



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA
CD13 EN LA MIGRACIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER HUMANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

EKATERINNE GISELLE GARCÍA REYES



CD.MX.

AÑO: 2017



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 está 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: ENRIQUE ORTEGA SOTO**
VOCAL: **Profesor: JOSE PEDRAZA CHAVERRI**
SECRETARIO: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**
1er. SUPLENTE: **Profesor: ROSA CAMACHO SANDOVAL**
2° SUPLENTE: **Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM, DEPARTAMENTO DE
INMUNOLOGÍA. LABORATORIO A003.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Enrique Ortega Soto

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en IBB Claudia Garay Canales

SUSTENTANTE (S):

Ekaterinne Giselle García Reyes

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DEL DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

El presente proyecto fue financiado por donativos de CONACYT (178803) y DGAPA-UNAM (IN210314). Ekaterinne Giselle García Reyes recibió una beca Tesis del proyecto IN210314 (PAPIIT-DGAPA-UNAM).

Índice General

LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 CÁNCER.....	10
3.1.1 Incidencia.....	10
3.1.2 ¿QUÉ ES CÁNCER?	11
3.1.3 El cáncer y la inestabilidad genética	12
3.1.4 Inmunovigilancia	15
3.1.5 Evasión de la respuesta inmunológica.....	16
3.1.6 Tumorigénesis y angiogénesis.....	17
3.1.7 Invasión y metástasis.....	19
3.1.8 Terapia contra el cáncer basada en anticuerpos	20
3.2 AMINOPEPTIDASA N (CD13, APN).....	21
3.2.1 Estructura de CD13	21
3.2.3 La CD13 y su papel en cáncer.....	22
3.2.4 Una posible inmunoterapia contra el cáncer basada en CD13	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
6. HIPÓTESIS	26
7. OBJETIVOS.....	26
7.1 Objetivo general.....	26
7.2 Objetivos particulares	26
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1 Líneas celulares y cultivo celular:	27
8.2 Anticuerpos	27
8.3 Ensayo de saturación de anticuerpo (Inmunofluorescencia indirecta)	28
8.4 Ensayo de proliferación celular	29
8.5 Ensayo de cierre de herida	30
8.6 Ensayo de migración en cámaras de Transwell.....	31
8.6.1 Migración inducida por CD13.....	31

8.6.2 Modulación de la migración por CD13	32
9. RESULTADOS	33
9.1 Ensayo de saturación de anticuerpo	33
9.2 Ensayo de proliferación celular	34
9.3 Ensayo de cierre de herida	36
9.4 Ensayos de migración en cámaras de Transwell	40
9.4.1 Migración inducida por CD13	40
9.4.2 Modulación de la migración por CD13	44
10. DISCUSIÓN	48
11. CONCLUSIONES	54
12. PERSPECTIVAS	55
13. APÉNDICE	56
14. BIBLIOGRAFÍA	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG1: angiopoyetina-1

APN: Aminopeptidasa N

BL: Buffer de lavados

BSA: Albúmina de suero bovino

CAMs: Moléculas de adhesión celular

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECM: Matriz extracelular

ENT: Enfermedades no transmisibles

FITC: Isotiocianato de fluorescencia

INEGI: Instituto Nacional de Geografía y Estadística

mAb: Anticuerpo monoclonal

MEM: Minimum Essential Medium

MTT: bromuro de 2,5-difeniltetrazolio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)

NGR: motivo peptídico compuesto por los aminoácidos asparagina-glicina-arginina

OMS: Organización Mundial de la Salud

pAPN: Aminopeptidasa N porcina

PBS: Solución buffer de fosfatos

PFA: Paraformaldehído

PIGF: Factor de crecimiento placentario

RF: Rojo de fenol

rpm: revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. RESUMEN

Se denomina cáncer a un conjunto de diversos tipos de enfermedades en las cuales se ha perdido el estado de homeostasia del organismo. Como consecuencia de ello se presenta una sobreexpresión de diversas proteínas celulares, como proteasas, las cuales ayudan a promover la migración de las células malignas iniciando con el proceso de metástasis. La aminopeptidasa CD13 escinde aminoácidos del extremo amino de proteínas y péptidos. Esta enzima está expresada en múltiples tejidos de mamíferos tales como riñón, próstata, pulmón, colon, estómago, y piel, entre otros. Se ha comprobado que en células malignas CD13 se encuentra sobreexpresada y que es un promotor de la migración e invasión celulares. Recientemente se ha propuesto a CD13 como un posible blanco terapéutico en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Tales terapias conllevan el uso de anticuerpos específicos para CD13, por lo que el estudio de los mismos es de gran importancia para que continúe el desarrollo de terapias para el tratamiento del cáncer.

En el presente trabajo se estableció el efecto de dos anticuerpos específicos anti-CD13: el anticuerpo monoclonal 452 y el anticuerpo monoclonal C, sobre dos líneas celulares cancerígenas diferentes, la línea celular de fibrosarcoma HT1080 y la línea celular de melanoma A-375. Es preciso indicar que estos anticuerpos anti-CD13 no interfieren con la actividad enzimática de CD13. Por lo tanto, con la finalidad de saber si la actividad enzimática interviene con la migración celular, se empleó la bestatina, la cual es un inhibidor de la actividad enzimática. Para el estudio de la migración celular se emplearon dos tipos de ensayos *in vitro*, el ensayo de cierre de herida y el ensayo de migración celular en cámaras de Transwell.

No obstante, para poder asociar el cierre de herida únicamente a la actividad migratoria de las células y no a la replicación celular, fue necesario detener la proliferación de las células, para lo cual se empleó un ensayo denominado ensayo de proliferación celular, en el cual se empleó un compuesto inhibidor de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA), la mitomicina C: un entrecruzador no reversible de las cadenas complementarias del DNA, mismo que logró detener la replicación celular para la realización del ensayo de cierre de herida.

Se encontró que los anticuerpos anti-CD13 no ejercieron ningún tipo de efecto en los ensayos de cierre de herida y en los ensayos de migración en cámaras de Transwell con ninguna de las dos líneas celulares empleadas. No obstante, en los ensayos de cierre de herida el efecto con la bestatina fue diferente al esperado, ya que ésta promovió la migración celular en lugar de detenerla como se ha descrito en la literatura. Mientras que en los ensayos de migración celular en cámaras de Transwell la bestatina logró inhibir la migración celular concordando con la información descrita en la literatura, la cual indica que al inhibir la actividad enzimática de CD13 la migración celular disminuye.

De acuerdo con estos resultados se concluye que los anticuerpos anti-CD13 no ejercen ningún tipo de efecto sobre la migración celular. Mientras que la bestatina parece promover la migración celular en los ensayos de cierre de herida, pero logra el efecto contrario en los ensayos en cámaras de Transwell.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado como la principal causa de muerte en países desarrollados y subdesarrollados, particularmente en los últimos, donde reside cerca del 82% de la población mundial (Torre et al., 2015).

El cáncer estimula una respuesta inmune en el organismo. El sistema inmunológico es una red intrincada en la que participan diferentes tipos de células y de moléculas. La acción coordinada de todos sus elementos permite que se despliegue una respuesta eficaz para eliminar las células tumorales. Sin embargo, los tumores presentan diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, lo que a la larga les permite desarrollarse.

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades que requiere de una serie de pasos para permitir su progresión hasta la última y en la mayoría de los casos letal etapa de invasión celular. Durante el cáncer, además, hay una pérdida importante del estado de homeostasia del organismo, por lo que la sobreexpresión celular de diversas proteínas es característica.

La aminopeptidasa N (APN) o CD13, es una enzima del tipo aminopeptidasa Zn-dependiente, y es la más estudiada dentro de su grupo. Durante el cáncer, la CD13 se sobreexpresa en la membrana de las células tumorales e inclusive se ha llegado a considerar como un marcador tumoral. La CD13 incrementa la migración de las células tumorales y favorece la degradación de las proteínas de matriz promoviendo la invasión.

Avances en el conocimiento de la inmunología básica han conducido a importantes tipos de inmunoterapia contra el cáncer, la cual ha revolucionado el cuidado proporcionado a los pacientes. Entre algunos de estos agentes inmunoterapéuticos se encuentran ciertos inhibidores de puntos de control inmunológicos. Adicionalmente, otras herramientas tales como terapias de radiación, fármacos dirigidos o inclusive la quimioterapia convencional, son empleadas para mejorar de modo sinérgico, el efecto de estas inmunoterapias.

Recientemente se ha propuesto a CD13 como un punto de control inmunológico en la inmunoterapia contra el cáncer, y se han ensayado tanto inhibidores de su actividad enzimática (como bestatina y otros), como anticuerpos específicos, para intentar inhibir su función en el cáncer.

En este trabajo se caracterizó el efecto de dos anticuerpos específicos anti-CD13: el anticuerpo 452 y el anticuerpo C, sobre la migración celular en ensayos *in vitro*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CÁNCER

3.1.1 Incidencia

De acuerdo con datos recopilados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013, a nivel mundial, el 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles (ENT) generalmente crónicas, de larga duración y de progresión lenta. Entre los cuatro tipos principales de ENT se encuentran: enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y cáncer. Juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año. Por sí mismo, el cáncer provoca cerca de ocho millones de muertes al año, lo que lo convierte en la principal causa de muerte a nivel mundial (Figura 1). Se espera que esta cifra se incremente a 21 millones para el año 2030 (Vinay et al., 2015; OMS, 2013).

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que afecta a personas de edad avanzada en una proporción mayor que a niños y jóvenes, sin haber diferencias por razón de raza, nivel socioeconómico o sexo. Además del impacto psicológico y emocional que conlleva el padecimiento de cáncer, las consecuencias socioeconómicas que acompañan el tratamiento de la enfermedad son de gran repercusión monetaria para la comunidad, especialmente para aquellas menos favorecidas, donde el acceso a los recursos médicos es limitado.

Existen más de 100 tipos de cáncer y distintos subtipos de tumores que pueden ser encontrados dentro de órganos específicos. Se sabe que los tipos de cáncer más comunes entre la población de infantes y adolescentes son aquellos que afectan órganos hematopoyéticos, al sistema nervioso central, así como cáncer de hueso, neuroblastoma y tumor de Wilms (cáncer de riñón), mientras que los de mayor prevalencia en personas de veinte años y más, es el de órganos digestivos, cáncer de mama, de órganos genitales y de órganos hematopoyéticos. Como cabría esperar, la tasa de letalidad por tumores malignos aumenta más rápidamente con la edad a partir de los treinta años.

Durante 2013, se informó que el cáncer de órganos hematopoyéticos es la principal causa de morbilidad y mortalidad hospitalaria en poblaciones de 0 a 19 años de edad en México. Por otro lado, se reportó que el cáncer de órganos digestivos y de mama presenta la mayor tasa de morbilidad en poblaciones de 20 años y más, mientras que la mayor tasa de mortalidad la ocupó el cáncer de órganos digestivos (OMS, 2013).

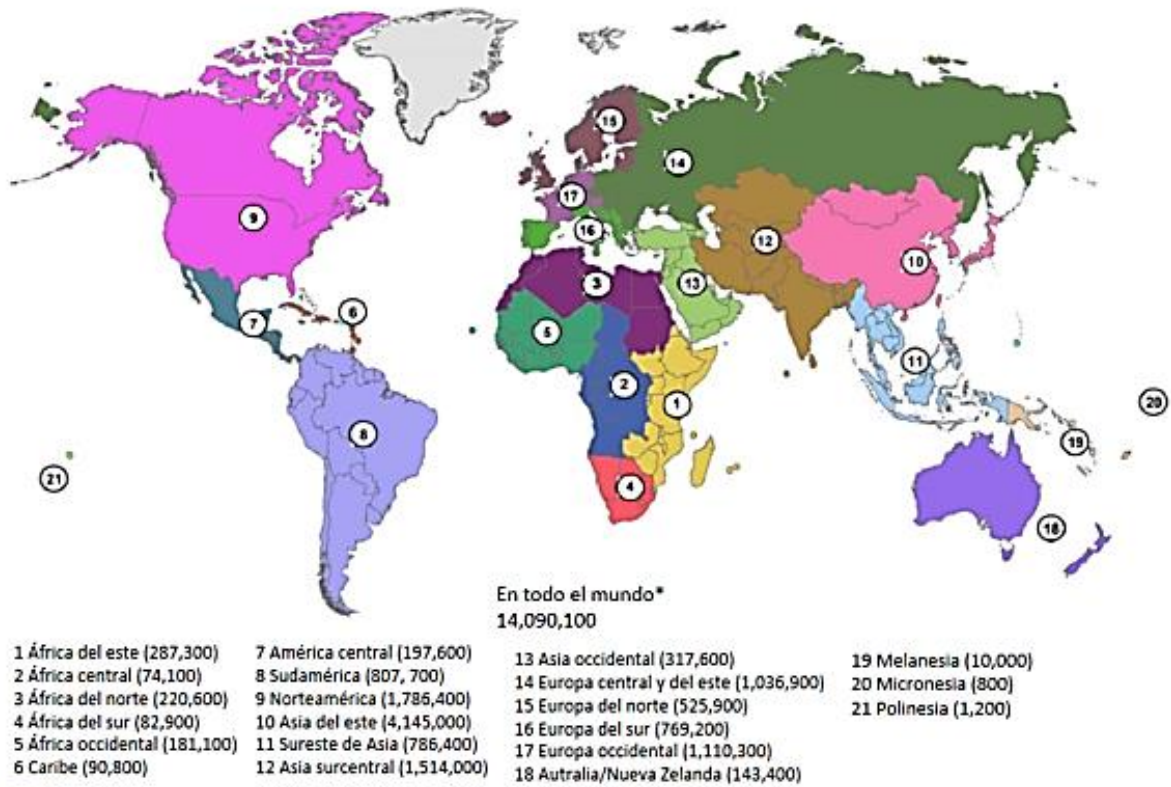


Figura 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer en 21 áreas del mundo, 2012.
* Las regiones estimadas no suman el estimado mundial debido al método de cálculo.
Fuente: GLOBOCAN 2012

Fig 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer en 21 áreas del mundo 2012. Tomado de: Torre, et. al, 2015. Modificado por García E.

3.1.2 ¿QUÉ ES CÁNCER?

Se define como cáncer a un conjunto de enfermedades que causan un cambio y un crecimiento incontrolado de células del cuerpo. La mayoría de los tipos de cáncer se caracterizan por la formación de un bulto o masa denominado tumor, conformado por células cancerosas que han perdido su funcionalidad (Trinchieri G, 2012). Los tumores se presentan de forma localizada en diversos órganos o tejidos del cuerpo y

en la mayoría de los casos dan lugar a la propagación de las células malignas que lo conforman, hacia otros sitios del organismo en donde establecen nuevos tumores denominadas metástasis.

La interacción de factores genéticos y estímulos ambientales provoca alteraciones en el material genético de las células, que frecuentemente culminan en la pérdida de las funciones biológicas normales y en una proliferación celular anormal. Para eliminar estas aberraciones, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y destruir las células transformadas. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor.

Una vez que el sistema inmunológico reconoce a las células malignas, éste entrará en contacto e interactuará íntimamente con las mismas en todo el proceso de desarrollo y progresión del cáncer hasta la metástasis. Esta compleja comunicación entre la inmunidad y las células tumorales puede inhibir o ayudar el crecimiento del tumor. Son varios los factores que determinan la eficiencia de la respuesta antitumoral, pero una de sus consecuencias principales es la selección de variantes de las células cancerosas que son resistentes a los mecanismos efectores inmunológicos y/o que son capaces de influenciar la formación progresiva de ambientes inmunológicos de supresión de la respuesta inmune, lo que suprime la respuesta inmunológica contra las células malignas y favorece el desarrollo del tumor.

3.1.3 El cáncer y la inestabilidad genética

El cáncer es una enfermedad del genoma que da inicio con la acumulación de una serie de mutaciones en el material genético de las células (Aran D, et al, 2016). Diversos autores emplean un modelo clásico de carcinogénesis, el cual describe una serie de expansiones clonales sucesivas que son dirigidas por la acumulación de cambios genómicos o mutaciones, las cuales son preferencialmente seleccionadas por el microambiente del tumor (Figura 2).

Estos cambios en la biología de las células tumorales son condicionados por la reprogramación genética y epigenética (Niko Beerenwinkel, et al, 2016). La

inestabilidad genética de las células es una característica esencial para la oncogénesis y la progresión del tumor, y a menudo es acompañada por la emisión de “señales de peligro”, así como por la expresión de proteínas mutadas y ectópicas (Zitvogel et al., 2008).

Es importante mencionar que el genoma de las células tumorales es heterogéneo. Esta heterogeneidad refleja la acción de mutaciones genéticas que involucran variación, generación y selección (Yates & Campbell, 2013), mismas que son controladas por el microambiente tumoral y que pueden presentarse en forma individual o colectiva. Dicha heterogeneidad está presente en diferentes tipos de tumores, en un tipo particular de tumor e inclusive dentro de un solo tipo de cáncer; es decir, se genera diversidad genética monoclonal y policlonal en el tumor y estos cambios genéticos se transfieren a células en división y a linajes celulares diferentes. Este grado de variabilidad genómica es prueba de la naturaleza dinámica y diversa de las múltiples mutaciones que sufre el DNA.

Como ya se mencionó, el microambiente del tumor (Deberardinis, R.J, et al, 2016) tiene un papel crucial en la selección de las células mejor adaptadas a los ambientes (a menudo hostiles) en los cuales existen. Exposiciones a agentes cancerígenos, tales como fumar tabaco, exposiciones a luz ultravioleta y solventes químicos, una dieta rica en carnes procesadas, entre otras, pueden tener un importante papel en la adquisición de esta heterogeneidad del cáncer.

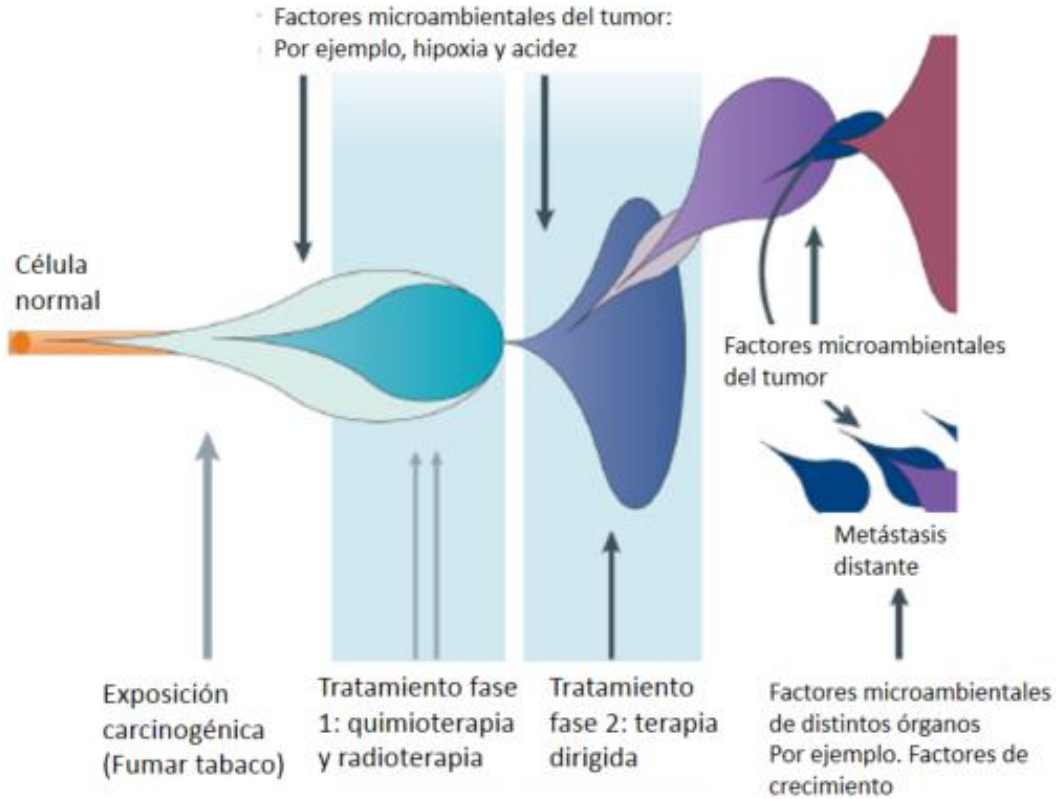


Fig 2. Un conjunto de factores ambientales puede dar pie al proceso evolucionario dentro de un único tipo de cáncer. Las burbujas azules y moradas representan las clonas cancerosas sucesivas, la expansión de éstas es alterada por factores mutagénicos directos (flechas grises) y factores no mutagénicos (flechas negras). Tomado de: Yates, *et al* 2013. Modificado por García E

Como la oncogénesis está determinada en gran medida por la acumulación de mutaciones en el genoma de las células, se debe hacer hincapié en su proceso. Una nueva mutación en un gen capaz de causar cáncer, no ocurre aisladamente, sino que depende de todo un conjunto de factores genómicos establecidos. Esta red genética puede tener un profundo efecto en el destino de la célula, determinando si hay muerte celular o expansión clonal. En algunos casos el número de mutaciones es enorme, y puede ocurrir en una escala de tiempo que es considerablemente menor que aquel en el que se lleva a cabo la selección clonal, culminando en la activación de la oncogénesis. Los efectos de tales mutaciones pueden ser en general categorizados como: habilidad reducida para detectar y/o para reparar daño al DNA, falla en los mecanismos de vigilancia inmunológica, y una susceptibilidad incrementada al daño del DNA por carcinógenos endógenos y exógenos. Se ha reconocido ampliamente

que algunos síndromes cancerígenos hereditarios, tales como xeroderma pigmentoso, Síndrome de Bloom y, cáncer colo-rectal no poliposo hereditario, entre otros, son causados por defectos en genes reparadores del DNA de la línea germinal (Yates & Campbell, 2013).

Muchas de las características clínicas más agresivas de distintos tipos de cáncer, tales como la habilidad para resistir los tratamientos, las recaídas y la capacidad de establecer metástasis, dependen de la continua generación de variación genética, lo que permite la adaptación de las células a su microambiente.

3.1.4 Inmunovigilancia

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente en 1971 tanto por Thomas como por Burnet (Burnet FM, Thomas L, 1971), con la teoría de la “vigilancia inmunológica”. Esta teoría postula que “dentro de un organismo, continuamente se están generando células malignas, pero éstas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune” (Raúl B. y Oscar P. 1995) (Figura 3).

A pesar de la inmunovigilancia, las células tumorales comúnmente presentan mecanismos de evasión a la respuesta inmune, que permiten su expansión aún en presencia de una respuesta inmune antitumoral (Ryungsa Kim, et al, 2007).

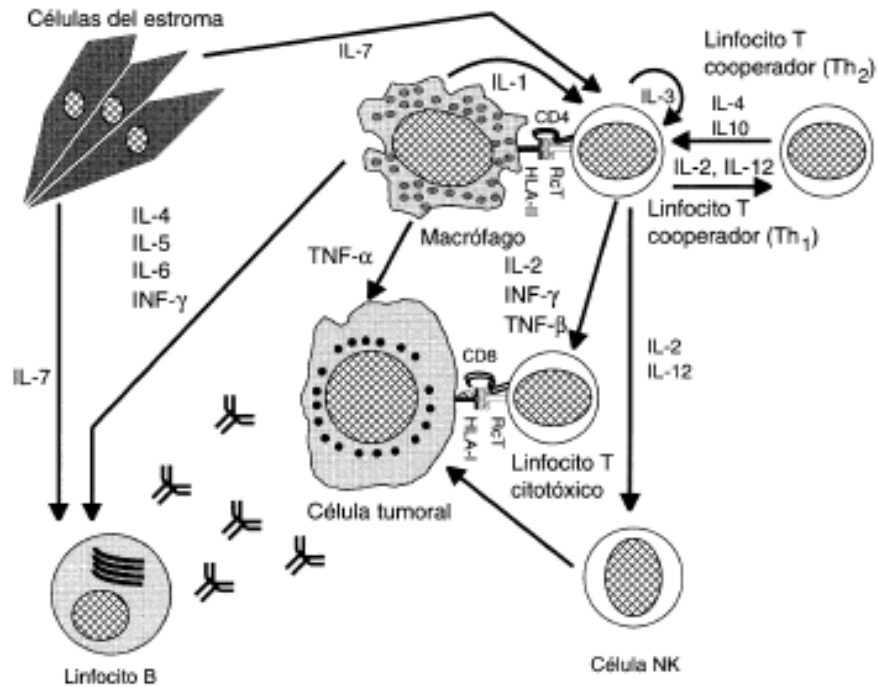


Fig 3. Respuesta inmune antitumoral. En el reconocimiento y eliminación de células tumorales participan diversas poblaciones celulares de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales y macrófagos, así como citocinas, anticuerpos y receptores, los cuales pueden tener un efecto directo sobre la célula tumoral, o bien producir una mayor activación de la respuesta inmune local por medio de interleucinas. La interacción de todos estos elementos permite que se lleve a cabo una respuesta eficiente contra el tumor. Tomado de: Raúl *et al*, 1995.

3.1.5 Evasión de la respuesta inmunológica

Como se ha venido mencionando, el sistema inmunológico juega un papel crítico en el mantenimiento del equilibrio entre el reconocimiento inmunológico y el desarrollo del tumor, con la capacidad dual de promover o de suprimir el crecimiento tumoral.

Los mecanismos que resultan en que el tumor logre evadir la respuesta inmunológica incluyen la selección de variantes del tumor resistentes a efectores inmunes (algunas veces denominados "inmunoedición"), y la formación progresiva de un ambiente inmunológico de supresión dentro del tumor (Vinay et al., 2015).

Durante la inmunoedición, el sistema inmunológico es capaz de reconocer y destruir células cancerosas vulnerables (Gajewski, T.F, et al, 2013), debido a que éstas presentan antígenos tumorales. No obstante, debido a la inestabilidad genética y la

constante división de las células tumorales, se pueden generar variantes con una inmunogenicidad reducida, contribuyendo a que puedan evadir la eliminación completa. Este estado de producción de nuevas variantes de células tumorales en balance con su eliminación, ha sido llamado fase de “equilibrio”, durante la cual las células cancerosas continúan dividiéndose y acumulando mutaciones. Así, se mantiene un balance entre el control inmunológico y el crecimiento tumoral, brindándole al tumor una apariencia de “inactividad”. Sin embargo, estos procesos eventualmente habilitan a los tumores para evadir la capacidad del sistema inmunológico de erradicarlos. Es en este estado en que el escape del tumor a la respuesta inmunológica ocurre, y se desarrolla un cáncer clínico.

3.1.6 Tumorigénesis y angiogénesis

Una vez que una o varias células malignas logran evadir la respuesta inmunológica y con ello su erradicación, éstas inician su rápida replicación y la adquisición de nuevas características funcionales que permiten su proliferación y efectiva adaptación al microambiente tumoral. Tras una serie de expansiones, lo que inició como unas cuantas células se convierte en un grupo macroscópico de millones de células malignas que conforman lo que se conoce como tumor. Un tumor se define como una protuberancia anormal compuesta de tejido.

A diferencia de un tumor maligno, un tumor benigno no tiene la capacidad de invadir tejidos, órganos u otra parte del cuerpo, sin embargo, ambos tipos están conformados por células que han perdido su funcionalidad normal.

Además de los cambios genéticos que se llevan a cabo en las células, se requiere de un paso adicional para permitir la propagación y progresión del tumor: la inducción de nueva vasculatura, lo que muchos autores reconocen como el “switch angiogénico”.

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren de un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes, así como una efectiva remoción de los productos de desecho. El acceso al sistema vascular del huésped y con ello la generación de un suministro sanguíneo adecuado, son pasos limitantes en la progresión del tumor.

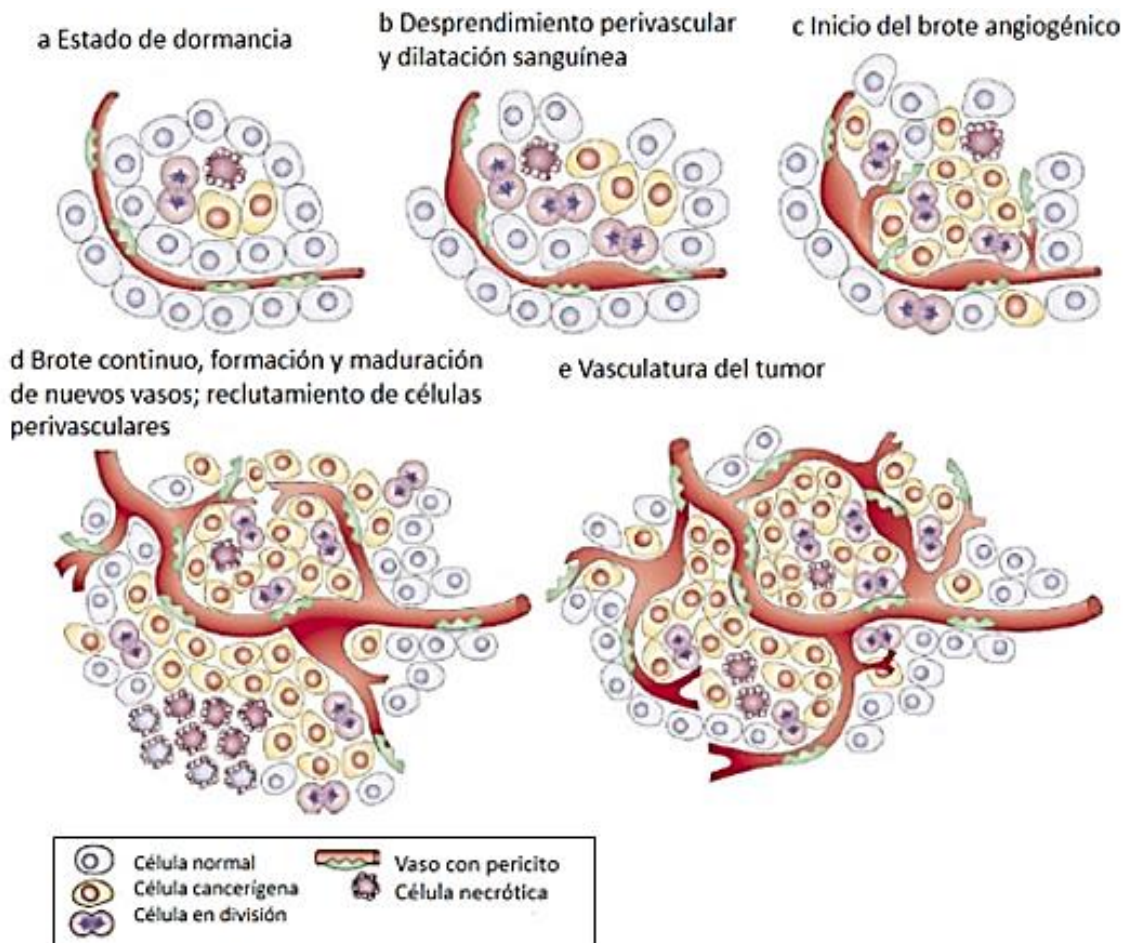


Fig 4. Switch angiogénico. (a) La mayoría de los tumores comienzan su crecimiento como nódulos avasculares (estado de dormancia). (b) Se lleva a cabo una separación perivascular y se dilatan los vasos sanguíneos. (c) Formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos y reclutamiento de células perivasculares. (d) La formación de vasos sanguíneos continúa tanto como crezca el tumor. (e) Los nuevos vasos sanguíneos alimentan las áreas necróticas y proveen al tumor de oxígeno y nutrientes esenciales. Tomado de: *Bergers, et al, 2003. Modificado por García E.*

La angiogénesis tumoral pasa por dos fases. La primera fase es definida como la fase avascular, la cual corresponde a pequeñas y ocultas masas tumorales de no más de 1-2 mm de diámetro. Estas lesiones permanecen en estado de dormancia, alcanzando un estado estacionario entre proliferación y la apoptosis. La segunda fase es la vascular, en la cual sobreviene un crecimiento exponencial del tumor (Figura 4). Algunos de los factores que estimulan el proceso de angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la angiopoyetina-1 (ANG1). Actualmente se conocen más de dos docenas de factores

inductores de la angiogénesis y un número similar de proteínas inhibitorias (Martínez-Esquerro, et al, 2006). En condiciones normales, existe un balance entre estas señales pro y anti-angiogénicas. Sin embargo, en un tumor se ha perdido este balance, aumentando la expresión de las señales pro-angiogénicas y como consecuencia se lleva a cabo un constante crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en torno al tumor. Consecuentemente, la vasculatura del tumor desarrolla características estructurales y funcionales únicas, que revelan algunas diferencias con las del sistema sanguíneo normal.

3.1.7 Invasión y metástasis

Tarde o temprano durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer, algunas células se desprenden de las masas tumorales primarias y se mueven e invaden tejidos adyacentes, a partir de los cuales viajan a diferentes sitios donde pueden tener éxito y formar nuevas colonias. Estos nuevos asentamientos de células tumorales (metástasis) son la causa del 90% de muertes por cáncer en humanos (Cavallo, De Giovanni, Nanni, Forni, & Lollini, 2011).

Varias clases de proteínas implicadas en el mantenimiento de las células dentro de un tejido están alteradas en aquellas células que poseen capacidades metastásicas. Las proteínas afectadas incluyen moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) e integrinas (Hanahan D., et al, 2011). La alteración mejor caracterizada es la pérdida de E-caderina, una molécula de interacción célula-célula, en las células transformadas. Asimismo, la colonización exitosa de nuevos sitios (locales y distantes) por las células tumorales, demanda su adaptación. Entre los cambios requeridos para una colonización exitosa, se encuentran variaciones en el espectro de las subunidades α y β de las integrinas expresadas en las células migrantes.

La siguiente característica general de las células con capacidades invasivas y metastásicas es la expresión de proteasas extracelulares. Estas proteasas que pueden degradar proteínas de la matriz extracelular están asociadas a la superficie celular por un dominio transmembranal. La activación de proteasas en la superficie celular facilita la invasión del estroma por las células cancerosas, y el cruce a través las paredes de los vasos sanguíneos y de las capas celulares epiteliales. La

activación de proteasas extracelulares y los cambios de las especificidades de unión de las caderinas, CAMs e integrinas son claramente centrales en la adquisición de invasividad y de la habilidad metastásica (Figura 5).

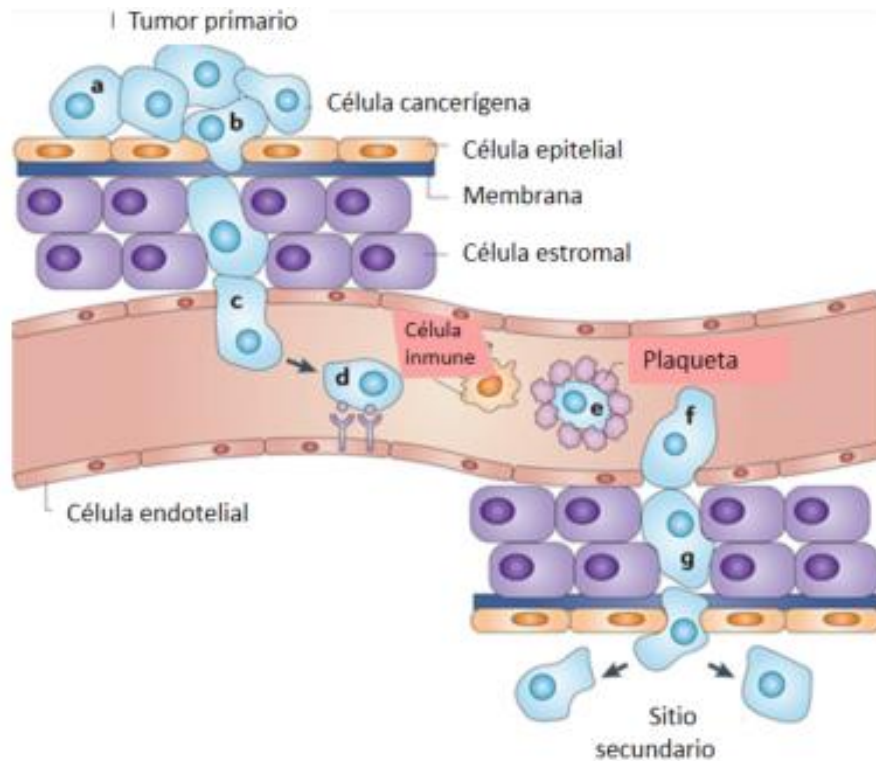


Fig 5. Los pasos de la metástasis. (a) Las células metastásicas deben ser liberadas del tumor primario y reducir la adhesión entre las células vecinas. (b) Las células crean un camino dentro del estroma. (c) La intravasación es requerida si la vasculatura es continua. La distribución de las células cancerígenas es determinada por el flujo sanguíneo. (d) Las células pueden quedar atrapadas en camas capilares estrechas y unirse a plaquetas. (e) Las plaquetas protegen a las células del ataque del sistema inmune. (f) Después de llegar al sitio secundario, las células cancerígenas pueden salir del flujo sanguíneo. (g) Las células proliferan en el sitio secundario mediante la liberación de compuestos pro-inflamatorios y la inducción vecina de factores de crecimiento. Tomado de: *Avi. Schroeder A. et al 2011. Modificado por García E.*

3.1.8 Terapia contra el cáncer basada en anticuerpos

En la actualidad, la inmunoterapia contra el cáncer basada en anticuerpos es una de las promesas y estrategias más exitosas en el tratamiento de pacientes con cáncer,

puesto que combina especificidad, alta eficiencia y seguridad, con el único inconveniente de ser altamente costosas y, por ende, de acceso limitado.

Esta terapia está basada en la interacción de anticuerpos con antígenos tumorales, los cuales se encuentran sobreexpresados en las células transformadas. Este reconocimiento antígeno-anticuerpo conlleva a la eliminación de la célula maligna por distintos mecanismos, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, complemento, etc. Además, existe lo que muchos autores reconocen como la activación de puntos de control inmunológicos mediada por anticuerpos, cuya activación inhibe funciones invasivas de las células malignas (Pardoll et al, 2012).

3.2 AMINOPEPTIDASA N (CD13, APN)

La CD13 es una enzima metaloproteasa perteneciente a la familia M1, cuya actividad catalítica depende de Zn. Está unida a la membrana plasmática por su segmento transmembranal que se encuentra muy cercano al extremo N-terminal. Escinde preferencialmente aminoácidos neutros del extremo amino terminal de proteínas y péptidos. Esta aminopeptidasa está ampliamente expresada en células de múltiples órganos y tejidos, tales como, riñón, piel, tejido fibroso, colon, estómago, ovario, pulmón, próstata, páncreas y tiroides, por mencionar algunos (Mina-Osorio, et al, 2006, Mina-Osorio P, et al, 2007). Se sabe que esta enzima se encuentra sobreexpresada en células tumorales y que media diversas características funcionales de las mismas, promoviendo la metástasis.

3.2.1 Estructura de CD13

La APN es el miembro más extensamente estudiado de la amplia familia de aminopeptidasas Zn-dependientes M1. Es una ectoenzima transmembranal que consta de un pequeño (6-8 aminoácidos) dominio citoplasmático N-terminal, un segmento transmembranal único, un pequeño tallo extracelular y un dominio C-terminal grande. La CD13 es una aminopeptidasa de gran tamaño (967 aminoácidos), lo cual ha dificultado su estudio inmunológico y molecular. Mediante la cristalización de la APN porcina (pAPN), cuya secuencia guarda alta homología con la APN

humana, se sabe que la gran porción extracelular (ectodominio) tiene forma de “caballo de mar” y que está compuesta por 4 diferentes dominios: cabeza, cuerpo, costado y cola. El sitio catalítico Zn-dependiente, está localizado en una cavidad rodeada por los dominios cabeza, costado y cuerpo (Figura 6).

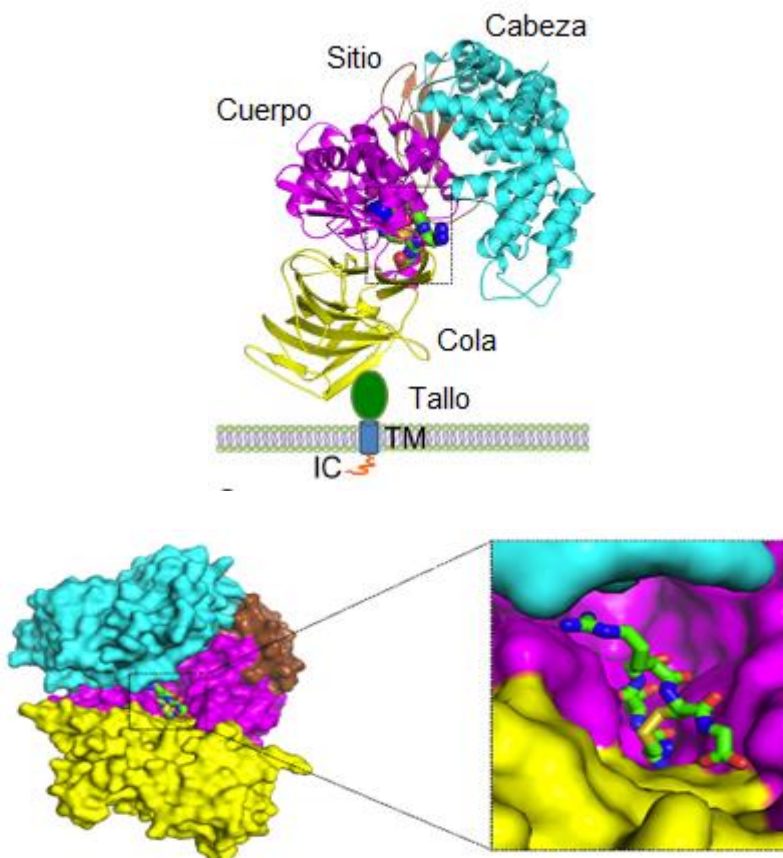


Fig. 6. Estructura cristalográfica de la APN porcina. La pAPN contiene un ectodominio, un tallo, un ancla transmembranal (TM) y una cola intracelular (IC). El ectodominio contiene cuatro dominios: cabeza (azul), costado (café), cuerpo (magenta) y cola (amarillo). El sitio activo de la enzima se muestra en el zoom del cuerpo. Las bolas azules representan el Zn, mientras que el péptido CNGRCG se muestra en bolas verdes. Tomado de: *Liu et al, 2014*.

3.2.3 La CD13 y su papel en cáncer

Durante el desarrollo del cáncer se sobreexpresan diversas enzimas hidrolíticas, tales como peptidasas, esterasas y proteasas, que promueven el fenotipo agresivo de las células tumorales. En lo concerniente a las peptidasas, la mejor estudiada es la APN o CD13, la cual se ha considerado como un marcador tumoral (Fontjin D. et al, 2006). La APN es requerida para el desarrollo y crecimiento tumoral (Piedfer M, et al, 2011),

y participa en la activación de péptidos angiogénicos (Wickström, & Larsson, 2011). La APN juega un papel importante en la migración de las células tumorales y la metástasis, ya que la expresión incrementada de ésta en la superficie de las células tumorales (Terauchi M, et al, 2007) mejora en gran medida la capacidad migratoria de las mismas, favoreciendo el proceso de metástasis. Dicha función es independiente de la actividad enzimática dependiente de Zn, no obstante, se ha comprobado que en ensayos de invasión celular se incluyen algunos inhibidores de la actividad enzimática específicos para aminopeptidasas, los cuales son empleados con la finalidad de detener el tráfico celular, el inhibidor enzimático más comúnmente empleado es la bestatina, un compuesto con propiedades inmunomoduladoras y antitumorales (Saiki I. et al, 1989, Piedfer M. et al, 2011).

El mecanismo por el que CD13 regula la migración celular aún es desconocido, sin embargo, se ha propuesto una posible teoría (Figura 7). La motilidad celular mediada por CD13 es equiparable con la quimiotaxis mediada por integrinas. Con base en este principio, se ha iniciado la búsqueda de un posible ligando de CD13 que al unirse con su receptor promueva la migración celular. Pasqualini y cols. (1995) demostraron la unión de APN al motivo peptídico Asn-Gly-Arg (NGR). Este motivo de unión puede ser un posible ligando para CD13. Se encuentra expresado en fibronectina, y motivos similares podrían estar expresados en otras proteínas de matriz extracelular (ECM), mismas que son excretadas por las células tumorales al medio extracelular. Este motivo de unión se encuentra también altamente expresado en células endoteliales de vasculatura angiogénica maligna. El empleo de la interacción entre CD13 y este motivo peptídico como posible blanco terapéutico ha sido rápidamente desarrollado y terapias basadas en inhibir esta interacción están actualmente en las fases clínicas I y II para el tratamiento contra el cáncer (Mina-Osorio, et al, 2007).

Además de la participación de CD13 en la migración celular, CD13 podría tener participación en la degradación proteolítica de la ECM, la cual es un paso esencial en el proceso de metástasis, ya que permite la invasión de las células malignas hacia otros compartimentos del organismo. Se sabe que esta última función es dependiente

de la actividad enzimática de la APN, por lo que el empleo de inhibidores de la actividad enzimática en ensayos de invasión celular es común.

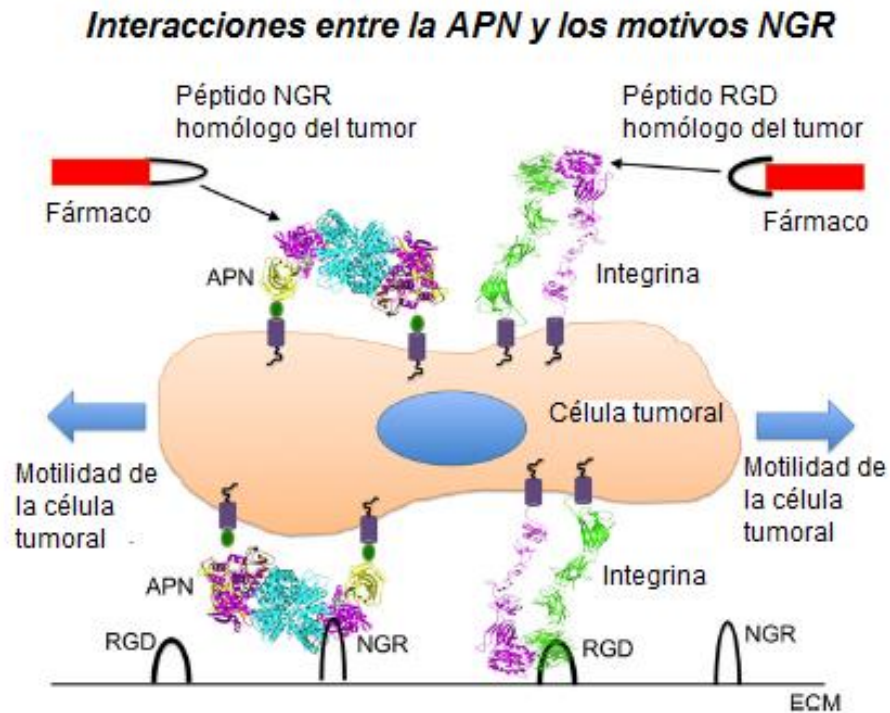


Fig. 7. Un mecanismo unificado para la motilidad de las células tumorales. La matriz extracelular se muestra como una línea negra en el fondo. Los motivos NGR y RGD presentes en la ECM son reconocidos por APN e integrinas respectivamente generando tracciones para la motilidad celular. Tomado de: *Liu et al, 2014*.

3.2.4 Una posible inmunoterapia contra el cáncer basada en CD13

Ya se ha visto que CD13 es un importante inmunorregulador en el desarrollo del cáncer favoreciendo su progresión como consecuencia de un incremento en la migración celular, así como participando en la degradación proteolítica de la ECM, que favorece la invasión de células tumorales. Diversas investigaciones han revelado que el empleo de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD13 en modelos *in vivo* e *in vitro* pueden inhibir la migración celular y la degradación de la ECM, donde sólo la segunda es dependiente de la actividad enzimática. A pesar de que CD13 es la aminopeptidasa más estudiada, se desconocen los epítopes específicos a los que se unen algunos de los anticuerpos anti-CD13 existentes hasta ahora.

Con base en esta información, es evidente que la APN o CD13 puede ser considerado como un blanco terapéutico contra el cáncer, que puede contribuir a frenar el avance de la enfermedad. No obstante, debido a que en el cáncer hay un desbalance de otros cientos de proteínas y demás puntos de control inmunológicos, el empleo de la inmunoterapia contra una sola proteína será probablemente insuficiente contra la progresión del cáncer. Sin embargo, es fundamental que los estudios sobre CD13 continúen para el desarrollo de una terapia cien por ciento funcional.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un grave problema de salud mundial que sigue cobrando miles de vidas al año y que además disminuye la calidad de vida de los pacientes. Por esto se hace necesario aportar información acerca del comportamiento del cáncer para el desarrollo de terapias efectivas contra el mismo. Sin embargo, el gran problema con el cáncer radica en que es improbable que tenga éxito una terapia dirigida hacia un solo punto de control inmunológico; es por eso que las terapias convencionales involucran un coctel de medicamentos, así como terapias sinérgicas de destrucción no selectiva de las células, que además de no ser cien por ciento efectivas, resultan ser destructivas para los pacientes. Tomando en cuenta estas problemáticas, se debe promover el desarrollo de terapias contra el cáncer que actúen sobre los puntos de control inmunológico mayormente disregulados. Estas nuevas terapias pueden incluir anticuerpos específicos que incidan en la activación de puntos de control inmunológicos, prometiéndole especificidad sin efectos secundarios.

La APN ha demostrado ser un punto de control inmunológico de gran importancia en el desarrollo y la progresión del cáncer, puesto que tiene un papel importante en la capacidad de migración e invasión de las células malignas. En el presente trabajo se plantea conocer el efecto de dos anticuerpos específicos para CD13: el mAb 452 y el mAb C, sobre la migración celular en ensayos *in vitro*, empleando líneas celulares de cáncer humano.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

CD13 es una aminopeptidasa que se sobreexpresa en la membrana de células tumorales, confiriéndoles una capacidad mejorada de migración y de invasión, promoviendo la evolución del cáncer. Los anticuerpos monoclonales específicos anti-CD13 que puedan modular o restringir estas funciones mediadas por CD13 podrían inhibir la capacidad migratoria de las células tumorales frenando o haciendo más lento el avance del cáncer.

6. HIPÓTESIS

Los anticuerpos monoclonales específicos anti-CD13: mAb 452 y mAb C; inhibirán o promoverán la migración celular *in vitro* de las líneas celulares de cáncer humano: HT1080 (células epiteliales de fibrosarcoma) y A-375 (células epiteliales de melanoma), las cuales ya han sido empleadas en ensayos para el estudio de la migración e invasión celular modulados por CD13 (Saiki I. et al, 1989, Fuji H. et al, 1995). Asimismo, el empleo de un inhibidor de la actividad enzimática de las células podría inhibir la migración celular.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los anticuerpos específicos anti-CD13 sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer humano.

7.2 Objetivos particulares

- Asegurar que no hay proliferación celular en los ensayos de cierre de herida mediante el ensayo de proliferación con bromuro de 2,5-difeniltetrazolio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) (MTT).
- Estandarizar ensayos de cierre de herida para cuantificar la migración de las células HT1080 y A-375.
- Estandarizar ensayos de migración en cámaras de Transwell para las células HT1080 y A-375, así como su cuantificación.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Líneas celulares y cultivo celular:

HT1080: Línea celular adquirida de ATCC® y donada por el Dr. Alfonso Dueñas González, investigador del Instituto Nacional de Cancerología. Esta es una línea celular de células epiteliales adherentes de tejido conectivo de humano provenientes de fibrosarcoma. Se cultivaron en medio MEM (Minimum Essential Medium) con 10% de suero fetal bovino (SFB), complementado al 5% con aminoácidos no esenciales y 5% de piruvato de sodio (todo de GIBCO-BRL Life Technologies®), así como 100 U/ml penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, y glutamina al 5% (SIGMA ALDRICH®); a una temperatura de 37°C y una atmósfera al 5% de CO₂.

A-375: Línea celular adquirida de ATCC ® y donada por el Dr. Alfonso Dueñas González, investigador del Instituto Nacional de Cancerología. Esta línea celular corresponde a células epiteliales de piel de humano adherentes provenientes de melanoma. Fueron cultivadas en medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 10% de SFB, complementado al 5% con aminoácidos no esenciales y 5% de piruvato (todo de GIBCOBRL Life Technologies®), así como 100 U/ml penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, y glutamina al 5% (SIGMA ALDRICH®); a una temperatura de 37°C y una atmósfera al 5% de CO₂.

8.2 Anticuerpos

El anticuerpo IgG usado como control inespecífico fue adquirido de Abcam®. Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD13: mAb 452 y mAb C se obtuvieron en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega bajo las siguientes especificaciones:

El hibridoma C se obtuvo por la M. en I.B.B. Claudia Garay en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, mientras que el hibridoma de la clona 452 fue donado por el Dr. Meenhard Herlyn, investigador de The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, EUA. Estos hibridomas secretan los anticuerpos monoclonales C y 452, que son específicos para CD13 humano. Ambos anticuerpos son de la subclase IgG1. Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD13 452 y C se purificaron a partir

del sobrenadante de los cultivos celulares de los respectivos hibridomas, como ha sido descrito (Valdivia, 2013).

El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (goat anti-mouse) marcado con isotiocianato de fluorescencia (FITC) fue adquirido de ZYMED Technologies ®.

8.3 Ensayo de saturación de anticuerpo (Inmunofluorescencia indirecta)

En placas de 96 pozos se añadieron 100 µl de Buffer de lavados (BL) más el anticuerpo anti-CD13 correspondiente: mAb 452 o mAb C, a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 µg/ml, además se agregó el anticuerpo IgG como control de especificidad a una concentración de 10 µg/ml. Se destinó un pozo como control negativo y otro como control para el segundo anticuerpo, además, se empleó la línea celular U-937 como control positivo. La placa quedó de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (U-937)	CTRL	2do Ab	IgG 10 µg/ml	452 0.1 µg/ml	452 1 µg/ml	452 10 µg/ml	C 0.1 µg/ml	C 1 µg/ml	C 10 µg/ml			
B (HT1080)	CTRL	2do Ab	IgG 10 µg/ml	452 0.1 µg/ml	452 1 µg/ml	452 10 µg/ml	C 0.1 µg/ml	C 1 µg/ml	C 10 µg/ml			
C (A-375)	CTRL	2do Ab	IgG 10 µg/ml	452 0.1 µg/ml	452 1 µg/ml	452 10 µg/ml	C 0.1 µg/ml	C 1 µg/ml	C 10 µg/ml			
D												
E												
F												
G												
H												

Enseguida se despegaron las células de las botellas de cultivo y se resuspendieron a una concentración de 200,000 células en 100 µl. Se lavaron con 500 µl de BL y se dejaron 5 minutos en hielo. Se resuspendieron a la misma concentración y se transfirieron 100 µl de la suspensión celular a cada pozo de la placa anteriormente preparada. Se incubó por 30 minutos con agitación ocasional. Se centrifugó la placa y se lavaron las células 2 veces con BL.

Se agregó el segundo anticuerpo (goat anti-mouse Ig) marcado con FITC a todos los pozos, excepto al control negativo. Se incubó sobre hielo y en oscuridad por 30 minutos con agitación ocasional. Se lavó con BL y solución buffer de fosfatos (PBS) y se resuspendieron las células en 200 µl de PFA frío al 1%. Se incubó la placa 20 minutos en hielo en oscuridad. Finalmente, las muestras se transfirieron a viales y se leyeron y capturaron por citometría de flujo (citómetro de flujo ATTUNE™ by Invitrogen™ con láseres azul y violeta).

8.4 Ensayo de proliferación celular

Este ensayo se realizó por 72 horas. Se destinó una placa de 96 pozos por cada 24 horas, desde el tiempo 0 hasta el tiempo 72 teniendo en total 4 placas. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo al 10% de SFB y sembradas en las placas a una concentración de 10,000 células por pozo en 100 µl de medio de cultivo, por triplicado para cada condición. Se añadió o no la Mitomicina C (SIGMA ALDRICH®) a dos concentraciones: 10 µg/ml y 25 µg/ml (Aeyung Kim, et al, 2013), se hicieron incubaciones por 2 y 4 horas, de acuerdo a la siguiente placa:

PLACA DE LAS 0 HORAS

	HT1080						A-375					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTRL MTT	CTRL MTT	CTRL MTT				CTRL MTT	CTRL MTT	CTRL MTT			
B	CTRL	CTRL	CTRL				CTRL	CTRL	CTRL			
C	MitC 10 µg/ml 2h	MitC 10 µg/ml 2h	MitC 10 µg/ml 2h				MitC 10 µg/ml 2h	MitC 10 µg/ml 2h	MitC 10 µg/ml 2h			
D	MitC 10 µg/ml 4h	MitC 10 µg/ml 4h	MitC 10 µg/ml 4h				MitC 10 µg/ml 4h	MitC 10 µg/ml 4h	MitC 10 µg/ml 4h			
E	MitC 25 µg/ml 2h	MitC 25 µg/ml 2h	MitC 25 µg/ml 2h				MitC 25 µg/ml 2h	MitC 25 µg/ml 2h	MitC 25 µg/ml 2h			
F	MitC 25 µg/ml 4h	MitC 25 µg/ml 4h	MitC 25 µg/ml 4h				MitC 25 µg/ml 4h	MitC 25 µg/ml 4h	MitC 25 µg/ml 4h			
G												
H												

Transcurrido el tiempo de incubación, se desechó el medio con Mitomicina y se añadió medio de cultivo fresco a las células de las placas correspondientes a las 24, 48 y 72h. Se dejaron en incubación normal.

A las células del tiempo 0 se les añadieron 100 µl de medio s/SFB y sin rojo de fenol (s/RF) seguido del bromuro de 2,5-difeniltetrazolio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) mejor conocido como MTT (SIGMA ALDRICH ®) en una proporción 1:10 y se incubaron por 2 horas. Además, se añadió MTT por triplicado a pozos vacíos, como control negativo de oxidación. Finalizadas las 2 horas de incubación se añadió isopropanol ácido (pH=3) para disolver el precipitado formado y se leyó la absorbancia de la placa con ayuda del lector Cytation 3™ (by BioTek Instruments Inc.) a una longitud de onda de 570 nm.

A los respectivos tiempos, se repitió el ensayo con MTT para las células de las placas incubadas por 24, 48 y 72 horas.

8.5 Ensayo de cierre de herida

En una placa de 48 pozos se sembraron células para obtener una monocapa confluyente (160,000 células por pozo) de acuerdo a la siguiente placa:

	HT1080				A-375			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	IgG CTRL	IgG 0.1 µg/ml	IgG 1 µg/ml	IgG 10 µg/ml	IgG CTRL	IgG 0.1 µg/ml	IgG 1 µg/ml	IgG 10 µg/ml
B	452 CTRL	452 0.1 µg/ml	452 1 µg/ml	452 10 µg/ml	452 CTRL	452 0.1 µg/ml	452 1 µg/ml	452 10 µg/ml
C	C CTRL	C 0.1 µg/ml	C 1 µg/ml	C 10 µg/ml	C CTRL	C 0.1 µg/ml	C 1 µg/ml	C 10 µg/ml
D	BEST CTRL DMSO 20 µg/ml	BEST 5 µg/ml	BEST 10 µg/ml	BEST 20 µg/ml	BEST CTRL DMSO 20 µg/ml	BEST 5 µg/ml	BEST 10 µg/ml	BEST 20 µg/ml
E	CONTROLES DE PROLIFERACIÓN							
F	IgG 10 µg/ml	452 10 µg/ml	C 10 µg/ml	BEST 20 µg/ml	IgG 10 µg/ml	452 10 µg/ml	C 10 µg/ml	BEST 20 µg/ml

Las células se incubaron en medio con mitomicina C a 10 µg/ml por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se cambió el medio y se dejó la placa en incubación hasta el día siguiente.

Se realizó la herida en la monocapa con ayuda de una punta de micropipeta. Se lavó la monocapa con PBS y se añadió medio con 10% de SFB. Enseguida se añadieron o no los anticuerpos IgG, mAb 452 y mAb C a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 µg/ml. Se añadió además bestatina (Santa Cruz Biotechnology) a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml, mientras que el control contenía (dimetil sulfóxido) DMSO a 20 µg/ml (Saiki I. et al, 1989, Van Hensbergen, et al, 2003).

Inmediatamente después de añadir los estímulos se tomaron las fotografías correspondientes al tiempo 0, seguidas de las fotografías tomadas después de 6 y 24 horas de incubación. Las fotografías se analizaron con el programa *ImageJ*. Las fotografías de las heridas se muestran en el apéndice

8.6 Ensayo de migración en cámaras de Transwell

8.6.1 Migración inducida por CD13

Se añadió un volumen de 235 µl de medio s/SFB a los pozos y un volumen de 75 µl de medio s/SFB a los insertos (estos volúmenes se respetarán siempre para los pozos y los insertos de las placas de Transwell) y se incubó la placa por 30 minutos para su equilibrio (Riedl J. 2010, Sciences C.L, Soltaninassab S.R et al, 2008). Durante este periodo de incubación se cosecharon las células y se resuspendieron en medio con 0.1% de albumina de suero bovino (BSA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) a una concentración de 200,000 células en 75 µl.

Se retiró la placa de la incubadora después de 30 minutos y se desechó el medio de equilibrio. En el pozo del control negativo se añadió medio sin SFB, mientras que para los controles positivos se añadió medio con 10 o con 20% de SFB. Además, se añadió medio con 20% de SFB en tres pozos para el estímulo de bestatina. Finalmente, para las células HT1080 se añadieron en los pozos los anticuerpos IgG, mAb 452 y mAb C a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 µg/ml, mientras que para las células A-375 las concentraciones de los anticuerpos fueron de 0.02, 0.1, 0.5 y 1.0

µg/ml en medio con 0.1% BSA. Una vez preparados todos los pozos se transfirieron los 75 µl de la suspensión celular (200,000 células) a los insertos. Se añadió la bestatina en los insertos correspondientes a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml. Se incubó la placa 8 horas.

Al término de la incubación, se centrifugó la placa a 300 Gs 3 minutos. Se recolectó el medio de los pozos en viales y se centrifugaron para resuspenderlos posteriormente en PBS (20 µl para las células HT1080 y 50 µl para las células A-375). Diez µl de estas suspensiones se colocaron en cámara de Neubauer para determinar el número de células que migraron, contando 5 cuadrantes por duplicado. Los resultados se normalizaron dividiendo el número obtenido de las células que migraron con el estímulo entre el número de células que migraron en el control negativo.

8.6.2 Modulación de la migración por CD13

Se añadió un volumen de 235 µl de medio s/SFB a los pozos y un volumen de 75 µl de medio s/SFB a los insertos (estos volúmenes se respetarán siempre para los pozos y los insertos) y se incubó la placa por 30 minutos para su equilibrio. Durante este periodo de incubación se cosecharon las células y se resuspendieron en medio con 0.1% de BSA a una densidad de 200,000 células en 75 µl.

a.) células HT1080: Se sacó la placa de incubación y se desechó el medio de equilibrio. En el pozo del control negativo se añadió medio sin SFB mientras que para el control positivo y los pozos de los estímulos se añadió medio con 20% de SFB. Enseguida se transfirieron 75 µl de la suspensión celular a los insertos. Se añadieron en los insertos los anticuerpos IgG, 452 y C a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 µg/ml, así como la bestatina a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml. Se incubó la placa por 8 horas.

Tras la incubación, se centrifugó la placa a 300 Gs 3 minutos. Se recolectó el medio de los pozos en viales y se centrifugaron para posteriormente resuspender las células en 20 µl de PBS. Se contaron 5 cuadrantes en la cámara de Neubauer por duplicado para obtener el número de células que migraron.

b.) células A-375: Se sacó la placa de incubación y se desechó el medio de equilibrio. En el pozo del control negativo se añadió medio sin SFB mientras que para el control positivo y los pozos de los estímulos se añadió medio con 10% de SFB. Enseguida se transfirieron 75 µl de la suspensión celular (200,000 células) a los insertos. Se añadieron los mismos anticuerpos IgG, 452 y C, a las concentraciones de 0.02, 0.1, 0.5 y 1.0 µg/ml, así como la bestatina a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml. Se incubó la placa por 8 horas.

Tras la incubación, se centrifugó la placa a 300 Gs por 3 minutos. Se recolectó el medio de los pozos en viales y se centrifugaron para posteriormente resuspender las células en 50 µl de PBS. Se contaron 5 cuadrantes en la cámara de Neubauer por duplicado para obtener el número de células que migraron.

9. RESULTADOS

9.1 Ensayo de saturación de anticuerpo

El ensayo de saturación de anticuerpo (Figura 8) se llevó a cabo con dos finalidades; la primera fue conocer el nivel de expresión de CD13 en las líneas celulares HT1080 y A-375 y, en segundo lugar, determinar las concentraciones de los anticuerpos 452 y C que se usarían en los ensayos funcionales posteriores.

Este ensayo se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los anticuerpos específicos anti-CD13 mAb 452 y mAb C se emplearon a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 µg/ml para las tres líneas celulares (U937, HT-1080 y A-375). Asimismo, se añadió aparte como control de especificidad un anticuerpo no relevante, de clase IgG, a 10 µg/ml, así como el primer control negativo con sólo células y el segundo control sólo con el anticuerpo goat anti-mouse Ig-FITC más las células. Finalmente, el ensayo fue evaluado por citometría de flujo obteniendo los resultados presentados en la Figura 8.

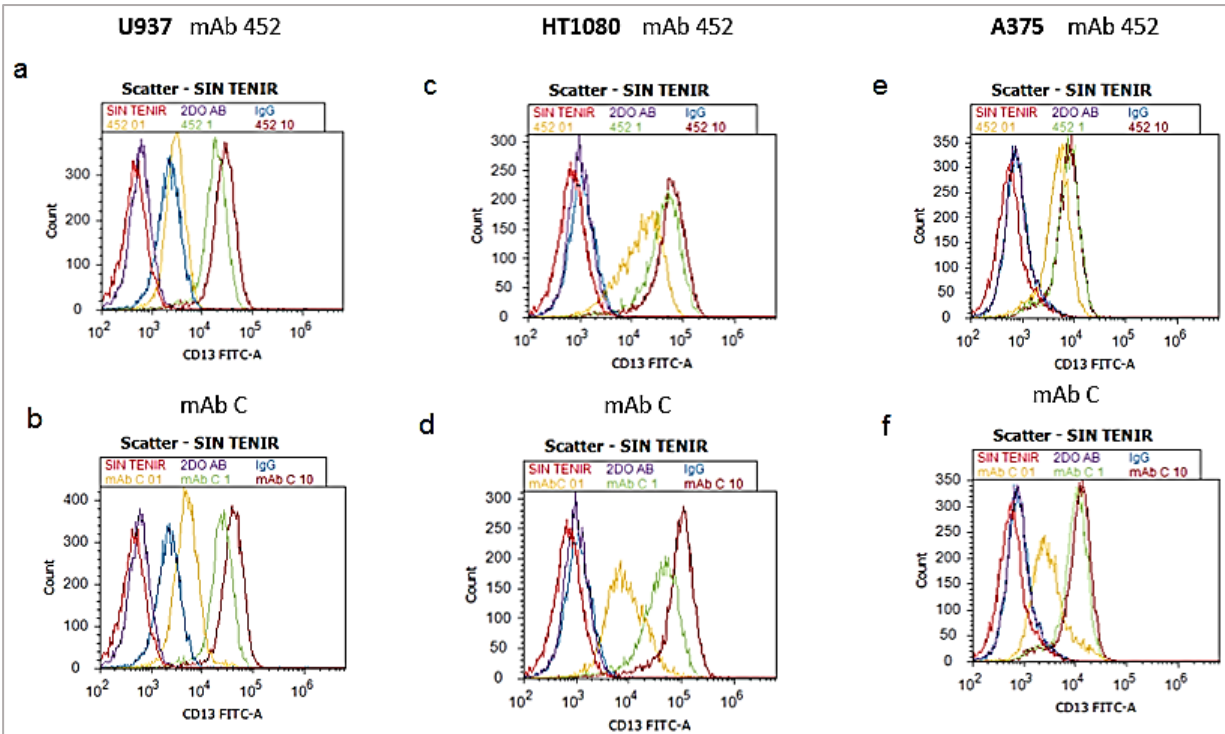


Fig. 8. Histogramas del ensayo de saturación de anticuerpo. (a) Expresión de CD13 con el anticuerpo 452 en la línea celular U-937, la cual fungió como control positivo de expresión. (b) Expresión de CD13 con el anticuerpo C en la línea celular U-937. (c) Expresión de CD13 en la línea celular HT1080 empleando el anticuerpo 452, (d) así como el anticuerpo C. (e) Expresión de CD13 en la línea celular A-375 empleando el anticuerpo 452. (f) Expresión de CD13 con el anticuerpo C en la línea celular A-375.

9.2 Ensayo de proliferación celular

Para llevar a cabo los ensayos de cierre de herida, fue necesario primero asegurar que las células detuvieran su replicación durante el periodo del experimento, con el propósito de poder asociar el cierre de la herida únicamente a la actividad migratoria de las células y no como consecuencia de un aumento en el número de células. Por esta razón, se realizó un ensayo de proliferación celular empleando Mitomicina C, un inhibidor de la síntesis de DNA. La mitomicina se empleó a dos concentraciones diferentes: 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se incubaron con estas concentraciones de mitomicina por dos y cuatro horas para inducir óptimamente la detención de la división celular. Después del tratamiento con el fármaco, se evaluó el efecto sobre la densidad celular a las 24, 48 y 72 horas empleando MTT, el cual al ser oxidado por las células produce un compuesto colorido que se puede cuantificar

espectrofotométricamente. La lectura de la absorbancia del MTT oxidado indicará si aumentó el número de células, lo que indicará si la mitomicina C detuvo la replicación celular. Las lecturas de las absorbancias obtenidas se presentan en las Tablas 1 y 2.

Tablas 1 y 2. Absorbancias medidas a 570 nm de los precipitados obtenidos por la oxidación del MTT por las células HT1080 y A-375 en el ensayo de proliferación celular con cada una de las placas correspondientes a las 0, 24, 48 y 72 horas con y sin los tratamientos con Mitomicina C a 10 y 25 µg/ml por 2 y 4 horas.

1)

HT1080	0 h	24 h	48 h	72 h
CONTROL	0.252	0.276	0.490	0.554
MitC 10 µg/ml 2 h	0.187	0.252	0.239	0.236
MitC 10 µg/ml 4 h	0.199	0.229	0.238	0.234
MitC 25 µg/ml 2 h	0.198	0.220	0.163	0.218
MitC 25 µg/ml 4 h	0.180	0.210	0.136	0.193

2)

A-375	0 h	24 h	48 h	72 h
CONTROL	0.203	0.268	0.430	0.555
MitC 10 µg/ml 2 h	0.203	0.259	0.311	0.320
MitC 10 µg/ml 4 h	0.164	0.264	0.311	0.314
MitC 25 µg/ml 2 h	0.212	0.256	0.196	0.255
MitC 25 µg/ml 4 h	0.165	0.224	0.175	0.189

9.3 Ensayo de cierre de herida

Una vez obtenida la concentración óptima de mitomicina C para detener la proliferación de las líneas celulares, se realizaron los ensayos de cierre de herida con la línea celular de fibrosarcoma HT1080 (Figura 9) y con células de melanoma A-375 (Figura 10). El cierre de la herida se monitoreó después de seis y 24 horas, siempre en presencia de los anticuerpos anti-CD13 (mAb 452 y mAb C), mismos que se emplearon a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Además, de acuerdo con la metodología, se emplearon también el anticuerpo de control de especificidad (IgG no relevante) a las mismas concentraciones y la bestatina a 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$.

Se cuantificó el área del cierre de herida de ambas líneas celulares a cada tiempo de incubación con el programa *ImageJ* estableciendo las unidades de medida a 1 pixel/mm. Los valores numéricos de las áreas obtenidas se transformaron a valores porcentuales tomando como un 100% de área abierta de las heridas al tiempo cero y relacionando las áreas de los tiempos 6 y 24 horas con respecto al primer tiempo. Finalmente se graficaron estos datos.

Las gráficas correspondientes a la línea celular HT1080 (Figura 9 a, b, c) señalan que no hubo efecto con ninguno de los anticuerpos a ninguna de las tres concentraciones empleadas, comparando siempre contra las células sin estímulo o control en cada tiempo. A diferencia de los anticuerpos, la bestatina si logró ejercer un efecto en el ensayo de cierre de la herida a las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9 d), provocando que ésta cerrara en mayor proporción a las 6 horas de haberla realizado, siendo mayor el efecto a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

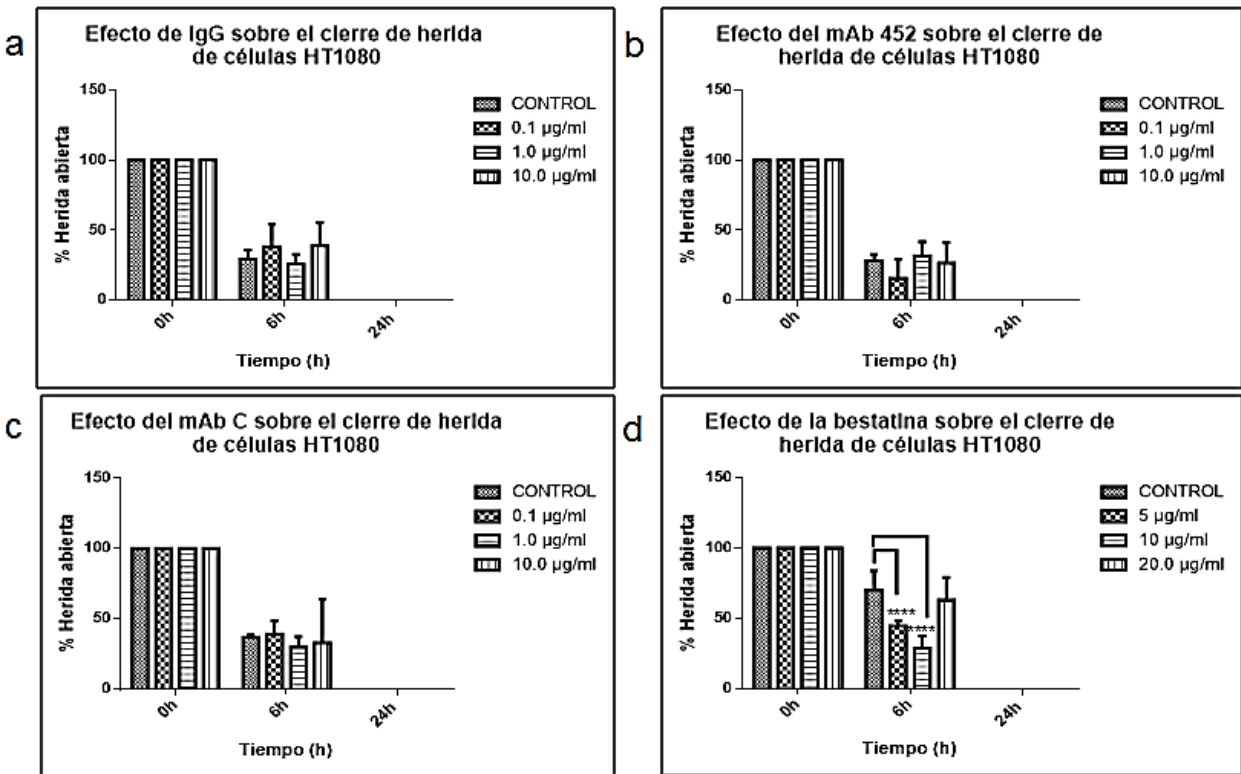


Fig 9. Gráficas del ensayo de cierre de herida con la línea celular HT1080. Porcentaje de herida abierta contra tiempo con y sin los anticuerpos IgG (a), mAb 452 (b) y mAb C (c) a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml medidas a las 0, 6 y 24 horas. No se presentó ningún efecto con ninguno de los anticuerpos. (d) Gráfica del cierre de herida con y sin bestatina a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml a las 0, 6 y 24 horas. Se observa un efecto a las 6 horas de haber realizado la herida a los 5 y 10 µg/ml de concentración contra el control. Se realizó una Anova de dos vías y prueba de Dunnet (n=4). **** p < 0.0001

Los ensayos de cierre de herida empleando las células A-375 (Figura 10 a, b, c) tampoco muestran efecto de ninguno de los anticuerpos, y también presentó un efecto la presencia de bestatina (Figura 10 d), aumentando el cierre de la herida a la concentración de 5 µg/ml a las 24 horas.

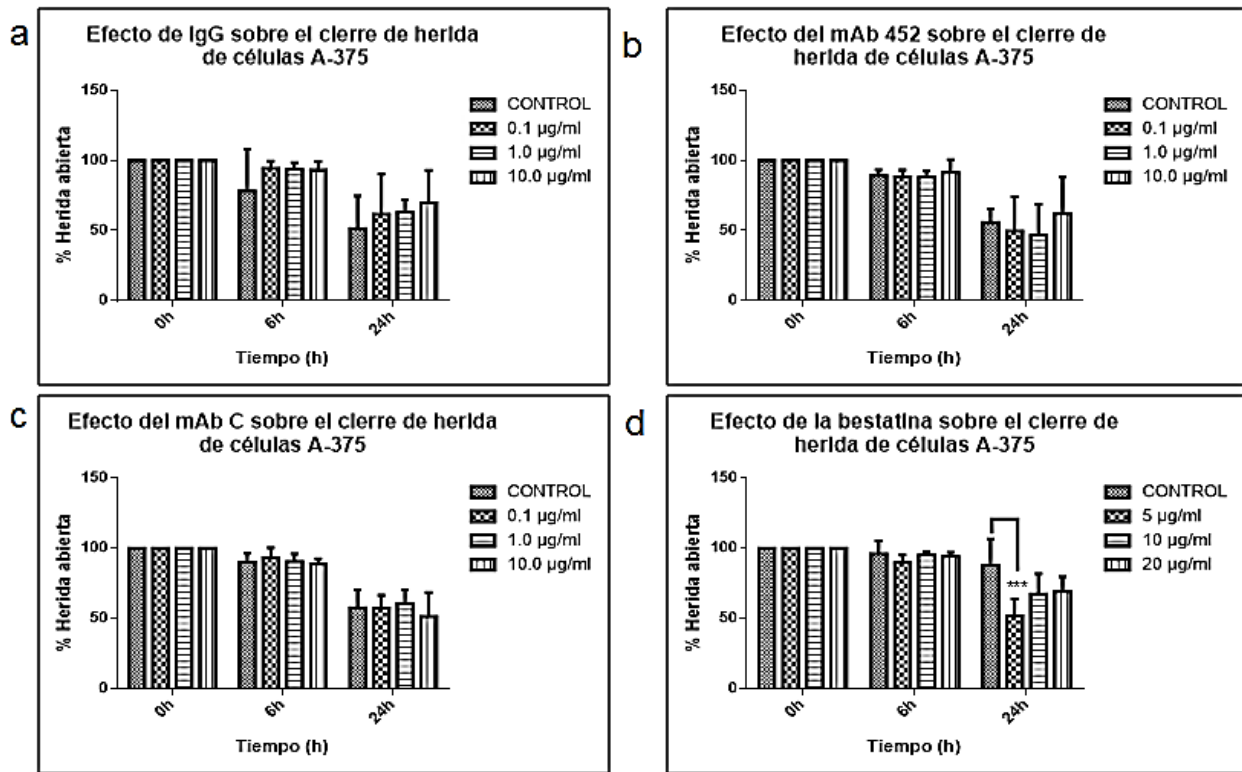


Fig 10. Gráficas del ensayo de cierre de herida con la línea celular A-375. Porcentaje de herida abierta contra tiempo con y sin los anticuerpos IgG (a), mAb 452 (b) y mAb C (c) a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml medidas a las 0, 6 y 24h. Las gráficas no muestran ningún efecto con ninguno de los anticuerpos. (d) Gráfica del cierre de herida con y sin bestatina a las concentraciones 5, 10 y 20 µg/ml a las 0, 6 y 24h, presentándose un efecto a las 24 horas a la concentración de 5 µg/ml. Se realizó una Anova de dos vías y prueba de Dunnet (n=4). *** p < 0.001

Además de los ensayos de cierre de herida empleando los anticuerpos anti-CD13 y la bestatina, se hicieron ensayos para observar el cierre de herida en células sin el tratamiento con mitomicina C, para comprobar si la replicación celular realmente afectaba el cierre de herida como se esperaba (Figura 11). Estos ensayos se realizaron únicamente con fines demostrativos. Los resultados obtenidos con estos controles de proliferación en las dos líneas celulares (Figura 11 a y b) nos revelan un comportamiento similar a los resultados de los ensayos de cierre de herida efectuados con células tratadas previamente con mitomicina C.

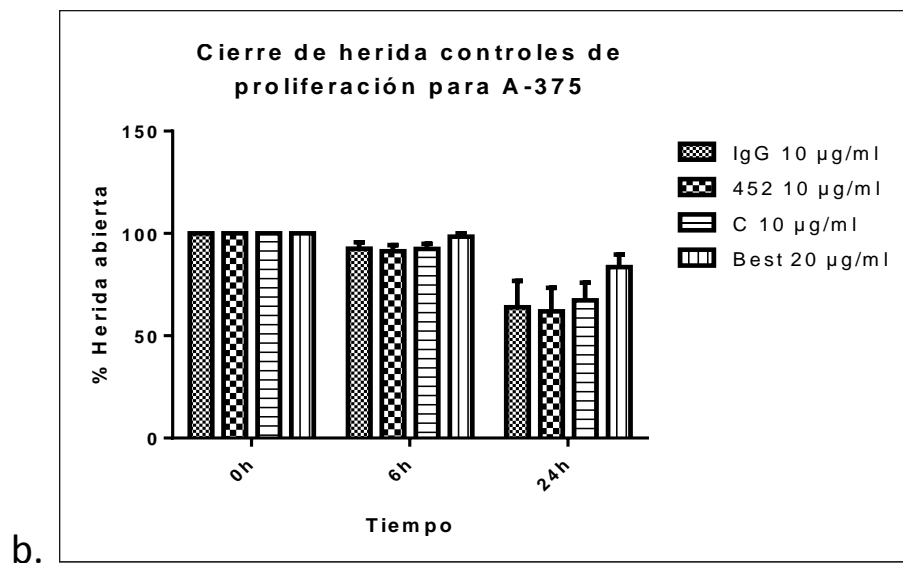
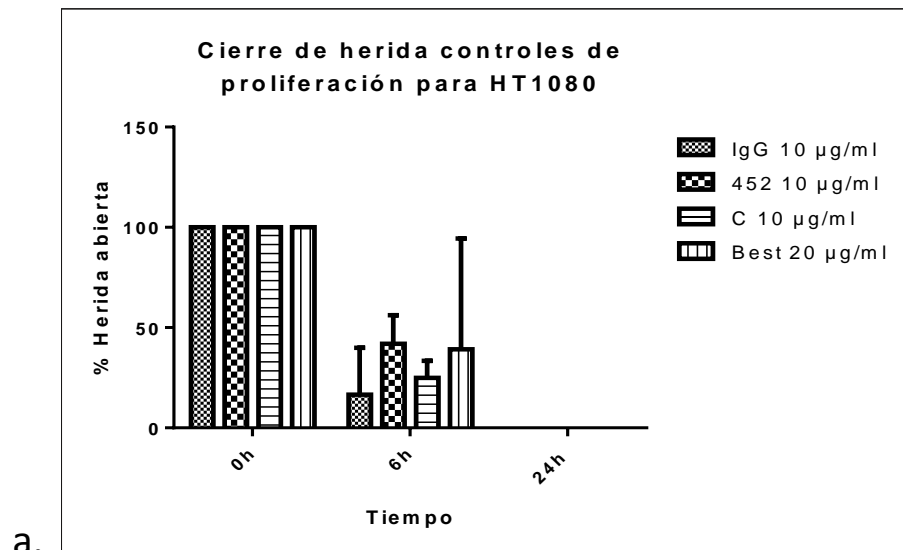


Fig 11. Gráficas del ensayo de cierre de herida para las líneas celulares HT1080(a) y A-375 (b). En estos ensayos se realizó el cierre de herida con células que no recibieron el tratamiento con Mitomicina C para detener su proliferación, además se emplearon las máximas concentraciones de anticuerpos, ya que estos experimentos solo se hicieron con fines demostrativos.

9.4 Ensayos de migración en cámaras de Transwell

También se estudió el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 sobre la migración celular en cámaras de Transwell. Estos ensayos se dividieron en dos partes, estudiando en la primera la migración inducida por entrecruzamiento de CD13 con los anticuerpos, y en la segunda si el entrecruzamiento de CD13 modula la migración de las células ante otro estímulo.

9.4.1 Migración inducida por CD13

En los ensayos correspondientes a la inducción de la migración por CD13 para ambas líneas celulares, se buscó determinar si los anticuerpos proveen un estímulo que provoque la migración de las células, por lo que se usó medio sin SFB en los ensayos, recordando que el SFB se usó como el control positivo por su efectiva promoción de la migración celular, mientras que el control negativo fue medio sin SFB. Primeramente, para la línea celular HT1080 (Figura 11) se emplearon los anticuerpos anti-CD13 y el anticuerpo de especificidad IgG a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml, así como la bestatina a 5, 10 y 20 µg/ml. Sin embargo, como la bestatina se ensayó como modulador de la migración celular, en estos pozos las células tuvieron como estímulo migratorio medio con SFB.

La migración celular se monitoreó por ocho horas. Al término de este lapso, las células que migraron se recuperaron y se cuantificaron por conteo en cámara de Neubauer. Además, se contaron dos volúmenes iguales de cada muestra y se obtuvo el promedio de ambas. Una vez obtenidos los resultados se calculó el índice de migración celular dividiendo el número de células que migraron en presencia del estímulo entre el número de células que migraron en el control negativo, de la siguiente forma:

$$\text{Índice de migración} = \frac{\text{No. de células que migraron con el estímulo}}{\text{No. de células que migraron en el control negativo}}$$

Este índice de migración delimita un punto de referencia a partir del cual podemos indicar si hubo o no migración, considerando la migración basal que hubo con las células en el control negativo, es decir, sin ningún tipo de estímulo. Los resultados revelan que únicamente el anticuerpo IgG ejerció un efecto significativo a 10 µg/ml y

que éste es bajo (Figura 12 a), mientras que la gráfica correspondiente a la bestatina (Figura 12 d) revela un efecto a las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ y un efecto menor a 20 $\mu\text{g/ml}$, Por otra parte, la bestatina ejerció efectos significativos a las tres concentraciones empleadas.

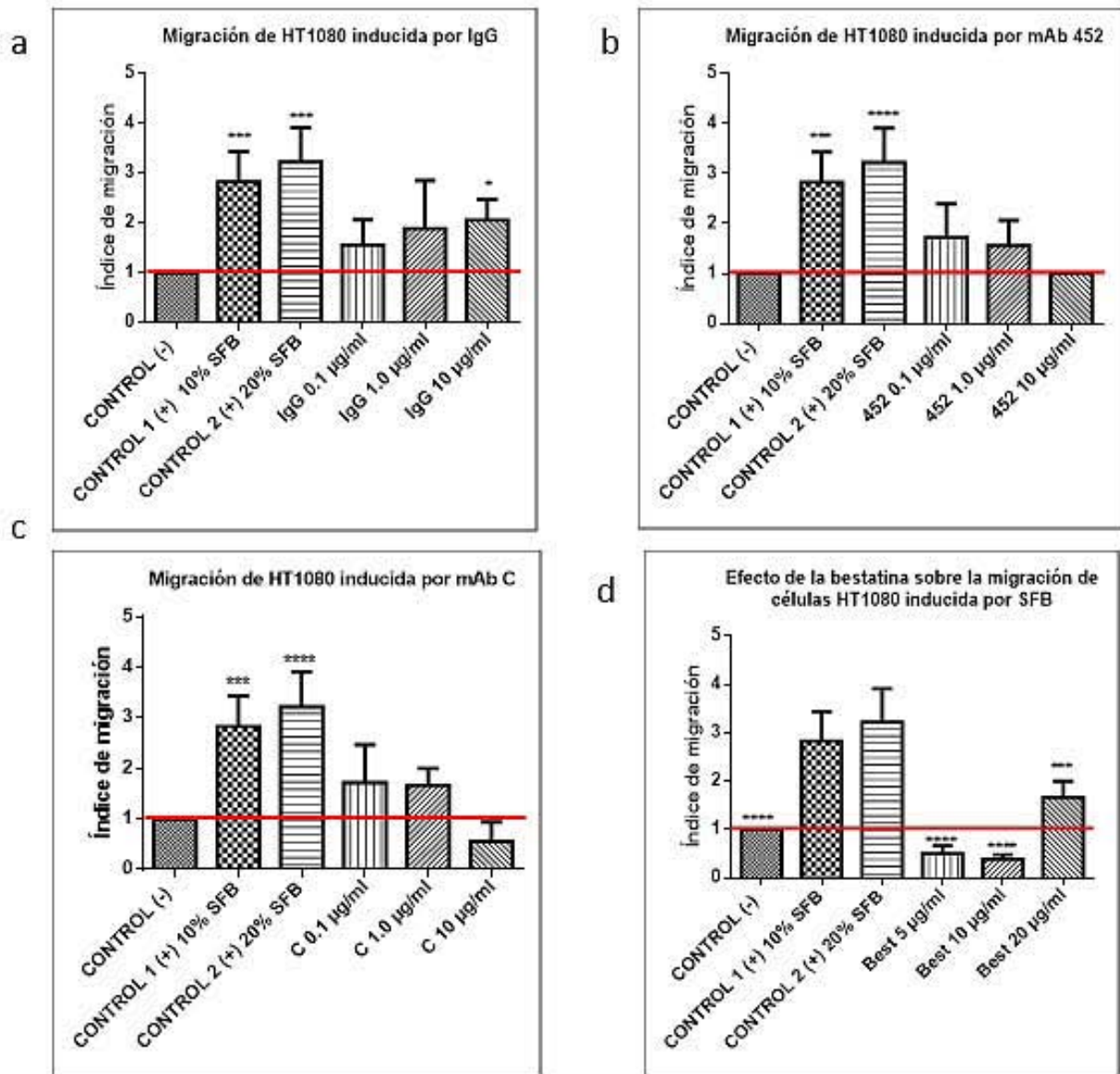


Fig. 12 Gráficas de los ensayos de inducción de la migración de células de la línea HT1080 por IgG o por anticuerpos anti- CD13. (a) El anticuerpo IgG presenta un efecto a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ contra el control negativo. Los anticuerpos 452 (b) y C (c) no presentaron ningún efecto a ninguna de las concentraciones. (d) La bestatina por el contrario presenta un efecto a las tres concentraciones manejadas contra el control positivo 2,

obteniendo el mayor efecto a las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Análisis estadístico: Anova de una vía y una prueba de Dunnet ($n=3$). * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$

Se hace referencia aparte a los ensayos de inducción de la migración celular por CD13 con la línea celular A-375 (Figura 12), ya que las concentraciones empleadas de todos los anticuerpos fueron diferentes de aquellas empleadas para la línea celular HT1080, siendo éstas de 0.02, 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, las concentraciones usadas para la bestatina se mantuvieron sin modificaciones, al igual que la metodología y el tratamiento de los resultados.

Los resultados revelan que todos los anticuerpos tuvieron un efecto positivo en la inducción de la migración (Figura 13), tanto el anticuerpo control IgG como los anticuerpos 452 y C, en donde el anticuerpo IgG (Fig. 13a) mostró un efecto significativo a las concentraciones de 0.02, 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, y un menor efecto a 0.5 $\mu\text{g/ml}$, comparado con el control negativo. Estos efectos son muy similares a los que indujo el anticuerpo 452 (Figura 13b), se observan efectos significativos a las cuatro concentraciones empleadas, mientras que con el anticuerpo C (Figura 13c) solo a dos concentraciones se observaron efectos significativos. La bestatina sólo presentó efecto significativo a la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

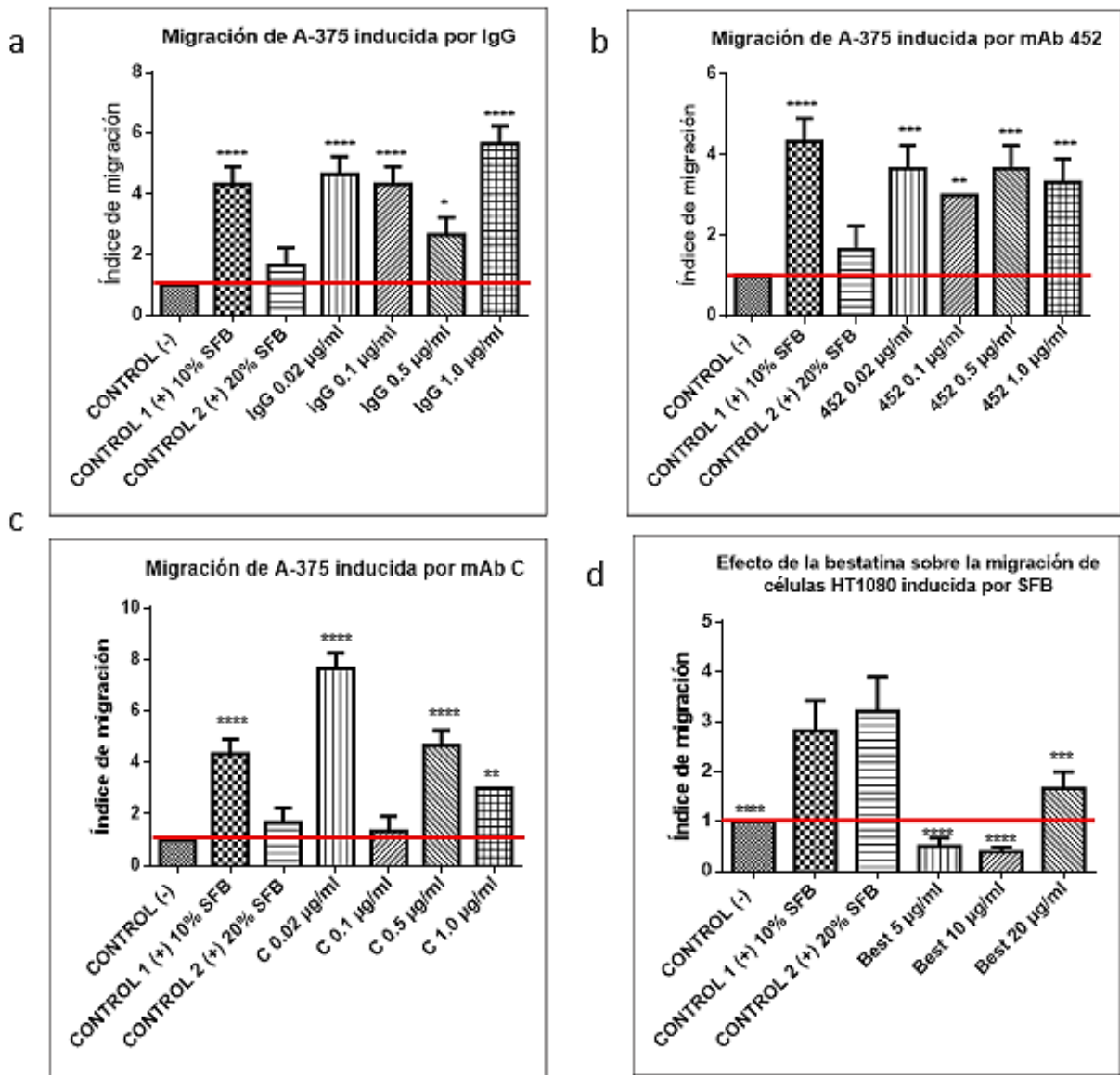


Fig. 13. Gráficas de los ensayos de inducción de la migración por anticuerpos anti-CD13 para la línea celular A-375. Se añadieron o no los anticuerpos IgG (a) y 452 (b) a las concentraciones de 0.02, 0.1, 0.5 y 1 µg/ml, presentándose un efecto contra el control negativo en todas las concentraciones para cada uno de los mismos. (c) Asimismo, se añadió o no el anticuerpo C, el cual mostró un efecto en todas las concentraciones, excepto a 0.1 µg/ml comparando contra el control negativo. (d) La bestatina se añadió a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml, presentando un efecto significativo a la concentración mayor contra el control 2 (+). *Ánálisis estadístico: Anova de una vía más prueba de Dunnet (n=3). *p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001*

9.4.2 Modulación de la migración por CD13

Como se refirió anteriormente, la segunda parte de los ensayos de migración en cámaras de Transwell consistió en estudiar si el entrecruzamiento de CD13 modula la migración de las células HT1080 y A375. La Figura 13 muestra los resultados de los ensayos con la línea HT1080. Como factor quimioatrayente se empleó SFB en la cámara inferior, mientras que las células en contacto con el anticuerpo respectivo se colocaron en el pozo superior, a fin de evaluar si los anticuerpos modulan la migración de las células. En estos ensayos, los anticuerpos se emplearon con el mismo propósito que la bestatina, por lo que la metodología empleada fue la misma tanto para la bestatina como los anticuerpos. Como en los ensayos de inducción de la migración, en estos se realizó el mismo tratamiento de resultados, obteniendo el índice de migración de la misma forma, según se refirió anteriormente (Punto 8.4.1).

De acuerdo con las gráficas correspondientes a la línea celular HT1080 (Figura 14), se observa que se obtuvieron efectos significativos de todos los anticuerpos empleados a cada una de las concentraciones. La gráfica correspondiente a la bestatina muestra que ésta tuvo efectos significativos a las tres concentraciones empleadas en forma directamente proporcional a la concentración.

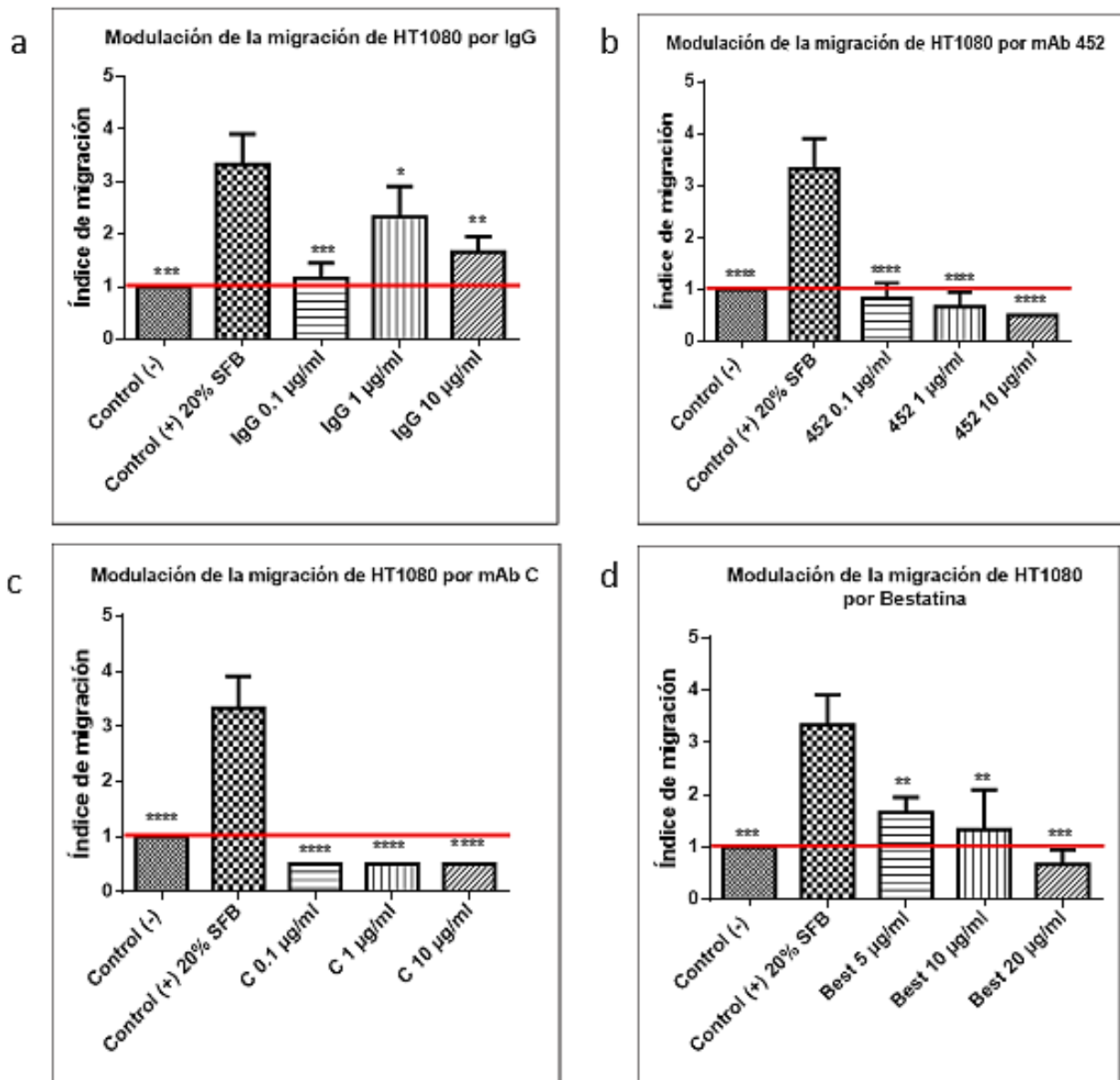


Fig. 14. Ensayos de modulación de la migración por CD13 para la línea celular HT1080. Se añadieron o no los anticuerpos IgG (a), 452 (b) y C (c) a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml presentándose un efecto a las tres concentraciones, comparadas contra el control (+). (d) La bestatina se añadió a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml. La gráfica muestra un efecto en forma directamente proporcional a las concentraciones contra el control (+). Análisis estadístico de una vía y una prueba de Dunnet (n=3). *p < 0.05 ** p < 0.01 ***p < 0.001 **** p < 0.0001

En los ensayos con la línea celular A-375 (Figura 14) se empleó la misma metodología, aunque las concentraciones empleadas de los anticuerpos fueron de 0.02, 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos muestran efectos significativos con todos los anticuerpos empleados, aunque con el anticuerpo 452 solo se obtuvo un efecto a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15 b). En contraste, la bestatina registró efectos significativos a las tres concentraciones empleadas (Figura 15 d).

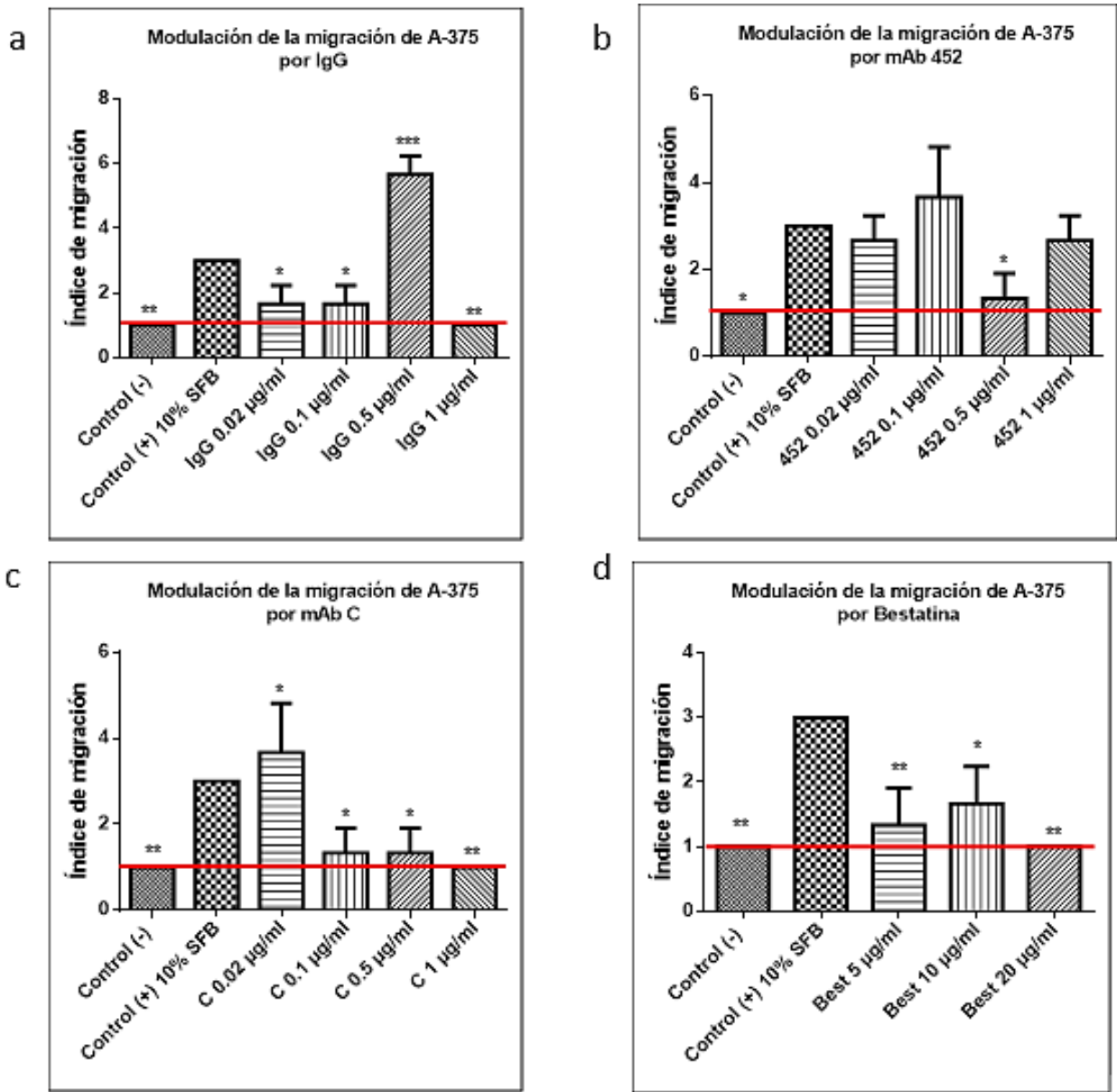


Fig. 15 Gráficas de los ensayos de modulación de la migración de la línea celular A-375 por anticuerpos anti-CD13 y por bestatina. (a) Se añadió o no el anticuerpo IgG a las concentraciones de 0.02, 0.1, 0.5 y 1 µg/ml observándose un efecto contra el control positivo a todas las concentraciones. (b) Se añadió o no el anticuerpo 452 a las mismas concentraciones. La gráfica muestra que únicamente se presentó un efecto a la concentración de 0.5 µg/ml comparando contra el control positivo. (c) Asimismo, se añadió el anticuerpo C presentándose un efecto a las tres concentraciones comparadas contra el control (+). (d) La bestatina se añadió o no a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/ml, encontrándose un efecto a todas las concentraciones contra el control (+). Los análisis estadísticos se realizaron mediante un Anova de una vía y una prueba de Dunnet (n=3) *p < 0.05 ** p < 0.01 ***p < 0.001

10. DISCUSIÓN

El principal objetivo del presente trabajo, fue el estudio del papel de CD13 en la migración celular de líneas celulares de cáncer humanas. Existen reportes con evidencias que comprueban que la sobreexpresión de CD13 influye de manera positiva para acelerar la migración celular aumentando la capacidad invasiva de las células de cáncer (Wickström & Larsson, 2011)(Liu & Yang, 2014). Por tanto, era de interés determinar si los anticuerpos anti-CD13 con que contamos en el laboratorio, son capaces promover o modular la actividad migratoria de las células. Para ello, se trabajó con dos líneas celulares de cáncer; la HT1080 y la A-375, las cuales cuentan con estudios de migración e invasión celular basados en CD13 (Saiki I. et al, 1989, Fuji H. et al, 1995).

Sin embargo, para llegar a los ensayos de migración celular era necesario primero comprobar la expresión de CD13 en la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humanas que se emplearon. Estos ensayos comprobaron que como se esperaba, ambas líneas celulares expresan CD13 en su membrana, siendo mayor la expresión en las células HT1080 y menor en las A-375 (Fig. 8). De acuerdo con los histogramas correspondientes a la línea celular HT1080 (Fig. 8 c y d), se observa que el empleo de una concentración de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos específicos anti-CD13 (anticuerpo 452 y anticuerpo C) es suficiente para alcanzar la fluorescencia máxima, que es la misma que se obtiene al emplear la concentración máxima de anticuerpo utilizada (10 $\mu\text{g/ml}$). Este resultado indica que los receptores CD13 membranales de las células HT1080 se saturan a una concentración alrededor de 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que al ser los anticuerpos bivalentes y por tanto capaces de entrecruzar a CD13, la máxima unión del anticuerpo no necesariamente coincide con el máximo nivel de entrecruzamiento (esto es, el máximo nivel de dimerización), que en muchos casos es lo que genera la señal activadora de algunos receptores.

A diferencia de las células HT1080, las células A-375 presentan el nivel máximo de unión de los anticuerpos 452 y C, a una concentración alrededor de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ según lo indica la fluorescencia de los histogramas obtenidos (Fig. 8 e y f). Esto sugiere fuertemente que el número de receptores CD13 es mucho menor en la membrana de

las células de melanoma A-375 que en las de fibrosarcoma HT1080. Dado que la sobreexpresión de CD13 se ha asociado a mayor capacidad migratoria, se esperaba que las células HT-1080 tuvieran una mayor capacidad migratoria que las A-375.

Una vez comprobada la expresión de CD13 en las líneas celulares HT1080 y A-375 se iniciaron los experimentos de migración celular, comenzando con los ensayos de cierre de herida. Como se mencionó en los resultados, era importante asegurar la detención de la proliferación celular durante los ensayos, con la finalidad de asociar el cierre de herida únicamente a la migración de las células, y no a la proliferación celular (Pellegata D.M et al, 2012). Así pues, se empleó mitomicina C, un compuesto reportado en la literatura que detiene la proliferación al interferir con la replicación del DNA celular (PubChem Compound Database). La mitomicina C al ser un entrecruzador no reversible para las posiciones específicas guanina y citosina en las cadenas complementarias del DNA, logra el arresto de la división celular independientemente de la fase de la mitosis en la que se encuentren las células. Más no se debe olvidar que al detener la replicación de las células como consecuencia de un daño irreversible al DNA, también se induce estrés y apoptosis. Por esta razón, era de gran importancia encontrar la concentración óptima de Mitomicina C, a la cual se indujera el arresto de la división celular sin que se produjera estrés y muerte celular, o en su defecto, éstas quedarán reducidas al mínimo.

Para encontrar esta concentración óptima de mitomicina C (Aeyung Kim, et al, 2013) se realizaron ensayos de proliferación celular, en los cuales se probaron diferentes concentraciones del compuesto a diferentes tiempos de incubación y se cuantificó la reducción metabólica del bromuro de 2,5-difeniltetrazolio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) (MTT) efectuado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, formando un compuesto azul denominado formazan. Dicho método determina la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Como cabría esperar, el formazan producido por la reducción del MTT aumentará en forma directamente proporcional al número de células en el pozo, indicando de manera indirecta, si hubo o no replicación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación (Tablas 1 y 2), se observa un incremento en la absorbancia del formazan producido por la reducción del

MTT después de 24 horas de que las células recibieron el tratamiento con mitomicina, independientemente de la concentración de ésta. Este resultado indica que entre las 0 y las 24 horas se incrementa el número de células a pesar del tratamiento con mitomicina C, aunque a partir de las 24 y hasta las 72 horas, los valores de las absorbancias se mantienen constantes, siendo más uniformes aquellos correspondientes a la incubación por 4 horas de las células con una concentración de 10 µg/ml de mitomicina. Por otra parte, se puede apreciar que la concentración más alta de mitomicina induce muerte celular, según lo revelan los valores de las absorbancias del formazan, los cuales disminuyen a distintos intervalos de tiempo. Así, tomando en cuenta que para ambas líneas celulares parece persistir la división celular hasta por 24 horas de haber sido tratadas, se decidió realizar los ensayos de cierre de herida 24 horas después de tratar a las células por cuatro horas con mitomicina C a la menor concentración. Al dejar de lado la incertidumbre de que pudiera estarse llevando a cabo división celular, estamos asegurando ensayos de cierre de herida funcionales, que retratarán de modo más efectivo el comportamiento de las líneas celulares durante el proceso de migración.

Como se ha venido mencionando, la sobreexpresión de CD13 está asociada a una mayor capacidad migratoria, de acuerdo con esto cabría esperar que la línea celular HT1080 migrara en mayor medida que la A-375, en presencia de los anticuerpos monoclonales 452 y C, los cuales al entrecruzar CD13 podrían promover o inhibir la migración celular. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de cierre de herida, ninguno de los anticuerpos tuvo efecto alguno sobre la migración de las células HT1080 y A-375, ya que, en ambas líneas celulares la herida se comporta de la misma manera transcurridas 24 horas a todas las condiciones probadas. No obstante, el efecto que se registró fue debido a la bestatina, la cual moduló positivamente la migración al mostrar un mayor porcentaje de cierre de herida.

Tales efectos son opuestos a lo que se esperaba ya que, si se ha reportado que la inhibición de la actividad enzimática de CD13 inhibe la actividad migratoria de las células asociada a una actividad invasiva, era lógico esperar que el empleo de la

bestatina inhibiera la migración celular (Fuji et al, 1995). Si retrocedemos un poco a la metodología, recordaremos que las células control para la bestatina tienen 20 µg/ml de DMSO, debido a que éste es el vehículo en el que se preparó la bestatina. De acuerdo con la gráfica, los datos sugieren que el DMSO por sí solo provoca que las células migren en menor proporción, ya que el porcentaje de herida abierta es el mayor de las cuatro barras mostradas en la gráfica. Sin embargo, ni el DMSO evita que la herida se cierre por completo a las 24 horas.

Al igual que con la línea celular HT1080, se esperaba que al incubar las células A-375 en presencia de bestatina, ésta inhibiera la migración. Sin embargo, el efecto fue el contrario y las células A-375 también aumentaron el porcentaje de migración en presencia de bestatina, cerrando más rápido la herida. No obstante, este efecto se registró después de 24 horas, a diferencia de las células HT1080 que mostraron dicho efecto después de 6 horas. Este resultado podría estar relacionado con las diferencias en la actividad metabólica de las células, la cual es diferente de línea celular a línea celular, demostrando ser mayor en las células de fibrosarcoma HT1080 en comparación con las células de melanoma A-375, según lo reveló el ensayo de saturación de anticuerpo. Por esta misma razón las células A-375 control que contenían DMSO muestran todavía una actividad migratoria mucho más baja que la de las HT1080.

Además de haber probado los anticuerpos y la bestatina en los ensayos de cierre de herida en las células HT100 y A-375, se probó aparte un control de proliferación, al cual no se le aplicó previamente el tratamiento con mitomicina C con la finalidad de observar si efectivamente la herida cerraba más rápido debido a la replicación celular como se pensaba. De acuerdo con los resultados obtenidos en la gráfica (Fig 11.) es perceptible que el porcentaje de herida abierta es prácticamente el mismo a las 6 horas y a las 24 horas en ambas líneas celulares. Este resultado se puede apreciar de mejor forma en las fotografías comparativas del cierre de herida con y sin tratamiento con mitomicina (Apéndice, Fig A11), en las cuales además, se logra observar que aunque las células continúan replicándose lo hacen “hacia arriba” y no lateralmente por lo que no intervienen en el comportamiento del cierre de la herida.

Para la continuación del estudio del papel de CD13 en la migración celular se hicieron los ensayos de migración celular en cámaras de Transwell. Se plantearon dos objetivos, el primer objetivo fue evaluar la capacidad de CD13 para inducir la migración celular. Aquí, las células atravesarían la membrana de los insertos que componen las cámaras de Transwell en respuesta a una señal quimiotáctica, la cual, sería llevada a cabo por el anticuerpo al entrecruzar CD13.

El segundo objetivo consistió en el estudio de la capacidad de CD13 de modular la migración en respuesta a una señal quimiotáctica, la cual sería ejercida por el SFB y, por tanto, al entrecruzarse CD13 se ejercería el efecto de modulación. Paralelamente se evaluó el efecto de la bestatina, misma que se añadió en la suspensión celular en el inserto, ya que recordemos la función de ésta es inhibir la actividad enzimática de las células y con ella la migración. Por este motivo, se debía añadir el factor quimioatrayente (medio con SFB) debajo del inserto para que se lograra observar el efecto inhibitorio.

De esta forma, se obtuvieron las gráficas de los ensayos correspondientes a la migración inducida por CD13 para la línea celular HT1080 (Fig. 12). Éstas gráficas nos indican en primer término, que los dos controles positivos que se emplearon resultaron promover eficazmente la migración celular (éstos fueron medio al 10 y 20% de SFB), siendo más efectivo el segundo por lo menos para las células HT1080. En segundo término, observamos que ninguno de los anticuerpos logró ejercer un efecto significativo a ninguna de las concentraciones probadas. Por otra parte, la gráfica correspondiente a la bestatina (Fig. 12 d) reveló un efecto positivo, demostrando que la inhibición de la actividad enzimática logra disminuir la actividad migratoria de las células, concordando con lo reportado en la literatura (Fuji, Nakajima, 1995) (Ikao S et al, 1993). En este caso, como lo que se quería comprobar era qué tanto la bestatina inhibía la migración celular, los resultados se debían comparar contra el control positivo que obtuvo el mayor número de células que migraron, es decir, medio al 20% SFB.

A continuación, se realizaron estos ensayos con la línea celular A-375 cambiando las concentraciones a las que se emplearon los anticuerpos obteniendo las gráficas

correspondientes (Fig. 13) las cuales nos muestran que los dos controles positivos empleados también inducen eficazmente la migración en esta línea celular, sin embargo, a diferencia de las células HT1080, las células A-375 presentaron una mayor migración con medio al 10% de SFB. A pesar de que los anticuerpos específicos anti-CD13 probados en la línea celular A-375 revelaron ejercer efectos significativos a diversas concentraciones, tales los consideraríamos inespecíficos debido a que el anticuerpo IgG registró también resultados significativos y recordemos, éste es un anticuerpo de especificidad, el cual se une de manera inespecífica a la célula y por tanto no ejerce ningún tipo de efecto sobre la misma, por lo que si tal aparece es considerado como inespecífico.

Punto aparte es la bestatina (Fig. 13d), la cual no muestra ningún tipo de efecto significativo de inhibición contra el control positivo 2 (medio al 20% de SFB). Es importante recalcar que estos resultados se compararon contra el control positivo 2 porque fue este medio el que se añadió como factor quimioatrayente suponiendo que tendría el mayor efecto migratorio.

Para finalizar con los ensayos de migración en cámaras de Transwell, se llevaron a cabo los experimentos de modulación de la migración por CD13, según se redactó anteriormente. Se debe señalar que estos ensayos se compararon contra el control positivo, ya que lo que se pretendía era analizar el efecto inhibitorio del entrecruzamiento de CD13 sobre la actividad migratoria de las células, es decir, qué tanto se inhibía la migración de las células en respuesta a la señal quimiotáctica inducida por el SFB. Además, en vista de que en los ensayos de inducción de la migración quedó establecido cuál de los controles positivos ejercía el efecto más eficaz para promover la migración dependiendo de la línea celular, en estos ensayos, se empleó únicamente dicho control.

De acuerdo con las gráficas de la línea celular HT1080 (Fig. 14 a, b y c), se obtuvieron efectos significativos con el anticuerpo IgG, así como los anticuerpos 452 y C a todas las concentraciones empleadas. Al observar que el anticuerpo de especificidad IgG registró efectos significativos (Fig. 14 a) se podría pensar que los efectos obtenidos con los anticuerpos anti-CD13 se tomarían como inespecíficos. Sin

embargo, aquí es importante observar detenidamente las concentraciones de los anticuerpos ya que los efectos obtenidos con los anticuerpos anti-CD13 (Fig. 14 b y c), se registraron a concentraciones muy por debajo de aquellas obtenidas con el anticuerpo IgG, indicando que el efecto podría ser significativo. Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con el anticuerpo IgG versus los anticuerpos 452 y C se mantienen los efectos estadísticamente significativos con los anticuerpos anti-CD13 a todas las concentraciones excepto a 0.1 µg/ml con el anticuerpo 452, demostrando que el empleo de estos logra modular la migración celular con la línea celular HT1080. Por otro lado, la bestatina mostró un marcado efecto inhibitorio a las tres concentraciones empleadas, aumentando éste en relación directamente proporcional a la concentración, probando una vez más que la bestatina inhibe la actividad migratoria de las células.

Finalmente, los resultados de los ensayos de modulación de la migración por CD13 para la línea celular A-375 (Fig. 15 a, b y c) revelan nuevamente efectos inespecíficos con los anticuerpos anti-CD13, mientras que la gráfica de la bestatina (Fig. 15 c) registró efectos significativos inhibitorios de la migración celular obteniéndose los mayores efectos a las concentraciones de 5 y 20 µg/ml y el menor efecto a 10 µg/ml.

11. CONCLUSIONES

A pesar de que se detuvo la proliferación celular durante los ensayos de cierre de herida, quedó demostrado mediante los ensayos con los controles de proliferación, que ésta última no afecta el cierre de herida.

Asimismo, se concluye que los anticuerpos específicos anti-CD13: el anticuerpo monoclonal 452 y el anticuerpo monoclonal C no ejercen ningún tipo de efecto sobre la migración celular en las líneas celulares HT1080 y A-375, según lo revelan el ensayo de cierre de herida. En cuanto a los ensayos de migración en cámaras de Transwell, parece ser que los anticuerpos 452 y C modulan la migración en la línea celular HT1080.

En cuanto al empleo de la bestatina, se concluye que ésta aumenta la migración celular en los ensayos de cierre de herida, sin embargo, su uso en los ensayos de

migración en cámaras de Transwell detiene la actividad migratoria de las células en las líneas celulares HT1080 y A-375. Podemos mencionar además que estos efectos inhibitorios no son dependientes de la concentración en los rangos utilizados, ni para los ensayos de cierre de herida ni para los ensayos de migración en cámaras de Transwell.

12.PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en estos ensayos *in vitro*, es prudente considerar probar sólo aquellos que se obtuvieron positivos en modelos animales, en este caso, la bestatina para observar los posibles efectos *in vivo*.

13. APÉNDICE

A continuación, se muestran una serie de fotografías que ilustran los ensayos de cierre de herida, así como, los ensayos de proliferación celular para las líneas celulares HT1080 y A-375.

Figura A1. Cierre de herida ante el anticuerpo IgG con la línea celular HT1080

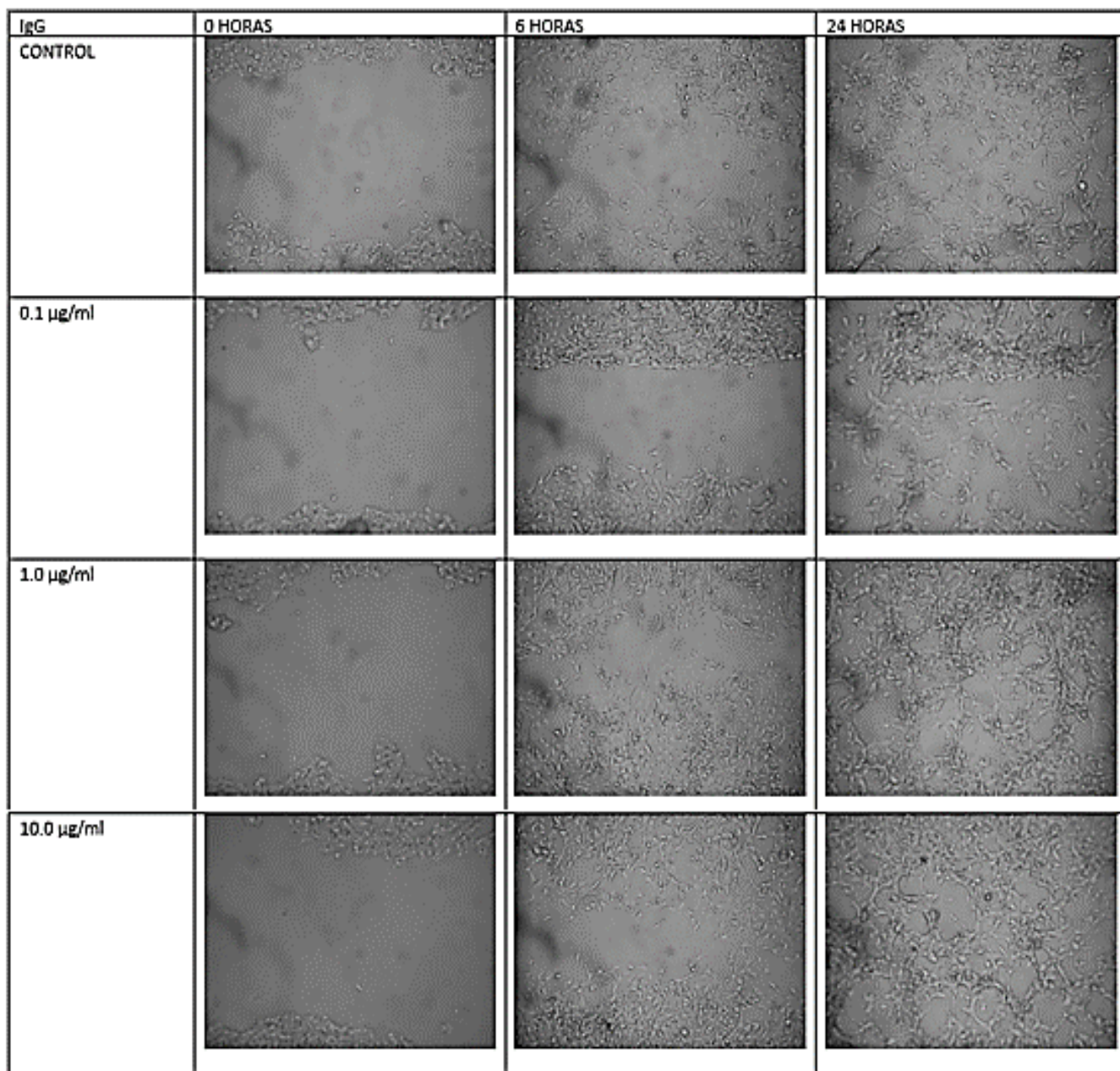


Figura A2. Cierre de herida ante el anticuerpo 452 con la línea celular HT1080



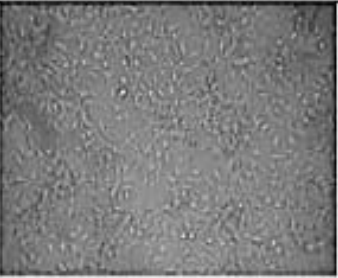
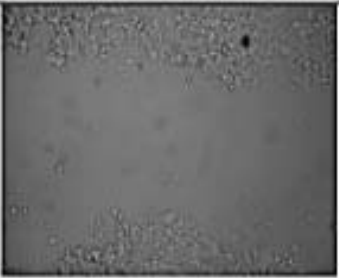




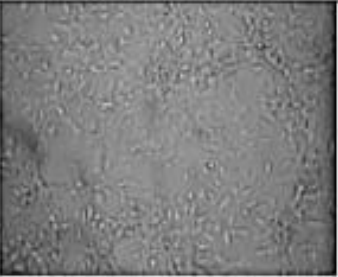



mAb 452	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL			
0.1 µg/ml			
1.0 µg/ml			
10.0 µg/ml			

Figura A3. Cierre de herida ante el anticuerpo C con la línea celular HT1080

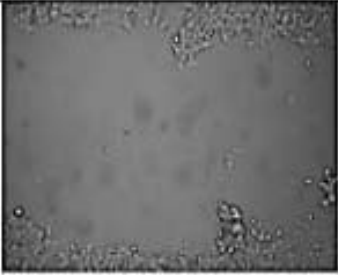
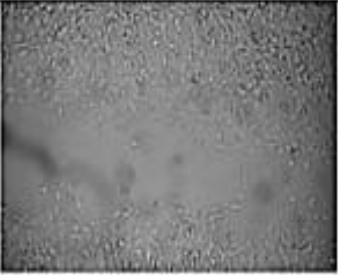
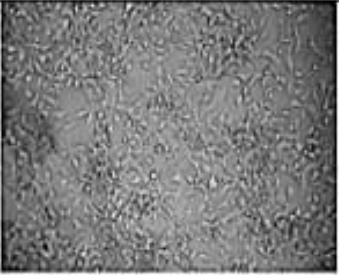
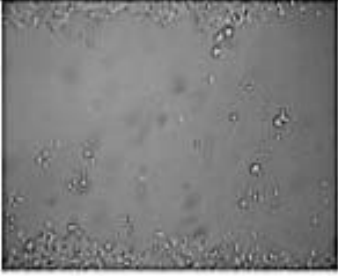
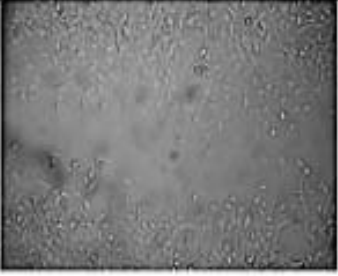







mAb C	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL			
0.1 µg/ml			
1.0 µg/ml			
10.0 µg/ml			

Figura A4. Cierre de herida ante bestatina para la línea celular HT1080

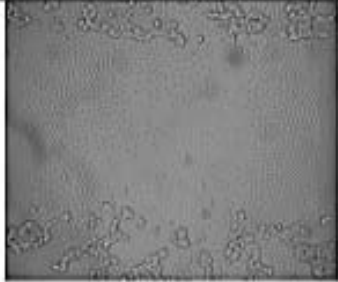
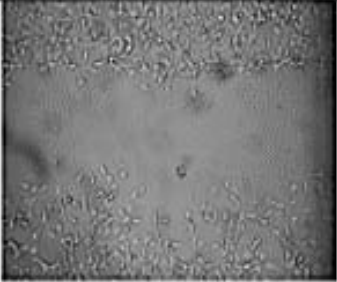

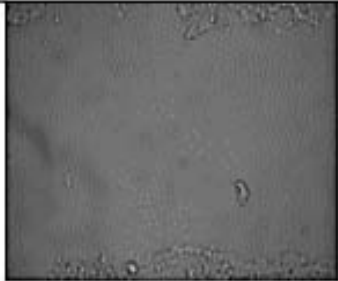
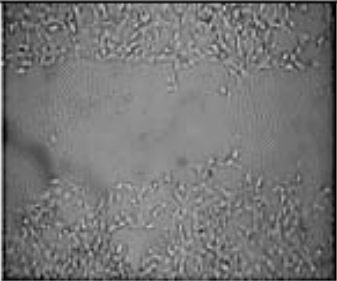


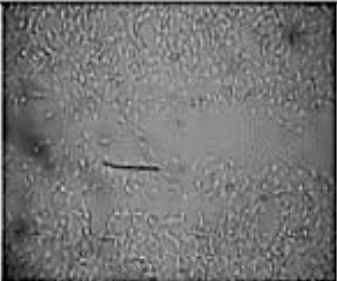
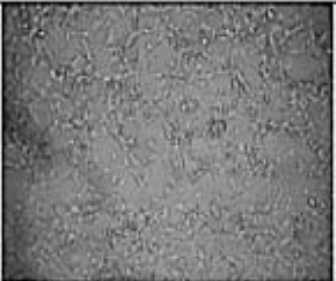
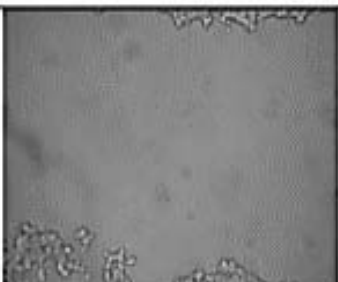
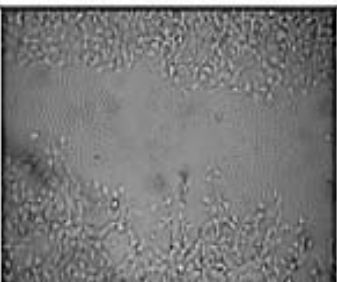

BESTATINA	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL 1% DMSO			
3 µg/ml			
10 µg/ml			
20.0 µg/ml			

Figura A5. Cierre de herida ante IgG con la línea celular A-375

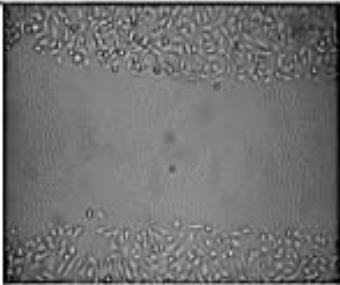

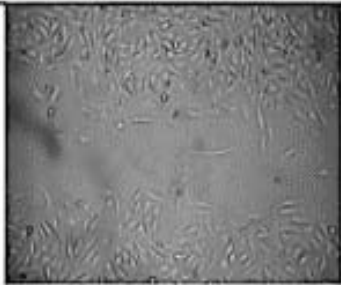
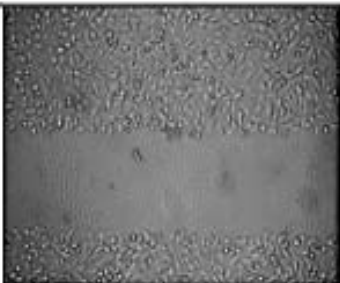

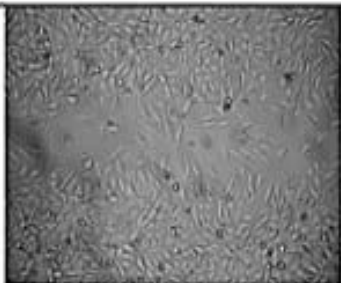


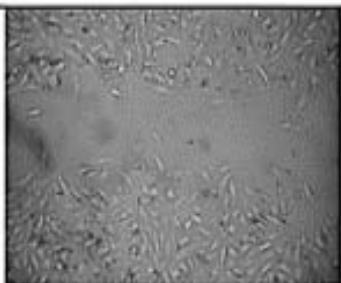


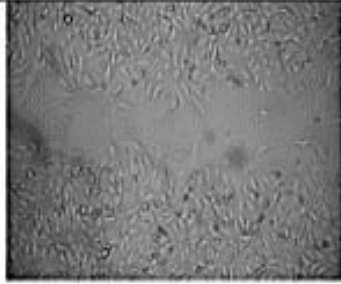
IgG	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL			
0.1 µg/ml			
1.0 µg/ml			
10.0 µg/ml			

Figura A6. Cierre de herida ante el anticuerpo 452 con la línea celular A-375

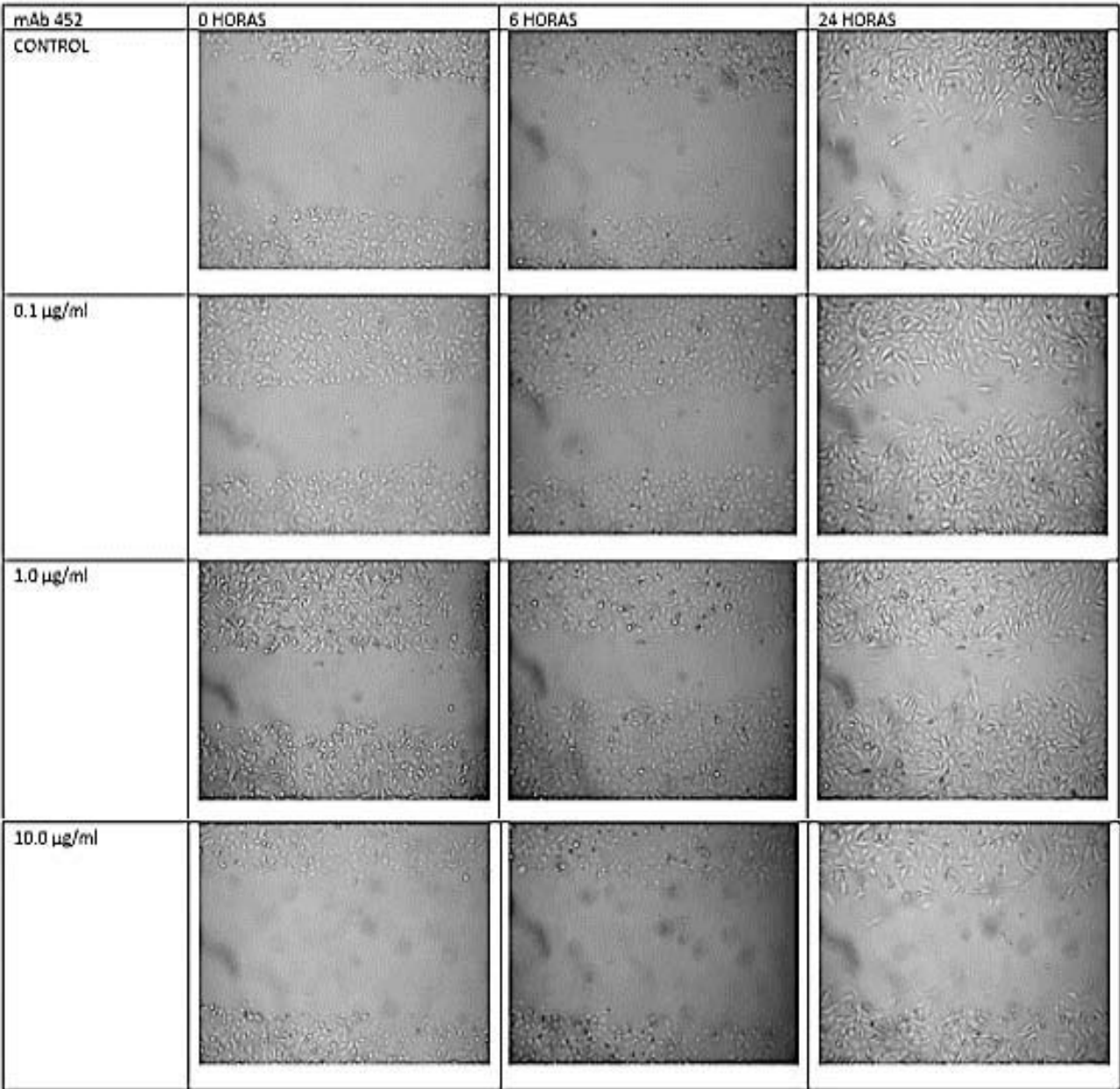


Figura A7. Cierre de herida ante el anticuerpo C con la línea celular A-375


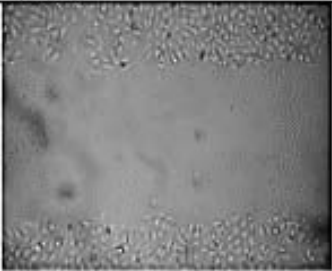
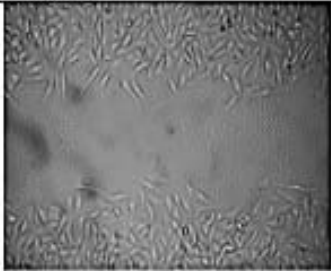
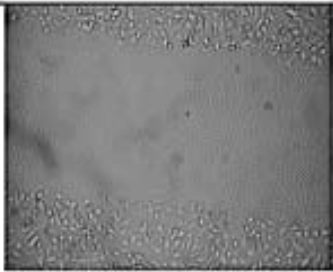
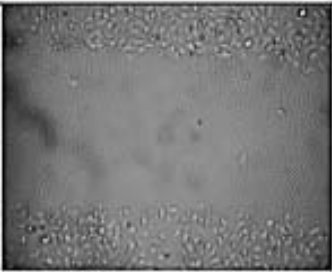
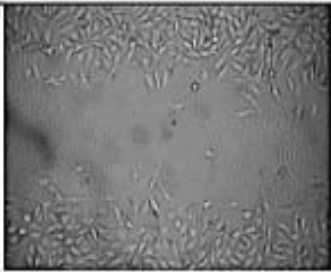
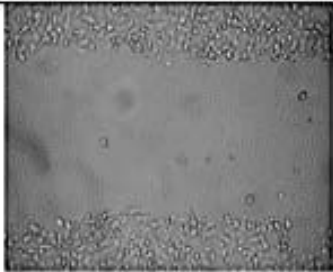
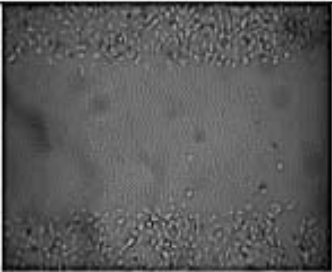
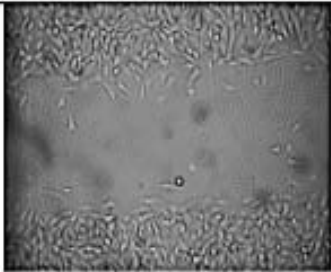



mAb C	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL			
0.1 µg/ml			
1.0 µg/ml			
10.0 µg/ml			

Figura A8. Cierre de herida ante bestatina con la línea celular A-375



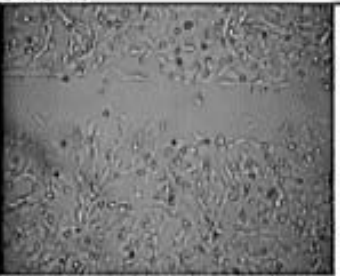
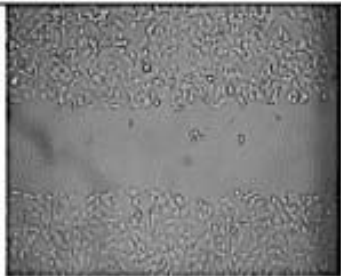
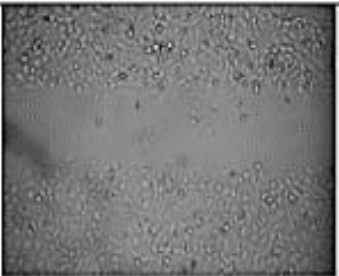
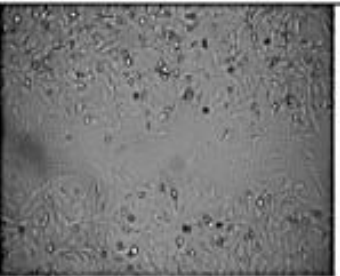
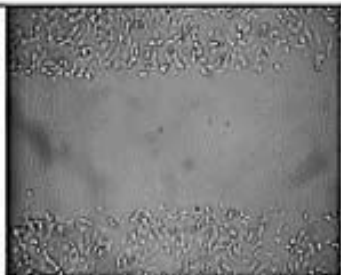
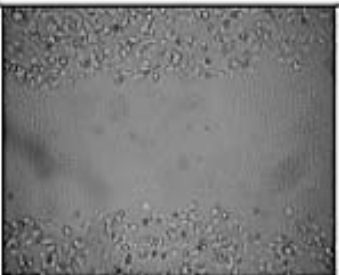
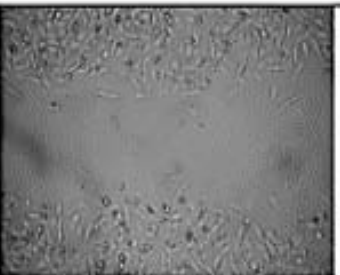
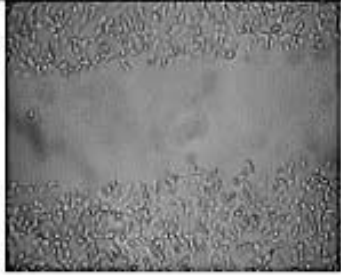
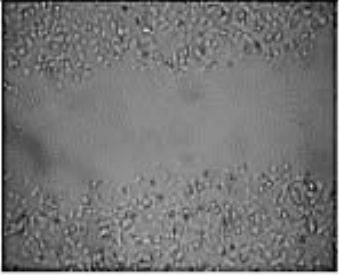
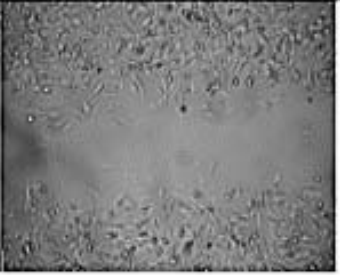
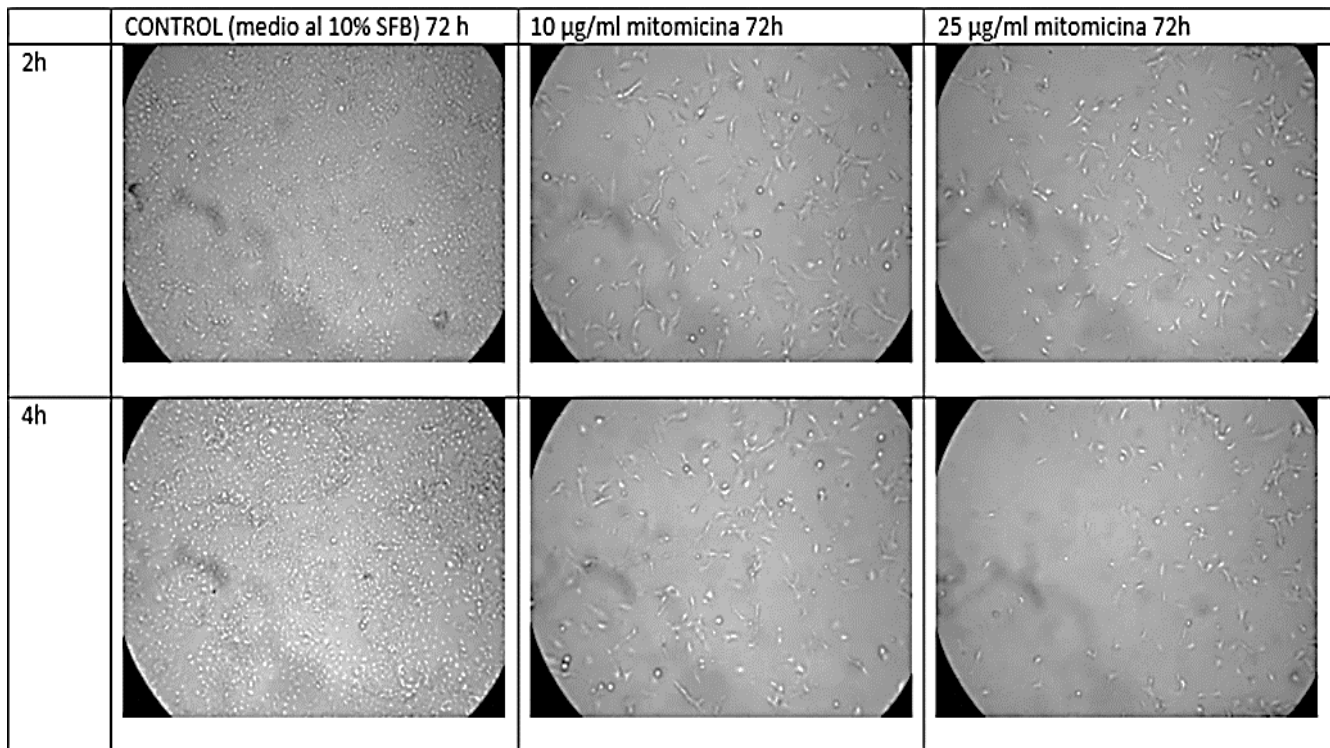
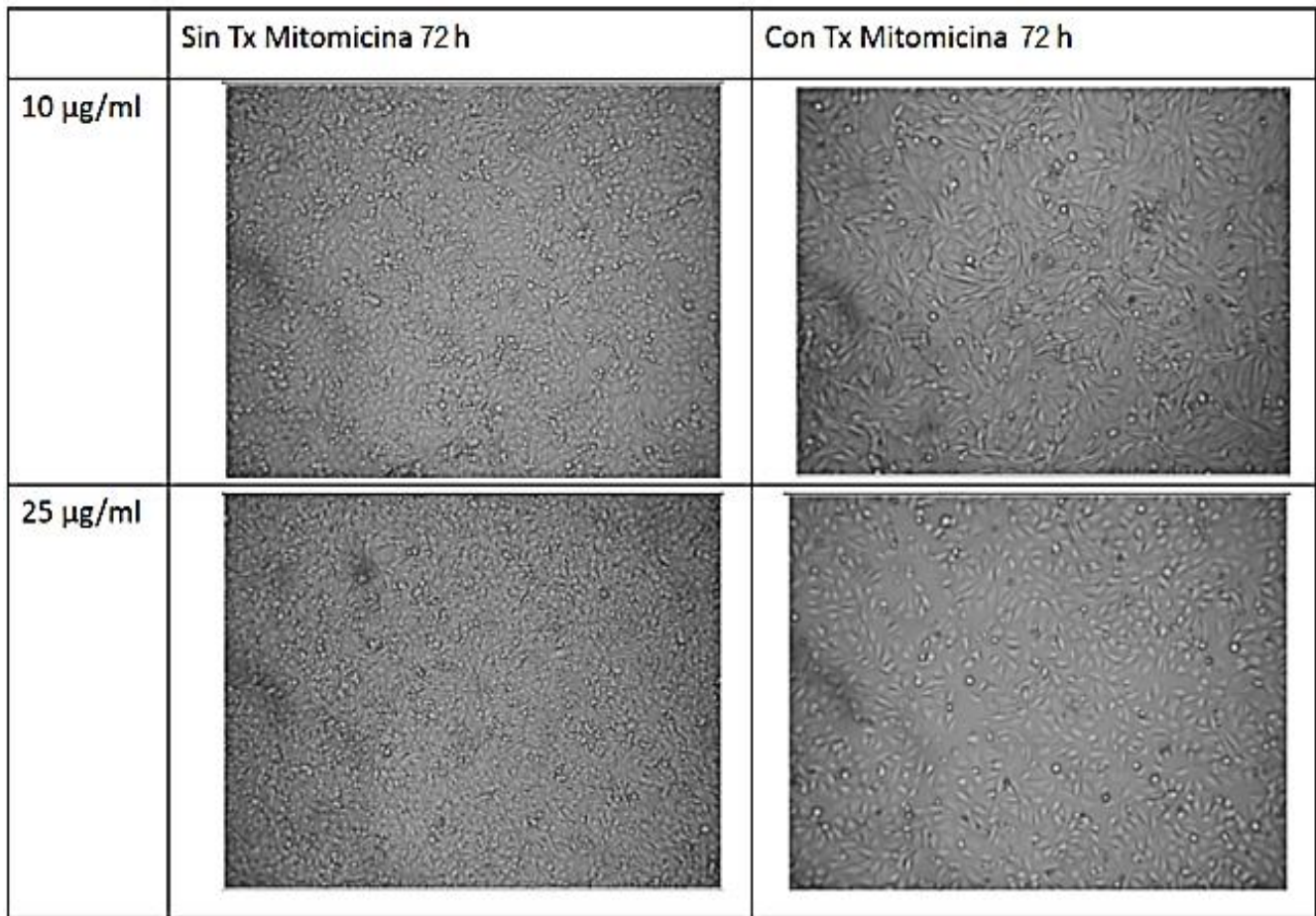
BESTATINA	0 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
CONTROL 2% DMSO			
5 µg/ml			
10 µg/ml			
20.0 µg/ml			

Figura A9. Células HT1080 con y sin tratamiento con Mitomicina C a las 72 horas





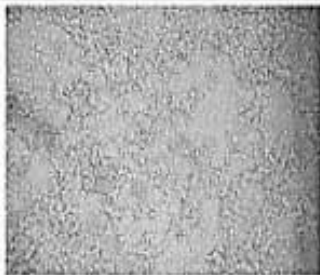
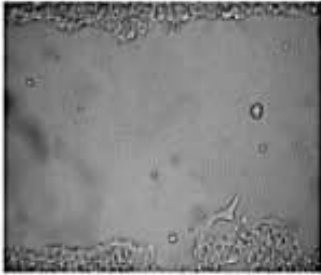

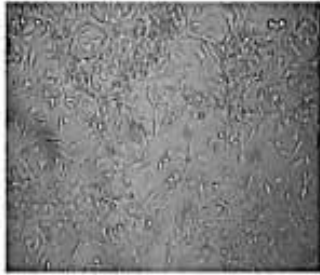
En esta imagen se observa claramente que la Mitomicina C está produciendo el arresto de la división celular logrando detener la proliferación, siendo el efecto más visible después de 72 horas de haber aplicado el tratamiento. Además, es perceptible que al emplear la Mitomicina a 25 $\mu\text{g/ml}$ el número de células disminuye, ya que a una concentración elevada se induce muerte celular.






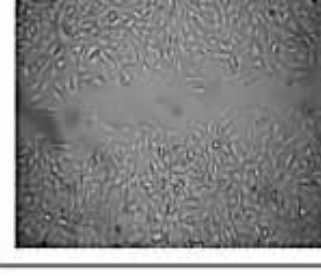
Figura A10. Células A-375 con y sin tratamiento con mitomicina a las 72 horas



En esta imagen se logra observar que después de 24 horas de haber recibido el tratamiento con Mitomicina, las células detienen su proliferación celular comparadas con aquellas que no lo recibieron. Del mismo modo que las células HT1080, las células A-375 demostraron mayor viabilidad a una concentración de Mitomicina de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Figura A11. Ensayo de cierre de herida con y sin tratamiento con Mitomicina con las líneas celulares HT1080 y A-375

HT1080 CIERRE DE HERIDA	0h	6h	24h
SIN Tx MIT			
CON Tx MIT			

A-375 CIERRE DE HERIDA	0h	6h	24h
SIN Tx MIT			
CON Tx MIT			

En esta imagen se observa que a pesar de que la Mitomicina logra el arresto de la división celular, ésta última no influye en el cierre de herida como se esperaba para ninguna de las dos líneas celulares.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Aran, D., Lasry, A., Zinger, A., Biton, M., Pikarsky, E., Hellman, A., ... Ben-Neriah, Y. (2016). Widespread parainflammation in human cancer. *Genome Biology, Under rev*, 1–14. <http://doi.org/10.1186/s13059-016-0995-z>
- Aeyung Kim, Minju Im, Nam-Hui Yim, Young Pil Jung, Jin Yeul Ma. (2013) Aqueous extract of bambusae caulis in taeniam inhibits PMA-induces tumor cell invasion and pulmonary metastasis: suppression of NF-Kb activation through ROS signaling. *PLOS ONE (8) 1-13*
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 401–410. <http://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Burnet FM. (1971) Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7:3-25
- Carroll-Portillo, A., Cannon, J. L., Te Riet, J., Holmes, A., Kawakami, Y., Kawakami, T., ... Lidke, D. S. (2015). Mast cells and dendritic cells form synapses that facilitate antigen transfer for T cell activation. *The Journal of Cell Biology*, 210(5), 851–864. <http://doi.org/10.1083/jcb.201412074>
- Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P. L. (2011). 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(3), 319–326. <http://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Deberardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism, (May). <http://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Ikuo Saiki, Hideji Fujii, Junyia Joneda, Fumimori Abe, Motowo Nakajima, Takashi T.,... Int. J. Cancer. (1993). Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *International Union Against Cancer*, 54, 137-143
- Fontijn, D., Duyndam, M. C. a, van Berkel, M. P. a, Yuana, Y., Shapiro, L. H., Pinedo, H. M., ... Boven, E. (2006). CD13/Aminopeptidase N overexpression by basic fibroblast growth factor mediates enhanced invasiveness of 1F6 human melanoma cells. *British Journal of Cancer*, 94(11), 1627–1636. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603157>
- Fujii, H., Nakajima, M., Saiki, I., Yoneda, J., Azuma, I., & Tsuruo, T. (1995). Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clinical & Experimental Metastasis*, 13(5), 337–44. <http://doi.org/10.1007/BF00121910>
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, 14(10), 1014–22. <http://doi.org/10.1038/ni.2703>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Liu, C., Yang, Y., Chen, L., Lin, Y. L., & Li, F. (2014). A unified mechanism for aminopeptidase N-based tumor cell motility and tumor-homing therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), 34520–34529. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.566802>
- Martínez-Ezquerro, J. D., & Herrera, L. A. (2006). ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología*, 1, 83–96.
- Mina-Osorio, P., Soto-Cruz, I., & Ortega, E. (2007). A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(3), 605–610. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.081>
- Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O’Conor, C., Grant, C. L., Vogel, L. K., Rodriguez-Pinto, D., ... Shapiro, L. H. (2008). CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(2), 448–459. <http://doi.org/10.1189/jlb.1107802>
- Niko Beerenwinkel, Chris D. Greenman, Jens Lagergren (2016). Computational Cancer Biology: An Evolutionary Perspective. *PLOS Computational Biology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449114>
- OMS. (2013). “ Estadísticas a Propósito Del Día Internacional Contra El Cáncer De Mama .” *Inegi*, 24, 1–17.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <http://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Pellegata, N. S., Antoniono, R. J., Redpath, J. L., & Stanbridge, E. J. (1996). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15209–15214. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15209>
- Piedfer, M., Dauzonne, D., Tang, R., N’Guyen, J., Billard, C., & Bauvois, B. (2011). Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(8), 2831–2842. <http://doi.org/10.1096/fj.11-181396>
- Raúl Barrera-Rodríguez, Oscar Peralta Zaragoza, Vicente Madrid-Marina. (1995). Bases Moleculares de la inmunología del cáncer. Salud Pública en México.
- Riedl, J. (2010). 3D Chemotaxis Protocol with Collagen I Gel for Dendritic Cells, 92(1999), 6–11.
- Ryungsa Kim. Manabu Emi & Kazuaki Tanabe. (2007) Cancer Immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14
- Saiki I, Murata J. Watanabe K, *et al.*1989, Inhibition of tumor cell invasion by

- ubenimex (bestatin) *in vitro*. *Japan J Cancer Res*, 80, 873-8.
- Schroeder, A., Heller, D. a., Winslow, M. M., Dahlman, J. E., Pratt, G. W., Langer, R., ... Anderson, D. G. (2011). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 39–50. <http://doi.org/10.1038/nrc3180>
- Sciences, C. L. (n.d.). Cell Migration , Chemotaxis and Invasion Assay Protocol. *Life Sciences*, 1–10.
- Soltaninassab S.R, Sotos J.P, Williams L.A, Williams J.W, Abbot N.L, Murphy C.J & Held P.G (2008) A novel high throughput-compatible cell migration screening assay. *Biotek Instruments 1-4 1-4*<http://www.biotek.com/resources/articles/oris-cell-migration-screening.html>
- Terauchi, M., Kajiyama, H., Shibata, K., Ino, K., Nawa, A., Mizutani, S., & Kikkawa, F. (2007). Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 7(1), 140. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-7-140>
- Thomas L. (1971) On immunosurveillance in neoplasia. *Tranplant Rev.* 7:3-25
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.*, 65(2), 87–108. <http://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 677–706. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075008>
- Valdivia López Sergio Erick. Tesis. Químico farmacéutico biólogo. Efecto de anticuerpos monoclonales anti-CD13 sobre la proliferación, la viabilidad e inducción de la apoptosis en líneas celulares de cáncer humano. Facultad de Quiimica, UNAM (2013)
- Van Hensbergen, Y., Broxterman, H. J., Peters, E., Rana, S., Elderkamp, Y. W., van Hinsbergh, V. W. M., & Koolwijk, P. (2003). Aminopeptidase inhibitor bestatin stimulates microvascular endothelial cell invasion in a fibrin matrix. *Thrombosis and Haemostasis*, 921–929. <http://doi.org/10.1160/TH03-03-0144>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P., & Gullbo, J. (2011). Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Science*, 102(3), 501–508. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x>
- Yates, L. R., & Campbell, P. J. (2013). Europe PMC Funders Group, 13(11), 795–806. <http://doi.org/10.1038/nrg3317>. Evolution
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., Kroemer, G., ...

Roussy, G. (2008). Science in medicine The anticancer immune response : indispensable for therapeutic success ?, 118(6).
<http://doi.org/10.1172/JCI35180.review>

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mitomycin_C#section=Top