

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**«DETERMINACIÓN DE LAS RESPUESTAS CELULARES AFECTADAS
POR LA SOBREEXPRESIÓN DE ADAMTS-1 DURANTE LA
PROGRESIÓN TUMORAL DEL FIBROSARCOMA»**

Tesis presentada por la Bachiller:

Noriega Guerra, Heydi

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Carpio Carpio, José Miguel

Co-Asesora:

Dra. Morais Freitas, Vanessa

AREQUIPA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20180000021032
N° Trámite en Fac. 383-2018
Fecha Recep. Fac. 27-04-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

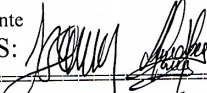
DE: **NORIEGA GUERRA, Heydi**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

“DETERMINACION DE LAS RESPUESTAS CELULARES AFECTADAS POR LA SOBREENPRESION DE ADAMTS-1 DURANTE LA PROGRESION TUMORAL DEL FIBROSARCOMA”

DICTAMINADORES: **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **01 de mayo 2018**

ASESOR: **Ing. José Miguel Carpio Carpio**

DICTAMEN ASESORÍA:

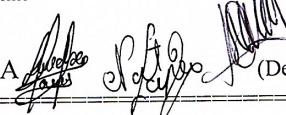
Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMA  FECHA **01/06/18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas** 3) **Mgter. Natalia López Álvarez**
2) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

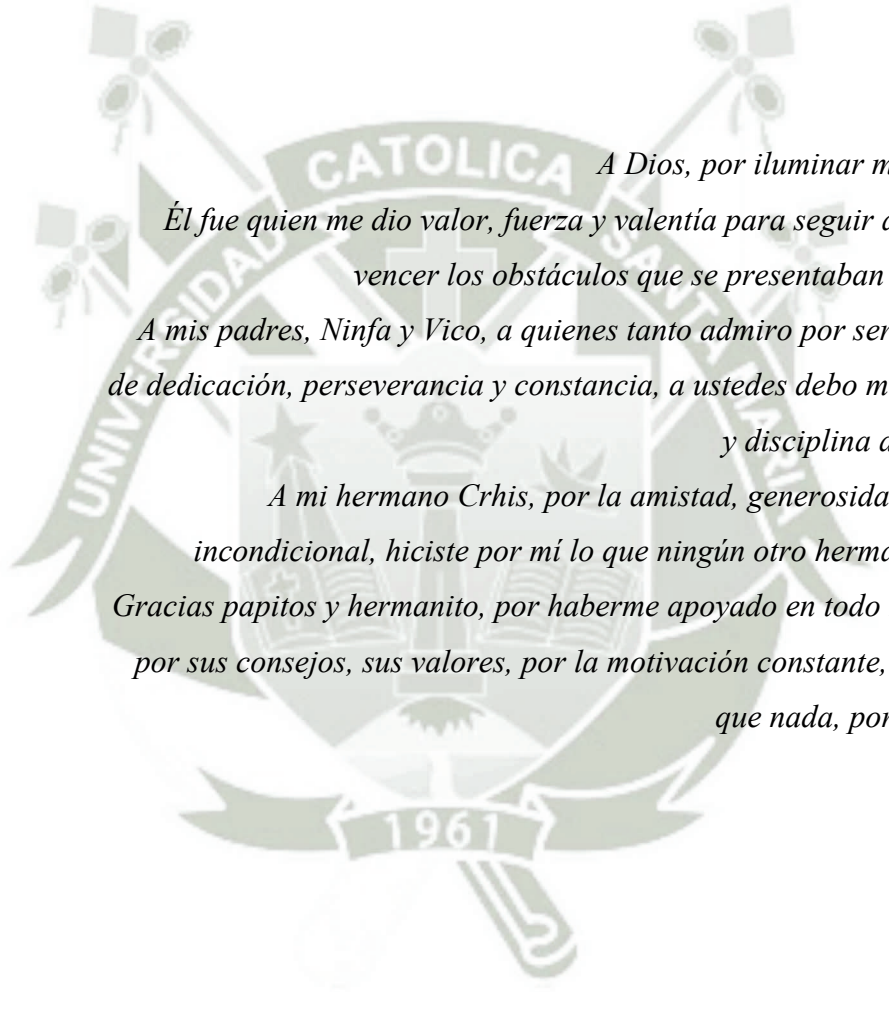
DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: **“DETERMINACION DE LAS RESPUESTAS CELULARES AFECTADAS POR LA SOBREENPRESION DE ADAMTS-1 DURANTE LA PROGRESION TUMORAL DEL FIBROSARCOMA ”** y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente
FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **12/06/18**

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA **22/06/18** HORA **19.00** LOCAL **SUM C-402**

FIRMA DEL DECANO  FECHA **14/06/18**



*A Dios, por iluminar mi camino,
Él fue quien me dio valor, fuerza y valentía para seguir adelante y
vencer los obstáculos que se presentaban día a día.
A mis padres, Ninfa y Vico, a quienes tanto admiro por ser ejemplos
de dedicación, perseverancia y constancia, a ustedes debo mi carácter
y disciplina al trabajo.
A mi hermano Crhis, por la amistad, generosidad y apoyo
incondicional, hiciste por mí lo que ningún otro hermano haría.
Gracias papitos y hermanito, por haberme apoyado en todo momento,
por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, pero más
que nada, por su amor.*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, el **Ing. José Miguel Carpio Carpio**, por su asesoría y preocupación en la realización de mi tesis. Gracias por su tiempo y estar siempre a disposición, ofreciéndome su ayuda.

A la **Dra. Vanessa Morais Freitas**, por la co-orientación y apoyo que me brindó durante la realización de mi tesis. Estaré eternamente agradecida por todo el tiempo dedicado a enseñarme a hacer ciencia. Siempre llevaré conmigo todas sus enseñanzas, las cuales fueron fundamentales para mi formación académica. Gracias, por la amistad y generosidad dentro y fuera del laboratorio, conocerla fue una de las mejores cosas que me pasó en la vida.

Al **Dr. José Villanueva Salas**, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, por haberme brindado el apoyo e incentivo para alcanzar este triunfo profesional.

Al Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo y a la Universidad Católica de Santa María, mi alma mater.

A la Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de São Paulo (FAPESP) por el apoyo financiero e institucional, el cual fue de extrema importancia para el desarrollo de este proyecto.

Al personal técnico del Laboratorio de Matriz extracelular y del Sector de Microscopia Confocal CEFAP, por su inestimable apoyo y oportunos consejos.

A mi mejor amiga Fachyz por estar siempre a mi lado, independiente de la distancia entre nosotras. Gracias por escucharme, darme apoyo y palabras de aliento. "You're my person you will always be my person".

A mis meninas Mari Longhi, Magna y Priscilla, por las alegrías, tristezas y sufrimientos compartidos. ¡Conocerlas fue la más grata sorpresa! Gracias por el convivio maravilloso, el cariño e incentivo siempre dado en los momentos difíciles, las tendré siempre en mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	iv
OBJETIVOS	vi
HIPÓTESIS	vii
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Sarcomas	1
1.1.1 Fibrosarcoma	1
1.2 Progresión tumoral	2
1.2.1 Autosuficiencia en señales de proliferación	3
1.2.2 Insensibilidad a señales inhibitoras de la proliferación	3
1.2.3 Evasión de la apoptosis	4
1.2.4 Potencial proliferativo ilimitado	4
1.2.5 Angiogénesis sostenida	4
1.2.6 Activación de los mecanismos de invasión y metástasis	5
1.3 Microambiente tumoral	6
1.3.1 Células estromales	7
1.3.2 Matriz extracelular (MEC)	8
1.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)	9
1.5 Adamalinas	11
1.5.1 ADAMTS-1 (Una desintegrina y metaloproteinasa con repeticiones de trombospondina del tipo 1)	12
1.6 Ensayos utilizados para el estudio de la ADAMTS-1	13

1.6.1	Cultivo celular	13
1.6.2	Transducción	14
1.6.3	PCR en tiempo real (RT-qPCR)	15
1.6.4	<i>Western Blotting</i> o <i>Immunoblotting</i>	15
1.6.5	Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)	15
1.6.6	Microscopía de <i>time-lapse</i>	16
1.6.7	Estudio <i>in vivo</i> usando el modelo de <i>zebrafish</i>	16

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS 17

2.1 Materiales 17

2.1.1	Muestras y/o unidades biológicas	17
2.1.2	Medios de cultivo	17
2.1.3	Material de laboratorio	17
2.1.4	Insumos y reactivos químicos	18
2.1.5	Kits Comerciales	20
2.1.6	Equipos e instrumentación	20
2.1.7	Otros	21

2.2 Métodos 21

2.2.1	Ubicación geográfica del estudio	21
2.2.2	Cultivo celular	21
2.2.3	Transducción de las líneas celulares HT1080 y HEK293T	22
2.2.4	PCR en tiempo real (RT-qPCR)	23
2.2.5	<i>Western Blotting</i>	24
2.2.6	Colecta de los medios condicionados (MCs).....	26
2.2.7	Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)	26
2.2.8	Microscopía de <i>time-lapse</i>	28

2.2.9	Inyección de células tumorales en embriones de <i>zebrafish</i> transgénicos, Tg (fli1:eGFP)	28
2.2.10	Análisis de los resultados	30

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1 Inducción de la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las líneas celulares HT1080 y HEK293T	31
3.2 Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la proliferación celular del fibrosarcoma	33
3.3 Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la velocidad de migración celular del fibrosarcoma	37
3.4 Evaluación del efecto <i>in vivo</i> de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la capacidad de las células de fibrosarcoma para formar agregados celulares	42
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	60
APÉNDICES	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alteraciones adquiridas por las células tumorales que favorecen el desarrollo del cáncer	3
Figura 2 – Proceso de formación de tumores metastáticos	5
Figura 3 – Esquema representativo del microambiente tumoral	6
Figura 4 – Esquema representativo de la funcionalidad de la MEC	9
Figura 5 – Estructura esquemática de las MMPs	10
Figura 6 – Estructura esquemática de las ADAMs y ADAMTSs	12
Figura 7 – Formas de la ADAMTS-1	13
Figura 8 – Células (A) HT1080 y (B) HEK293T cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de SFB	22
Figura 9 – Imagen de un embrión de <i>zebrafish</i> con 24 hpf (horas post-fecundación) ..	29
Figura 10 – Imagen de un embrión de <i>zebrafish</i> con 48 hpf, tratado con PTU	30
Figura 11 – Representación esquemática del montaje de un embrión, para ser visualizado en el microscopio de fluorescencia	30
Figura 12 – Análisis del RT-qPCR de las células transducidas HT1080 y HEK293T .	31
Figura 13 – <i>Western Blotting</i> representativos de las células transducidas HT1080 y HEK293T	32
Figura 14 – Incorporación de BrdU en las células HT1080-MPC y HT1080-MPA, bajo condiciones de 0% y 10% de SFB	34
Figura 15 – Incorporación de BrdU en las células HT1080 (tipo salvaje), tratadas con un <i>MC enriquecido con ADAMTS-1</i> o <i>MC Control</i> en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB	36
Figura 16 – Velocidad de migración calculada a partir de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA, bajo condiciones de 0% y 10% de SFB	38
Figura 17 – Velocidad de migración calculada a partir de las células HT1080 (tipo salvaje), tratadas con un <i>MC enriquecido con ADAMTS-1</i> o <i>MC Control</i> en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB	40

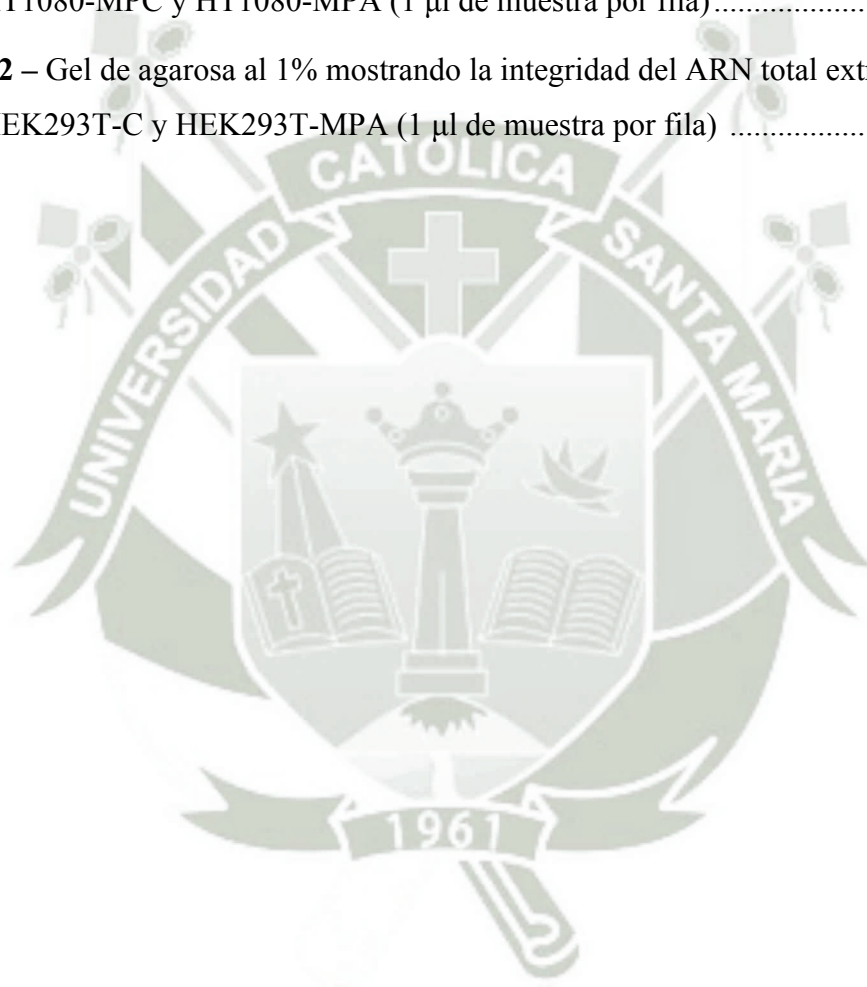
Figura 18 – Formación de agregados celulares a partir de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA en embriones de *zebrafish* Tg (*fli1:eGFP*) 43

Figura 19 – Representación esquemática de la producción de partículas lentivirales recombinantes y la transducción de la célula huésped 62

Figura 20 – Esquema del vector lentiviral pReceiver-Lv213, utilizado para la sobreexpresión de ADAMTS-1 63

Figura 21 – Gel de agarosa al 1% mostrando la integridad del ARN total extraído de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA (1 µl de muestra por fila)..... 68

Figura 22 – Gel de agarosa al 1% mostrando la integridad del ARN total extraído de las células HEK293T-C y HEK293T-MPA (1 µl de muestra por fila) 69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Secuencias de los cebadores diseñados para los ensayos de RT-qPCR.....	24
Tabla 2 – Componentes de la reacción de eliminación de ADN genómico	66
Tabla 3 – Componentes de la reacción de transcripción inversa	66
Tabla 4 – Concentraciones en ng/ μ l del ARN total extraído	68
Tabla 5 – Conteo de los núcleos de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA positivas para DAPI y BrdU	70
Tabla 6 – Conteo de los núcleos de las células HT1080 (tipo salvaje) positivas para DAPI y BrdU.....	71
Tabla 7 – Medición de las distancias recorridas por las células HT1080-MPC y HT1080-MPA.....	73
Tabla 8 – Medición de las distancias recorridas por las células HT1080 (tipo salvaje)	75
Tabla 9 – Medición del diámetro de los agregados celulares formados por las células HT1080-MPC y HT1080-MPA.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

%	porcentaje
°C	grados centígrados
α	alfa
β	beta
μm	micrómetro
μM	micromolar
μg	microgramo
μl	microlitro
ADAM	del inglés “ <i>a disintegrin and metalloproteinase</i> ”, traducido como una desintegrina y metaloproteinasa
ADAMTS	del inglés “ <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif</i> ”, traducido como una desintegrina y metaloproteinasa con repeticiones de trombospondina
BCA	del inglés “ <i>bicinchoninic acid</i> ”, traducido como ácido bicinconínico
BCRJ	Banco de células de Rio de Janeiro
BSA	del inglés “ <i>Bovine Serum Albumine</i> ”, traducido como albumina de suero bovino
BrdU	bromodeoxiuridina
CAF	del inglés “ <i>Cancer-Associated Fibroblast</i> ”, traducido como fibroblastos asociados al cáncer
CMV	citomegalovirus
CT	del inglés “ <i>Cycle Threshold</i> ”, traducido como ciclo umbral
DPI	días post-inyección
dNTP	del inglés “ <i>deoxynucleoside triphosphates</i> ”, traducido como deoxinucleósido trifosfato
dUTP	del inglés “ <i>deoxyuridine triphosphate</i> ”, traducido como desoxiuridina trifosfato
EDTA	del inglés “ <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”, traducido como ácido etilendiaminotetraacético
EGF	del inglés “ <i>Epidermal Growth Factor</i> ”, traducido como factor de crecimiento epidérmico

eGFP	del inglés “ <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> ”, traducido como proteína verde fluorescente mejorada
FGF	del inglés “ <i>Fibroblast Growth Factor</i> ”, traducido como factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	del inglés “ <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ”, traducido como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HGF	del inglés “ <i>Hepatocyte Growth Factor</i> ”, traducido como factor de crecimiento de hepatocitos
hr	hora
hpf	horas post-fecundación
INEN	Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
IRES	del inglés “ <i>Internal Ribosome Entry Site</i> ”, traducido como sitio interno de entrada al ribosoma
kDa	kilodalton
M	molar
mm	milímetro
mM	milimolar
ml	mililitro
mg	miligramo
MEC	matriz extracelular
MMP	del inglés “ <i>matrix metalloproteinases</i> ”, traducido como metaloproteinasas de matriz
MT-MMP	del inglés “ <i>membrane-type matrix metalloproteinases</i> ”, traducido como metaloproteinasas de matriz asociadas a la membrana
MC	medio condicionado
MEM	del inglés “ <i>Minimum Essential Medium</i> ”, traducido como medio esencial mínimo
MSCs	del inglés “ <i>Mesenchymal Stem Cells</i> ”, traducido como células madre mesenquimales
N	normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	del inglés “ <i>Open Reading Frame</i> ”, traducido como marco abierto de lectura

pH	potencial de hidrógeno
psi	libra de fuerza por pulgada cuadrada
PBS	del inglés “ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ”, traducido como tampón fosfato salino
PCR	del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”, traducido como reacción en cadena de la polimerasa
PTU	N-feniltiourea
RCF	del inglés “ <i>Relative Centrifugal Force</i> ”, traducido como fuerza centrífuga relativa
rpm	revoluciones por minuto
RB	del inglés “ <i>Retinoblastoma Protein</i> ”, traducido como proteína del retinoblastoma
RT-qPCR	del inglés “ <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> ”, traducido como PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real
SBP	sarcomas de partes blandas
SDS	del inglés “ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ”, traducido como Sodio dodecilsulfato
SEM	del inglés “ <i>Standard Error of the Mean</i> ”, traducido como error estándar del promedio
SFB	suero fetal bovino
TBS	del inglés “ <i>Tris-Buffered Saline</i> ”, traducido como solución salina tamponada
TSP	trombospondina
TGF- β	del inglés “ <i>Transforming Growth Factor beta</i> ”, traducido como factor de crecimiento transformante beta
VEGF	del inglés “ <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ”, traducido como factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

El fibrosarcoma es una neoplasia de origen mesenquimal, que se caracteriza por presentar un alto grado de malignidad y agresividad. La progresión de esta neoplasia se ve dictada por su microambiente circundante, puesto que las células estromales y tumorales secretan para la matriz extracelular, una gran variedad de factores biológicamente activos, tales como: factores de crecimiento y enzimas proteolíticas. La ADAMTS-1 (una desintegrina y metaloproteinasa con repeticiones de trombospondina del tipo 1) es una enzima secretada, conocida por inducir cambios en la matriz extracelular y, por lo tanto, influir en el comportamiento de las células tumorales. El presente trabajo permitió evaluar el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1, sobre la proliferación y migración celular del fibrosarcoma *in vitro*, así como la capacidad de las células tumorales para formar agregados celulares *in vivo*. Para este fin, células humanas de fibrosarcoma (HT1080) y células embrionarias de riñón humano (HEK293T), fueron transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1. Después de confirmar la eficiencia de la transducción, a través de RT-qPCR y *Western Blotting*, se analizó el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1. Así, el ensayo de incorporación de BrdU, mostró que las células HT1080 que sobreexpresan ADAMTS-1, presentaron una disminución en su proliferación celular. Además, mediante microscopía de *time-lapse*, se observó una disminución de la velocidad de migración de las células HT1080 que sobreexpresan ADAMTS-1. De la misma forma, se observó que la proliferación y la velocidad de migración de las células HT1080 (tipo salvaje) disminuyó cuando estas fueron tratadas con el medio condicionado de otro tipo

celular (HEK293T) que sobreexpresa ADAMTS-1. Finalmente, los estudios *in vivo*, donde se utilizaron embriones de *zebrafish* transgénicos, demostraron que la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las células HT1080, perturbó la capacidad de estas para formar agregados celulares. Por consiguiente, los resultados obtenidos sugieren que la ADAMTS-1 actúa como un factor antitumoral durante la progresión del fibrosarcoma.

Palabras claves: Fibrosarcoma, microambiente tumoral, matriz extracelular, ADAMTS-1, proliferación celular, migración celular, agregados celulares.



ABSTRACT

Fibrosarcoma is a malignant and aggressive neoplasm of mesenchymal cell origin. The progression of this neoplasm is dictated by the surrounding microenvironment, since the stromal and tumor cells have the capacity to secrete biologically active factors, such growth factors and proteolytic enzymes, into the extracellular matrix. ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs) is a secreted enzyme that induce changes in extracellular matrix and, therefore, influence the tumor cell behavior. The present work allowed to evaluate the effect of ADAMTS-1 overexpression on fibrosarcoma cell proliferation and migration *in vitro*, as well as the capacity of the tumor cells to form cellular aggregates *in vivo*. For this purpose, human fibrosarcoma cells (HT1080) and transformed human kidney embryonic cells (HEK293T) were transduced to overexpress ADAMTS-1. After confirm the transduction efficiency, through RT-qPCR and Western blot immunodetection, the effect of ADAMTS-1 overexpression was tested. Thus, BrdU incorporation assay showed that HT1080 cells overexpressing ADAMTS-1 presented a decrease of cell proliferation. In addition, time-lapse microscopy showed a decrease in migration velocity of these cells. Likewise, when wild-type HT1080 cells were treated with the conditioned medium of other cell type (HEK293T) that overexpress ADAMTS-1, it was observed a decrease of cell proliferation and migration velocity. Finally, *in vivo* studies with transgenic zebrafish embryos, demonstrated that ADAMTS-1 overexpression in HT1080 cells disrupted the ability of these cells to form cell aggregates. Hence the results obtained suggest that ADAMTS-1 acts as an antitumor factor during fibrosarcoma progression.

Keywords: Fibrosarcoma, tumor microenvironment, extracellular matrix, ADAMTS-1, cell proliferation, cell migration, cellular aggregates.

INTRODUCCIÓN

El fibrosarcoma es una neoplasia maligna y agresiva que se origina en los tejidos mesenquimatosos (tejido conjuntivo y tejido muscular). Histológicamente, el fibrosarcoma está formado por células fusiformes que presentan diferenciación fibroblástica y altas tasas de mitosis. Estas células se encuentran además inmersas en una cantidad variable de colágeno, formando así tumores sólidos que ponen en peligro la vida¹⁻³.

La progresión tumoral no se define únicamente por las diversas características adquiridas por las células tumorales, sino que también engloba las contribuciones del microambiente tumoral. Este último es reconocido por ser el producto de la interacción entre diferentes tipos celulares, los cuales secretan para la matriz extracelular, una gran variedad de factores biológicamente activos, tales como: factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas, entre otros^{4,5}.

Por consiguiente, el papel de la matriz extracelular en el microambiente tumoral, no se limita a actuar como una barrera física contra la invasión tumoral, sino también sirve como depósito para factores biológicamente activos que influyen la migración, proliferación y adhesión celular (progresión tumoral)^{6,7}.

La ADAMTS-1 (una desintegrina y metaloproteinasa con repeticiones de trombospondina 1) es una enzima proteolítica multifuncional, cuya estructura se caracteriza por presentar un péptido señal, un pro-dominio, un dominio metaloproteinasa (dominio catalítico), un dominio similar a desintegrina, una trombospondina del tipo 1 (TSP1) central, un dominio rico en cisteína, una región espaciadora y dos repeticiones de TSP1 en el extremo C-terminal. Cabe señalar que todos los miembros de la familia ADAMTS no presentan el dominio transmembrana, por lo tanto, son secretados para la matriz extracelular^{8,9}.

Asimismo, la ADAMTS-1 se encuentra implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos¹⁰. Inicialmente, esta enzima fue descrita como un mediador de la inflamación⁸. Actualmente se conoce que la ADAMTS-1 participa en los procesos de organogénesis^{11,12}, foliculogénesis ovárica, formación de vasos sanguíneos y linfáticos^{13,14} y cáncer¹⁵.

Sin embargo, el papel de la ADAMTS-1 durante la progresión tumoral sigue siendo contradictorio; dado que la ADAMTS-1 puede estar relacionada con la actividad antitumoral ¹⁶ o la actividad pro-tumoral y estimuladora de metástasis ¹⁷. Esto podría deberse a su estructura de multidominios, la cual le atribuye de diferentes características y habilidades funcionales, dependiendo de la combinación de dominios ¹⁸.

En este trabajo se buscó evaluar el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1, sobre la proliferación y migración celular del fibrosarcoma *in vitro*, así como la capacidad de las células tumorales para formar agregados celulares *in vivo*. De esta forma, se determinó las respuestas celulares afectadas por la sobreexpresión de ADAMTS-1 durante la progresión tumoral del fibrosarcoma.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las respuestas celulares afectadas por la sobreexpresión de ADAMTS-1 durante la progresión tumoral del fibrosarcoma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inducir la sobreexpresión de ADAMTS-1 en células humanas de fibrosarcoma HT1080 (línea celular tumoral) y en células embrionarias de riñón humano HEK293T (línea celular no tumoral transformada).
2. Evaluar *in vitro* el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1 en la proliferación y migración de las células HT1080.
3. Evaluar *in vivo* el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la capacidad de las células HT1080 para formar agregados celulares.

HIPÓTESIS

Dado que la desregulación de la expresión de ADAMTS-1 está asociada a diferentes tipos de neoplasias, y su papel durante la progresión tumoral aún es contradictorio (respuesta pro- o antitumoral); es posible que la sobreexpresión de ADAMTS-1 afecte las respuestas celulares del fibrosarcoma, perjudicando o promoviendo su progresión.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Sarcomas

Los sarcomas constituyen un grupo de neoplasias malignas que se originan a partir de tejidos mesenquimatosos, es decir, tejidos no epiteliales derivados del mesodermo embrionario, tales como el tejido conjuntivo y muscular ^{3,19}.

Se han identificado más de 70 subtipos de sarcomas, los cuales fueron agrupados en ²⁰:

- Sarcomas de partes blandas (SBP).
- Osteosarcomas.

Aproximadamente, 80% de los sarcomas son provenientes de tejidos blandos (músculos, nervios, tendones, recubrimiento de las articulaciones y vasos sanguíneos y linfáticos) y 20% descienden de los huesos ^{21,22}.

La presente tesis está dedicada a estudiar al fibrosarcoma, uno de los subtipos histológicos de sarcomas de partes blandas (SBP) ²³.

1.1.1 Fibrosarcoma

El fibrosarcoma es un tumor maligno de células fusiformes con diferenciación fibroblástica ²⁴. Según el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en Lima-Perú durante el periodo de 1952 al 2007 se registraron 155 casos clínicos de sarcomas, de los cuales el 5.1% correspondieron a fibrosarcomas ²⁵.

Se han reconocido dos variedades clinicopatológicas de esta neoplasia: El fibrosarcoma congénito (infantil) y el fibrosarcoma del tipo adulto ²⁶. Como la línea celular de fibrosarcoma humano (HT1080) utilizada en este estudio, se deriva de un tumor de adulto, se dará énfasis a este tipo de fibrosarcoma.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el fibrosarcoma del tipo adulto es un tumor sólido compuesto por fibroblastos malignos y una cantidad variable de colágeno que, en los casos clásicos, presenta un aspecto histopatológico semejante a una espina de pescado ².

Si bien en los últimos años la incidencia del fibrosarcoma del tipo adulto ha caído drásticamente a nivel mundial, siendo representada por apenas del 1 al 5% de los sarcomas provenientes de tejidos blandos; cuando este tipo de fibrosarcoma se manifiesta, presenta un alto grado de malignidad (grado 2 y 3), formando lesiones agresivas que ponen en peligro la vida ²⁷.

Por lo general el fibrosarcoma se presenta en adultos entre la cuarta y sexta década de vida; siendo los sitios más acometidos, los tejidos blandos profundos (tejido conjuntivo y muscular) de las extremidades (principalmente muslos y antebrazos), tronco, cabeza y cuello. Entre los factores que predisponen a un pronóstico desfavorable, podemos mencionar la presencia de un gran número de células, las cuales están asociadas a altas tasas de mitosis y necrosis, con una mínima cantidad de colágeno ^{2,27,28}.

A pesar de que no existen factores de riesgo bien establecidos para el surgimiento del fibrosarcoma del tipo adulto, se observó que algunos tumores tienden a surgir en sitios previamente irradiados. De esta forma, este tipo de fibrosarcoma podría ser resistente a la quimioterapia y hacer metástasis a los pulmones y huesos (especialmente del esqueleto axial) ². En esos casos, la principal forma de tratamiento es la extirpación quirúrgica del tumor o la amputación total de la extremidad, esto dependiendo del grado de malignidad, extensión y localización del tumor ^{29,30}.

1.2 Progresión tumoral

El cáncer es una enfermedad heterogénea que involucra cambios dinámicos en el genoma de las células ³¹. Durante el desarrollo del cáncer, las células normales evolucionan progresivamente hacia un estado neoplásico, en respuesta a la acumulación de alteraciones genéticas. El término *progresión tumoral* hace referencia a todas esas alteraciones que llevan a las células normales a transformarse en células malignas (Figura 1) ^{4,32}.

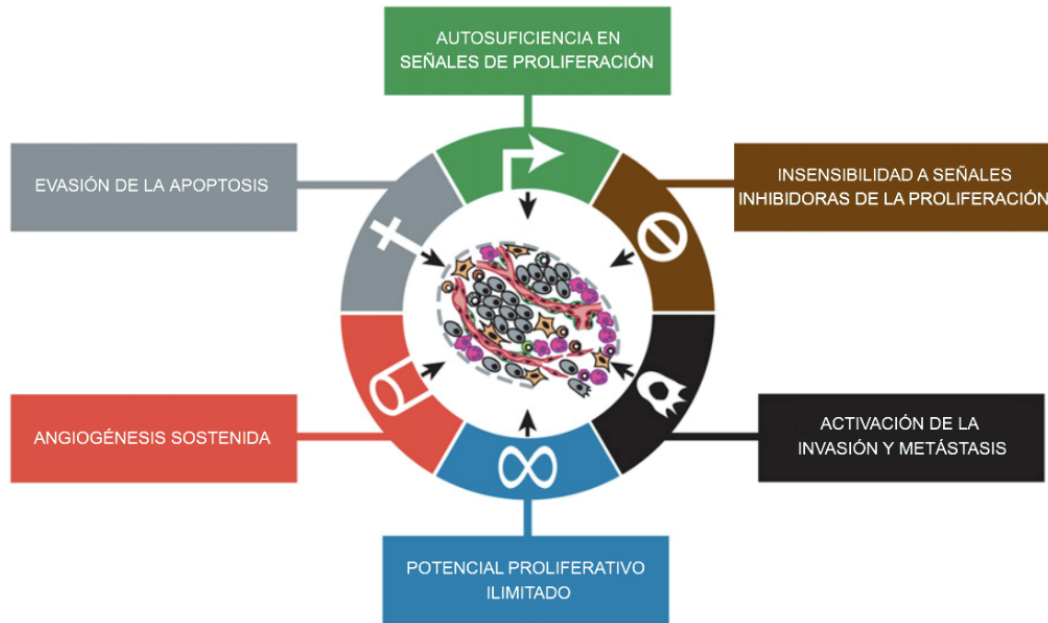


Figura 1 – Alteraciones adquiridas por las células tumorales que favorecen el desarrollo del cáncer. Adaptado de Hanahan (2011) ⁴.

1.2.1 Autosuficiencia en señales de proliferación

Normalmente, las células controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales que regulan el número de células, la arquitectura y función del tejido. A diferencia de los tejidos normales, las células tumorales comienzan a proliferar descontroladamente, generalmente como consecuencia de la activación de oncogenes: genes que han sufrido mutaciones para sobreexpresar una proteína dada. Estos oncogenes actúan mimetizando de una u otra manera a factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, citocinas, entre otros. De esta forma, las células tumorales generan sus propias señales (autonomía proliferativa), reduciendo así su dependencia a las señales normales del microambiente en el que están creciendo ^{4,33,34}.

1.2.2 Insensibilidad a señales inhibitoras de la proliferación

En un tejido normal operan múltiples señales antiproliferativas que controlan minuciosamente la proliferación celular, manteniendo así la homeostasis tisular. Sin embargo, las células que están iniciando su transformación maligna deben eludir los poderosos programas que regulan negativamente la proliferación celular (señales antiproliferativas). Muchos de estos programas dependen de la acción de los genes

supresores de tumores, los cuales son encargados de codificar proteínas que detienen la proliferación celular a través de la regulación del ciclo celular. Por consiguiente, cuando estos genes son inactivados, las células tumorales llegan a dividirse descontroladamente; favoreciendo al crecimiento e invasión del tumor ^{4,33-35}.

1.2.3 Evasión de la apoptosis

El crecimiento de los tumores no depende sólo de la velocidad y proliferación celular, sino también de la disminución del número de células que ocurre principalmente por apoptosis (muerte celular programada). El mecanismo más común a través del cual las células tumorales resisten a la apoptosis, consiste en mutaciones en el gen supresor p53 e inactivación de la proteína p53. En este caso, no se produce una parada del ciclo celular, la cual es necesaria para la reparación del ADN, sino ocurre la rápida proliferación de clones de células con ADN mutado (transformación neoplásica) ^{4,36,37}.

1.2.4 Potencial proliferativo ilimitado

Normalmente, las células se dividen un número limitado de veces y después mueren espontáneamente sin necesidad de señales externas. Sin embargo, las células tumorales son capaces de romper la barrera de la inmortalidad y aumentar su potencial de proliferación, para así completar la progresión tumoral (crecimiento e invasión). Los mecanismos a través de los cuales las células tumorales adquieren un potencial proliferativo ilimitado son: mutaciones en los genes supresores de tumores (p53 o RB) y/o la expresión aberrante de la telomerasa. Este último, evita el acortamiento de los telómeros después de cada ciclo celular, estabilizando el genoma mutante ^{4,38,39}.

1.2.5 Angiogénesis sostenida

La angiogénesis tumoral es un paso necesario para la evolución de un pequeño grupo de células a un tumor de gran tamaño. Así, cuando se produce un desequilibrio entre los factores pro- y antiangiogénicos, las células endoteliales comienzan a proliferar, formando nuevos vasos sanguíneos que crecen hacia el interior o alrededor de la masa tumoral, suministrándolo de suficiente oxígeno y nutrientes; este proceso es conocido como angiogénesis ^{4,40,41}.

Por otro lado, la angiogénesis no es sólo importante para el crecimiento y supervivencia del tumor, sino también para la diseminación de las células tumorales para otros tejidos, puesto que los nuevos vasos sanguíneos son fácilmente penetrados por las células tumorales, proporcionando una oportunidad para que estas células entren en el sistema circulatorio e inicien el proceso metastásico (Figura 2) ^{40,42,43}.

1.2.6 Activación de los mecanismos de invasión y metástasis

La invasión tumoral a tejidos circundantes, constituye la etapa inicial del proceso metastásico. En dicho proceso, las células tumorales se desprenden del tumor original (primario), alcanzan los vasos sanguíneos o linfáticos y viajan a través de ellos, para luego formar un nuevo tumor (secundario) en otros tejidos del cuerpo (Figura 2) ⁴². Tanto la invasión como la metástasis utilizan estrategias operativas similares que implican la disminución de la adhesión celular, el aumento de la motilidad y la secreción de enzimas proteolíticas ^{4,44}.

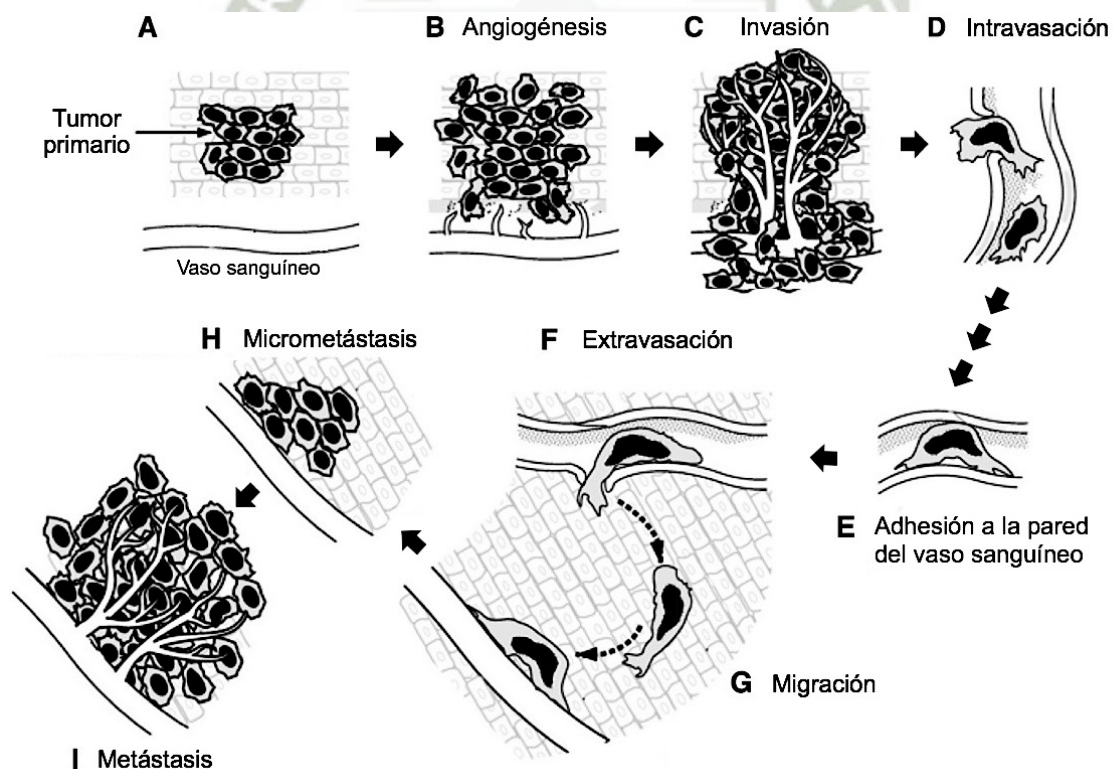


Figura 2 – Proceso de formación de tumores metastásicos. (A) Un tumor primario tiene la capacidad de (B) producir factores angiogénicos que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis tumoral). (C) La neovascularización favorece la

rápida expansión del tumor (invasión), a través **(D)** del ingreso de las células tumorales al flujo sanguíneo (intravasación). **(E)** En el torrente sanguíneo, las células tumorales interactúan con las células endoteliales, para luego **(F)** salir a través de la pared del vaso sanguíneo (extravasación) y **(G)** migrar hacia los vasos sanguíneos más próximos, **(H)** favoreciendo así la formación de micrometástasis. **(I)** La iniciación de la angiogénesis en el sitio secundario, libera a las colonias metastásicas de la dormancia, y en consecuencia permite su rápido crecimiento. Adaptado de Zetter (1998) ⁴⁵.

1.3 Microambiente tumoral

La progresión tumoral no se define únicamente por las diversas características adquiridas por las células tumorales, sino que también engloba las contribuciones del microambiente tumoral ^{4,5}.

En la mayoría de los cánceres, las células tumorales están rodeadas por un microambiente complejo formado por la matriz extracelular (MEC), células estromales, vasos sanguíneos y linfáticos (Figura 3) ⁴⁶. Esta elaborada infraestructura promueve la transformación neoplásica; protegiendo al tumor del sistema inmune, ayudando al crecimiento del tumor y favoreciendo la invasión y metástasis tumoral ⁴⁷.

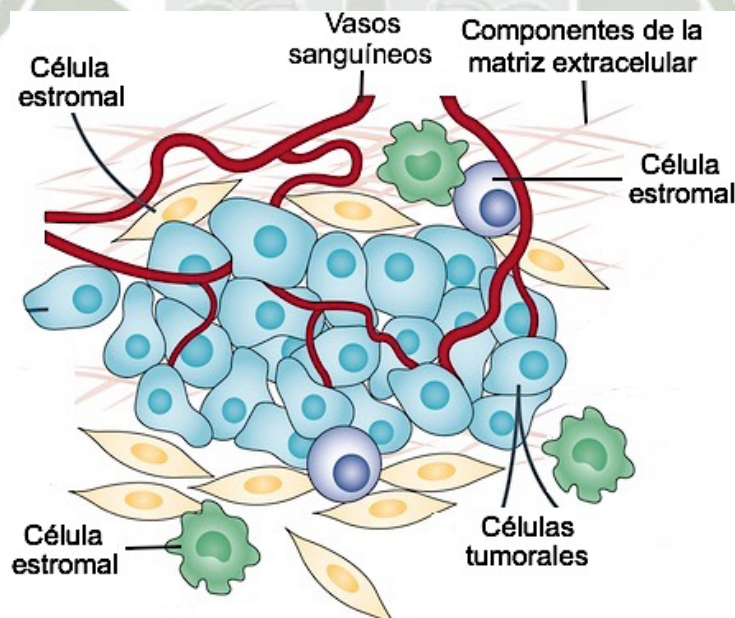


Figura 3 – Esquema representativo del microambiente tumoral. Adaptado de Bresnick (2015) ⁴⁸.

El microambiente tumoral es reconocido por ser el producto de la interacción entre diferentes tipos celulares⁵. Estas células se comunican entre sí (señalización paracrina y autocrina), a través de una compleja y dinámica red de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y enzimas proteolíticas, que hacen posible la progresión tumoral^{4,49}.

1.3.1 Células estromales

Las células estromales asociadas a tumores, representan una población celular heterogénea no transformada⁵⁰. Estas células se han agrupado en tres clases generales⁵:

- **Células vasculares angiogénicas**, que incluyen pericitos y células endoteliales.
- **Células inmunes infiltrantes**, que incluyen plaquetas, mastocitos, neutrófilos, monocitos inflamatorios, células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y células natural *killer* (NK).
- **Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs)**, que incluyen fibroblastos activados, adipocitos activados, células madre mesenquimales (MSCs) y α -actina de músculo liso (α -SMA) con miofibroblastos.

Las células estromales tienen una función dinámica en la promoción de la progresión tumoral. Así, por ejemplo, los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) propician una red de comunicación a través de la secreción de factores de crecimiento y quimiocinas, los cuales inducirán cambios en la matriz extracelular, aumentando la proliferación e invasión tumoral^{41,51,52}.

Por otro lado, las células inmunes infiltrantes junto con las células tumorales, producen sustancias inflamatorias que actúan como agentes químicos, favoreciendo la proliferación celular. La inflamación, por lo tanto, puede acelerar el ciclo celular, prevenir la apoptosis y estimular la angiogénesis, el cual es esencial para el crecimiento de tumores sólidos^{49,53,54}.

Asimismo, las células tumorales secretan una variedad de proteínas, tales como: factores de crecimiento y enzimas proteolíticas, las cuales están involucradas en procesos de adhesión celular, motilidad, comunicación intercelular e invasión⁵⁵.

1.3.2 Matriz extracelular (MEC)

La MEC representa una red tridimensional, compuesta principalmente por dos clases de macromoléculas ⁵⁶:

- **Proteínas fibrosas** (colágeno y elastina) que tienen funciones estructurales.
- **Proteínas no fibrosas** (laminina, fibronectina, tenascina, entactina, entre otras) que son importantes en la adhesión celular.

Ambas proteínas se encuentran inmersas en una sustancia fundamental, la cual está formada por glicosaminoglicanos y proteoglicanos, asociados a glicoproteínas estructurales, agua y sales ⁵⁶.

La MEC no sólo propicia soporte estructural e integridad del tejido, sino también funciona como un lugar de anclaje a la membrana basal, el cual es esencial para varios procesos biológicos (como la división celular asimétrica y mantenimiento de la polaridad del tejido). Además, la MEC puede funcionar como una barrera que bloquea la migración de las células; o como un camino que facilita la migración celular (Figura 4) ⁵⁷.

Algunos componentes de la MEC (como los proteoglicanos) pueden enlazarse selectivamente a diversos factores de crecimiento, impidiendo su difusión libre y consecuentemente la activación de diversas vías de señalización. Por otro lado, los proteoglicanos pueden activar vías de señalización, ya que estos pueden funcionar como co-receptores y presentadores de señales. La MEC también puede iniciar directamente eventos de señalización, esto a través de la liberación de fragmentos bioactivos, los cuales fueron procesados por enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas (MMPs) (Figura 4) ⁵⁸⁻⁶⁰.

Además, las células sienten directamente las propiedades biomecánicas de la MEC, incluyendo su rigidez, lo que desencadena una gran variedad de comportamientos en las células (Figura 4) ^{58,59}.

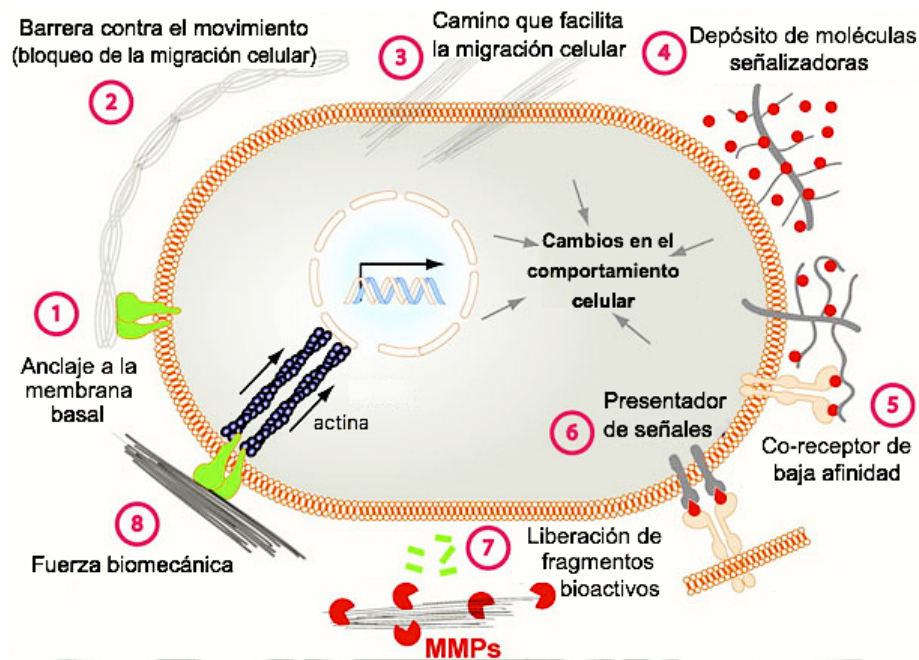


Figura 4 – Esquema representativo de la funcionalidad de la MEC. Adaptado de Lu (2012)⁵⁷.

Por consiguiente, el papel de la MEC en el microambiente tumoral, no se limita a actuar como una barrera física contra la invasión tumoral, sino también sirve como depósito para factores biológicamente activos, tales como: factores de crecimiento, citocinas, enzimas proteolíticas, hormonas, entre otros; los cuales influyen la migración, proliferación y adhesión celular^{6,7,61}.

1.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de calcio y zinc que comparten características estructurales básicas. La estructura de las MMPs, por lo tanto, comprende una serie de dominios, tales como: un péptido señal, un pro-dominio, un dominio metaloproteína con un sitio de unión a zinc (dominio catalítico), una región bisagra y un dominio tipo hemopexina. Las MMPs que presentan dicha estructura son secretadas para la MEC; no obstante, algunas MMPs pueden presentar un dominio transmembrana, el cual las mantiene asociadas a la membrana celular (MT-MMP) (Figura 5B)⁶².

Inicialmente, las MMPs son sintetizadas como zimógenos o proenzimas, cuya inactivación se mantiene gracias a la interacción entre los residuos de cisteína (presentes

en el pro-dominio) y el ion Zn^{+2} (presente en el dominio catalítico). Sin embargo, cuando esta interacción se rompe por acción de otras enzimas proteolíticas o por modificaciones químicas (como estrés oxidativo y detergentes) en los residuos de cisteína; el pro-dominio es removido y el sitio catalítico queda expuesto para interactuar con sustratos específicos (Figura 5A) ⁶³⁻⁶⁵.

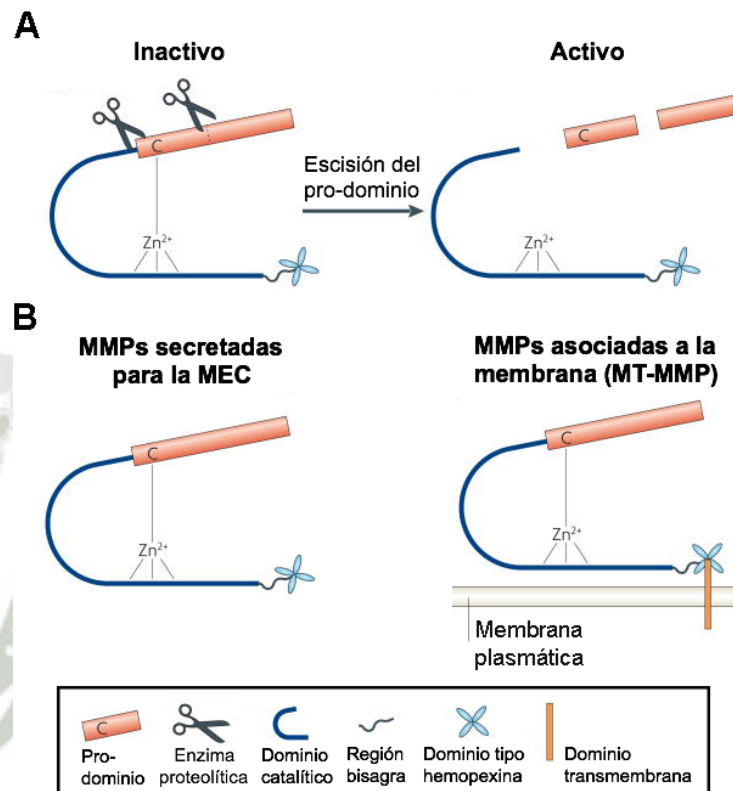


Figura 5 – Estructura esquemática de las MMPs. (A) Activación de las MMPs. (B) Grupos de MMPs. Adaptado de Page-Mccaw (2007) ⁶⁶.

La principal función de las MMPs es la degradación de diversas macromoléculas presentes en la MEC y en la superficie de la célula. Entre estas macromoléculas se encuentran el colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos, factores de crecimiento, receptores tirosina quinasa, moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas, entre otras MMPs ^{63,64,67,68}. De esta forma, las MMPs actúan desorganizando la MEC, a través de procesos que alteran las interacciones célula-célula y célula-MEC ⁶.

Las MMPs no participan solo en la remodelación de la MEC, sino también en los procesos de vascularización, proliferación, diferenciación y migración celular ^{66,68,69}. Por

consiguiente, las MMPs están implicadas en todas las etapas de la progresión tumoral, puesto que estas son abundantemente expresadas en varias neoplasias malignas ⁷⁰.

1.5 Adamalisininas

De acuerdo con la base de datos para enzimas proteolíticas MEROPS, las adamalisininas pertenecen a la superfamilia de MMPs; y poseen algunos dominios homólogos entre sí, como el dominio metaloproteinasa (dominio catalítico), el dominio similar a desintegrina y el dominio rico en cisteína (Figura 6) ^{71,72}.

La familia de adamalisininas incluye dos grandes subgrupos de enzimas proteolíticas ¹⁵.

- **ADAMs (Una desintegrina y metaloproteinasa)**

Son enzimas asociadas a la membrana plasmática, cuya estructura está compuesta por un péptido señal, un pro-dominio, un dominio metaloproteinasa (dominio catalítico), un dominio similar a desintegrina, un dominio rico en cisteína, un dominio similar al EGF (factor de crecimiento epidérmico), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (C-terminal) (Figura 6) ¹⁵.

- **ADAMTSs (Una desintegrina y metaloproteinasa con repeticiones de trombospondina)**

A diferencia de las ADAMs, las ADAMTSs no presentan un dominio transmembrana, por lo tanto, son secretadas para la MEC. Actualmente se conocen 19 miembros de esta familia, todos ellos comparten una estructura en común, la cual comprende a partir del extremo N-terminal: un péptido señal, un pro-dominio, un dominio metaloproteinasa (dominio catalítico), un dominio similar a desintegrina, una trombospondina (TSP) central, un dominio rico en cisteína y una región espaciadora. La diferencia entre los diferentes miembros de las ADAMTS, está en la cantidad de repeticiones de TSP y la presencia de algunos dominios adicionales (como los dominios PLAC, dominios Gon-1, dominios Cub y los dominios similares a mucina) en el extremo C-terminal (Figura 6) ^{15,16}.

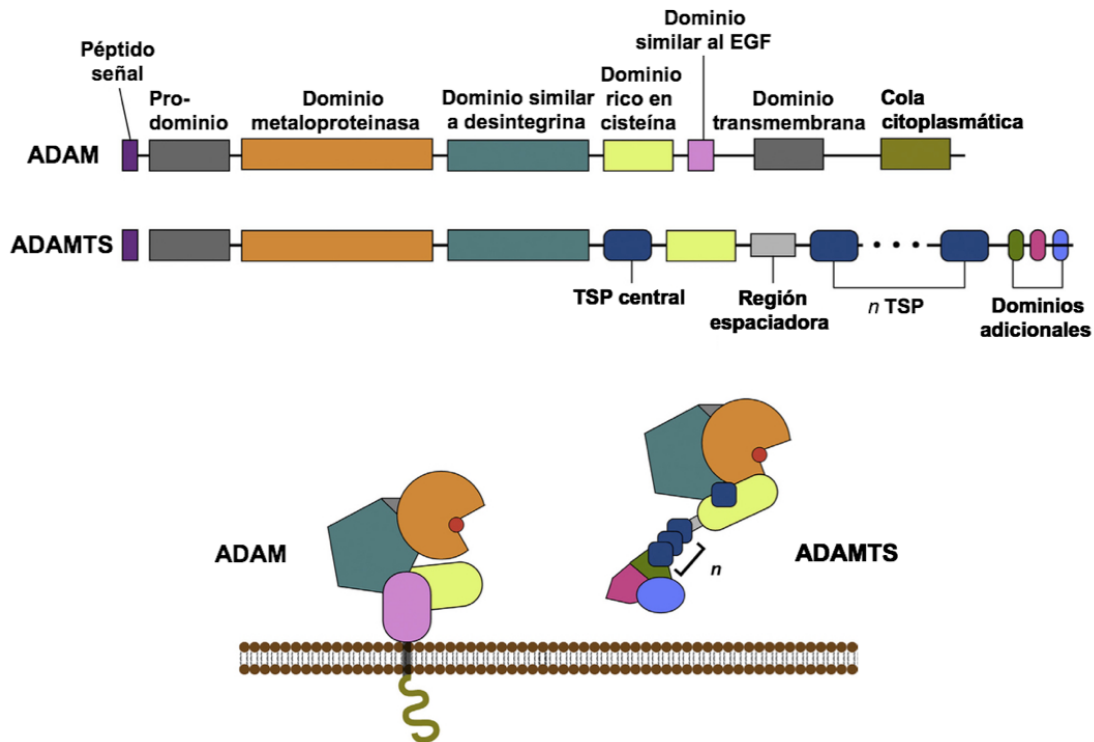


Figura 6 – Estructura esquemática de las ADAMs y ADAMTSs. Adaptado de Yang (2017) ⁷³.

De la misma forma que las MMPs, las ADAMs y ADAMTSs necesitan de la escisión del pro-dominio, para ser activadas ^{15,72}.

1.5.1 ADAMTS-1 (Una desintegrina y metaloproteínasa con repeticiones de trombospondina del tipo 1)

La ADAMTS-1 es el primer miembro identificado de la familia ADAMTS. Inicialmente, la ADAMTS-1 fue descrita como un mediador de la inflamación ⁸. Sin embargo, la actividad de esta enzima ha sido asociada con la organogénesis ^{11,12}, foliculogénesis ovárica, formación de vasos sanguíneos y linfáticos ^{13,14} y cáncer ¹⁵.

La estructura de la ADAMTS-1 se caracteriza por presentar a partir del extremo N-terminal: un péptido señal, un pro-dominio, un dominio metaloproteínasa (dominio catalítico), un dominio similar a desintegrina, una trombospondina del tipo 1 (TSP1) central, un dominio rico en cisteína, una región espaciadora y dos repeticiones de TSP1 en el extremo C-terminal ⁸.

Inicialmente, la ADAMTS-1 es sintetizada como zimógeno o proenzima (110 kDa), encontrándose inactiva en el citoplasma de la célula. Sin embargo, cuando pasa por dos eventos de procesamiento, las formas maduras (activas) de 87 kDa y 65 kDa son liberadas para la MEC. Así, para la secreción de la forma madura de 87 kDa se requiere la escisión del pro-dominio, por endopeptidasas furina. Mientras que la segunda forma de 65 kDa, requiere la escisión de las dos repeticiones de TSP1 localizadas en el extremo C-terminal; esta escisión puede ocurrir por acción de la misma ADAMTS-1 u otras MMPs (Figura 7)^{74,75}.

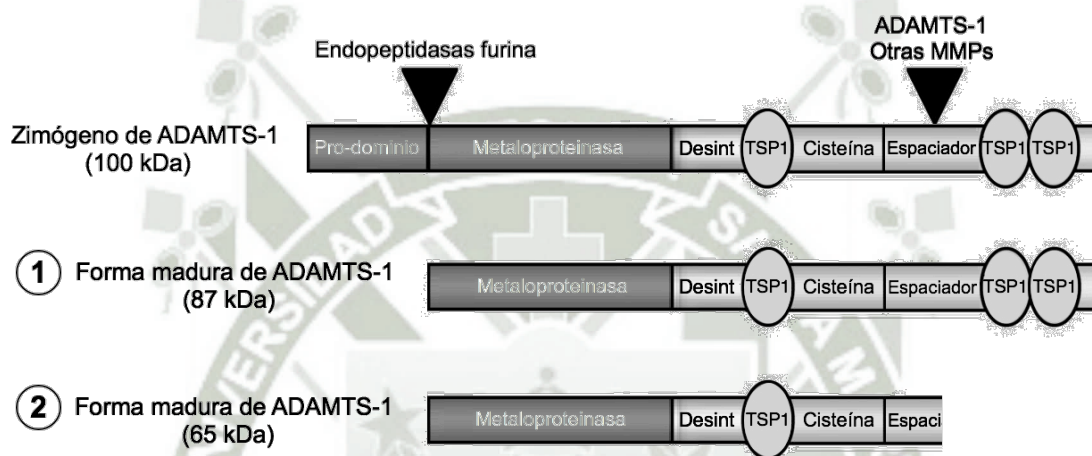


Figura 7 – Formas de la ADAMTS-1. Adaptado de Rodríguez-Manzanaque (2000)⁷⁵.

Generalmente, la ADAMTS-1 actúa en la remodelación de la MEC a través de la degradación (proteólisis) de sustratos específicos (presentes en la MEC), tales como: colágeno tipo I⁷⁴, entactina, glicoproteína TSP1^{76,77}, glicosaminoglicano condroitín sulfato y proteoglicanos agregano, versicán, brevicán^{78,79}. Sin embargo, cuando el extremo C-terminal sufre de proteólisis, la ADAMTS-1 expande sus propiedades funcionales, alterando su capacidad de unión y reconocimiento de diversas proteínas presentes en la MEC y en la superficie celular⁷⁵.

1.6 Ensayos utilizados para el estudio de la ADAMTS-1

1.6.1 Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas fueron:

- **Células humanas de fibrosarcoma (HT1080)**

Se generó a partir de un tejido tomado en una biopsia de fibrosarcoma, presente en un varón Caucásico de 35 años. Cabe señalar que el paciente no se había sometido a radiación o quimioterapia, por lo que las células HT1080 carecen del tipo de mutaciones que comúnmente causan estos tratamientos. Además, las células HT1080 muestran una gran cantidad de mitosis (división celular descontrolada) y una falta de inhibición por contacto, formando así colonias en el medio de cultivo ⁸⁰. Actualmente, las células HT1080 representan un modelo celular bastante utilizado en ensayos relacionados a secreción de MMPs, invasión, migración celular y metástasis ^{81,82}.

- **Células embrionarias de riñón humano transformadas (HEK293T)**

Es una línea celular no tumoral, generada a partir de las células HEK293 (células de riñón perteneciente a un embrión humano), las cuales fueron transfectadas de forma estable con un plásmido que codifica al gen del antígeno T grande de SV-40 (virus del simio 40), cabe señalar que este no se une al ADN y es sensible a la temperatura ⁸³. Por lo tanto, las células HEK293T son comúnmente usadas para producir proteínas y retrovirus recombinantes, puesto que presentan una alta eficiencia de transducción ⁸⁴.

1.6.2 Transducción

Es el proceso mediante el cual un virus o un vector viral (como los lentivirus), introduce ADN o ARN extraño en una célula huésped. Estos lentivirus son producidos previamente por co-transfección de tres plásmidos (vectores) en una célula productora (ANEXO 1); generando así partículas lentivirales que contienen el ARN genómico (viral) de interés. Específicamente, los vectores lentivirales tienen la capacidad de retrotranscribir el ARN genómico en una molécula de ADNc; el cual es capaz de integrarse de forma estable al genoma de la célula huésped, garantizando así la expresión estable y duradera del transgén ⁸⁵⁻⁸⁷.

1.6.3 PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN, de forma extremadamente rápida. Puesto que la PCR está diseñada de acuerdo con el principio natural de replicación del ADN; este se desarrolla en varios ciclos que se repiten un número específico de veces. Cada ciclo está formado por tres etapas (i) **desnaturalización** del ADN de doble cadena, (ii) **hibridación** de los cebadores o *primers* a zonas específicas de cada una de las hebras, y (iii) **elongación** del cebador por actuación de la DNA polimerasa ⁸⁸.

Por otro lado, la RT-qPCR es una combinación de tres pasos: (i) la síntesis del ADNc a partir del ARN, por acción de una enzima transcriptasa inversa (RT); (ii) la amplificación del ADNc a través de PCR; y (iii) la detección y cuantificación de la amplificación de los productos en tiempo real ⁸⁹. De esta forma es posible cuantificar con alta precisión, tanto los niveles de ADN como los de ARN ^{90,91}.

1.6.4 Western Blotting o Immunoblotting

Es un técnica utilizada para identificar con un anticuerpo específico un antígeno particular dentro de una mezcla compleja de proteínas que se ha fraccionado en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmovilizado en una membrana. De esta forma, se puede determinar una serie de características de los antígenos proteicos, tales como: la presencia y la cantidad de un antígeno, el peso molecular relativo de la cadena polipeptídica y la eficacia de la extracción del antígeno ^{92,93}.

1.6.5 Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

Es una técnica utilizada para estudiar la proliferación celular en cultivo. El fundamento de esta técnica se basa en la incorporación del BrdU (nucleótido sintético análogo a la timidina) al ADN de las células, durante el proceso de replicación (fase S). Esta incorporación es detecta por un método indirecto, que comúnmente usa un anticuerpo específico (anti-BrdU) conjugado a un sistema reportero, tal como un fluorocromo o una enzima. De esta forma es posible detectar a las células que entraron en la fase S del ciclo celular ⁹⁴⁻⁹⁶.

1.6.6 Microscopía de *time-lapse*

Esta técnica es frecuentemente usada para observar y caracterizar directamente el comportamiento migratorio de células vivas. Gracias a esta técnica se logra comprimir un evento de un tiempo, que por lo general es muy larga y lenta, en una secuencia de vídeo de tan solo unos segundos o minutos de duración^{97,98}.

Básicamente, la microscopía de *time-lapse* consiste en la captura de varias imágenes fijas (siempre desde un mismo lugar) en intervalos regulares, durante largos períodos de tiempo. Estas imágenes son después reproducidas a una velocidad mayor a la que fueron tomadas, creando la ilusión de imágenes aceleradas. A partir de estas imágenes, son marcadas las posiciones de las células individuales, rastreando así los cambios posicionales (de seguimiento) de las células a lo largo del tiempo⁹⁹.

1.6.7 Estudio *in vivo* usando el modelo de *zebrafish*

El *zebrafish* fue escogido como modelo *in vivo*, ya que es un organismo capaz de desarrollar casi cualquier tipo de tumor con una morfología similar al del ser humano¹⁰⁰. Además, el desarrollo del embrión fuera del útero y la transparencia de este antes de entrar a la vida adulta, permite visualizar moléculas fluorescentes dentro del animal intacto^{101,102}. Por último, cabe señalar que el sistema inmunitario adaptativo de los embriones se desarrolla completamente (morfológica y funcionalmente maduro) entre las 4-6 semanas de vida. De esta forma es posible inyectar células tumorales humanas, sin riesgo de que sean atacadas por el sistema inmunitario del *zebrafish*¹⁰³.

En la presente tesis fue utilizada la línea de *zebrafish*: Tg (fli1:eGFP), línea transgénica que se caracteriza por expresar la proteína verde fluorescente (GFP) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del *zebrafish*¹⁰⁴.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Muestras y/o unidades biológicas

- Células humanas de fibrosarcoma (HT1080).
- Células embrionarias de riñón humano transformadas (HEK293T).
- Embriones de *zebrafish* transgénicos, Tg (fli1:eGFP).

2.1.2 Medios de cultivo

- Medio Esencial Mínimo, MEM (*Vitrocell Embriolife*).

2.1.3 Material de laboratorio

- Pipetas serológicas (5 y 10 ml)
- Puntas para micropipetas
- Tubos de centrífuga (15 y 50 ml)
- Cámara de Neubauer
- Placas de Petri para cultivo celular (35, 60 y 100 mm)
- Placas de cultivo celular con 6, 12, y 24 pocillos
- Laminillas cubreobjetos redondos de 13 mm de diámetro
- Microtubos (0.6, 1.5 y 2 ml)
- Filtro para botellas (tamaño de poro de 0.22 μm)
- Filtro para jeringas (tamaño de poro de 0.45 μm)
- Beakers (100, 500 y 1000 ml)
- Probeta (100, 500 y 1000 ml)
- Matraz (250 ml)
- Jeringas (10 y 20 ml)
- Láminas Portaobjetos
- Tubos de polipropileno para PCR de 200 μl
- Placas de polipropileno para PCR con 96 pocillos
- Placa de fondo plano con 96 pocillos

- Raspadores de células
- Membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.45 μm
- Filme plástico para microplaca de PCR

2.1.4 Insumos y reactivos químicos

- Agua destilada
- Agua ultrapura
- Partículas lentivirales HPK-LvTR-20 que contienen elevados niveles de ARNm de ADAMTS-1 y mCherry (*GeneCopoeia*)
- Partículas lentivirales HPK-LvTR-20 que contienen elevados niveles de ARNm de mCherry (*GeneCopoeia*)
- Anticuerpo anti-ADAMTS-1 (*Abcam*)
- Anticuerpo anti- β -actina (*Sigma-Aldrich*)
- Inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugado con HRP (*Cell signaling*)
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugado con HRP (*GE Healthcare Life Sciences*)
- Anticuerpo biotinilado anti-BrdU (*Millipore*)
- Bromodeoxiuridina, BrdU (*Sigma-Aldrich*)
- Suero fetal bovino, SFB (*Cultilab*)
- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 (*Sigma-Aldrich*)
- Tripsina-EDTA 0,25% (*Sigma-Aldrich*)
- Tampón fosfato salino, PBS (*Gibco*)
- Polibreno (*Sigma-Aldrich*)
- Puromicina (*Sigma-Aldrich*)
- β -mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*)
- Solución de descontaminación, RNaseZap™ (*Thermo Fisher Scientific*)
- Agarosa (*Sigma-Aldrich*)
- Bromuro de etidio (*Sigma-Aldrich*)
- Tampón de carga de gel de ARN (*Thermo Fisher Scientific*)
- SYBR® Green PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*)
- Primers o cebadores *forward* y *reverse* de ADAMTS-1 (*Sintese Biotecnologia*)
- Primers o cebadores *forward* y *reverse* de GAPDH (*Sintese Biotecnologia*)

- Estándar de peso molecular de 1Kb (*Sigma-Aldrich*)
- Cóctel de inhibidores de proteasas (*Sigma-Aldrich*)
- Etanol 99.8% grado absoluto (*Synth*)
- Leche deshidratada sin grasa (*Molico*)
- Marcador de peso molecular de proteínas preteñido, Kaleidoscope™ (*Bio-Rad*)
- Paraformaldehído (*Sigma-Aldrich*)
- Metanol (*Synth*)
- Ácido clorhídrico, HCl (*Synth*)
- Ácido bórico (*Sigma-Aldrich*)
- Hidróxido de sodio (*Sigma-Aldrich*)
- Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- Albumina de suero bovino, BSA (*Sigma-Aldrich*)
- Estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (*Thermo Fisher Scientific*)
- Estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 555 (*Thermo Fisher Scientific*)
- Medio de montaje ProLong con DAPI (*Thermo Fisher Scientific*)
- N-feniltiourea, PTU (*Sigma-Aldrich*)
- 3-aminobenzoico, tricaína (*Sigma-Aldrich*)
- Cloruro de sodio, NaCl (*Sigma-Aldrich*)
- Cloruro de potasio, KCl (*Sigma-Aldrich*)
- Cloruro de calcio, CaCl₂ (*Sigma-Aldrich*)
- Sulfato de magnesio, MgSO₄ (*Sigma-Aldrich*)
- Fosfato disódico, Na₂HPO₄ (*Merck*)
- Desoxicolato de sodio (*Sigma-Aldrich*)
- Fosfato de potasio monobásico, KH₂PO₄ (*Sigma-Aldrich*)
- Persulfato de amonio, (NH₄)₂S₂O₈ (*Sigma-Aldrich*)
- Solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30% (*Bio-Rad*)
- Tris base (*Sigma-Aldrich*)
- Glicina (*Sigma-Aldrich*)
- Tween 20 (*Bio-Rad*)
- Tris HCl (*Sigma-Aldrich*)

- Glicerol (*Merck*)
- Dodecil sulfato de sodio, SDS (*Merck*)
- Azul de bromofenol (*Synth*)
- Tampón RIPA (*Sigma-Aldrich*)
- Tetrametiletilendiamina, TEMED (*Bio-Rad*)

2.1.5 Kits Comerciales

- Kit para la extracción y purificación de ARN, *PureLink™ RNA Mini* (*Thermo Fisher Scientific*)
- Kit para sintetizar el ADNc, *QuantiNova™ Reverse Transcription* (*Qiagen*)
- Kit para la detección colorimétrica y cuantificación del total de proteínas basado en el ácido bicinconínico, *Pierce™ BCA* (*Thermo Fisher Scientific*)
- Kit para la detección de proteínas por quimioluminiscencia, *Clarity™ Western ECL Substrate* (*Bio-Rad*)

2.1.6 Equipos e instrumentación

- Cabina de seguridad biológica (*BioVanguard Class II Type A2*)
- Centrifugadora
- Incubadora de CO₂
- Microscopio invertido de luz
- Autoclave
- Refrigerador
- pHmetro
- Balanza analítica
- Microscopio invertido de fluorescencia
- Espectrofotómetro para microplacas
- Fuente de poder para electroforesis
- Sistema de transferencia de proteínas en semi-seco
- Sonicador de vástago
- Freezer -80 °C
- Lector de bandas por luminiscencia MF-ChemiBIS 3.2
- Transiluminador

- Agitador de vaivén
- Sistema de purificación de agua Ultrapura MilliQ
- Termociclador
- Microinyector
- Termociclador en tiempo real
- Microscopio estereoscópico (lupa)
- Sistema de imagen celular automatizado *IN Cell Analyzer*
- Pipetas automáticas - Micropipetas de: 0.1-2.5, 0.5-10, 2-20, 10-100, 20-200 y 100-1000 μ l
- Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa
- Cámara de electroforesis vertical para proteínas

2.1.7 Otros

- Hielo seco
- Guantes descartables
- Mascarilla
- Hielo

2.2 Métodos

2.2.1 Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Matriz Extracelular del Departamento de Biología Celular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo, São Paulo – Brasil.

2.2.2 Cultivo celular

Las líneas celulares HT1080 y HEK293T se obtuvieron del Banco de células de Río de Janeiro (BCRJ, Brasil) (Figura 8). Ambas líneas celulares fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), a 37 °C en un entorno humidificado con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue cambiado a cada 2 o 3 días, de acuerdo con el metabolismo celular; y la proliferación de las células fue monitoreada diariamente, a través de un microscopio invertido de contraste de fases.

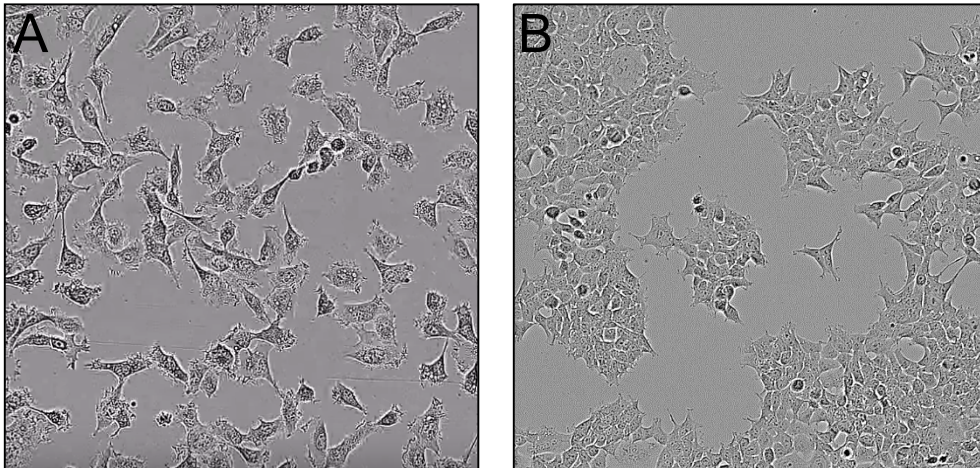


Figura 8 – Células (A) HT1080 y (B) HEK293T cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de SFB. Imágenes adquiridas a las 36 horas de cultivo.

Antes de alcanzar el 80% de confluencia, las células fueron subdivididas mediante desprendimiento enzimático con 0,25% de tripsina-EDTA a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se inactivó la tripsina con la adición de MEM suplementado con 10% de SFB. Las suspensiones de células fueron colectadas y transferidas a unos tubos, y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes, y cada uno de los pellets fue resuspendido en 1ml de MEM suplementado con 10% de SFB. Dichas suspensiones fueron distribuidas y cultivadas en diferentes placas, dependiendo del experimento a ser realizado.

2.2.3 Transducción de las líneas celulares HT1080 y HEK293T

Para sobreexpresar la ADAMTS-1, se utilizaron partículas virales HPK-LvTR-20 que contienen elevados niveles de ARNm de ADAMTS-1 y mCherry. Como control se utilizó partículas virales HPK-LvTR-20 que contienen apenas elevados niveles de ARNm de mCherry. Dichas partículas fueron construidas y proporcionadas por la empresa GeneCopoeia™ (Rockville, MD, USA), la cual utilizó el vector lentiviral pReceiver-Lv213 (ANEXO 2).

Para el proceso de transducción, las células HT1080 y HEK293T fueron incubadas con las partículas virales y 10 µg/ml de polibreno (polímero de carga positiva, encargado de desestabilizar la membrana plasmática de la célula) en MEM suplementado con 5% de SFB inactivado. Se mantuvieron a las células en esta condición durante 1 hora a 4 °C.

Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue sustituido por MEM con 10% de SFB; y las células regresaron a 37 °C en un entorno humidificado con 5% de CO₂. Después de 5 días de incubación, las células transducidas fueron seleccionadas con 1 mg/ml de puromicina, durante 6 días.

Luego de confirmar la eficiencia de la transducción, a través de los ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) y *Western Blotting*, las células transducidas fueron cultivadas en MEM con 10% de SFB, a 37 °C en un entorno humidificado con 5% de CO₂. Estas células fueron subdivididas, según el protocolo anteriormente descrito, y usadas en experimentos posteriores.

2.2.4 PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Las células transducidas junto con sus respectivos controles, fueron cultivadas en placas con MEM suplementado con 10% de SFB. Antes de alcanzar una confluencia del 70%, las células pasaron por un periodo de *Starving* (eliminación del SFB del medio de cultivo, con el fin de sincronizar a las células y reducir la interferencia analítica proveniente del suero) de 24 horas; para esto, se lavó las células con PBS y se adicionó el MEM libre de suero.

Posteriormente, se utilizó el Kit *PureLink RNA Mini* para extraer y purificar el ARN total de las células, este procedimiento fue realizado según las instrucciones especificadas por el fabricante (ANEXO 3). Una vez extraído el ARN, se determinó su concentración total mediante espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm y 280 nm; y su pureza e integridad fue evaluada a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este fue preparado con tampón TAE 1X (40 mM de tris-acetato y 1 mM de EDTA pH 8) y 1 µg/ml de bromuro de etidio. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%; xilenecyanol 0,25% y glicerol 80%) antes de ser cargadas en el gel de agarosa.

Previamente, 1 µg de ARN extraído fue tratado con DNasa I, esto para eliminar el ADN contaminante y evitar falsos positivos. Seguidamente, se sintetizó el ADNc utilizando el Kit de *Transcriptasa Reversa QuantiNova*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ANEXO 4).

Antes de realizar a cabo la reacción de PCR, se realizaron las diluciones correspondientes del ADNc y los cebadores sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) para el gen de ADAMTS-1 y GAPDH. Finalmente, se llevó a cabo la reacción de PCR en un volumen total de 20 μ l. Cada reacción estuvo compuesta de: 100 ng de ADNc previamente sintetizado, 500 μ M de los cebadores sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) para el gen de ADAMTS-1 o 250 μ M de los cebadores sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) para el gen de GAPDH y 10 μ l de la mezcla de reacción (*SYBR Green Master Mix* que contiene: colorante *SYBER Green I*, ADN polimerasa *AmpliTaq Gold*, dNTPs con dUTPs, referencia pasiva y un tampón optimizado). Los cebadores fueron previamente diseñados por miembros del laboratorio (Tabla 1).

Cebadores	Secuencia <i>forward</i> (5' – 3')	Secuencia <i>reverse</i> (3' – 5')
ADAMTS1	GGACAGGTGCAAGCTCATCTG	TCTACAACCTTGGGCTGCAA
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

Tabla 1 – Secuencias de los cebadores diseñados para los ensayos de RT-qPCR

La RT-qPCR se realizó en el Termociclador StepOnePlus (*Applied Biosystems*); y el perfil de amplificación fue el siguiente: Desnaturalización a 95 °C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C (hibridación) y 30 segundos a 72 °C (elongación).

La expresión relativa del gen ADAMTS-1 fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH (*housekeeping*). De esta forma, los cambios en los niveles de expresión del gen ADAMTS-1, se estableció a través de los valores CT obtenidos. Y la expresión relativa del gen ADAMTS-1 fue calculada por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁰⁵.

2.2.5 Western Blotting

A partir de las células transducidas se analizó: el lisado celular y el medio condicionado (medio libre de suero que contiene metabolitos, factores de crecimiento y proteínas de la MEC, los cuales fueron secretados por las células cultivadas).

Inicialmente, las células transducidas junto con sus respectivos controles, fueron cultivadas en placas con MEM suplementado con 10% de SFB. Antes de alcanzar un 70% de confluencia; las células fueron lavadas con PBS, y se adicionó MEM libre de suero.

Después de 24 horas, los medios condicionados fueron colectados en microtubos, conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (endopeptidasas). A seguir, las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, con el fin de remover a las células que se desprendieron de la placa. El sobrenadante obtenido fue transferido a un microtubo nuevo, donde rápidamente se añadió etanol frío al 99,8%. Dichas muestras fueron incubadas en hielo seco durante 15 minutos, y luego centrifugadas a 13400 rpm durante 10 minutos a 4 °C. De esta vez, el sobrenadante fue descartado, y nuevamente se añadió etanol frío al 99,8%. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 13400 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos fueron descartados; y los microtubos conteniendo las muestras precipitadas, se dejaron secando a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez secas, los pellets fueron resuspendidos en tampón RIPA.

Simultaneo a la precipitación de los medios condicionados, fue realizado la lisis celular (ruptura de la membrana plasmática de las células) con un raspador de células y un tampón RIPA conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (endopeptidasas). Los lisados fueron colectados, sonicados y centrifugados a 15500 rcf durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes (que contienen a las proteínas solubles) se transfirieron a microtubos nuevos e inmediatamente fue realizada la cuantificación proteica, a través del Kit de BCA.

Tanto a las muestras del lisado como del medio condicionado, se les añadió un tampón de muestra (SDS 3%, 150 mM Tris pH 6.8, mercaptoetanol 15%, glicerol 30% y azul de bromofenol 0.01%), y fueron sometidas a 95 °C en baño maría por 5 minutos. La electroforesis se realizó siguiendo el método de SDS-PAGE, en donde 30 µg de proteínas fueron separados en gel de poliacrilamida al 10% (preparado con 1.5 M Tris-HCl, SDS 10%, bis-acrilamida 30%, persulfato de amonio 10% y TEMED). Luego de la separación de los fragmentos proteicos mediante SDS-PAGE, las proteínas fueron electro transferidos a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm, utilizando el sistema de transferencia en semi-seco.

Finalmente, las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en tampón TBS-tween (TBST; Tris 25 mM, NaCl 0.14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7.4). Después de 1 hora de bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche con el

anticuerpo anti-ADAMTS-1 (ab28284), diluido 1:1000 en tampón TBS. Al día siguiente, fueron realizados 3 lavados de 5 minutos con TBST; seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, diluido 1:5000 en TBST. Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron sometidas a revelación, utilizando el Kit para la detección de proteínas por quimioluminiscencia *Clarity™ Western ECL Substrate*, y el lector de bandas MF-ChemiBIS 3.2 (*DNR Bio-Imaging Systems*). Este mismo protocolo fue utilizado para la marcación con el anticuerpo anti- β -actina, diluido 1:1000 en tampón TBST; sin embargo, el anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de ratón, diluido 1:5000 en TBST.

2.2.6 Colecta del medio condicionado (MC)

Los medios condicionados se colectaron a partir de las células HEK293T no transducidas (Control) y células HEK293T transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1. Ambos grupos de células fueron cultivados en placas con MEM suplementado con 10% de SFB. Cuando los cultivos celulares alcanzaron un 85% de confluencia, se lavaron con PBS y se añadió MEM libre de suero. Las células pasaron 36 horas en esta condición, antes de ser colectados sus medios condicionados; los cuales fueron filtrados en membrana de 0,45 μm (tamaño de poro), para remover los fragmentos o residuos de células.

El medio condicionado obtenido de las células HEK293T no transducidas (*MC Control*) y el medio condicionado obtenido de las células HEK293T transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1 (*MC enriquecido con ADAMTS-1*), fueron inmediatamente utilizados en los ensayos de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) y microscopía de *time-lapse*.

2.2.7 Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

Las células HT1080 transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1, junto con su respectivo control, fueron cultivados en la concentración de 5000 células/laminillas cubreobjetos redondos de 13 mm, en placas de 24 pocillos con MEM suplementado con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación, las células pasaron por un periodo de *Starving* (anteriormente descrito) de 48 horas. A seguir, el medio fue sustituido por: MEM

suplementado con 10% de SFB, o un nuevo MEM libre de suero. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 48 horas.

En paralelo, se analizaron los medios condicionados (MCs) anteriormente colectados, sobre las células HT1080 (tipo salvaje). Para esto, las células HT1080 fueron cultivadas en la concentración de 5000 células/laminillas cubreobjetos redondos de 13 mm, en placas de 24 pocillos con MEM suplementado con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación, las células pasaron por un periodo de *Starving* de 48 horas. A seguir, las células fueron tratadas con un *MC enriquecido con ADAMTS-1* o un *MC Control*, en la ausencia o presencia de SFB 10%. El tiempo de tratamiento fue de 48 horas.

Posteriormente, las células fueron incubadas con 5 μ M de BrdU durante 1 hora. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con 4% de paraformaldehído durante 10 minutos. El ADN de las células fue desnaturalizado con 2 N de HCl durante 30 minutos, y neutralizado con 0.1 M de tampón borato (0.1 M ácido bórico, 0.15 M NaOH, pH 8.4) durante 10 minutos. Las células fueron incubadas con 0.3% de Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos, y bloqueadas con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.3% de Tritón X-100 en PBS. Después de 1 hora de bloqueo, las células fueron incubadas durante toda la noche, con el anticuerpo biotinilado anti-BrdU (MAB 3252B), diluido 1:100 en PBS con 0.1% de Tritón X-100 y 1% de BSA. Al día siguiente, el anticuerpo biotinilado fue detectado con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555, diluida 1:500 en PBS. Después de 1 hora de incubación, las muestras fueron montadas con el medio de montaje ProLong con DAPI.

Finalmente, se tomaron 5 fotos (imágenes) por cada laminilla (muestra), utilizando el objetivo de 20X del microscopio de fluorescencia Axio vert A1 (*Carl Zeiss*), el cual también está equipado con una cámara digital AxionCam MRc.

El porcentaje de células BrdU positivas se calculó a través de la fórmula descrita a continuación:

$$\% \text{ de células BrdU positivas} = \frac{\# \text{ Núcleos marcados con DAPI}}{\# \text{ Núcleos marcados con BrdU}} \times 100$$

2.2.8 Microscopía de *time-lapse*

Las células HT1080 transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1, junto con su respectivo control, fueron cultivados en la concentración de 10000 células/pocillo, en placas de 12 pocillos con MEM suplementado con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación, las células pasaron por un periodo de *Starving* (anteriormente descrito) de 24 horas. El medio fue sustituido por: MEM suplementado con 10% de SFB, o un nuevo MEM libre de suero.

En paralelo, se analizaron los medios condicionados (MCs) anteriormente colectados, sobre las células HT1080 (tipo salvaje). Para esto, las células HT1080 fueron cultivadas en la concentración de 10000 células/pocillo, en placas de 12 pocillos con MEM suplementado con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación, las células pasaron por un periodo de *Starving* de 24 horas. Las células fueron tratadas con un *MC enriquecido con ADAMTS-1* o un *MC Control*, en la ausencia o presencia de SFB 10%.

Inmediatamente fueron adquiridas las imágenes, a través del sistema de microscopía de fluorescencia IN Cell Analyzer 2000 (*GE Healthcare Life Sciences*), utilizando el objetivo de 10X. Las imágenes fueron adquiridas en intervalos de 10 minutos, durante un tiempo total de 12 horas. Durante este procedimiento, las células se mantuvieron a 37 °C en un entorno humidificado con 5% de CO₂.

Finalmente, se unieron todas las imágenes para obtener un video de corta duración. La velocidad de migración fue calculado a través del complemento o *plug-in MtrackJ* para el programa *ImageJ*. Gracias a este *plug-in* fue posible seguir a las células en movimiento, dentro de la secuencia de imágenes adquiridas.

2.2.9 Inyección de células tumorales en embriones de *zebrafish* transgénicos, Tg (*fli1:eGFP*).

Los experimentos con los embriones de *zebrafish*, fueron realizados acuerdo con las normas de bienestar animal, establecido por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo (Protocolo n° 99, página 132, libro 2).

Los embriones fueron colectados del bioterio de peces, y mantenidos en medio de embrión E3 (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.15 mM KH₂PO₄, 1.7 mM NaHCO₃ y 0.00001% de azul de metileno) a 27 °C. Cuando los embriones cumplieron 24 horas de fecundación (Figura 9), fueron transferidos a medio de embrión E3 con 0.1 mM de N-feniltiourea (PTU), esto para evitar la pigmentación de los embriones en periodos futuros.

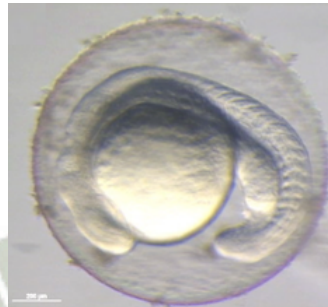


Figura 9 – Imagen de un embrión de zebrafish con 24 hpf (horas post-fecundación).

Simultáneamente, las células HT1080 transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1, junto con su respectivo control, fueron cultivados en placas con MEM suplementado con 10% de SFB. Antes de alcanzar un 80% de confluencia; las células pasaron por un periodo de *Starving* de 48 horas. Posteriormente, las células fueron subdivididas mediante desprendimiento enzimático (anteriormente descrito), y resuspendidas en MEM libre de suero. Las suspensiones de células fueron contadas y subdivididas en grupos de 50 µl conteniendo 10⁶ células.

Cuando los embriones llegaron a las 48 horas de fecundación (Figura 10), fueron anestesiados con 0.003% de 3-aminobenzoico (tricaína), e inyectados con las suspensiones de células, separadamente. La inyección fue realizada en la cavidad pericárdica de los embriones (Figura 10), y se utilizó el picoinjetor-1000 BTX (*Harvard Apparatus Inc*) equipado con una aguja de vidrio de borosilicato de 0,5 mm (diámetro de apertura de la aguja = 10-20 µm). Los parámetros de inyección fueron: presión de inyección = 24 psi; balance = 3 psi; tiempo de inyección = 10 milisegundos.



Figura 10 – Imagen de un embrión de zebrafish con 48 hpf, tratado con PTU. Flechas apuntan el sitio de la inyección.

Los embriones inyectados se mantuvieron en medio de embrión E3 con PTU a 35.5 °C. Después de 4 días de la inyección, los embriones fueron eutanasiados y fijados durante toda la noche con 4% de paraformaldehído a 4 °C en agitación constante. Al día siguiente, los embriones fijados fueron lavados con PBS y montados en una gota de agarosa al 0.8%, en una placa que contiene una laminilla como fondo (Figura 11). Además, se adicionó PBS en la placa de montaje, para evitar que la agarosa y los embriones se sequen.

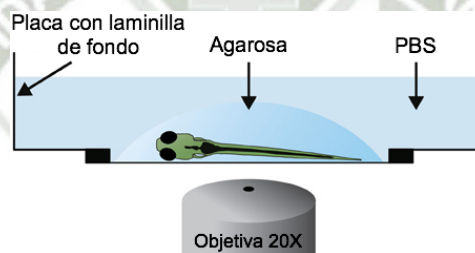


Figura 11 – Representación esquemática del montaje de un embrión, para ser visualizado en el microscopio de fluorescencia.

Finalmente, se tomaron las fotos (imágenes) de los embriones utilizando el objetivo de 20X del microscopio de fluorescencia Axio vert A1 (*Carl Zeiss*), el cual también está equipado con una cámara digital AxionCam MRc. El diámetro de los agregados celulares se midió utilizando el programa *Zen Blue* del microscopio de fluorescencia utilizado.

2.2.10 Análisis de los resultados

Los experimentos se realizaron por triplicado; y los resultados obtenidos se presentaron como promedios \pm error estándar del promedio (SEM). El análisis estadístico fue realizado usando el programa *GraphPadPrism* versión 7.0. Y la diferencia entre dos grupos fue estimada a través de la prueba *t-Student*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Inducción de la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las líneas celulares HT1080 y HEK293T

Las células HT1080 y HEK293T fueron transducidas para sobreexpresar ADAMTS-1 y expresar la proteína mCherry (marcador fluorescente); dichas células fueron llamadas de HT1080-MPA y HEK293T-MPA (mCherry–puromicina–ADAMTS-1). Como control negativo de la transducción de HT1080, se utilizó células HT1080 transducidas apenas para expresar la proteína mCherry, estas células fueron llamadas de HT1080-MPC (mCherry–puromicina–Control). En el caso de las células HEK293T-MPA, se utilizó como control negativo células HEK293T sin transducir (tipo salvaje), las cuales fueron llamadas de HEK293T-C.

El primer ensayo realizado para confirmar la eficacia de la transducción, fue PCR en tiempo real (RT-qPCR). A través de este ensayo se cuantificó la expresión relativa del ARNm del gen ADAMTS-1, en las líneas celulares transducidas HT1080 y HEK293T (Figura 12). Previo al ensayo, se cuantificó los ARN totales extraídos de las células HT1080-MPC, HT1080-MPA, HEK293T-C y HEK293T-MPA; asimismo se verificó la integridad de cada uno de los ARN totales (APÉNDICE A).

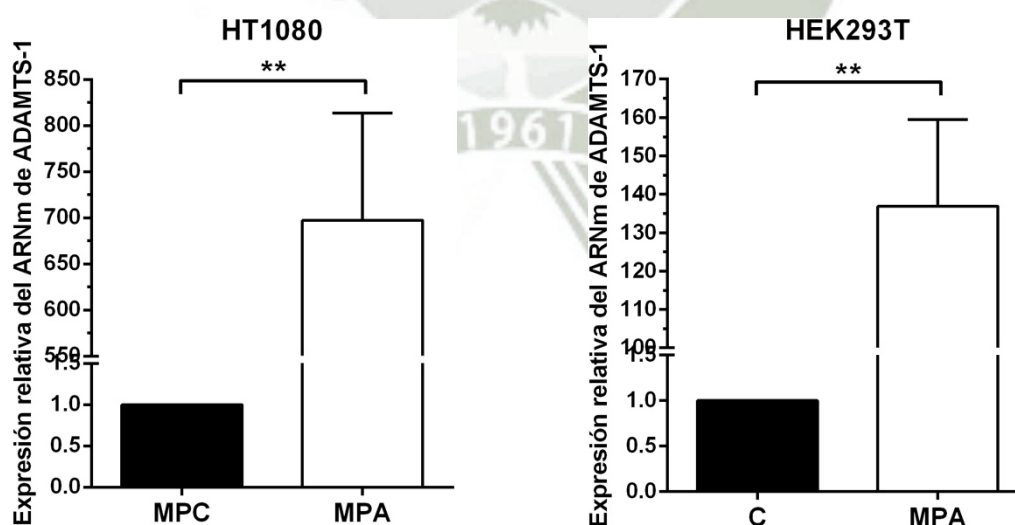


Figura 12 – Análisis del RT-qPCR de las células transducidas HT1080 y HEK293T.

(**) $0.001 < p < 0.01$

Los gráficos de barras de la **figura 12** muestran que tanto las células HT1080-MPA como HEK293T-MPA (barras blancas), presentaron niveles elevados del ARNm de ADAMTS-1, los cuales fueron estadísticamente significativos cuando se comparó con las células control HT1080-MPC y HEK293T-C (barras negras), respectivamente.

Adicionalmente, se confirmó la eficacia de la transducción a nivel proteico, mediante *Western Blotting*. Para esto se utilizó un anticuerpo específico que reconoce a la ADAMTS-1 en el lisado y medio condicionado de las células transducidas HT1080 y HEK293T. Además, se utilizó β -actina como control para comprobar que se cargó la misma cantidad de muestra proteica.

De esta forma, se observó que el lisado celular de HT1080-MPA, presentaba un aumento acentuado de la expresión de ADAMTS-1 bajo su forma no procesada (~110 kDa). Cuando se analizó el medio condicionado, se detectó un aumento de la segunda forma procesada de ADAMTS-1 (~65 kDa). Los resultados fueron comparados con el lisado celular y medio condicionado obtenidos a partir de las células HT1080-MPC (Figura 13).

En el caso de las células HEK293T-MPA, se observó un aumento en la expresión de la forma no procesada de ADAMTS-1 (~110 kDa) en el lisado celular. Sin embargo, cuando se analizó el medio condicionado, se detectó tanto un aumento discreto de la forma no procesada (~110 kDa), como un aumento acentuado de la segunda forma procesada de ADAMTS-1 (~65 kDa). Los resultados fueron comparados con el lisado y medio condicionado obtenidos a partir de las células HEK293T-C, las cuales no expresaron ADAMTS-1 (Figura 13).

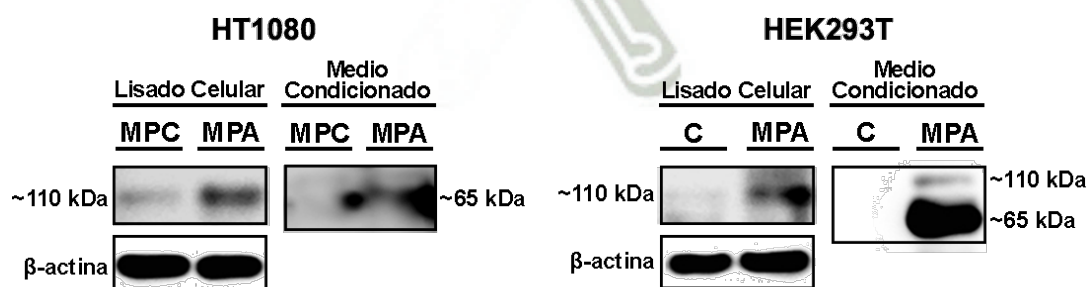


Figura 13 – *Western Blotting* representativos de las células transducidas HT1080 y HEK293T. Fue utilizado el anticuerpo anti-ADAMTS-1 (ab28284); y anti- β -actina como control de carga.

Generalmente, la ADAMTS-1 no se encuentra altamente expresa en tejidos normales. Sin embargo, cuando el tejido sufre una estimulación, como la inflamación, los niveles de expresión de ADAMTS-1 aumentan rápidamente⁸. En el caso del cáncer, se observó que los niveles de expresión de la ADAMTS-1 aumentan a medida en que se desarrolla la progresión tumoral. Así, numerosos estudios mostraron cambios en los niveles del ARNm de ADAMTS-1, durante la progresión de los tumores de próstata, colon, hígado y glándula mamaria^{17,77}.

Casal y colaboradores¹⁰⁶ observaron que las células derivadas del sarcoma de Ewing (osteosarcoma) expresan normalmente ARNm de ADAMTS-4. Además, se observó que las muestras de tejidos que se extrajeron durante la biopsia del sarcoma de Ewing, mostraron elevados niveles de expresión del ARNm de ADAMTS-4¹⁰⁷. Cabe señalar que la ADAMTS-4 está estructuralmente y funcionalmente relacionada con la ADAMTS-1, debido a la semejanza de las repeticiones de TSP que estas enzimas comparten¹⁰⁸.

Si bien la ADAMTS-1 fue localizada en el citoplasma de las células HT1080, a través de inmunofluorescencia¹⁰⁹; no existen estudios que muestren el nivel de expresión del ARNm y proteína de ADAMTS-1, en las células HT1080 o en tejidos de fibrosarcoma. Como es sabido, la ADAMTS-1 es inicialmente sintetizada bajo la forma inactiva de 110 kDa (forma no procesada), generalmente esta forma se localiza en el citoplasma de las células (lisado). Sin embargo, Rodríguez-Manzanque y colaboradores⁷⁵ detectaron la forma de 110 kDa en el medio condicionado de células HEK293T transfectadas para sobreexpresar ADAMTS-1; asimismo pueden ser encontradas una o ambas formas activas de ADAMTS-1 (65 y 87 kDa). Estas últimas formas son secretadas para la MEC, después de pasar por 2 eventos de procesamiento independientes y/o secuenciales¹¹⁰.

3.2 Evaluación del efecto *in vitro* de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la proliferación celular del fibrosarcoma

Para evaluar si la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las células HT1080, afectaba la proliferación celular, se realizó el ensayo de incorporación de BrdU.

A partir de las imágenes de inmunofluorescencia, utilizando estreptovidina conjugada con Alexa fluor 488, se detectó en verde los núcleos de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA que incorporaron BrdU, bajo condiciones de 0% de SFB (MEM libre de suero) y 10% de SFB (MEM suplementado con suero). Además, se utilizó el marcador DAPI para visualizar en azul todos los núcleos de las células. De esta forma, se determinó el porcentaje de células BrdU positivas, el cual es directamente proporcional a la cantidad de división celular (proliferación) que ocurre en el cultivo (APÉNDICE B, Figura 14).

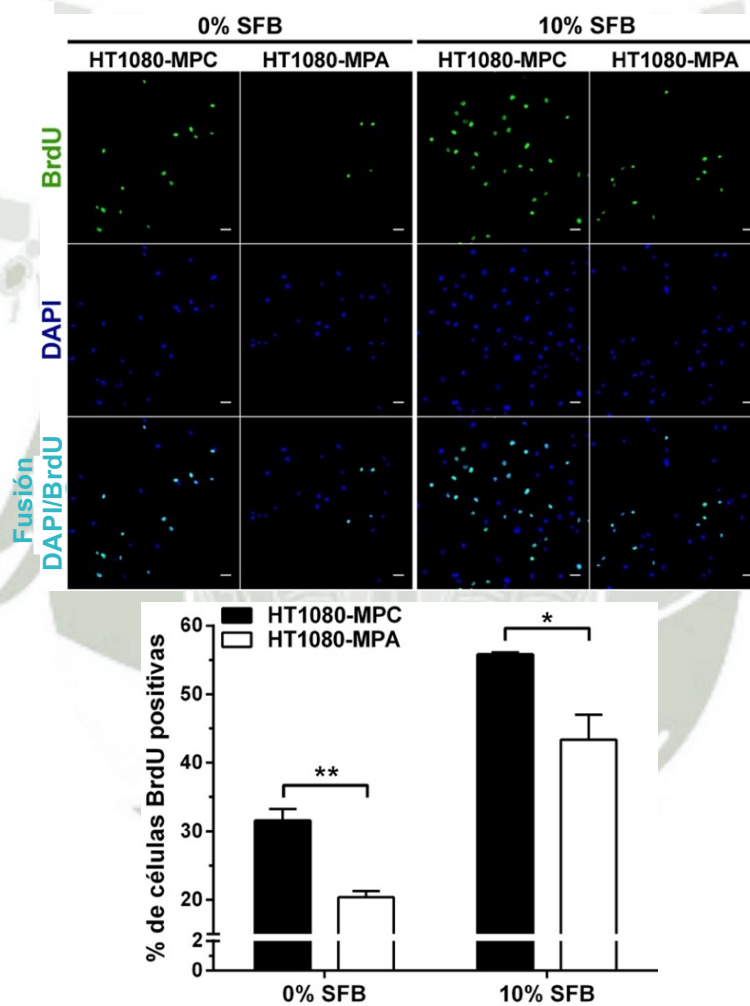


Figura 14 – Incorporación de BrdU en las células HT1080-MPC y HT1080-MPA, bajo condiciones de 0% y 10% de SFB. Barra de escala = 50 μ m. (*) $0.01 < p < 0.05$; () $0.001 < p < 0.01$**

El gráfico de barras de la **figura 14** muestra que tanto bajo condiciones de 0% como 10% de SFB, la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las células HT1080 (barras blancas)

desencadenó una reducción de la proliferación celular, la cual fue estadísticamente significativa cuando se comparó con las células control HT1080-MPC (barras negras).

Adicionalmente, se estudió si la proliferación celular de HT1080 (tipo salvaje) se veía afectada por la sobreexpresión de ADAMTS-1 proveniente de otro tipo celular. Siendo así, las células HT1080 fueron tratadas con: un medio condicionado obtenido a partir de las células HEK293T-C, el cual fue llamado de *MC Control*; y un medio condicionado obtenido a partir de las células HEK293T-MPA, llamado de *MC enriquecido con ADAMTS-1*. Este último simuló a la ADAMTS-1 secretada por otros tipos celulares presentes en el microambiente tumoral.

En esta ocasión fue utilizada la estreptovidina conjugada con Alexa fluor 555, para detectar en rojo los núcleos de las células HT1080 (tipo salvaje) que incorporaron BrdU, después de ser tratados con los medios condicionados anteriormente descritos y bajo condiciones de 0% y 10% de SFB. Además, se utilizó el marcador DAPI para visualizar en azul todos los núcleos de las células (Figura 15). A partir de estas marcaciones, se cuantificaron los núcleos (APÉNDICE C) y se determinó el porcentaje de células HT1080 (tipo salvaje) positivas para BrdU.

El gráfico de barras de la **figura 15** muestra que tanto bajo condiciones de 0% como 10% de SFB, las células HT1080 (tipo salvaje) tratadas con el *MC enriquecido con ADAMTS-1* (barras blancas) presentaron una disminución significativa de la proliferación celular. Los resultados fueron comparados con las células HT1080 tratadas con el *MC Control* (barras negras), bajo las mismas condiciones.

El microambiente tumoral desempeña un papel muy importante durante la progresión tumoral. Esto debido a que tanto las células estromales como las células tumorales, secretan para el microambiente circundante, diversas moléculas que influyen en el comportamiento del tumor^{18,111,112}. En el caso del fibrosarcoma, las células tumorales producen y secretan diversas macromoléculas que constituyen la MEC, tales como: proteoglicanos, colágenos, fibronectina, laminina, factores de crecimiento (TGF- β , EGF, FGF2 y VEGF) y metaloproteinasas. De esta forma, las células tumorales pueden alterar la composición y organización de la MEC, facilitando el crecimiento, supervivencia e invasión del fibrosarcoma¹¹³.

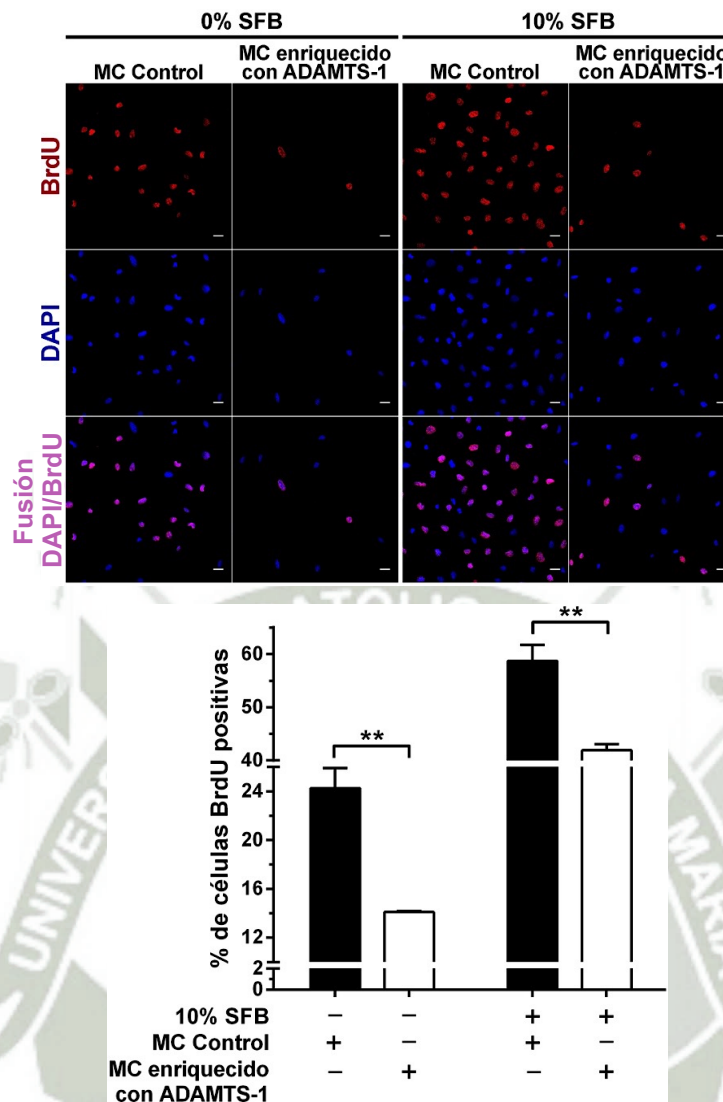


Figura 15 – Incorporación de BrdU en las células HT1080 (tipo salvaje), tratadas con un *MC enriquecido con ADAMTS-1* o *MC Control* en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. Barra de escala = 50 μ m. () $0.001 < p < 0.01$**

El papel de la ADAMTS-1 durante la progresión tumoral sigue siendo contradictorio; algunos estudios muestran que esta enzima puede actuar como un factor antitumoral ¹⁶ o pro-tumoral ¹¹⁴. La estructura multidomínios de la ADAMTS-1, podría ser la responsable de atribuirle diferentes características y habilidades funcionales ¹⁸; puesto que cuando su estructura sufre de modificaciones, ya sea por proteólisis de su extremo C-terminal, la ADAMTS-1 expande sus propiedades funcionales, alterando su capacidad de unión y reconocimiento de diversas proteínas presentes en MEC y en la superficie celular ⁷⁵.

La presente tesis demostró que la ADAMTS-1 actuó como un factor antitumoral, puesto que la sobreexpresión de ADAMTS-1 afectó negativamente la proliferación celular del fibrosarcoma, esto podría deberse a la presencia de las repeticiones de TSP1. Si bien la ADAMTS-1 secretada por las células transducidas (HT1080-MPA y HEK293T-MPA), presenta apenas una repetición de TSP1 localizada en la región central de la ADAMTS-1, esta sería suficiente para afectar la proliferación de las células de fibrosarcoma.

Específicamente, la glicoproteína TSP1 tiene la capacidad de unirse a diversas superficies celulares y macromoléculas de la MEC, tales como el heparán sulfato, proteoglicanos, fibronectina, laminina y colágeno. A través de esta interacción la TSP1 es capaz de regular los procesos de proliferación, adhesión y migración de varias células normales y tumorales. Además la TSP1 es conocida por actuar como un inhibidor fisiológico de la angiogénesis ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Algunos estudios mostraron que la glicoproteína TSP1 se une directamente a diversos factores de crecimiento, tales como el FGF-2 ¹¹⁸, PDGF y VEGF¹¹⁹; dicha interacción no sólo afecta la ubicación de los factores de crecimiento, sino también la activación de vías de señalización involucradas en la proliferación de las células endoteliales y del adenocarcinoma ^{118,120}. Asimismo, Luque y colaboradores ¹⁴ detectaron que la interacción directa entre el VEGF y las repeticiones de TSP1 de la ADAMTS-1, impedía la activación del receptor de VEGF, reduciendo así la proliferación de las células endoteliales durante el proceso de angiogénesis tumoral.

3.3 Evaluación del efecto *in vitro* de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la velocidad de migración celular del fibrosarcoma

La velocidad de migración fue determinada a través de la técnica de microscopía de *time-lapse* y el *plug-in MtrackJ* para el programa *ImageJ*.

Se realizó la captura de las imágenes a cada 10 minutos, durante un tiempo total de 12 horas. Desde el inicio del ensayo las células HT1080-MPC y HT1080-MPA se mantuvieron bajo las condiciones de 0% SFB (MEM libre de suero) y 10% SFB (MEM

suplementado con suero). Como estas células expresan la proteína fluorescente mCherry, las imágenes de fluorescencia de las células fueron capturadas en rojo.

Utilizando el *plug-in MtrackJ* se marcaron las posiciones de las células dentro de la secuencia de imágenes adquiridas. De esta forma fue posible seguir a las células desde el inicio hasta el final del ensayo, y medir las distancias recorridas por las células HT1080-MPC y HT1080-MPA bajo condiciones de 0% y 10% de SFB (APÉNDICE D). Las distancias fueron divididas por el tiempo total de 12 horas y así se determinó la velocidad de migración en $\mu\text{m/hr}$.

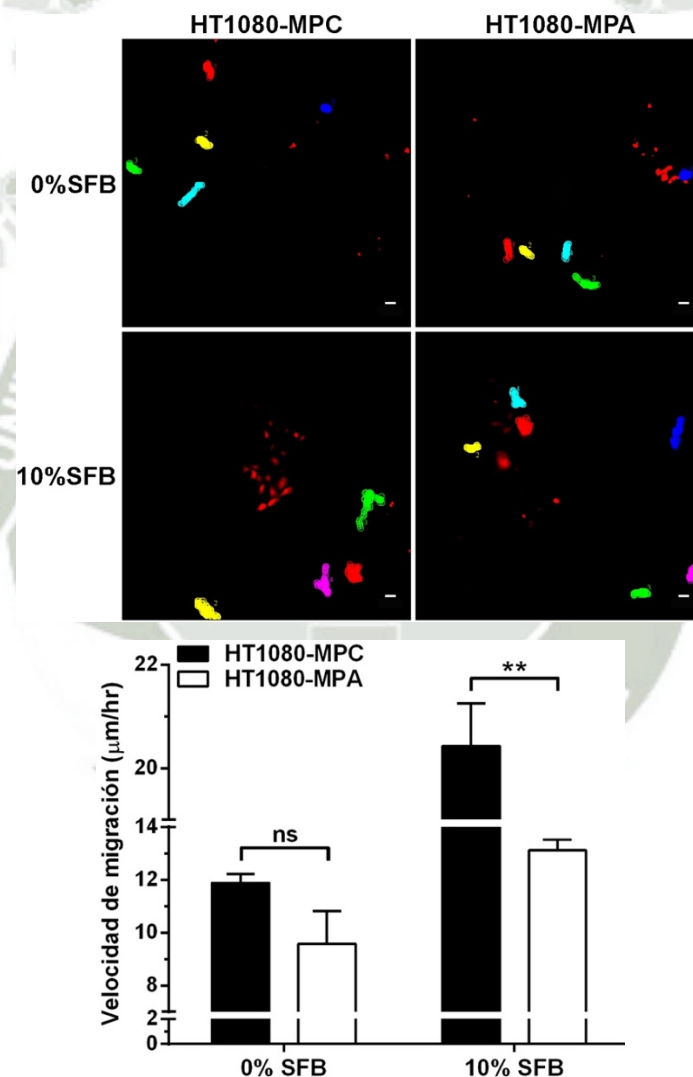


Figura 16 – Velocidad de migración calculada a partir de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA, bajo condiciones de 0% y 10% de SFB. Barra de escala = 50 μm . (ns) $p \geq 0.05$, no significativo; () $0.001 < p < 0.01$**

La **figura 16** muestra las imágenes de fluorescencia de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA (en rojo) bajo condiciones de 0% y 10% de SFB, superpuestas con sus respectivas trayectorias (franjas de colores). Una vez calculadas las velocidades de migración ($\mu\text{m/hr}$), estas se expresaron como media \pm SEM y se elaboró el gráfico de barras.

A partir de este ensayo se observó que en la presencia de SFB (10%), la sobreexpresión de ADAMTS-1 en las células HT1080, redujo significativamente su velocidad de migración ($13.11 \pm 0.3959 \mu\text{m/hr}$), en comparación con las células control HT1080-MPC (velocidad de migración de $20.42 \pm 0.8302 \mu\text{m/hr}$, Figura 16). Por otro lado, en la ausencia de SFB (0%) se observó que la sobreexpresión de ADAMTS-1 redujo la velocidad de migración de las células HT1080-MPA, sin embargo no fue estadísticamente significativa cuando se comparó con su respectivo control (HT1080-MPC en la misma condición de 0% de SFB, Figura 16).

Asimismo, se estudió si la sobreexpresión de ADAMTS-1 proveniente de otro tipo celular (HEK293T-MPA), afectaba la velocidad de migración de las células HT1080 (tipo salvaje). Para esto, se realizó la captura de las imágenes a cada 10 minutos, durante un tiempo total de 12 horas. En esta ocasión, se capturaron las imágenes en campo claro, ya que las células HT1080 (tipo salvaje) no expresan ningún tipo de fluorescencia.

Las velocidades de migración se calcularon de la misma forma anteriormente descrita. Utilizando el *plug-in MtrackJ* se midieron las distancias recorridas por las células HT1080 (tipo salvaje), tratadas con un *MC enriquecido con ADAMTS-1* o *MC Control* en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB (APÉNDICE E). Las imágenes en campo claro de estas células fueron superpuestas con sus respectivas trayectorias (franjas de colores). A partir de estas distancias se calculó la velocidad de migración ($\mu\text{m/hr}$), la cual fue expresada como media \pm SEM (Figura 17).

El gráfico de barras de la **figura 17** muestra que las células HT1080 tratadas con el *MC enriquecido con ADAMTS-1* y suplementado con 10% de SFB, presentaron una disminución significativa de su velocidad de migración ($15.6 \pm 0.589 \mu\text{m/hr}$). Los resultados fueron comparados con las células HT1080 tratadas con el *MC Control*, suplementado con 10% de SFB (velocidad de migración de $19.84 \pm 0.8774 \mu\text{m/hr}$). Por

otro lado, cuando las células HT1080 fueron tratadas únicamente con *MC enriquecido con ADAMTS-1* (0% SFB), se observó una disminución en la velocidad de migración; sin embargo no fue estadísticamente significativa cuando se comparó con su respectivo control (células HT1080 tratadas con *MC Control* en la ausencia de SFB, Figura 17).

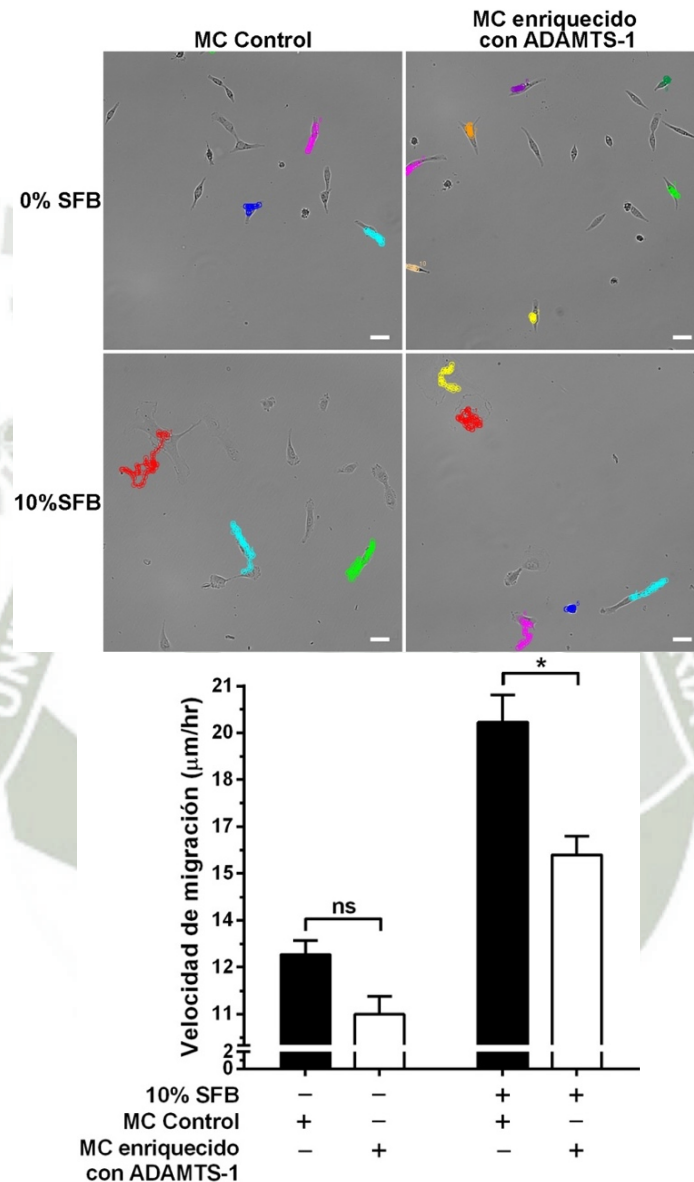


Figura 17 – Velocidad de migración calculada a partir de las células HT1080 (tipo salvaje), tratadas con un *MC enriquecido con ADAMTS-1* o *MC Control* en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. Barra de escala = 50 μm . (ns) $p \geq 0.05$, no significativo; (*) $0.01 < p < 0.05$

Tanto en los ensayos de proliferación celular como en este ensayo (velocidad de migración) se utilizaron 2 condiciones: 0% y 10% de SFB. Esta última condición (10% SFB) no solo representó las condiciones normales de las células *in vitro*, sino también simuló las condiciones normales (suero de la sangre) de un organismo vivo. De esta forma fue posible comparar los resultados obtenidos *in vitro* con los de *in vivo*.

Cabe mencionar que particularmente en este ensayo, se observó diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de migración, apenas cuando las células se mantuvieron bajo condiciones de SFB 10%, pero no bajo condiciones de SFB 0%. Como en el suero son encontrados diversos factores biológicamente activos, la ADAMTS-1 podría estar interactuando y/o secuestrando factores de crecimiento presentes en el suero, interfiriendo significativamente la velocidad de migración celular.

Por lo tanto, la ADAMTS-1 estaría actuando como un factor antitumoral, no solo afectando la proliferación celular sino también la velocidad de migración de las células de fibrosarcoma. Como fue discutido en los ensayos de proliferación celular, la repetición de TSP1 localizada en la región central de la ADAMTS-1, podría ser la responsable de atribuirle el efecto antitumoral.

Algunos estudios mostraron que la TSP1 central con una parte de la región espaciadora, se caracterizan por presentar una gran afinidad por los proteoglicanos, los que a su vez atraen a las moléculas de agua; y junto con estas moléculas de agua, los proteoglicanos retienen y almacenan a los factores de crecimiento ¹²¹⁻¹²³.

Rustani y Presta ¹¹⁹ mostraron que la glicoproteína TSP1 se une directamente al TGF- β y HGF, impidiendo así la activación de vías de señalización involucradas no sólo en la proliferación, sino también en la motilidad de las células endoteliales y del adenocarcinoma ^{118,120}. Cabe señalar que la motilidad celular es esencial para promover los procesos de invasión y metástasis durante la progresión tumoral ¹²⁴.

Asimismo, Freitas y colaboradores ¹²⁵ mostraron los efectos de la expresión reducida de la ADAMTS-1, sobre la invasión y migración celular del carcinoma de mama (MDA-MB-231). Estos efectos parecen estar relacionados con el VEGF, ya que las células MDA-MB-231 con expresión reducida de ADAMTS-1 mostraron niveles

aumentados de VEGF en el medio acondicionado. Los bajos niveles de ADAMTS-1 no fueron suficientes para secuestrar al VEGF, permitiendo así la activación de vías de señalización involucradas en la migración celular y la invasión ¹⁴.

Si bien la TSP1 central podría atribuirle este efecto antitumoral a la ADAMTS-1, no se puede ignorar el hecho de que la ADAMTS-1 también podría estar degradando (actividad proteolítica) algunos componentes o factores pro-tumorales. Así, Lee y colaboradores ¹²⁶ observaron que a través de la actividad proteolítica de la ADAMTS-1 se producía la liberación de diversos fragmentos de TSP1, los cuales impedían que ocurra la vascularización de la metástasis hepática. Asimismo, Martino-Echarri y colaboradores ¹²⁷ mostraron que la ADAMTS-1 era responsable de la degradación del nidógeno-1 y -2, lo que llevó a potenciar la respuesta antiangiogénica en un modelo murino de cáncer de mama.

3.4 Evaluación del efecto *in vivo* de la sobreexpresión de ADAMTS-1 sobre la capacidad de las células de fibrosarcoma para formar agregados celulares

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de ADAMTS-1 *in vivo*, se utilizaron embriones de *zebrafish* transgénicos, Tg (fli1:eGFP), que se caracterizan por expresar la proteína fluorescente GFP en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. De esta forma es posible visualizar en verde, la vasculatura entera del embrión (Figura 18A-G).

Las células HT1080-MPC y HT1080-MPA resuspendidas en MEM libre de suero, fueron inyectadas en la cavidad pericárdica de embriones de 48 horas post-fecundación (hpf) (Figura 18A). Después de 4 días de haber realizado la inyección (DPI), se adquirieron las imágenes de fluorescencia de los embriones (en verde), y de los agregados celulares formados a partir de HT1080-MPC y HT1080-MPA (en rojo, Figura 18B-G). Se midió el diámetro de dichos agregados celulares, a través del programa *Zen Blue* (APÉNDICE F). Los diámetros fueron expresados en μm y se elaboró el gráfico de dispersión, en donde cada punto representa un agregado celular formado en embriones de *zebrafish* (número de embriones = 18, Figura 18H).

Después de 4 días de haber realizado la inyección (DPI) se observó que las células HT1080-MPA formaron agregados celulares de $\sim 12,5 \mu\text{m}$ de diámetro (Figura 18E-H), los cuales fueron menores comparados con los agregados celulares formados por las células HT1080-MPC (diámetro de $\sim 18,5 \mu\text{m}$) (Figura 18B-D y H).

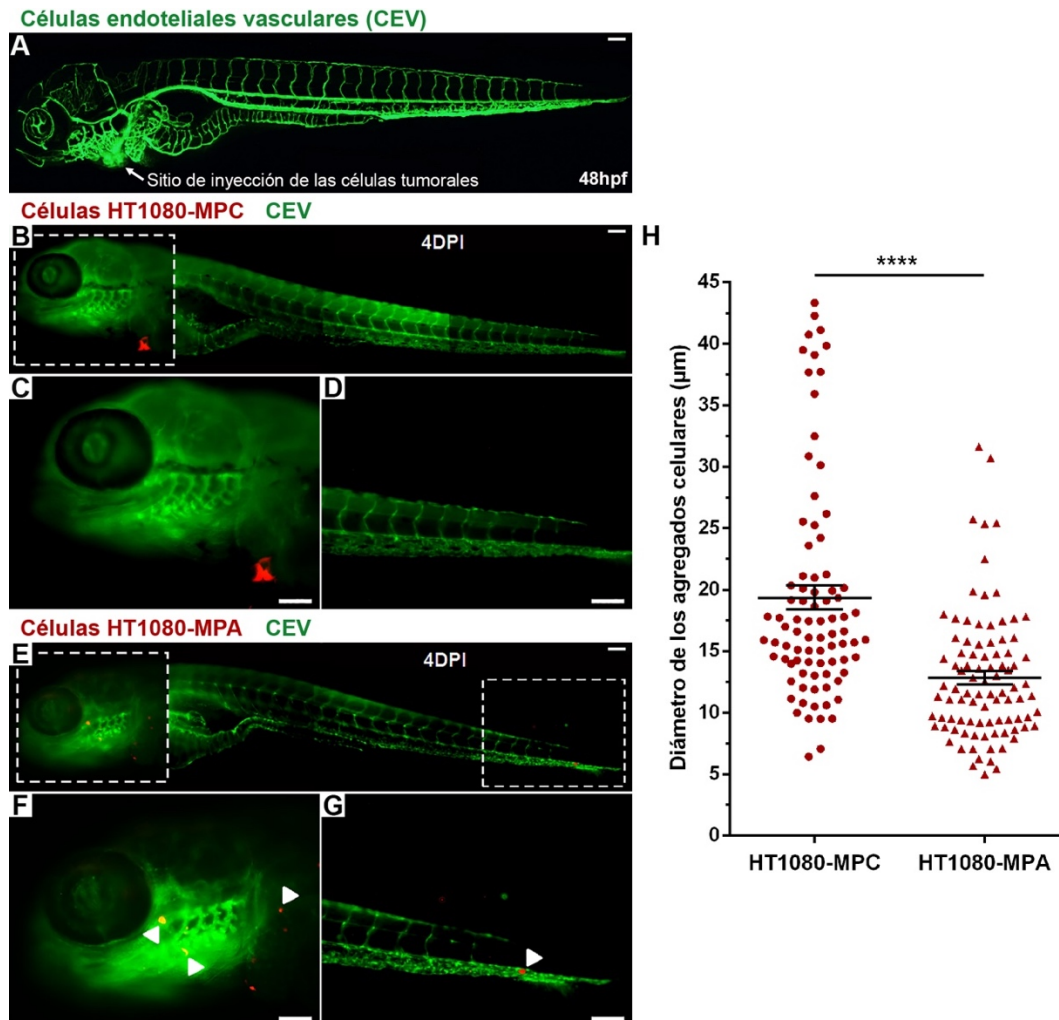


Figura 18 – Formación de agregados celulares a partir de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA en embriones de *zebrafish* Tg (*fli1:eGFP*). Imágenes de fluorescencias de (A) un embrión de 48 hpf, (B-D) embriones inyectados con células HT1080-MPC, y (E-G) embriones inyectados con células HT1080-MPA (4DPI). Barra de escala = 100 μm . (H) Gráfico de dispersión mostrando el diámetro (μm) de los agregados celulares formados. (****) $p < 0.0001$

Se detectaron varias células HT1080-MPA en diferentes regiones de los embriones; tales como la cabeza, saco vitelino y cola (Figura 18F-G); posiblemente las células se

disociaron del tumor primario y entraron en la circulación sanguínea de los embriones. Sin embargo, no se puede afirmar que las células HT1080-MPA realizaron metástasis hacia esas zonas, puesto que las células fueron inyectadas en una zona cercana al corazón (cavidad pericárdica). Además es posible que las células HT1080-MPA no tienen la capacidad de formar grandes agregados celulares, debido a la falta de interacciones célula-célula, facilitando así su ingreso a la corriente sanguínea ¹²⁸.

En cambio, las células HT1080-MPC no dejaron la cavidad pericárdica (lugar de la inyección), formando agregados celulares con dimensiones mayores en esa región (Figura 18C-D). Además, después de 4 días de la inyección, las células HT1080-MPC no realizaron metástasis para otras zonas del embrión; esto confirmaría la característica de los tumores de fibrosarcoma, los cuales tienden a formar grandes masas sólidas que son difícilmente de ser tratados con quimioterapia o radioterapia, siendo la extirpación quirúrgica la única forma de tratamiento. Esta opción de tratamiento muchas veces requiere la amputación total del miembro en donde se desarrolló el tumor, poniendo en peligro la vida ^{2,29,30}.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de ADAMTS-1 no solo afecta negativamente los procesos de proliferación y migración celular *in vitro*, sino también la formación de agregados celulares *in vivo*.

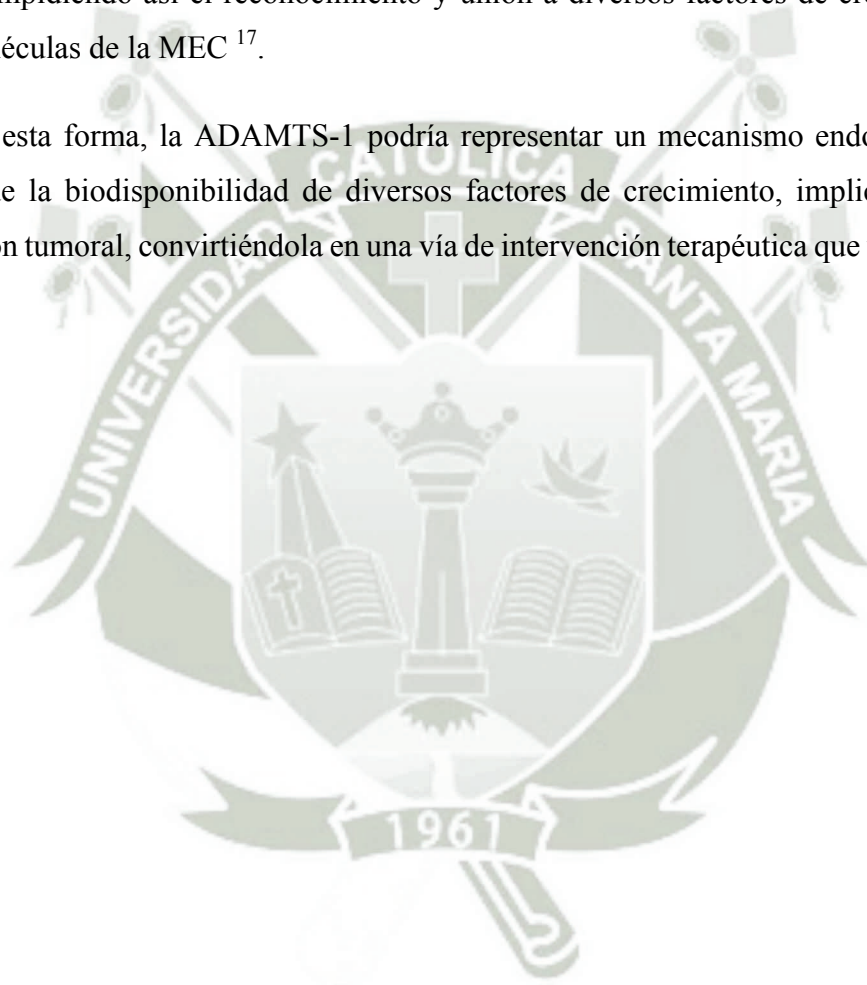
Obika y colaboradores ¹²⁹ mostraron que la ADAMTS-1 inhibe el crecimiento de tumores de fibrosarcoma, próstata y ovario; después de que las líneas celulares (HT1080, DU145 y CHO-K1 respectivamente) sean inoculadas separadamente, en ratones inmunodeficientes o *nude*. Por otro lado, Casal y colaboradores ¹⁰⁶ observaron *in vivo*, un aumento en el crecimiento de la masa tumoral, formada a partir de las células HT1080 que fueron modificadas para sobreexpresar ADAMTS-1. Cabe mencionar que Casal y colaboradores analizaron la primera forma procesada de ADAMTS-1 (87 kDa), esta forma se caracteriza por presentar las repeticiones de TSP1 en el extremo C-terminal.

Así, cuando la ADAMTS-1 se encuentra en su primera forma procesada (87 kDa), entra a actuar su dominio catalítico o metaloproteinasas. Gracias a la actividad de este dominio, se liberará de la membrana plasmática, las formas activas de diversos factores de crecimiento. Un ejemplo de esto, es la liberación del ligando parecido a EGF, el cual

se encuentra asociado a la membrana celular (inactivo); la liberación para la MEC de las formas maduras (activas) de este factor de crecimiento, producirá la activación de vías de señalización que promoverán el proceso de metástasis ^{17,114}.

Cabe señalar que en la presente tesis se analizó el efecto de la segunda forma procesada de ADAMTS-1 (65 kDa), la cual se caracteriza por presentar apenas una repetición de TSP1 localizada en la región central de la ADAMTS-1. Posiblemente, las repeticiones de TSP1 del extremo C-terminal, se encuentren enmascarando a la TSP1 central, impidiendo así el reconocimiento y unión a diversos factores de crecimiento u otras moléculas de la MEC ¹⁷.

De esta forma, la ADAMTS-1 podría representar un mecanismo endógeno en el control de la biodisponibilidad de diversos factores de crecimiento, implicados en la progresión tumoral, convirtiéndola en una vía de intervención terapéutica que vale la pena explorar.



CONCLUSIONES

Primera:

Se logró inducir la sobreexpresión de ADAMTS-1 en células humanas de fibrosarcoma HT1080 (línea celular tumoral) y en células embrionarias de riñón humano HEK293T (línea celular no tumoral transformada) por medio de la transducción con partículas lentivirales. Además, a través de los ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) e inmunodetección por *Western Blotting* se confirmó la eficiencia de la transducción; observando así niveles elevados del ARNm de ADAMTS-1, y un aumento acentuado de la segunda forma procesada de ADAMTS-1 (~65 kDa) en los MCs de las células transducidas para superexpresar ADAMTS-1.

Segunda:

La sobreexpresión de ADAMTS-1 afectó negativamente la proliferación celular del fibrosarcoma, *in vitro*. Así, por medio del ensayo de incorporación de BrdU, se observó que tanto bajo las condiciones de 0% y 10% de SFB, la sobreexpresión de ADAMTS-1 redujo significativamente la proliferación de las células HT1080.

Tercera:

La sobreexpresión de ADAMTS-1 afectó negativamente la velocidad de migración celular del fibrosarcoma, *in vitro*. A través del ensayo de microscopía de *time-lapse*, se observó que sólo bajo la condición de 10% de SFB, la sobreexpresión de ADAMTS-1 disminuyó significativamente la velocidad de migración de las células HT1080.

Cuarta:

La sobreexpresión de ADAMTS-1 afectó la capacidad de las células HT1080 para formar agregados celulares, *in vivo*. Utilizando embriones de *zebrafish*, se observó que las células que sobreexpresaban ADAMTS-1, no formaban agregados celulares o formaban pequeños agregados celulares, después de 4 días de haber realizado la inyección en los embriones.

RECOMENDACIONES

Primera:

Sería interesante realizar espectrometría de masas para analizar la presencia de otros componentes, además de la ADAMTS-1, presentes en los medios condicionados de las células HEK293T-C y HEK293T-MPA. Puesto que estas células podrían estar secretando factores de crecimiento, los cuales estarían siendo secuestrados o degradados por la ADAMTS-1.

Segunda:

Con el propósito de verificar si la ADAMTS-1 estaría secuestrando factores de crecimiento, sería importante realizar ensayos de inmunoprecipitación o usar el sistema Biacore, para confirmar la interacción directa entre la TSP1 central de la ADAMTS-1 y los factores de crecimiento (previamente identificados en los MCs).

Tercera:

Para verificar si la ADAMTS-1 estaría degradando factores de crecimiento, sería interesante incubar por separado, la ADAMTS-1 con los factores de crecimiento (previamente identificados en los MCs); y analizar a través de *Western Blotting* e impregnación con nitrato de plata, si la ADAMTS-1 se encuentra descomponiendo a los factores de crecimiento en pequeñas unidades.

Cuarta:

Antes y durante el proceso de transducción de las células, se recomienda retirar cualquier tipo de antibiótico que fue adicionado al medio de cultivo; dado que este puede competir con el gen de resistencia a puomicina (antibiótico de selección) por el mismo espacio ribosomal, reduciendo así la probabilidad de seleccionar exclusivamente a las células que fueron transducidas.

Quinta:

En los ensayos de migración, se recomienda cuantificar únicamente a las células que no tuvieron contacto entre sí y aquellas que no sufrieron división celular, esto para evitar que la velocidad de migración sea alterada por otros factores que no sean del tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shrivastaval S, Nayak SK, Nayak P, Sahu S. Fibrosarcoma of maxilla: A rare case report. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016; 20(1): 162.
2. Fisher C, Van Den Berg E, Molenaar W. Adult fibrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (Eds). *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. IARC Press: Lyon, France. 2002; 100-101.
3. Strum JM, Gartner LP, Hiatt JL. *BRS Cell biology and histology*. 6th edition. Hagerstown (MD): Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 83.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.
5. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21(3): 309-22.
6. Declerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *American Journal of Pathology*. 2004; 164(4): 1131-9.
7. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002; 14 (5): 608-16.
8. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(1):556-62.
9. Kuno K, Bannai K, Hakozaki M, Matsushima K, Hirose K. The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 319(4): 1327-33.
10. Le Goff C, Cormier-Daire V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. *Human Molecular Genetics*. 2011; 20(R2): R163-7.
11. Günther W, Skafnesmo KO, Arnold H, Bjerkvig R, Terzis AJ. Distribution patterns of the anti-angiogenic protein ADAMTS-1 during rat development. *Acta Histochemica*. 2005; 107(2): 121-31.

12. Thai SN, Iruela-Arispe ML. Expression of ADAMTS1 during murine development. *Mechanisms of Development*. 2002; 115(1-2): 181-5.
13. Brown HM, Dunning KR, Robker RL, Pritchard M, Russell DL. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. *Developmental Biology*. 2006; 300(2): 699-709.
14. Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(26): 23656-65.
15. Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, Crahay C, Gueders M, Foidart JM, Noel A, Cataldo D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie*. 2008; 90(2): 369-79.
16. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochemical Journal*. 2005; 386(Pt 1): 15-27.
17. Liu YJ, Xu Y, Yu Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene*. 2006; 25(17): 2452-67.
18. Apte SS. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(46): 31493-97.
19. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(9): 685-94.
20. Hui JY. Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surgical Clinics of North America*. 2016; 96(5): 901-14.
21. Aljabab AS, Nason RW, Kazi R, Pathak KA. Head and neck soft tissue sarcoma. *Indian Journal of Surgical Oncology*. 2011; 2(4): 286-90.
22. Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015; 36: 13-22.
23. Wibmer C, Leithner A, Zielonke N, Sperl M, Windhager R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Annals of Oncology*. 2010; 21(5): 1106-11.

24. Collini P, Sorensen PH, Patel S, Blay JY, Issels RD, Maki RG, Eriksson M, Del Muro XG. Sarcomas with spindle cell morphology. *Seminars in Oncology*. 2009; 36(4): 324-37.
25. Guevara-Canales JO, Sacsquispe-Contreras SJ, Morales-Vadillo R, Sánchez Lihón J. Epidemiology of the sarcomas of the jaws in a Peruvian population. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2012; 17(2): e201-e205.
26. Wang H, Nie P, Dong C, Li J, Huang Y, Hao D, Xu W. CT and MRI Findings of Soft Tissue Adult Fibrosarcoma in Extremities. *BioMed Research International*. 2018; 2018: 7.
27. Bahrami A, Folpe AL. Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *American Journal of Surgical Pathology*. 2010; 34(10): 1504-13.
28. Folpe AL. Fibrosarcoma: a review and update. *Histopathology*. 2014; 64(1): 12-25.
29. Lunseth PA, Nelson CL. Longitudinal amputation for the treatment of soft tissue fibrosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1975; (109): 147-51.
30. Nason GJ, Baker JF, Seoighe D, Irvine AD, Mcdermott M, Orr D, Capra M, Kelly PM. Congenital-infantile fibrosarcoma of the foot-avoidance of amputation. *Irish Medical Journal*. 2014; 107(5): 148-9.
31. Foulds L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Research*. 1954; 14(5): 327-39.
32. Gerdes MJ, Sood A, Sevinsky C, Pris AD, Zavodszky MI, Ginty F. Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Frontiers in Oncology*. 2014; 4: 366.
33. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: Ed. W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes.
34. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*. 1998; 17(25): 3385-3400.
35. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Ed. Sinauer Associates; 2000. Tumor Suppressor Genes.
36. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Cancer Research*. 1991; 51:257-72.

37. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. *British Journal of Surgery*. 1998; 85(11): 1460-7.
38. Raynaud CM, Hernandez J, Llorca FP, Nuciforo P, Mathieu MC, Commo F, Delalogue S, Sabatier L, André F, Soria JC. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *American Journal of Clinical Oncology*. 2010; 33(4): 341-5.
39. Ulrich E, Boehmelt G, Bird A, Beug H. Immortalization of conditionally transformed chicken cells: loss of normal p53 expression is an early step that is independent of cell transformation. *Genes and Development*. 1992; 6(5): 876-87.
40. Albini A, Tosetti F, Li VW, Noonan DM, Li WW. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2012; 9(9): 498-509.
41. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(11): 839-49.
42. Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(8): 563-72.
43. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*. 2011; 17(11): 1359-70.
44. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(2): 118-32.
45. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine*. 1998; 49: 407-24.
46. Gkretsi V, Stylianou A, Papageorgis P, Polydorou C, Stylianopoulos T. Remodeling Components of the Tumor Microenvironment to Enhance Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2015; 5:214.
47. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM, Declerck YA. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Research*. 2012; 72(10): 2473-80.
48. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015; 15(2): 96-109.
49. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.

50. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran Patología Estructural e Funcional. 9 edición. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2015.
51. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2016; 18(84).
52. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(5): 392-401.
53. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research*. 2008; 659(1-2): 15-30.
54. Peek RM, Mohla S, Dubois RN. Inflammation in the genesis and perpetuation of cancer: summary and recommendations from a national cancer institute-sponsored meeting. *Cancer Research*. 2005; 65(19): 8583-6.
55. Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2009; 63(4): 571-82.
56. Brasileiro Filho G. Bogliolo Patología Geral. 3 edición. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2004.
57. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*. 2012; 196(4): 395-406.
58. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009; 326(5957): 1216-9.
59. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011; 3(12).
60. Norton WH, Ledin J, Grandel H, Neumann CJ. HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. *Development*. 2005; 132(22): 4963-73.
61. Gumbiner BM, Yamada KM. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995; 7(5): 615-8.
62. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*. 2011; 278(1): 28-45.

63. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001; 17: 463-516.
64. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*. 2003; 92(8): 827-39.
65. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*. 2007; 26(8): 587-96.
66. Page-Mccaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8(3): 221-33.
67. Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new “intracellular” substrates revealed by degradomics. *Biochemistry*. 2009; 48(46): 10830-45.
68. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141(1): 52-67.
69. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology*. 2001; 11(11): S37-43.
70. Ikejiri M, Bernardo MM, Bonfil RD, Toth M, Chang M, Fridman R, Mobashery S. Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(40): 33992-4002.
71. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36: D320-D325. Available from: <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm/>.
72. Turner SL, Blair-Zajdel ME, Bunning RA. ADAMs and ADAMTSs in cancer. *British Journal of Biomedical Science*. 2009; 66(2): 117-28.
73. Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25(7): 1000-9.
74. Rehn AP, Birch MA, Karlström E, Wendel M, Lind T. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone*. 2007; 41(2): 231-8.

75. Rodríguez-Manzaneque JC, Milchanowski AB, Dufour EK, Leduc R, Iruela-Arispe ML. Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(43): 33471-79.
76. Canals F, Colomé N, Ferrer C, Plaza-Calonge MEC, Rodríguez-Manzaneque JC. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics*. 2006; 6 Suppl 1: S28-35.
77. Tan IEA, Ricciardelli C, Rusell DL. The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *International Journal of Cancer*. 2013; 133(10): 2263-76.
78. Hu L, Jonsson KB, Andersén H, Edenro A, Bohlooly-y M, Melhus H, Lind T. Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2012; 30(3): 304-11.
79. Nakamura M, Sone S, Takahashi I, Mizoguchi I, Echigo S, Sasano Y. Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2005; 53(12): 1553-62.
80. Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*. 1974; 33(4): 1027-33.
81. Baldassarre M, Razinia Z, Brahme NN, Buccione R, Calderwood DA. Filamin A controls matrix metalloproteinase activity and regulates cell invasion in human fibrosarcoma cells. *Journal of Cell Science*. 2012; 125(Pt 16): 3858-69.
82. Hanyu A, Kojima K, Hatake K, Nomura K, Murayama H, Ishikawa Y, Miyata S, Ushijima M, Matsuura M, Ogata E, Miyazawa K, Imamura T. Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Science*. 2009; 100(11): 2085-92.
83. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*. 1987; 7(1): 379-87.
84. Mao Y, Yan R, Li A, Zhang Y, Li J, Du H, Chen B, Wei W, Zhang Y, Sumners C, Zheng H, Li H. Lentiviral Vectors Mediate Long-Term and High Efficiency

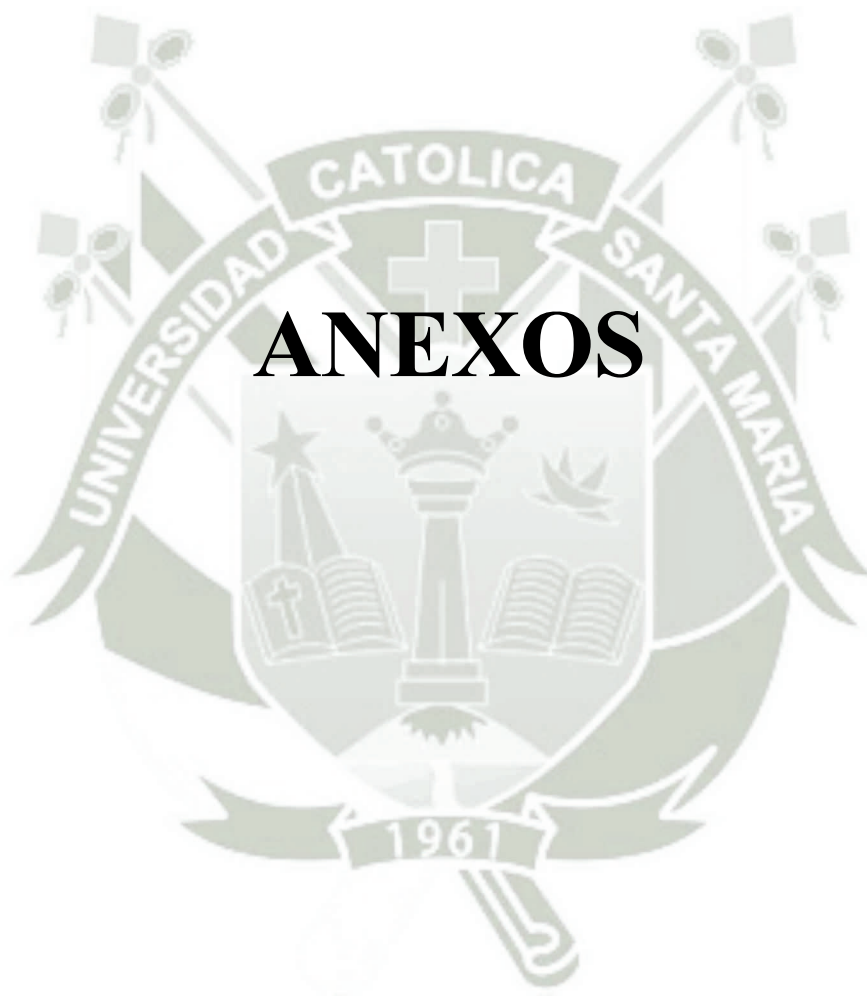
- Transgene Expression in HEK 293T cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2015; 12(5): 407-15.
85. Escors D, Breckpot K, Arce F, Kochan G, Stephenson H. *Lentiviral Vectors and Gene Therapy*. New York: Springer; 2012. Chapter 2, Development of Retroviral and Lentiviral Vectors; p.11-28.
 86. Naldini L, Blömer U, Gallyat P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of post mitotic cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272(5259):263-7.
 87. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(21): 11382-8.
 88. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239(4839): 487-91.
 89. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 1996; 6(10): 995-1001.
 90. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*. 1992; 10(4): 413-7.
 91. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 2002; 30(6): 503-12.
 92. Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012; 4(9): 429-34.
 93. Blancher C, Jones A. SDS -PAGE and Western Blotting Techniques. *Methods in Molecular Medicine*. 2001; 57: 145-62.
 94. Sondell M, Fex-Svenningsen A, Kanje M. The inculine-like growth factors I and II stimulates. *Neuroreport*. 1997; 8(13): 2871-6.
 95. Holm M, Thomsen M, Høyer M, Hokland P. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. *Cytometry*. 1998; 32(1): 28-36.

96. Rahirant S, Garavito Z, Hurtado H. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. *Biomédica*. 2000; 20: 144-50.
97. Dormann D, Weijer CJ. Visualizing signaling and cell movement during the multicellular stages of dictyostelium development. *Methods in Molecular Biology*. 2006; 346: 297–309.
98. Entschladen F, Drell TL, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS. Analysis methods of human cell migration. *Experimental Cell Research*. 2005; 307(2): 418-26.
99. Huth J, Buchholz M, Kraus JM, Schmucker M, von Wichert G, Krndija D, Seufferlein T, Gress TM, Kestler HA. Significantly improved precision of cell migration analysis in time-lapse video microscopy through use of a fully automated tracking system. *BMC Cell Biology*. 2010; 11:24.
100. Feitsma H, Cuppen E. Zebrafish as a cancer model. *Molecular Cancer Research*. 2008; 6(5): 685-94.
101. Matthews JL. Common diseases of laboratory zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 2004; 77: 617-43.
102. Smolowitz R, Hanley J, Richmond H. A three-year retrospective study of abdominal tumors in zebrafish maintained in an aquatic laboratory animal facility. *Biology Bulletin*. 2002; 203(2): 265-6.
103. Novoa B, Figueras A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012; 946: 253-75.
104. Liu F, Walmsley M, Rodaway A, Patient R. Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Current Biology*. 2008; 18(16): 1234-40.
105. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
106. Casal C, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge MEC, Martino-Echarri E, Ramón y Cajal S, Rojo F, Griffioen AW, Rodríguez-Manzaneque JC. ADAMTS1 contributes

- to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Research*. 2010; 70(11): 4676-86.
107. Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T, Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. *International Journal of Oncology*. 2010; 37(3): 569-81.
 108. Karagiannis ED, Popel AS. Anti-angiogenic peptides identified in thrombospondin type I domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 359(1): 63-9.
 109. Silva SV, Lima MA, Cella N, Jaeger RG, Freitas VM. ADAMTS-1 Is Found in the Nuclei of Normal and Tumoral Breast Cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(10): e0165061.
 110. Fu Y, Nagy JA, Brown LF, Shih SC, Johnson PY, Chan CK, Dvorak HF, Wight TN. Proteolytic cleavage of versican and involvement of ADAMTS-1 in VEGF-A/VPF-induced pathological angiogenesis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2011; 59(5):463-73.
 111. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011; 6(1): 209-17.
 112. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*. 2011; 147(5): 992-1009.
 113. Nikitovic D, Kouvidi K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 929531.
 114. Lu X, Wang Q, Hu G, Van Poznak C, Fleisher M, Reiss M, Massague J, Kang Y. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes and Development*. 2009; 23(16): 1882-94.
 115. Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB Journal*. 1992; 6(14): 3290-9.

116. Frazier WA. Thrombospondins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1991; 3(5): 792–9.
117. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell*. 1989; 56(3): 345–55.
118. Taraboletti G, Belotti D, Borsotti P, Vergani V, Rusnati M, Presta M, et al. The 140-kilodalton antiangiogenic fragment of thrombospondin-1 binds to basic fibroblast growth factor. *Cell Growth and Differentiation*. 1997; 8(4): 471–479.
119. Rusnati M, Presta M. Extracellular angiogenic growth factor interactions: an angiogenesis interactome survey. *Endothelium*. 2006; 13(2): 93–111.
120. Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M, et al. Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood*. 2003; 102(13): 4399–406.
121. Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999; 3(2): 147-58.
122. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB Journal*. 2002; 16(2): 219-21.
123. Krampert M, Kuenzle S, Thai SN, Lee N, Iruela-Arispe ML, Werner S. ADAMTS1 proteinase is up-regulated in wounded skin and regulates migration of fibroblasts and endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(25): 23844-52.
124. Stuelten CH, Parent CA, Montell DJ. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nature Reviews Cancer*. 2018; 18(5): 296-312.
125. Freitas VM, Do Amaral JB, Silva TA, Santos ES, Mangone FR, Pinheiro JEJ, Jaeger RG, Nagai MA, Machado-Santelli GM. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. *Molecular Cancer*. 2013; 12(2).
126. Lee YJ, Koch M, Karl D, Torres-Collado AX, Fernando NT, Rothrock C, Kuruppu D, Ryeom S, Iruela-Arispe ML, Yoon SS. Variable inhibition of thrombospondin 1

- against liver and lung metastases through differential activation of metalloproteinase ADAMTS1. *Cancer Research*. 2010; 70(3): 948-56.
- 127.** Martino-Echarri E, Fernández-Rodríguez R, Rodríguez-Baena FJ, Barrientos-Durán A, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge Mdel C, Amador-Cubero S, Cortés J, Reynolds LE, Hovalala-Dilke KM, Rodríguez-Manzaneque JC. Contribution of ADAMTS1 as a tumor suppressor gene in human breast carcinoma. Linking its tumor inhibitory properties to its proteolytic activity on nidogen-1 and nidogen-2. *International Journal of Cancer*. 2013; 133(10): 2315-24.
- 128.** Hofschröer V, Koch KA, Ludwig FT, Friedl P, Oberleithner H, Stock C, Schwab A. Extracellular protonation modulates cell-cell interaction mechanics and tissue invasion in human melanoma cells. *Scientific Reports*. 2017; 7: 42369.
- 129.** Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Science*. 2012; 103(10): 1889-97.
- 130.** Buchschacher G, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*. 2000; 95: 2499-504



ANEXO 1

VISIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES RECOMBINANTES Y LA TRANSDUCCIÓN DE LA CÉLULA HUÉSPED

Las partículas virales que se utilizan en la transducción de la célula huésped, se producen por co-transfección (introducción de ADN extraño en la célula, a través de métodos químicos o no químicos, sin la utilización de virus) de tres plásmidos vectores en una célula productora: (i) El vector de clonación que codifica el gen de interés; (ii) El vector pseudotipado que codifica las proteínas de la envoltura externa del virus; (iii) El vector de empaquetamiento que codifica a la transcriptasa inversa, además de las proteínas que permiten el empaquetamiento del ARN viral (genómico) en la partícula viral (Figura 19) ^{85,86}.

Una vez que la partícula viral se ensambla, la célula productora lo libera para el medio de cultivo (sobrenadante). El sobrenadante conteniendo las partículas virales será, por lo tanto, utilizado para la transducción de la célula huésped. Aquí, las proteínas de la envoltura externa del virus se unen a receptores presentes en la membrana plasmática de la célula huésped, permitiendo así la liberación del ARN viral y de la transcriptasa inversa. Esta última se hará cargo de la transcripción del ARN viral en ADN; el cual se integrará al genoma de la célula huésped (Figura 19) ^{85,130}.

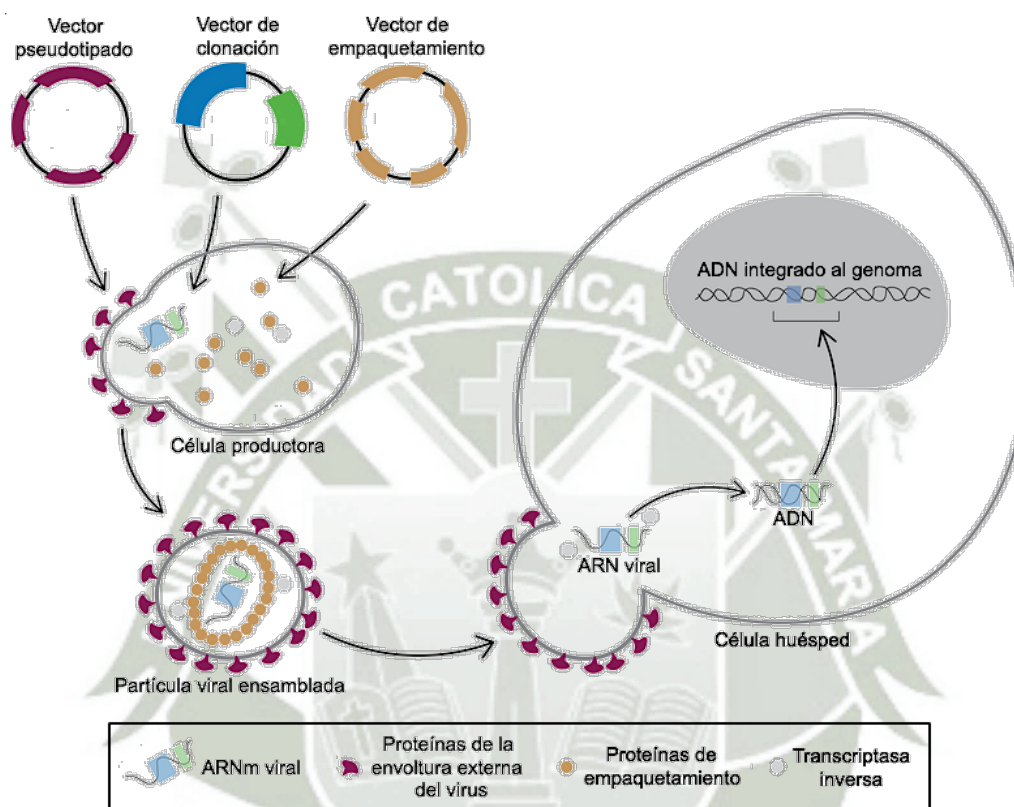


Figura 19 – Representación esquemática de la producción de partículas lentivirales recombinantes y la transducción de la célula huésped. Adaptado de <https://blog.benchling.com/2016/03/24/how-to-express-crispr-in-your-target-cells/>

ANEXO 2

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL VECTOR LENTIVIRAL UTILIZADO PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE ADAMTS-1

El vector de clonación utilizado para la sobreexpresión de ADAMTS-1 fue: **pReceiver-Lv213**, este es un vector lentiviral que se caracteriza por presentar:

- Promotor de citomegalovirus humano (CMV) que maximiza la expresión del gen de interés, en este caso, la ADAMTS-1.
- Marco abierto de lectura (ORF) en donde fue insertado la secuencia del gen de ADAMTS-1. En caso del control negativo, esta secuencia no fue inserida.
- Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) permite la iniciación de la síntesis proteica, en este caso de mCherry, en medio de la secuencia de ARNm.
- Gen reportero mCherry, codifica a la proteína fluorescente roja mCherry. A través de la expresión de esta proteína, será posible visualizar las células que fueron transducidas, puesto que presentaran fluorescencia roja.
- Gen de resistencia al antibiótico de puromicina codifica a la enzima PAC (inactiva a la puromicina) en aquellas células que presentan el ARNm de interés. Esto lleva a la sobrevivencia de las células cuando son expuestas a la puromicina, permitiendo así seleccionar únicamente a las células que presentan el ARNm de interés.

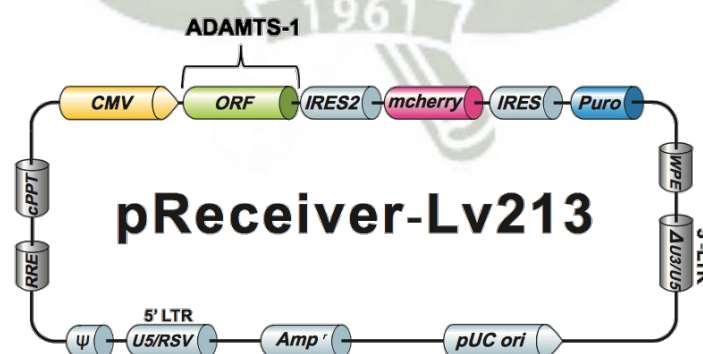


Figura 20 – Esquema del vector lentiviral pReceiver-Lv213 utilizado para la sobreexpresión de ADAMTS-1. Adaptado de <http://www.genecopoeia.com/wp-content/uploads/oldpdfs/tech/omicslink/pReceiver-Lv213.pdf>

ANEXO 3

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL, EMPLEANDO EL KIT *PureLink RNA Mini (Thermo Fisher Scientific)*

1. Descartar el medio de cultivo de las células.
2. Adicionar el tampón de lisis en la placa de las células. Preparar previamente el tampón de lisis que contenga 1% de 2-mercaptoetanol.
3. Transferir el lisado celular para un tubo libre de RNasa y homogeneizar utilizando una jeringa con aguja libre de RNasa.
4. Adicionar a las muestras etanol frío al 70%.
5. Agitar con vortex para mezclar bien y dispersar cualquier tipo de precipitado que pueda formarse después de ser agregado el etanol.
6. Transferir 700 μ l de la mezcla anterior, para una columna de afinidad acoplada a un tubo colector.
7. Centrifugar a 12 000 rcf por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el contenido del tubo colector (flujo que paso a través de la columna).
8. Repetir los pasos 6 y 7 hasta que se procese toda la muestra.
9. Adicionar a la columna 700 μ l de tampón de lavado I.
10. Centrifugar a 12 000 rcf por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el contenido del tubo colector (flujo que paso a través de la columna).
11. Adicionar a la columna 500 μ l de tampón de lavado II. Previamente adicionar etanol al tampón de lavado II.
12. Centrifugar a 12 000 rcf por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el contenido del tubo colector (flujo que paso a través de la columna).
13. Repetir los pasos 11 y 12.

14. Centrifugar a 12 000 rcf durante 1-2 minutos para secar la membrana con el ARN adjunto (columna de afinidad). Descartar el tubo de recolección e insertar la columna de afinidad en un tubo de recuperación.
15. Adicionar 30 μ l de agua libre de RNasa, al centro de la columna de afinidad.
16. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
17. Centrifugar a 12 000 rcf por 2 minutos a temperatura ambiente, para eluir el ARN de la membrana de la columna de afinidad para el tubo de recuperación.



ANEXO 4

METODOLOGÍA PARA LA SÍNTESIS DEL ADNc, EMPLEANDO EL KIT DE *Transcriptasa Reversa QuantiNova (Qiagen)*

1. Preparar la reacción de eliminación de ADN genómico, de acuerdo a la tabla 2. Mezclar y almacenar en hielo.

Componentes	Volumen
<i>gDNA Removal Mix</i>	2 μ l
<i>Template RNA</i>	Variable
Adicionar agua libre de RNase, hasta llegar a un volumen final de 15 μ l	

Tabla 2 – Componentes de la reacción de eliminación de ADN genómico

2. Incubar durante 2 minutos a 45 °C en el termociclador. Luego colocar inmediatamente la mezcla sobre hielo.
3. Preparar la mezcla maestra de transcripción inversa, de acuerdo a la tabla 3. Mezclar y almacenar en hielo. La mezcla maestra de transcripción inversa contiene todos los componentes requeridos para la síntesis del ADNc.

Componentes	Volumen
Enzima transcriptasa inversa	1 μ l
Mezcla de transcripción inversa (Cebadores al azar, Mg ²⁺ y dNTPs)	4 μ l
<i>Template RNA</i> (Toda la reacción de eliminación de ADN genómico).	15 μ l
Volumen total de la reacción	20 μl

Tabla 3 – Componentes de la reacción de transcripción inversa

4. Adicionar la mezcla maestra de transcripción reversa recién preparada, a cada tubo que contenga el molde de ARN del paso 2 (15 μ l). Mezclar y almacenar en hielo.
5. Incubar durante 3 minutos a 25 °C en el termociclador (hibridación).
6. Incubar durante 10 minutos a 45 °C en el termociclador (elongación del ADNc).
7. Incubar durante 5 minutos a 85 °C en el Termociclador (inactivación de la transcriptasa inversa).
8. Colocar las reacciones en hielo y proceder directamente con la PCR en tiempo real.



APÉNDICES

APÉNDICE A

CONCENTRACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ARN TOTAL EXTRAÍDO

		Muestra	ARN total [ng/μl]
HT1080	MPC	1	611.4810
		2	796.4575
		3	833.2715
	MPA	1	458.0490
		2	393.7230
		3	363.1945
HEK293T	C	1	1639.43
		2	1594.1045
		3	1348.6375
	MPA	1	1458.292
		2	1434.965
		3	1255.683

Tabla 4 – Concentraciones en ng/μl del ARN total extraído. Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080-MPC, HT1080-MPA, HEK293T-C y HEK293T-MPA.

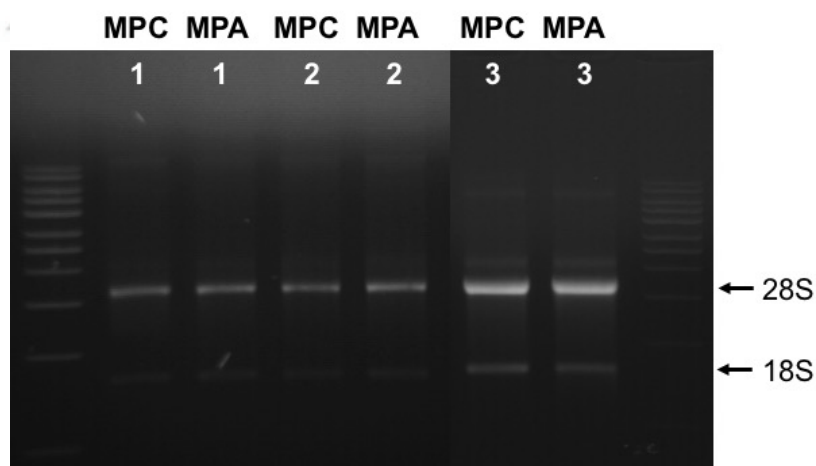


Figura 21 – Gel de agarosa al 1% mostrando la integridad del ARN total extraído de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA (1 μl de muestra por fila). Fueron realizados 3 experimentos independientes.

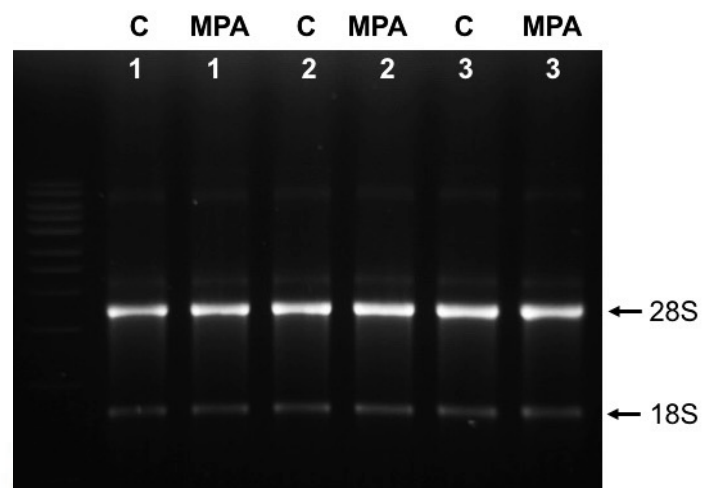
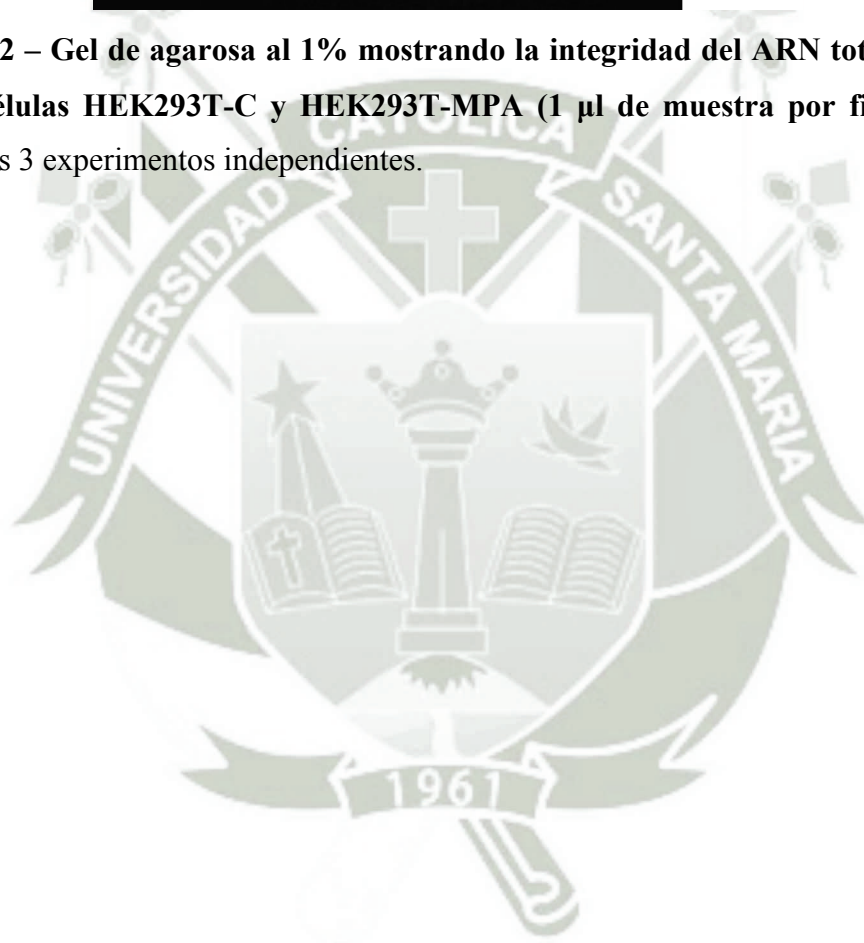


Figura 22 – Gel de agarosa al 1% mostrando la integridad del ARN total extraído de las células HEK293T-C y HEK293T-MPA (1 μ l de muestra por fila). Fueron realizados 3 experimentos independientes.



APÉNDICE B

CONTEO DE LAS CÉLULAS POSITIVAS PARA BRDU Y DAPI

		SFB	HT1080-MPC					
Exp. 1	0%	41	42	42	60	20	205	DAPI BrdU-Alexa488
		14	16	12	16	9	67	
Exp. 2	10%	103	127	64	59	54	407	
		51	66	40	37	35	229	
Exp. 3	0%	27	28	45	22	32	154	
		11	8	15	8	10	52	
Exp. 1	10%	42	62	39	80	39	262	
		22	41	24	32	26	145	
Exp. 2	0%	31	56	28	33	57	205	
		10	17	12	10	9	58	
Exp. 3	10%	77	79	59	43	82	340	
		50	39	32	19	50	190	
			HT1080-MPA					
Exp. 1	0%	55	61	56	45	20	237	DAPI BrdU-Alexa488
		14	12	9	10	7	52	
Exp. 2	10%	55	49	60	38	23	225	
		18	17	26	16	5	82	
Exp. 3	0%	88	56	56	59	39	298	
		15	13	15	13	5	61	
Exp. 1	10%	32	65	35	55	42	229	
		23	22	19	25	23	112	
Exp. 2	0%	49	60	60	78	63	310	
		9	7	15	13	14	58	
Exp. 3	10%	74	55	71	51	24	275	
		36	20	23	30	14	123	
		<i>Imagen 1</i>	<i>Imagen 2</i>	<i>Imagen 3</i>	<i>Imagen 4</i>	<i>Imagen 5</i>	TOTAL	

Tabla 5 – Conteo de los núcleos de las células HT1080-MPC y HT1080-MPA, positivas para DAPI y BrdU. Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080-MPC y HT1080-MPA bajo las condiciones de ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. En cada experimento fueron adquiridas 5 imágenes; a partir de las cuales fueron contados los núcleos marcados con DAPI (azul) y BrdU-Alexa488 (verde).

APÉNDICE C

CONTEO DE LAS CÉLULAS POSITIVAS PARA BRDU Y DAPI

		SFB	HT1080 - MC Control					
Exp. 1	0%	11	9	12	12	9	53	DAPI BrdU-Alexa555
		5	3	1	2	2	13	
Exp. 2	10%	67	35	35	36	49	222	
		35	24	23	25	27	134	
Exp. 3	0%	13	7	18	15	10	63	
		5	3	3	4	2	17	
Exp. 1	10%	50	49	37	42	46	224	
		26	32	25	31	27	141	
Exp. 2	0%	16	21	9	5	10	61	
		3	1	3	3	3	13	
Exp. 3	10%	74	29	22	45	61	231	
		28	24	15	28	27	122	
		HT1080 - MC enriquecido con ADAMTS-1						
Exp. 1	0%	5	11	10	11	12	49	DAPI BrdU-Alexa555
		1	1	2	0	3	7	
Exp. 2	10%	29	40	39	46	36	190	
		7	14	15	25	15	76	
Exp. 3	0%	10	14	14	8	4	50	
		2	4	0	0	1	7	
Exp. 1	10%	38	41	46	48	37	210	
		13	32	14	16	13	88	
Exp. 2	0%	17	6	12	7	15	57	
		2	2	0	2	2	8	
Exp. 3	10%	39	41	35	19	30	164	
		17	15	16	15	9	72	
		<i>Imagen 1</i>	<i>Imagen 2</i>	<i>Imagen 3</i>	<i>Imagen 4</i>	<i>Imagen 5</i>	TOTAL	

Tabla 6 – Conteo de los núcleos de las células HT1080 (tipo salvaje) positivas para DAPI y BrdU. Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080 (tipo salvaje) las cuales fueron tratadas con un MC Control y un MC enriquecido con ADAMTS-1, en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. En cada experimento fueron adquiridas 5 imágenes; a partir de las cuales fueron contados los núcleos marcados con DAPI (azul) y BrdU-Alexa555 (rojo).

APÉNDICE D

MEDICIÓN DE LAS DISTANCIAS RECORRIDAS POR LAS CÉLULAS

Célula	HT1080-MPC		HT1080-MPA		
	0% SFB	10% SFB	0% SFB	10% SFB	
Exp. 1	1	299.64	575.561	295.567	227.542
	2	210.283	276.63	276.715	102.676
	3	193.341	253.931	245.324	60.114
	4	296.496	218.502	196.364	328.406
	5	505.597	385.322	180.656	203.816
	6	140.764	398.48	256.172	249.886
	7	196.065	540.436	236.841	310.498
	8	304.729	279.899	231.281	367.717
	9	266.754	353.309	199.973	387.66
	10	288.372	487.363		
	11	126.788	281.395		
	12	133.355	502.242		
	13	213.236	325.566		
	14	250.329			
Exp. 2	1	163.921	357.715	174.879	386.32
	2	426.958	256.529	209.415	85.672
	3	307.167	668.789	62.186	124.346
	4	235.724	348.931	81.931	345.454
	5	111.49	339.602	123.504	400.679
	6	72.015	492.165	190.106	230.547
	7	253.253	587.969	162.748	469.117
	8	261.897	495.524	238.656	336.415
	9	493.646	437.961	117.694	357.841
	10	236.109	403.499	124.022	133.183
	11	229.622	288.684	116.213	167.762
	12	340.214		160.441	
	13	272.785		95.848	
	14	143.646		133.98	
	15	206.341		179.346	
	16	144.475		228.942	
Exp. 3	1	160.031	258.167	60.342	137.47
	2	103.276	214.157	80.763	102.714
	3	167.503	131.016	59.117	181.826
	4	107.451	266.872	155.964	102.446
	5	103.417	276.743	80.709	108.74
	6	103.999	188.352	82.528	148.411
	7	48.662	154.206	81.189	155.171

8	136.332	203.131	196.876	104.789
9	77.194	219.695	145.956	196.372
10	58.605		93.574	104.402
11	105.146		27.042	97.488
12	56.365		169.792	
13	144.328		37.21	
14	116.663		113.509	
15	131.016		31.33	
16	188.352		97.817	
17	99.389			

Tabla 7 – Medición de las distancias recorridas por las células HT1080-MPC y HT1080-MPA. Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080-MPC y HT1080-MPA bajo las condiciones de ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. En cada experimento fue rastreado un número determinado de células, considerando únicamente a las que no sufrieron división celular ni tuvieron contacto entre sí. Así, se consiguió medir las distancias recorridas por las células desde las 0 hasta las 12 horas.



APÉNDICE E

MEDICIÓN DE LAS DISTANCIAS RECORRIDAS POR LAS CÉLULAS

Célula	HT1080 - MC Control		HT1080 - MC enriquecido con ADAMTS-1		
	0% SFB	10% SFB	0% SFB	10% SFB	
Exp. 1	1	175.167	351.149	181.318	182.414
	2	50.97	176.406	117.195	173.2
	3	165.95	118.769	219.104	85.72
	4	121.782	299.291	69.007	247.255
	5	68.475	172.589	183.198	160.33
	6	124.801	196.186	222.563	233.894
	7	37.557	259.698	10.288	155.952
	8	62.001	136.259	31.482	98.846
	9	73.991	134.904	28.48	78.969
	10	181.374	191.754	45.174	36.271
	11	153.4	167.883	41.992	226.407
	12	188.677	96.534	98.402	212.745
	13	115.351	209.958	66.401	78.416
	14	121.634		45.248	109.322
	15	60.611		42.712	103.075
	16	135.907			109.976
	17	267.868			43.309
	18	176.579			180.065
	19	156.74			122.396
	20	179.08			327.288
	21				131.898
	22				81.816
Exp. 2	1	137.623	299.269	152.125	226.184
	2	310.211	386.958	65.874	369.8
	3	80.136	408.269	85.017	89.445
	4	25.543	261.85	158.047	201.669
	5	35.478	300.69	76.656	150.711
	6	54.449	159.359	94.395	95.435
	7	58.489	123.98	272.56	88.473
	8	17.566	147.652	62.512	44.515
	9	76.7	193.049	67.348	48.162
	10	339.982	160.044	156.335	121.446
	11	180.661	215.062	113.804	174.762
	12	93.804	126.944	40.685	299.88
	13	165.97	163.25	149.901	
	14	93.845	62.506	186.683	

	15	84.015	35.139	99.501	
	16	83.735	457.628	19.764	
	17	144.669	114.17		
	18	116.175	89.781		
	19	99.866	291.275		
	20		430.303		
	21		160.33		
	22		233.92		
	23		228.305		
	24		185.649		
	25		152.302		
Exp. 3	1	291.531	235.308	78.672	169.563
	2	314.838	339.124	6.658	248.231
	3	52.411	209.653	493.933	216.88
	4	62.519	111.143	80.899	233.542
	5	35.445	120.348	88.709	154.002
	6	215.314	333.605	134.372	19.338
	7	145.622	51.273	103.122	32.362
	8	162.808	122.887	29.791	63.239
	9	86.026	121.716	28.054	254.159
	10	56.686	73.912	41.86	243.708
	11	174.013	202.818		204.059
	12	59.469	134.423		335.595
	13	51.177	413.22		22.033
	14	122.942	96.828		77.716
	15	79.251	168.477		147.104
	16	78.035	249.011		256.615
	17	87.035			87.361
18	123.192			120.309	
19	99.2			107.371	
20	225.759			289.542	
21	113.086				

Tabla 8 – Medición de las distancias recorridas por las células HT1080 (tipo salvaje).

Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080 (tipo salvaje) las cuales fueron tratadas con un MC Control y un MC enriquecido con ADAMTS-1, en la ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. En cada experimento fue rastreado un número determinado de células, considerando únicamente a las que no sufrieron división celular ni tuvieron contacto entre sí. Así, se consiguió medir las distancias recorridas por las células desde las 0 hasta las 12 horas.

APÉNDICE F

MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE LOS AGREGADOS CELULARES
FORMADOS *in vivo*

		Embrión de <i>zebrafish</i>					
		1	2	3	4	5	6
Exp. 1	HT1080-MPC	15.899	17.452	20.142	14.567	9.993	20.335
		27.603	15.69	13.249	20.086	12.013	14.133
		30.111	14.308		13.201	14.026	15.119
			17.666		11.06	17.792	15.042
			10.505		9.507	10.599	18.633
					19.911	25.527	
					16.114	19.092	
					19.079	12.033	
					17.722	15.692	
Exp. 1	HT1080-MPA	12.991	13.826	12.203	8.623	11.483	14.755
		7.066	10.071	17.803	17.666	8.314	14.839
		7.101	8.38	9.726	19.565	9.554	11.306
		9.186	15.546	9.627	12.033	7.9	19.874
		8.143	9.507	9.272	11.038	11.517	
		9.513	8.057	8.623	9.213	9.389	
		11.618	11.06	8.833	17.495	15.924	
		12.554	8.902			9.389	
			12.876				
			6.037				
Exp. 2	HT1080-MPC	16.99	39.085	15.426	43.315	30.861	12.554
		7.066	37.67	14.242	13.02	39.833	16.595
		24.215	39.473			19.322	13.131
		14.139				17.457	15.924
						18.127	21.238
					14.514	40.733	
	HT1080-MPA	4.976	17.176	5.427	30.697	15.808	13.432
		5.69	25.418	14.55		13.574	
		22.467	11.943	17.674		17.106	
		25.336	6.246	8.837		31.617	
		17.973	14.731		10.93		
		12.344		13.477			
		11.367		8.902			

Exp. 3	HT1080-MPC	19.173	15.614	14.353	13.966	42.26	41.099
		16.095	16.414	17.803	32.473		
		11.872	9.498	15.43	26.174		
		35.91	25.226	19.804	12.589		
		10.779	6.438	16.619	20.978		
		37.695		9.513			
		23.584		21.112			
		17.566					
		11.127					
	15.042						
	HT1080-MPA	11.041	7.07	13.801	25.752	13.801	16.076
		7.07	19.76	11.046	17.457	13.663	
		15.692	9.433	11.573	16.095	13.801	
		14.522	10.474	14.84		8.281	
		14.396					

Tabla 9 – Medición del diámetro de los agregados celulares formados por las células HT1080-MPC y HT1080-MPA. Fueron realizados 3 experimentos independientes con las células HT1080-MPC y HT1080-MPA bajo las condiciones de ausencia (0%) o presencia (10%) de SFB. En cada experimento fueron medidos los diámetros de los agregados celulares formados en 6 embriones de *zebrafish*.