



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Análisis de la función de cortactina en la migración transendotelial de
las células B leucémicas en la leucemia linfoblástica aguda infantil”**

TESIS

Que presenta:

ING. ELIANA ITZEL SILVA CASOLUENGO

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. Michael Schnoor

Dra. Rosana Pelayo Camacho

México D.F.

Agosto, 2017

A mis padres, por su cariño infinito y su apoyo incondicional

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca recibida durante el periodo 2015-2017 para la realización de este proyecto.

Al Dr. Michael Schnoor y la Dra. Rosana Pelayo por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A los Drs. Leopoldo Santos y Vianney Ortiz por su apoyo y sugerencias durante este proyecto.

A la Dra. Hilda Vargas por su apoyo durante la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Alex, Eduardo, Karla, Isma y Sandy por su apoyo, paciencia, comprensión y cariño.

A mis amigos de generación, en especial a Laura, Lu, Paola, Iván, Giovanni, Mayra, Rember, Norberto, Rebe, Keity, Erick y Selene por acompañarme en este viaje de 2 años.

A mi mejor amiga Vale por apoyarme y estar siempre para mí.

A mis padres por estar siempre para alentarme cuando el camino se complicaba.

Contenido

INTRODUCCIÓN	6
Leucemia: epidemiología e inmunofenotipos	12
Recaída en la LLA	13
Migración de células B en la normalidad y en la LLA	14
Citoesqueleto de actina	19
El papel de cortactina en la leucemia	24
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Químicos	29
Buffers	29
Reactivos y materiales empleados en cultivo celular	30
Anticuerpos.....	31
Fármacos.....	32
Cultivo celular	32
Obtención y purificación de la población control.....	33
Extracción de RNA	33
Retrotranscripción.....	33
RT-qPCR	34
Análisis de citometría.....	35
Lisados celulares y estímulos.....	36
Inmunoprecipitación.....	37
Western Blot	37
Ensayos de transmigración	38
Microscopia intravital de cremaster en un modelo murino de xenotrasplante	39
RESULTADOS.....	41
Discusión	51
Conclusión	56

Perspectivas 56
BIBLIOGRAFÍA..... 57

Abreviaturas

ABP: proteínas de unión a actina

ADP: adenosin difosfato

AF: Attachment Factor

AF488: Alexa flour 488

APC: alofocianina con enlaces cruzados

Arp2/3: complejo de proteínas de unión a actina 2/3

ATP: adenosin trifosfato

BCR: receptor de las células B

BSA: albúmina bovina

CaCl₂: cloruro de calcio

Caco-2: células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano

CLP: progenitores linfoides comunes

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

dNTPS: desoxirribonucleósidos-trifosfato

E-selectina: selectina endotelial

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidermal

Erk: cinasas que regulan las señales extracelulares

F-actina: actina filamentosa

FGB: factor de crecimiento de fibroblastos

G-actina: actina globular

Gal 1: galectina 1

GlyCAM-1: molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1

HSC: células troncales hematopoyéticas

HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IL-7: interleucina 7

i.p: intraperitoneal

KCl: cloruro de potasio

kDa: kilodalton

KD: knockdown

KH₂PO₄: fosfato de potasio monobásico

L-selectina: selectina leucocitaria

LFA-1: antígeno asociado a función linfocitaria 1

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LLC: leucemia linfocítica crónica

LMC: leucemia mieloide crónica

LMA: leucemia mieloide aguda

IMF: intensidad media de fluorescencia

MadCAM1: molécula celular de adhesión de mucosas 1

min: minuto

MIV: microscopia intravital

MgCl₂: cloruro de magnesio

mM: milimolar

MMP-9: metaloproteasa de matriz 9

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MO: médula ósea

MPP: progenitores multipotentes

N-WASP: WASP neural

Na₂HPO₄: fosfato di-básico de sódio

NaCl: cloruro de sodio

NaN₃: azida de sodio

ng: nanogramo

NPF: factores promotores de la nucleación

P-selectina: selectina plaquetaria

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PAK: cinasa activada por p21

PBS: buffer de fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: ficoeritrina

PeCy5: ficoeritrina-cianina 5

PP: placas de Peyer

PSGL1: ligando de la proteína P-selectina

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: reacción de transcripción inversa de la polimerasa en cadena en tiempo real

SCU: sangre de cordón umbilical

SDF1: factor derivado de células estromales 1

SDS: dodecilsulfato sódico

SNC: sistema nervioso central

SV: variante de splicing

TBS: tris buffer salino

Tyr: tirosina

VLA-4: antígeno muy tardío 4

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1

WASP: proteínas del síndrome de Wiskott–Aldrich

WAVE: proteína homóloga de verprolina de la familia WASP

WIP: la proteína que interactúa con WASP

WT: wild type

µg: microgramo

µl: microlitro

Resumen

La leucemia es un grave problema de salud a nivel mundial y el principal cáncer infantil, con la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores de células B como la más frecuente. A pesar de que las tasas de curación de la leucemia han incrementado en los últimos años, existe una subpoblación de pacientes con el riesgo de sufrir recaídas, las cuales tienen una tasa de mortalidad del 70%. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los blastos leucémicos logran infiltrarse a otros órganos no se conocen con exactitud. Cortactina es una proteína de unión a actina que está altamente expresada en distintos tipos de cáncer y se ha asociado a metástasis, por lo que creemos que su alta expresión en células leucémicas podría estar relacionada con su capacidad de transmigración endotelial e infiltración. Encontramos que las líneas celulares de LLA-preB, Nalm-6 y REH, expresan altos niveles de cortactina. Ambas líneas celulares presentan la variante de *splicing 2* de 60kDa. Además, estas células expresan altos niveles de moléculas de adhesión tales como L-selectina y VLA-4, sugiriendo una ventaja en procesos migratorios. En efecto, la capacidad de transmigración de estas líneas celulares leucémicas es mayor en comparación con las células CD34-CD19⁺ usadas como control sano. Posterior al ensayo de transmigración se observó en las células que transmigraron un incremento de cortactina en comparación con aquellas que no migraron. Los niveles de fosforilación de cortactina en la línea celular REH no cambiaron bajo un estímulo de CXCL12, sugiriendo que la fosforilación constitutiva de cortactina mantiene a las células en un estado de activación lo cual podría facilitar la transmigración. Con el objetivo de investigar si la expresión de cortactina participa en la extravasación de los precursores leucémicos de B *in vivo*, intentamos analizar la extravasación en un modelo murino de xenotrasplante estimulado con CXCL12 mediante microscopia intravital (MIV) del músculo cremaster; sin embargo estas células no lograron llegar al sitio o se atoraron en los capilares sanguíneos por lo que no es un método apropiado.

Abstract

Leukemia is a serious health issue worldwide as it is the most frequent cancer in children; with acute lymphoblastic leukemia of B cell precursors (B-ALL) being the most common childhood leukemia. Even though the cure rates have increased lately, some patients still suffer a disease relapse that remains lethal in 70% of all relapse cases. However, the mechanisms underlying relapse including organ infiltration by leukemic blasts remain elusive. Cortactin is an actin-binding protein that is highly expressed in different types of cancers and it is related to metastasis formation. Thus, we wondered if B-ALL cells also expressed high cortactin levels that would trigger transendothelial migration and infiltration. We found that the preB-ALL cell lines Nalm-6 y REH indeed expressed high cortactin levels. Of note, both cell lines only expressed the splice variant 2 of 60kDa. Moreover, these cells showed increased expression of L-selectin and VLA-4 when compared to normal B cells, which could confer an advantage during migration. Indeed, the transmigratory capacity of these leukemic cells was increased in comparison to CD34-CD19⁺ control cells. Additionally, transmigrated cells showed even higher levels of cortactin when compared to non-migrated cells. We also found that cortactin was constitutively tyrosine phosphorylated in REH cells and treatment with CXCL12 did not further increase phosphorylation suggesting that these cells are in a state of constant activation that could facilitate transmigration. To investigate whether cortactin expression participates in preB-ALL cell extravasation in vivo, we tried to analyze extravasation of the xenotransplanted cell lines in the CXCL12-stimulated mouse cremaster by intravital microscopy. However, most of the cells did not arrive to the site or got stuck in the capillaries and could not be quantified indicating that this is not an appropriate method to study extravasation of human B-ALL cells.

INTRODUCCIÓN

Leucemia: epidemiología e inmunofenotipos

La leucemia es una neoplasia maligna que afecta a las células de la sangre, a nivel mundial es un grave problema de salud pública ya que es el cáncer infantil más frecuente (Bhojwani, Yang et al. 2015, Enciso, Mendoza et al. 2015).

Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) caracterizadas por una rápida progresión de la enfermedad y un acelerado incremento de los blastos leucémicos representan el mayor porcentaje de todas las leucemias. En México su incidencia en niños menores a 15 años es de 49.5 casos por millón por año representando el 85.1% de los casos, seguida de la leucemia mieloide aguda (LMA) con una incidencia de 6.9 casos por millón por año representando el 12.3% y la leucemia mieloide crónica (LMC) cuya incidencia es de 0.9 casos por millón por año que corresponde al 1.7%. De los casos de LLA el inmunofenotipo más frecuente es el de precursores de células B representando el 73.2%, seguido del de células B con un 14.4% y el de células T con un 12.4% (Perez-Saldivar, Fajardo-Gutierrez et al. 2011).

Los porcentajes para 3 estadios de maduración de precursores de células B de pacientes de LLA se han reportado recientemente, donde las células ProB (CD34+CD10+CD19+) representan el 34.1%, las células preB (CD34+CD10+CD19-) el 25% y una combinación de ambos precursores ProB y preB el 40.9% (Balandran, Vadillo et al. 2016).

La introducción de la quimioterapia multifarmacológica como tratamiento para la LLA, la cual incluye normalmente corticoesteroides, vincristina, L-asparaginasa y antraciclinas, ha generado un incremento en las tasas de curación en los últimos años llegando a más del 80% de los casos (Morické, Zimmermann et al. 2010, Salzer, Devidas et al. 2010). A pesar de esto, existe una subpoblación de pacientes quienes corren el riesgo de sufrir una recaída, situación que han reportado como la principal causa de muerte en niños menores a 15 años (Nguyen, Devidas et al. 2008).

Recaída en la LLA

Las recaídas están definidas como la reaparición de la leucemia en la médula ósea, sangre o cualquier otro sitio después de lograr una remisión completa como resultado de una terapia. Las recaídas son consideradas como una nueva condición de la enfermedad, para las cuales existen diversos factores que pueden pronosticar el resultado de la enfermedad y seleccionar un nuevo tratamiento más apropiado para el paciente. Entre estos factores pronósticos se encuentran el inmunofenotipo de la leucemia, la duración de la remisión, la respuesta a la terapia y el sitio de la recaída.

El sitio de la recaída de la enfermedad puede presentarse: de manera aislada en médula ósea (MO) si esta contiene al menos 25% de células leucémicas sin evidencia de leucemia en otros sitios. Una recaída extramedular aislada existe cuando se evidencia la leucemia en sitios distintos a la MO y existen menos del 5% de blastos en la MO. Además, una recaída combinada involucra blastos leucémicos en sitios extramedulares y más del 5% en la médula ósea (Smith 2011). De acuerdo a estos sitios, aquellos pacientes con una recaída en médula ósea tienen el peor pronóstico, seguido de una recaída combinada y una recaída extramedular (Buhrer, Hartmann et al. 1993, Nguyen, Devidas et al. 2008)

Los sitios extramedulares donde se dan las recaídas con mayor frecuencia son el sistema nervioso central (SNC) y los testículos. La recaída de SNC está definida como la presencia de 5 o más leucocitos por microlitro en el líquido cefalorraquídeo mientras que una recaída testicular es definida como testiculomegalia unilateral o bilateral comprobada mediante biopsia. A pesar de que ambos sitios son fisiológicamente distintos comparten la característica de ser compartimentos altamente selectivos a la entrada de moléculas y células. La circulación al SNC está protegida por la barrera hematoencefálica donde la entrada de agua, dióxido de carbono, oxígeno y la mayoría de los

compuestos líquidos solubles pueden pasar fácilmente mientras que a muchas proteínas plasmáticas y la mayoría de moléculas orgánicas grandes se les restringe la entrada mediante uniones interendoteliales muy estrechas. La fisiología de la barrera entre la sangre y los testículos es menos clara, sin embargo se ha identificado una barrera firme también formada por uniones interendoteliales que separan la sangre y los tubos seminíferos e inhibe la infiltración de células leucémicas que se encuentran normalmente en el espacio intersticial (Dym and Fawcett 1970).

Se ha observado que la entrada selectiva a estos sitios genera un ambiente que favorece la supervivencia de las células leucémicas ya que los agentes quimioterapéuticos no logran alcanzar una concentración o actividad adecuada que permita erradicar las clonas malignas. Por ejemplo se ha demostrado que la concentración de metrotexato en el fluido testicular intersticial es de dos a cuatro veces menor que en el suero, y en los tubos seminíferos de 18 a 50 veces menor (Brecher, Weinberg et al. 1986). El mecanismo exacto por el cual las células leucémicas logran infiltrarse a los diferentes órganos extramedulares se desconoce, sin embargo requiere un proceso de migración celular altamente regulado.

Migración de células B en la normalidad y en la LLA

La capacidad de migrar es una característica esencial de las células B. Durante su proceso de maduración, las células B deben migrar dentro de la médula ósea a diferentes microambientes los cuales proporcionan las señales necesarias para la supervivencia y diferenciación (Fig 1).

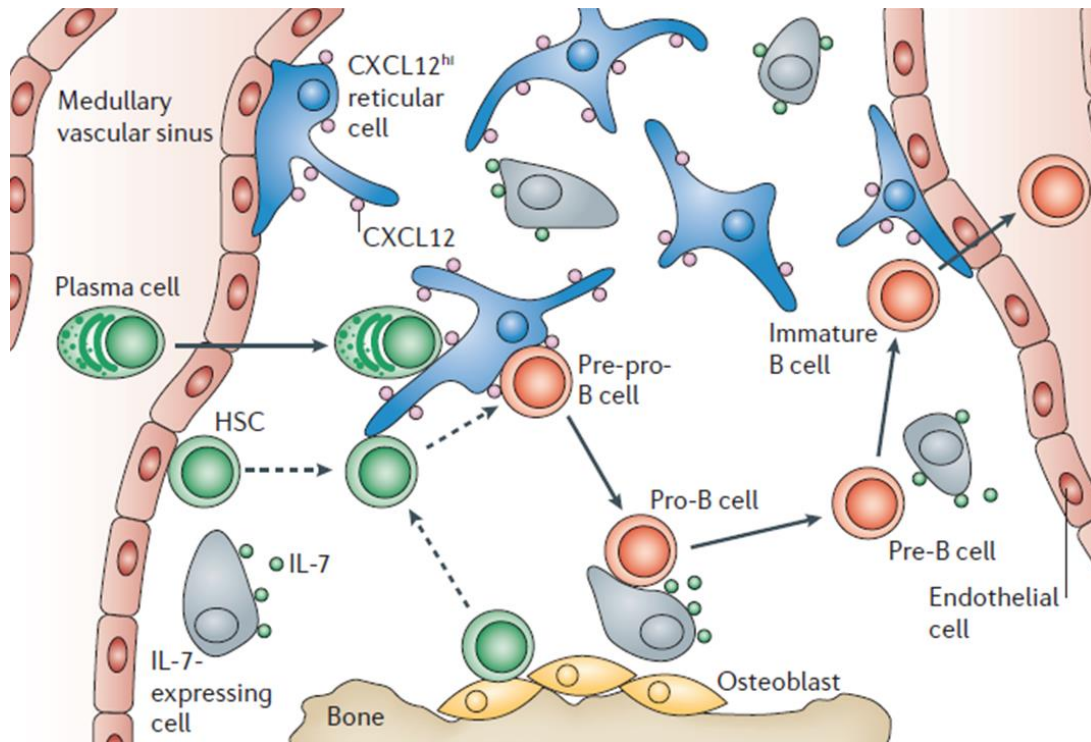


Figura 1. Modelo del movimiento de las células B y sus precursoras dentro de la médula ósea. Las células troncales hematopoyéticas (HSC) que se localizan cerca de los osteoblastos dan lugar a los precursores de células B los cuales migran a diferentes microambientes dentro de la médula ósea dependiendo de su estadio de diferenciación. Las células pre-pro B se asocian con las células reticulares que secretan CXCL12, mientras que las células pro-B migran hacia células productoras de IL-7. Conforme la diferenciación continúa las células pre-B abandonan a las células que expresan IL-7. Una vez que terminan su maduración las células salen de la médula ósea y entran a la circulación (Nagasawa, 2006).

Los precursores de las células B son generados a partir de células troncales hematopoyéticas (HSC) caracterizadas por una capacidad de autorenovación y diferenciación. Estas HSC se localizan en la cercanía de los osteoblastos, las células que delimitan el hueso y la médula ósea. Los osteoblastos secretan factores que regulan la retención y la quiescencia de las HSC como trombopoyetina, angiopoyetina y el factor derivado de células estromales 1 (SDF1 también conocido como CXCL12). Las HSC generan progenitores multipotentes (MPP) que a su vez dan lugar a los progenitores linfoides comunes (CLP), los cuales se diferencian a los progenitores más tempranos de linaje B, las células pre-pro B.

La quimiocina CXCL12 que señala mediante su receptor CXCR4, juega un papel importante durante este proceso de diferenciación y es requerido para el desarrollo de células pre-pro B, ya que éstas tienen contacto con las células estromales que expresan CXCL12, esta adhesión está mediada por el antígeno muy tardío 4 (VLA-4) expresado en la superficie de las células B que se une a la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) expresada en la superficie de las células estromales. El eje CXCR4/CXCL12 también ha demostrado ser importante para las células de LLA, ya que éstas migran espontáneamente hacia las células estromales que secretan CXCL12 y la adhesión a estas células también es dependiente de VLA-4 (Burger, Burger et al. 1999, Burger, Zvaifler et al. 2001). Además, al bloquear el receptor en las células leucémicas la migración hacia las células estromales disminuye drásticamente y se ha observado que esto aumenta los efectos citotóxicos de agentes terapéuticos como vincristina y dexametasona (Juarez, Bradstock et al. 2003).

Conforme la diferenciación continúa, las células pro-B abandonan a las células productoras de CXCL12 y se localizan cerca de células productoras de interleucina 7 (IL-7). En el siguiente estado de diferenciación las células pre-B migran hacia un grupo diferente de células estromales las cuales expresan galectina-1 (Gal 1) que actúa como ligando del pre-receptor de las células B (BCR). Un vez que las células B han terminado su maduración y expresan un BCR funcional, deben salir de la médula ósea a través de los sinusoides, los vasos sanguíneos de la médula ósea para llegar a los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfoides y placas de Peyer) donde reconocerán antígenos y se diferenciarán en linfocitos efectores. Además estos linfocitos efectores pueden trasladarse de los órganos linfoides secundarios a los sitios de infección en cualquier tejido, donde llevarán a cabo su función de protección.

Para llevar a cabo la entrada a los órganos linfoides secundarios las células B deben atravesar la barrera endotelial, proceso conocido como migración

transendotelial, la cual requiere de una serie de pasos secuenciales (Fig 2). La migración transendotelial ha sido descrita a detalle para distintos tipos de células como neutrófilos, monocitos y células T sin embargo no se conoce a profundidad este mecanismo para las células B y sus distintos estadios de maduración.

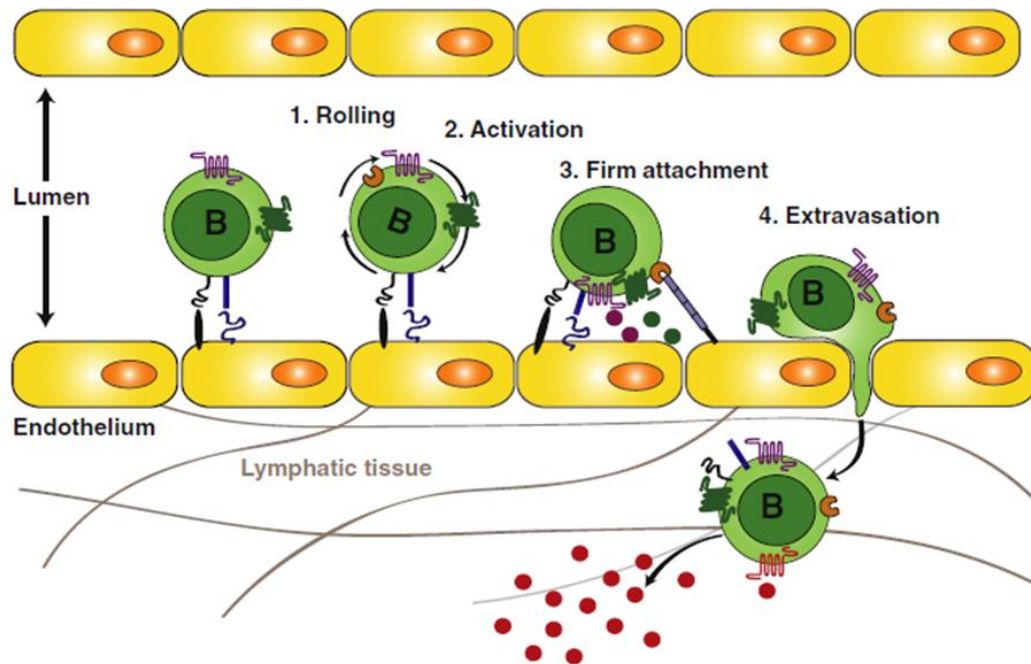


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de migración transendotelial de los linfocitos B. 1) Los linfocitos que se encuentran en la circulación forman contactos con las células del endotelio y llevan a cabo un proceso de *rolling* 2) La unión de quimiocinas a sus receptores da como resultado la activación de las integrinas. 3) La activación de las integrinas genera un cambio conformacional a un estado de alta afinidad por sus ligandos, gracias al cual se da una adhesión firme al endotelio. 4) Las células B generan protrusiones de membrana las cuales le permiten a la célula desplazarse a un punto donde atravesará la barrera endotelial (Hauser y Höpken, 2015).

Se cree que los linfocitos B siguen un mecanismo similar al de las células T para llevar a cabo el proceso de transmigración. El primer paso consiste en que las células que se encuentran en la circulación comienzan a formar contactos con las células endoteliales, dichos contactos están mediados por

la selectina leucocitaria (L-selectina) y el ligando de la proteína P-selectina (PSGL1). L-selectina se une a sus receptores que incluyen CD34, la molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1 (GlyCAM-1) y la molécula celular de adhesión de mucosas 1 (MadCAM1) mientras que PSGL1 se une a la selectina plaquetaria (P-selectina) y a la selectina endotelial (E-selectina). Estas uniones frenan la velocidad de las células generando un proceso de rodamiento, sin embargo ensayos *in vitro* de adhesión con flujo, demuestran que las células B son capturadas vía VCAM-1 sin necesidad de un rolling previo (Shetty, Bruns et al. 2012).

A continuación se requiere de una activación de las integrinas, la cual consiste en un cambio conformacional a un estado de alta afinidad que permite la adhesión firme al endotelio. En el caso de los nódulos linfoides periféricos esta adhesión firme esta mediada por el antígeno asociado a función linfocitaria 1 (LFA-1) y VLA-4 en la superficie de las células B, que se unen a la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y VCAM-1 respectivamente, en la superficie de las células endoteliales de las vénulas altas (Hamann, Jablonski-Westrich et al. 1988, Berlin-Rufenach, Otto et al. 1999).

La activación de las integrinas está mediada por la unión de quimiocinas a su receptor. Existen diversas quimiocinas que logran llevar a cabo este proceso en las células B entre las cuales se encuentran CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13. CCL19 y CCL21 comparten el receptor CXCR7, CCL21 es expresada por el endotelio de la vasculatura alta en los nódulos linfáticos y las placas de Peyer (PP) (Gunn, Tangemann et al. 1998), mientras que CCL19 es producida por las células estromales cercanas a la vasculatura (Baekkevold, Yamanaka et al. 2001). CXCL12 es producida por las células perivasculares estromales y se encuentra presente en el lado luminal del endotelio y CXCL13 está expresado por el endotelio de la vasculatura alta en las PP y se une a su receptor CXCR5 (Okada, Ngo et al. 2002).

Una vez que las células están adheridas, comienzan a deslizarse sobre la superficie endotelial para encontrar un sitio óptimo donde realizar la

transmigración. Para llevar a cabo este proceso, la célula requiere de la formación de protrusiones de membrana al frente de las células. Los lamelipodios son estructuras anchas y planas, que se proyectan y se retraen de manera transitoria, en el borde delantero de las células que se mueven sobre un sustrato plano. Cuando estas estructuras persisten lo suficiente las células pueden establecer nuevas adhesiones mediadas por integrinas con el sustrato que se encuentra en la parte inferior, contraerse y liberar la adhesión de la parte trasera para llevar a cabo la migración. Se ha observado que a diferencia de las células T, las cuales llevan de manera extensa este proceso, las células B se mantienen estáticas antes de transmigrar (Shetty, Bruns et al. 2012), lo cual marca otra diferencia entre los procesos de migración de estos linfocitos.

Finalmente las células llevan a cabo el proceso de transmigración, el cual puede ocurrir atravesando el cuerpo de las células endoteliales (transcelular) o cruzando entre los contactos de las células endoteliales (paracelular), lo cual requiere una desestabilización en la unión adherente formada principalmente por VE-cadherina.

Todos estos pasos necesarios para llevar a cabo el proceso de transmigración de las células requieren de un rearrreglo del citoesqueleto de actina, una red dinámica y compleja, la cual se ve regulada por diversas proteínas de unión a actina (ABP).

Citoesqueleto de actina

La actina es una ATPasa que puede unirse a las moléculas de ATP o su forma hidrolizada ADP + Pi y en las células, actina puede encontrarse en forma monomérica (G-actina) o filamentosa (F-actina). Estos filamentos de actina son estructuras polarizadas con un extremo barbado (+), al cual se une ATP-actina y es de elongación rápida; y extremo punto final al cual se une ADP-actina y es de lenta elongación (Bugyi and Carlier 2010). La remodelación

dinámica del citoesqueleto de actina da lugar a la formación de estructuras necesarias para la migración de las células como los lamelipodios. Los lamelipodios se proyectan gracias a la formación dinámica de ramificaciones de actina llevado a cabo por el complejo de proteínas de unión a actina 2/3 (Arp2/3). Este complejo compuesto por 7 proteínas se une a los filamentos pre-existentes de actina (filamento madre) para llevar a cabo la nucleación de nuevos filamentos que crecen como ramificaciones a partir del filamento madre.

El complejo Arp2/3 requiere ser activado por los factores promotores de la nucleación (NPF) para llevar a cabo su función. Los NPF de clase I consisten en los miembros de la familia de las proteínas del síndrome de Wiskott–Aldrich (WASP) y la proteína homóloga de verprolina de la familia WASP (WAVE), estos contienen un dominio WCA, compuesto por un dominio WH2 (W) que une G-actina, un dominio de conexión (C) y un dominio ácido (A) que sirve para unirse al complejo Arp2/3. Los NPF de clase II, cuyo miembro más destacado es cortactina, unen filamentos de actina en lugar de monómeros mediante una secuencia de repetidos y unen al complejo Arp2/3 mediante su dominio ácido en el extremo N terminal. A pesar de que cortactina colocaliza con el complejo Arp2/3 en lamelipodios, en sitios de endocitosis mediada por clatrina (Kaksonen, Peng et al. 2000, Cao, Orth et al. 2003) y se sugiere que es un activador débil del complejo Arp2/3 (Urano, Liu et al. 2001, Weaver, Karginov et al. 2001), estudios en fibroblastos primarios deficientes de cortactina indican que no es requerida para activar al complejo Arp2/3 o para la formación de los lamelipodios (Lai, Szczodrak et al. 2009) por lo que probablemente cortactina no es principalmente un NPF. Debido a que cortactina es reclutada a los sitios de formación dinámica se piensa que su función es más bien la estabilización de las ramificaciones de actina ya que se ha observado que una depleción de la proteína reduce el tiempo de duración del lamelipodio así como la velocidad de la migración celular (Weaver, Karginov et al. 2001).

Cortactina

Cortactina es una proteína de unión a F-actina de 80 kDa, codificada por el gen *cttn/ems1* localizado en los ratones en el cromosoma 7 y en humanos en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q13. Hasta hace poco la literatura reportaba que cortactina era una proteína que se expresaba en todas las células excepto en células hematopoyéticas, sin embargo recientemente se ha descrito su expresión en plaquetas, monocitos, células NK, células T y células B (Gattazzo, Martini et al. 2014).

La proteína contiene múltiples dominios (Fig 3): en su extremo N terminal un dominio de unión a Arp2/3 seguido de un dominio de 6.5 repetidos los cuales sirven para la unión a F-actina, un dominio hélice, un dominio rico en prolinas, serinas, treoninas y tirosina las cuales son blancos de fosforilación de diversas cinasas y un dominio SH3 en su extremo carboxilo que permite la interacción con otras proteínas como WASP neural (N-WASP), la proteína que interactúa con WASP (WIP), o dinamina-2 (McNiven, Kim et al. 2000, Uruno, Liu et al. 2001, Weaver, Heuser et al. 2002).

Adicional a la forma *wild type* (WT) de la proteína de 80 kDa se ha demostrado que cortactina cuenta con dos variantes de splicing que difieren en el número de repetidos. La variante de splicing 1 (SV1) carece del repetido 6 y tiene un peso molecular de 70 kDa y la variante de splicing 2 (SV2) carece del repetido 5 y 6 y tiene un peso de 60 kDa (van Rossum, de Graaf et al. 2003).

Cortactina puede ser regulada por modificaciones postraduccionales como fosforilaciones que ocurren principalmente en el dominio rico en serinas, prolinas, treoninas y tirosinas. El incremento en las fosforilaciones de la proteína resulta en un incremento en su peso molecular de 80 kDa a 85 kDa (van Damme, Brok et al. 1997, Campbell, Sutherland et al. 1999).

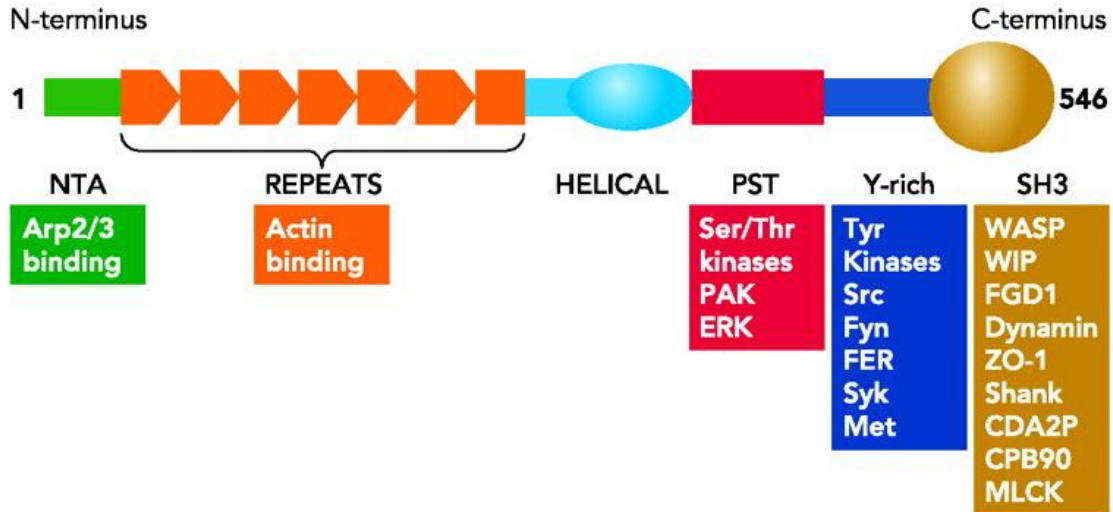


Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de cortactina. Cortactina cuenta con un dominio N terminal al cual se une el complejo de proteínas de unión a actina (Arp2/3), un dominio de 6.5 repetidos mediante el cual une F-actina, un dominio helical, un dominio rico en prolinas, serinas, treoninas (PST) y tirosinas (Y) y en su extremo C-terminal un dominio SH3. Las distintas cinasas capaces de fosforilar al dominio PSTY se muestran así como las proteínas capaces de interactuar con el dominio SH3 (Cosen-Binker y Kapus, 2006).

Las fosforilaciones funcionan como un *switch* para diversos eventos de señalización celular en las proteínas, sin embargo, el papel que estas tienen en cortactina no está bien definido. Diversas cinasas participan en la fosforilación de cortactina entre las cuales se encuentran las cinasas de treoninas y serinas, de las cuales la cinasa activada por p21 (PAK) (Vidal, Geny et al. 2002) y las cinasas que regulan las señales extracelulares (Erk) (Martinez-Quiles, Ho et al. 2004) que fosforilan en la serina 405 y en la serina 418 incrementando la unión entre cortactina y N-WASP (Campbell, Sutherland et al. 1999, Vidal, Geny et al. 2002, Martinez-Quiles, Ho et al. 2004) (Webb, Zhou et al. 2006). Las tirosinas 421, 466 y 488 se fosforilan secuencialmente y son blanco de las cinasas Src, Fer y Syk (Campbell, Sutherland et al. 1999, Vidal, Geny et al. 2002). En cortactina se ha demostrado una fuerte correlación

positiva entre los altos niveles de tirosinas fosforiladas y la capacidad de migración de las células, así como un incremento en la metástasis de células cancerígenas (Huang, Liu et al. 1998, Liu, Huang et al. 1999, Bourguignon, Zhu et al. 2001, Li, Tondravi et al. 2001, Huang, Asawa et al. 2003). Además se ha observado la inhibición de estos procesos cuando se previene la fosforilación de las tirosinas o la sobreexpresión de mutantes incompetentes para la fosforilación (Huang, Liu et al. 1998, Liu, Huang et al. 1999).

Las fosforilaciones en cortactina incrementan bajo diferentes estímulos como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGB) (Zhan, Hu et al. 1993, Zhan, Plourde et al. 1994), el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Kelley, Hayes et al. 2010, Oser, Mader et al. 2010), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Boyle, Michaud et al. 2007), la fagocitosis de bacterias (Dehio, Prevost et al. 1995), la activación de integrinas (Vuori and Ruoslahti 1995) y la activación del receptor CXCR4 (Luo, Pan et al. 2006). Este último mecanismo se ha descrito en células HEK293, donde la unión de CXCL12 a CXCR4 induce la translocación transitoria de cortactina de los compartimentos endosomales a la periferia celular, la fosforilación en la tirosina 421 y la colocalización con CXCR4 seguido de la internalización del receptor. (Luo, Pan et al. 2006).

Dado el papel de cortactina en procesos que requieren de una dinámica del citoesqueleto de actina, como la migración celular, su expresión se ha estudiado en distintos tipos de cáncer. Cortactina se expresa en células de cáncer como ovárico, gástrico, de mama, colorectal, esófago, cabeza y cuello (Yuan, Zhou et al. 2003, Luo, Shen et al. 2006, Fantozzi, Grall et al. 2008, Cai, Zhao et al. 2010, Dedes, Lopez-Garcia et al. 2010, Wang, Cao et al. 2010, Xie, Li et al. 2010, Xu, Garcia et al. 2010); donde su alta expresión correlaciona con metástasis y un pronóstico desfavorable para los pacientes.

El papel de cortactina en la leucemia

La expresión de cortactina en neoplasias de células hematopoyéticas ha sido estudiada únicamente en la leucémica linfocítica crónica (LLC). Las células B de pacientes de LLC muestran un incremento de cortactina tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig 4) y esta correlaciona de acuerdo a los parámetros clínicos con factores negativos (Gattazzo, Martini et al. 2014).

Recientemente mediante un *knockdown* (KD) de cortactina en células B de pacientes de LLC se ha descrito una reducción de la migración de estas células en comparación a las células control tanto en presencia como en ausencia del quimioatrayente CXCL12 (Fig 5), así como una reducción en la liberación de MMP-9 en el medio de cultivo. Ambas características se ven disminuidas drásticamente al ser tratadas con PP2, un inhibidor de cinasas Src, indicando la importancia de la fosforilación de cortactina. Adicionalmente, al evaluar los niveles de fosforilación de cortactina en condiciones basales y tras un estímulo de CXCL12 tanto en células control como en células de LLC se observó que en las células control cortactina presenta en condiciones basales bajos niveles de fosforilación en la tirosina 421 y esta incrementa cuando se estimulaba con CXCL12 (Fig 6). Por el contrario, las células leucémicas se encontraban constitutivamente fosforiladas y no hubo un incremento tras la estimulación con CXCL12 (Martini, Gattazzo et al. 2017).

Los altos niveles de cortactina y su fosforilación constitutiva en células de LLC incrementan la capacidad de migración y liberación de MM-9 confiriendo una ventaja a las células leucémicas para los procesos migratorios. Sin embargo, su expresión y fosforilación no ha sido evaluada en otro tipo de leucemias como las LLA, que son las de mayor incidencia.

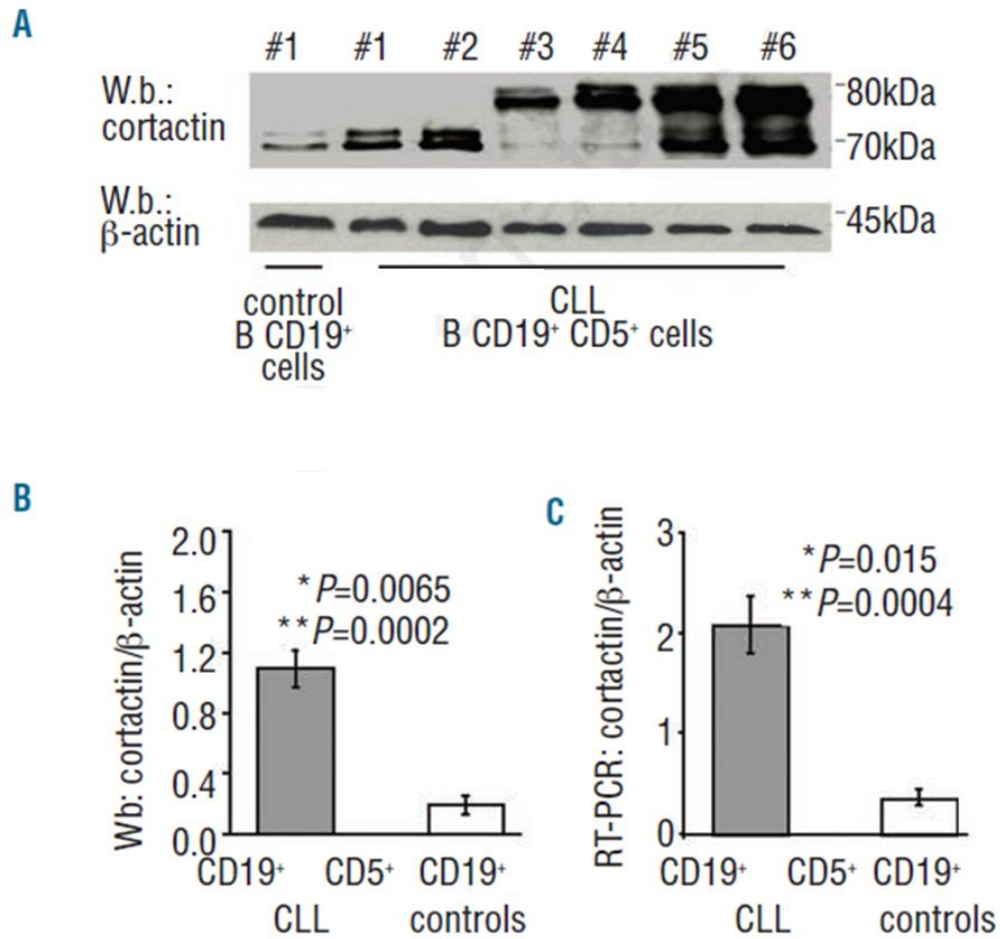


Figura 4. Evaluación de la expresión de cortactina en pacientes de LLC y pacientes control. (A) La expresión de cortactina fue evaluada por wester blot en linfocitos B CD19⁺CD5⁺ de pacientes de LLC y linfocitos CD19⁺ de pacientes control. Figura representativa de un paciente control y 6 pacientes de LLC. (B) Análisis de los niveles de cortactina en los pacientes de LLC vs los pacientes control. Todas las isoformas de cortactina fueron incluidas (células de LLC vs células control: 1.10 ± 0.12 vs 0.19 ± 0.06 ; $P=0.0065$ t-Student). (C) La expresión de cortactina a nivel de mRNA fue evaluada por RT-qPCR y normalizada a la expresión de β -actina (células de LLC vs células control: 2.08 ± 0.28 vs 0.36 ± 0.08 , $P=0.015$ t-Student) (Gattazzo, Martini et al. 2014).

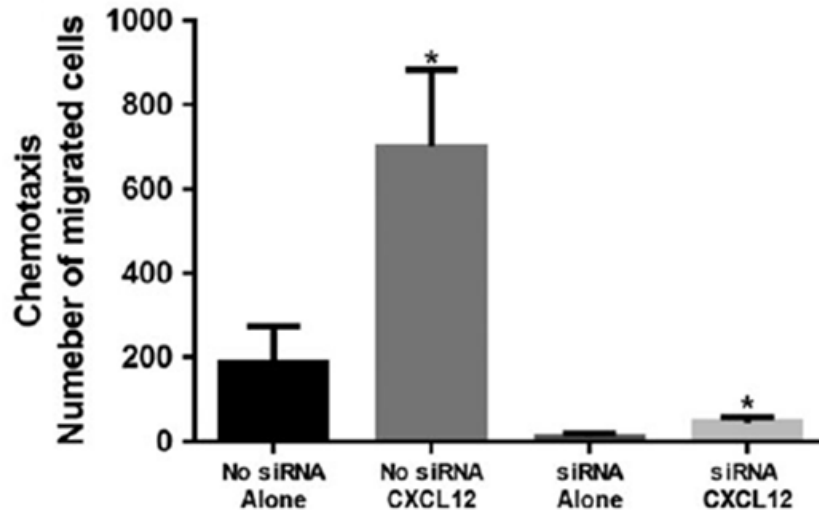
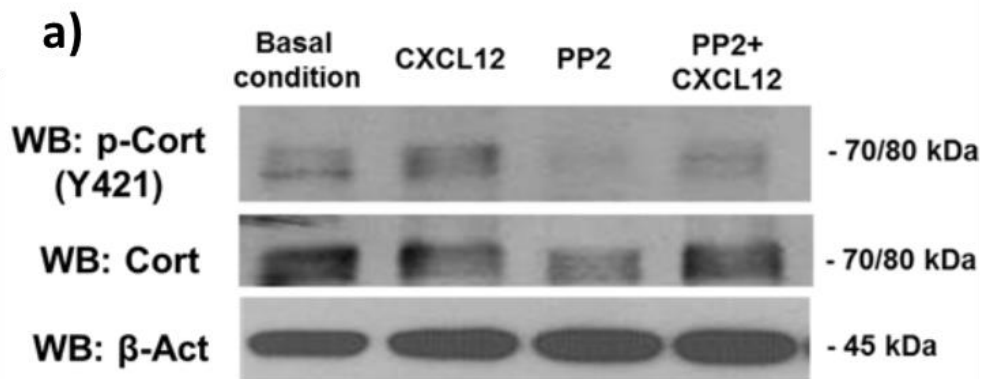


Figura 5. Evaluación de la capacidad de migración de células de LLC. La capacidad de migrar se evaluó mediante cámaras transwell en condiciones basales y en presencia de CXCL12 (100ng/ml) antes y después de un *knockdown* de cortactina en 4 pacientes LLC (No siRNA Alone: 187.5+85; No siRNA CXCL12: 700+182.6; siRNA Alone: 11.25+8.5; siRNA CXCL12: 45+12.9; P < 0.05 t-Student) (Martini, Gattazzo et al. 2017).



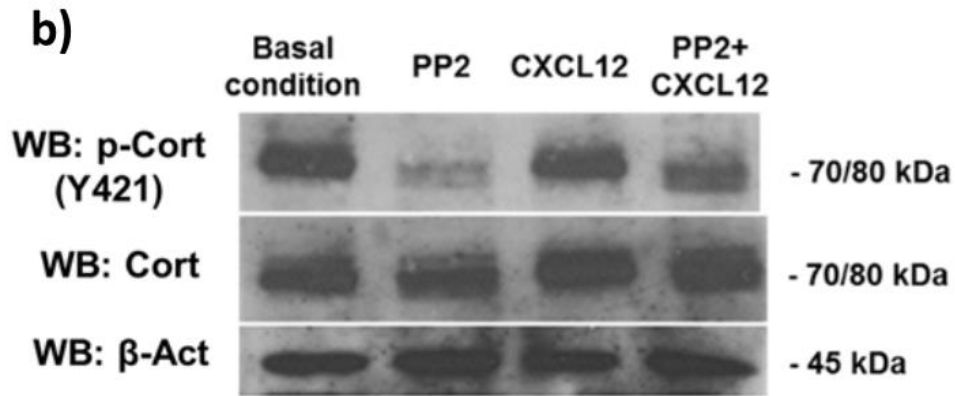


Figura 6. Evaluación de los niveles de fosforilación de cortactina en células de pacientes de LCC y pacientes control. La fosforilación de la Tyr421 se evaluó mediante western blot, en condiciones basales, después de incubar con PP2 (100 μ mol/l) por 20 min y/o CXCL12 (100ng/ml) por 15 minutos. A) Células de pacientes control. B) Células de pacientes con LLC (Martini, Gattazzo et al. 2017).

JUSTIFICACIÓN

Cortactina se encuentra altamente expresada en distintos tipos de cáncer y se ha asociado a metástasis. En leucemia únicamente se ha evaluado su expresión en pacientes de leucemia linfocítica crónica, y el incremento en los niveles de la proteína se ha asociado a pronósticos desfavorables. Dado que las leucemias linfoblásticas agudas de precursores de células B tienen la mayor incidencia de los casos de leucemia, es importante evaluar los niveles de cortactina en este tipo de células y explorar si su alta expresión correlaciona con la capacidad infiltrativa de las células leucémicas.

HIPÓTESIS

La expresión de altos niveles de cortactina en los precursores B leucémicos de LLA correlaciona con la capacidad de infiltración.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel de cortactina en la transmigración endotelial de las células B leucémicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión de cortactina y analizar la capacidad de transmigración en precursores leucémicos de B
2. Determinar los niveles de fosforilación de cortactina en precursores leucémicos de B
3. Establecer un modelo murino de xenotrasplante para analizar por microscopía intravital si la expresión de cortactina participa en la extravasación de los precursores leucémicos de B

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Todos los químicos fueron provistos por las siguientes compañías: ROCHE, Gibco, Preprotech, J.T. Baker, Affymetrix, Sigma, Invitrogene, Qiagen, BD Bioscience, Bio-Rad y Life Technologies.

Buffers

Todos los buffers fueron preparados en agua deionizada la cual ha sido purificada usando un sistema Mili-Q-system (Millipore).

Buffer de transferencia	20% metanol 25 mM Tris 192 mM glicina pH 8.3
Buffer de corrida SDS-PAGE	25 mM Tris 192 mM glicina 0.1% SDS pH 8.3
TBS	150 mM NaCl 10 mM Tris pH 8.0
TBS-T	100 ml TBS 10x 0.1% Tween20
PBS	138 mM NaCl 3 mM KCl 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄
Buffer de bloqueo	5% BSA TBS-T
Buffer de lisis de Mg ²⁺	25 mM HEPES pH 7.5 150 mM NaCl

	10 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1% NP-40 2% glicerol 1 mM ortovanadato de sodio 10 mM fluoruro sódico 1x Complete (ROCHE) 1x Phospho STOP (ROCHE)
Buffer de lisis para inmunoprecipitación (IP)	20 mM imidazol pH 6.8 100 mM NaCl 0.04% NaN ₃ 2 mM CaCl ₂ 2x Complete libre de EDTA (ROCHE) 1x Phospho STOP (ROCHE) 1% Triton x-100
Buffer HEPES	20 mM HEPES 140 mM NaCl 2mg/ml Glucosa pH 7.4

Reactivos y materiales empleados en cultivo celular

Gibco	RPMI 1640	REF 11875-093
	Tripsina 0.25%	15050-065
	Attachment Factor (AF)	REF S-006-100
	Aminoácidos no esenciales MEM (100x)	REF 11140-050
	Piruvato de sodio (100x)	REF 11360-070
Lonza	EBM-2	CC-3156

Peprotech	CXCL12	30-28a
Life Technologies	Trizol	REF 15596018
HyClone	Suero fetal bovino (FBS)	Num Cat SH30396.03
SIGMA	Hoetch 33342	CAS N. 23491-52-3
	Protein G Sepharose	P3296-5ML
	Isopropanol	I9516
	Cloroformo	C2432
Corning	Solución antibiótico antimicótico	REF 30-004-CI
BD Bioscience	Cytofix/cytoperm kit	REF 554714

Anticuerpos

Biologend	PE Cy5 Anti-CD34 humano	Cat 343516
	PE Anti-CD19 humano	Cat 302208
	APC Anti-CD19 humano	Cat 302211
	APC Anti-CD62L humano	Cat 304810
	PE Anti-CD162 humano	Cat 328806
	APC Anti-CD184 humano	Cat 306510
	APC Anti-CD29 humano	Cat 303008
	PE Anti-CD49d humano	Cat 304304
	TruStain FcX Humana	Cat 422302
Donado por el laboratorio del Dr. Klemens Rottner (Technical Universitz Braunschweig, Alemania)	Alexa Fluor 488 anti- Cortactina	
	Sobrenadante de hibridoma anti-cortactina	
BD Bioscience	Anti-Fosfotirosinas	610000
Santa Cruz	Cabra anti-ratón IgG-HRP	Sc-2005

Fármacos

PiSA	Ketamina	Q-7833-028
	Xilacina	Q-7833-099

Cultivo celular

Las líneas celulares Nalm-6 y REH fueron donadas por la Dra. Rosana Pelayo (IMSS, México), fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y solución antibiótico antimicótico.

Las células HUVEC fueron aisladas a partir de cordón umbilical bajo consentimiento informado. El cordón fue lavado con agua de la llave para limpiar el exceso de sangre. En condiciones estériles, en el extremo superior se insertó una cánula de punta redonda en la vena del cordón, se le colocó una jeringa de 20 ml con PBS y antibiótico y el contenido fue vaciado. La jeringa fue removida y ambos extremos fueron sellados con pinzas hemostáticas, en el extremo superior la cánula fue fijada con ayuda de una pinza. Con ayuda de una jeringa se inyectó tripsina a través de la cánula hasta que la vena quedó totalmente llena, el cordón fue calentado a 37° dentro de un vaso de precipitados a baño maría por 10 minutos, dando un suave masaje cada 2 minutos. Finalmente la pinza de la parte inferior fue removida, el contenido fue recuperado y centrifugado a 1500 rpm. El sobrenadante fue removido, las células se resuspendieron en medio EBM-2 y se colocaron en una placa CellBIND de 60mm. Para propagar las células, el medio fue retirado, las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril, posteriormente se agregaron 2 ml de Tripsina-EDTA, se incubaron a 37°C por 5 minutos y la tripsina fue inactivada con 3 ml de medio. Todas las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂.

Obtención y purificación de la población control

Sangre de cordón umbilical (SCU) fue obtenida bajo consentimiento informado del banco de células de cordón umbilical del hospital de oncología Centro Médico Siglo XXI. Se realizó un gradiente de ficol a la SCU para obtener las células mononucleares y en el caso de requerir la población control purificada, las células mononucleares fueron teñidas con anti-CD34 PeCy5 (1:100), anti-CD19-PE (1:100) y sorteadas con base en la expresión CD34⁻ CD19⁺ usando un BD FACSAria sorter (BD Biosciences).

Extracción de RNA

Se adicionó 200µl de trizol por cada $0.5-1 \times 10^6$ de células y se dio mezcla utilizando el vórtex por 1 min, se agregaron 40µl de cloroformo por cada 200µl de trizol y se homogenizó por inversión 7 veces. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. La fase acuosa fue recolectada y se agregaron 100µl de isopropanol por cada 200 µL de trizol, se mezcló por inversión y se incubó toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces adicionando 500µL de etanol al 70 % frío, mezclando por inversión, centrifugando a 13000 rpm por 10 min a 4 °C y descartando el sobrenadante. La pastilla se disolvió con 20-30 µL de H₂O DEPC y se cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) por espectrofotometría empleando un nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Retrotranscripción

La reacción de desnaturalización se efectuó mezclando 1.5 µg de RNA, 1.5 µg de oligo dT, 1 mM de dNTPs y se llevó la reacción a un volumen final de 25 µL con agua DEPC. La mezcla se calentó a 70 °C por 5 min y se colocó en hielo

1 min. Para la reacción de hibridación, se agregó 0.01 M de DTT y se llevó a un volumen final de 48 µL con agua DEPC. La mezcla se calentó a 42 °C por 2 min y se agregaron 400 U de transcriptasa reversa SuperScript® II y se incubaron a 42 °C por 90 min. La enzima fue inactivada calentando la mezcla a 70 °C por 5 min. La pureza y concentración del cDNA sintetizado se evaluó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) por espectrofotometría con un nanodrop.

RT-qPCR

Los primers utilizados fueron:

Cortactina F	5' ggtgtgcagacagacagacaa 3'
Cortactina R	5' gtcttttgggattcatgcag 3'
β2- microglobulina F	5' tcaggaaattgactttccattc 3'
β2- microglobulina R	5' ttctggcctggaggctatc 3'

Las sondas para qRT-PCR utilizadas fueron:

Cortactina	Num. 2
β2- microglobulina	Num. 42

La reacción se preparó utilizando 1.75 µl de agua DEPC, 5 µl de MasterMix, 2.5 µl de cDNA, 0.25 µl del primer forward, 0.25 µl del primer reverse y 0.25 µl de las sondas (ROCHE).

La amplificación se llevó a cabo en un Light Cyclor 480 ROCHE bajo las siguientes condiciones: activación a 95°C por 10 min; amplificación de 45 ciclos que incluye una desnaturalización a 95°C por 10seg, alineamiento a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 10; la curva de disociación fue generada en 1 ciclo de 95°C por 1 min, 40°C por 2 min y 95°C continuo; y el enfriamiento a 40°C por 30 seg.

Las diferencias en los niveles de expresión del mensajero de cortactina se determinaron cuantificando por el método $\Delta\Delta CT$, el cual se basa en la comparación directa de los valores de CT (ciclo de umbral de detección).

Primero, el valor de ΔCT para cada muestra se determinó calculando la diferencia entre el valor de CT del gen blanco y el valor de CT del gen constitutivo.

$$\begin{aligned}\Delta CT (\text{Muestra}) &= CT \text{ del gen blanco} - CT \text{ del gen constitutivo} \\ \Delta CT (\text{Calibrador}) &= CT \text{ del gen blanco} - CT \text{ del gen constitutivo}\end{aligned}$$

Como muestra se consideraron los valores de CT del gen de cortactina de las líneas celulares leucémicas y como calibrador, los valores de CT del gen de cortactina de las células CD34-CD19+.

Luego, se determinó el valor $\Delta\Delta CT$ para cada muestra restando el valor de ΔCT de las líneas celulares leucémicas del valor ΔCT de las células CD34-CD19+.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Muestra}) - \Delta CT (\text{Calibrador})$$

El nivel normalizado de la expresión del gen blanco se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de expresión normalizado de una muestra del gen blanco} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Citometría de flujo

Las células mononucleares de SCU fueron teñidas con ficoeritrina-cianina 5 (PECy5) anti-CD34 humano (1:100) y ficoeritrina (PE) anti-CD19 humano (1:100) o aloficocianina con enlaces cruzados (APC) anti-CD19 humano (1:100) en PBS con 3% SFB para identificar la población control CD34⁻ CD19⁺. Adicionalmente, para evaluar la expresión de distintas proteínas de superficie se realizaron las tinciones tanto en las células mononucleares como en las

líneas celulares Nalm-6 y REH con los anticuerpos APC Anti-CD62L humano (1:50), PE Anti-CD162 humano (1:50), APC Anti-CD184 humano (1:50), APC Anti-CD29 humano (1:50) o PE Anti-CD49d humano (1:50) en PBS con 3% SFB por 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizó un lavado con 1 ml de PBS 3% SFB a 1500 rpm. Para evaluar la expresión de cortactina, después de la tinción extracelular se llevó a cabo una tinción intracelular. Las células fueron permeabilizadas con Cytotfix por 20 min a 4°C y lavadas con 1 ml de Permwash, se bloqueó intracelularmente con la inmunoglobulina inespecífica comercial TruStain FcX Humana por 20 min y se realizó un lavado con 1 ml de Permwash. La tinción con el anticuerpo monoclonal anti-cortactina AF488 (1:50) se llevó a cabo por 30 min y posteriormente se lavó con 1 ml de Permwash. Las células fueron analizadas en citómetro FACSCanto (BD Bioscience) y los resultados fueron analizados mediante el software FlowJo v10.0.

Lisados celulares y estímulos

Para analizar los niveles de proteínas totales, 30 millones de células Nalm-6 y REH fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y lisadas con 100 µl del buffer de Mg^{2+} que contenía Complete 1x para inhibir proteasas y phosphoSTOP 1x para inhibir fosfatasa. Las células fueron sonicadas utilizando un sonicador VCX130 (Vibra-cell) por 3 ciclos de un pulso de 10 segundos a una amplitud de 40% y 10 segundos de descanso. Se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la concentración de proteína fue determinada utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregó buffer Laemmli 5x a los lisados y se incubaron a 96°C por 5 min.

Para la estimulación con CXCL12, las células REH fueron lavadas 3 veces con buffer HEPES y fueron incubadas con CXCL12 (100ng/ml) a 37°C. Una vez

transcurridos 5, 10 y 15 min se transfirieron a hielo y fueron lisadas como se describió previamente.

Inmunoprecipitación

50 millones de células fueron resuspendidas en 1.5 ml de buffer de lisis de IP e incubados por 30 min a 4°C, se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se preclareó incubando con 30 µl de perlas de sefarosa por 30 minutos a 4°C. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 1 mg de la muestra preclareada fue incubada con 30 µl de perlas de sefarosa y 1.5 µg de anticuerpo anti-cortactina o el control de isotipo a 4°C toda la noche. Se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante, las perlas fueron lavadas 5 veces con 1 ml de buffer de lisis sinComplete y PhosphoSTOP por centrifugación 5 min a 5,000 rpm a 4°C. Se eluyeron las perlas con Laemmli 3X a 96°C por 5 min y se analizó por ensayos de western blot.

Western Blot

Los lisados fueron separados por SDS-PAGE al 8% durante 2 horas a 100V y transferida a una membrana de nitrocelulosa durante 1.5 horas a 220mA. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con buffer tris salino con Tween (TBS-T) y albumina de suero bovino (BSA) al 5% por 2 horas a temperatura ambiente y después se incubaron a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario, anti-tirosinas fosforiladas (clona 4G10, 1:1000) o el sobrenadante de hibridoma anti-cortactina (clona, 289H10, 1:10) diluidos en TBS-T y BSA al 5%. Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-T 3 veces por 5 minutos y se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), por 2 horas. Después de 3 lavados de 5 minutos con TBS-T las membranas fueron

reveladas con los reactivos SuperSignal® West Pico o Femto Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, y analizados a través del equipo ChemiDoc (Bio-rad).

Todas las muestras fueron cuantificadas y normalizadas de acuerdo a los niveles de tubulina.usando el Software Image J.

Ensayos de trans migración

Filtros transwell de policarbonato con un tamaño de poro de 8µm o 5 µm fueron utilizados para la trans migración de las células Nalm-6 y REH respectivamente. Los filtros fueron incubados con 100µl de Attachment Factor (AF) por 40 minutos, posteriormente este fue retirado y los filtros secado. Se colocaron 60 mil células HUVEC en cada Transwell en un volumen de 100 µl de medio EBM-2 y en la parte inferior se colocaron 600 µl del medio, las células se incubaron por 2 días a 37°C para la formación de la monocapa.

Para el ensayo de trans migración se retiró el medio de la parte superior e inferior de la cámara y se colocaron 600 µl de medio nuevo en la parte inferior con o sin CXCL12 (100 ng/ml). En la parte superior se colocaron 150 mil células Nalm-6 o REH en un volumen de 100 µl y se dejaron incubar por 4.5 horas. El medio de la parte inferior y superior de la cámara se recolectó y las células de la parte inferior se contaron mediante una cámara de Neubauer. Se realizó un lavado con 1ml de PBS 3% SFB y las células de la parte superior e inferior se tiñeron para CD29, CD49d y posteriormente para cortactina como se describió previamente y fueron analizados por citometría de flujo.

Microscopía intravital de cremaster en un modelo murino de xenotrasplante

Células de la médula ósea de ratones C57BL/6 de 8 a 12 semanas fueron obtenidas mediante lavado de fémur. El fémur fue extraído, las epífisis fueron cortadas para exponer la médula ósea y una aguja con una jeringa de 5ml que contenía PBS fue insertada en la parte superior. El PBS fue inyectado y las células se recolectaron en un tubo falcón. Las células fueron lavadas 2 veces con el buffer HEPES a 1500 rpm por 5 min. Las células fueron resuspendidas en 15 ml de medio RPMI el cual contenía 150 µl de colorante Hoechst 33342 e incubadas por 90 minutos a 37°C. Las células teñidas fueron lavadas por buffer HEPES seguido por centrifugación 1500 rpm y resuspendidas en 100 µl de PBS estéril.

Ratones C57BL/6 de 8 a 12 semanas fueron estimulados con una inyección intraescrotal de CXCL12 (500ng/ml), inmediatamente fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina/xilacina y se procedió a realizar la cateterización de la arteria carótida. Se realizó una incisión longitudinal a la altura del esternón, se diseccionó hasta llegar a la carótida y el flujo sanguíneo fue cerrado en un tramo. En la parte inferior se colocó un nudo con hilo de sutura y en la parte superior se colocó una pinza, posteriormente una pequeña incisión se realizó en la carótida por la cual se introdujo un catéter P10. Una vez que el catéter fue introducido, la pinza fue removida para permitir el flujo sanguíneo.

Se procedió a realizar la operación del músculo cremaster (Fig 7) en la cual el ratón fue colocado boca arriba con las patas extendidas a los lados en una plataforma de acrílico, se ejerció una ligera presión para descender a los testículos desde el interior de la cavidad peritoneal hacia el escroto. Una incisión inicial se realizó en el escroto y el testículo derecho fue empujado fuera de la cavidad corporal, tan pronto el tejido fue expuesto se perfundió con PBS precalentado a 37°C. Se realizó un corte a lo largo del cremaster para posteriormente extenderlo y fijarlo a la plataforma sobre un cubreobjeto. La

plataforma fue montada en un Zeiss Axioscope.A1 con un objetivo 40x en inmersión de PBS y un ocular 10x. Las células marcadas fueron transferidas mediante el catéter utilizando una jeringa 30G, posteriormente se localizó un vaso sanguíneo óptimo (ancho entre 20-40 μm) y comienza a capturarse un video.

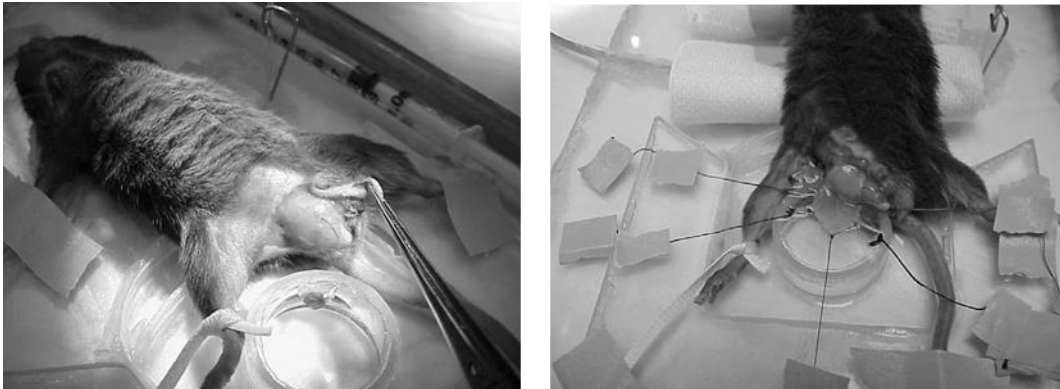


Figura 7. Preparación del musculo cremaster para microscopia intravital. Se muestra la incisión realizada en el escroto para exponer los testículos (lado izquierdo). Posteriormente se debe realizar un corte a lo largo del cremaster, lo cual permitirá exponerlo y fijarlo en la plataforma. (Gavins and Chatterjee 2004).

Los videos serán analizados para los parámetros de velocidad de las células, número de células adheridas, flujo y número de células transmigradas.

La velocidad de las células es calculada al dividir la distancia recorrida por una célula entre el tiempo que le toma recorrerlo ($\mu\text{m}/\text{s}$). El flujo de las células es calculado como el número de células que pasan a través de un punto fijo a lo largo del vaso sanguíneo en un tiempo fijo y es expresado como número de células por minuto. La adhesión de las células es medida como el número de células estáticas por al menos 30 segundos en la pared de un vaso sanguíneo de 100 μm de largo. El número de células transmigradas es calculado como el número de células en un área de 100x50 μm^2 en ambos lados de un vaso sanguíneo de 100 μm de largo.

RESULTADOS

Las líneas celulares leucémicas PreB humanas sobrepresan cortactina a nivel de mensajero y proteína

Con la finalidad de conocer si las líneas de LLA-PreB NALM-6 y REH muestran altos niveles de cortactina, se evaluó el nivel del mensajero mediante RT-qPCR (Fig 8), el nivel de proteína mediante citometría de flujo (Fig 9) y se comparó con células de sangre cordón umbilical (SCU) CD34⁻CD19⁺.

A nivel de mensajero en un experimento realizado por triplicado ambas líneas celulares muestran valores $\Delta\Delta C_t$ mayores en comparación a las células control (SCU vs Nalm-6: 18.765, SCU vs Reh: 14.621300) (Fig 8).

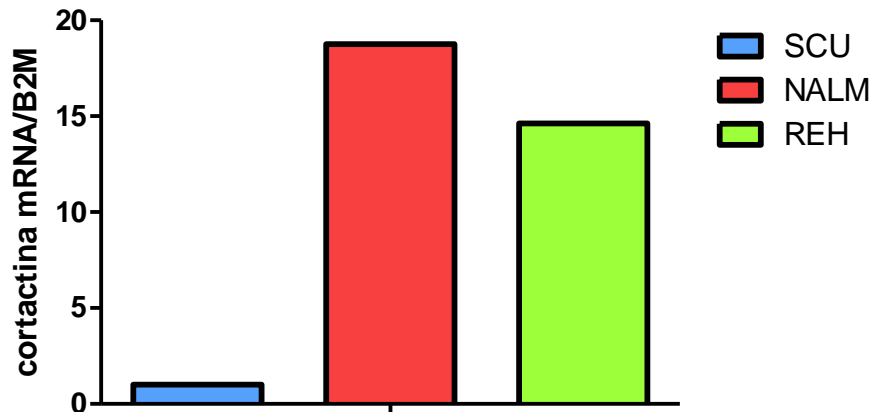


Figura 8. Evaluación de la expresión de cortactina a nivel de mensajero mediante RT-qPCR. Los niveles del mRNA de cortactina de las células CD34⁻CD19⁺, Nalm-6 y REH se evaluaron y normalizaron a la expresión de β -2 microglobulina.

Los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de cortactina para indicar la concentración de proteína por citometría de flujo en ambas líneas celulares en comparación con los valores de las células control muestran una diferencia significativa (IMF Nalm-6 vs SCU: 11710 ± 11.00 vs 1951 ± 293.0 , $n=3$, $P<0.05$; IMF REH vs SCU: 12120 ± 65.50 vs 1951 ± 293.0 , $n=3$, $P<0.05$)

(Fig 9). Sin embargo, no es así entre las líneas celulares (IMF Nalm-6 vs REH: 11750 ± 58.00 vs 12100 ± 64.50 , $n=3$).

Estos resultados demuestran que existe un incremento de cortactina en las líneas celulares NALM-6 y REH tanto a nivel de mensajero como de proteína en comparación con las células control.

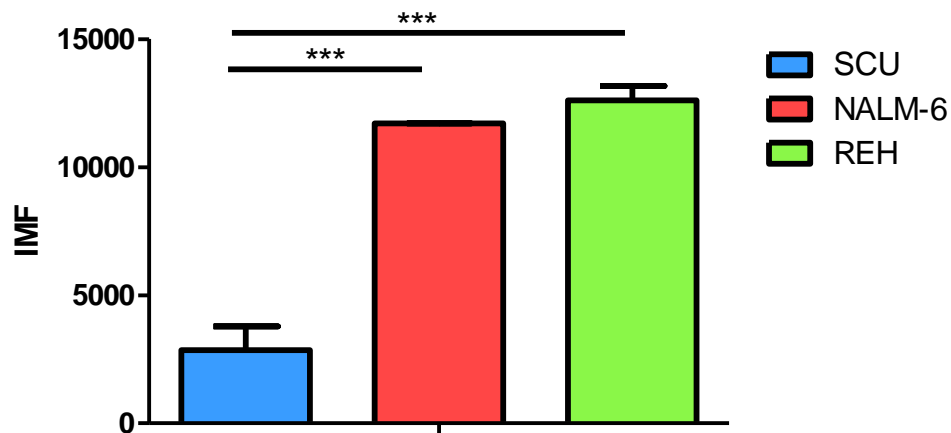


Figura 9. Evaluación de la expresión de cortactina a nivel de proteína mediante citometría de flujo. Valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de cortactina de células $CD34^+CD19^+$ de SCU, Nalm-6 y REH. $N=3$.

Las líneas celulares leucémicas preB humanas sobreexpresan la isoforma de 60 kDa de cortactina

Posteriormente mediante western blot se evaluaron las isoformas presentes en las líneas celulares (Fig 10). La línea celular Caco-2 fue utilizada como control ya que se sabe que expresa la forma WT de 80 kDa de la proteína. Ambas líneas celulares únicamente presentan la variante de *splicing 2* de 60 kDa, sin embargo desconocemos que implicación tiene la presencia de esta forma de la proteína.

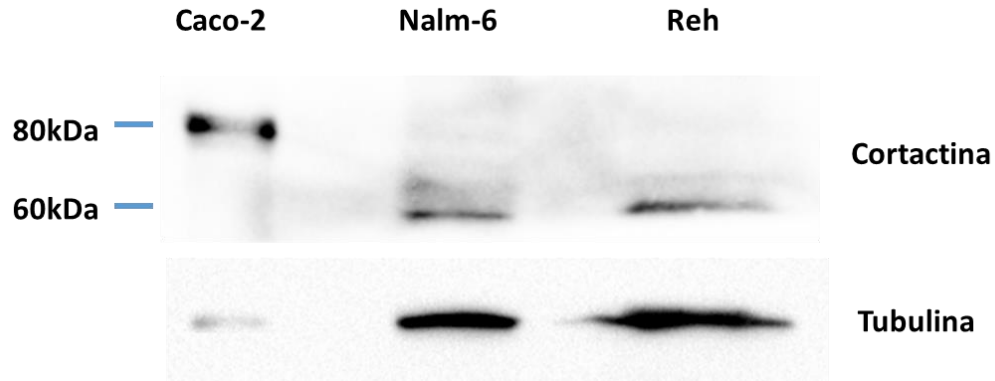


Figura 10. Evaluación de la isoforma de cortactina presente en las diferentes líneas celulares mediante western blot. La línea celular epitelial Caco-2 presenta la forma WT de la proteína de 80 kDa, las líneas celulares de LLA-preB presentan la SV de 60 kDa. Tubulina fue utilizada como control de carga para las líneas celulares Nalm-6 y Reh.

Evaluación de moléculas implicadas en el proceso de adhesión y trans migración

Dado que la adhesión y trans migración de los linfocitos depende de distintas proteínas de superficie que no están bien caracterizadas, en el caso de los linfocitos B leucémicos, era importante evaluar dichas proteínas ya que podrían conferirle una ventaja adicional a las células. Mediante citometría de flujo se evaluaron L-selectina, PSGL1, CXCR4 y las subunidades CD29 y CD49d que forman a la integrina VLA-4 en las líneas celulares Nalm-6 y REH y estas fueron comparadas con las células CD34⁻CD19⁺ (Fig 11).

En el caso de las proteínas encargadas de mediar el proceso de rolling, los valores de IMF de PSGL1 de ambas líneas celulares son estadísticamente menores que los de las células control (IMF Nalm-6 vs SCU: 195.5 ± 3.500 vs 334.5 ± 11.50 , $n=3$, $P<0.05$; REH vs SCU: 264.5 ± 5.500 vs 334.5 ± 11.50 , $n=3$, $P<0.05$; Nalm-6 vs REH: 195.5 ± 3.500 vs 264.5 ± 5.500 , $n=3$, $P<0.05$) mientras que los valores para L-selectina muestran un incremento significativo en ambas líneas celulares (IMF Nalm-6 vs SCU: 6472 ± 28.50 vs 130.5 ± 37.50 , $n=3$, $P<0.05$; REH vs SCU: 4961 ± 293.0 vs 130.5 ± 37.50 , $n=3$, $P<0.05$; Nalm-6 vs REH: 6472 ± 28.50 vs 4961 ± 293.0 , $n=3$, $P<0.05$).

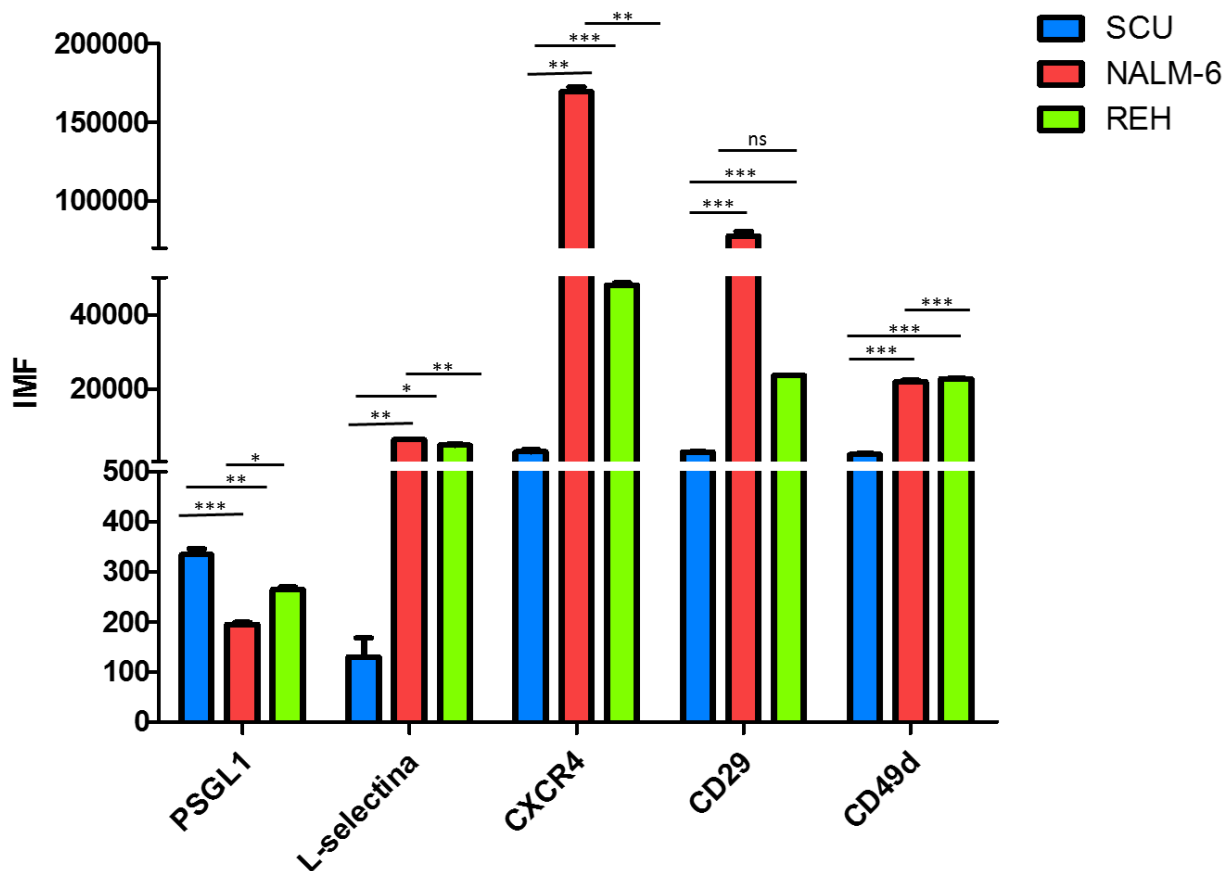


Figura 11. Evaluación de algunas moléculas implicadas en la cascada de trans migración. Valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de PSGL1, L-selectina, CXCR4 y las subunidades CD29, CD49d que forman a la integrina VLA-4 en células CD34⁺CD19⁺ de SCU, Nalm-6 y REH. N=3.

Los valores de IMF en ambas líneas celulares en comparación con los valores de las células control y entre las dos líneas celulares muestran una diferencia significativa para el receptor CXCR4 (IMF Nalm-6 vs SCU: 169400 ± 3055 vs 3174 ± 602.5 , $n=3$, $P<0.05$; REH vs SCU: 48000 ± 625.5 vs 3174 ± 602.5 , $n=3$, $P<0.05$; Nalm-6 vs REH: 169400 ± 3055 vs 48000 ± 625.5 , $n=3$, $P<0.05$) y las subunidades de VLA-4 CD29 (IMF Nalm-6 vs SCU: 77600 ± 2964 vs 3073 ± 122.5 , $n=3$, $P<0.05$; REH vs SCU: 23720 ± 44.00 vs 3073 ± 122.5 , $n=3$, $P<0.05$; Nalm-6 vs REH: 77600 ± 2964 vs 23720 ± 44.00 $n=3$) y CD49d, excepto entre las líneas celulares en esta última (IMF Nalm-6 vs SCU: 12890 ± 9570 vs 2446 ± 266.5 , $n=3$, $P<0.05$; REH vs SCU: 22850 ± 125.0 vs $2446 \pm$

266.5, n=3, P<0.05; Nalm-6 vs REH: 12890 ± 9570 vs 22850 ± 125.0, n=3, P<0.05). Estos resultados nos indican que las líneas celulares Nalm-6 y REH tienen una disminución en la expresión de PSGL1 en comparación con las células control pero un incremento en la expresión de L-selectina, CXCR4 y la integrina VLA-4.

Evaluación de la capacidad de transmigración de las líneas celulares Nalm-6 y Reh

Ya que en incremento en la expresión de cortactina se ha asociado a una alta capacidad de migración e invasión (Luo, Shen et al. 2006, Xie, Li et al. 2010, Martini, Gattazzo et al. 2017), decidimos evaluar la migración transendotelial de las líneas celulares y las células control mediante ensayos de cámaras transwell utilizando una monocapa de células HUVEC y CXCL12 (100ng/ml) como quimioatrayente en la parte inferior de la cámara.

Las células que migraron fueron recolectadas y contadas (Fig 12), no se observó una diferencia significativa en la capacidad de transmigración de la línea celular Nalm-6 en comparación con la REH (Nalm-6 vs REH: 3667 ± 1075 vs 5056 ± 1134, n=3). Sin embargo, si existe una diferencia significativa en ambas líneas celulares en comparación con las células control (IMF Nalm-6 vs SCU: 3778 ± 720.2 vs 663.0 ± 122.0, n=3, P<0.05; REH vs SCU: 4844 ± 786.9 vs 663.0 ± 122.0, n=3, P<0.05).

Adicionalmente los niveles de cortactina y las subunidades CD29 y CD49d de las células que migraron a la parte inferior de la cámara (bottom) y de aquellas que no migraron y permanecieron en la parte superior (top) fueron evaluados mediante citometría de flujo (Fig 13 y 14). En ambas líneas celulares y en las células control la expresión de cortactina incrementó en las células que migraron (IMF Nalm-6_{TOP} vs Nalm-6_{BOTTOM}: 4169 ± 529.2 vs 20290 ± 2232, n=4, P<0.05; REH_{TOP} vs REH_{BOTTOM}: 2552 ± 346.0 vs 7191 ± 1101, n=4, P<0.05) (Fig 13). En las líneas celulares también se observa un incremento de la expresión de CD29 en las células que migraron (IMF Nalm-6_{TOP} vs Nalm-

6_{BOTTOM}: 27590 ± 257.6 vs 118900 ± 18290, n=4, P<0.05; REH_{TOP} vs REH_{BOTTOM}: 12920 ± 490.8 vs 24060 ± 1601, n=4, P<0.05) (Fig 14 a, c). Por el contrario, la expresión de CD49d disminuyó en las células que migraron (IMF Nalm-6_{TOP} vs Nalm-6_{BOTTOM}: 12060 ± 138.7 vs 1390 ± 223.4, n=4, P<0.05; REH_{TOP} vs REH_{BOTTOM}: 8787 ± 179.5 vs 1838 ± 487.0, n=4, P<0.05) (Fig 14 b, d).

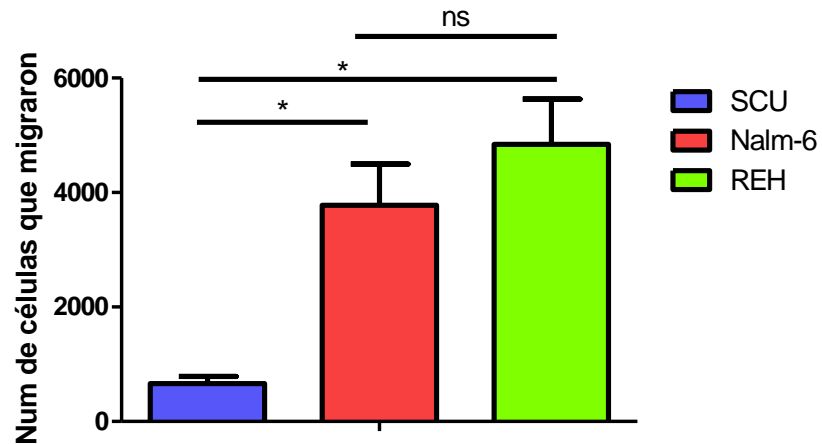


Figura 12. Evaluación de la capacidad de trans migración de las células frente a un estímulo de CXCL12. La capacidad de trans migración de las células Nalm-6 y REH a través de una monocapa de células HUVEC fue evaluada en respuesta a CXCL12 (100ng/ml) después de 4 horas mediante ensayos con cámaras Transwell.

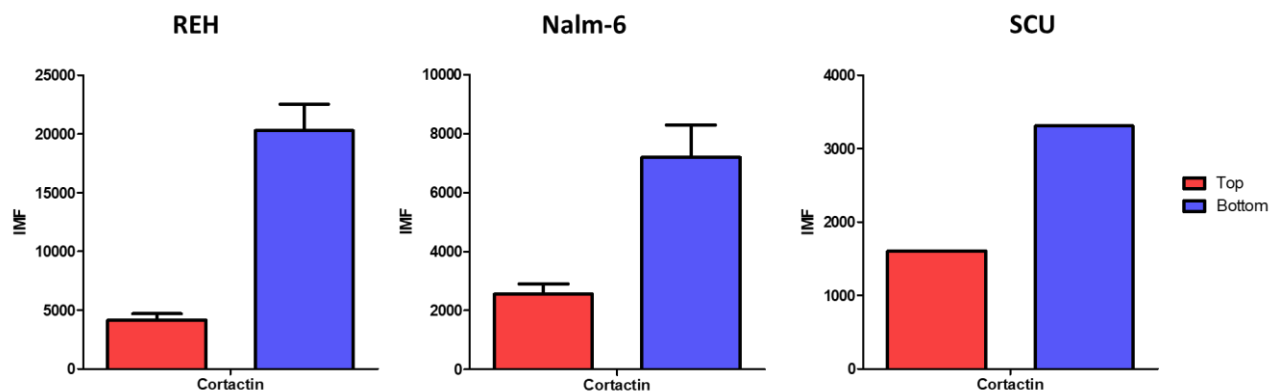


Figura 13. Niveles de expresión de cortactina después de un ensayo de trans migración bajo estímulo de CXCL12. Valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de cortactina de las células que lograron trans migrar (Bottom) en comparación con aquellas que no trans migraron (Top) en las células CD34-CD19+, Nalm-6 y REH. n=4

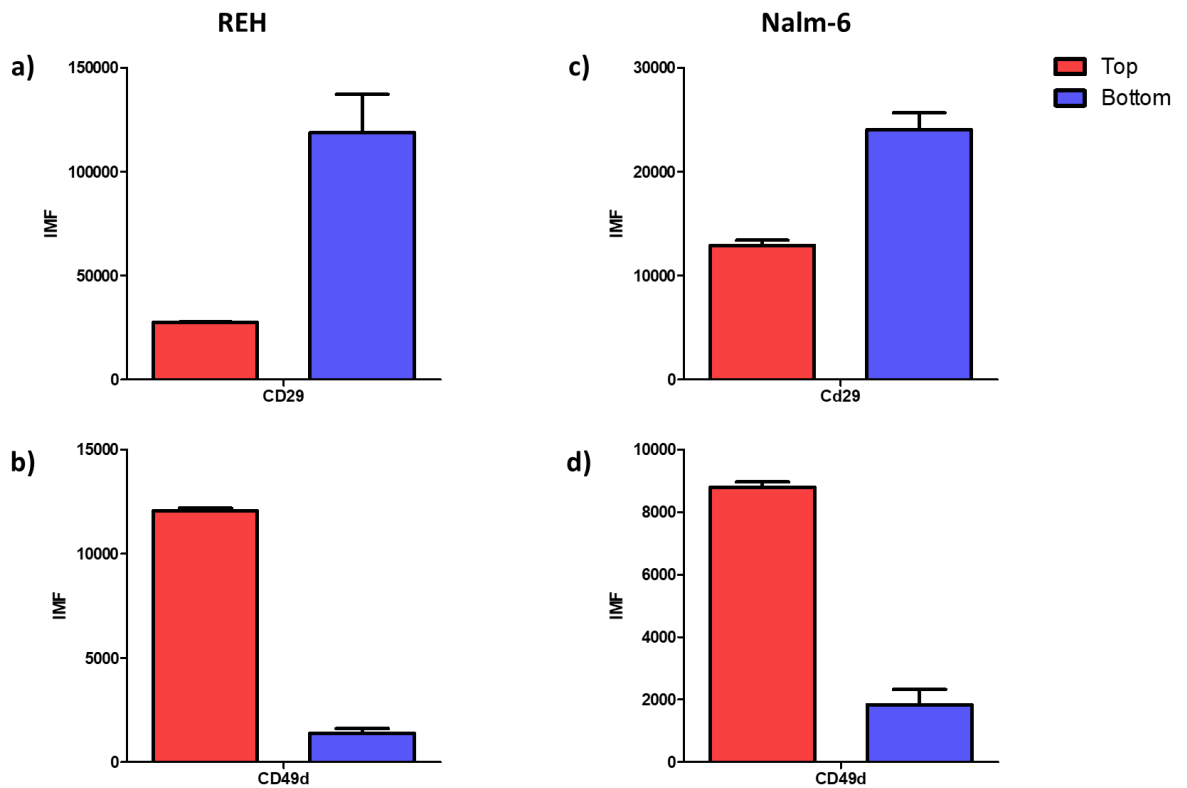


Figura 14. Niveles de expresión de CD49d y CD29 después de un ensayo de trans migración bajo estímulo de CXCL12. Valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD49d y CD29 de las células que lograron trans migrar (Bottom) en comparación con aquellas que no trans migraron (Top) en las líneas celulares Nalm-6 (a, b) y REH (c, d). n=4

Dado el papel de CXCL12 en la regulación de cortactina, evaluamos el nivel de fosforilación de cortactina tras estimulación con CXCL12 a los 5, 10 y 15 minutos, inmunoprecipitando la línea celular leucémica REH mediante WB utilizando un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (Fig 15). Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia en los niveles de fosforilación.

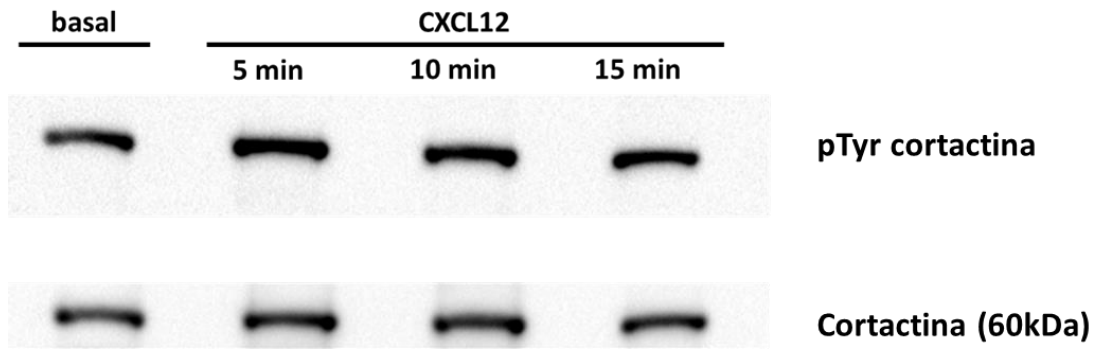


Figura 15. Niveles de fosforilación de cortactina bajo un estímulo de CXCL12. Los niveles de las tirosinas fosforiladas fueron evaluados en condiciones basales y bajo un estímulo de CXCL12 (100ng/ml) a 5, 10 y 15 min en la línea celular REH.

Modelo para investigar el proceso de trans migración de los precursores leucémicos de B *in vivo*

Con la finalidad de observar *in vivo* el mecanismo de trans migración de los precursores leucémicos de B e investigar si la alta expresión de cortactina contribuye a la extravasación de estas células se planteó una metodología de microscopia intravital aplicada a un modelo murino de xenotrasplante. El modelo fue validado mediante el trasplante de células mononucleares de un ratón C57BL/6 marcadas con Hoechst 33342 a otro ratón C57BL/6, donde las células transplantadas logran llegar al cremaster e interactuar con el endotelio de las venulas (Fig 16). Sin embargo cuando esta misma metodología se llevó a cabo con las líneas celulares Nalm-6 y REH, no fue posible observar a las células en el cremaster ya que solo muy pocas llegaban al sitio (Fig17). Además, estas células que llegaban y que se pudieron observar parecían obstruir los capilares sanguíneos ya que la velocidad del flujo se veía drásticamente disminuida en las zonas en la que se encontraban las células leucémicas (Fig 18).

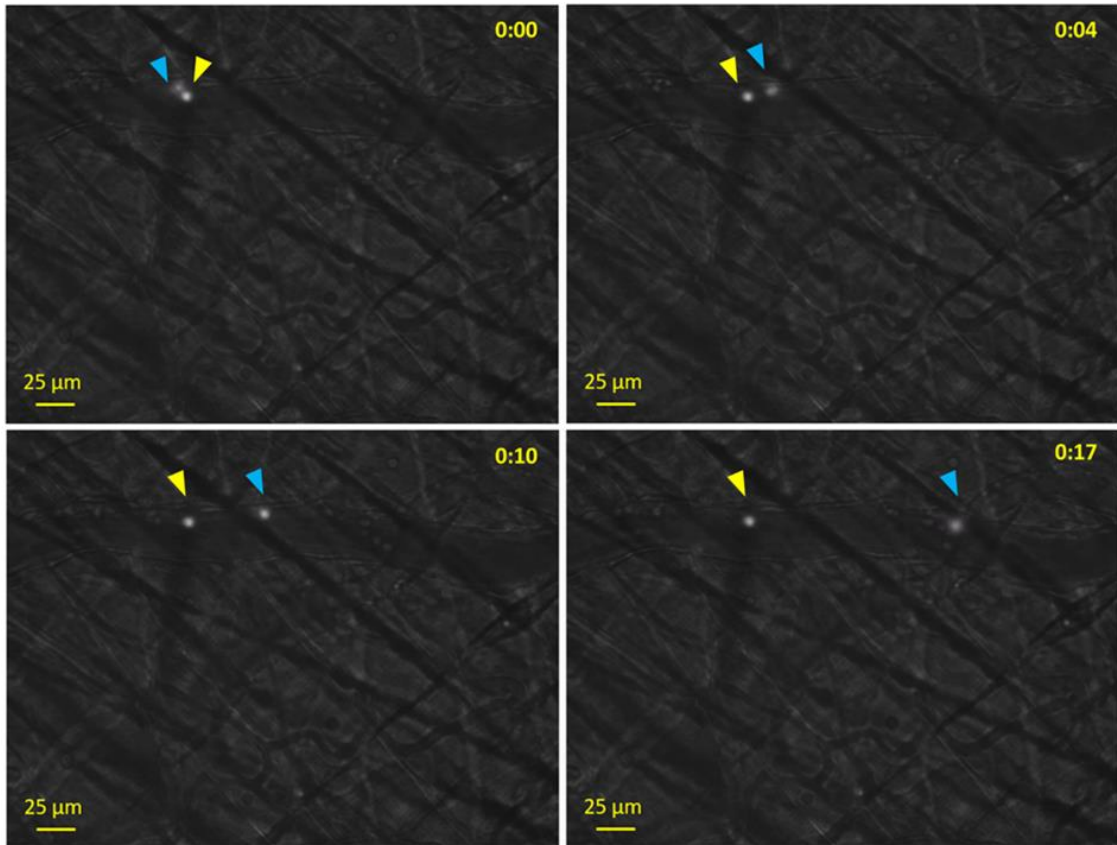


Figura 16. Las células de ratón trasplantadas logran observarse en el cremaster e interactúan con el endotelio mediante microscopía intravital. Fotografías de un video de microscopía intravital de cremaster de células mononucleares de un ratón C57BL/6 marcadas con Hoechst 33342 inyectadas en otro ratón C57BL/6. La flecha amarilla señala a una célula que se encuentra arrestada y la flecha azul señala a una célula que se encuentra haciendo *rolling*. N=2

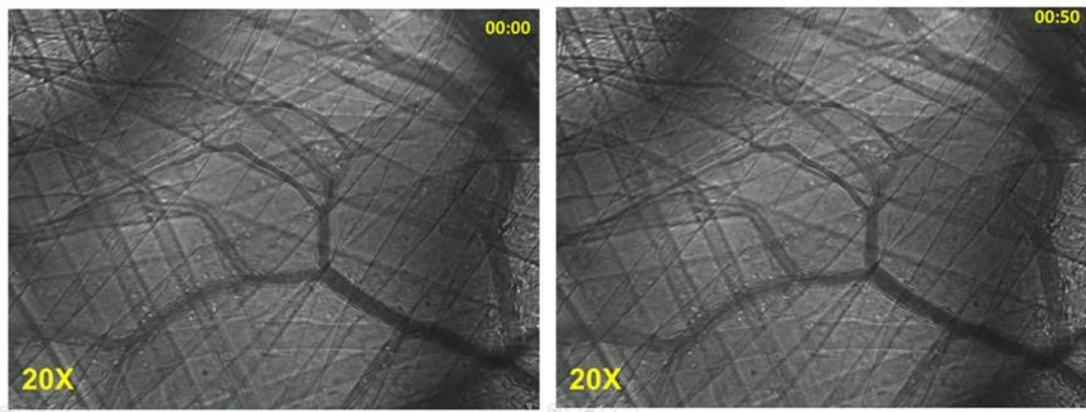


Figura 17. Las células REH no logran observarse en el cremaster. Fotografías de un video de microscopía intravital de cremaster de células REH marcadas con Hoechst 33342 inyectadas en un ratón C57BL/6. N=4

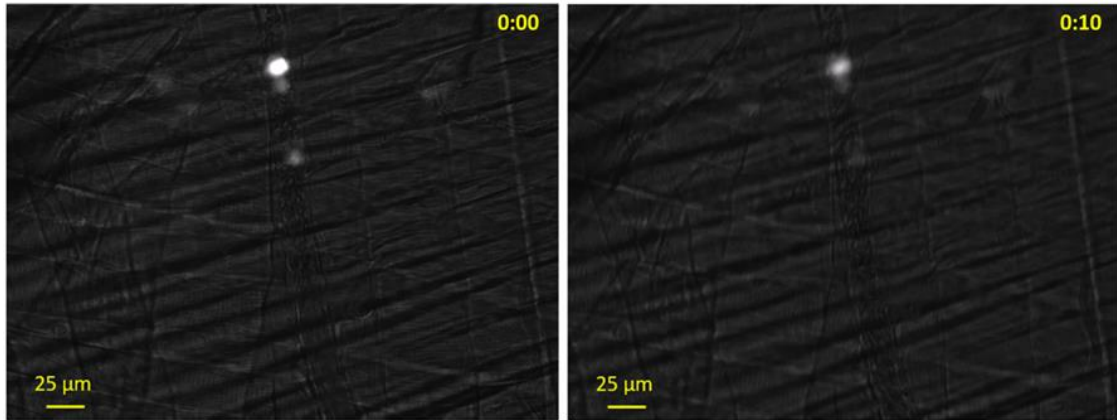


Figura 18. Las células REH que lograron observarse obstruyen los capilares sanguíneos. Fotografías de un video de microscopia intravital de cremaster de células REH marcadas con Hoechst 33342 inyectadas en un ratón C57BL/6. N=4

Discusión

En este trabajo demostramos que existe un incremento de cortactina tanto a nivel de proteína como de mensajero en dos líneas celulares de LLA-preB, NALM-6 y REH, en comparación con las células control.

La expresión de cortactina en células hematopoyéticas fue descrita recientemente y a diferencia de la mayoría de las células que expresan la forma WT de la proteína de 80 kDa, las células T, B, NK y monocitos expresan la forma de 70 kDa (Gattazzo, Martini et al. 2014). A pesar de que no fue posible identificar la forma presente de la proteína específicamente en la población CD34-CD19+, las líneas leucémicas Nalm-6 y REH presentan la SV2 de 60 kDa. Pese a que se ha reportado en fibroblastos que la SV2 tiene una menor capacidad de migración que la forma WT de la proteína (van Rossum, de Graaf et al. 2003), Weed y colaboradores demostraron que el repetido 4, que se encuentra en todas las formas de la proteína, es el repetido necesario para la unión estable de F-actina (Weed, Karginov et al. 2000).

La cascada de extravasación y las moléculas implicadas en esta, no han sido bien descritas en los linfocitos B. Shetty y colaboradores demostraron *in vitro*, mediante ensayos de adhesión con flujo utilizando una monocapa de células endoteliales de sinusoide hepático, que las células B eran capturadas firmemente sin necesidad de un *rolling* previo y que esta adhesión era regulada por VCAM-1. Al evaluar PGL1 y L-selectina, moléculas implicadas en el proceso de rolling, observamos que existe una baja expresión de PSGL1 en las líneas celulares NALM-6 y REH en comparación con las células control, lo cual coincide con lo reportado para células de pacientes con LLA de precursores de células B (Nonomura, Kikuchi et al. 2008). En el caso de L-selectina se observa una alta expresión en las líneas celulares leucémicas, esta selectina ha sido también descrita en células B de LLC y mediante ensayos funcionales se ha observado que es la proteína encargada de la captura inicial en los vasos sanguíneos especializados que permiten la entrada a los nódulos linfáticos (Lafouresse, Bellard et al. 2015). Estos datos apoyan

la idea de que las células LLA-preB llevan a cabo un proceso de *rolling* y sugieren que está mediado por L-selectina.

Al evaluar el receptor CXCR4, ambas líneas celulares leucémicas muestran altos niveles, lo cual correlaciona con los altos niveles de proteína en pacientes pediátricos de LLA-preB con recaída (van den Berk, van der Veer et al. 2014).

La alta expresión de las subunidades de VLA-4 en ambas líneas celulares leucémicas correlaciona con los altos niveles de mRNA reportados en pacientes de LLA-preB, los cuales de acuerdo a los parámetros clínicos están asociados a un mal pronóstico (Shalapour, Hof et al. 2011, Hsieh, Gang et al. 2013). La alta expresión de esta integrina no se ha asociado directamente con un incremento en la capacidad de migración de las células leucémicas, sin embargo se ha demostrado *in vitro* su importancia mediante cocultivos de células de LLA-preB y células estromales (Mudry, Fortney et al. 2000). En estos ensayos, las células leucémicas son capaces de proliferar incluso en presencia de un agente terapéutico únicamente cuando están en contacto directo con las células estromales y dicho contacto es mediado por la unión de VLA-4 y VCAM-1. Los altos niveles del receptor CXCR4 y las subunidades de VLA-4 en las líneas celulares NALM-6 y REH muestran patrones similares al de los pacientes y sugieren una ventaja al favorecer su supervivencia.

Al evaluar la capacidad de transmigración *in vitro* de las líneas celulares leucémicas, no observamos una diferencia significativa entre estas, probablemente debido a que tampoco existe una diferencia significativa en la expresión de cortactina entre las líneas celulares. Sin embargo, el papel que juegan los niveles de cortactina en la migración de las células de LLA-preB se han demostrado previamente en nuestro laboratorio con la línea celular RS4:11 la cual tiene una menor expresión de cortactina y una menor tasa de transmigración en comparación con las células REH. No obstante, la relación directa entre la expresión de cortactina y la capacidad de migración debe ser demostrada mediante un *knockdown* de la proteína en las líneas de LLA-preB.

Los niveles de IMF tanto de cortactina como de CD29, la cadena β de la integrina VLA-4, de las células que migraron son mayores en comparación con aquellas que no migraron. Dado que en condiciones basales se observa una población homogénea para la expresión de estas proteínas, la diferencia de IMF no es producto de la migración de una población con una alta expresión de alguna de la proteína sino probablemente de una población que es capaz de la rápida síntesis *de novo* de estas proteínas. El incremento en la expresión de cortactina podría deberse a que la proteína se requiere de manera abundante en proceso completo de trans migración. En líneas celulares de cáncer de ovario el nivel del mensajero de la integrina β 1 se ha visto incrementado cuando estas son estimuladas con CXCL12 por 3 horas (Jiang, Wu et al. 2007) por lo que el incremento que se observa en la expresión de CD29 tras la migración puede ser un efecto directo de CXCL12.

La cadena α de las integrinas define el ligando, en el caso de VLA-4, α 4 (CD49d) permite la unión a VCAM-1 y dicha unión media la adhesión firme de las células al endotelio. Una vez que estas son adheridas y el proceso de trans migración ocurre, debe existir un reciclamiento de las integrinas, el cual podría ser responsable de su disminución (Ramsay, Keppler et al. 2007). Los niveles de fosforilación de tirosinas en cortactina fueron evaluados en la línea celular REH bajo distintos estímulos de CXCL12, sin embargo no observamos ninguna diferencia con el nivel de fosforilación basal. Esto sugiere que cortactina se encuentra constitutivamente fosforilada en las células leucémicas REH, lo cual concuerda con lo ya reportado en células B de LLC por Martini y colaboradores. Dado que este nivel de fosforilación en las células B normales en condiciones basales es bajo e incrementa con un estímulo de CXCL12 y estas fosforilaciones favorecen la migración de las células así como la liberación de MM-9 (Martini, Gattazzo et al. 2017), una fosforilación constitutiva en las células de LLA-preB generaría una ventaja en estos procesos.

Otro de los objetivos de este proyecto fue evaluar *in vivo* la trans migración de las células leucémicas para lo cual se planteó un modelo de microscopia

intravital. Sin embargo, las células de LLA no lograron observarse en el cremaster. Su ausencia no puede explicarse por una aberración en la interacción del endotelio murino y las células leucémicas ya que diversos modelos murinos de xenotrasplante han sido utilizados para representar la enfermedad (Meyer and Debatin 2011, Goyama, Wunderlich et al. 2015).

A pesar de que las células de LLA han demostrado una capacidad de migración en respuesta a CXCL12 *in vitro*, es probable que *in vivo* este estímulo no sea suficiente para atraer a las células al cremaster. Los primeros sitios donde se localizan las células leucémicas en los modelos murinos de xenotrasplantes son la médula ósea y el bazo, sitios de hematopoyesis y órganos linfoides secundarios (Baersch, Mollers et al. 1997, Lock, Liem et al. 2002, Meyer, Eckhoff et al. 2011). Dado que estos sitios cuentan con los estímulos adecuados y el microambiente necesario para reclutar a las células B, estos podrían ser los lugares a los cuales se dirigen las células leucémicas inyectadas. Esta idea se ve apoyada por un estudio reciente donde se ha logrado evaluar la migración de células de LLC a nódulos linfáticos y su interacción con el endotelio en un modelo murino de xenotrasplante (Lafouresse, Bellard et al. 2015). Por lo que la MIV de nódulo linfático podría ser una alternativa para evaluar el proceso de migración de las células leucémicas.

En conjunto, mis resultados con lo ya reportado en la literatura nos sugieren que las células B, llevan a cabo un proceso de transmigración el cual requiere de pasos previos en los que participan L-selectina en el proceso de rolling, el receptor CXCR4 al cual se une CXCL12 y genera una activación de la integrina VLA-4 que permite el proceso de adhesión firme. Además, la unión CXCL12 a CXCR4 da lugar a un incremento en la fosforilación de cortactina, probablemente por cinasas de la familia Src, favoreciendo el proceso de migración y secreción de metaloproteasas. Sin embargo en líneas celulares de LLA-preB, hemos observado un incremento en los niveles de cortactina y altos niveles de fosforilación de la proteína, los cuales no incrementan tras un

estímulo de CXCL12 (Fig 19). Estas características, probablemente participan en el incremento de la transmigración de las células leucémicas, favoreciendo la infiltración a órganos extramedulares (Fig 19), generando un pronóstico desfavorable para los pacientes. Sin embargo, la importancia de los altos niveles de cortactina aún debe demostrarse *in vivo*.

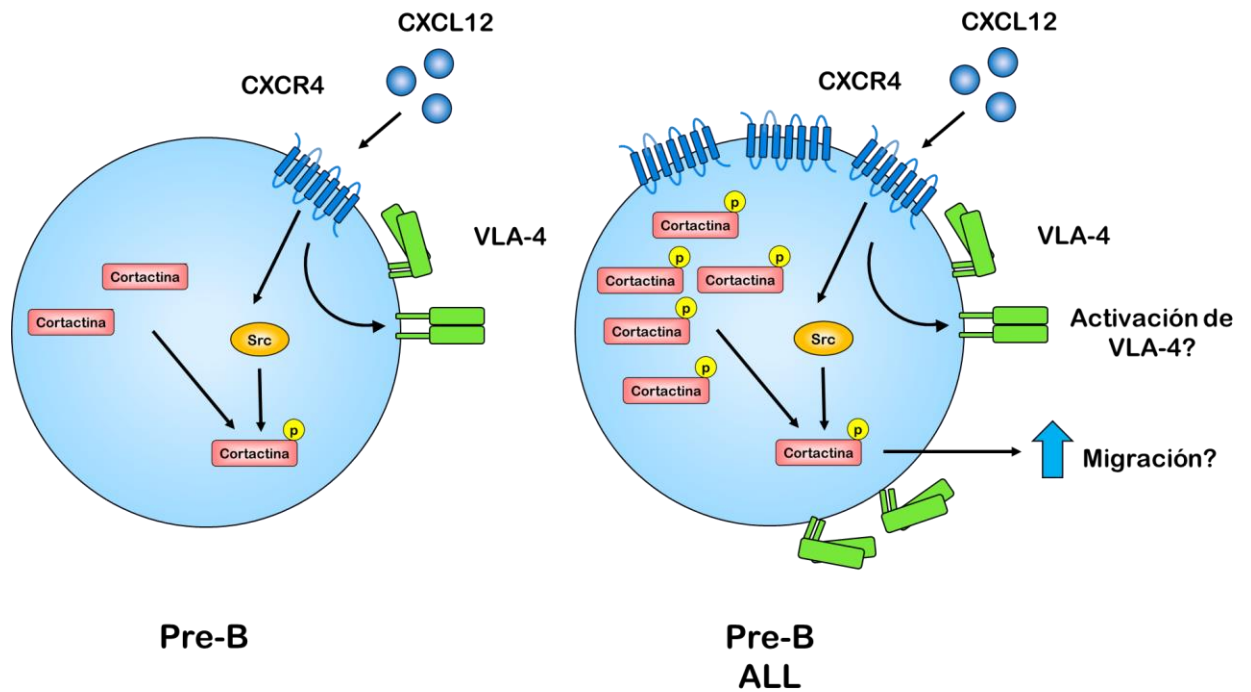


Figura 19. Modelo propuesto del papel que juega cortactina en las células de LLA-preB. En las células preB CXCL12 permite la activación de VLA-4 y la fosforilación en las tirosinas de cortactina (izquierda) para inducir una transmigración regulada. Las células de LLA-preB tienen una alta expresión de VLA-4, CXCR4 y cortactina, esta última presenta altos niveles de tirosinas fosforiladas, los cuales no se ven modificados bajo un estímulo de CXCL12 que sugiere un incremento en la transmigración.

Conclusión

Los altos niveles de cortactina en líneas celulares de LLA de precursores de células B así como su fosforilación constitutiva y los altos niveles de VLA-4 y CXCR4 podrían ser ventajas en el proceso de trans migración. Sin embargo, la metodología de MIV del cremaster tras xenotrasplantes no es un modelo adecuado para estudiar dicho proceso *in vivo*.

Perspectivas

- Realizar un KD lentiviral de cortactina en las líneas celulares de LLA-preB REH y NALM-6.
- Establecer un modelo murino de xenotrasplante para analizar por microscopía intravital la trans migración en nódulos linfáticos.
- Establecer un modelo *in vivo* de la enfermedad y analizar si los altos niveles de cortactina en las líneas de LLA-preB juegan un papel en la infiltración de las células a BM y/o extramedulares.

BIBLIOGRAFÍA

- Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." *J Exp Med* **193**(9): 1105-1112.
- Baersch, G., T. Mollers, A. Hotte, B. Dockhorn-Dworniczak, C. Rube, J. Ritter, H. Jurgens and J. Vormoor (1997). "Good engraftment of B-cell precursor ALL in NOD-SCID mice." *Klin Padiatr* **209**(4): 178-185.
- Balandran, J. C., E. Vadillo, D. Dozal, A. Reyes-Lopez, A. Sandoval-Cabrera, M. D. Laffont-Ortiz, J. L. Prieto-Chavez, A. Vilchis-Ordóñez, H. Quintela-Núñez Del Prado, H. Mayani, J. C. Núñez-Enríquez, J. M. Mejía-Arangure, B. López-Martínez, E. Jiménez-Hernández and R. Pelayo (2016). "Analysis of Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Contents in Childhood Acute Leukemia Bone Marrow." *Arch Med Res* **47**(8): 629-643.
- Berlin-Rufenach, C., F. Otto, M. Mathies, J. Westermann, M. J. Owen, A. Hamann and N. Hogg (1999). "Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice." *J Exp Med* **189**(9): 1467-1478.
- Bhojwani, D., J. J. Yang and C. H. Pui (2015). "Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Pediatr Clin North Am* **62**(1): 47-60.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, L. Shao and Y. W. Chen (2001). "CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration." *J Biol Chem* **276**(10): 7327-7336.
- Boyle, S. N., G. A. Michaud, B. Schweitzer, P. F. Predki and A. J. Koleske (2007). "A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation." *Curr Biol* **17**(5): 445-451.
- Brecher, M. L., V. Weinberg, J. M. Boyett, L. F. Sinks, B. Jones, A. Glicksman, J. F. Holland and A. I. Freeman (1986). "Intermediate dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia resulting in decreased incidence of testicular relapse." *Cancer* **58**(5): 1024-1028.
- Bugyi, B. and M. F. Carrier (2010). "Control of actin filament treadmilling in cell motility." *Annu Rev Biophys* **39**: 449-470.
- Buhrer, C., R. Hartmann, R. Fengler, R. Dopfer, H. Gadner, V. Gerein, U. Gobel, A. Reiter, J. Ritter and G. Henze (1993). "Superior prognosis in combined compared to isolated bone marrow relapses in salvage therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Med Pediatr Oncol* **21**(7): 470-476.
- Burger, J. A., M. Burger and T. J. Kipps (1999). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells." *Blood* **94**(11): 3658-3667.
- Burger, J. A., N. J. Zvaifler, N. Tsukada, G. S. Firestein and T. J. Kipps (2001). "Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism." *J Clin Invest* **107**(3): 305-315.
- Cai, J. H., R. Zhao, J. W. Zhu, X. L. Jin, F. J. Wan, K. Liu, X. P. Ji, Y. B. Zhu and Z. G. Zhu (2010). "Expression of cortactin correlates with a poor prognosis in patients with stages II-III colorectal adenocarcinoma." *J Gastrointest Surg* **14**(8): 1248-1257.
- Campbell, D. H., R. L. Sutherland and R. J. Daly (1999). "Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin." *Cancer Res* **59**(20): 5376-5385.
- Cao, H., J. D. Orth, J. Chen, S. G. Weller, J. E. Heuser and M. A. McNiven (2003). "Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis." *Mol Cell Biol* **23**(6): 2162-2170.

Dedes, K. J., M. A. Lopez-Garcia, F. C. Geyer, M. B. Lambros, K. Savage, R. Vatcheva, P. Wilkerson, D. Wetterskog, M. Lacroix-Triki, R. Natrajan and J. S. Reis-Filho (2010). "Cortactin gene amplification and expression in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemical study." *Breast Cancer Res Treat* **124**(3): 653-666.

Dehio, C., M. C. Prevost and P. J. Sansonetti (1995). "Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway." *Embo j* **14**(11): 2471-2482.

Dym, M. and D. W. Fawcett (1970). "The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium." *Biol Reprod* **3**(3): 308-326.

Enciso, J., L. Mendoza and R. Pelayo (2015). "Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology." *Front Genet* **6**: 290.

Fantozzi, I., D. Grall, S. Cagnol, F. Stanchi, A. Sudaka, M. C. Brunstein, A. Bozec, J. L. Fischel, G. Milano and E. Van Obberghen-Schilling (2008). "Overexpression of cortactin in head and neck squamous cell carcinomas can be uncoupled from augmented EGF receptor expression." *Acta Oncol* **47**(8): 1502-1512.

Gattazzo, C., V. Martini, F. Frezzato, V. Trimarco, E. Tibaldi, M. Castelli, M. Facco, F. Zonta, A. M. Brunati, R. Zambello, G. Semenzato and L. Trentin (2014). "Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* **99**(6): 1069-1077.

Gavins, F. N. and B. E. Chatterjee (2004). "Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations." *J Pharmacol Toxicol Methods* **49**(1): 1-14.

Goyama, S., M. Wunderlich and J. C. Mulloy (2015). "Xenograft models for normal and malignant stem cells." *Blood* **125**(17): 2630-2640.

Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen and L. T. Williams (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(1): 258-263.

Hamann, A., D. Jablonski-Westrich, R. Harder and H. G. Thiele (1988). "Homing receptor expression and migration of activated lymphocytes." *Adv Exp Med Biol* **237**: 511-518.

Hsieh, Y. T., E. J. Gang, H. Geng, E. Park, S. Huantes, D. Chudziak, K. Dauber, P. Schaefer, C. Scharman, H. Shimada, S. Shojaee, L. Klemm, R. Parameswaran, M. Loh, E. S. Kang, H. H. Koo, W. K. Hofmann, J. Andrade, G. M. Crooks, C. L. Willman, M. Muschen, T. Papayannopoulou, N. Heisterkamp, H. Bonig and Y. M. Kim (2013). "Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy." *Blood* **121**(10): 1814-1818.

Huang, C., J. Liu, C. C. Haudenschild and X. Zhan (1998). "The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells." *J Biol Chem* **273**(40): 25770-25776.

Huang, J., T. Asawa, T. Takato and R. Sakai (2003). "Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma." *J Biol Chem* **278**(48): 48367-48376.

Jiang, Y. P., X. H. Wu, H. Y. Xing and X. Y. Du (2007). "Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer." *Chin Med J (Engl)* **120**(14): 1251-1255.

Juarez, J., K. F. Bradstock, D. J. Gottlieb and L. J. Bendall (2003). "Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro." *Leukemia* **17**(7): 1294-1300.

Kaksonen, M., H. B. Peng and H. Rauvala (2000). "Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles." *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4421-4426.

Kelley, L. C., K. E. Hayes, A. G. Ammer, K. H. Martin and S. A. Weed (2010). "Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence." *PLoS One* **5**(11): e13847.

Lafouresse, F., E. Bellard, C. Laurent, C. Mousson, J. J. Fournie, L. Ysebaert and J. P. Girard (2015). "L-selectin controls trafficking of chronic lymphocytic leukemia cells in lymph node high endothelial venules in vivo." *Blood* **126**(11): 1336-1345.

Lai, F. P., M. Szczodrak, J. M. Oelkers, M. Ladwein, F. Acconcia, S. Benesch, S. Auinger, J. Faix, J. V. Small, S. Polo, T. E. Stradal and K. Rottner (2009). "Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases." *Mol Biol Cell* **20**(14): 3209-3223.

Li, Y., M. Tondravi, J. Liu, E. Smith, C. C. Haudenschild, M. Kaczmarek and X. Zhan (2001). "Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells." *Cancer Res* **61**(18): 6906-6911.

Liu, J., C. Huang and X. Zhan (1999). "Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1." *Oncogene* **18**(48): 6700-6706.

Lock, R. B., N. Liem, M. L. Farnsworth, C. G. Milross, C. Xue, M. Tajbakhsh, M. Haber, M. D. Norris, G. M. Marshall and A. M. Rice (2002). "The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse." *Blood* **99**(11): 4100-4108.

Luo, C., H. Pan, M. Mines, K. Watson, J. Zhang and G. H. Fan (2006). "CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis." *J Biol Chem* **281**(40): 30081-30093.

Luo, M. L., X. M. Shen, Y. Zhang, F. Wei, X. Xu, Y. Cai, X. Zhang, Y. T. Sun, Q. M. Zhan, M. Wu and M. R. Wang (2006). "Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance." *Cancer Res* **66**(24): 11690-11699.

Martinez-Quiles, N., H. Y. Ho, M. W. Kirschner, N. Ramesh and R. S. Geha (2004). "Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5269-5280.

Martini, V., C. Gattazzo and F. Frezzato (2017). "Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells."

McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao and T. W. Wong (2000). "Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape." *J Cell Biol* **151**(1): 187-198.

Meyer, L. H. and K. M. Debatin (2011). "Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology." *Cancer Res* **71**(23): 7141-7144.

Meyer, L. H., S. M. Eckhoff, M. Queudeville, J. M. Kraus, M. Giordan, J. Stursberg, A. Zangrando, E. Vendramini, A. Moricke, M. Zimmermann, A. Schrauder, G. Lahr, K. Holzmann, M. Schrappe, G. Basso, K. Stahnke, H. A. Kestler, G. Te Kronnie and K. M. Debatin (2011). "Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways." *Cancer Cell* **19**(2): 206-217.

Moricke, A., M. Zimmermann, A. Reiter, G. Henze, A. Schrauder, H. Gadner, W. D. Ludwig, J. Ritter, J. Harbott, G. Mann, T. Klingebiel, F. Zintl, C. Niemeyer, B. Kremens, F. Niggli, D. Niethammer, K. Welte, M. Stanulla, E. Odenwald, H. Riehm and M. Schrappe (2010). "Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000." *Leukemia* **24**(2): 265-284.

Mudry, R. E., J. E. Fortney, T. York, B. M. Hall and L. F. Gibson (2000). "Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy." *Blood* **96**(5): 1926-1932.

Nguyen, K., M. Devidas, S. C. Cheng, M. La, E. A. Raetz, W. L. Carroll, N. J. Winick, S. P. Hunger, P. S. Gaynon and M. L. Loh (2008). "Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study." *Leukemia* **22**(12): 2142-2150.

Nonomura, C., J. Kikuchi, N. Kiyokawa, H. Ozaki, K. Mitsunaga, H. Ando, A. Kanamori, R. Kannagi, J. Fujimoto, K. Muroi, Y. Furukawa and M. Nakamura (2008). "CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL-1." *Cancer Res* **68**(3): 790-799.

Okada, T., V. N. Ngo, E. H. Ekland, R. Forster, M. Lipp, D. R. Littman and J. G. Cyster (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." *J Exp Med* **196**(1): 65-75.

Oser, M., C. C. Mader, H. Gil-Henn, M. Magalhaes, J. J. Bravo-Cordero, A. J. Koleske and J. Condeelis (2010). "Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia." *J Cell Sci* **123**(Pt 21): 3662-3673.

Perez-Saldivar, M. L., A. Fajardo-Gutierrez, R. Bernaldez-Rios, A. Martinez-Avalos, A. Medina-Sanson, L. Espinosa-Hernandez, D. Flores-Chapa Jde, R. Amador-Sanchez, J. G. Penalozagonzalez, F. J. Alvarez-Rodriguez, V. Bolea-Murga, J. Flores-Lujano, C. Rodriguez-Zepeda Mdel, R. Rivera-Luna, E. M. Dorantes-Acosta, E. Jimenez-Hernandez, M. Alvarado-Ibarra, M. M. Velazquez-Avina, J. R. Torres-Nava, D. A. Duarte-Rodriguez, R. Paredes-Aguilera, L. Del Campo-Martinez Mde, R. Cardenas-Cardos, P. H. Alamilla-Galicia, V. C. Bekker-Mendez, M. C. Ortega-Alvarez and J. M. Mejia-Arangure (2011). "Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology." *BMC Cancer* **11**: 355.

Ramsay, A. G., M. D. Keppler, M. Jazayeri, G. J. Thomas, M. Parsons, S. Violette, P. Weinreb, I. R. Hart and J. F. Marshall (2007). "HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6." *Cancer Res* **67**(11): 5275-5284.

Salzer, W. L., M. Devidas, W. L. Carroll, N. Winick, J. Pullen, S. P. Hunger and B. A. Camitta (2010). "Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the children's oncology group." *Leukemia* **24**(2): 355-370.

Shalpour, S., J. Hof, R. Kirschner-Schwabe, L. Bastian, C. Eckert, J. Prada, G. Henze, A. von Stackelberg and K. Seeger (2011). "High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse." *Haematologica* **96**(11): 1627-1635.

Shetty, S., T. Bruns, C. J. Weston, Z. Stamataki, Y. H. Oo, H. M. Long, G. M. Reynolds, G. Pratt, P. Moss, S. Jalkanen, S. G. Hubscher, P. F. Lalor and D. H. Adams (2012). "Recruitment mechanisms of primary and malignant B cells to the human liver." *Hepatology* **56**(4): 1521-1531.

Smith, G. H. R. F. O. (2011). *Childhood Leukemia A Practical Handbook*.

Urano, T., J. Liu, P. Zhang, Y. Fan, C. Egile, R. Li, S. C. Mueller and X. Zhan (2001). "Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin." *Nat Cell Biol* **3**(3): 259-266.

van Damme, H., H. Brok, E. Schuurings-Scholtes and E. Schuurings (1997). "The redistribution of cortactin into cell-matrix contact sites in human carcinoma cells with 11q13 amplification is associated with both overexpression and post-translational modification." *J Biol Chem* **272**(11): 7374-7380.

van den Berk, L. C., A. van der Veer, M. E. Willemse, M. J. Theeuwes, M. W. Luijendijk, W. H. Tong, I. M. van der Sluis, R. Pieters and M. L. den Boer (2014). "Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Haematol* **166**(2): 240-249.

van Rossum, A. G., J. H. de Graaf, E. Schuurig-Scholtes, P. M. Kluin, Y. X. Fan, X. Zhan, W. H. Moolenaar and E. Schuurig (2003). "Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration." J Biol Chem **278**(46): 45672-45679.

Vidal, C., B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus and M. Fontenay-Roupie (2002). "Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin." Blood **100**(13): 4462-4469.

Vuori, K. and E. Ruoslahti (1995). "Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix." J Biol Chem **270**(38): 22259-22262.

Wang, X., W. Cao, M. Mo, W. Wang, H. Wu and J. Wang (2010). "VEGF and cortactin expression are independent predictors of tumor recurrence following curative resection of gastric cancer." J Surg Oncol **102**(4): 325-330.

Weaver, A. M., J. E. Heuser, A. V. Karginov, W. L. Lee, J. T. Parsons and J. A. Cooper (2002). "Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex." Curr Biol **12**(15): 1270-1278.

Weaver, A. M., A. V. Karginov, A. W. Kinley, S. A. Weed, Y. Li, J. T. Parsons and J. A. Cooper (2001). "Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation." Curr Biol **11**(5): 370-374.

Webb, B. A., S. Zhou, R. Eves, L. Shen, L. Jia and A. S. Mak (2006). "Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase." Arch Biochem Biophys **456**(2): 183-193.

Weed, S. A., A. V. Karginov, D. A. Schafer, A. M. Weaver, A. W. Kinley, J. A. Cooper and J. T. Parsons (2000). "Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex." J Cell Biol **151**(1): 29-40.

Xie, H. L., Z. Y. Li, R. L. Gan, X. J. Li, Q. L. Zhang, M. Hui and X. T. Zhou (2010). "Differential gene and protein expression in primary gastric carcinomas and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis." J Dig Dis **11**(3): 167-175.

Xu, X. Z., M. V. Garcia, T. Y. Li, L. Y. Khor, R. S. Gajapathy, C. Spittle, S. Weed, S. R. Lessin and H. Wu (2010). "Cytoskeleton alterations in melanoma: aberrant expression of cortactin, an actin-binding adapter protein, correlates with melanocytic tumor progression." Mod Pathol **23**(2): 187-196.

Yuan, B. Z., X. Zhou, D. B. Zimonjic, M. E. Durkin and N. C. Popescu (2003). "Amplification and overexpression of the EMS 1 oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma." J Mol Diagn **5**(1): 48-53.

Zhan, X., X. Hu, B. Hampton, W. H. Burgess, R. Friesel and T. Maciag (1993). "Murine cortactin is phosphorylated in response to fibroblast growth factor-1 on tyrosine residues late in the G1 phase of the BALB/c 3T3 cell cycle." J Biol Chem **268**(32): 24427-24431.

Zhan, X., C. Plourde, X. Hu, R. Friesel and T. Maciag (1994). "Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin." J Biol Chem **269**(32): 20221-20224.