q , Using Monoclonal Antibodies and Synthetic Peptides. Hybridoma. 1996;15(5):333-42.
 25. Jürgen Dedio, Willi Jahnen-Dechent MB and WM-E. The Multiligand-Binding Protein gC1qR, Putative C1q Receptor, Is a Mitochondrial Protein. J Immunol. 1998;160:3534-42.
 26. Muta T, Kang D, Kitajima S, Fujiwara T, Hamasaki N. p32 Protein , a Splicing Factor 2-associated Protein , Is Localized in Mitochondrial Matrix and Is Functionally Important in Maintaining Oxidative Phosphorylation *. J Biol Chem. 1997;272(39):24363-70.
 27. Matthews DA, Russell WC. Adenovirus core protein V interacts with p32 – a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. J Gen Virol. 1998;79:1677-85.
 28. Ghebrehiwet B, Geisbrecht B V, Xu X, Savitt AG, Peerschke EIB. The C1q Receptors : Focus on gC1qR / p33 (C1qBP , p32 , HABP-1). Semin Immunol. 2019;45(November):1-14.
 29. Berhane Ghebrehiwet, Joylon Jesty and EIBP. gC1q-R / p33 : Structure-Function Predictions from the Crystal Structure. Immunobiology. 2002;205:421-32.
 30. Deb TB, Datta K. Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. J Biol Chem. 1996;271(4):2206-12.

31. Saha P, Datta K. Multifunctional, multicompartamental hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR): implication in cancer progression and metastasis. *Oncotarget* [Internet]. 2018;9(12):10784–807. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/24082>
32. Lu PD, Galanakis DK, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB. The receptor for the globular “heads” of C1q, gC1q-R, binds to fibrinogen/fibrin and impairs its polymerization. *Clin Immunol*. 1999;90(3):360–7.
33. Lim BL, Reid KBM, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB, Leigh LAE, Preissner KT. The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR: Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. *J Biol Chem*. 1996;271(43):26739–44.
34. Herwald H, Dedio J, Kellner R, Loos M, Müller-Esterl W. Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells: Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem*. 1996;271(22):13040–7.
35. Fogal V, Zhang L, Krajewski S, Ruoslahti E. Mitochondrial / Cell-Surface Protein p32 / gC1qR as a Molecular Target in Tumor Cells and Tumor Stroma. *Cancer Res*. 2008;68(17):7210–9.
36. Shi H, Fang W, Liu M, Fu D. Complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP) in lipid rafts mediates hepatic metastasis of pancreatic cancer by regulating IGF-1/IGF-1R signaling. *Int J Cancer*. 2017;141(7):1389–401.
37. Prakash M, Kale S, Ghosh I, Kundu GC, Datta K. Hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) induces melanoma cell migration and tumor growth by NF-kappa B dependent MMP-2 activation through integrin α v β 3 interaction. *Cell Signal* [Internet]. 2011;23(10):1563–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.009>
38. Feng X, Tonnesen MG, Peerschke EIB, Ghebrehiwet B. Cooperation of C1q Receptors and Integrins in C1q-Mediated Endothelial Cell Adhesion and Spreading. *J Immunol*. 2002;168(5):2441–8.
39. Bialucha CU, Ferber EC, Pichaud F, Peak-Chew SY, Fujita Y. p32 is a novel mammalian Lgl binding protein that enhances the activity of protein kinase C ζ and regulates cell polarity. *J Cell Biol*. 2007;178(4):575–81.

40. Rozanov D V., Ghebrehwet B, Postnova TI, Eichinger A, Deryugina EI, Strongin AY. The hemopexin-like C-terminal domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates proteolysis of a multifunctional protein, gC1qR. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9318–25.
41. Hosszu KK, Valentino A, Vinayagasundaram U, Vinayagasundaram R, Joyce MG, Ji Y, et al. DC-SIGN, C1q, and gC1qR form a trimolecular receptor complex on the surface of monocyte-derived immature dendritic cells. *Blood* [Internet]. 2012;120(6):1228–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-369728>
42. Schaerer MT, Kannenberg K, Hunziker P, Baumann SW, Sigel E. Interaction between GABAA Receptor β Subunits and the Multifunctional Protein gC1q-R. *J Biol Chem.* 2001;276(28):26597–604.
43. Xu Z, Hirasawa A, Shinoura H, Tsujimoto G. Interaction of the $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J Biol Chem.* 1999;274(30):21149–54.
44. Storz P, Hausser A, Link G, Dedio J, Ghebrehwet B, Pfizenmaier K, et al. Protein kinase C μ is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24601–7.
45. Robles-Flores M, Rendón-Huerta E, González-Aguilar H, Mendoza-Hernández G, Islas S, Mendoza V, et al. p32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein. Interaction and cellular localization of p32-PKC complexes in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5247–55.
46. Reef S, Shifman O, Oren M, Kimchi A. The autophagic inducer smARF interacts with and is stabilized by the mitochondrial p32 protein. *Oncogene.* 2007;26(46):6677–83.
47. Sunayama J, Ando Y, Itoh N, Tomiyama A, Sakurada K, Sugiyama A, et al. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death Differ.* 2004;11(7):771–81.
48. Mallick J, Datta K. HABP1/p32/gC1qR induces aberrant growth and morphology in *Schizosaccharomyces pombe* through its N-terminal α helix. *Exp Cell Res.* 2005;309(2):250–63.
49. Li Y, Wan OW, Xie W, Chung KKK. P32 regulates mitochondrial morphology and dynamics through parkin. *Neuroscience.* 2011;199:346–58.

50. Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, et al. Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A in Maintenance of Human Mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9823–34.
51. Wang JT, Xu X, Alontaga AY, Chen Y, Liu Y. Impaired p32 Regulation Caused by the Lymphoma-Prone RECQ4 Mutation Drives Mitochondrial Dysfunction. *Cell Rep* [Internet]. 2014;7(3):848–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.037>
52. Jiao H, Su GQ, Dong W, Zhang L, Xie W, Yao LM, et al. Chaperone-like protein p32 regulates ULK1 stability and autophagy. *Cell Death Differ*. 2015;22(11):1812–23.
53. Xiao K, Wang Y, Chang Z, Lao Y, Chang DC. P32, a novel binding partner of Mcl-1, positively regulates mitochondrial Ca²⁺ uptake and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;451(2):322–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.122>
54. Wu H, Sun H, Liang X, Lima WF, Crooke ST. Human RNase H1 Is Associated with Protein P32 and Is Involved in Mitochondrial Pre-rRNA Processing. *PLoS One*. 2013;8(8).
55. Allison M. McGEE and Christopher P. Baineswe. Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. *Biochem J* [Internet]. 2011;433(1):119–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
56. Chung HJ, Korm S, Lee S in, Phorl S, Noh S, Han M, et al. RAP80 binds p32 to preserve the functional integrity of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;492(3):441–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.077>
57. Jayarajan J, Angandoor S, Vedulla SH, Sritharan S, Ganesan K, War AR, et al. Curcumin induces chemosensitization to doxorubicin in Duke's type B coloadenocarcinoma cell line. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2020;47(10):7883–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05866-w>
58. Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Öhrmalm C, Matthews DA, Russell WC, Akusjärvi G. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J*. 1999;18(4):1014–24.
59. Simos G, Georgatos SD. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence

- homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* 1994;346(2-3):225-8.
60. Even Y, Durieux S, Escande ML, Lozano JC, Peaucellier G, Weil D, et al. CDC2L5, a Cdk-Like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo. *J Cell Biochem.* 2006;99(3):890-904.
 61. Heyd F, Carmo-Fonseca M, Möröy T. Differential isoform expression and interaction with the P32 regulatory protein controls the subcellular localization of the splicing factor U2AF26. *J Biol Chem.* 2008;283(28):19636-45.
 62. Chattopadhyay C, Hawke D, Kobayashi R, Maity SN. Human p32, interacts with B subunit of the CCAAT-binding factor, CBF/NF-Y, and inhibits CBF-mediated transcription activation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):3632-41.
 63. Huang LJ, Chi J, Berry FB, Footz TK, Sharp MW, Walter MA. Human p32 is a novel FOXC1-interacting protein that regulates FOXC1 transcriptional activity in ocular cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(12):5243-9.
 64. Yu L, Loewenstein PM, Zhang Z, Green M. In vitro interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and the general transcription factor TFIIB with the cellular protein TAP. *J Virol.* 1995;69(5):3017-23.
 65. Ghate NB, Kim J, Shin Y, Situ A, Ulmer TS. p32 is a negative regulator of p53 tetramerization and transactivation. *Mol Oncol.* 2019;13:1976-92.
 66. Tange TØ, Jensen TH, Kjems J. In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem.* 1996;271(17):10066-72.
 67. Fausther-Bovendo PH, Vieillard V, Sagan S, Bismuth G, Debré P. Hiv gp41 engages gc1qr on cd4+ t cells to induce the expression of an nk ligand through the pip3/h2o2. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):1-14.
 68. Wang Y, Finan JE, Middeldorp JM, Hayward SD. P32/TAP, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology.* 1997;236(1):18-29.
 69. Bruni R, Roizman B. Open reading frame P - A herpes simplex virus gene repressed during

- productive infection encodes a protein that binds a splicing factor and reduces synthesis of viral proteins made from spliced mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10423–7.
70. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1239–49.
 71. Mohan KVK, Ghebrehwet B, Atreya CD. The N-terminal conserved domain of rubella virus capsid interacts with the C-terminal region of cellular p32 and overexpression of p32 enhances the viral infectivity. *Virus Res*. 2002;85(2):151–61.
 72. Choi Y, Kwon YC, Kim SI, Park JM, Lee KH, Ahn BY. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology* [Internet]. 2008;381(2):178–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.035>
 73. Nguyen T, Ghebrehwet B, Peerschke EIB. Staphylococcus aureus protein A recognizes platelet gC1qR/p33: A novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun*. 2000;68(4):2061–8.
 74. Braun L, Ghebrehwet B, Cossart P. GC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*. 2000;19(7):1458–66.
 75. Ghebrehwet B, Tantral Lee Titmus A., Mathew Panessa-Warren, Barbara J. Tortora, Stanislaus GT, Wong S, Warren5 and JB. The Exosporium of *B.cereus* Contains a Binding Site for gC1qR/ p33: Implication in Spore Attachment and/or Entry. *Exp Med Biol* [Internet]. 2007;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 76. Yadav G, Prasad RLA, Jha BK, Rai V, Bhakuni V, Datta K. Evidence for inhibitory interaction of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1 qR) with *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3897–905.
 77. Biswas AK, Hafiz A, Banerjee B, Kim KS, Datta K, Chitnis CE. *Plasmodium falciparum* uses gC1qR/HABP1/p32 as a receptor to bind to vascular endothelium and for platelet-mediated clumping. *PLoS Pathog*. 2007;3(9):1271–80.
 78. Babal Kant Jha, Dinakar M. Salunke and KD. Structural Flexibility of Multifunctional

HABP1 May Be Important for Regulating Its Binding to Different Ligands. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27464–72.

79. Yagi M, Uchiumi T, Takazaki S, Okuno B, Nomura M, Yoshida SI, et al. P32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: Importance of its RNA-binding ability. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):9717–37.
80. Noh S, Phorl S, Naskar R, Oeum K, Seo Y, Kim E, et al. p32/C1QBP regulates OMA1-dependent proteolytic processing of OPA1 to maintain mitochondrial connectivity related to mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Sci Rep [Internet].* 2020;10(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67457-w>
81. Liu Y, Leslie PL, Jin A, Itahana K, Graves LM, Zhang Y. P32 heterozygosity protects against age-and diet-induced obesity by increasing energy expenditure. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06209-9>
82. Gotoh K, Morisaki T, Setoyama D, Sasaki K, Yagi M, Igami K, et al. Mitochondrial p32/C1qbp Is a Critical Regulator of Dendritic Cell Metabolism and Maturation. *Cell Rep [Internet].* 2018;25(7):1800–1815.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.057>
83. Saito T, Uchiumi T, Yagi M, Amamoto R, Setoyama D, Matsushima Y, et al. Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses. *Cardiovasc Res.* 2017;113(10):1173–85.
84. Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 Protein Is a Critical Regulator of Tumor Metabolism via Maintenance of Oxidative Phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2010;30(6):1303–18.
85. Hu MJ, Crawford SA, Henstridge DC, Ng IHW, Boey EJH, Xu Y, et al. P32 Protein Levels Are Integral To Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Morphology, Cell Metabolism and Survival. *Biochem J.* 2013;453(3):381–91.
86. Sünderhauf A, Hicken M, Schlichting H, Skibbe K, Ragab M, Raschdorf A, et al. Loss of Mucosal p32/gC1qR/HABP1 Triggers Energy Deficiency and Impairs Goblet Cell Differentiation in Ulcerative Colitis. *Cmgh.* 2021;12(1):229–50.
87. Meenakshi J, Anupama, Goswami SK, Datta K. Constitutive expression of hyaluronan

- binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in normal fibroblast cells perturbs its growth characteristics and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300(3):686–93.
88. Kamal A, Datta K. Upregulation of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) is associated with Cisplatin induced apoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(5):861–74.
89. Chowdhury AR, Ghosh I, Datta K. Excessive reactive oxygen species induces apoptosis in fibroblasts: Role of mitochondrially accumulated hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR). *Exp Cell Res*. 2008;314(3):651–67.
90. McGee AM, Douglas DL, Liang Y, Hyder SM, Baines CP. The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle*. 2011;10(23):4119–27.
91. Ma J, Ren C, Yang H, Zhao J, Wang F, Wan Y. The Expression Pattern of p32 in Sheep Muscle and Its Role in Differentiation, Cell Proliferation, and Apoptosis of Myoblasts. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5161):1–18.
92. Watthanasurorot A, Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I. A calreticulin/gC1qR complex prevents cells from dying: A conserved mechanism from arthropods to humans. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(2):120–31.
93. Yoshikawa H, Komatsu W, Hayano T, Miura Y, Homma K, Izumikawa K, et al. Splicing factor 2-associated protein p32 participates in ribosome biogenesis by regulating the binding of Nop52 and fibrillar in to preribosome particles. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(8):1–23.
94. Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R, Hahn YS. gC1q Receptor Ligation Selectively Down-Regulates Human IL-12 Production through Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *J Immunol*. 2005;175(7):4706–14.
95. Rao CM, Deb TB, Datta K. Hyaluronic acid induced hyaluronic binding protein phosphorylation and inositol triphosphate formation in lymphocytes. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;40(2):327–37.
96. Kim KB, Yi JS, Nguyen N, Lee JH, Kwon YC, Ahn BY, et al. Cell-surface receptor for complement component C1q (gC1qR) is a key regulator for lamellipodia formation and cancer metastasis. *J Biol Chem*. 2011;286(26):23093–101.

97. Majumdar M, Meenakshi J, Datta K, Goswami SK. Hyaluronan binding protein 1 (HABP1)/c1qbp/p32 is an endogenous substrate for MAP kinase and is translocated to the nucleus upon mitogenic stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291(4):829–37.
98. Rubinstein DB, Stortchevoi A, Boosalis M, Ashfaq R, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB, et al. Receptor for the globular heads of C1q (gC1q-R, p33, hyaluronan-binding protein) is preferentially expressed by adenocarcinoma cells. *Int J Cancer.* 2004;110(5):741–50.
99. Dembitzer FR, Kinoshita Y, Burstein D, Phelps RG, Beasley MB, Garcia R, et al. gC1qR Expression in Normal and Pathologic Human Tissues: Differential Expression in Tissues of Epithelial and Mesenchymal Origin. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(6):467–74.
100. Saha S, Kim K, Islam SM, Cho S-G, Gil M. Systematic Multiomics Analysis of Alterations in C1QBP mRNA Expression and Relevance for Clinical Outcomes in Cancers. *J Clin Med.* 2019;8(513):1–16.
101. Egusquiza-Alvarez CA, Castañeda-Patlán MC, Albarran-Gutierrez S, Gonzalez-Aguilar H, Moreno-Londoño AP, Maldonado V, et al. Overexpression of Multifunctional Protein p32 Promotes a Malignant Phenotype in Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol.* 2021;11(May):1–15.
102. Fogal V, Babic I, Chao Y, Pastorino S, Mukthavaram R, Jiang P, et al. Mitochondrial p32 is upregulated in Myc expressing brain cancers and mediates glutamine addiction. *Oncotarget.* 2015;6(2):1157–70.
103. Ghosh I, Chowdhury AR, Rajeswari MR, Datta K. Differential expression of Hyaluronic Acid Binding protein 1 (HABP1)/P32/C1QBP during progression of epidermal carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2004;267(1–2):133–9.
104. Ellinor IB P. Soluble gC1qR in Blood and Body Fluids: Examination in a Pancreatic Cancer Patient Cohort. *Int J Cancer Res Mol Mech (ISSN 2381-3318).* 2015;1(3):1–5.
105. Chen YB, Jiang CT, Zhang GQ, Wang JS, Pang D. Increased expression of hyaluronic acid binding protein 1 is correlated with poor prognosis in patients with breast cancer. *J Surg Oncol.* 2009;100(5):382–6.
106. Wang J, Song Y, Liu T, Shi Q, Zhong Z, Wei W, et al. Elevated expression of HABP1 is a novel prognostic indicator in triple-negative breast cancers. *Tumor Biol.* 2015;36(6):4793–9.

107. Niu M, Sun S, Zhang G, Zhao Y, Pang D, Chen Y. Elevated expression of HABP1 is correlated with metastasis and poor survival in breast cancer patients. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2015;5(3):1190–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045997> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4449446>
108. Yu G, Wang J. Significance of hyaluronan binding protein (HABP1/P32/gC1qR) expression in advanced serous ovarian cancer patients. *Exp Mol Pathol*. 2013;94(1):210–5.
109. Zhao J, Liu T, Yu G, Wang J. Overexpression of HABP1 correlated with clinicopathological characteristics and unfavorable prognosis in endometrial cancer. *Tumor Biol*. 2015;36(2):1299–306.
110. Zhang M, Li N, Liang Y, Liu J, Zhou Y, Liu C. Hyaluronic acid binding protein 1 overexpression is an indicator for disease-free survival in cervical cancer. *Int J Clin Oncol*. 2017;22(2):347–52.
111. Zhang X, Zhang F, Guo L, Wang Y, Zhang P, Wang R, et al. Interactome analysis reveals that C1QBP (complement component 1, q subcomponent binding protein) is associated with cancer cell chemotaxis and metastasis. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(11):3199–209.
112. Kaul R, Saha P, Saradhi M, Prasad RLA, Chatterjee S, Ghosh I, et al. Overexpression of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) in HepG2 cells leads to increased hyaluronan synthesis and cell proliferation by up-regulation of cyclin D1 in AKT-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2012;287(23):19750–64.
113. Li K, Gao B, Li J, Chen H, Li Y, Wei Y, et al. ZNF32 protects against oxidative stress-induced apoptosis by modulating C1QBP transcription. *Oncotarget*. 2015;6(35):38107–26.
114. Xu J, Sun Y, Jiang J, Xu Z, Li J, Xu T, et al. Globular C1q Receptor (gC1qR/p32/HABP1) Suppresses the Tumor-Inhibiting Role of C1q and Promotes Tumor Proliferation in 1q21-Amplified Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2020;11(July):1–17.
115. Kim BC, Hwang HJ, An HT, Lee H, Park JS, Hong J, et al. Antibody neutralization of cell-surface gC1qR/HABP1/SF2-p32 prevents lamellipodia formation and tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016;7(31):49972–85.
116. Liu Z, Su YJ, Gu PQ, Ji ZY, Wang XG, Gao LJ. The role of the globular heads of C1q

- receptor (gC1qR) gene in regulating apoptosis of human cervical squamous cell carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(5):1181–90.
117. Wang Y, Fu D, Su J, Chen Y, Qi C, Sun Y, et al. C1QBP suppresses cell adhesion and metastasis of renal carcinoma cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01084-w>
118. Karousou E, Misra S, Ghatak S, Dobra K, Götte M, Vignetti D, et al. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biol* [Internet]. 2017;59:3–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.10.001>
119. Arielly SS, Ariel M, Yehuda R, Scigelova M, Yehezkel G, Khalaila I. Quantitative analysis of caveolin-rich lipid raft proteins from primary and metastatic colorectal cancer clones. *J Proteomics* [Internet]. 2012;75(9):2629–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.011>
120. Yenugonda V, Nomura N, Kouznetsova V, Tsigelny I, Fogal V, Nurmemmedov E, et al. A novel small molecule inhibitor of p32 mitochondrial protein overexpressed in glioma. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–12.
121. Peerschke EI, Stanchina E de, Chang Q, Manova-Todorova K, Barlas A, Savitt AG, et al. Anti gC1qR/p32/HABP1 Antibody Therapy Decreases Tumor Growth in an Orthotopic Murine Xenotransplant Model of Triple Negative Breast Cancer. *Antibodies*. 2020;9(4):51.
122. Peerschke E, Stier K, Li X, Kandov E, de Stanchina E, Chang Q, et al. gC1qR/HABP1/p32 Is a Potential New Therapeutic Target Against Mesothelioma. *Front Oncol*. 2020;10(August):1–10.
123. Brokstad KA, Kalland KH, Russell WC, Matthews DA. Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1161–9.
124. Kim YH, Lee SB, Shim S, Kim A, Park JH, Jang WS, et al. Hyaluronic acid synthase 2 promotes malignant phenotypes of colorectal cancer cells through transforming growth factor beta signaling. *Cancer Sci*. 2019;110(7):2226–36.
125. Long J, Yin Y, Guo H, Li S, Sun Y, Zeng C, et al. The mechanisms and clinical significance of PDCD4 in colorectal cancer. *Gene* [Internet]. 2019;680(September 2018):59–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.034>

