



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD13 SOBRE LA  
PROLIFERACIÓN, LA VIABILIDAD E INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**SERGIO ERICK VALDIVIA LÓPEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

- PRESIDENTE:**           **Profesor: Saturnino de León Chapa**
- VOCAL:**                   **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**
- SECRETARIO:**           **Profesor: Enrique Ortega Soto**
- 1er. SUPLENTE:**       **Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez**
- 2° SUPLENTE:**         **Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio**

**ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DEL DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Enrique Ortega Soto**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. EN I.B.B. CLAUDIA ANGÉLICA GARAY CANALES**

---

**SUSTENTANTE:**

**Sergio Erick Valdivia López**

---

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM EN EL LABORATORIO DEL DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, FUE FINANCIADO POR LOS PROYECTOS **CONACYT (80301) Y DGAPA (IN222008).**



BY ZDZISLAW BEKSÍNSKI

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por ser la gran casa de estudios que es, y permitirme formar parte orgullosamente de ella.

A la Facultad de Química por formarme como Q.F.B. y brindarme una educación de alto nivel.

Muchas gracias a ti Mamá por todo lo que me has dado, desde la vida, tu apoyo, tu cariño, tu corazón, y todo tu ser, ya que día a día siempre a mi lado haz estado sin pedirme nada a cambio. Cada día te esfuerzas para poder sacarnos adelante y ayudarnos en la vida. En los momentos de desaliento siempre tenías las palabras correctas. Gracias por brindarme tu confianza, tu fuerza y amor me ayudaron a llegar hasta donde estamos el día de hoy Gracias Mamá Mely.

Muchas Gracias a mi Papá Sergio Valdivia, ya que cada regaño y consejo han sido por mí bien y me han ayudado a formar carácter, siempre me has dado el ejemplo correcto, te agradezco que siempre hayas luchado para ser nuestro sostén y nunca nos des la espalda, siempre que te necesite estuviste ahí con el consejo necesario para salir adelante.

A mis hermanos Melanie, Kevin y Monse por estar presentes siempre para mí, por haber compartido risas, juegos y peleas, por ser tan chidos conmigo, siempre que necesito platicar o simplemente sonreír se que cuento con ustedes, y aun que a veces me desquicien los quiero mucho y espero siempre estar para ustedes.

A mi abuelita Gaby por ser una segunda mamá, por brindarme su cariño y cuidados durante mi infancia, inculcarme el valor de la educación y espero que estés donde estés te encuentres orgullosa de mi, por lograr una carrera.

A Nidia Barragán Vara por tantos momentos compartidos y experiencias, por todo su apoyo durante estos 5 años, por ser mi mejor amiga, por todo ese cariño que me demuestras día a día, por ser una buena compañera, siempre tuviste esa sonrisa que hasta en los peores momentos me ayudo a encontrar fuerzas en mi para salir adelante y vaya que viví momentos difíciles por todo eso y más gracias.

A mis entrañables amigos Metalheads: Edder Gonzales y Rodrigo "Soy Soy" Arana, por conbeber desde hace 8 años, me han brindado su amistad hasta el grado de llegarlos a considerar mis carnales, hemos compartido experiencia sin igual, por estar en los mejores conciertos, y por estar conmigo en las malas y en las buenas.

A la Bandota a cada uno de sus miembros, por ser como una familia durante las largas jornadas en la facultad, brindarme su amistad durante estos años, demostrarme su apoyo incondicional y las ganas de convivir siempre. Porque siempre tuvimos tiempo para pasarla bien. Gracias a todos: Nidi, Moy, Rene, Beto, Angel, Moni, Liliana, Aarón, Ale, Alan, Nadia, José, Marco, Darío, Jaime.

Muchas Gracias al Doctor Enrique Ortega Soto, porque desde el primer día de clases hasta el día de hoy sigo aprendiendo de él, por ser un gran Maestro, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza deposita y por guiarme en la ciencia de la inmunología.

Gracias a la cDra. Claudia Garay por todas sus enseñanzas en el laboratorio, por toda la ayuda brindada a este proyecto. Por ser una amiga que siempre me apoyó, por brindarme su confianza, y defenderme cuando fue necesario.

A mis compañeros de laboratorio los cuales hicieron mi estancia más placentera, con los cuales compartí pocos pero divertidos momentos, de todos aprendí un poco y por brindaron su ayuda cuando fue necesaria, Ileana, Sujhey, Ana Diana, Natalia, Lupe, Aurora, Irais, Raymundo y la Sra. Raquel.

A mis Primos Lucho, Pelón y mis tías Gloria y Adriana por tener la puerta de su casa abierta para mí.

A mi primo Christian y mis tíos Chelo y Fer por brindarme su apoyo y asilo cuando lo llegue a necesitar.

A todos los compañeros y compañeras con los cuales compartí clases y experiencias en la facultad y fuera de ella, a los equipos de Futbol Joga y Betabeles.

A mis profesores de la carrera por todos los conocimientos transmitidos, su dedicación en la labor docente, y por transmitir ese gusto por la ciencia. Francisco Rojo, Manuel Suarez, Mónica Heras, Aida Navas, Ariel Baltazar, Pedro Valadez, y Raúl Garza.

Un agradecimiento para todos aquellos que ya no pude nombrar los cuales son bastantes y de ante mano una disculpa.

Y gracias a mi motor, a mi pasión, a lo que me dio un estilo de vida, lo que me hace vibrar, headbanging cada día, viva el **METAL**



# Índice

1. <b>Resumen</b> .....	1
2. <b>Antecedentes</b> .....	2
2.1. Aminopeptidasa N (CD13).....	2
2.1.1. Actividad Enzimática.....	2
2.1.2. Otras funciones de CD13 .....	3
2.2. CD13 como posible blanco terapéutico .....	5
2.2.1. <b>Cáncer</b> .....	6
2.2.1.1. Incidencia a nivel <b>mundial</b> .....	8
2.2.1.2. Tratamientos en contra del <b>cáncer</b> .....	10
2.2.2. CD13 y sus funciones <b>en células neoplásicas</b> .....	11
2.3. Apoptosis.....	14
2.3.1. <b>Generalidades de la apoptosis</b> .....	14
2.3.2. <b>Fases de la apoptosis</b> .....	16
2.3.3. <b>Caspasas</b> .....	18
2.3.4. <b>Vías involucradas en la apoptosis</b> .....	19
2.3.5. <b>Activación de la apoptosis por vía extrínseca</b> .....	20
2.3.6. <b>Activación de la apoptosis por vía intrínseca</b> .....	22
2.3.7. <b>Regulación de la apoptosis</b> .....	24
3. <b>Justificación</b> .....	27
4. <b>Hipótesis</b> .....	28
5. <b>Objetivos</b> .....	28
5.1. <b>Objetivo General</b> .....	28
5.2. <b>Objetivos Particulares</b> .....	28
6. <b>Materiales y Métodos</b> .....	29
6.1. <b>Células</b> .....	29
6.2. <b>Anticuerpos</b> .....	30
6.3. <b>Purificación de los anticuerpos empleando Columnas de proteína A-agarosa (GIBCO)</b> .....	30

6.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	31
6.5. Ensayo para cuantificar Proliferación y Viabilidad.....	32
6.6. Cuantificación de la apoptosis.....	34
6.7. Análisis Estadístico.....	37
7. <b>Resultados y Análisis</b> .....	38
7.1. Unión específica de los mAbs purificados a su molécula blanco: CD13.....	38
7.2. Expresión de CD13 en diferentes líneas celulares de cáncer.....	41
7.3. Efecto de los distintos anticuerpos anti-CD13 sobre la proliferación y viabilidad en líneas celulares de cáncer humano.....	42
7.4. Inducción de la apoptosis con mAbs anti-CD13 en líneas celulares de cáncer.....	53
8. <b>Conclusiones</b> .....	63
9. <b>Perspectivas</b> .....	64
10. <b>Referencias</b> .....	65
11. <b>Anexo</b> .....	71

## 1. RESUMEN

CD13 es una molécula altamente expresada en algunos tipos de células tumorales de humano, las cuales muestran un fenotipo agresivo y una alta tasa de proliferación, razón por la cual CD13 ha sido propuesto como un posible blanco terapéutico. En el presente trabajo analizamos la capacidad de anticuerpos monoclonales específicos contra CD13 para inducir la apoptosis o interferir con la proliferación de líneas celulares de cáncer humano.

Se examinó el efecto de 3 distintos anticuerpos monoclonales (mAbs C, E y 452) sobre la proliferación, viabilidad e inducción de la apoptosis de 3 diferentes líneas celulares de cáncer humano. Las 3 líneas tienen distinto tejido de origen: la línea U-937 proviene de una leucemia mieloide aguda; PC-3 es una línea de cáncer de próstata y la línea A-375 es de un melanoma maligno.

Se observó que los 3 anticuerpos monoclonales inducen una disminución en la tasa de proliferación de las células e inducen de manera significativa la apoptosis en comparación a células sin tratamiento. Estos efectos son dependientes de la concentración y tiempo de incubación. Sobre las líneas U-937 y PC-3 los 3 anticuerpos inducen efectos cuantitativamente similares; sin embargo, en la línea A-375 el efecto que induce el mAb C es mayor en comparación con el efecto de los otros dos anticuerpos.

Otro punto importante fue determinar si el nivel de expresión de CD13 se encuentra directamente relacionado con la magnitud del efecto que inducen los anticuerpos sobre la proliferación y la apoptosis, pero no encontramos que en estas tres líneas celulares el nivel de expresión de CD13 correlacione cuantitativamente el efecto de los anticuerpos sobre las células blanco.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Aminopeptidasa N (CD13)

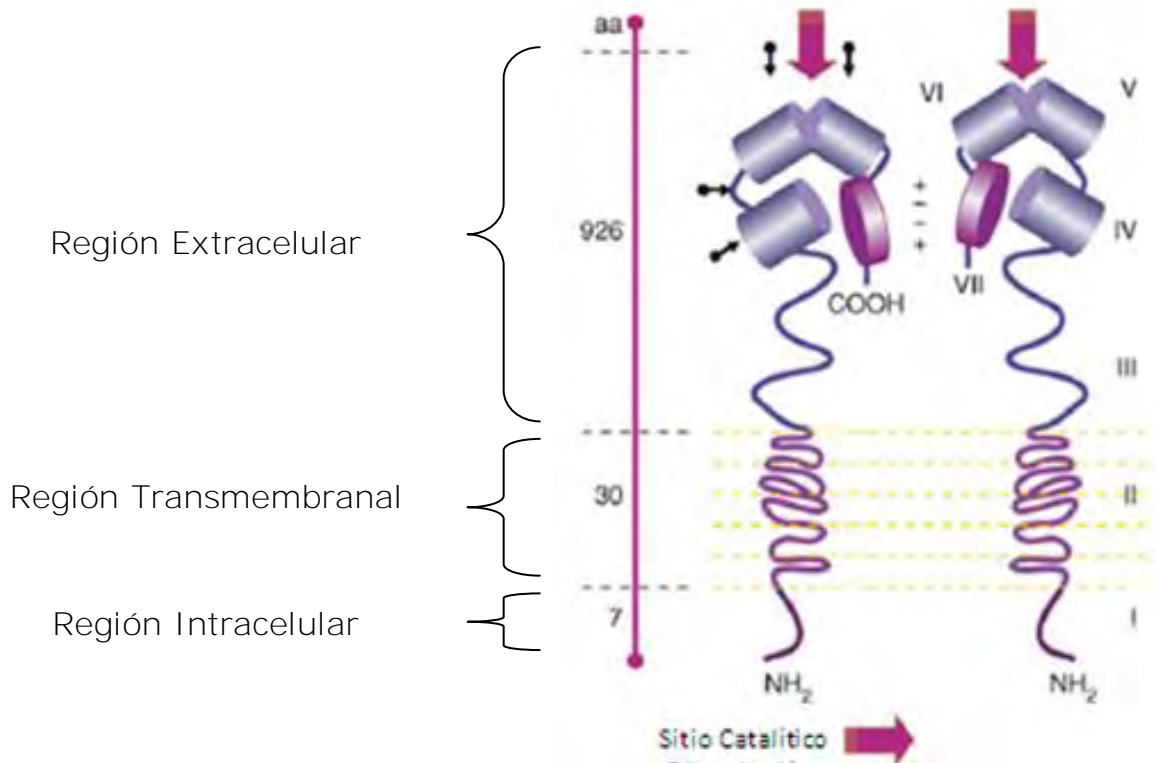
La aminopeptidasa N, también denominada CD13, es una ectopeptidasa transmembranal altamente glicosilada, con un peso molecular aproximado de 160 kDa, codificada en el cromosoma 15 (q25-q26), y miembro de la familia de metaloproteasas dependientes de zinc.

CD13 es una cadena polipeptídica de 967 aminoácidos (aa); cuenta con 3 regiones: una región citoplasmática corta de entre 7-10 aa, una región transmembranal de 30 aa y una región extracelular de 926 aa donde se localiza el sitio catalítico. <sup>(33, 53)</sup>

Dentro de las células hematopoyéticas, CD13 es considerado un marcador del linaje mieloide (monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC)); y también se ha descrito su expresión en diferentes tejidos y células como: células del sistema nervioso, células epiteliales y endoteliales, fibroblastos, placenta, pulmón, riñón, sebocitos, células epiteliales del intestino y precursores de linfocitos T y B. <sup>(13, 37,54)</sup>

#### 2.1.1. Actividad enzimática

La función más conocida de CD13 es su actividad de aminopeptidasa, que consiste en remover aminoácidos N-terminales de naturaleza neutra preferentemente, regulando así la actividad de ciertos péptidos que incluyen encefalinas, angiotensinas, citocinas y quimiocinas, así como componentes de matriz extracelular como colágena IV y entactina. <sup>(37,47)</sup>



**Figura 1.** Estructura hipotética de la aminopeptidasa N (CD13) en humanos. CD13 en forma de homodímeros, se organiza en 7 dominios indicados con números romanos a la derecha, la dimerización ocurre entre los dominios VII de cada monómero. El sitio activo de la enzima se encuentra entre los dominios V y VI. El número de aminoácidos que forman cada una de las regiones está indicado a la izquierda de la figura. Modificado de 37

### 2.1.2. Otras Funciones de CD13

**Procesamiento de antígenos:** Varios estudios han demostrado que CD13 participa en el procesamiento extracelular de péptidos antigénicos que protruyen de moléculas del MHC tipo II, ya que al incubar DCs con inhibidores no selectivos de peptidasas o con mAb anti-CD13, ambos tratamientos bloquearon la actividad enzimática y redujeron la presentación antigénica.<sup>(3,37)</sup>

**Endocitosis:** CD13 participa como receptor para algunos virus, como el coronavirus 229E, causante de infecciones en vías respiratorias. Se considera que su papel como receptor viral requiere de la internalización de CD13. También parece CD13 participar en la internalización del colesterol y su cristalización, ya que en pacientes con cálculos de colesterol en la vesícula biliar fue aislada una proteína con un peso molecular de 130 kDa presuntamente identificada como CD13, capaz de promover la cristalización del colesterol *in vitro*.<sup>(27, 43)</sup>

**Molécula de adhesión:** Se ha propuesto a CD13 como molécula que participa en la adhesión celular, ya que se encontró que en cultivos celulares CD13 se distribuye de manera homogénea en la membrana de células aisladas, pero cuando las células forman agregados, CD13 se desplaza a la zona de contacto célula-célula, al mismo tiempo que hay una inducción de la expresión de CD13. En estudios recientes se demostró que el entrecruzamiento de CD13 en monocitos humanos induce un fenómeno de agregación homotípica (HA), proceso independiente de la actividad enzimática de la aminopeptidasa. Se ha sugerido que para mediar la HA, CD13 se asocia con galectina-3, ya que la adición de mAb anti-galectina-3 elimina la HA inducida por CD13, lo cual indica que posiblemente galectina-3 es el ligando de CD13 cuando funge como molécula de adhesión.<sup>(38, 39,40)</sup>

**Diferenciación celular:** La expresión de CD13 muestra variaciones durante las distintas etapas de maduración y diferenciación celular en células mieloides normales y neoplásicas. Este fenómeno es utilizado para el diagnóstico de ciertos tipos de leucemias y linfomas, ya que CD13 es expresado en la mayoría de las leucemias histiocíticas, leucemias mieloides agudas y en las etapas tempranas de diferenciación de linfocitos. En los linfocitos maduros se vuelve negativa esta expresión. Finalmente, los inhibidores de la actividad catalítica de CD13 tales como la bestatina tienen efectos sobre la modulación de la diferenciación celular *in vitro*.<sup>(26, 32,42)</sup>

**Fagocitosis:** Se ha reportado que las células mononucleares de sangre periférica con mayor actividad fagocítica expresan el doble de cantidad de CD13 que las demás células fagocíticas.

Más recientemente se describió que CD13 estaba directamente involucrado en el proceso de fagocitosis, ya que al estimular células con prostaglandina E2 (PGE2), un promotor fagocítico, aumenta la expresión de CD13 en células altamente fagocíticas. Por otro lado, se ha descrito que **durante la fagocitosis mediada por FcγRs** en monocitos se presenta una redistribución de CD13 hacia la zona de interacción del blanco fagocitado, y que CD13 es internalizado hacia el fagosoma. La fagocitosis de partículas que son capaces de inducir el entrecruzamiento simultáneo de **los receptores Fcγ** y CD13, fueron fagocitadas con mayor eficiencia que las partículas que únicamente inducían el entrecruzamiento de los receptores **Fcγ**. <sup>(39,55)</sup>

## 2.2. CD13 como posible blanco terapéutico en cáncer

Como se ha mencionado, CD13 ha sido objeto de muchos estudios debido a las múltiples funciones que desempeña en la célula. Entre las áreas que han llamado la atención de los investigadores está la alta expresión de CD13 en algunas células tumorales. Se ha demostrado que CD13 se sobreexpresa en ciertas células cancerosas, especialmente en aquellas que presentan un rápido crecimiento y un fenotipo agresivo, por lo que se sugiere que CD13 de alguna manera podría participar en el desarrollo del cáncer. Esta hipótesis parece ser apoyada por algunos estudios que han demostrado que en efecto, CD13 puede participar en diferentes funciones durante el desarrollo de un proceso canceroso. <sup>(14, 15, 36, 52)</sup>

### 2.2.1. Cáncer

El termino cáncer se utiliza para agrupar a más de 100 enfermedades potencialmente fatales, las cuales se caracterizan por ser padecimientos complejos y de origen multifactorial, en los que hay una proliferación celular sin control y autónoma, condición que es transmitida a las células hijas, dando lugar a un tumor y adquiriendo potencialidad de invasión a distancia de otros órganos o tejidos (metástasis). <sup>(34, 59)</sup>

El proceso mediante el cual las células normales se transforman en células cancerosas se denomina carcinogénesis. Este proceso consta de varias etapas y en su inicio involucra cambios genéticos y epigenéticos en protooncogenes, así como en genes supresores de tumores. Una mutación en dichos genes es raramente suficiente para el desarrollo de un tumor, pero puede conducir a una inestabilidad genómica, por la cual las células pueden acumular más mutaciones que finalmente les proporcionen pérdida o ganancia de funciones que dan como resultado el desarrollo de cáncer (Figura 2). <sup>(2,28)</sup>

Si sólo tiene lugar un aumento en la proliferación de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se habla de un tumor benigno, que generalmente puede ser extirpado por cirugía. Por el contrario, cuando las células de un tumor son capaces de invadir tejidos circunstantes o distantes tras penetrar en el torrente sanguíneo o linfático, y formar metástasis, se habla de un tumor maligno. <sup>(2)</sup> Las células tumorales muestran características que las diferencian de las células normales:

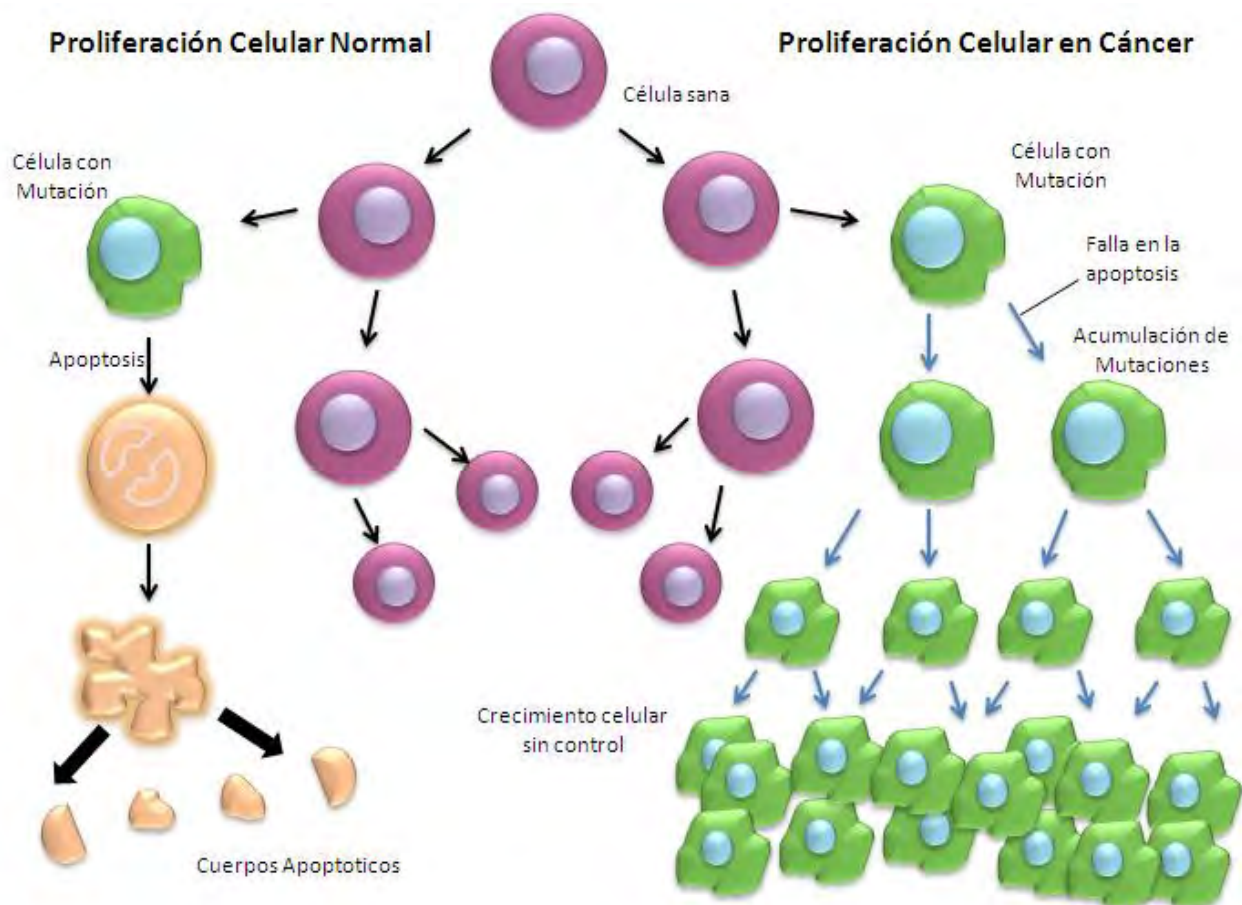
a) Para proliferar no dependen de factores de crecimiento como las células normales, porque existe la posibilidad de que sean capaces de secretar sus propios factores de crecimiento para estimular su proliferación en un proceso llamado estimulación autócrina. <sup>(51)</sup>



b) A diferencia de las células normales, que requieren de contacto con una superficie externa para ser capaces de proliferar, las células tumorales son independientes de anclaje.

c) Las células normales responden a la presencia de otras células, y en cultivo formarán una monocapa debido a la inhibición por contacto, mientras que las células tumorales carecen de ésta y frecuentemente crecen sobre o bajo otras células.

d) Las células normales detienen su proliferación una vez que alcanzan cierta densidad mientras que las células tumorales continúan proliferando sin control alguno.



**Figura 2.** Proceso de proliferación celular durante el cáncer

### 2.2.1.1. Incidencia del cáncer a nivel mundial

Una de cada 8 muertes en el mundo es debida al cáncer, siendo esta enfermedad la segunda causa de muerte en países desarrollados solo por debajo de enfermedades cardiacas; en países subdesarrollados es la tercera causa de muerte (Cuadro 1).

En el 2007 hubo un estimado que 7.6 millones de personas alrededor del mundo murieron por causa del cáncer, aproximadamente 20,000 personas por día. Se estima que para el 2050 existirán 27 millones de casos nuevos de cáncer alrededor del mundo y 17.5 millones de muertes debidas al cáncer en un solo año.

**Tabla 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2001. Adaptado de (2)**

<b>Enfermedad o padecimiento</b>	<b>Puesto</b>	<b>Muertes (x10<sup>3</sup>)</b>	<b>%</b>
<b>Enfermedades cardiacas</b>	1	11,004	19.6
<b>Neoplasias Malignas</b>	2	7,021	12.5
<b>Enfermedades cerebrovasculares</b>	3	5,390	9.6
<b>Infecciones respiratorias</b>	4	3,753	6.7
<b>Padecimientos pulmonares obstructivos crónicos</b>	5	2,676	4.8
<b>VIH</b>	6	2,574	4.6
<b>Condiciones perinatales</b>	7	2,522	4.5
<b>Enfermedades Diarreicas</b>	8	1,783	3.2
<b>Tuberculosis</b>	9	1,606	2.9
<b>Accidentes automovilísticos</b>	10	1,108	2.0
<b>Otros</b>		4,577	29.6
<b>Total</b>		56,242	100

Existen factores, tanto genéticos como ambientales, que hacen más susceptible a un grupo de la población a cierto tipo de cáncer, como son la edad, el sexo, la raza, y factores físicos y químicos a los que se está expuesto.

En hombres, la neoplasia con mayor incidencia es el cáncer pulmonar, seguida por el cáncer de próstata y en tercer lugar el cáncer de estómago. En cambio para las mujeres el más frecuente es el cáncer de mama, seguido por el cáncer cervicouterino, y en tercer lugar el cáncer colorectal (Tabla 2).

**Tabla 2. Número de nuevos casos de cáncer detectados en hombres y mujeres durante el 2007 a nivel mundial. Adaptado de (2)**

<b>Puesto</b>	<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Casos</b>	<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Casos</b>
<b>1</b>	Pulmón	1,108,731	Mama	1,301,867
<b>2</b>	Próstata	782,647	Cervicouterino	555,094
<b>3</b>	Estómago	691,432	Colorectal	536,662
<b>4</b>	Colorectal	630,358	Pulmón	440,390
<b>5</b>	Hígado	502,571	Estómago	375,111
<b>6</b>	Esófago	361,931	Ovario	230,555
<b>7</b>	Vías urinarias	314,256	Útero	226,787
<b>8</b>	Cavidad	200,774	Hígado	208,557
<b>9</b>	Linfoma No-Hodgkin	196,298	Esófago	167,352
<b>10</b>	Leucemia	188,394	Leucemia	142,569

### 2.2.1.2. Tratamientos en contra del cáncer

La elección del tratamiento antitumoral depende principalmente del estadio y del tipo histológico del tumor, así como el estado de salud del paciente. De forma general, los principales tratamientos en contra del cáncer pueden clasificarse en tres tipos:

- 1) La cirugía es el método más empleado para eliminar tumores benignos que se encuentran localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz la extirpación, parte del tejido que rodea al tumor también es removido.
- 2) La radioterapia es un tratamiento que emplea altas dosis de radiación ionizante para destruir células cancerosas y reducir el tamaño del tumor.
- 3) La quimioterapia involucra el uso de fármacos con actividad citotóxica, administrados ya sea individualmente o en combinación, para destruir las células en proceso de división celular.

El reto en la terapia contra el cáncer es la eliminación selectiva de las células cancerosas sin ocasionar daño o haciendo el menor daño posible a las células normales. Ya que la alta tasa de proliferación de las células cancerosas las distingue de células normales, algunas estrategias se dirigen a atacar solamente a células en proliferación. Tal es el caso de los fármacos antineoplásicos y la radiación, cuyo objetivo es eliminar las células cancerosas induciéndoles algún tipo de muerte celular. Inicialmente se pensaba que en la inducción de apoptosis de células cancerosas por estos tratamientos estaba involucrada solamente p53. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que estos agentes también pueden inducir necrosis, autofagia y catástrofe mitótica. Se ha reportado que el tipo de muerte que provocan dichos agentes está en función de su naturaleza, la dosis en la que son empleados, así como el fenotipo y genotipo de las células diana.<sup>(7)</sup>

La desventaja de estos tratamientos es que afectan también en mayor o menor medida a células normales. Por este motivo, otras estrategias se han basado en identificar blancos moleculares que sean expresados exclusiva o preferencialmente en células cancerosas, utilizando estas moléculas como blancos específicos para atacar a estas células, ya sea con anticuerpos, con inhibidores selectivos, etc. Como se mencionó arriba, CD13 es sobreexpresado en algunos tipos de cáncer, por lo que se ha evaluado su función y su posible utilización como blanco de tratamientos antitumorales.

### 2.2.2. Funciones de CD13 en células neoplásicas

Diferentes estudios han asociado la sobreexpresión de la aminopeptidasa N con algunas funciones importantes involucradas en el desarrollo del cáncer y el tumor:

**Capacidad invasiva de las células tumorales:** Existe una fuerte correlación entre la sobreexpresión y/o la actividad enzimática de la aminopeptidasa N, y la capacidad invasiva de algunas células neoplásicas que la expresan. Se ha demostrado que bloqueando la actividad catalítica de CD13 con mAbs disminuye la capacidad de invasión de las células tumorales *in vitro*, lo cual es primordial para el desarrollo del tumor, aunque esto no se ha podido comprobar *in vivo*. Se ha sugerido que este mecanismo está relacionado con la degradación de colágeno tipo-IV, lo cual deja de manifiesto que CD13 es esencial para la invasión de células cancerígenas. <sup>(44, 49)</sup>

**Capacidad proliferativa de células cancerosas:** Numerosos estudios han demostrado que en presencia de mAb anti-CD13 disminuye la tasa de proliferación de algunos tipos celulares de cáncer como son las líneas: SN12M, 1736, FTC-133. El mecanismo por el cual los anticuerpos reducen la proliferación aún es desconocido, sin embargo existe la hipótesis que plantea

a CD13 como un receptor de membrana, el cual pudiera estarse asociando a una proteína auxiliar y desencadenar una cascada de señalización que da como resultado el proceso de apoptosis.<sup>(24, 49, 58, 61)</sup>

**Participación en la migración Celular:** Se ha descrito la participación de CD13 en la motilidad de algunas células cancerígenas, ya que al incubar dichas células en presencia de mAb anti-CD13 se observa disminuida significativamente la migración de las células cancerígenas.

También se ha observado que la transfección de células neoplásicas metastásicas con ARNsh para el ARNm de CD13, o el uso de inhibidores de la actividad catalítica de CD13, bloquea la migración de estas células en Matrigel y su motilidad en ensayos de cierre de herida.<sup>(48)</sup>

Así mismo, algunas células que expresan una variante enzimática de CD13 con actividad enzimática disminuida, muestran una disminución en su capacidad migratoria en comparación con las células que expresan la forma con actividad enzimática normal. Estas observaciones sugieren que la actividad enzimática de CD13 es esencial y que participa de manera activa en la motilidad celular.<sup>(8, 19)</sup>

**Angiogénesis:** La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también es un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral, puesto que la masa tumoral requiere de una buena irrigación sanguínea para mantener su desarrollo.

Las peptidasas extracelulares pueden participar en la angiogénesis por al menos tres diferentes mecanismos: a) degradación de proteínas de la matriz extracelular, b) generación de péptidos con propiedades

proangiogénicas y/o antiangiogénicas, c) degradación de los factores de crecimiento y/o proangiogénicos. Gracias a su actividad enzimática, CD13 podría llevar a cabo cualquiera de estos tres mecanismos, y hay datos reportados que sugieren que CD13 puede participar en procesos de angiogénesis. Así por ejemplo, se ha reportado que la hipoxia y el uso de factores angiogénicos inducen la expresión de CD13 en células endoteliales primarias. La aminopeptidasa N que expresan dichas células endoteliales es idéntica a la que expresan líneas de células endoteliales de los vasos que irrigan un tumor. Además se demostró que inhibidores de la actividad enzimática de CD13 bloquean la formación de tubos capilares de las células endoteliales que tienen contacto con células cancerígenas *in vitro*.<sup>(5, 8, 19)</sup>

La incubación con inhibidores de CD13 como bestatina, así como con algunos mAbs anti CD13, es capaz de derogar la habilidad de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) cultivadas en matrigel, para organizar una red capilar, sin alterar la tasa de proliferación.

**Inducción de la apoptosis:** En 2011, Piedfer y colaboradores describieron a CD13 como un blanco proapoptótico en la línea celular U-937, la cual es una leucemia mieloide aguda promonocítica, y mostraron también que anticuerpos anti-CD13 pueden afectar la proliferación de estas células *in vitro*. Los datos de Piedfer sugieren que este efecto es independiente de la actividad catalítica de la aminopeptidasa, ya que en el estudio se usaron 3 diferentes anticuerpos, y solo uno de estos afecta la actividad catalítica de CD13, pero su efecto en la inducción de apoptosis era muy similar al efecto de los otros dos anticuerpos que no afectan la actividad. En este estudio, se demostró la participación de caspasas en el proceso de inducción de la apoptosis, empleando inhibidores selectivos de las principales caspasas.<sup>(45)</sup>

En 2012 Guenova y colaboradores realizaron un estudio con 50 pacientes con Leucemia linfocítica crónica de células B (la leucemia más común

en adultos), en el cual se obtuvieron muestras de la medula ósea y se aislaron linfocitos B de cada paciente. Se inmunotipificó la expresión de 2 diferentes epitopes de CD13: 7H5 y M7, resultando la expresión positiva en 40 pacientes para 7H5 y 8 pacientes para M7. Las células de los pacientes positivos para la expresión de CD13 fueron cultivadas a diferentes concentraciones de curcumina, una molécula de origen natural presente en distintas plantas, la cual es un inhibidor de la actividad catalítica de la aminopeptidasa N. La curcumina causó un aumento de la apoptosis dependiente de la concentración en las líneas celulares que expresan CD13 (7H5) de hasta un 20% y las muestras negativas para esta epitope solamente mostraron un aumento del 10%.<sup>(22)</sup>

## 2.3. Apoptosis

### 2.3.1. Generalidades de la Apoptosis

La supervivencia de un organismo pluricelular depende de un sofisticado balance entre la vida y la muerte de sus células. Esta última puede ocurrir mediante distintos procesos esencialmente diferentes como son la apoptosis y la necrosis.

La apoptosis implica la activación de mecanismos específicos en tiempos específicos, que conducen a la muerte de la célula. Es una estrategia esencial para proteger el equilibrio homeostático de un organismo multicelular; es un proceso en el que la célula programa su propia muerte y ha sido llamado también **"suicidio celular"**. Afecta solo a células individuales, aisladas y no se asocia a inflamación, siendo un fenómeno bastante común. Tiene un rol central en la morfogénesis, en el desarrollo, la homeostasis y es determinante en la eliminación de células dañadas o peligrosas para el organismo (células infectadas con virus, células del sistema inmune, células con daño en el ADN y células cancerosas).<sup>(7, 10, 18)</sup>



La célula que se encuentra en proceso de apoptosis presenta características morfológicas y bioquímicas que la distinguen de las células que no están en apoptosis. Fisiológicamente se caracteriza por que la célula que ha recibido una señal que induce apoptosis pierde contacto de las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución del tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen íntegros. Sin embargo, en la mitocondria se llevan a cabo cambios como la reducción del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno. En etapas posteriores la cromatina se condensa y se desintegra. Posteriormente la célula genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeadas de membrana plasmática íntegra, que contienen parte de la cromatina y de los organelos celulares; estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos. Cuando dichos cuerpos son liberados al medio intersticial son rápidamente fagocitados por células vecinas, lo cual es una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la apoptosis ya que no se libera material intracelular (Figura 3).<sup>(18, 29)</sup>

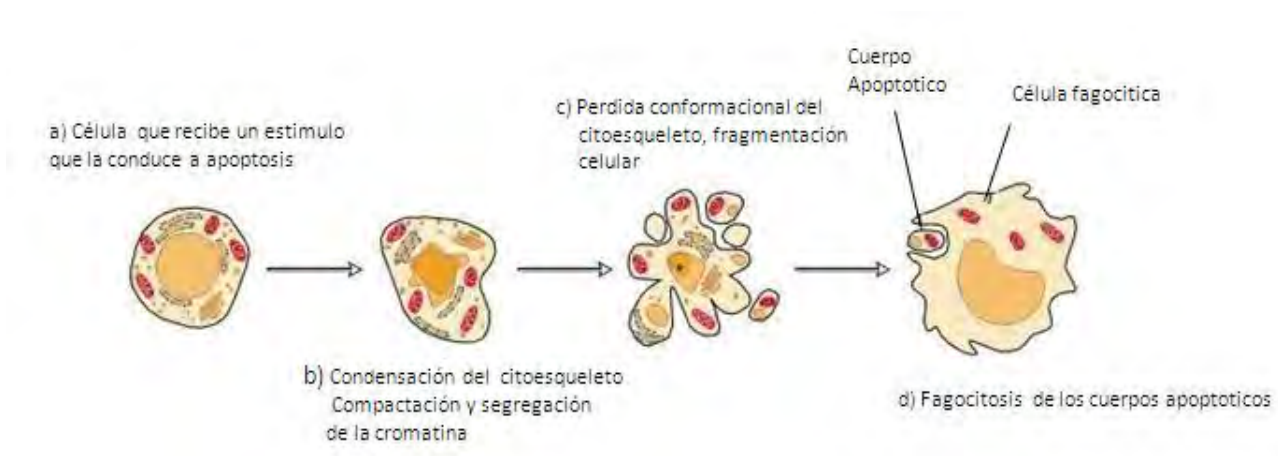


Figura 3. Principales características morfológicas durante el proceso de apoptosis. Modificado de (31)

### 2.3.2. Fases de la apoptosis

La apoptosis consta de tres fases:

- Fase de inicio
- Fase de ejecución
- Fase de eliminación

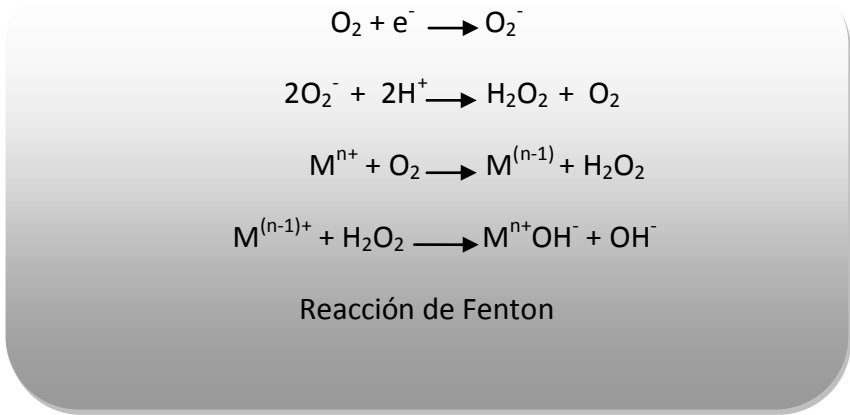
**Fase de Inicio** En esta fase la célula recibe el estímulo de muerte, que puede provenir de una vía intrínseca o extrínseca. Las primeras señales son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). <sup>(18, 23)</sup>

**Fase de ejecución:** En los últimos años la mitocondria ha recibido una atención especial por tener un papel importante en la fase efectora de la apoptosis. En la mayoría de los sistemas donde ocurre apoptosis, se observa la formación de un canal de gran conductancia en la membrana mitocondrial, conocido como poro PT. Su estructura y composición no se conocen por completo, pero entre sus constituyentes se encuentran proteínas de la membrana interna como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), y proteínas de la membrana externa como las porinas, que actúan en los sitios de contacto de la membrana interna y externa, creando un canal a través del cual pasan moléculas de aproximadamente 1.5 kDa. La apertura de este canal provoca la degradación de la mitocondria y la pérdida del potencial de membrana debido a un aumento de la osmolaridad de la matriz, haciendo que éste se expanda y eventualmente se rompa liberando proteínas activadoras de caspasas, localizadas en el espacio intermembranal hacia el citosol y el desacoplamiento de la cadena respiratoria, que se reconoce como una falla temprana de muerte. <sup>(41)</sup>

Informes recientes sugieren que los cambios mitocondriales están bajo control de los productos génicos de la familia Bcl-2. Los miembros de dicha familia promueven o inhiben la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos; así por ejemplo, en ausencia de factores de crecimiento, algunos miembros de esta familia promueven la apoptosis, ya que al unirse a la membrana externa mitocondrial la permeabilizan formando el poro PT lo cual da como resultado la liberación del citocromo c. Este efecto puede ser antagonizado por otras proteínas de esta misma familia que pueden obstruir físicamente el poro y así evitar la salida del citocromo c. <sup>(24)</sup>

**Fase de eliminación** En esta etapa participan enzimas catabólicas como las endonucleasas y las caspasas, cuya actividad hidrolítica inicia una serie de alteraciones estructurales en la célula, cuyo resultado final es la formación de cuerpos apoptóticos, que son degradados por macrófagos y células adyacentes. <sup>(22, 41)</sup>

La apoptosis se acompaña de cambios de gran importancia en el balance redox como el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la oxidación de algunos compuestos celulares. Por otro lado los metales de transición como  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , generan al radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), mediante la reacción de Fenton, el cual se ha comprobado que es un inductor de apoptosis. <sup>(16)</sup>



### 2.3.3. Caspasas

Las moléculas responsables de inducir y ejecutar el proceso apoptótico de la célula son un grupo de cisteín-proteasas citosólicas llamadas caspasas; aunque hay que mencionar que existe apoptosis independiente de caspasas.

Las caspasas (**cysteine-dependent aspartate-specific proteases**) son una familia evolutivamente conservada de proteasas con residuos de cisteína en su sitio catalítico. Los miembros de esta familia muestran similitud en sus secuencias de aminoácidos, en estructura tridimensional y en especificidad. Los sustratos de las caspasas deben contener un residuo de ácido aspártico y requieren el reconocimiento de al menos cuatro aminoácidos en el sitio de ruptura. En las células de mamíferos se encuentran presentes en el citoplasma.

La célula las sintetiza como procaspasas, las cuales constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10. A la fecha las caspasas más estudiadas son la 3, 6, 7, 8 y 9. Las caspasas pueden agruparse en dos grupos: al grupo I pertenecen las caspasas que tienen un prodominio N-terminal grande, como son las procaspasas 1, 2, 8, 9 y 10. En las procaspasas del grupo II el prodominio N-terminal es pequeño o carecen de él; pertenecen a este grupo las procaspasas 3, 6 y 7. En las procaspasas el dominio catalítico es inhibido por un prodominio adyacente, y se requiere de un procesamiento proteolítico para volverse activas. Las procaspasas del grupo I son capaces de autoproteolizarse, es decir, ellas mismas pueden liberar el prodominio inhibitorio. En cambio las procaspasas del grupo II requieren la activación de las caspasas del grupo I para que estas liberen el prodominio inhibitorio. (7, 17, 41, 48)

En el proceso de apoptosis se requieren de dos tipos de caspasas: las iniciadoras y las efectoras. En otros procesos intervienen las caspasas

proinflamatorias. Las caspasas iniciadoras son las caspasas apicales en la cascada de señalización, son activadas por la interacción de sus dominios DED (Dominio efector de muerte) o CARD (dominios de reclutamiento de caspasas) con plataformas moleculares especializadas (apoptosoma y DISC), lo cual permite su corte en al menos dos sitios, las subunidades p20 y p10 forman entonces un heterodímero; la asociación de dos heterodímeros forma un tetrámero con dos sitios activos, esta es la forma activa de la caspasa. Una vez activas las caspasas iniciadoras, pueden proteolizar a las procaspasas efectoras y activarlas. Las caspasas efectoras activas rompen una gran cantidad de polipéptidos intracelulares tanto del núcleo como del **citoplasma, que son fundamentales para mantener la estructura celular** ( $\beta$ -actina, gelsolina, laminina A y B, proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN e incluso algunas proteínas cinasas. <sup>(16)</sup>

Existen por lo menos tres vías de activación de las caspasas:

- a) A través de Apaf-1 que es el factor activador de proteasas apoptóticas. Apaf-1 puede interactuar con citocromo c e iniciar la cascada de activación de la caspasa 9.
- b) A través de receptores de muerte
- c) A través de la translocación del citocromo C de la mitocondria al citoplasma.

#### 2.3.4. Vías involucradas en la apoptosis

Existen por lo menos dos vías por las que puede iniciarse la señalización de la muerte celular. Una es la vía extrínseca, que es mediada por la activación de receptores de muerte que se encuentran en la membrana celular, y son activados cuando se une su ligando extracelular. La otra vía es conocida como vía intrínseca o vía mitocondrial de la apoptosis y está mediada por estímulos como la radiación UV, fármacos quimioterapéuticos,

inanición o falta de factores de crecimiento necesarios para la sobrevivencia.  
(1, 18) Ambas vías tienen en común la activación de las caspasas

### 2.3.5. Activación de la apoptosis por la vía extrínseca

Las moléculas encargadas de iniciar esta vía son los receptores de muerte, los cuales pertenecen a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor, TNF), caracterizada por una estructura que contiene de dos a cinco dominios extracelulares ricos en cisteína y un dominio intracelular denominado dominio de muerte (death domain, DD). Se han identificado 8 receptores de muerte Fas, TNF-R1, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6, EDAR y NTR (Figura 4).

Los receptores de muerte están presentes en la membrana celular como monómeros, la unión con su ligando induce su trimerización, seguida de un cambio conformacional que permite a sus DD la interacción y reclutamiento de moléculas adaptadoras para la formación del complejo de señalización inductor de muerte (Death-inducing signalling complex, DISC). El miembro de los receptores de muerte más estudiado y mejor caracterizado es Fas o CD95. La unión de FasL con el receptor Fas provoca la trimerización del receptor lo cual es requerido para la traducción de la señal apoptótica. El adaptador FADD se une a través de su dominio de muerte a CD95. Este complejo Fas/FADD atrae a este sitio una caspasa iniciadora inactiva llamada procaspasa 8 (se ha reportado que también procaspasa 10 puede ser reclutada) la cual es activada mediante un corte proteolítico. La caspasa 8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes.

El proceso de activación se amplifica por el gran número de moléculas de caspasa 8 que se activan. Estas moléculas procesan directamente a otras proteasas de la misma familia como caspasas 3, 6 y 7, llevando así a la muerte celular. (12, 20)

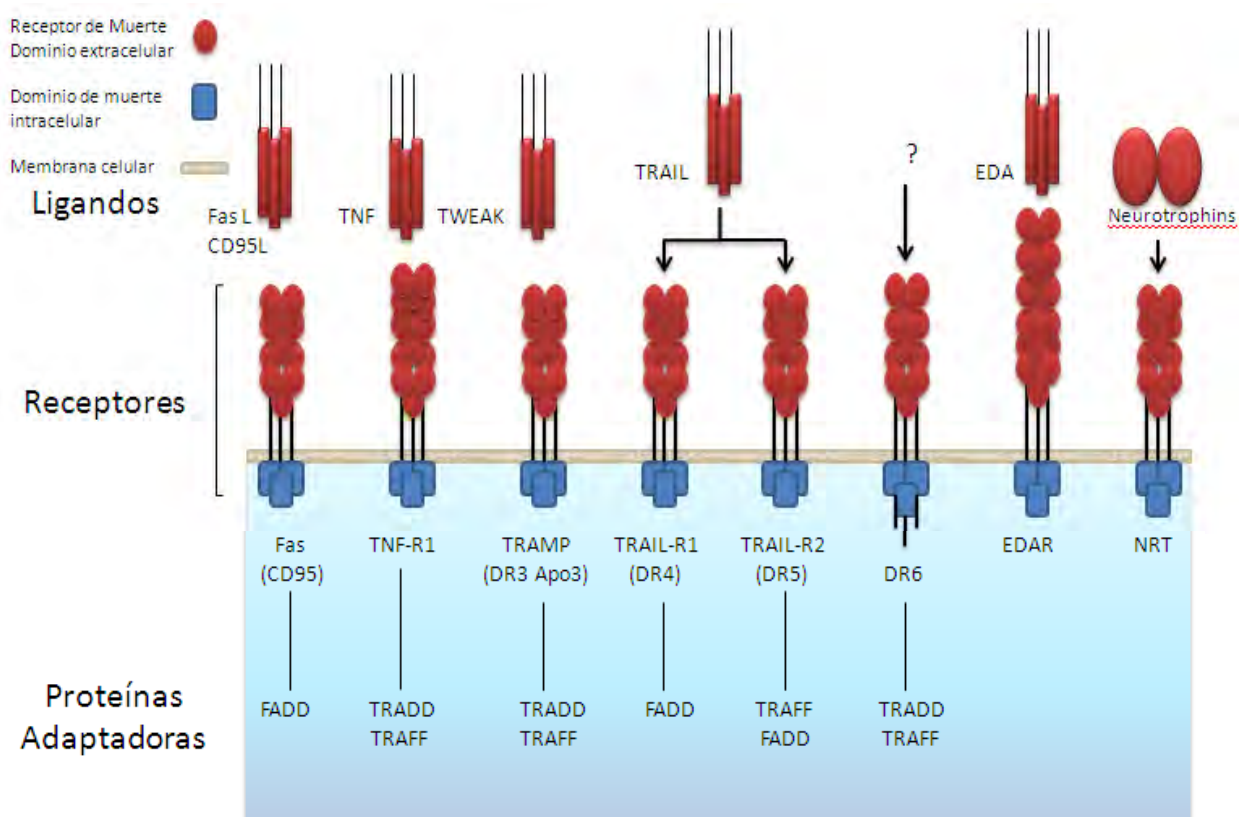


Figura 4 **Receptores de muerte, sus ligandos y proteínas adaptadoras** Los ligandos de muerte son en su mayoría proteínas que pertenecen a la familia del TNF- $\alpha$ . Son proteínas transmembranales, las cuales pueden sufrir proteólisis y dar origen a la forma soluble del ligando. Los receptores de muerte se caracterizan por tener tres regiones: 1) dominios extracelulares ricos en cisteína, que reconocen de manera selectiva a su ligando, 2) una región transmembranal, 3) región intracelular que contiene los dominios de muerte, a los cuales se asocian proteínas adaptadoras. Las proteínas adaptadoras, presentes en el citoplasma, se caracterizan por tener en su estructura primaria dominios de muerte (DD), dominios efectores de muerte (DED) y dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), estas proteínas sirven como conectores entre los receptores y las caspasas. Modificado de (57)

Esta ruta extrínseca es susceptible de ser inhibida por proteínas que contienen dos dominios efectores de muerte (death-effector domain, DED) que se unen al DISC, esto inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa 8. <sup>(30)</sup>

### 2.3.6. Activación de apoptosis por la vía intrínseca o de la mitocondria

En la vía intrínseca o mitocondrial, la cascada bioquímica de activación de caspasas puede ser disparada por diversos estímulos nocivos o bien, por la ausencia de señales extracelulares que son necesarias para la sobrevivencia de la célula. En el caso de estímulos nocivos, la célula responde a través de la activación de p53, regulador que induce la activación de genes proapoptóticos.

La mitocondria provee la energía que la célula necesita, pero puede ser catastrófico para la célula si ocurre una pérdida en la integridad de la mitocondria. Esta pérdida involucra cambios en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, proceso que puede liberar una variedad de moléculas proapoptóticas. La liberación de estos factores se encuentra regulada por la familia de proteínas Bcl-2 y estos a su vez se encuentran regulados por la proteína p53. El nombre de la familia de proteínas Bcl se debe al primer miembro, que fue aislado como un gen implicado en el linfoma de linfocitos B (B-cell lymphoma). Esta familia consta de 19 miembros que se han clasificado en tres grupos basándose en similitudes estructurales y funcionales. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados dominios de homología con Bcl-2 (Bcl-2 homology domains, **BH**): BH1, BH2, BH3, BH4. <sup>(18,62)</sup>

El primero de estos grupos muestra actividad antiapoptótica y sus miembros se caracterizan por tener los cuatro dominios de homología BH (BH1-BH4); ciertos miembros como Bcl-2 y Bcl-XL se encuentran en la membrana externa de la mitocondria y al parecer ayudan a mantener la integridad en la membrana permitiendo la exportación de iones H<sup>+</sup> desde el espacio intramitocondrial. <sup>(34)</sup> El segundo grupo, con ejemplos como Bax y Bak, proteínas proapoptóticas, está caracterizado por contener los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no el dominio BH4. El tercer grupo, también con

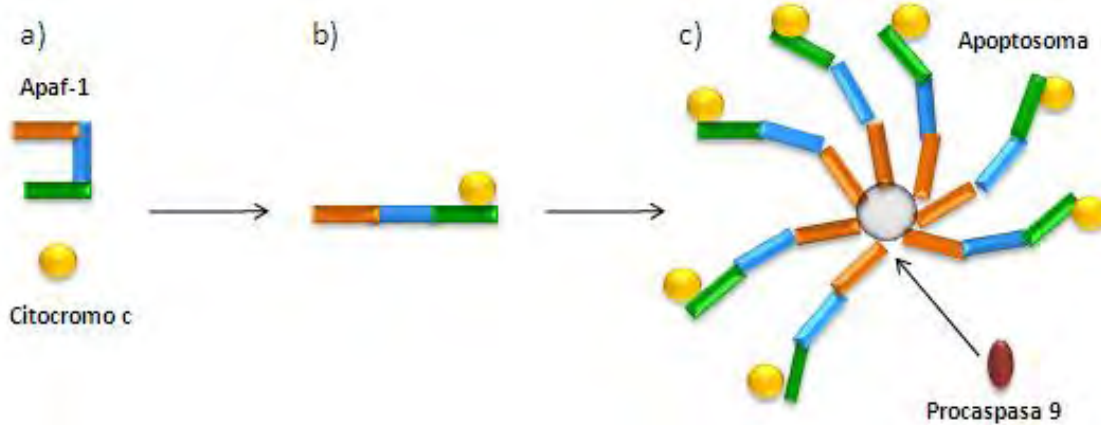


actividad proapoptótica se caracteriza por tener un único dominio BH3, además de que pueden o no tener región transmembranal.

Una alteración en la membrana externa de la mitocondria tiene como resultado la salida de proteínas proapoptóticas como el citocromo c, que se une a Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1). Apaf-1 es una proteína que inicia apoptosis. Está compuesta de: a) un dominio CARD, responsable de reclutar la procaspasa 9, b) un dominio de ATPasa, y c) 13 repeticiones WD40, responsables de la interacción con el citocromo c. <sup>(50)</sup>

Para que se lleve a cabo la unión entre Apaf-1 y citocromo c se requiere de dATP o ATP y que se forme el apoptosoma, complejo heptamérico (Figura 5). El apoptosoma recluta y corta a la procaspasa 9, liberando la forma activa, es decir, caspasa 9. <sup>(4)</sup>

Otra proteína que es liberada de la mitocondria es Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) o Diablo (direct IAP-binding protein with low pI), la cual se une a los miembros de la familia de proteínas IAPs (proteínas inhibidores de la apoptosis) y neutraliza su actividad antiapoptótica, y también se puede unir a proteínas de la familia de Bcl-2, lo que al final provoca la activación de caspasas efectoras. <sup>(55, 59)</sup> La forma inactiva de Smac/Diablo se encuentra restringida al espacio intramitocondrial como monómero, un vez que se inicia la apoptosis se forman dímeros, la forma madura de Smac, que son liberados hacia el citosol donde contribuye en la apoptosis. <sup>(46)</sup>



**Figura 5. Formación del apoptosoma.** En condiciones normales Apaf-1 se encuentra como monómero plegado autoinhibido (a), su unión al citocromo c promueve un cambio conformacional a su forma parcialmente abierta (b), lo cual permite su oligomerización con la consecuente formación del apoptosoma (c), capaz de reclutar y activar a la procaspasa 9. Modificado de (4) (56)

### 2.3.7. Regulación de la apoptosis

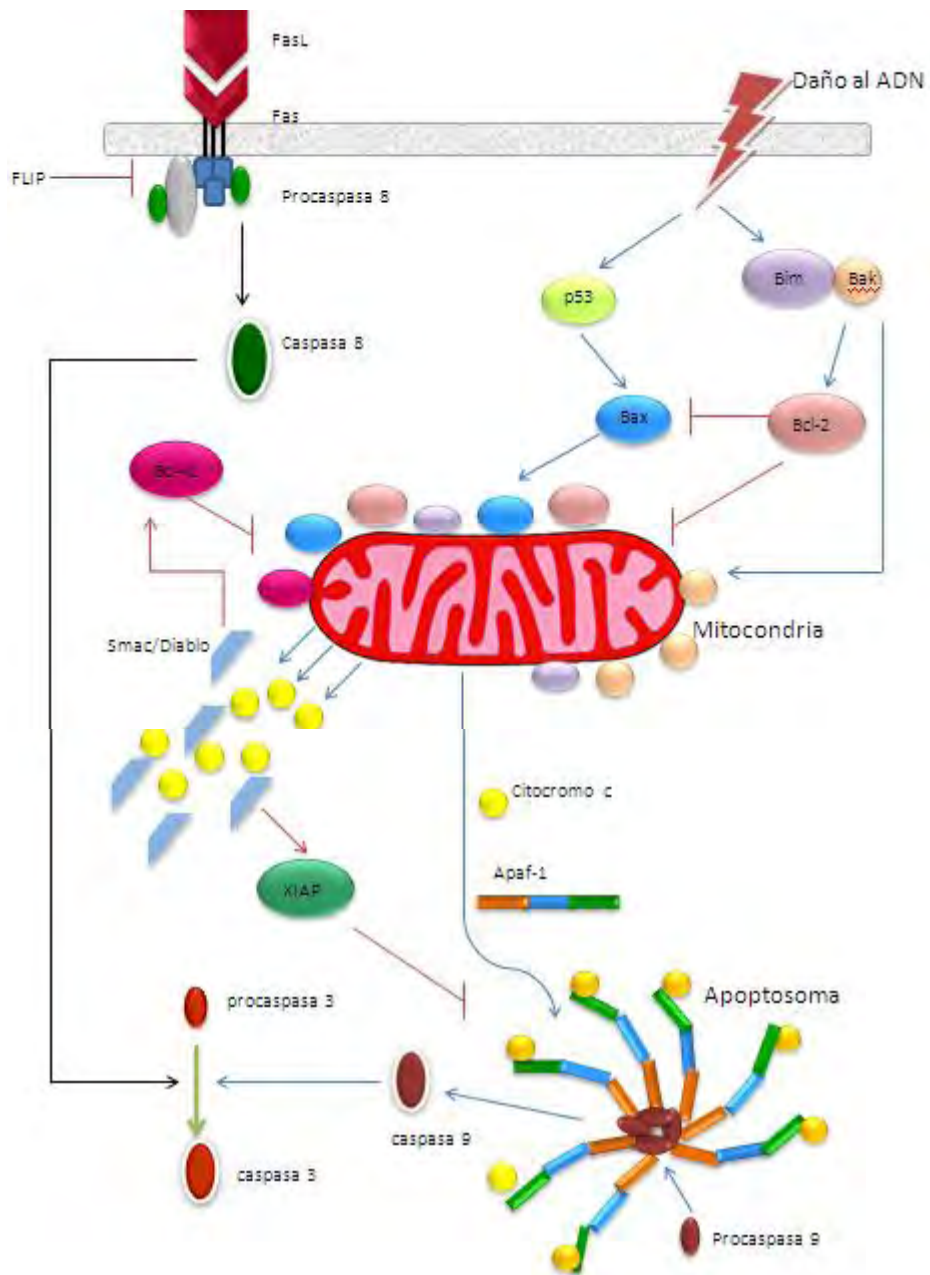
En condiciones de homeostasis, la expresión, procesamiento, activación e inactivación de las caspasas es un proceso estrictamente regulado por diversos mecanismos a nivel transcripcional y postraduccional. En la regulación postraduccional de la actividad de las caspasas están involucradas las familias de proteínas Bcl-2, IAP y FLIP. <sup>(6)</sup>

Los miembros de la familia IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) se caracterizan por poseer de uno a tres dominios BIT (Baculoviral IAP Repeat) por medio de los cuales se unen a las caspasas. Dicha interacción bloquea la entrada del sustrato a los sitios activos de las caspasas, inhibiendo así su actividad enzimática. Estos inhibidores pueden actuar tanto sobre las caspasas iniciadoras como sobre las efectoras, pero dicha inhibición es altamente específica y selectiva. Hasta la fecha se han descrito ocho

miembros de esta familia: Bruce/Apollon, ILP2, ML-IAP/Livin, Survivina, NAIP, cAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP. <sup>(9)</sup>

FLIP: Los miembros de esta familia participan en la regulación de la vía extrínseca. Se han reportado 2 grupos de FLIPs, el de origen viral (v-FLIP) y el grupo de sus homólogos en mamíferos, llamado FLIP celular (c-FLIP). Ambos grupos tienen dominios de muerte, con los cuales pueden competir con la procaspasa 8 por su unión al DISC, inhibiendo de esta manera su activación. Se conocen tres isoformas: c-FLIPL, c-FLIPS, c-FLIPR; las 3 isoformas son capaces de inhibir la activación de la procaspasa 8. <sup>(21)</sup>

Se ha descrito que los miembros de las familias c-FLIP, IAP y de la subfamilia antiapoptótica de Bcl-2 están sobreexpresados en varios tipos de cáncer, lo que confiere a las células neoplásicas resistencia a la muerte por apoptosis. Dicho fenómeno está directamente relacionado con la resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que aquellos fármacos que tengan como blanco estos inhibidores endógenos, podrían incrementar la muerte de las células malignas y aumentar la supervivencia así como la calidad de vida en los pacientes con cáncer. <sup>(11)</sup>



Vía extrínseca —→ Vía intrínseca —→ Convergencia de ambas vías —→  
 Mecanismos antiapoptóticos involucrados en la activación de caspasas —|  
 Mecanismos proapoptóticos involucrados en la inhibición de las moléculas antiapoptóticas —→

**Figura 7. Vías de inducción y regulación de la apoptosis.** Modificado de (4) (11) (18) (46)

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública el cual a nivel mundial ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, siendo la segunda causa de mortalidad a nivel mundial. Las enfermedades malignas de diversos tipos no solo han aumentado, también representan una de las principales causas de muerte en países como el nuestro.

En la actualidad los avances terapéuticos permiten el control y desaparición de varios tipos de cáncer que anteriormente no respondían a los tratamientos convencionales. Esto se debe, en parte, a la identificación de moléculas expresadas de forma exclusiva, o con un alto nivel de expresión, en células tumorales. Estas moléculas pueden ser utilizadas como blancos terapéuticos ya sea porque anticuerpos específicos puedan promover la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, o porque anticuerpos específicos para estas moléculas pueden detener el ciclo celular y/o inducir la muerte de estas células. Se ha propuesto que CD13 puede ser una de estas moléculas.

Durante los últimos años CD13 ha sido una aminopeptidasa muy estudiada debido a las múltiples funciones que desempeña en células cancerosas y en procesos esenciales para la formación del tumor. Se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD13 inducido por anticuerpos, puede inducir la apoptosis de células de leucemia mielocítica aguda (U-937). El mecanismo por el cual se induce la apoptosis aún no se conoce totalmente. En este trabajo, usaremos tres diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen a la molécula CD13, **(mAbs C, E y 452)** para determinar si el entrecruzamiento de CD13 inducido por estos mAbs induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer diferentes a leucemia, y poder ser propuesto como un posible blanco en terapia adyuvante en contra del cáncer.

## 4. HIPÓTESIS

Los mAbs anti-CD13 inducirán en líneas celulares de cáncer humano una disminución en la proliferación celular, se verá comprometida la viabilidad de éstas, y existirá un aumento en el porcentaje de células en apoptosis.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

- Determinar y cuantificar el efecto inducido por cada uno de los diferentes mAbs anti-CD13 (**C**, **E** y **452**) sobre la proliferación, la viabilidad e inducción de la apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

### 5.2. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de distintas concentraciones de cada uno de los anticuerpos C, E y 452 sobre la proliferación, la viabilidad e inducción de la apoptosis en líneas celulares de cáncer humano, a distintos tiempos (24, 48, 72 y 96 horas) de tratamiento.
- Establecer si el nivel de expresión de CD13 se encuentra directamente relacionado con el porcentaje de inducción de apoptosis.
- Comparar el efecto inducido por cada uno de los 3 anticuerpos para determinar si alguno de ellos tiene mayor efecto en comparación con los otros 2 mAbs sobre alguna de las líneas de cáncer.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1. Células

Hibridomas: Los hibridomas C y E fueron obtenidos por la M. en I.B.B. Claudia Garay en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega. El hibridoma de la clona 452 fue donado por el Dr. Meenhard Henlyn, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia EU. Los hibridomas secretan anticuerpos monoclonales específicos para la molécula CD13 humana. El mAb C pertenece a la subclase IgG1, y el mAb E a la subclase IgG2a. Los hibridomas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) complementado con 5% de suero fetal bovino, a temperatura de 37°C con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron a una densidad de entre 5x10<sup>5</sup> a 4x10<sup>6</sup> células/mL.

Línea celular U-937 (derivadas de leucemia mieloide aguda): Fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) Cat. No. CLR-1593.2. Se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) complementado con 3% de suero fetal bovino a temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron a una densidad de entre 2x10<sup>5</sup> a 10x10<sup>6</sup> células/mL.

La línea celular PC-3, derivada de adenocarcinoma de próstata, se obtuvo gracias a una donación de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Facultad de Química. Se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bovino a temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron a una densidad de entre 2x10<sup>5</sup> a 4x10<sup>6</sup> células/mL.

La línea celular A-375 se obtuvo de una donación por parte del laboratorio del Dr. Alfonso Dueñas del Instituto Nacional de Cancerología. Son células derivadas de un melanoma maligno. Se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal

bovino a temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se mantuvieron a una densidad entre 2x10<sup>5</sup> a 4x10<sup>6</sup> células/mL.

## 6.2. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD13 (clonas **C**, **E** y **452**) fueron purificados a partir del sobrenadante de los cultivos celulares de los respectivos hibridomas. El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a FITC (GAM-FITC) fue adquirido de Zymed, San Francisco.

## 6.3. Purificación de anticuerpos en columnas de Proteína A-agarosa

En cajas de Petri se cultivaron 4x10<sup>5</sup> células de cada hibridoma en 30 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 3% de SFB, se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Al cabo de este tiempo se recolectó el cultivo en tubos para centrifuga de 50 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 4500 rpm. Después de centrifugar se recolectó el sobrenadante libre de material insoluble en contenedores estériles y se almacenó a 4°C, para posteriormente realizar la purificación de la inmunoglobulina lo más pronto posible para evitar que ésta pierda su actividad.

Posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de diámetro de poro, se ajustó el pH a 8 con buffer de TRIS 2M pH=8. Se depositaron 20 ml de sobrenadante sobre la columna con las perlas de Agarosa Proteína A (GIBCO). Se repitió este proceso hasta que pasaron 250 ml en total. El sobrenadante que sale de la columna se conservó a 4 °C; si al final se obtiene una buena cantidad de anticuerpo se puede realizar otra purificación con la misma muestra de sobrenadante para obtener más anticuerpo.

Se lavó la columna 4 veces con 1 ml de TRIS 0.01 M, NaCl 0.2 M pH=8.2, desechar los 3 primeros lavados y leer la absorbancia a 280 nm en



el 4º lavado, ajustar el blanco con TRIS 0.01 M, NaCl 0.2 M, pH=8.2. Si la absorbancia es menor a 0.1, se comienza a eluir la columna, si la absorbancia es más alta seguir con los lavados, procurando no realizar más de 6 lavados. Para eluir los anticuerpos se añadieron a la columna alícuotas de 1.5 mL/fracción de glicina 0.2 M pH=2.8, agregando la solución de glicina gota a gota para obtener el anticuerpo más concentrado en menos fracciones. El anticuerpo eluido se colectó en tubos Eppendorf de 2mL que contenían 150µL de TRIS 2M pH=8.0 para neutralizar el pH. Se colectaron entre 4 a 6 fracciones, y se determinó la absorbancia a 280 nm de cada fracción. La concentración de anticuerpo en cada fracción se determinó empleando la relación de 1.4 D.O. =1.0 mg/ml. Cuando las absorbancias nuevamente bajaron a 0.1 D.O., se lavó la columna 2 veces con TRIS 2M para restablecer el pH de la columna, y posteriormente se lavó al menos 4 veces con 1mL de TRIS 0.01 M NaCl 0.2 M, desechando los lavados.

Es recomendable tener una columna para cada anticuerpo, y para conservar la columna se deben dejar las perlas de proteína A suspendidas en solución de TRIS 0.01M NaCl 0.2 M pH=8.2.

Una vez que fue purificado todo el anticuerpo posible del sobrenadante, se concentran todas las fracciones del mismo anticuerpo en una sola fracción, y se filtraron en un filtro de pirinola de 0.22 µm tamaño de poro. Se dividió en alícuotas de 1.5 mL y se conservaron a -20°C hasta su uso.

#### 6.4. Inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo

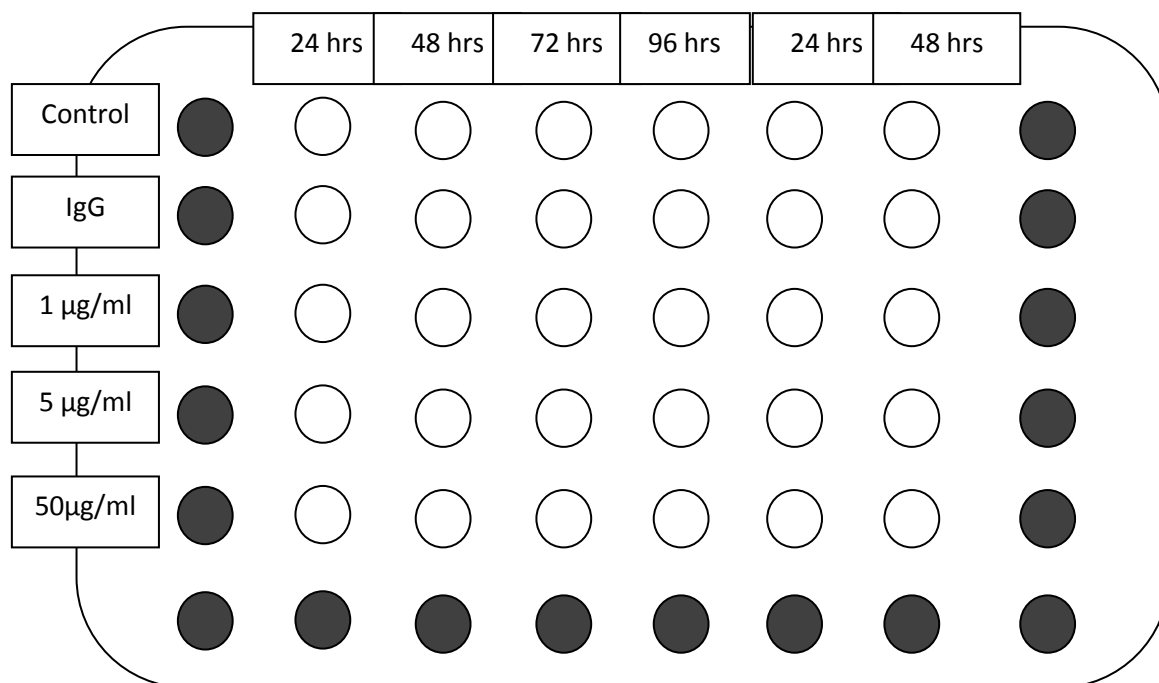
Se resuspendieron  $4 \times 10^5$  células en 300 µl de amortiguador de lavados y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Posteriormente se agregaron 10 µg del anticuerpo primario anti-CD13, y se incubó en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional. Se realizaron 3 lavados con amortiguador de lavados, centrifugando a 1000 rpm por 3 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 300 µl del

anticuerpo secundario (GAM-FITC) a una dilución 1:400 en amortiguador de lavados. Las células con el anticuerpo secundario se incubaron 30 minutos en hielo, protegidas de la luz con agitación ocasional. Se lavó una vez más con 300  $\mu$ l de amortiguador de lavados y una vez con PBS 1X frío, se resuspendió en 400 $\mu$ L de PFA al 1% en PBS y se incubaron por 20 minutos en hielo, cubiertas de la luz. Al terminar la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 300 $\mu$ L de PBS. Se leyó en el citómetro de flujo (Attune) evaluando la media geométrica de fluorescencia como indicador de niveles de expresión de los receptores.

Esta técnica se empleó para detectar la expresión de CD13 en las diferentes líneas celulares de cáncer y verificar la actividad de los mAbs purificados.

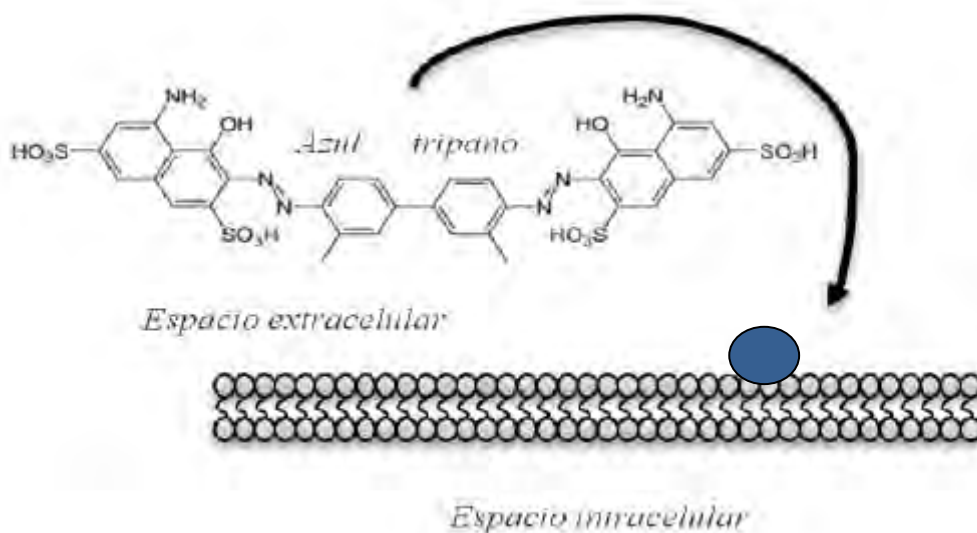
#### 6.5. Ensayo para cuantificar la proliferación y la viabilidad

En placas de 48 pozos (costar 3548, Corning, NY), se sembraron  $1 \times 10^4$  células/pozo en 400 $\mu$ L del medio de cultivo apropiado para cada línea celular. Se realizaron curvas dosis-respuesta determinando el efecto sobre la proliferación y la viabilidad de 3 diferentes concentraciones de cada anticuerpo (1, 5 y 50  $\mu$ g/ml), contando las células a distintos tiempos de incubación: 24, 48, 72 y 96 horas. En cada placa se colocó una serie completa de anticuerpo y media serie del siguiente anticuerpo (fig. 8).



**Figura 8.** Distribución de las diferentes condiciones a las cuales fueron sometidas las células en placa de 48 pozos para cuantificar la proliferación y la viabilidad. Pozo Vacío ●

Una vez cumplido el periodo de incubación establecido se recolectaron las células de cada pozo en un tubo Eppendorf de 2 mL. Para las células adherentes a la placa se empleó Tripsina-EDTA 0.05% para favorecer su desprendimiento. La placa se volvió a incubar hasta el siguiente periodo de muestreo. Los tubos con las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en un volumen conocido de medio de cultivo y se tiñeron con azul tripano. Posteriormente las células se contaron en cámara de Neubauer, y se cuantificó el número de células viables y no viables. Se realizaron 3 experimentos independientes con 4 repeticiones del conteo de células en cada pozo para cada línea celular.



**Figura 9.** Fundamento de la tinción con azul tripano para distinguir células viables y no viables. Una célula viable (membrana intacta) no permite la entrada del colorante y por lo tanto no es teñida.

#### 6.6. Cuantificación de la apoptosis

Para cuantificar la apoptosis se utilizó un kit de Annexina V-FITC/Ioduro de propidio (PI) (Beckman-Coulter). Las tinciones se analizaron mediante citometría de flujo (Citómetro Attune) y los datos se analizaron con Attune Cytometric Software V1.25.

En placas de 24 pozos (Nunc Surface, Nunc Brand Products) se colocaron  $2.5 \times 10^4$  células/mL en cada pozo y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 30'. Después de este lapso, se retiró la placa de la incubadora y se agregaron  $50 \mu\text{g/ml}$  de anticuerpo anti-CD13 en los pozos de 96 hrs y se continuó la incubación. Durante las siguientes 72 hrs, se agregó la misma cantidad de anticuerpo cada 24 hrs en cada serie de pozos hasta completar la placa entera (Figura 10).

Veinticuatro horas después de la última dosis de anticuerpo, la placa se retiró de la incubadora, se colectaron las células de cada uno de los pozos en tubos Eppendorf de 2mL, y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Para facilitar la recolección de las células adherentes se utilizó una solución de Tripsina al 0.05% en PBS. Se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío, posteriormente se resuspendió el pellet en 50µL de ApoScreen Annexina V Binding Buffer 1X (Beckman-Coulter) y se adicionó a cada tubo 2µl de IP y 2µL de Annexina V-FITC. Se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente protegidos de la luz con agitación ocasional. Trascurrido el tiempo de incubación se adicionaron 200µL de ApoScreen Annexina V Binding Buffer 1X y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min, se desechó el sobrenadante, se adicionaron 300µL de PBS 1x frío e inmediatamente se leyeron las muestras en el citómetro. Se realizaron 3 experimentos independientes para cada línea celular.

Como control positivo de apoptosis se irradiaron  $1 \times 10^6$  células en una caja petri con luz UV a  $10000 \text{ J/cm}^2$  durante 15 min (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker), después se incubaron a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$ . Dicho procedimiento se realizó 24 horas previas a la tinción.

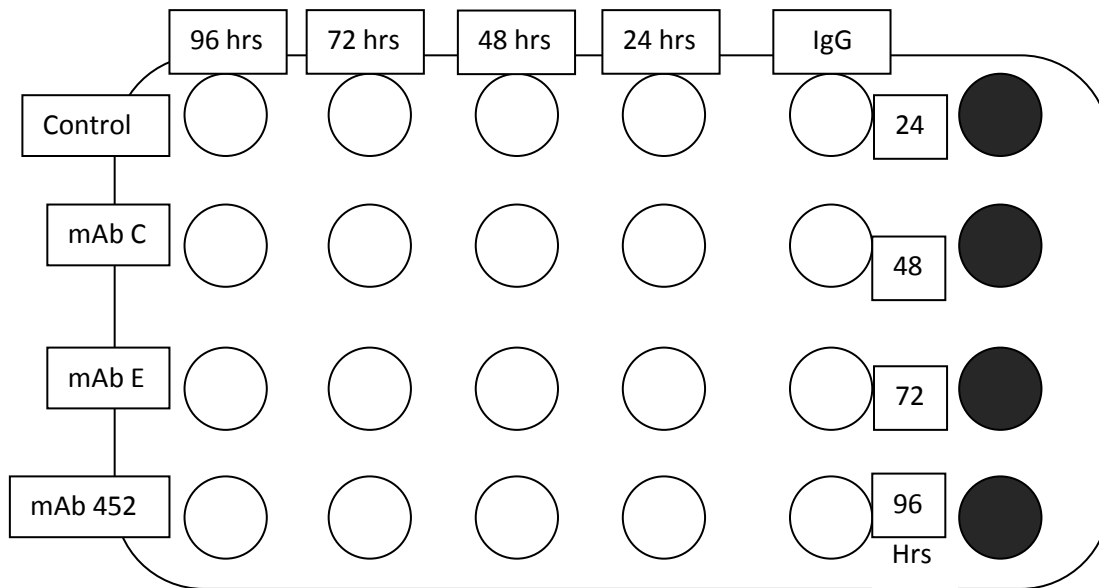


Figura 10. Distribución de las diferentes condiciones a las cuales fueron sometidas las células en placa de 24 pozos para cuantificar la apoptosis. Pozo Vacio ●

La Annexina V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. Durante la apoptosis la integridad de la membrana se ve alterada y hay una traslocación de algunas proteínas entre la cara interna y de la cara externa de la membrana, lo cual provoca que la fosfatidilserina pueda localizarse en la cara externa de la membrana durante la apoptosis. Cuando la fosfatidil serina se localiza en la cara externa, puede unir a la annexina V-FITC, que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina.

El yoduro de propidio (PI) es un fluorocromo que se intercala en el ácido nucleico. El marcaje con PI permite diferenciar a las células apoptóticas en apoptosis temprana y apoptosis tardía.

## 6.7. Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de Kolmorov-Smirgov (Prueba K-S) para determinar si los datos de cada grupo cumplían con una linealidad para posteriormente obtener su promedio y compararlo con el del grupo control.

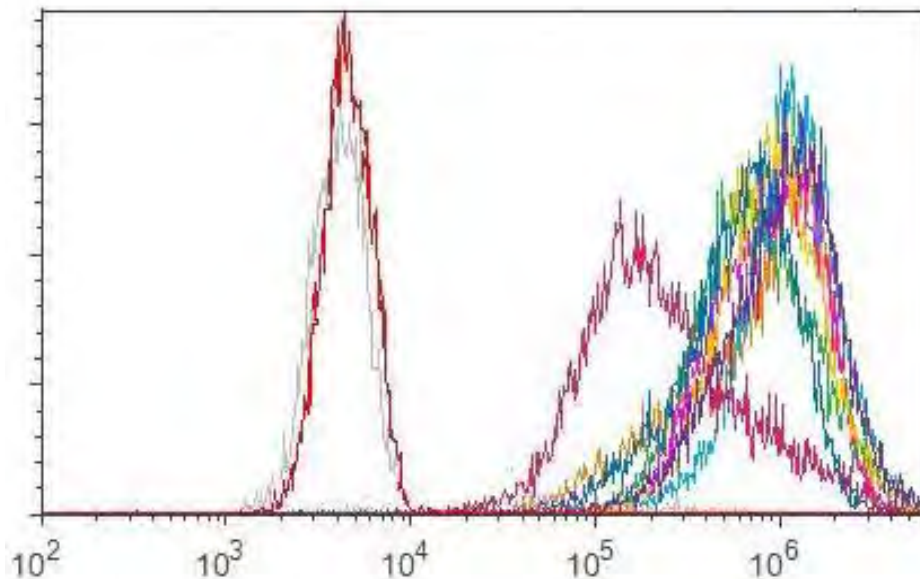
Se utilizó la prueba t de Student para comparar la media del grupo control con respecto a las diferentes condiciones propuestas para cada **experimento, con un nivel de significancia  $p \leq 0.05$ . Ambas pruebas se realizaron con el software SPSS 16.0.**

## 7. Resultados y Análisis

### 7.1. Unión específica de los mAbs purificados a CD13

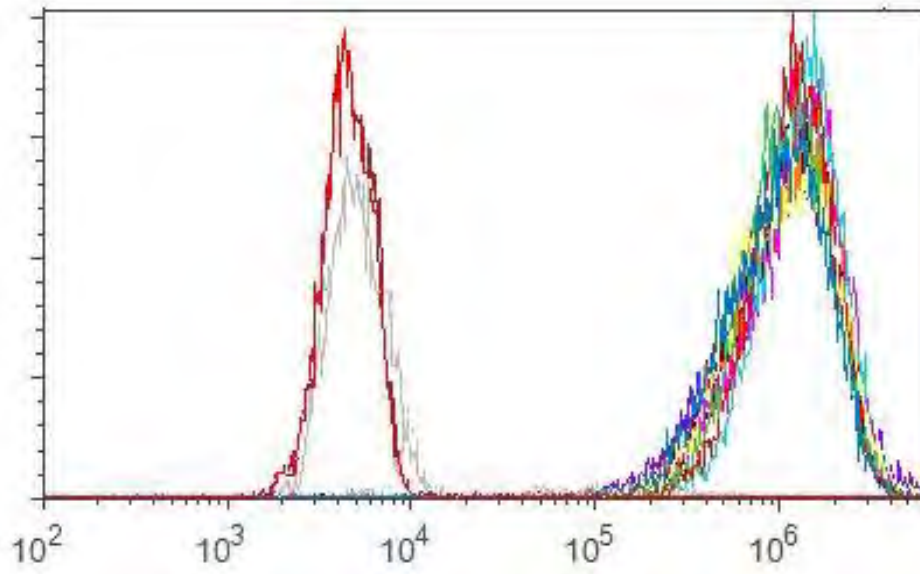
Para asegurar el contar con cantidades suficientes de anticuerpos anti-CD13 para los experimentos de esta tesis, fue necesario producir y purificar una cantidad considerable de mAbs C, E y 452. Una vez terminado el proceso fue necesario comprobar la unión específica a su molécula blanco para lo cual se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando células U-937 ya que se sabe por trabajos anteriores en el laboratorio que estas células expresan CD13.

Como control positivo se emplearon muestras de cada anticuerpo previamente purificadas y de las cuales se sabe que tienen esta unión con CD13.

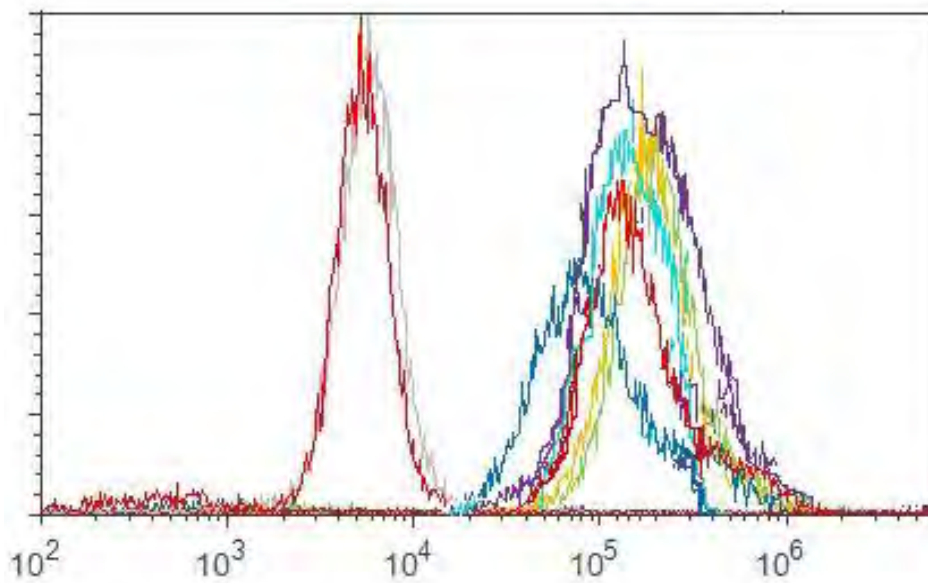


a) mAb C





b) mAb E



c) mAb 452

**Figura 11.** Histogramas de la unión específica de cada alícuota de los distintos anticuerpos anti-CD13 purificados. Las células fueron incubadas con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo de la alícuota respectiva. Se realizó la tinción de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Células — IgG — Control Positivo — Alícuota 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 —

Se observa en la figura 11A que todas las alícuotas del anticuerpo **C** tienen una unión similar con la molécula blanco (CD13) comparada con el anticuerpo de unión positiva, excepto la alícuota 5, de la cual el histograma muestra un desplazamiento hacia la izquierda lo que indica que no se une de la misma manera que las demás, o que a la concentración empleada dicha alícuota no muestra un nivel de unión a CD13 similar a las otras alícuotas, por lo cual se descartó para los siguientes experimentos.

En las figuras 11B, 11C se observa que las alícuotas de los anticuerpos **E** (8 Alícuotas) y **452** (5 Alícuotas) tienen la misma media geométrica de fluorescencia comparada con su respectivo control positivo lo cual demuestra nuevamente que los anticuerpos reconocen a CD13 y se unen de manera específica, ninguna alícuota fue descartada.

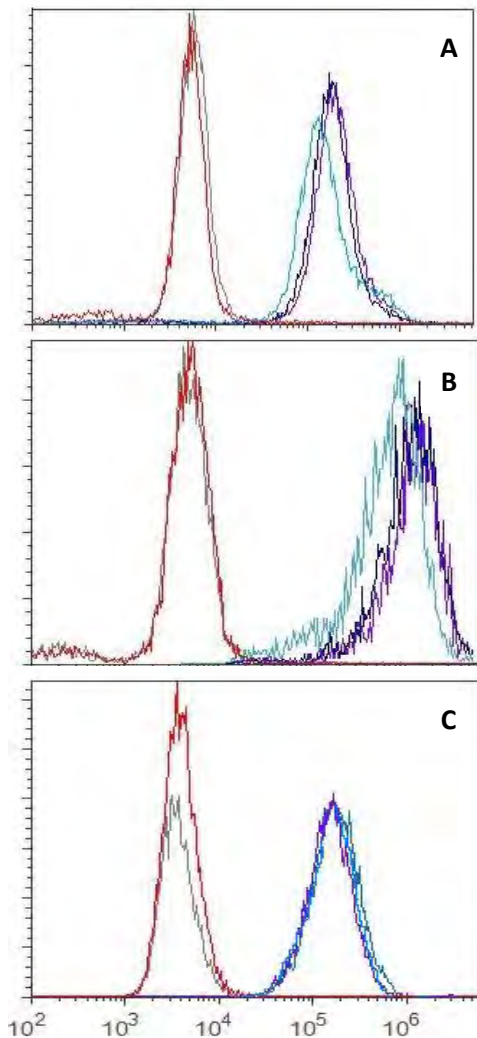
Para descartar que la unión sea inespecífica se utilizó en estos experimentos un control con un anticuerpo del mismo isotipo (IgG), y se observa que en ninguno de los 3 histogramas la media geométrica de fluorescencia de la IgG sea mayor que la media geométrica basal de las células, lo cual indica que no existe unión de los anticuerpos a las células a través de la porción Fc.

Con estos resultados podemos concluir que el método de purificación de anticuerpos con columnas de Agarosa Proteína A es útil, sencillo y eficaz para obtener anticuerpos puros con especificidad hacia su molécula blanco. Este método no es laborioso, pero si se debe de tener cierta práctica para poder purificar de manera correcta, la única desventaja de este método es que es necesario contar con el sobrenadante donde se encuentren los anticuerpos y para esto es necesario contar con el hibridoma productor de dichos anticuerpos. Con los anticuerpos purificados se prosigue a la siguiente serie de experimentos, donde fue fundamental contar con los anticuerpos purificados para poder identificar las líneas celulares de cáncer que expresan

CD13, y con las líneas positivas para la expresión de CD13 se prosiguió a evaluar los efectos de los anticuerpos sobre la proliferación, viabilidad e inducción de la apoptosis de estas líneas.

## 7.2. Expresión de CD13 en diferentes líneas celulares de cáncer

Se determinó la expresión de CD13 en 7 diferentes líneas celulares de cáncer humano, de diferente origen tisular: U-937, SK-LU-1, PC-3, A-375, CaLu, A-549, y MCF-7. Se buscó la expresión de CD13 mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo. Solamente tres de ellas mostraron expresión de CD13: U-937, PC-3 y A-375 (Figura 12).



**Figura 12.** Expresión de CD13 en diferentes líneas celulares. Se probaron tres diferentes cantidades del mAb C (1, 10 y 20  $\mu$ g) para determinar el nivel de expresión de CD13. A) U-937 B) PC-3 C) A-375. Se incluye un control de isotipo (IgG) en todas las muestras. Se presenta un experimento representativo. N=5

Células — IgG — 1  $\mu$ g — 10  $\mu$ g — 20  $\mu$ g —

### 7.3. Efecto de los distintos anticuerpos anti-CD13 sobre la proliferación y viabilidad de líneas celulares de cáncer humano.

Se evaluó el efecto de los 3 diferentes mAbs anti-CD13 (**C**, **E** y **452**) sobre la proliferación y la viabilidad de las 3 diferentes líneas celulares de cáncer positivas para la expresión de CD13, previamente corroborada. Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (1, 5 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) del anticuerpo durante 96 horas, determinando el número total de células y la viabilidad de éstas cada 24 horas; el efecto de cada anticuerpo fue evaluado individualmente.

#### **Células U-937**

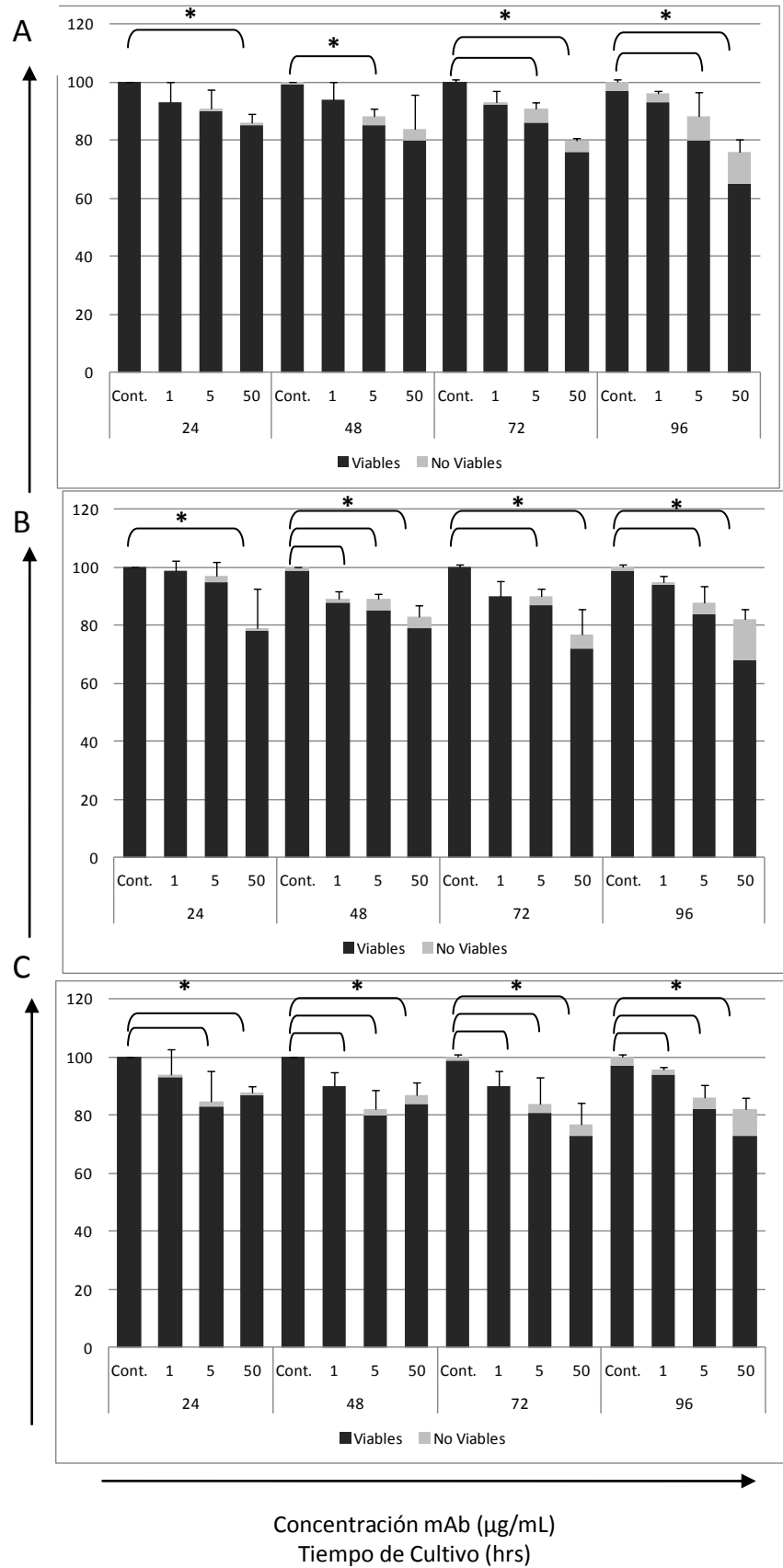
Para la línea celular **U-937** el número de células totales se ve disminuido en las células tratadas con anticuerpo en comparación con las células sin tratamiento (control), y el porcentaje de las células no viables aumenta conforme aumenta la concentración del anticuerpo (Figura 13A, 13B, 13C). Con la mayor concentración del anticuerpo (50 $\mu\text{g/mL}$ ), el porcentaje en que disminuye el número total de células llega a un 20%, en cambio con las demás concentraciones no se observa el mismo efecto indicando que el efecto en la disminución de la proliferación es dependiente de la dosis de anticuerpo. La viabilidad de las células también se ve afectada con la mayor concentración de anticuerpo. El porcentaje de células no viables es considerablemente mayor con respecto a las células no viables del control a partir de las 48 horas y hasta las 96 horas, con cualquiera de los 3 mAbs, lo cual indica que los efectos en ambos criterios son dependientes del tiempo de tratamiento.

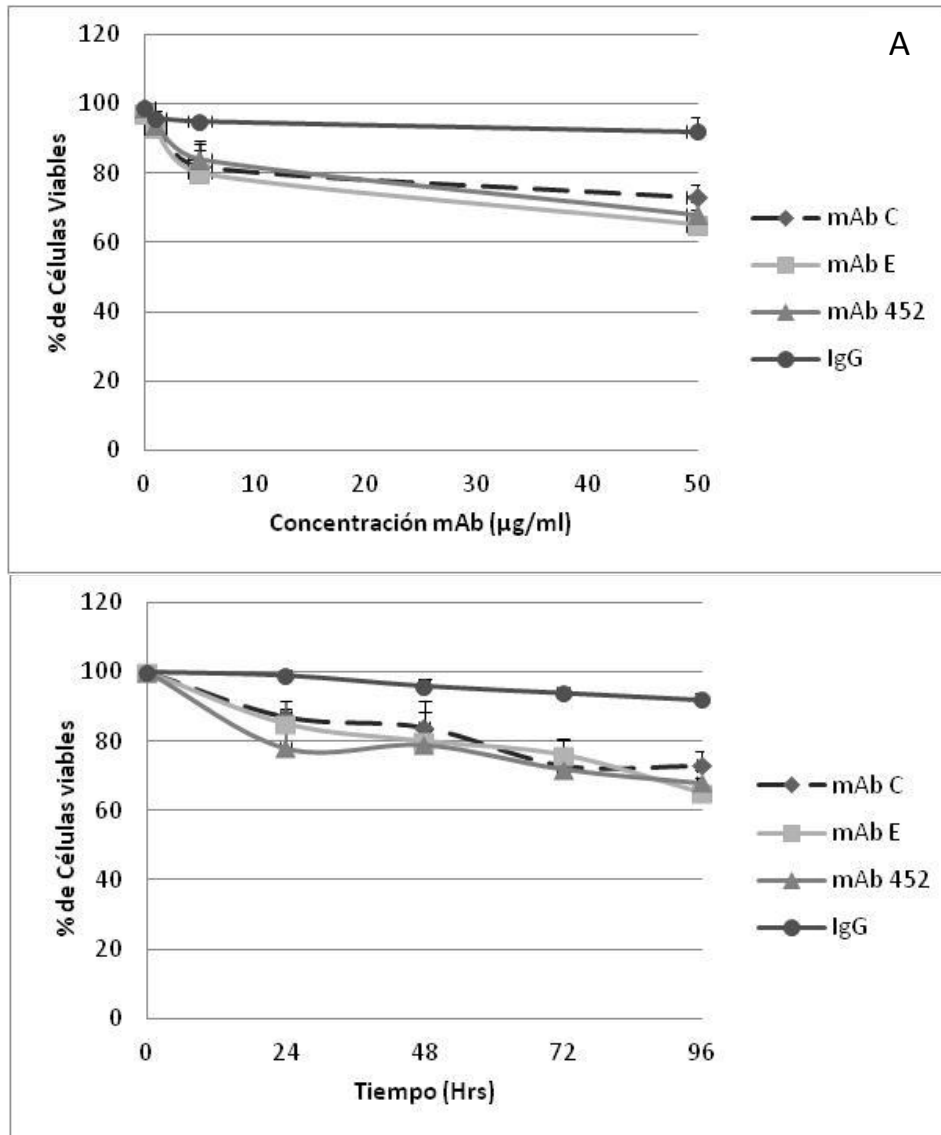
Se realizó un análisis estadístico con la prueba de t de Student para muestras independientes comparando el número total de células de cada una de las concentraciones de anticuerpo contra el número de células del control de su respectivo tiempo, encontrándose que en algunas condiciones existe una diferencia significativa entre el tratamiento y las células control (Fig 13).

**Figura 13.** Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular U-937. A) células incubadas con mAb C. B) células incubadas con el mAb E. C) células incubadas con el mAb 452. N=3

\*P<0.05

No. Total de células en porcentaje con respecto al control





**Figura 14.** Efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre el porcentaje de células viables U-937. A) Efecto de distintas concentraciones de mAb sobre la viabilidad de las células a las 96 horas de incubación. B) Viabilidad de las células en función del tiempo de incubación en presencia de anticuerpos (50µg/mL). Para ambas graficas se incluye un control de IgG Los valores incluyen la desviación estándar  $\pm$ . n=3

De acuerdo a los resultados obtenidos respecto al número total de células (Figura 13), en la Figura 14 A se graficó el porcentaje de células viables a las 96 horas de incubación, en función de la concentración de cada anticuerpo. En la Figura 14 B se graficó el porcentaje de células viables en función del tiempo de incubación, para el tratamiento con la concentración más alta de cada anticuerpo. Se observa que el porcentaje de células viables

que hay en cada uno de los tratamientos con los anticuerpos monoclonales anti-CD13 es menor en comparación con el grupo control. Para el efecto dependiente de la concentración (Figura 14A), conforme aumenta la concentración del anticuerpo el porcentaje de células viables disminuye lo cual indica nuevamente que este efecto es dependiente de la concentración de anticuerpo al que se exponen las células blanco. Observamos también que los 3 anticuerpos disminuyen de manera muy similar el porcentaje de viabilidad por lo cual se concluye que no existe diferencia significativa entre los 3 anticuerpos anti-CD13, pero si existe una diferencia significativa en comparación con la IgG en la cual la disminución de la viabilidad es menor al 10%. Para el efecto dependiente del tiempo de incubación se observan los mismos efectos. Esto evidencia de manera concluyente que los anticuerpos monoclonales anti-CD13 tienen un efecto sobre la disminución de la viabilidad y disminución del número total de células en la línea **U-937**, el análisis estadístico demuestra que el efecto de los anticuerpos anti-CD13 es mayor al efecto de una IgG no específica, por lo que el efecto no se debe a una unión inespecífica de los anticuerpos o por unión de la porción Fc del anticuerpo. El análisis estadístico también mostró que los 3 anticuerpos anti-CD13 tienen un efecto similar sobre la viabilidad de las células, ninguno tiene un mayor efecto que los otros dos en esta línea celular.

### **Células PC-3**

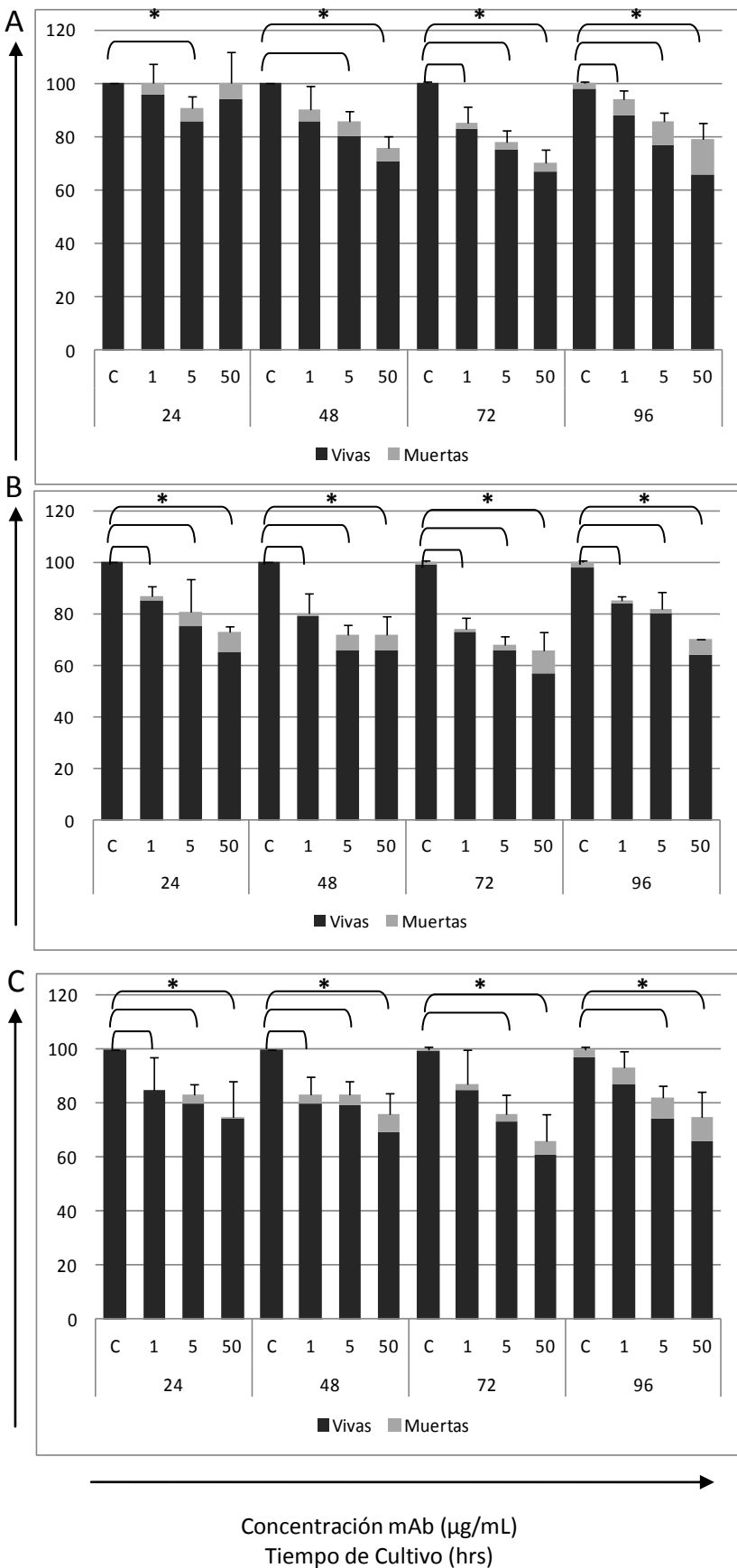
La siguiente línea analizada fue **PC-3**, una línea celular proveniente de cáncer de próstata. Los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones en las que se realizaron los experimentos para la línea U-937.

Los resultados de la proliferación de las células de esta línea son más notorios a las 72 horas de incubación con los mAb, ya que a este tiempo el porcentaje de células totales se encuentra en 70%, 66% y 68% con respecto al control de células tratadas con Ab irrelevante, (Figura 15A, 15B, 15C).

Figura 15. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular PC-3. A) células incubadas con mAb C. B) células incubadas con el mAb E. C) células incubadas con el mAb 452. Los experimentos se repitieron 3 veces.

\*P≤0.05

No. Total de células en porcentaje con respecto al control





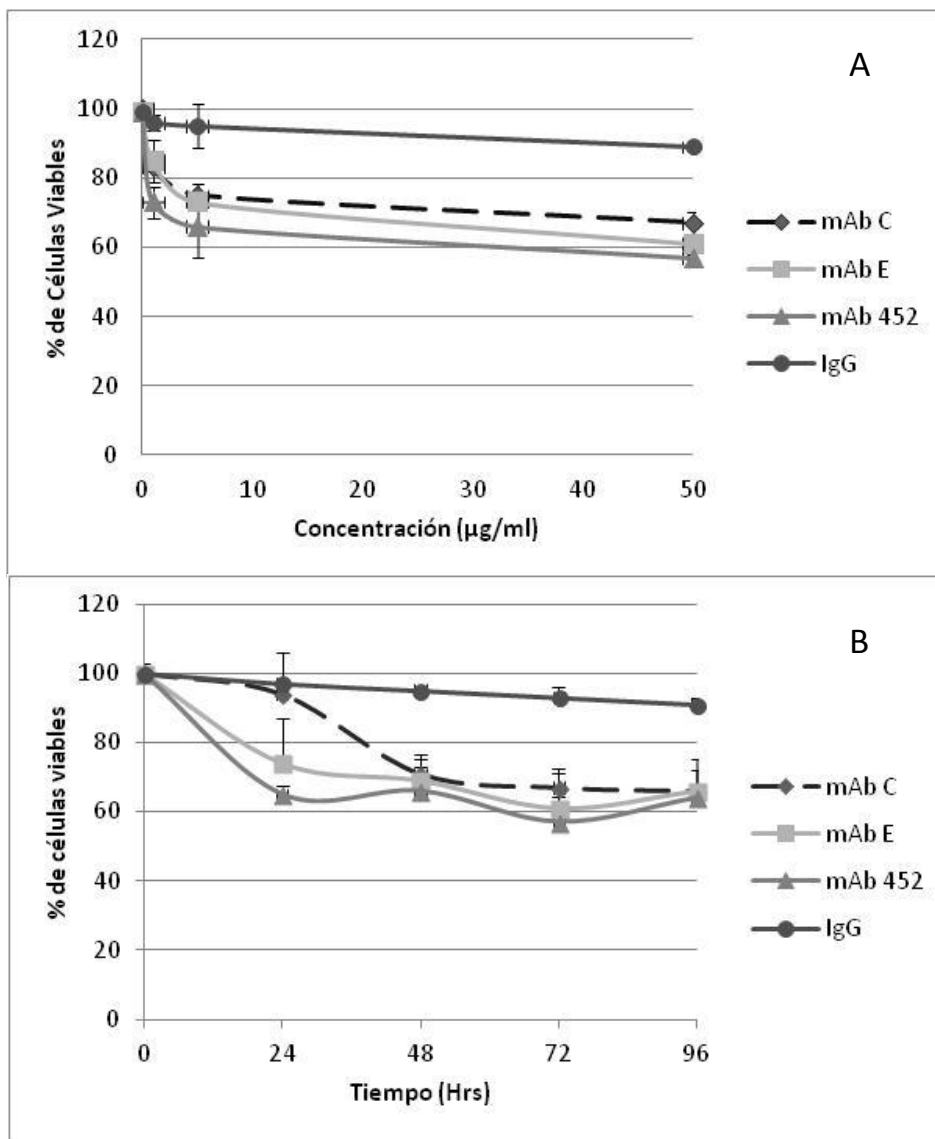


Figura 16. Efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre el porcentaje de células PC-3 viables. A) Efecto de distintas concentraciones de mAb sobre la viabilidad de las células a las 72 horas de incubación. B) Viabilidad de las células en función del tiempo de incubación en presencia de anticuerpo (50µg/mL). Para ambas graficas se incluye un control de IgG. Las barras muestran la desviación estándar  $\pm$ . n=3

Sin embargo a las 96 horas el número total de células aumenta a 76%, 75% y 70% respectivamente, pero existe un mayor porcentaje de células no viables, este efecto es distinto a la línea anterior ya que conforme aumentaba el tiempo de incubación en presencia de cualquiera de los anticuerpos la disminución en el número de células era mayor y el porcentaje

de células no viables aumentaba también. Este efecto puede deberse a una resistencia por parte de las células, al origen histológico de las células, el metabolismo, los requerimientos nutricionales, los mecanismos de reparación, e incluso los tiempos a los cuales el ciclo celular cambia de fase, debido a cualquiera de estos factores o a la contribución de todos ellos el efecto sobre esta línea pudiera ser diferente.

Sin embargo, al igual que sobre las células U-937, la concentración con mayor efecto es 50  $\mu\text{g/ml}$ , y los efectos sobre la proliferación y la viabilidad son concentración y tiempo dependientes hasta las 72 horas.

Debido a que los resultados de la figura 15 muestran que el tiempo al que se observa el mayor efecto son 72 horas de incubación, se eligió esa serie de resultados para analizarlos individualmente. Se observa que el porcentaje de células viables disminuye conforme aumenta la concentración del anticuerpo, todo esto a tiempo de incubación constante de 72 horas (Figura 16A). Sin embargo a concentración constante pero con variación en el tiempo de incubación se observa de manera más simplificada el extraño efecto que ocurre a las 72 horas, donde la viabilidad se encuentra por debajo de la viabilidad a las 96 horas (Figura 16B). En ambas figuras se compara cada anticuerpo contra el control de isotipo demostrando diferencia significativa en todos los puntos excepto a las 24 horas de incubación con el mAb **C** (Figura 16B), solo en este punto el porcentaje de células viables es similar al control, pero pasando las siguientes 24 horas de incubación (48 horas en total) el valor se asemeja a los valores observados con los otros 2 anticuerpos. Entre los diferentes anticuerpos no existe una diferencia significativa lo cual demuestra de manera clara que para la línea PC-3 nuevamente ningún anticuerpo es más efectivo que otro en la disminución de la viabilidad o disminución del número total de células.

## Células A-375

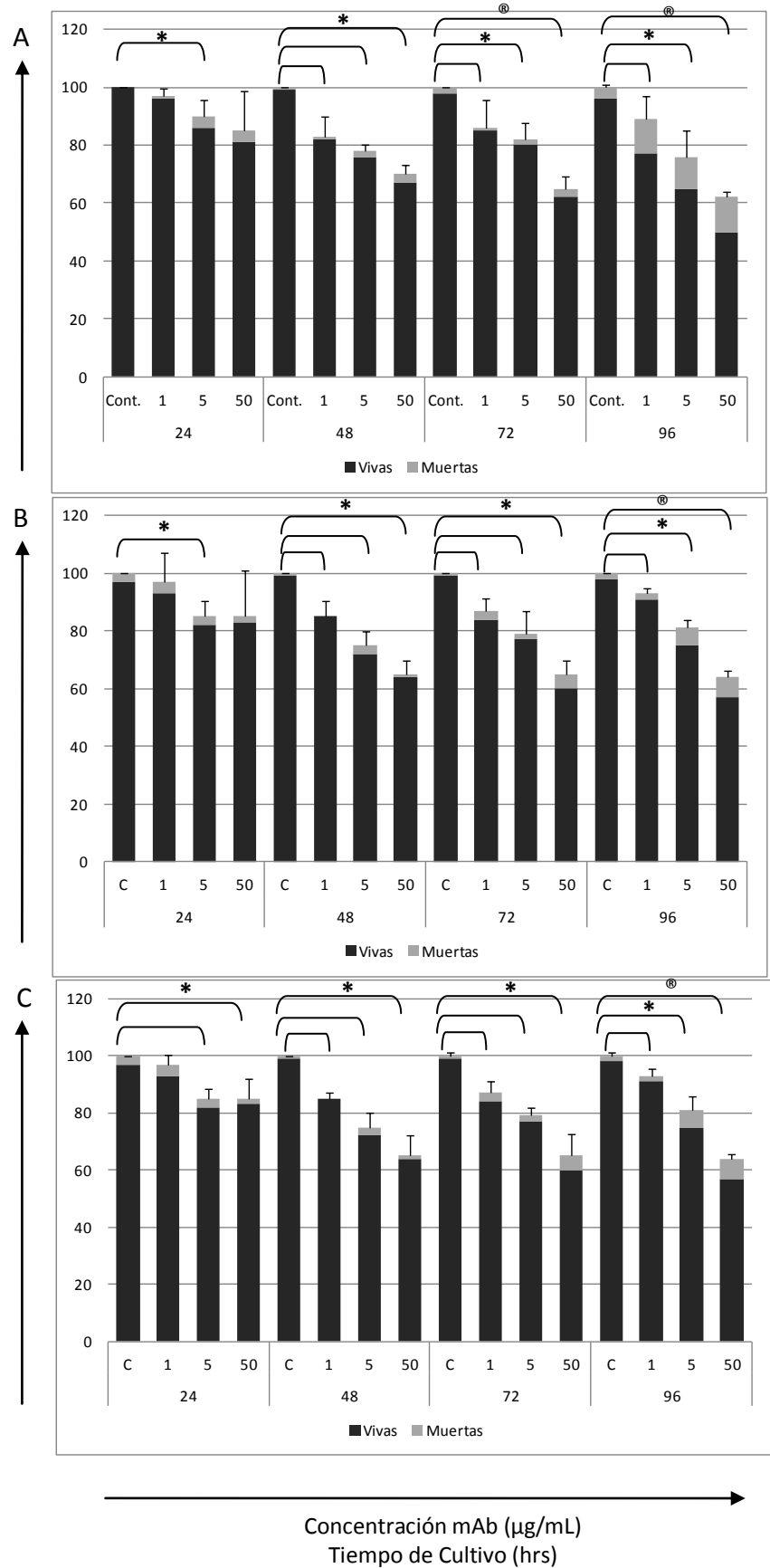
Las células de la línea **A-375** son células de piel provenientes de un melanoma maligno. En esta línea los anticuerpos mostraron los efectos cuantitativamente más grandes en cuanto a la disminución del número total de células y disminución de la viabilidad en comparación con las dos líneas anteriores. Nuevamente la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es la más efectiva (Figura 17A, 17B, 17C). El número total de células en presencia de los 3 mAbs llega alrededor del 60% a las 72 horas y este se mantiene así hasta las 96 horas. Este mismo porcentaje se alcanzaba en las otras líneas pero hasta las 96 horas, lo cual indica que tiene mayor rapidez el efecto sobre esta línea celular que sobre las otras líneas. Es notorio que el mAb C parece inducir un mayor efecto sobre la viabilidad que los otros anticuerpos, esto es visible en todas las concentraciones (Figura 18A), y a las 96 horas es realmente apreciable el efecto que induce en comparación con los demás tiempos (Figura 18B). Este fenómeno es particular ya que por experimentos previos en el laboratorio se sabe que el mAb **C** y **E** reconocen epítopes muy cercanos pero no iguales (Datos aun no publicados), es, por lo cual compiten por su unión a CD13, por lo que se tenía la hipótesis que ambos anticuerpos inducirían efectos similares sobre la viabilidad de las células malignas, lo cual ocurrió en las 2 líneas anteriores, pero sobre esta línea sus efectos son diferentes. Esto podría indicar que tal vez los efectos sobre la línea celular A-375 se deban al tipo de IgG que se une a CD13, ya que la única diferencia entre estos anticuerpos es el subtipo de inmunoglobulina al que pertenecen.

Nuevamente los efectos que inducen los mAbs sobre esta línea son dependientes de la concentración y del tiempo de incubación, y cualquier efecto causado por una unión inespecífica es descartado por el control de isotipo.

Figura 17. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular A-375. A) células incubadas con mAb C. B) células incubadas con el mAb E. C) células incubadas con el mAb 452. Los experimentos se repitieron 3 veces.

\* $p \leq 0.05$  ® $p \leq 0.01$

No. Total de células en porcentaje con respecto al control



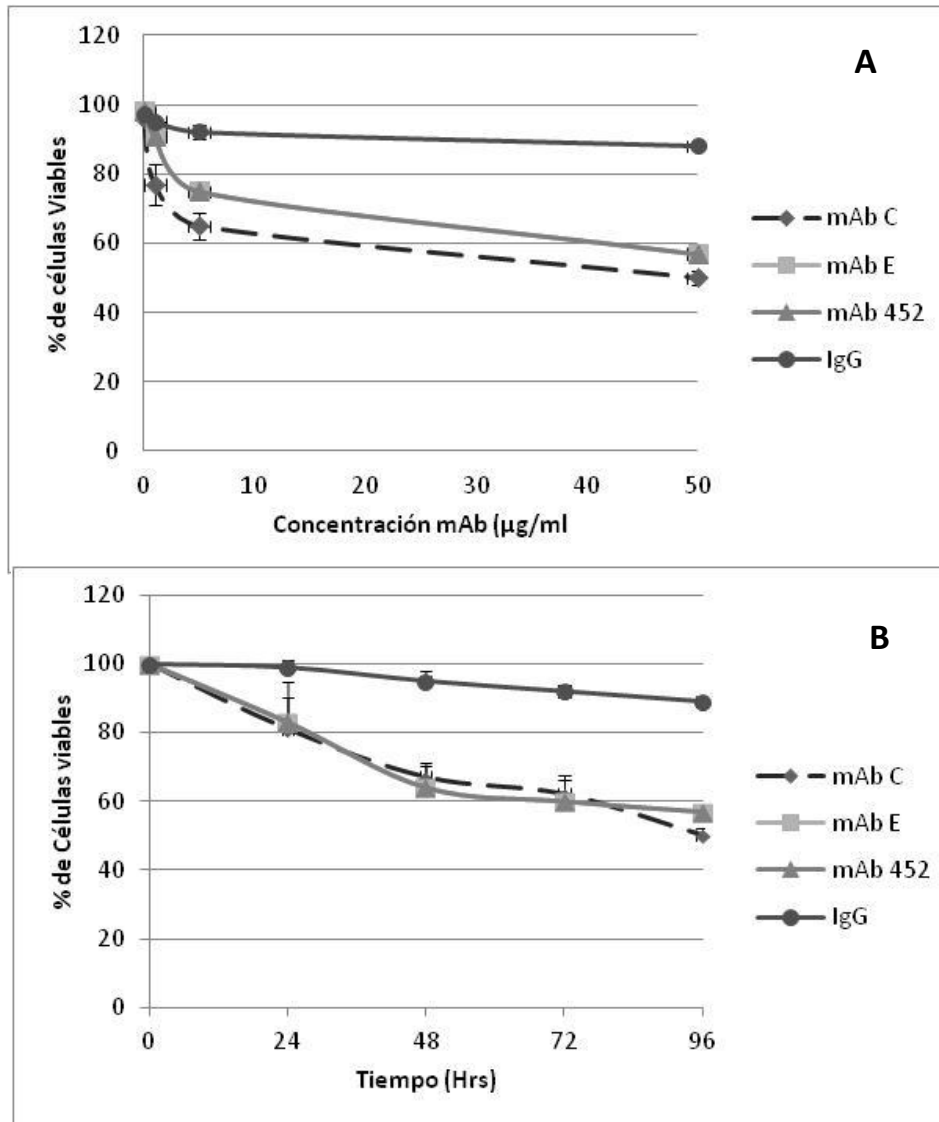


Figura 18. Efecto de los anticuerpos anti-CD13 sobre el porcentaje de células viables A-375. A) Efecto de distintas concentraciones de mAb sobre la viabilidad de las células a las 96 horas de incubación. B) Viabilidad de las células en función del tiempo de incubación en presencia de anticuerpo (50µg/mL). Para ambas graficas se incluye un control de IgG Los valores incluyen la desviación estándar  $\pm$ . N=3

Analizando las diferentes condiciones a las cuales se sometieron las células, observamos que a la concentración de 50 µg/mL, y 96 horas de incubación los resultados de la disminución en la viabilidad existe una diferencia significativa entre el mAb C con respecto a los otros dos anticuerpos monoclonales (Figura 18B).

Evaluando este mismo anticuerpo a tiempo constante de incubación (96 horas) pero a distintas concentraciones de anticuerpo, se observan diferencias significativas a todas las concentraciones probadas con respecto a los demás anticuerpos, lo cual destaca el efecto del mAb C del resto de los anticuerpos, sobre la línea celular A-375.

Hablando en términos generales para las 3 líneas, los resultados muestran que los 3 mAbs anti-CD13 disminuyen de manera significativa la proliferación y la viabilidad de las líneas celulares de cáncer analizadas. Estos efectos son dependientes de la concentración de anticuerpo con la cual se incuban las células y del tiempo de incubación. La única característica común entre las 3 líneas es la concentración (50µg/mL) a la cual los efectos son máximos. De acuerdo a nuestra hipótesis, nosotros esperábamos apreciar un mayor número de células no viables, sin embargo este porcentaje alcanzó entre el 20 y 30% en la mayoría de las condiciones experimentales. Aun así este porcentaje es estadísticamente significativo, y es evidente que el porcentaje de células viables en los cultivos tratados con anticuerpos anti-CD13 siempre es menor al porcentaje de células viables en el control y en las células incubadas con IgG.

La diferencia que existe entre las células viables del control y las células viables de cualquiera de las concentraciones probadas no corresponde al porcentaje de células no viables en ese tratamiento. Lo cual nos indica que las células podrían estar sufriendo dos diferentes clases de efecto, ya sea que los anticuerpos monoclonales detienen el ciclo celular por eso el número de células totales disminuye e inducen apoptosis en un porcentaje mínimo de la población celular; o el índice de apoptosis es igual al número de células totales que disminuyen en comparación con el grupo control pero con este método no es posible cuantificarlo. Para poder determinar con mayor exactitud el porcentaje de células en apoptosis se utilizó un kit para apoptosis empleando citometría de flujo.

#### 7.4. Inducción de apoptosis de líneas celulares de cáncer con mAbs anti-CD13

Se evaluó la capacidad de los mAbs **C, E** y **452** para inducir apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer. Para evaluar el porcentaje de células en apoptosis se incubaron las líneas celulares en ausencia o presencia de Ab monoclonal a una concentración de 50µg/mL, la concentración a la cual se mostraron los mayores efectos en el aumento del porcentaje de células no viables. Las células fueron incubadas 24, 48, 72 y 96 horas. Como control negativo se evaluaron las células sin tratamiento, y como control positivo células incubadas con luz UV 24 horas previas a leer las muestras. La luz UV induce en la mayoría de las células apoptosis debido a los efectos de dicha radiación sobre el ADN.

Se realizaron 3 experimentos independientes para cada línea celular. A continuación se muestran las gráficas de puntos (Dot plots) de un experimento representativo con cada línea (Figuras 19, 20 y 21). Se muestra la distribución de la población celular en cuatro distintas regiones: Las células en la región R4 (negativas para las tinciones con Anexina V y Ioduro de propidio) corresponden a las células vivas sin ninguna clase de daño, en R2 las células IP positivas (Necrosis), R3 y R5 muestra a las células que han entrado en un proceso de apoptosis, R3 corresponde a las células en apoptosis tardía y R5 a las células en apoptosis temprana.

**U-937**

72 Hrs

96 Hrs

UV

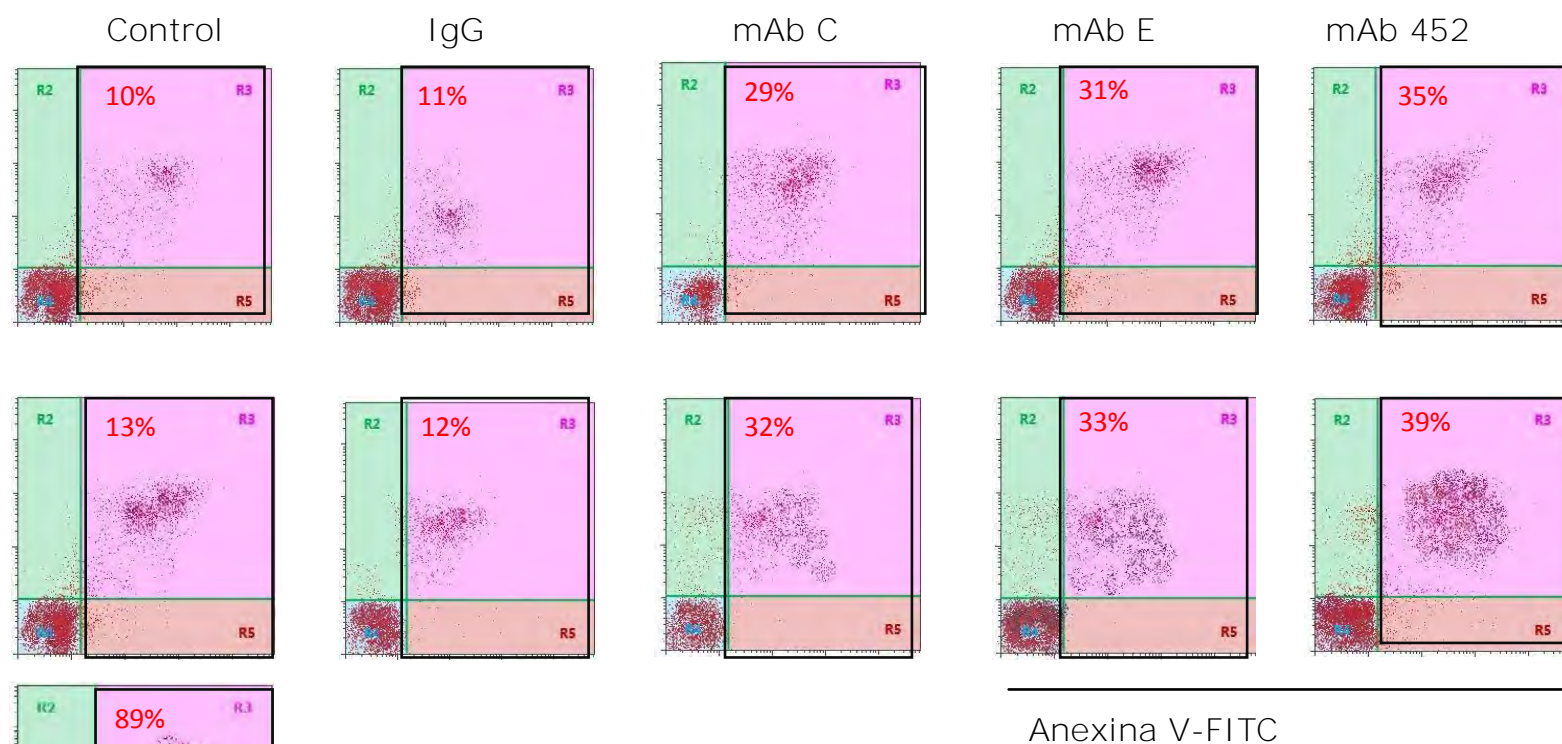


Figura 19. Inducción de la apoptosis en células U-937 por anticuerpos monoclonales anti-CD13. Apoptosis de las células U-937 incubadas durante 72 y 96 horas en presencia de IgG, C, E o 452 (50µg/ml), cuantificada mediante citometria de flujo. Los resultados son expresados como log de intensidad de fluorescencia de PI (eje Y), y log de la intensidad de fluorescencia de Anexina-V (eje X). Células positivas para Anexina V son remarcadas en un cuadro negro, las cuales representan las células en apoptosis. Se muestra un experimento representativo.



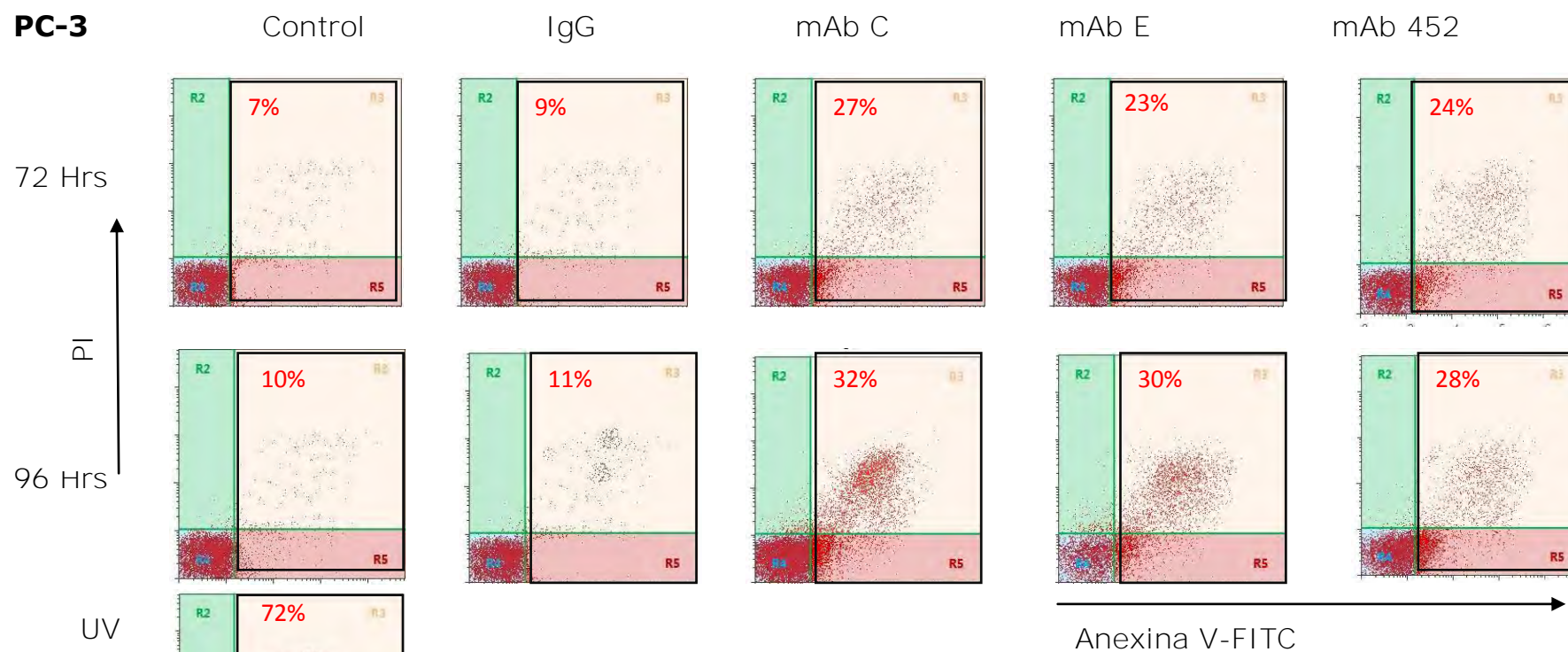


Figura 20. Inducción de la apoptosis en células PC-3 en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD13. Apoptosis de células PC-3 incubadas durante 72 y 96 horas en presencia de IgG, C, E o 452 (50 $\mu$ g/ml), cuantificada mediante citometria de flujo. Los resultados son expresados como log de intensidad de fluorescencia de IP (eje Y), y log de la intensidad de fluorescencia de Anexina-V (eje X). Células positivas para Anexina V son remarcadas en un cuadro negro, las cuales representan las células en apoptosis. Se muestra un experimento representativo.

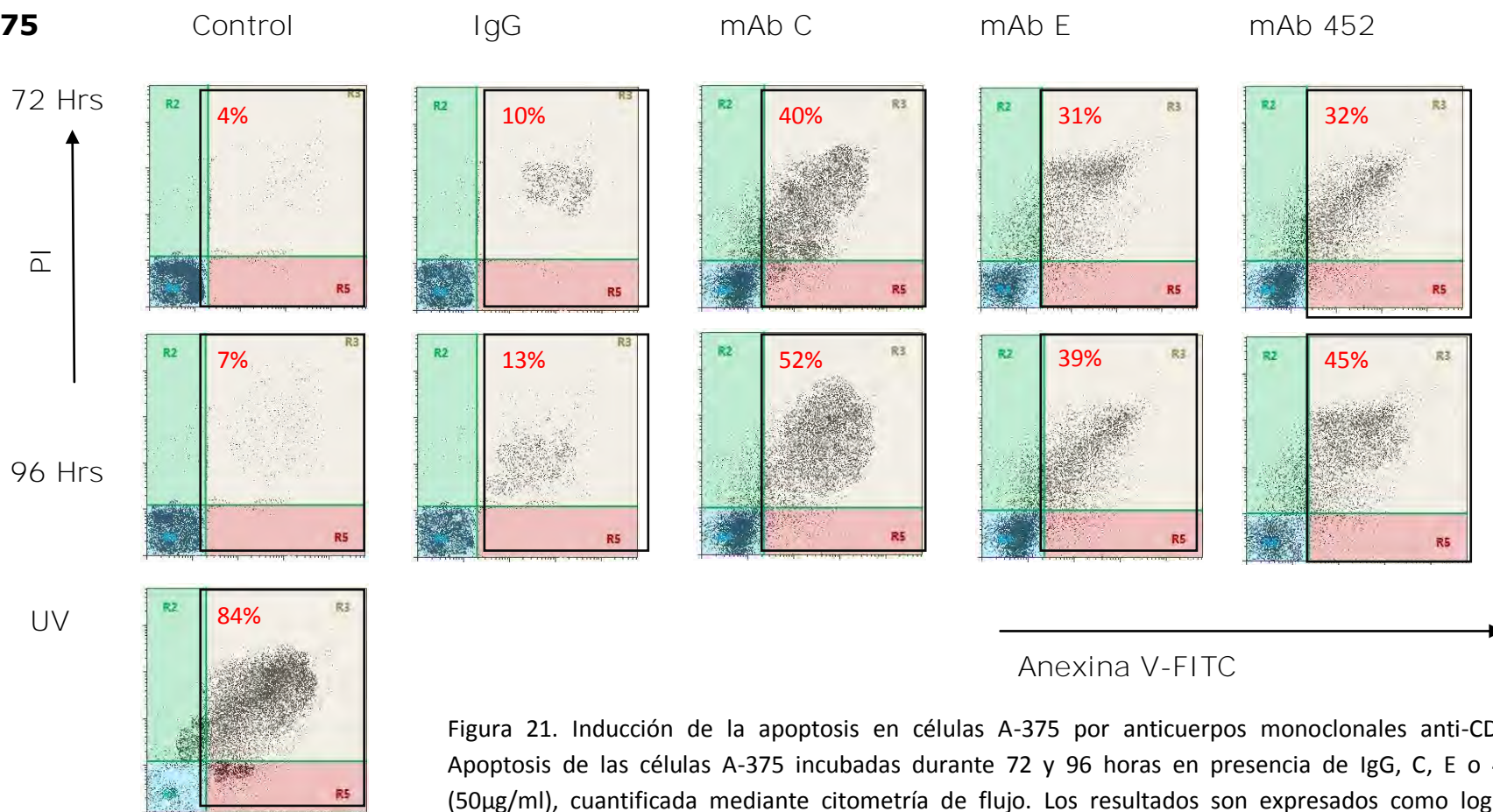
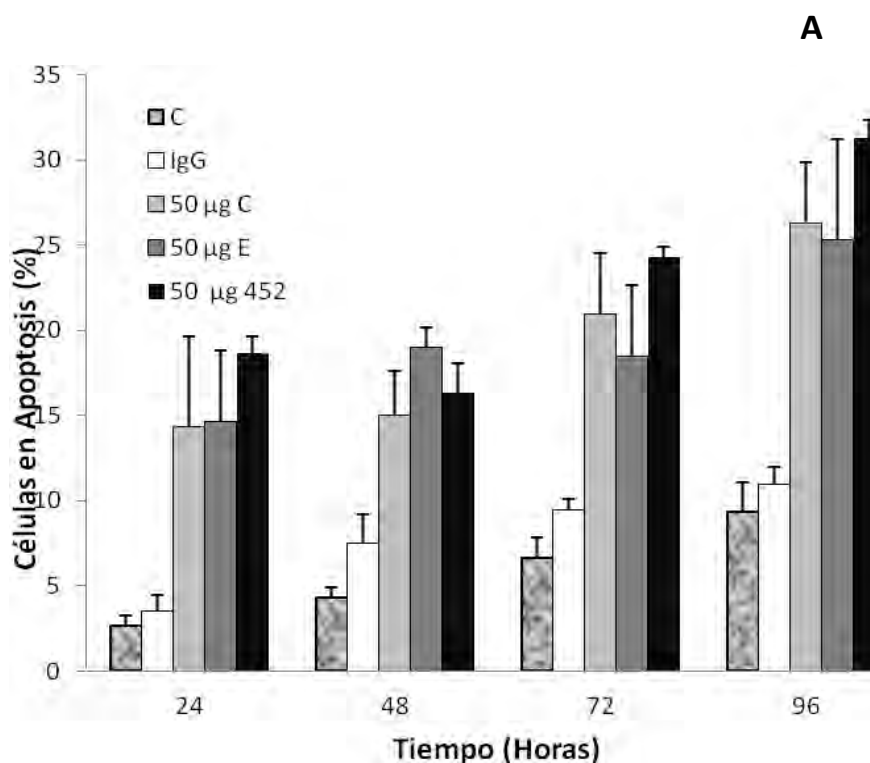
**A-375**

Figura 21. Inducción de la apoptosis en células A-375 por anticuerpos monoclonales anti-CD13. Apoptosis de las células A-375 incubadas durante 72 y 96 horas en presencia de IgG, C, E o 452 (50 $\mu$ g/ml), cuantificada mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como log de intensidad de fluorescencia de PI (eje Y), y log de la intensidad de fluorescencia de Anexina-V (eje X). Células positivas para Anexina V son remarcadas en un cuadro negro, las cuales representan las células en apoptosis. Se muestra un experimento representativo.

De acuerdo a los datos mostrados en las figuras 19, 20 y 21 se observa que los anticuerpos inducen apoptosis de manera significativa comparando con el control o la IgG. Los tres anticuerpos inducen porcentajes similares de células en apoptosis a todos los tiempos de incubación (solo se muestran resultados para 72 y 96 horas de incubación). Para la línea celular A-375 el efecto del mAb **C** es superior a los demás anticuerpos (Figura 21).

Al contar con 3 experimentos independientes para cada línea celular se calculó el promedio del porcentaje de células en apoptosis para cada condición experimental y se graficó en función del tiempo (Figura 22A, 22B y 22C). Para todos los tiempos de incubación existe una diferencia significativa en el porcentaje de células en apoptosis entre cualquiera de los 3 tratamientos con Ab monoclonal y el porcentaje del control o la IgG.



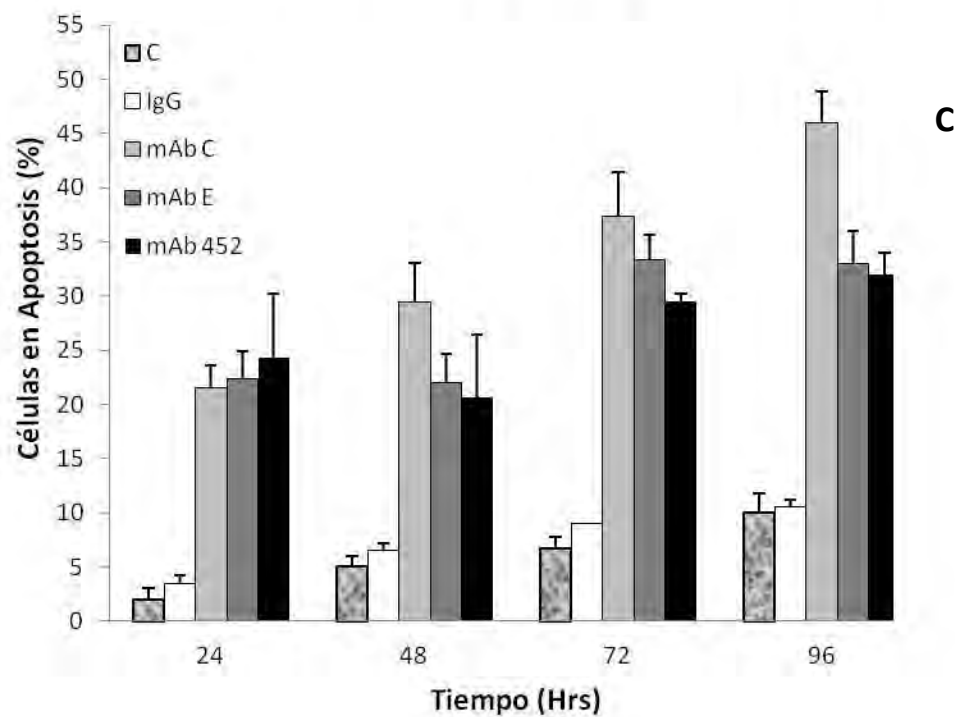
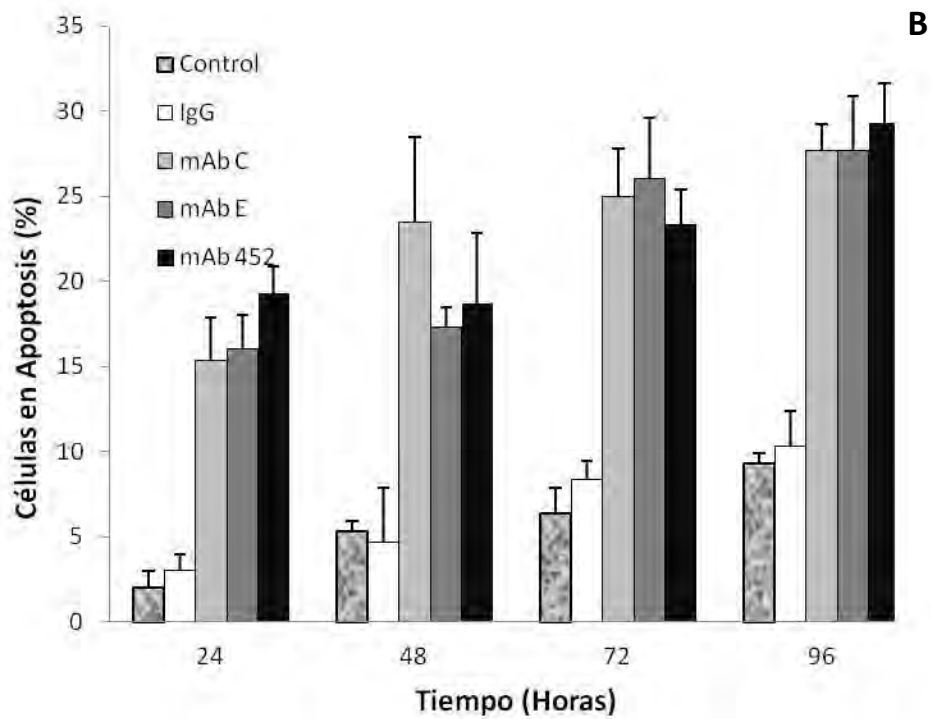


Figura 22. Índice de Apoptosis cuantificado mediante citometría de flujo. Células incubadas en presencia de distintos anticuerpos anti-CD13 o IgG a una concentración de 50µg/mL. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes ± DS. A) Células U-937 B) Células PC-3 C) Células A-375. C=control, \*p≤0.05.

Como muestra la figura 22C, el mAb C induce hasta un 46% de apoptosis que es significativamente mayor que el índice de apoptosis del mAb E (33%) y el mAb 452 (32%). Anteriormente en los resultados de proliferación y viabilidad se observaba este mismo resultado, el cual para la línea celular **A-375** tiene un mayor efecto el mAb C en la disminución de la viabilidad y del número de células que los otros anticuerpos. El porcentaje a las 96 horas es mayor que en los demás como se puede observar. Sin embargo para las otras dos líneas celulares ninguno de los 3 anticuerpos induce un índice de apoptosis mayor que cualquiera de los demás anticuerpos, lo cual apunta que para la línea celular U-937 y PC-3 tiene el mismo efecto utilizar cualquier anticuerpo anti-CD13 ya que cualquiera de los 3 anticuerpos induce en la misma medida la apoptosis de las células.

Para la línea **PC-3** (Figura 22B) los resultados obtenidos a las 72 horas y 96 horas no muestran diferencia significativa, lo cual indica que el índice de apoptosis en ambos tiempos es muy parecido y no es posible concluir que a las 72 horas exista un mayor porcentaje de células en apoptosis que a las 96 horas como se había mostrado en los resultados anteriores de proliferación y viabilidad (Figuras 15, 16). Se aprecia que los resultados con el mayor efecto en la disminución de la viabilidad se mostraban a las 72 horas de incubación y a las 96 horas existía una recuperación por parte de las células, sin embargo para los resultados de apoptosis no se aprecia este mismo fenómeno. Posiblemente se deba a que este método con el cual se cuantificó la apoptosis tiene una mayor exactitud, incluyendo que este método permite elegir la población con la cual se puede llevar a cabo el análisis, lo cual permite analizar incluso las partículas pequeñas que pueden ser los cuerpos apoptóticos. El método de viabilidad mediante la incorporación con azul tripan es más difícil de detectar las células no viables si estas no mantienen su estructura celular. La incorporación de azul tripan se lleva a cabo cuando la célula no es viable, ya que cuando la célula comienza a perder su

permeabilidad, se forman poros en la membrana y esto permite la entrada del colorante. Esto nos podría sugerir que a las 72 horas las células que se tiñen llevan un tiempo en proceso de apoptosis y al llegar a las 96 horas estas células han terminado su proceso hasta perder su integridad y solamente quedar los cuerpos apoptóticos y restos celulares, lo cual con este método no es posible observar. Sin embargo, con una tinción más específica como la empleada para cuantificar la apoptosis, observamos el porcentaje de células en apoptosis en ambos tiempos es muy similar ya que este cuantifica todas las células y cuerpos apoptóticos.

Como se observa en la figura 22, nuevamente queda demostrado que la línea sobre la cual los efectos son más evidentes es la línea celular A-375 llegando hasta un punto máximo de apoptosis del 46% de la población total con el mAb C. En cambio, para la línea U-937 los mAbs C, E y 452 inducen un porcentaje de apoptosis del 25%, 26% y 31% respectivamente y para la línea PC-3 se llega hasta 28% con el mAb C, 28% con el mAb E y 29 % con el mAb 452.

Otro aspecto destacable es la correlación del nivel de expresión de CD13 y los resultados obtenidos. La línea con mayor nivel de expresión es PC-3 (Figura 12) y la línea que mostró mayor susceptibilidad en ensayos de viabilidad, proliferación e inducción de la apoptosis fue la A-375 (Figuras 17, 18, 22C). Esto indica que no es posible correlacionar dichos resultados con el nivel de expresión de la aminopetidasa N, la efectividad de los anticuerpos radica en otro factor independiente del nivel de expresión de la aminopeptidasa N en la superficie celular.

La unión del anticuerpo a CD13, podría estar desencadenando una cascada de señalización que finaliza con la apoptosis de la célula. Aunque CD13 tiene una región intracelular muy pequeña se ha demostrado que su entrecruzamiento es capaz de inducir transducción de señales, para lo cual

probablemente se asocie con otra molécula ya sea de membrana o bien intracelular <sup>(19, 37, 40, 45)</sup>. Otra teoría posible sería que las células podrían internalizar dicho complejo anticuerpo/CD13 e iniciar la apoptosis por vía intrínseca. El mecanismo por el cual se desencadena el proceso de apoptosis es aún una incógnita, pero indudablemente sería pertinente estudiarlo más a fondo, lo cual marcaría una de las perspectivas a futuro de este trabajo.

Por reportes previos en el laboratorio se sabe que el único anticuerpo de los 3 empleados que inhibe la actividad catalítica de CD13 es el mAb 452 (datos aun no publicados). Sin embargo, para las líneas U937 y PC-3 los 3 anticuerpos muestran el mismo porcentaje en el efecto en las células diana lo cual sugiere que la actividad catalítica de CD13 no se encuentra involucrada en dicho efecto.

Sobre la línea A-375 el anticuerpo que tiene mayor efecto es el mAb C, y los mAbs E y 452 tienen efectos muy similares pero menores al C. La diferencia en esta línea con el mAb C pudiera deberse al subtipo de IgG al que pertenece este anticuerpo, que es IgG1 (datos aun no publicados). Otra hipótesis acerca de este particular efecto puede deberse a la glicosilación de CD13 en esta línea celular, lo que puede provocar que el epítipo que reconoce el anticuerpo C quede mayormente expuesto y gracias a esto exista un mayor reconocimiento y esto induzca un mayor porcentaje de apoptosis, limitando el sitio de unión para los otros 2 anticuerpos.

Finalmente, se concluye que CD13 es un blanco proapoptótico en células de cáncer, independientemente del origen histológico de las células blanco. CD13 es una molécula con grandes pronósticos para el futuro, al ser un blanco en contra del cáncer se debe estudiar el mecanismo molecular por el cual actúa, e iniciar con experimentos *in vivo*. CD13 ha demostrado tener diversas funciones durante el desarrollo del tumor en algunas etapas esenciales para formación de éste, pero esta misma molécula puede brindar

una alternativa en tratamientos en contra del cáncer. Es posible que la terapia con anticuerpos monoclonales sea parte de una terapia en conjunto con cualquier otro tratamiento compatible.



## 8. Conclusiones

- CD13 es un blanco proapoptótico en diferentes tipos de células de cáncer.
- Los anticuerpos monoclonales anti-CD13 son capaces de inducir un arresto de la proliferación y disminución en la viabilidad de las células.
- Los efectos sobre la disminución en la proliferación, viabilidad e inducción de la apoptosis son concentración y tiempo dependientes.
- Los efectos sobre la disminución en la proliferación, viabilidad e inducción de la apoptosis son independientes de la actividad catalítica de CD13.
- El nivel de expresión de CD13 en la superficie celular no está directamente relacionada con el índice de apoptosis que inducen los anticuerpos monoclonales.
- Únicamente para la línea celular A-375 el mAb C tiene mayor efectividad que los otros dos anticuerpos, para las líneas U-937 y PC-3, no hay diferencia significativa entre los efectos que inducen cada uno de los anticuerpos.

## 9. Perspectivas

- Determinar los niveles de expresión de CD13 después de que las células han sido incubadas con el anticuerpo monoclonal, para determinar si existe una internalización de la aminopeptidasa N y si esto correlaciona con la inducción de apoptosis. Cuantificar esto a distintos periodos de tiempo.
- Determinar el daño a ADN en las células mediante alguna técnica molecular.
- Determinar el efecto que tienen los anticuerpos monoclonales a la misma dosis en células no cancerígenas pero positivas en la expresión de CD13 (macrófagos o DCs aisladas de sangre periférica).
- Determinar cuáles caspasas se activan durante la apoptosis cuando los anticuerpos monoclonales anti-CD13 inducen este efecto, y establecer mediante cual vía se ejecuta la apoptosis.
- Estudiar los efectos de los anticuerpos monoclonales en un modelo murino de cáncer, evaluando el desarrollo del tumor, si existe metástasis, y el tiempo que los anticuerpos monoclonales retardan su crecimiento.

## 10. Referencias

1. **Abul K. Abbas, M.B., B.S. Andrew H. Lichman, M.D., Ph. D. Jordan S. Pober, Md., Ph. D.** *Inmunología celular y molecular*. 3ra. Edición. España : Mc Graw Hill-Interamericana, 1999. pp. 275-307.
2. **American Cancer Society.** *Global Cancer Facts & Figures 2007*. [Online] <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/GlobalCancerFactsFigures/index> Consultado 02/Agosto/2012
3. **Amoscato A.A., et. al.** *Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptidase by human dendritic cells* 161, 1998, J. Immunol., pp. 4023-4032.
4. **Bao Q., et. al.** *Structure of Apaf-1 in the Auto-Inhibited Form*. 2005, Cell cycle, Vol. 4, Vol 8, pp. 1001-1003.
5. **Bauvois, B.** *Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?*, 2004, Oncogene, Vol.23 pp. 337-344.
6. **Boatright KM, Salvesen GS.** *Mechanisms of caspase activation*. 2003, Curr Opin Cell Biol, Vol. 15, pp. 725-731.
7. **Brown JM, Attardi LD.** *The role of apoptosis in cancer development and treatment response*. 2005, Nat Rev Cancer, Vol. 5, pp. 231-237.
8. **Chang YW., et. al.** *CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells*. 2005, Int J Cancer, Vol.116, pp. 243-252.
9. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** *Caspases- an update*. 2008, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, Vol. 151, pp. 10-27.
10. **Cohen, JJ.** *Apoptosis*. 1993, Inmunol Today, Vol. 14, pp. 126-130.
11. **Cotter, T.** *Apoptosis and Cancer: the genesis of a research field*. 2009, Nature Reviews, Vol. 9, pp. 501-507.
12. **Curtin JF, Cotter TG.** *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. 2003, Cell Signal, Vol. 15, pp. 983-992.

13. **Danielsen EM, Olsen J.** *Byosynthesis of intestinal microvillar proteins. Effect of castanospermine on cell-free synthesis of aminopeptidase N.* 228, 1988, FEBS Lett, pp. 102-104.
14. **Dixon J, Kaklamanis L, Turley H, et. al.** *Expression of aminopeptidase-N (CD13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin.* 1994, J Clin Pathol, Vol. 47, pp. 43-47.
15. **Dubowcchik GM, Walker MA.** *Receptor-mediated and enzyme-depent targeting of cytotoxic anticancer drugs* 83, 1999, Pharmacol Ther, pp. 67-123.
16. **Earshaw CW, martins ML, Kaufman HS.** *Mammalian caspases: structure, activation, substrates and fuctions during apoptosis.* 1999, Annu Rev Biochem, Vol. 68, pp. 383-424.
17. **Elinos-Báez C.M., Maldonado V., Meléndez-ZajglaJ.** *Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis.* 2003, Gaceta Medica de Máxico, Vol. 15, Numero.5, pp. 493-499.
18. **Elmore, S.** *A review of programmed cell death.* 2007, Toxicology Pathol, Vol. 35, pp. 495-516.
19. **Fukasawa K., et. al.** *Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis.* 2006, Cancer Lett. Vol.243, pp. 135-143
20. **Fulda, S.** *Caspase-8 in cancer biology and therapy.* 2009, Cancer Lett, Vol. 281, pp. 128-133.
21. **Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN.** *c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis.* 2005, J Biol Chem, Vol. 208, pp. 14507-14513.
22. **Guenova M, Michova A, Balatzenko G, et. Al.** *A particular expression pattern of CD13 epitope 7H5 in chronic lymphocytic leukaemia- a posible new therapeutic target*

23. **Hengartner, M.** *The biochemistry of Apoptosis.* 2000, Nature, Vol. 407, pp. 770-776.
24. **Hetts, SW.** *To die or not to die: An Overview of Apoptosis and Its Role in Disease.* 1998, JAMA, Vol. 279, pp. 300-307.
25. **Inoi K. et. al.** *Aminopeptidase inhibitor ubimex (bestatin) inhibits the growth of human choriocarcinoma in nude mice through its direct cytostatic activity.* 1995, Anticancer Res, Vol. 15, pp. 2081-2087.
26. **Kehlen A., et. al.** *IL-10 and TGF-B difefer in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes.,* 2004, Int. J. Mol. Med. Vol. 13, pp. 877-882.
27. **Kolb A.F., et. al.** *Molecular analysis of the coronavirus-receptor fuction of aminopeptidase N.* 1998, Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 440, pp. 61-67
28. **Klug W, Cumming M.** *Conceptos de genetica.* s.l. : Prentice Hall, 1999. pp. 30-32, 630-634.
29. **Kroemer G, Zamzami N, Susin S A.** *Motocondrial control of apoptosis.* 1997, Inmunol Today, Vol. 18, pp. 44-51
30. **Kruger, A., et al.** *FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis.* 24, 2001, Molecular and Cellular Biology, Vol. 21, pp. 8247-8254.
31. **Lodish H., Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J.** *Molecular Cell Biology.* 4Th Edition. New York : W.H. Freeman, 2000.
32. **Lohn M., et. al.** *Aminopeptidase N-mediated signal trasduccion and inhibition of proliferation of human myeloid cells.* 1997, Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 421, pp. 85-91.
33. **Luan Y, Xu W.** *The structure and main fuction of aminopeptidase N.* Curr Med Chem, 2007, Vol. 14, pp. 639-647.
34. **Malumbres M, Barbacid M.** *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.* 2009, Nat. Rev Cancer, Vol. 9, pp. 153-166.

35. **Marsden, V.S., Strasser A.** *Control of apoptosis in the immune system: Bcl-3, BH3-only proteins and more.* 2003, Annu Rev Immunol, Vol. 21, pp. 71-105.
36. **Mechtersheimer G, moller P.** *Expression of aminopeptidase N (CD13) in mesenchymal tumors.* 1990, Am J Pathol, Vol. 137, pp. 1215-1222.
37. **Mina-Osorio, P.** *The moonlighting enzyme CD13: old and new funtion to target.* Trends Mol. Med., 2008, Vol. 14, pp. 361-371.
38. **Mina-Osorio P., et. al.** *A role for galactina-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes.* 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun.Vol. 353, pp. 605-610.
39. **Mina-Osorio P., Ortega E.** *Aminopeptidase N (CD13) fuctionally interacts with FcyRs in human monocytes.* 2005, J Leukoc Biol, Vol. 69, pp. 1008-1017.
40. **Mina-Osorio P., Shapiro L.H., Ortega E.** *CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells.* 2006, J. Leukoc. Biol.Vol. 79, pp. 719-730.
41. **Nagata, S.** *Fas-Ligand induced apoptosis.*1999, Annual Review Genet., Vol. 33, pp. 29-55.
42. **Nakase K., et. al.** *Myeloid antigen, CD13, CD14, and/or CD33 expresion in restricted to certain lymphoid neoplasms.* 1996, Am. J. Clin. Pathol. Vol. 105, pp. 761-768.
43. **Nuñez L., et. al.** *Cholesterol crystallization-promoting activity of aminopeptidase-N isolated from vesicular carrier of billary lipids.* 329, 1993, FEBS Lett, pp. 84-88.
44. **Petrovic N, et. al.** *CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodiaformation.* 2007, Blood, Vol.110, pp. 142-150.
45. **Piedfer M, Dauzonne D, Tang R, et. al.** *Aminopeptidase-N/Cd13 is a potencial proapoptotic target in human myeloid tumor cells.* 25, 2001, The FASEB J, Vol. 8, pp. 2831-2847.

46. **Quin S, Yang C, et. al.** *Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment.* 308, 2012, Cancer Letters, pp. 9-13.
47. **Riemann D, Kehlen A, Langner J.** *CD13- not just a marker in leukemia typing.* 1999, Immunol Today, Vol. 20, pp. 83-89.
48. **Riedl Sj, Shi Y.** *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.* 2004, Nat Rev Mol Cell Biol, Vol. 5, pp. 897-907.
49. **Saiki I, Fujii H, Yoneda J, et. al.** *Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor cell invasion and extracellular matrix degradation.* 54, 1993, Int J Cancer, pp. 137-143.
50. **Shi, Y.** *Mechanical aspects of apoptosome assembly.* 2006, Current Opinion in Cell Biology, Vol.18, pp. 667-684.
51. **Sporn, M. and Roberts, A.** *Autocrine growth factors and cancer.* 1985, Nature, Vol.313, pp. 745-747.
52. **Surowiak P, Drag M, Matema V, et. al.** *Expression of aminopeptidase N/CD13 in human ovarian cancer.* 2006, Int J Gynecol Cancer, Vol. 19, pp. 1783-1788.
53. **Taylor, A..** *Aminopeptidases structure and fuction.* 1993, FASEB Journal, Vol. 7, pp. 290-298.
54. **Thielitz A. et. al.** *Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV and Aminopeptidase N targed major pathogenetic step in acne initiation.* 2007, Journal of investigative Dermatology, Vol. 127, pp. 1042-1051.
55. **Tokuda N, Levy RB.** *1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but supress HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes.,* 1996, Proc Soc Exp Biol Med, Vol. 211, Tomo 3, pp. 244-250.
56. **Verhagem, A.M. and Vaux, D.L.** *Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac.* 2002, Apoptosis, Vol. 7, Tomo 2, pp. 163-166.

57. **Weinlinch R., Dillon C., Green D.** *Ripped to death.* 2011, *Trend Cell B.*, Vol. 21, pp. 630-637.
58. **Wex T., et.al.** *.Antisense-mediated inhibition of aminopeptidase N (CD13) markedly decreases growth rates of hematopoietic tumor cell.* 1997, *Adv Exp. Med. Biol.* Vol. 427, pp. 67-73.
59. **World Health Organization.** [Online]  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Consultado 02/Mayo/2012
60. **Wu, G., et al.** *Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO.* 2000, *Nature*, Vol.408, pp. 1008-1012.
61. **Wulfaenger J, et. al.** *Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion.* 2008, *Mol Membr Biol*, Vol.25, pp. 72-82.
62. **Youle RJ, Strasser A.** *The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.* 2008, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 9, pp. 47-59



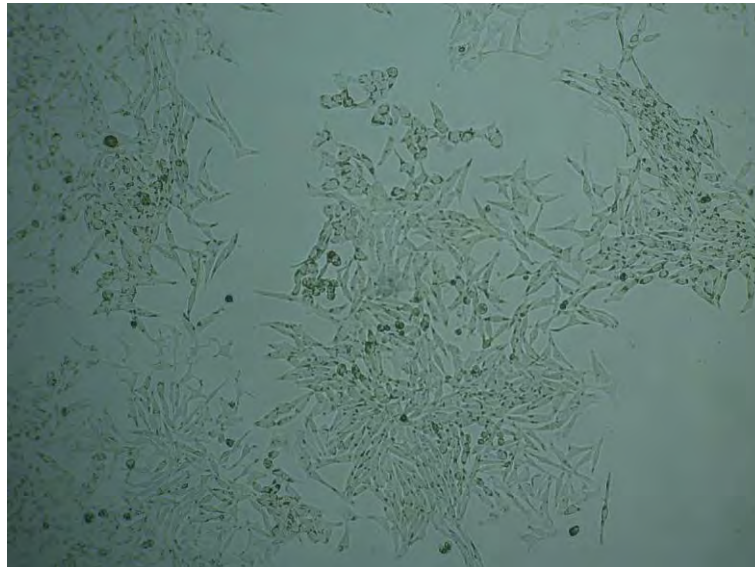
## 11. Anexo I

Morfología Celular

U-937



PC-3



A-375

