



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DE CD43 EN LA CAPACIDAD
INVASORA DE CÉLULAS A549

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. ALICIA CAÑAS LINARES

TUTOR PRINCIPAL
DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE
[Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

Para su realización, el proyecto contó con fondos provenientes de los proyectos:

DGAPA-UNAM (PAPIIT): IN212716 y IN212519

CONACYT: 220990 y A1-S-15601

Asimismo, conté con una beca CONACYT (Núm. Becario: 631008), con una beca de DGAPA-UNAM (Proyecto IN212519) y con el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)” para la asistencia a cursos y congresos.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Baltazar Becerril Luján
(Presidente)

Dra. Hilda María Lomelí Buyoli
(Secretaria)

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara
(Vocal)

Dra. Celina García Meléndrez
(Vocal)

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que de una y mil formas contribuyeron para que este trabajo llegara a término.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Yvonne por guiarme y enseñarme durante esta etapa de mi formación, por su apoyo, su confianza, disponibilidad y buen ánimo para dialogar. Me llevo sus enseñanzas, recuerdos gratos, anécdotas interesantes y frases ingeniosas. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Patricia Mussali y al Dr. Fernando Covarrubias por escucharme y aconsejarme, por sus críticas y aportes en cada seminario. Ambos fueron parte importante en el desarrollo de este trabajo. ¡Muchas gracias!

A los miembros del jurado de examen por las revisiones y recomendaciones para mejorar este trabajo y por las facilidades para concluir con el proceso de obtención de grado. ¡Muchas gracias!

A la M. en C. Daniela Vega que fue muy importante en la realización de este trabajo, disfrute mucho aprender y trabajar contigo. Gracias por tu ayuda, consejos, confianza y por tu amistad. Muchas gracias, Dani.

Al Dr. Angel Flores por su apoyo técnico en Microscopía, por todo lo aprendido, por las críticas y sugerencias, por los consejos, por la confianza y orientación, pero sobre todo por su amistad. ¡Muchas gracias!

A la Biól. Erika Melchy gracias por su apoyo técnico en citometría de flujo, por sus críticas y sugerencias en los seminarios.

A el Lic. Den Alvarado muchas gracias por escucharme, por animarme siempre, por apoyarme y tolerarme, pero sobre todo por tu amistad y cariño. Al Biól. Iván Carranza gracias por hacer ameno y divertido el laboratorio, por escucharme y por tu amistad. A Sara, Nacho, Monse, Vero, Alan, Eli y Steph YR, gracias, amigos y compañeros por su amistad y enseñanzas.

También quiero agradecer a la Unidad de Docencia principalmente al Lic. Antonio Bolaños por su apoyo en innumerables trámites y buena disposición para ayudar. A la Lic. Gloria Villa por su apoyo en los trámites de titulación. Muchas gracias.

Gracias al Dr. Andrés Saralegui y al Dr. Adán Guerrero por su apoyo técnico en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Asimismo, agradezco a la Dra. Graciela Cabeza por su apoyo técnico y enseñanzas en el bioterio.

Gracias a mi familia que tanto amo, que me alienta, me inspira y me ama. Mamá gracias por tu amor, cuidados y por estar conmigo siempre. Papá gracias por tu amor, por enseñarme y por tenerme tanta paciencia. Hermanos gracias por todo lo que me han enseñado, por su cariño y por todo lo bueno que sucede cuando estoy con ustedes. Sobrinos gracias por su cariño, su risa y alegría. A todos ustedes que me recuerdan lo afortunada que soy, infinitas gracias.

A mis amigos, en especial a Angel a quien tengo en alta estima, gracias por apoyarme, por escucharme, por creer en mí, por todo lo que hemos construido como equipo y sobre todo por la amistad inefable. Muchas gracias.

A mi entrañable mejor amiga Ara, gracias por tu amistad y cariño, por tu apoyo y por alentarme a realizar mis sueños. Muchas gracias a ti y a tu familia, a tu mamá, a Oli, a Lili y al siempre Adrián.

También quiero agradecer a Alex, un amigo que llegó justo en el momento más inesperado, me escucho y me ayudo. Gracias por tu amistad y por todo lo bueno que hemos pasado juntos. ¡Muchas gracias!

Fernando, Miguel y Daniel gracias por su amistad y cariño, por escucharme y por enseñarme a ver las cosas desde otros puntos de vista. A mis amigos de siempre: el buen Faust, Enki, Dex, Álvaro, Mar, Vane, Mishel, el teacher y mi Wife. Gracias.

A todos ustedes muchísimas gracias.

INDICE

RESUMEN	9
I.-INTRODUCCIÓN	10
1.1.-REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	11
1.2.- ANGIOGÉNESIS	15
1.3.- MUCINAS	17
1.3.1.- CD43	17
1.3.1.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES	18
1.3.1.2.- CD43 Y CÁNCER	21
1.4.- CÁNCER DE PULMÓN	23
II.- HIPÓTESIS	25
III.- OBJETIVOS	26
3.1.- OBJETIVO GENERAL	26
3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES	26
IV.- RESULTADOS	27
4.1.- LOCALIZACIÓN DE CD43 EN LAS CÉLULAS A549	27
4.2.-OBTENCIÓN DE CLONAS DE CÉLULAS A549 CD43 ^{HI} Y CD43 ^{LO}	29
4.2.1.- PURIFICACIÓN Y LINEARIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	29
4.2.2.- TRANSFECCIÓN Y SELECCIÓN DE CLONAS	31
4.3.- CD43 FAVORECE LA CAPACIDAD DE SOBREVIDA EN CONDICIONES DE NUTRIENTES LIMITADOS	34
4.4.- LOS SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CLONAS CD43 ^{HI} TIENEN MAYOR CAPACIDAD ANGIOGÉNICA	35
4.4.1.- ANILLOS AÓRTICOS	35
4.5.2.- ENSAYOS DE FORMACIÓN DE TUBOS	37
4.5.2.1.- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES	37
4.5.2.2.- POTENCIAL DE FORMACIÓN DE TUBOS DE LOS SOBRENADANTES CD43 ^{HI} Y CD43 ^{LO}	40
4.6.- LOS SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CLONAS CD43 ^{HI} TIENEN MAYOR CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	44
V.- DISCUSIÓN	46
5.1.- LOCALIZACIÓN DE CD43 EN LAS CÉLULAS A549 Y SUS POSIBLES IMPLICACIONES	46
5.2.- CD43 FAVORECE LA CAPACIDAD DE SOBREVIDA EN CONDICIONES DE NUTRIENTES LIMITADOS	48
5.3.- LOS SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CLONAS CD43 ^{HI} TIENEN MAYOR CAPACIDAD ANGIOGÉNICA	49
5.4.- LOS SOBRENADANTES PROVENIENTES DE CLONAS CD43 ^{HI} TIENEN MAYOR CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	51
VI.- CONCLUSIONES	53
VII.- PERSPECTIVAS	54
VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS	55
8.1.- TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS A459 CON EL PLÁSMIDO PSUPER	55
8.2.- CÉLULAS A549: MANTENIMIENTO Y OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES	58
8.3.- DETECCIÓN DE CD43	60
8.4.- ENSAYO DE SOBREVIDA	63
8.5.- ENSAYO DE ANILLOS AÓRTICOS	64
8.6.- ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS	67
8.7.- ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	71

IX.- REFERENCIAS	74
X.- ANEXOS	83

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- ORGANIZACIÓN Y COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC):	11
FIGURA 2.- ESTRUCTURA DE LAS MMPs.....	13
FIGURA 3.- PROCESO DE ANGIOGÉNESIS:.....	16
FIGURA 4.- ESTRUCTURA DE CD43 EN LINFOCITOS.	19
FIGURA 5.- LOCALIZACIÓN DE LA MUCINA CD43 EN CÉLULAS A549.	28
FIGURA 6.- PATRÓN DE DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS pSUPER Y pSUPER-RNAi.....	30
FIGURA 7.- SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSUPER Y pSUPER-RNAi.	30
FIGURA 8.- LINEARIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSUPER Y pSUPER- RNAi	31
FIGURA 9.- SELECCIÓN DE CLONAS pSUPER Y RNAi	33
FIGURA 10.- LAS CLONAS pSUPER SOBREVIVEN MAS QUE LAS CLONAS RNAi EN CONDICIONES DE CONFLUENCIA Y NUTRIENTES LIMITADOS.....	35
FIGURA 11.- LAS SOBRENADANTES DE CÉLULAS CD43 ^{HI} POSEEN MAYOR CAPACIDAD PARA ESTIMULAR EL CRECIMIENTO DE VASOS SANGUÍNEOS.....	37
FIGURA 12.- FORMACIÓN DE TUBOS DE CÉLULAS TELOHAEC.....	39
FIGURA 13.- FORMACIÓN DE TUBOS ESTIMULADOS CON SOBRENADANTES CD43 ^{HI} Y CD43 ^{LO}	41
FIGURA 14.- LOS SOBRENADANTES DEL CULTIVO DE CÉLULAS CD43 ^{HI} TIENEN MAYOR CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE TUBOS.	42
FIGURA 15.- LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS CD43 ^{LO} TIENEN MAYOR ÁREA MEDIA DE LA MALLA.	43
FIGURA 16.- LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS A549 CD43 ^{HI} SECRETAN MAYOR CANTIDAD DE METALOPROTEASAS QUE SUS CONTRAPARTES CD43 ^{LO}	45
FIGURA 17.- REPRESENTACIÓN DEL PLÁSMIDO pSUPER-RNAi.	56
FIGURA 18.- LÍNEA CELULAR A549.....	58
FIGURA 19.- ESTRATEGIA DEL ENSAYO DE ANILLOS AÓRTICOS	66
FIGURA 20.- LÍNEA CELULAR TELOHAEC.....	68
FIGURA 21.- CÉLULAS ENDOTELIALES TELOHAEC.....	69
FIGURA 22.- MAPA DE ANÁLISIS DE TUBOS.	70

ABREVIATURAS

- **ALK:** Anaplastic Lymphoma Kinase (gen del receptor de la tirosina quinasa del linfoma anaplásico)
- **ATCC:** American Type Culture Collection
- **Bax:** Bcl2-associated X protein (proteína X asociada a Bcl-2)
- **Bcl-2:** B-cell lymphoma 2 (linfoma 2 de células B)
- **BGF:** Beta glicerofosfato
- **Bim:** Bcl-2-like protein 11(proteína 11 unida a Bcl-2)
- **BSA:** Bovine serum albumin (suero de albumina bovina)
- **CD43^{lo} :** Clonas transfectadas con el plásmido pSuper-RNAi
- **CD43^{hi} :** Clonas transfectadas únicamente con el vector pSuper
- **DAPI:** 4 ',6-diamino-2-fenilindol (marcador fluorescente)
- **DFT-1:** anticuerpo de detección de CD43
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio de cultivo)
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **DNA:** Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
- **DTT:** Ditioneitol
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **EGF:** Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico)
- **FACS:** Fluorescence activated cell sorting (Clasificación de células activadas por fluorescencia)
- **FGF:** Fibroblast Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)
- **GFP:** Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)
- **G418:** antibiotico de selección
- **HEPES:** Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazine etanosulfónico
- **HIF-1:** Hypoxia-inducible factor-1 (Factor Inducible por Hipoxia-1)
- **H300:** anticuerpo de detección de CD43
- **IGF-1:** Insulin-like growth factor type 1(Factor de crecimiento insulínico tipo 1)
- **IF:** Inmunofluorescencia
- **KRAS:** Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog (homólogo de oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten 2)
- **LB:** medio de cultivo Luria Bertani
- **MAT:** microambiente tumoral
- **MEC:** matriz extracelular
- **MBV:** medio basal de células vasculares
- **Mcl-1:** Myeloid cell leukemia 1 (células de leucemia mieloide 1)

- **MCF-7:** línea celular de cáncer de mama
- **MMP:** metaloproteinasa
- **NaF:** Fluoruro de sodio
- **NSCLC:** Non-small-cell lung carcinoma (Cáncer de pulmón de células no pequeñas)
- **Na₃VO₄:** Ortovanadato de sodio
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ON:** Del inglés overnight (toda la noche)
- **PBS:** Phosphate Buffered Saline (Buffer de fosfato salino)
- **PDGF:** Platelet Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
- **PFA:** Paraformaldehído
- **PKM2:** Piruvato cinasa isoforma M2
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **PSG:** Penicilina, estreptomina y glutamina
- **RNAi:** Ribonucleic Acid Interference (Ácido ribonucleico de interferencia)
- **SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
- **SFB:** Suero fetal bovino
- **TA:** Temperatura ambiente
- **TBS-T:** Tris-buffered saline with Tween (Buffer salino con Tris y Tween)
- **TEMED:** N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine
- **TLB:** Triton Lysis buffer (buffer de lisis con Tritón)
- **Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano
- **USSDNA:** Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA
- **VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)
- **WB:** Western blot

RESUMEN

CD43 es una proteína transmembranal muy abundante en células hematopoyéticas, así como en carcinomas y linfomas. CD43 posee numerosos ligandos los cuales le confieren diferentes funciones, entre ellas: adhesión celular, apoptosis, migración y proliferación. Esto se ha descrito en células linfoides; sin embargo, en células no linfoides no ha sido tan estudiado, pero se sabe que en estas células la expresión de CD43 anula el fenómeno de inhibición por contacto del crecimiento celular, altera el crecimiento independiente de anclaje y la formación de tumores *in vivo*.

Resultados recientes sugieren que además de las funciones previamente descritas CD43 contribuye de manera importante en el proceso de angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular. En este sentido, se ha descrito que para que las células puedan sobrevivir e invadir otros tejidos modifican su microambiente tumoral, estableciéndose un diálogo entre las células tumorales y el medio circundante. Esta interacción proporciona un entorno adecuado para su crecimiento y diseminación.

Con base en estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel de CD43 en la supervivencia celular, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular en la línea tumoral A549 en poblaciones clonales CD43^{hi} y CD43^{lo}. Los resultados obtenidos sugieren que CD43 contribuye en la supervivencia de las células A549 cultivadas en condiciones de confluencia, baja glucosa y sin suero. Demostramos que la expresión de CD43 favorece el potencial angiogénico, ya que los sobrenadantes provenientes de células A549 CD43^{hi} generaron mayor número de vasos sanguíneos en ensayos de anillos aórticos y de formación de tubos. Adicionalmente, CD43 proporciona una mayor capacidad de remodelación de la matriz extracelular gracias a las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 que son mayormente secretadas en sobrenadantes CD43^{hi}.

Finalmente, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares en los que CD43 participa, podría conducir a la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

PARTICIPACIÓN DE CD43 EN LA CAPACIDAD INVASORA DE CÉLULAS A549

I.-INTRODUCCIÓN

La transformación celular que conduce a la formación de tumores es un proceso complejo y dinámico que resulta en la acumulación de mutaciones que favorecen los sellos distintivos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). El desarrollo tumoral se inicia con eventos puntuales por medio de los cuales una célula sana va adquiriendo las características típicas de un fenotipo tumoral. Estas son: proliferación incontrolada, evasión de la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, potencial replicativo ilimitado, activación de la angiogénesis e invasión a otros tejidos. En conjunto, estas funciones aseguran el crecimiento tumoral y la colonización de nuevos nichos (Hanahan & Weinberg, 2000).

Además de considerar las nuevas capacidades de las células tumorales, el campo de estudio de la investigación en cáncer se ha ampliado, abarcando la interacción del tumor con su microambiente tumoral (MAT), el cual contribuye de manera importante a definir la capacidad de crecimiento del tumor. De esta manera, se establece un diálogo entre las células tumorales y el medio circundante para conducir a la invasión de otros tejidos (Wang, *et al.* 2017). El MAT es complejo e incluye, además de las células tumorales, células del sistema inmune, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz extracelular y metabolitos. En el MAT se intercambia información entre los diferentes elementos de ese tejido anómalo, generando un conjunto de señales intra e inter-celulares que modulan las funciones de las células que lo constituyen, promoviendo el crecimiento tumoral (Poh & Ernst, 2018).

1.1- Remodelación de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) constituye el mayor componente estructural del microambiente tumoral. Es un elemento muy dinámico que participa de manera importante en la plasticidad de las células tumorales, a la vez que es moldeado directa e indirectamente por las células tumorales.

Los componentes de la MEC se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión como fibronectina y laminina (Cascales & Álvarez-Gómez, 2010; Fig.1). Dichos componentes se encuentran interconectados y son regulados por metaloproteinasas de la matriz, esenciales en múltiples casos de morfogénesis (Murphy & Nagase, 2008).

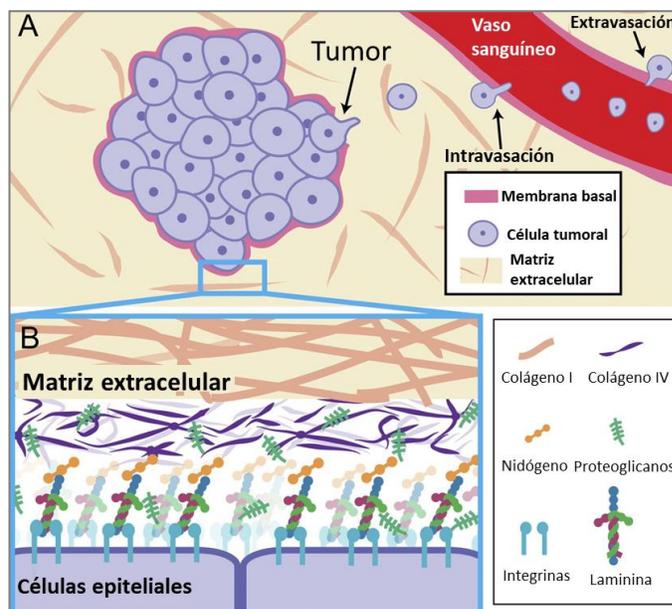


Figura 1.- Organización y componentes de la matriz extracelular (MEC): Es una red macromolecular tridimensional no celular y muy dinámica, compuesta por colágeno de varios tipos, proteoglicanos/glucosaminoglucanos, elastina, fibronectina, lamininas y otras glucoproteínas. Los componentes de la matriz se unen entre sí, formando una red compleja en la que las células residen en todos los tejidos y órganos. La MEC está sometida a remodelaciones mediadas por varias enzimas que degradan la matriz durante condiciones normales y patológicas. (A)Paranorama general, (B) Acercamiento a los componentes de la MEC (figura modificada de Chang & Chaudhuri, 2019).

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas extracelulares que degradan selectivamente los componentes extracelulares. Las MMP están asociadas con procesos fisiológicos como la morfogénesis, la angiogénesis y la reparación de tejidos. La desregulación de la actividad de las MMP está asociada a procesos patológicos agudos y crónicos, como la artritis, el infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica; el crecimiento tumoral maligno, la invasión, la metástasis y la angiogénesis. Además de degradar la MEC, las MMPS contribuyen al crecimiento tumoral liberando fragmentos bioactivos de factores de crecimiento que se encuentran secuestrados en la MEC (Kupai, *et al.* 2010).

Hasta el momento se han descrito 25 miembros de la familia de las MMPs, distribuidos en cinco subfamilias que incluyen a las colagenasas, estromelisininas, gelatinasas, las MMPs de membrana (MT-MMP) y otras MMP (Folgueras, *et al.* 2004, Fig.2). En conjunto, las MMPs son capaces de degradar todos los componentes de la MEC y se distinguen entre ellos por su estructura y afinidad de sustrato. Actúan a pH fisiológico, y se consideran elementos importantes en la destrucción tisular que acompaña al cáncer (Murphy & Nagase, 2008; Cascales & Alvarez, 2010).

La estructura básica de las MMP consta de: un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico carboxi-terminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que determina la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembrana en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática (MT-MMP) (Fig. 2).

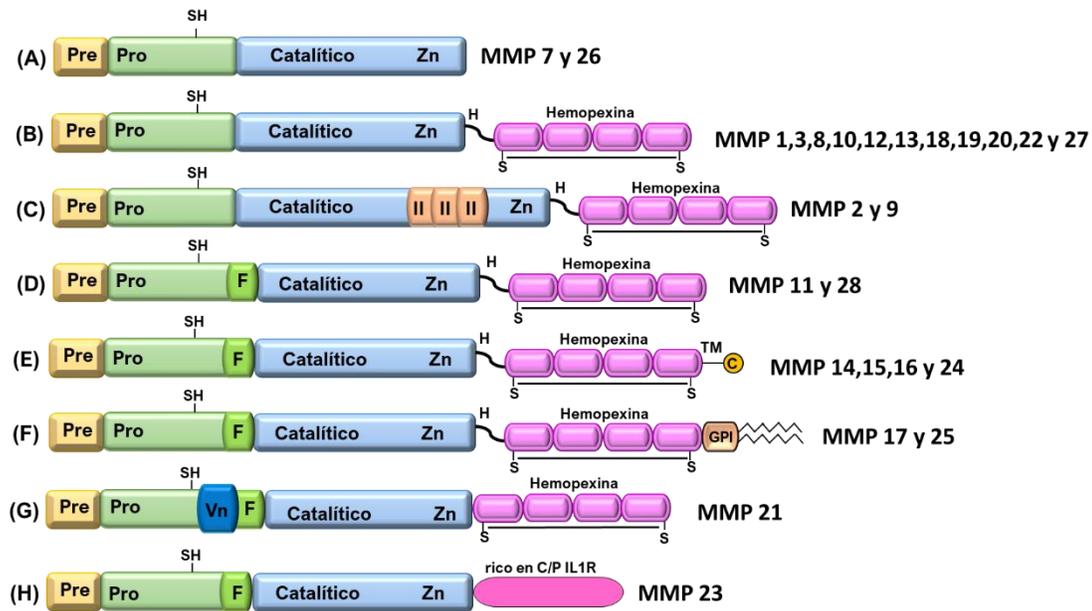


Figura 2.- Estructura de las MMPs. (A) Dominios mínimos de las MMP. (B) MMP que contienen sólo un dominio hemopexina. (C) MMP que se unen a gelatina. (D) MMP secretadas activadas por furina. (E) MMP transmembrana. (F) MMP ligadas a GPI. (G) MMP con un dominio inserto similar a la vitronectina. (H) MMP con un dominio rico en cisteína/prolina receptor IL-1. *Pre*, secuencia señalizadora; *Pro*, propéptido con un zinc libre que se une al tiol (SH); *F*, sitio susceptible a la furina; *Zn*, sitio catalítico de unión al Zn; *II*, insertos de fibronectina que se unen al colágeno; *H*, región bisagra; *TM*, dominio transmembrana; *C*, cola citoplasmática; *GPI*, dominio de anclaje del glicofosfatidil inositol; *C/P*, cisteína/prolina; *IL-1R*, receptor de la IL-1; *Vn*, dominio similar a vitronectina. El dominio hemopexina contiene cuatro repetidos con un enlace disulfuro entre el primer y el último (Modificado de Folgueras, *et al.* 2010).

Las MMPs han sido ampliamente estudiadas por su relación con la progresión tumoral dado que muchas de ellas se encuentran incrementadas en distintos tipos de cáncer. El estudio de las gelatinasas A y B (MMP 2 y MMP 9), las colagenasas-1 y -13 y la MT1-MMP en diferentes modelos sugiere que estas metaloproteinasas son las que están más involucradas en la progresión tumoral. A la luz de los conocimientos actuales, no hay evidencia que indique que alguna proteasa sea responsable por sí sola de las propiedades invasivas y metastásicas de los distintos tipos de tumores, y más bien se sugiere que todo se debe a la actividad

conjunta de diferentes combinaciones de estas enzimas (Deryugina & Quigley, 2006).

Por su gran capacidad de alterar la arquitectura tisular, la regulación de la actividad las MMPs está sometida a un estricto control, a nivel de la regulación transcripcional, activación de la proenzima o zimógeno y por inactivación. Otros mecanismos como la estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional y secreción enzimática, así como el reclutamiento en la membrana celular, selección del sustrato, su liberación, oligomerización, incorporación, internalización celular y, autólisis también han sido descritos (López-Otín & Matrisian, 2007; Folgueras, *et al.* 2010). La transcripción de estas enzimas está regulada positiva y negativamente por citocinas y factores de crecimiento como IL-1, IL-4, IL6, IL-8, EGF, HGF, TGF β y TNF α (Cawston y Wilson, 2006; Spinale, 2007). Generalmente las MMPs se expresan en cantidades muy bajas en sus formas latentes o pro-MMP. Estas últimas se mantienen en esta condición, por la interacción de un residuo de cisteína conservado en un pre-dominio con el residuo de zinc en el centro activo. Las MMPs son reguladas negativamente por proteínas presentes en el plasma y fluidos tisulares como la macroglobulina α_2 y por inhibidores específicos. Los inhibidores tisulares de las MMP, también conocidos como TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), se unen fuertemente a las MMPs activas (Murphy, 2011).

En particular, MMP-2 y MMP-9, conocidas colectivamente como gelatinasas, participan de manera importante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, infecciosas y neoplásicas. Así por ejemplo, la arquitectura tisular se altera notoriamente en el epitelio pulmonar afectado por procesos patológicos que afectan la matriz extracelular, deteriorando la función pulmonar normal y promoviendo un estado de inflamación crónica (Chakrabarti y Patel, 2005).

MMP-2 se secreta como una pro-enzima de 72 kDa y la forma activa tiene un peso molecular de 64 kDa. Por su parte, la MMP-9 tiene masas de 92 kDa y 83 kDa respectivamente. Ambas enzimas están ampliamente glicosiladas. MMP-2 es

producida constitutivamente por una gama de células, incluidas las células endoteliales y los macrófagos. La MMP-9 se encuentra principalmente en neutrófilos y eosinófilos. Resulta de particular interés el hecho que numerosas células tumorales producen estas MMP. Tal es el caso de la línea celular A549, la cual deriva de un adenocarcinoma humano de células epiteliales alveolares.

Durante el proceso tumoral, las gelatinasas promueven la degradación de la membrana basal y de componentes de la matriz extracelular, así como la liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente inductor de la angiogénesis. A su vez, el VEGF liberado por la MMP-9 puede provocar la liberación de MMP-2 de las células endoteliales, lo que conduce a la ruptura de la membrana basal y promueve la formación de nuevos vasos (Bergers, *et al.* 2000, Sternlicht & Werb. 2001).

1.2.- Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. La angiogénesis es un proceso invasivo que requiere la proteólisis de la matriz extracelular (MEC), la migración y proliferación de células endoteliales, así como la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Dvorak, 2005; Rundhaug, 2005).

Se consideran dos tipos de angiogénesis: fisiológica y patológica. La angiogénesis fisiológica comienza durante el desarrollo fetal y continúa después del nacimiento para formar los vasos sanguíneos normales de los tejidos adultos. La angiogénesis patológica, promovida por la hipoxia y/o la expresión de determinados oncogenes, es un elemento clave de la invasión tumoral, pues es la vía que utilizan las células tumorales para migrar a otros órganos y, además, a partir de ella, el tumor consigue un aporte continuo de nutrientes y la eliminación de desechos (Dvorak, 2005).

Las principales etapas de la angiogénesis son: Inducción de la expresión de HIF-1 (aumento de hipoxia), con la consecuente liberación de factores pro-angiogénicos en donde el VEGF es el más importante. 2) Aumento de la expresión de proteasas que degradan la membrana basal y promueven el desprendimiento de pericitos. 3) Migración de células endoteliales especializadas (“células punta”), asociada a un gradiente de factores angiogénicos. 4) Organización en grupos, de las células endoteliales para formar estructuras tubulares que eventualmente se unirán. 5) Regulación de la formación y tamaño de los vasos por el VEGF, el cual estimula la secreción de DLL4 (Delta like ligand 4), el cual se une a su receptor (Notch-1), generando la disminución de los niveles de VEGFR (receptor de VEGF) resultando en una supresión de la proliferación. 6) Establecimiento de la vascularización tumoral, en donde PDGF-B estimula el desprendimiento de los pericitos reduciendo entonces la proliferación como una consecuencia de la disminución a la sensibilidad por el VEGF. Finalmente, se genera una supresión de los estímulos que promueven el crecimiento vascular (Fig.3).

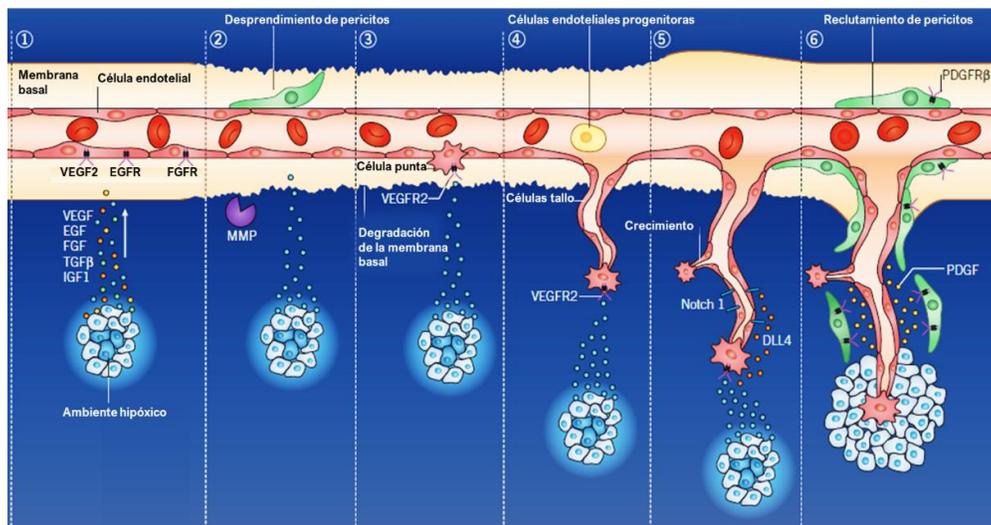


Figura 3.- Proceso de angiogénesis: 1) Inducción por hipoxia, 2) degradación de la matriz extracelular, 3) migración de células punta, 4) Formación del tubo, 5) Regulación del tamaño del vaso, 6) Supresión de la angiogénesis (modificado de Tocris-Cookson, 2017).

1.3.- Mucinas

Las mucinas constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas de alto peso molecular con abundantes residuos de galactosa, manosa, fucosa y/o ácido siálico que se expresan preferencialmente en las células epiteliales de varios órganos. Por su alta hidrofobicidad, forman un gel que protege al epitelio de las condiciones hostiles. Las mucinas se clasifican en dos grupos principales: las mucinas unidas a la membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 y MUC21) y, las mucinas secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 y MUC19) (Kufe, 2009).

Numerosos adenocarcinomas tales como el cáncer de páncreas, de pulmón, de mama, ovario y colon se caracterizan por producir grandes cantidades de mucinas. Se ha sugerido, en particular, que las alteraciones en los patrones de glicosilación de las mucinas están relacionadas con el proceso de transformación tumoral y la evasión de la respuesta antitumoral, ya que coordinan funciones que dirigen la proliferación y/o apoptosis (Tuccillo, *et al.* 2014). Algunas de estas mucinas se consideran como marcadores tumorales. Por ejemplo, MUC1, se expresa en el 90% de los tumores de mama y en el 75% de los cáncer de pulmón de células no pequeñas, MUC4 está el 80% de adenocarcinomas y células escamosas de pulmón. Por otro lado, MUC5AC esta expresada en el 30% de los tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Kufe, 2010; Lakshmanan, *et al.* 2015). Además de los miembros de la familia de MUC, la expresión de otras mucinas, como la sialomucina CD43, se ha asociado a un mal pronóstico. Actualmente las mucinas se consideran como potenciales blancos terapéuticos (Torres-Huerta, *et al.* 2017).

1.3.1.- CD43

CD43, también llamada sialoforina o leucosialina, es una mucina transmembranal. Inicialmente se consideró exclusiva del linaje hematopoyético, a excepción de los eritrocitos maduros. Sin embargo, se expresa también en riñón, cuello uterino y

cerebro, así como en tumores de origen no linfoide como carcinomas de mama, próstata, colon, cervix y pulmón (Baeckström, *et al.* 1995, Pedraza-Alva y Rosenstein, 2007; Torres-Huerta, *et al.* 2017). Aunque no es la causa de la enfermedad, CD43 es fenotípicamente defectuosa en linfocitos de pacientes con el síndrome recesivo Wiskott–Aldrich (WAS por sus siglas en inglés). Esta enfermedad está ligada al cromosoma X y se caracteriza por trombocitopenia con plaquetas pequeñas de función reducida, deterioro progresivo de la función de linfocitos T, eczema e infecciones recurrentes (Remold-O'Donnell, *et al.* 1984).

1.3.1.1- Estructura y funciones

El gen que codifica para CD43 se localiza en el cromosoma 16 en humanos, consta de dos exones, y todo su producto de traducción está codificado en el segundo exón (Kudo & Fukuda, 1991). La proteína posee 235 aminoácidos en el dominio extracelular, 23 aminoácidos en el dominio transmembranal y 123 en el citoplasmático. El dominio extracelular es rico en serinas y treoninas, presenta entre 70 y 80 O-glicosilaciones y una posible N-glicosilación en un residuo de asparagina modificable. Este dominio sobresale 45 nm de la membrana y se sugiere que podría funcionar como una antena anunciadora de interacciones, que permiten establecer los primeros contactos intercelulares, ayudando así a la comunicación con células adyacentes y regulando eventos como la adhesión celular, la proliferación, etc. (Ostberg, *et al.* 1998; Rosenstein, *et al.* 1999; Torres-Huerta, *et al.* 2017). CD43 se presenta en dos isoformas: una de 115 kDa y otra de 130 kDa como resultado de diferentes patrones de glicosilación. La isoforma de 130 kDa contiene ramificaciones de hexa sacáridos (NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3) [NeuAc(α 2-3) Gal(β 1-4) GlcNAc(β 1-6) GalNac), mientras que la isoforma de 115 kDa contiene casi exclusivamente tetrasacáridos (NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3) [NeuAc(β 2-6) GalNac). Como resultado de estas modificaciones, la masa de CD43 aumenta más del 50%, ya que el esqueleto proteico pesa alrededor de 54 kDa (Figura 4; Tuccillo, *et al.* 2014).

El dominio citoplasmático carece de actividad enzimática, pero posee treoninas y serinas altamente conservadas entre especies y susceptibles de ser fosforiladas. También contiene una región rica en prolinas a través de la cual CD43 interacciona con proteínas con dominios SH3 tales como la p85 (subunidad reguladora de PI3K) y las tirosin-cinasas Lck y Fyn (Pedraza-Alva, *et al.* 1996, 1998; Alvarado 1995). Además, CD43 tiene dos regiones de localización nuclear encubiertas por dos sitios de unión a proteínas de la familia ERM (Ezrina-Radixina-Moesina), y dos sitios de sumoilación (Bravo-Adame *et al.* 2012). A través de todos estos motivos moleculares, CD43 participa en múltiples eventos de señalización celular.

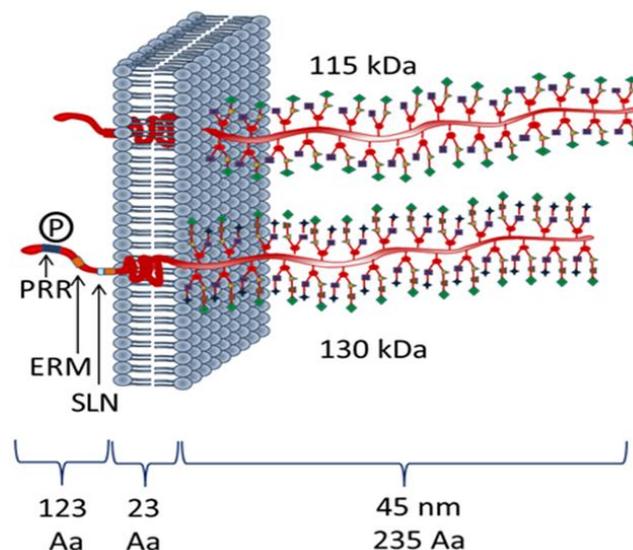


Figura 4.- Estructura de CD43 en linfocitos. Se han descrito dos isoformas de 115 y 130 kDa. El dominio extracelular altamente glicosilado posee 235 aminoácidos (aa), el dominio transmembranal presenta 23 aa, el dominio citoplasmático 123 aa. En el dominio intracelular hay dos sitios de localización nuclear (SLN) encubiertos por sitios de unión a proteínas de la familia ERM (Ezrina-Radixina-Moesina) y una región rica en prolinas, varios residuos de serinas y treoninas fosforilables y dos sitios de sumoilación (Torres-Huerta, 2012[imagen]; Torres-Huerta, *et al.* 2017).

En linfocitos, la abundancia y localización de CD43 está finamente regulada por factores como: cambios en la tasa de transcripción, redistribución en la membrana

plasmática y escisión del dominio extracelular por proteólisis (Revisado en Pedraza Alva y Rosenstein, 2007 y Torres-Huerta, *et al.* 2017). Se tiene poca información acerca de los mecanismos de regulación de los niveles de CD43 en células tumorales.

Esta molécula se describió en células del sistema inmune, por lo que la mayor parte de la literatura se refiere a las funciones en células del linaje leucocitario. Se ha sugerido que CD43 contribuye a la homeostasis del sistema inmune, con múltiples funciones como: regulación de la adhesión celular, de la locomoción, la activación celular, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (Torres-Huerta, *et al.* 2017). Debido a la carga negativa proporcionada por la abundancia de ácidos siálicos, CD43 se ha asociado a procesos de repulsión, así como de adhesión celular (Revidado en Ostberg, *et al.* 1998; Aguilar-Delfín 2006). Las señales de CD43 generadas por entrecruzamiento con anticuerpos anti-CD43 llevan a la activación celular (Park, *et al.* 1991), secreción de citocinas (Santana, *et al.* 2000; Fierro, *et al.* 2006; Pedraza-Alva, *et al.* 2011), agregación celular (Layseca-Espinosa, *et al.* 2003), proliferación (Fierro, *et al.* 2006; Pedraza-Alva, *et al.* 2011), regulación de la apoptosis (He y Bevan, 1999; Bravo-Adame, *et al.* 2016) y migración (Auvynet, *et al.* 2013). Para realizar estas funciones, CD43 requiere de su dominio citoplasmático (Park, *et al.* 1991).

CD43 es ligando de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Rosenstein, 1991) y selectina E (Matsumoto, *et al.* 2005), así como de moléculas MHC-1 (Complejo Mayor de Histocompatibilidad-1); elemento clave en la presentación de antígeno (Stockl, *et al.* 1996). También es ligando de lectinas como Siglec-1 (Van Den Berg, *et al.* 2001) y galectina-1 (Fulcher, *et al.* 2009). Adicionalmente funge como receptor de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* y el virus de la influenza tipo A (Revisado en Aguilar-Delfín, *et al.* 2006 y Torres-Huerta, *et al.* 2017).

Las funciones de CD43 en los procesos tumorales han sido parcialmente descritas, y se resumen en la siguiente sección.

1.3.1.2.- CD43 y cáncer

La mucina CD43 se expresa en la mayoría de los tumores de origen linfoide: en 30% de los linfomas de bajo grado de células B, en 90% de los linfomas de células T y linfomas de células linfoblásticas B y T, en los cuales su presencia se considera un indicador de mal pronóstico de supervivencia (Bravo-Adame, *et al.* 2015, Ma, *et al.* 2015).

Como se mencionó anteriormente, hasta hace unos años, CD43 se consideró una molécula exclusiva de las células del sistema inmunológico. Sin embargo, se ha encontrado expresada en riñón, cuello uterino y cerebro de forma normal, así como en tumores de origen no linfoide como carcinomas de mama, próstata, colon, cérvix y pulmón (Fernández- Rodríguez, *et al.* 2002, Pedraza-Alva y Rosenstein, 2007; Torres-Huerta *et al.* 2017). Por estas razones, CD43 ha sido considerada como indicador de malignidad (Tuccillo, *et al.* 2014).

En carcinomas y adenocarcinomas de colon, se ha descrito una estrecha relación entre la proteína p53 y CD43, habiendo una correlación inversa entre sus niveles de expresión. Las funciones de p53 son detener el ciclo celular y reparar el ADN antes de que las células entren al ciclo celular o bien llevar a las células desreguladas a su eliminación (Kadaja-Saarepuu *et al.*, 2008). Incluso en células tumorales en las que la vía de p53 es defectuosa por mutaciones ya sea en la propia p53 o de ARF (Marco de lectura alternativa, por sus siglas en inglés Alternative Reading Frame), es decir en la mayoría de las células tumorales, la expresión de CD43 se correlaciona con la reducción de los niveles de expresión de Fas, una molécula que participa en la activación de la apoptosis extrínseca (Kadaja, *et al.* 2004; Kadaja, *et al.* 2008). Por otro lado, se ha descrito que el dominio intracelular de CD43 puede ser cortado por acción de una gamma secretasa y trasladado al núcleo donde interactúa con beta-catenina, un protooncogén que favorece la proliferación celular al aumentar los niveles de expresión de c-Myc y ciclina D1 (Andersson, *et al.* 2004; Balikova, *et al.* 2012; Torres-Huerta, *et al.* 2017).

En linfomas murinos de células B, la expresión de CD43, además de regular la entrada al ciclo celular, incrementa la capacidad de supervivencia y proliferación de las células, aún en ausencia de suero, siendo importante para ello la participación del dominio extracelular de la mucina (Treasure, *et al.* 1992; Misawa, *et al.* 1996). En concordancia con lo anterior, datos preliminares del laboratorio obtenidos con células de carcinoma de pulmón (A549) confluentes y con nutrientes limitados, sugieren que CD43 modula positivamente la expresión de proteínas de la familia BCL-2, las cuales regulan la muerte celular (datos no publicados). Asimismo, la expresión de CD43 en líneas tumorales de pulmón (A549) y de mama (MCF7) reducen la susceptibilidad a la muerte celular inducida por TNF α , o la lisis celular medida por células NK (Fu *et al.* 13; Fu *et al.* 2014).

Datos de nuestro grupo indican que, como sucede en linfocitos T (Bravo-Adame, *et al.* 2017), en células A549 la presencia de CD43 conduce a un incremento en la fosforilación de la serina 37 y tirosina 105 de la enzima PKM2 (Tesis de licenciatura, Cañas, A. 2017). Esta enzima regula el último paso de la glicólisis, pero cuando se fosforila en tirosinas ejerce funciones de serin/treonina cinasa no glicolíticas que conducen a la fosforilación de STAT3 y ERK5, promoviendo procesos de proliferación y supervivencia, regulando de esta manera negativamente la apoptosis. La activación de esta vía de señalización se ha correlacionado con malignidad en varios tipos de tumores y se ha vinculado con la reprogramación del metabolismo en el llamado “Efecto Warburg”. Esto facilita el crecimiento y la proliferación tumoral gracias al aumento en la tasa de biosíntesis de nucleótidos, fosfolípidos y aminoácidos, necesarios para generar nuevas células (Yang *et al.* 2012).

Utilizando cultivos confluentes de líneas tumorales de pulmón (A549), cérvix (CaSki) y colon (DLD-1), nuestro grupo ha demostrado que CD43 regula negativamente la vía de Hippo (Camacho-Concha *et al.* 2013), la cual regula la inhibición por contacto del crecimiento celular, evitando que las células continúen dividiéndose (Zeng y Hong, 2008). Esto se lleva a cabo por un mecanismo que

depende de la vía de PI3K-AKT, que conduce a la fosforilación de Merlina, (con lo cual queda marcada para su degradación), y la translocación del coactivador YAP al núcleo. De esta manera, se favorece la transcripción de factores como Myc, promoviendo la entrada a ciclo celular y la proliferación de las células tumorales. Con ensayos de pérdida de función, se demostró que la expresión de CD43 en las líneas tumorales de pulmón (A549), cervix (CasKi) y colon (DLD-1) potencia la capacidad de transformación de oncogenes como E6 y EGFR (Camacho- Concha, *et al.* 2013).

Más recientemente, se estudió el secretoma de células A549, encontrando que sólo las células con niveles normales de CD43, puestas durante 48 horas en condiciones de post-confluencia y baja glucosa, secretan al medio extracelular mayores cantidades de MCP-1, IL-8, neuroserpina, PDGF-D (Platelet Derived Growth Factor-D) y fibrinógeno entre otras. En estas condiciones, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular son los procesos biológicos más favorecidos (Vega-Mendoza, manuscrito en preparación). Dichos procesos son necesarios para la generación de nuevos vasos sanguíneos para conseguir un aporte continuo de nutrientes que el tumor requiere como preámbulo hacia la metástasis del tumor primario (Hanahan y Weinberg, 2011).

En conjunto, estos datos demuestran la participación de CD43 en procesos neoplásicos, en los cuales se favorece la transformación tumoral a varios niveles: regulación de los mecanismos moleculares que controlan la sobrevivencia, la actividad de oncogenes, regulación negativa de la vía de Hippo y remodelación del microambiente tumoral.

1.4.- Cáncer de pulmón

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial y este se clasifica en dos tipos: de células pequeñas y no pequeñas (abundantes y con peor

pronóstico). Este último se subdivide en adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y de células grandes (NIH, 2016). En nuestro país, la incidencia (número de casos nuevos) en 2018 enlistan al cáncer de mama, próstata y pulmón en primero, segundo y tercer lugar respectivamente; sin embargo, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en mortalidad (OMS, 2019). Datos recabados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en el periodo comprendido entre 2009 a 2016 revelan que, más del 80% de los pacientes recibidos con cáncer de pulmón tenían metástasis, 16% propagación a los nodos linfáticos y menos del 2% se encontraban en etapas tempranas donde los tratamientos son más exitosos (INCan, 2018). A pesar del mal pronóstico de esta enfermedad, se sabe que puede ser curada en etapas tempranas gracias a la detección oportuna de biomarcadores. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés: Non-small-cell lung carcinoma) representa aproximadamente el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón; en este subtipo de cáncer se han identificado mutaciones particulares de tirosinas cinasas en EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) y ALK (Linfoma quinasa anaplásica) y gracias a estos conocimientos se han diseñado inhibidores de tirosinas cinasas o bien inhibidores de punto de control como en el caso del oncogén KRAS (Molina, *et al.* 2009; Tfayli, *et al.* 2017; Metro, 2018; Adderley, *et al.* 2019).

En este trabajo, se usó la línea celular A549, un carcinoma epitelial derivado de un paciente masculino de 58 años, que tiene mutaciones para KRAS y EGFR (Rosell, *et al.* 2009) y que expresa endógenamente CD43 (Fu *et al.* 2013). Esta línea celular es un buen modelo celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas para evaluar la participación de CD43 en la capacidad invasora de estas células.

II.- HIPÓTESIS

La expresión de CD43 en las células A549 genera un microambiente que promueve la supervivencia celular y la angiogénesis, contribuyendo a la capacidad invasora de estas células.

III.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Evaluar como CD43 promueve la capacidad invasora y la sobrevida de las células A549, una línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

3.2.- Objetivos particulares

- ❖ Generar clonas de células A549 que expresan niveles endógenos (CD43^{hi}) o reducidos de CD43(CD43^{lo})
- ❖ Evaluar la capacidad de sobrevida de las clonas CD43^{hi} y CD43^{lo}
- ❖ Evaluar el potencial angiogénico de los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} y CD43^{lo}
- ❖ Evaluar la capacidad remodeladora de la MEC de los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} y CD43^{lo}

IV.- RESULTADOS

4.1.- Localización de CD43 en las células A549

La expresión de CD43 ha sido reportada en cortes histológicos de biopsias de pulmón, en donde se ha encontrado expresión tanto en citoplasma como en núcleo (Fu, *et al.* 2013). Por ello nos preguntamos si, al igual que en los cortes histológicos, en monocapas de células A549, CD43 se localiza en estas mismas regiones subcelulares.

Para identificar la localización de CD43 utilizamos el anticuerpo H300, un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce a CD43 humano (dirigido contra los aminoácidos 101-400). Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 como se describe en la sección de Materiales y Métodos para permitir el marcaje en el interior de las células, o bien, se expusieron al anticuerpo sin permeabilizar para detectar la expresión de CD43 en la superficie celular.

Cuando marcamos a CD43 en células no permeabilizadas, estimamos que solo el 30% de las células parecen expresar a la mucina, en comparación con las células permeabilizadas que son todas positivas para CD43. También pudimos observar que CD43 intracelular se expresa con mayor intensidad en células en división celular (Fig. 5A), lo cual puede ser el reflejo de la localización de CD43 en el surco que establece el plano ecuatorial de las células, en el momento de la citocinesis (Yonemura, *et al.* 1998).

Por microscopía confocal, corroboramos que CD43 no se encuentra en la membrana de las células, sino en el citoplasma y que solo algunas células muestran una detección a nivel nuclear (Fig. 5C).

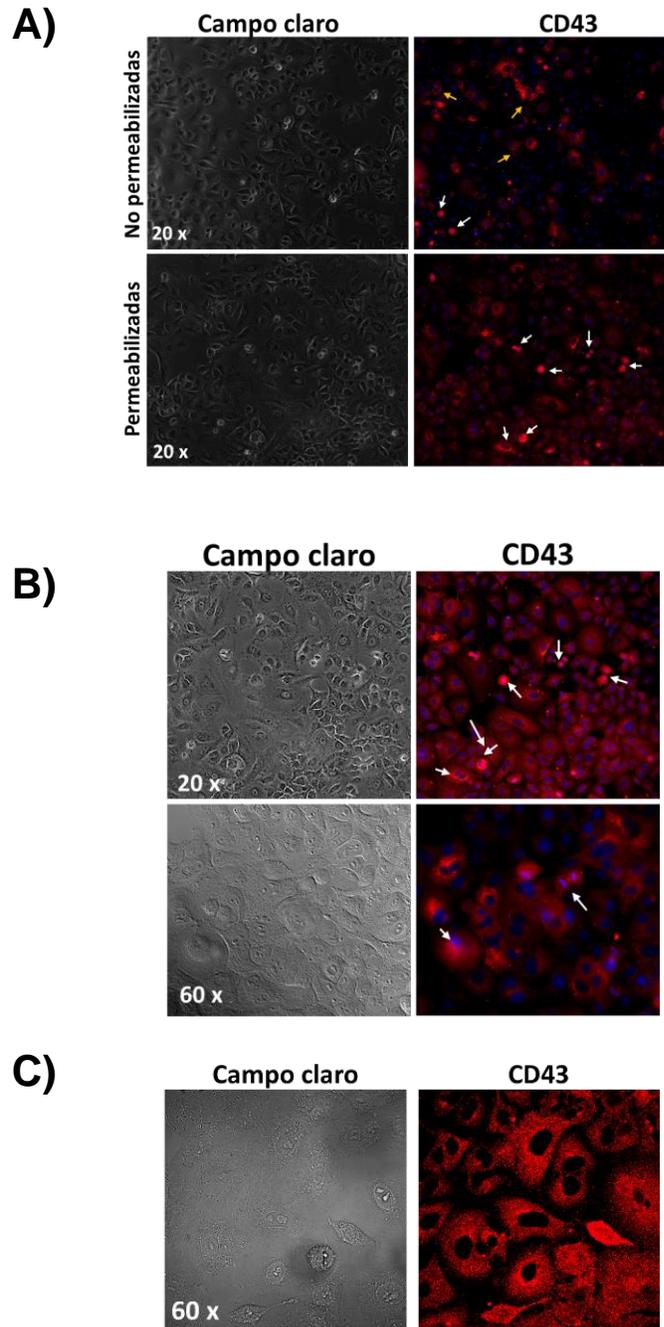


Figura 5.-. Localización de la mucina CD43 en células A549. (A) Células permeabilizadas o no tratadas con el anti-CD43 H300 (rojo) y DAPI (colorante para núcleo, azul). Las flechas blancas señalan células en división con mayor expresión de CD43 y las amarillas CD43 en el contorno de la célula. **(B)** Células permeabilizadas aumentadas 20X y 60X **(C)** Células permeabilizadas en 60X. Estas fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus FV1000.

4.2.-Obtención de clones de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}

Para la obtención clones de células A549 con niveles equivalentes a los endógenos (CD43^{hi}) y reducidos (CD43^{lo}) de CD43 se utilizó el plásmido pSuper, el cual es un vector de expresión en mamíferos que dirige la síntesis de pequeños transcritos del tipo siRNA. El oligonucleótido sintético que codifica el RNA interferente específico (AA ATG GCC ACG CTT CTC CT) para CD43 humano se clonó en los sitios BglIII-Sal1 del plásmido pSuper. Por tanto, para generar las clones, las células se transfectaron con el plásmido vacío (pSuper) o bien el plásmido con el RNAi (pSuper-RNAi).

4.2.1.- Purificación y linearización de los plásmidos

El DNA plasmídico (pSuper o pSuper-CD43 RNAi) se amplificó mediante la transformación de bacterias competentes DH5 α como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El DNA fue cuantificado y para comprobar si el tamaño del plásmido correspondía con el esperado, se digirió con las enzimas de restricción EcoR1 y Sal1 (sitio donde se insertó el RNAi). El producto de la digestión se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En las Fig.6 se muestra el plásmido digerido (D) y sin digerir (SD) respectivamente. El patrón electroforético del DNA de las muestras sin digerir, reveló tanto para pSuper como pSuper- CD43 RNAi, una banda de aproximadamente 9,000 pb y otra 3,500 pb (excepto en la muestra R4), lo cual indica superenrollamiento del plásmido. En todas las muestras digeridas (pSuper y pSuper- CD43 RNAi), se observa una sola banda de aproximadamente 5000pb correspondiente al tamaño del plásmido. En este gel no pudimos detectar el fragmento de 23 pb correspondiente al fragmento del RNAi liberado después del corte con las enzimas. La secuenciación del plásmido confirmó que esta secuencia se encuentra presente en el plásmido (Fig. 7).

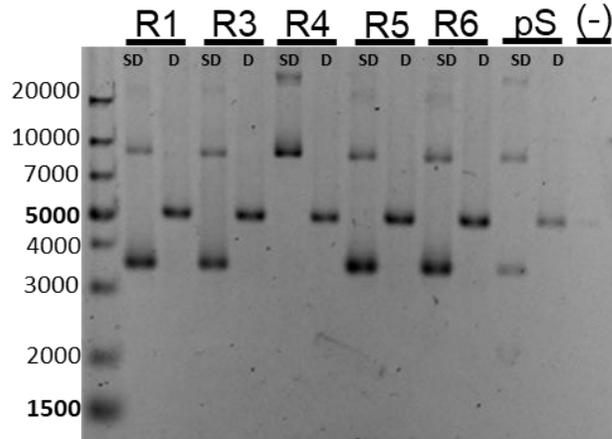


Figura 6.- Patrón de digestión de plásmidos pSuper y pSuper-RNAi. SD, plásmido sin digerir; D, plásmido digerido con EcoR1 y Sal1. El control negativo no tiene plásmido. En los carriles D se observa una banda correspondiente al tamaño del plásmido (pS: pSuper; R: pSuper-RNAi).

Secuencia pSuper- Promotor H1

```
GTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCT
GTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTG
GGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTA
TGAGACCACAGATC
```

Secuencia pSuper- Promotor H1, RNA de interferencia

```
GTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCT
GTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTG
GGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTA
TGAGACCACAGATC[CCCAATGGCCACGCTTCTCCTTCAAGAGAAGGAGAAG
CGTGG]
```

Figura 7.- Secuenciación de los plásmidos pSuper y pSuper-RNAi. Para la secuenciación se emplearon los oligos T3 y T7. En la secuencia de arriba se muestra el promotor H1 del plásmido y en la secuencia de abajo el promotor con el respectivo RNA de interferencia.

Para disponer de suficiente material, purificamos el plásmido pSuper-CD43 RNAi, y el vector vacío con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas) y los linearizamos con la enzima de restricción DralIII para facilitar su integración en las células A549. Al revelar el gel donde se corrieron los plásmidos pSuper-RNAi y solo pSuper, en los carriles SD se observan bandas correspondientes al plásmido enrollado y en los carriles D se visualiza una banda que corresponde con el tamaño del plásmido linearizado (5344 pb) y que indica que el corte con DralIII fue exitoso (Fig. 8).

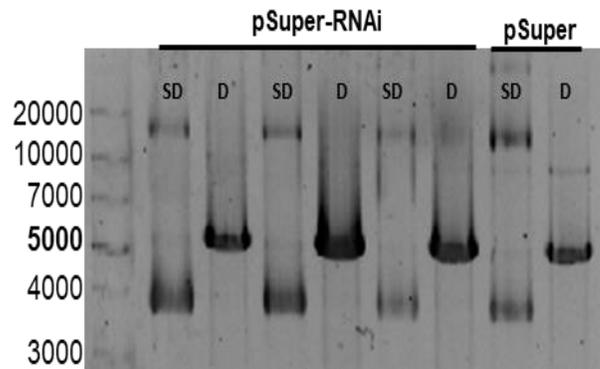


Figura 8.- Linearización de los plásmidos pSuper y pSuper- RNAi. Para facilitar la integración del DNA plasmídico al DNA de las células A549 se realizó un corte con la enzima de restricción DralIII, encontrándose en los carriles D (digeridos con la enzima) una sola banda que corresponde con el tamaño del plásmido y en los carriles SD (sin digerir) bandas de diferentes tamaños correspondientes al plásmido enrollado.

4.2.2.- Transfección y selección de clones

El plásmido pSuper tiene GFP y un cassette de resistencia a neomicina (G418). Previo a la transfección, se realizó una curva de resistencia al antibiótico para determinar la dosis mínima necesaria para matar a las células que no tienen el plásmido que confiere resistencia al antibiótico de selección. Las células A549 WT con 80% de confluencia, fueron expuestas a dosis crecientes de G418 (400ug/mL- 1.5mg/mL), siendo monitoreadas todos los días y recambiando el medio cada tres

días en promedio durante 10 días. La dosis mínima que mata al 100% de las células que no tienen el gen de resistencia a G418 es de 800 µg/ml, lo que concuerda con la concentración reportada para estas células (Altogen, 2017).

Se obtuvieron células positivas para GFP y se evaluaron los niveles de expresión de CD43 por western blot. Si bien, después de la transfección la proporción de células positivas para GFP era de ~20%, después del tratamiento con el antibiótico de selección este porcentaje se incrementó hasta un 60-90%. Para obtener clones independientes, las células transfectadas se sembraron en cajas de 96 pozos a razón de una célula/pozo, sembrándose dos cajas de 96 pozos para las células transfectadas con el vector vacío (pSuper) y cuatro cajas de células transfectadas con el vector pSuper-RNAi. En total se sembraron 192 pozos de las células pSuper y 384 de las pSuper-RNAi, obteniéndose al final del proceso de selección 14 (7.29%) y 49 (12.76%) clones pSuper GFP+ y pSuper-RNAi GFP+, respectivamente.

Para evaluar los niveles de CD43 de las diferentes clones, las células fueron analizadas por citometría de flujo y por inmunoblot. De manera general, tanto por citometría de flujo como de inmunoblot las clones transfectadas con el plásmido pSuper-RNAi presentaron niveles reducidos de CD43 que iban de un 20% hasta un 50% menos en promedio, comparadas con las clones pSuper. Decidimos nombrar a las clones transfectadas con el vector pSuper y que expresaban niveles constitutivos de CD43 “clonas CD43^{hi}” y a las clones que se transfectaron con el RNAi y presentaron reducción en los niveles de expresión de la proteína, como “clonas CD43^{lo}”. A pesar de ser GFP+, algunas CD43^{lo} no mostraron una disminución significativa de la mucina, por lo que reclonamos algunas clones, obteniendo varias clones con una expresión reducida de CD43 como se muestra en la Fig.9A. Asimismo, en el análisis por western blot de otras clones pSuper y RNAi, mostró la reducción de CD43 en las clones CD43^{lo} (Fig. 9B y C). La figura 9 solo muestra algunas clones representativas. Además, para efectos prácticos podríamos usar ambas técnicas de detección y por la facilidad de screening, la

citometría de flujo es más rápida e igual de eficiente que el western blot (ver materiales y métodos).

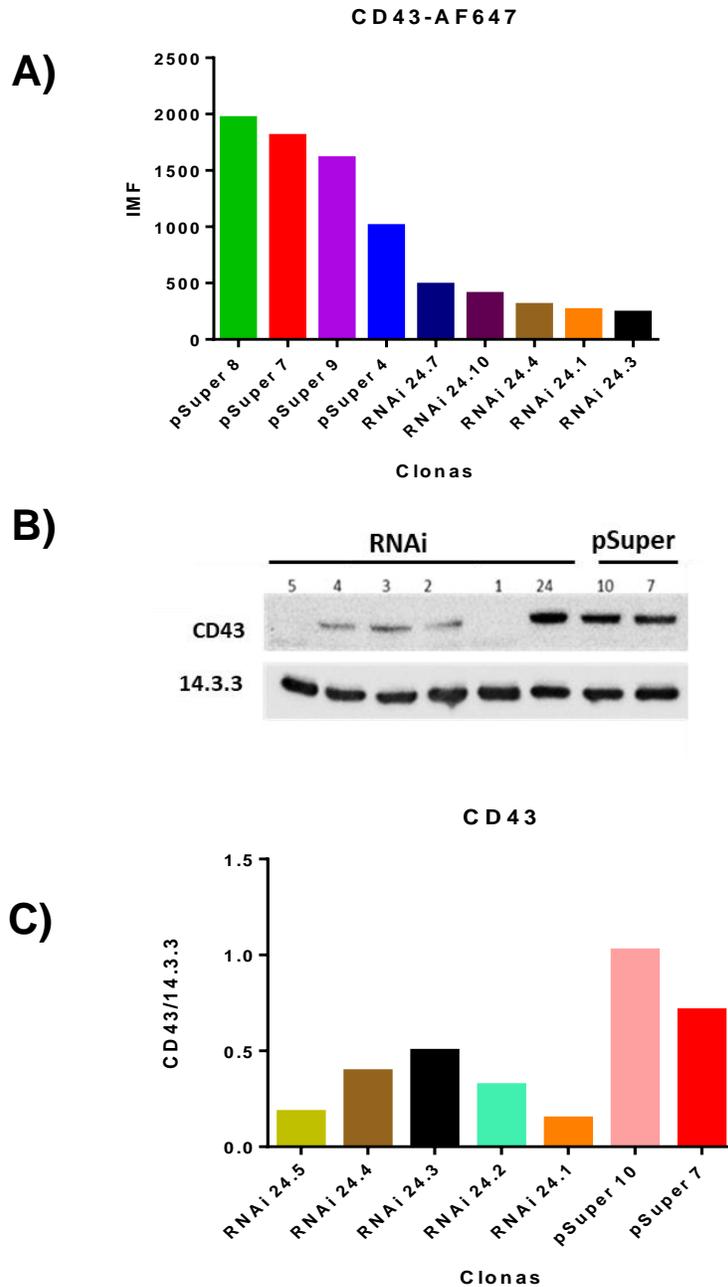


Figura 9.- Selección de clones pSuper y RNAi. (A) Expresión de CD43 evaluada por citometría de flujo con el anticuerpo DFT1 acoplado al fluoróforo AF647 (IMF: intensidad media de fluorescencia). (B) Expresión de CD43 evaluadas por inmunoblot con el anticuerpo H300, se utilizó la proteína 14.3.3 como control de carga. (C) Niveles de expresión de CD43 de las clones mostradas en B, normalizado.

4.3.- CD43 favorece la capacidad de sobrevida en condiciones de nutrientes limitados

Reportes previos indican que la sobreexpresión de CD43 en un linfoma B murino promueve la sobrevida y proliferación de las células, aún en ausencia de suero (Misawa *et al.* 1996) y que el dominio intracelular de CD43 es necesario para proteger a las células de un hibridoma T murino de la muerte inducida por activación (Bravo-Adame, *et al.* 2012). Estas evidencias nos condujeron a evaluar si la reducción del nivel de CD43 incrementaba la sensibilidad de las células A549 a condiciones de estrés proporcionadas por un estado de confluencia y ayuno de 48 horas.

Al término del período de incubación (confluencia y ayuno) las células se despegaron de la placa de Petri y se evaluó la proporción de células vivas mediante una tinción con el colorante de viabilidad eFluor 780 (Fig. 10A). Para este ensayo se utilizaron doce clonas CD43^{hi} y quince clonas CD43^{lo} en cinco experimentos independientes. De manera general, el porcentaje de células vivas es menor en las células CD43^{lo} comparado con las células CD43^{hi} (P= 0.0198). El porcentaje de células vivas en las clonas CD43^{hi} oscila entre el 60-95%, mientras que en el caso de las CD43^{lo} van del 20-90%. Si bien, algunas de las clonas CD43^{lo} tiene un elevado porcentaje de sobrevida, no es el caso de la mayoría de las clonas analizadas (Fig.10B). Estos resultados sugieren que en condiciones de confluencia y nutrientes limitados, CD43 contribuye a la sobrevida de las células.

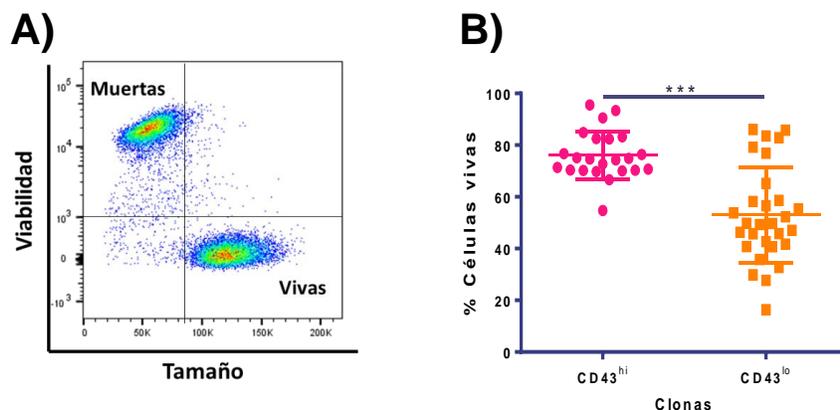


Figura 10.- Las clonas pSuper sobreviven mas que las clonas RNAi en condiciones de confluencia y nutrientes limitados. (A) Ventana de análisis para seleccionar células vivas y muertas teñidas con eFlour 780. **(B)** Gráfico que representa el porcentaje de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} vivas. Cada punto de la gráfica representa una clona puesta en las condiciones experimentales al menos una vez en los 5 ensayos (P= <0.0198 de cinco experimentos independientes, prueba t de Student).

4.4.- Los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} tienen mayor capacidad angiogénica

4.4.1.- Anillos aórticos

Previo a este estudio, en nuestro laboratorio se realizó un análisis de proteómica del secretoma de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} confluentes y en ayuno (medio sin suero) por 48 horas. Dicho análisis reveló que las células A549 CD43^{hi} secretan una gran variedad de proteínas relacionadas principalmente con procesos de angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular (Vega-Mendoza, manuscrito en preparación). En función de este resultado, evaluamos si la expresión de CD43 promueve la secreción de moléculas que favorecen la angiogénesis.

Para evaluar la capacidad angiogénica de los sobrenadantes de cultivo de las clonas CD43^{hi} y CD43^{lo} se realizaron ensayos con anillos de aortas de ratón. Este modelo se basa en la capacidad de los explantes aórticos de formar nuevos vasos, cuando son embebidos en Matrigel, una mezcla gelatinosa rica en proteínas estructurales como colágeno y algunos factores de crecimiento (EGFR,

FGF, PDGF). El crecimiento angiogénico de los explantes aórticos consiste en una población mixta de células (endoteliales, pericitos, fibroblastos, macrófagos y dendríticas) que interactúan mediante mecanismos paracrinos y bajo condiciones químicas de cultivo definidas (Nicosia, 2009). Se evaluaron los sobrenantes pSuper 5,6,7,10 y 11; y los pSuper-RNAi 24.1,2,3,4,5,6,7,8,17 por triplicado, en cinco experimentos independientes.

Al término del período de incubación, se documentó fotográficamente el crecimiento de los anillos utilizados. A partir de las fotografías se calculó el área de crecimiento de los vasos sanguíneos formados en respuesta a los factores angiogénicos contenidos en los sobrenadantes de las células A549 CD43^{hi} o CD43^{lo}, como se describe en la metodología. En la imagen representativa se muestra la clona pSuper 10 y la pSuper-RNAi 24.1 (Fig.11A).

El análisis de las fotografías reveló que los sobrenadantes de células CD43^{hi} inducen mayor crecimiento de vasos sanguíneos en comparación con los sobrenadantes provenientes de células CD43^{lo} (Fig. 11B). Esto concuerda con el hecho de que las células CD43^{hi} producen mayor cantidad de factores promotores del proceso angiogénico y que el proceso biológico mayormente enriquecido en estos sobrenadantes fue la angiogénesis (Vega-Mendoza, manuscrito en preparación).

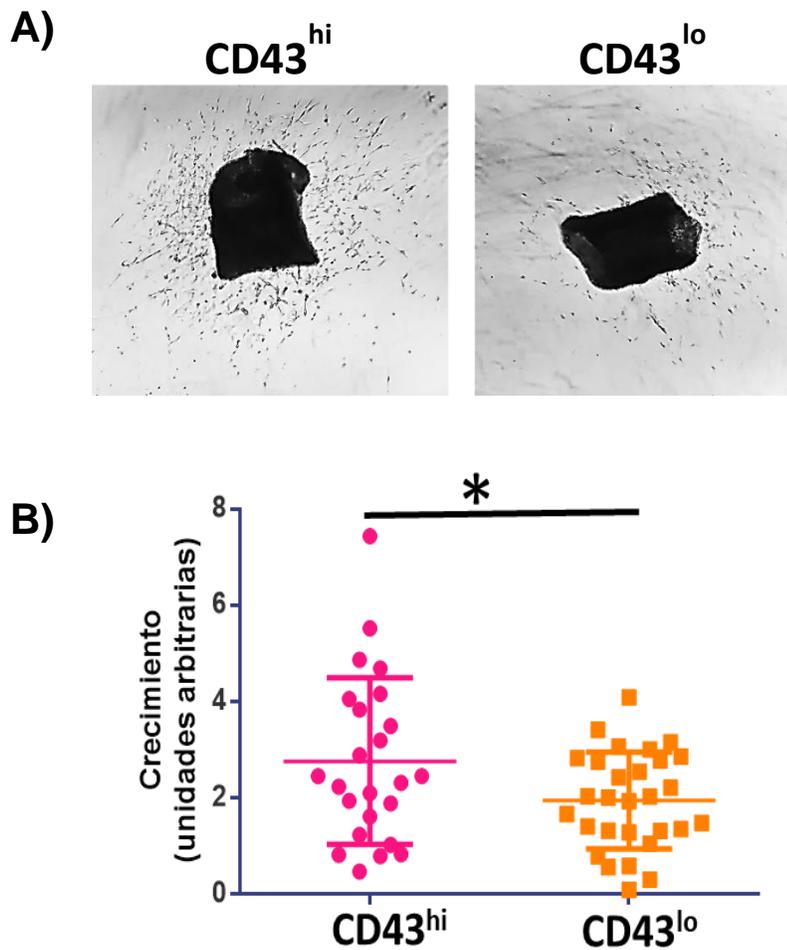


Figura 11.- Las sobrenadantes de células CD43^{hi} poseen mayor capacidad para estimular el crecimiento de vasos sanguíneos. (A) Microfotografía representativa del crecimiento de vasos en un anillo aórtico de ratón cultivado con sobrenadantes de células CD43^{hi} o CD43^{lo} (dilución 1:1) **(B)** Crecimiento de vasos producido por sobrenadantes de clonas CD43^{hi} (n=24) y CD43^{lo} (n=29), evaluado 72 h después de agregar los sobrenadantes a los anillos aórticos. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student, P=0.0363

4.5.2.- Ensayos de formación de tubos

4.5.2.1.- Establecimiento de las condiciones experimentales

Cómo se mencionó anteriormente, el ensayo de angiogénesis de anillos aórticos es una medida del potencial angiogénico de un medio condicionado en el que se mide el área resultante de una entramada red en la que los fibroblastos, los macrófagos y las células endoteliales se reúnen y organizan, y dan lugar a la

neovascularización. En línea con lo anterior se evaluó el potencial angiogénico de los sobrenadantes provenientes de cultivos confluentes y en ayuno de clonas CD43^{hi} y CD43^{lo} en un modelo más sencillo, el modelo de formación de tubos con células endoteliales humanas inmortalizadas, las células TeloHAEC.

La densidad celular tiene un profundo impacto en la formación de tubos y es necesario que las células dispongan de espacio suficiente para migrar y conectarse con otras células. Cuando se siembra un número insuficiente de células sobre la matriz, se forman pocos tubos y la red es mínima. A medida que se siembran más células, la red de tubos se hace más extensa, pero si hay demasiadas células, se inhibe la formación de tubos (DeCicco-Skinner, *et al.* 2014). En primer lugar, se determinó la concentración celular óptima, así como el porcentaje de suero necesario y el tiempo óptimo para la formación de los tubos. La concentración celular que elegimos para hacer los ensayos fue de 20,000 células, con esta cantidad pudimos generar una red de tubos óptima, además adicionamos al medio basal vascular 2% de suero (Fig.12A). Las células endoteliales migran y comienzan a formar pequeñas ramas 1-2 horas después de la siembra. A las 6 horas, los tubos están bien definidos, por tanto, fue el tiempo seleccionado para evaluar el potencial angiogénico de los sobrenadantes de las células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}. El registro fotográfico revela que a las 24 horas las estructuras tubulares se ven cada vez más separadas (Fig. 12B).

Las imágenes tomadas fueron procesadas con el programa ImageJ con el complemento "Analizador de Angiogénesis". Se generó un mapa con los elementos (nombre genérico de los parámetros) que brinda el programa: nodos, tubos, mallas, extremos, entre otros (Fig. 12C).

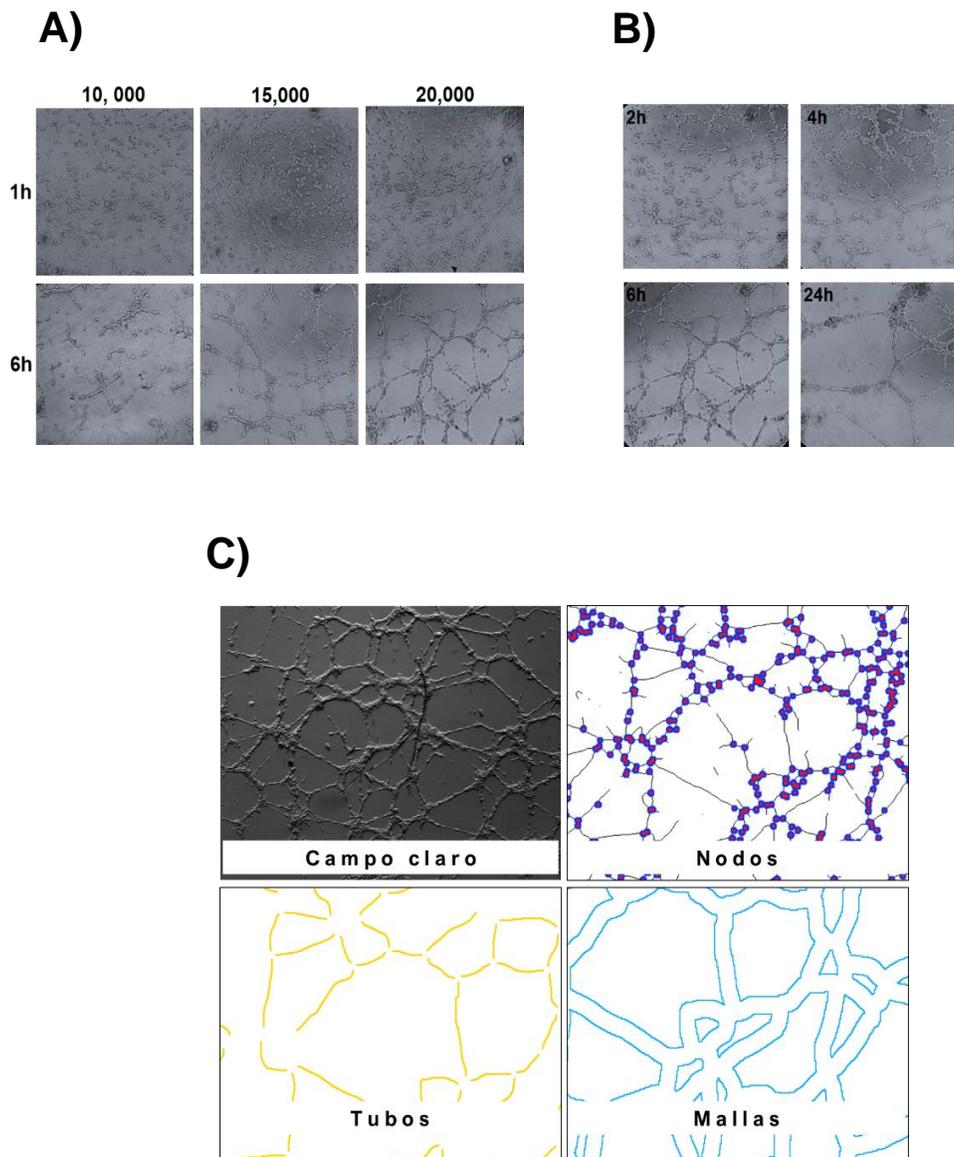


Figura 12.- Formación de tubos de células TeloHAEC. (A) Efecto del número de células para formación de tubos de células endoteliales. Se sembraron 10,000, 15,000 y 20,000 células. **(B)** La formación de tubos se registró a la 1,2, 4, 6 y 24 h, siendo las 6 horas el tiempo elegido para el análisis de imágenes. **(C)** Imagen de microscopía en campo claro y acercamiento a los elementos evaluados. Los nodos son el punto en donde convergen uno o más tubos se representan en color rojo, los tubos en amarillo y las mallas en azul (fotografías tomada con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, aumento 5X).

4.5.2.2.- Potencial de formación de tubos de los sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo}

Para evaluar el potencial de formación de tubos de los sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo}, se consideró el número de tubos, nodos, mallas y el índice de angiogénesis en áreas equivalentes en cada uno de los pozos. Se evaluaron las clonas pSuper 5, 6, 7,8, 10 y RNAi 24.1,3,4, J en 3 experimentos independientes. La figura 13 muestra un experimento con algunos de los sobrenadantes utilizados, así como sus respectivos mapas de elementos (Fig. 13A). Además, una figura representativa en donde se comprara la formación de tubos inducida por sobrenadantes de células CD43^{hi} y CD43^{lo} con los parámetros evaluados (Fig.13B).

El análisis de los mapas de elementos de las clonas reveló diferencias estadísticamente significativas en el número de nodos ($P=0.0126$), tubos ($P=0.0083$) y mallas ($P=0.0046$), demostrando así, el potencial angiogénico de los sobrenadantes CD43^{hi}. Además, obtuvimos un índice de angiogénesis a partir del número de nodos, tubos, mallas y extremos sueltos (pequeños segmentos aislados), resultando para las clonas CD43^{hi} de 6.38 y para las CD43^{lo} de 4.59 y una tasa de cambio (fold change) de 1.38 (Fig. 14). Otra diferencia encontrada en las imágenes analizadas es que el área media de las mallas en clonas CD43^{lo} es significativamente mayor que en las clonas CD43^{hi} ($P=0.0328$, Fig. 15), de tal forma que, además de presentar un mayor número de tubos con extremidades truncas, los pozos de células TeloHaec cultivados con los sobrenadantes de las clonas CD43^{lo} tienen pocos tubos conectados entre ellos, lo que resulta en una densidad de mallas menor.

Estos resultados son consistentes con los ensayos de anillos aórticos que demuestran el potencial angiogénico de CD43 para formar vasos sanguíneos y además nos brindan información acerca del alcance de la mucina para favorecer la angiogénesis en un solo tipo de células protagonistas del proceso de angiogénesis como lo son las células endoteliales.

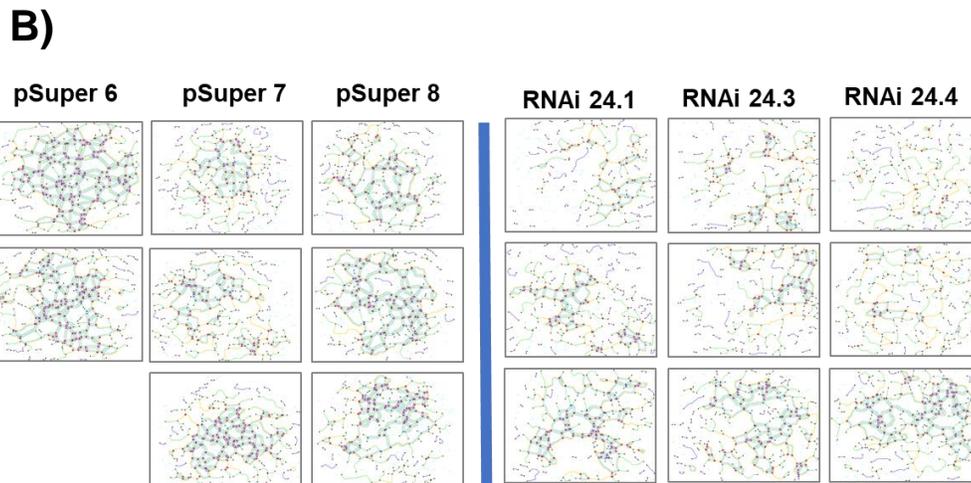
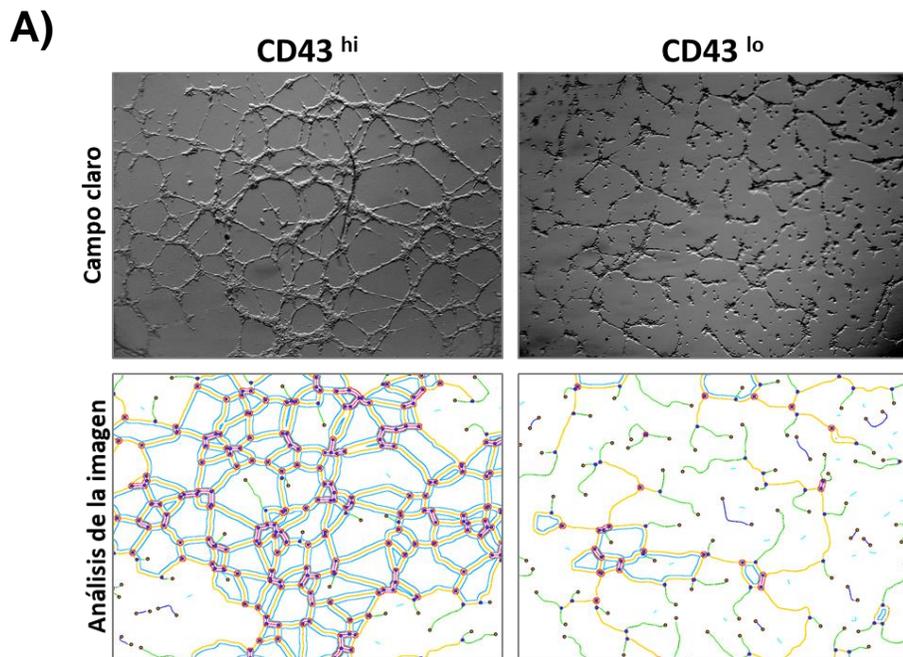


Figura 13.- Formación de tubos estimulados con sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo}. (A) Imagen representativa de la formación de tubos producto de la estimulación con sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo}, y mapas de elementos (tubos, nodos y mallas) generados con el analizador de imágenes. (fotografías tomadas con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, aumento 5X). (B) Mapas de elementos (nudos, tubos, mallas, entre otros) obtenidos a partir del análisis de las fotografías de los pozos de células TeloHaec cultivadas con diferentes sobrenadantes)

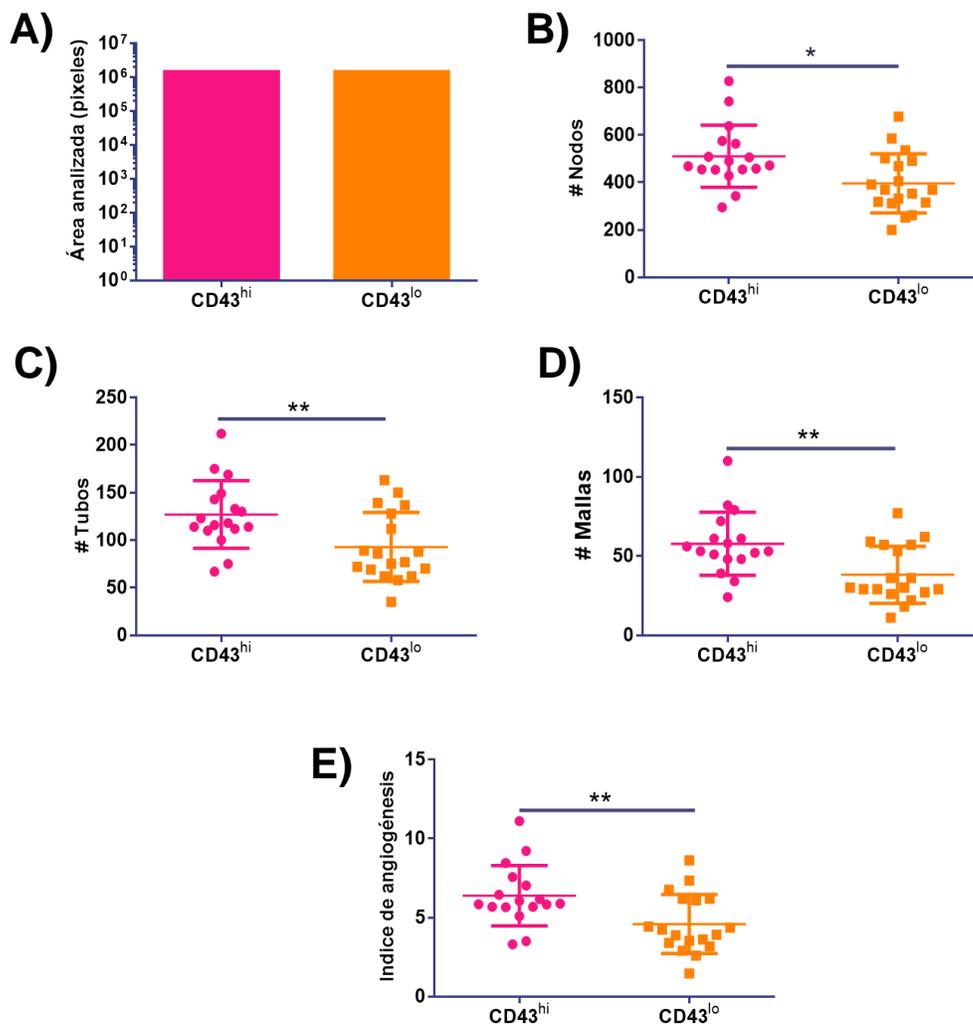


Figura 14.- Los sobrenadantes del cultivo de células CD43^{hi} tienen mayor capacidad de formación de tubos. Se agregaron sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo} a células endoteliales TeloHAEC. Con las fotografías tomadas después de 6 horas, se obtuvieron mapas de elementos y se evaluaron: **(A)** El área total analizada, es la misma para ambos tipos de sobrenadantes. **(B)** Número de nodos. **(C)** Número de tubos. **(D)** Número de mallas formadas con sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo}. **(E)** Índice de angiogénesis, construido a partir de mediciones del número de nodos, tubos y mallas. Se utilizaron 5 clones CD43^{hi} y 4 clones CD43^{lo} diferentes con tres replicas cada una.

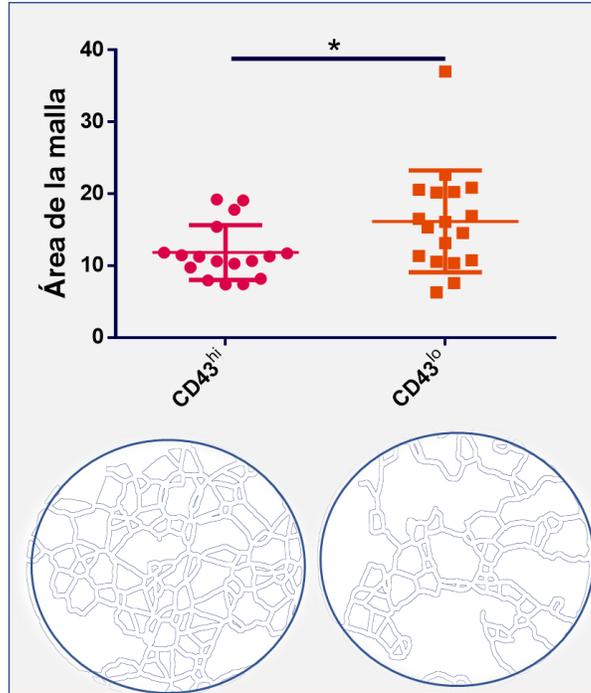


Figura 15.- Los sobrenadantes de los cultivos CD43^{lo} tienen mayor área media de la malla. Los sobrenadantes de clones CD43^{hi} generaron mayor número de mallas, pero entrecruzamientos más pequeños que sus contrapartes CD43^{lo} (P=0.0328, medido en pixeles). Se muestran los resultados de experimentos independientes, con 5 clones pSuper y 5 clones pSuper-RNAi.

4.6.- Los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} tienen mayor capacidad de degradación de la matriz extracelular

La angiogénesis es un proceso invasivo que requiere de la proteólisis de la matriz extracelular para dar paso a las células endoteliales que formarán los nuevos vasos sanguíneos. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) degradan selectivamente los componentes de la matriz extracelular (Kupai, *et al.* 2010), y participan en la angiogénesis (Devorak, 2015). El análisis del secretoma de las células A549 reveló que CD43 participa en la remodelación de la matriz extracelular, por lo que evaluamos la presencia de moléculas de remodelación de la MEC en los sobrenadantes de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}.

La línea celular A549 expresa MMP-2 y MMP-9 (Yang-Ling, *et al.* 2014), por lo que realizamos un ensayo de zimografía, usando gelatina como sustrato, para evaluar si los sobrenadantes de las clonas CD43^{hi} y CD43^{lo} secretan estas MMP de manera diferencial. Los zimogramas revelaron que los medios condicionados de las clonas pSuper A549 contenían dos proteínas gelatinolíticas, una que migró a 62 y la otra a 82 kDa. La identidad de estas proteínas se confirmó por inmunoblot, detectando la forma activa (63kDa) y de pro-enzima (72 kDa) de la MMP-2 y la pro-enzima de la MMP-9 vista ligeramente más arriba de lo 92kDa, así como varias formas activas (Fig. 16 B y C) y por un ensayo de zimografía en presencia de un inhibidor específico de MMP-2 / MMP-9 (Fig. 16 D). Los medios condicionados de las clones CD43 RNAi A549 contenían solo trazas de MMP-2, mientras que MMP-9 no se detectó en la mayoría de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos en tres experimentos independientes empleando cinco clonas CD43^{lo} y seis clonas CD43^{hi} sugieren que en los sobrenadantes de las clonas CD43^{hi} tienen mayor capacidad de degradar la gelatina que los sobrenadantes de las clonas CD43^{lo} y que la MMP-2 es más abundante que MMP-9. Haciendo una prueba de correlación de Pearson, entre los niveles de expresión de CD43 y la presencia de MMP-2 o MMP-9 en los secretomas de las clonas analizadas, encontramos que hay una correlación positiva entre los niveles de expresión de CD43 y la capacidad de degradar gelatina por ambas MMP [MMP-2

($P < 0.0001$, $r = 0.9560$) y MMP-9 ($P = 0.0005$, $r = 0.8950$)]. Estos resultados son consistentes con informes anteriores que indican que las células A549 expresan más MMP-2 que MMP-9, y apuntan a un papel de CD43 en promover la secreción al medio extracelular dos de las MMP consideradas como clave papel en la degradación y remodelación de la MEC en NSCLC.

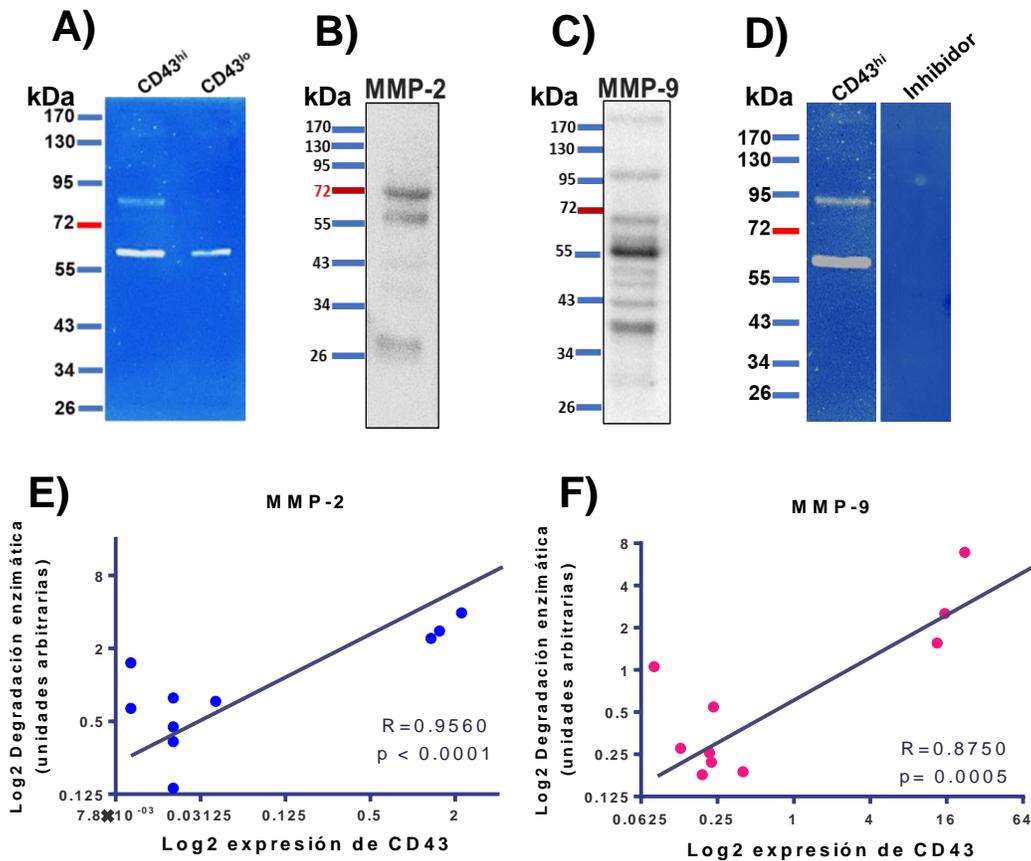


Figura 16.- Los sobrenadantes de las células A549 CD43^{hi} secretan mayor cantidad de metaloproteasas que sus contrapartes CD43^{lo}. (A) Tinción con azul de Coomassie para observar la degradación de la gelatina con sobrenadantes de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}. (B) Detección de MMP-2 por inmunoblot en sobrenadante CD43^{hi} (C) Detección de MMP-9 por inmunoblot en sobrenadante CD43^{hi} (D) Comprobación de que las bandas que representan la degradación del sustrato corresponden a la MMP-2 y MMP-9; en presencia del inhibidor específico de las metaloproteasas, las bandas ya no aparecen. (E) Correlación entre el nivel de expresión de CD43 de las células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} y la degradación de la gelatina con la MMP-2. (F) Correlación entre el nivel de expresión de CD43 en las células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} y la degradación de la gelatina con la MMP-9.

V.- DISCUSIÓN

5.1.- Localización de CD43 en las células A549 y sus posibles implicaciones

CD43 es una glicoproteína de membrana que durante mucho tiempo fue considerada exclusiva de células hematopoyéticas, pero ha sido encontrada en numerosos tumores no linfoides como carcinomas de mama, próstata, colon, cérvix y pulmón (Fernández - Rodríguez, *et al.* 2002; Torres-Huerta, *et al.* 2017). En este trabajo nos centramos en estudiar algunas de las funciones de CD43 en la línea celular A549, la cual proviene de un carcinoma de pulmón de células pequeñas. A pesar de que el primer reporte acerca de la expresión de CD43 de manera constitutiva en tumores de pulmón, y en particular tumores de NSCLC (Santamaria, *et al.* 1996) fue publicado hace ya más de 20 años, es poco lo que se sabe acerca de cómo CD43 contribuye a la transformación celular. En un trabajo previo, nuestro grupo demostró que la expresión de CD43 inhibe la vía de Hippo, por una vía dependiente de AKT-Merlín (Camacho-Concha, *et al.* 2013). En este trabajo nos enfocamos en evaluar si CD43 favorece la supervivencia de las células tumorales A549 cuando son expuestas a condiciones de estrés como la falta de suero o glucosa, así como a evaluar si la expresión de CD43 promueve la capacidad invasora de las células A549.

A diferencia de las células linfoides, en tumores NSCLC, CD43 no es una proteína transmembranal, sino que es una proteína intracelular. Nuestros datos de microscopia de fluorescencia con células A549 WT lo confirman. De manera interesante, las imágenes que obtuvimos muestran que en las células en división CD43 parece concentrarse en el surco mitótico que se forma al inicio de la citocinesis, como ha sido descrito anteriormente en fibroblastos de ratón en los que se introdujo una quimera construida con el dominio extracelular de E-cadherina y el dominio intracelular de CD43 (Yonemura, *et al.* 1993).

Se ha reportado que en células de tumores NSCLC, CD43 puede encontrarse en el núcleo; sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales y con los anticuerpos que empleamos, no detectamos a CD43 en el núcleo. En el trabajo de Fu *et al.* (2013) en el que se describe que CD43 se puede encontrar en el núcleo de las células tumorales, se usó el anticuerpo de conejo (SSGZ) que reconoce los últimos 26 aminoácidos del dominio intracelular de CD43. Esta discrepancia podría deberse a que los anticuerpos que empleamos (DFT-1, un anticuerpo monoclonal que reconoce epítopes sialilados de CD43, y H300 un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra los aminoácidos 101-400) están dirigidos contra epítopes localizados hacia el extremo amino-terminal de CD43. También es posible que CD43 se procese y que el anticuerpo SSGZ, reconozca el fragmento resultante de ese procesamiento, mientras que los anticuerpos DFT-1 y H300 reconocen epítomos distintos, localizados probablemente en la porción amino-terminal de la molécula. Cabe mencionar que se ha descrito que el procesamiento de CD43 por la gama secretasa libera el dominio intracelular de CD43 (Andersson, *et al.* 2005), que se ha encontrado en el núcleo, asociado a los cuerpos promielocíticos, lo cual se ha asociado a procesos de sobrevivencia (Seo, *et al.* 2009). Se puede especular que la localización de CD43 pudiera estar asociada a la agresividad del tumor. En los carcinomas de células pequeñas (SCLC), casi exclusivamente se encuentra en el núcleo y es poco frecuente encontrarla en citoplasma, a diferencia de los NSCLC en donde si se encuentra en citoplasma y núcleo. Estos resultados indican que los tumores NSCLC son más agresivos que los SCLC (Fu, *et al.* 2013).

Los datos de microscopia que mostramos, fueron obtenidos con células silvestres (A549 WT). Queda pendiente evaluar la distribución de CD43 en las células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}, bajo las condiciones de estrés a las que fueron sometidas.

5.2.- CD43 favorece la capacidad de sobrevivida en condiciones de nutrientes limitados

La mucina CD43 puede participar en la apoptosis extrínseca (tipo de muerte celular mediada por la activación de receptores de muerte en la membrana plásmatica) en linfocitos (He y Bevan, 1999) y en células no linfoides (Kadaja, *et al.*, 2008; Fu, *et al.* 2013 y 2014), así como en la intrínseca modulando la expresión de Bim, Bax y Mcl-1 (Tesis Cañas, 2017). Además, se ha demostrado que CD43 es necesario para proteger de la muerte inducida por activación a las células de un hibridoma T murino de la muerte inducida por activación (Bravo-Adame, *et al.* 2016).

Consistente con la información de los trabajos realizados en linfocitos, y en células tumorales, nos dimos a la tarea de evaluar si el nivel de expresión de CD43 incide sobre la capacidad de las células A549 de resistir a la muerte. Se cultivaron células A549 confluentes en condiciones de nutrientes limitantes (componentes del suero) para simular un microambiente tumoral. Bajo estas condiciones experimentales, encontramos que expresar niveles reducidos de CD43 merma la capacidad de sobrevivir, en comparación con células en las que no se interfirió la expresión de CD43. Este resultado está en concordancia con reportes que sugieren que reducir la expresión de CD43, puede vulnerar la capacidad de sobrevivida de células tumorales tanto no linfoides (Kadaja, *et al.*, 2008; Fu, *et al.* 2013 y 2014) como en linfocitos bajo estímulos de muerte (He y Bevan, 1999; Bravo-Adame, *et al.* 2016). En conjunto, estos resultados indican que CD43 favorece la sobrevivida en ambientes hostiles de crecimiento, lo cual favorece el proceso tumoral y conduce hacia la adquisición de otras características de cáncer tales como la migración celular y la angiogénesis.

5.3.- Los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} tienen mayor capacidad angiogénica

Los tumores dependen de la angiogénesis para su supervivencia y propagación. Para que la masa tumoral se incremente, los tumores necesitan estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos para asegurar el aporte continuo de nutrientes y establecer las condiciones para migrar a otros sitios así como para garantizar deshacerse de los desechos generados (Nishida, et al 2006). Los tumores producen varios de los factores de crecimiento involucrados en la angiogénesis tumoral, entre ellos el VEGF. Dentro del esquema básico de tratamiento se busca su inhibición a través del uso del anticuerpo monoclonal Bevacizumab, el cual inhibe la unión de VEGF con su receptor (Folkman, 2002; Nishida, et al 2006). Por ello, la inhibición del proceso angiogénico se considera un blanco terapéutico para suprimir el crecimiento tumoral (Vasudev & Reynolds, 2014). Se ha reportado que en blancos terapéuticos ya establecidos, como el caso de VEGF se suprime el crecimiento de los vasos tumorales recién formados, pero es menos eficaz contra la vasculatura tumoral más establecida (Helfrich, et al.2010).

En un estudio en el que se cocultivaron células A549 y monocitos de sangre periférica humana, se evaluó el potencial y la expresión de factores angiogénicos en el medio condicionado resultante. Los resultados permitieron concluir que en conjunto las células tumorales y los monocitos, aumentan significativamente la actividad quimiotáctica de células endoteliales, favoreciendo la formación de nuevos vasos (White, et al. 2001). Nos preguntamos si expresando diferentes niveles de CD43 se modificaría de alguna manera la composición cualitativa y cuantitativa del secretoma de las células A549 crecidas bajo condiciones de estrés (confluencia y falta de nutrientes como glucosa y suero). El análisis proteómico del secretoma reveló que la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular son los procesos biológicos más representados. Todas las clonas CD43^{hi}, secretaron una mayor cantidad y diversidad de moléculas asociadas a estos procesos (Vega-Mendoza, manuscrito en preparación). Las clonas utilizadas para

análisis proteómico fueron distintas a las utilizadas en el presente trabajo, lo cual fortalece los resultados obtenidos y nos habla de procesos dependientes de CD43 y no particular de las clonas.

Por otro lado, evaluamos la capacidad angiogénica de los sobrenadantes de cultivo de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} confluentes cultivadas por 48 horas en ausencia de nutrientes. Los resultados que obtuvimos con el modelo de anillos aórticos confirmaron los resultados del análisis proteómico de los sobrenadantes de las clonas de células A549 CD43^{hi}. En términos generales, la respuesta angiogénica en las aortas estimuladas con sobrenadantes CD43^{hi} fue mayor que la de los explantes estimulados con sobrenadantes CD43^{lo}.

Como mencionamos anteriormente, los anillos aórticos son un modelo biológico complejo en el que varios linajes celulares se coordinan para iniciar la neovascularización. Cada uno de estos linajes celulares a su vez puede secretar distintos factores pro-angiogénicos, por lo resulta complicado evaluar la capacidad angiogénica específica de los sobrenadantes de cultivo que probamos. Por esta razón, evaluamos la capacidad angiogénica de los sobrenadantes de cultivo de las distintas clonas de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} en un modelo más sencillo, el modelo de formación de tubos con células endoteliales. Este modelo explota la capacidad que tienen las células endoteliales de organizarse espontáneamente en estructuras semejantes a los vasos capilares en respuesta a las señales angiogénicas presentes en un medio condicionado (DeCicco-Skinner, *et al.* 2014).

Con el modelo de formación de tubos, observamos nuevamente que los sobrenadantes de las clonas de células A549 CD43^{hi} tienen mayor capacidad angiogénica que los sobrenadantes de células A549 CD43^{lo}. En todos los casos, la trama formada por las células endoteliales fue más grande y más organizada con el sobrenadante de la clona A549 CD43^{hi}. Notoriamente, las células endoteliales cultivadas con los sobrenadantes de células A549 CD43^{lo}, no forman redes completas sino grandes cúmulos de tubos cortos.

5.4.- Los sobrenadantes provenientes de clonas CD43^{hi} tienen mayor capacidad de degradación de la matriz extracelular

La migración es una característica necesaria para la invasión tumoral (Polacheck, *et al.* 2013). Una célula tumoral necesita desprenderse de la masa tumoral y de la membrana basal para poder migrar a otros tejidos a través del flujo sanguíneo (Salvatore, *et al.* 2017; Paolillo & Schinellicina, 2019). La degradación de la membrana basal requiere de metaloproteinasas de matriz (MMP) y niveles elevados de expresión de diferentes MMP están asociados con una etapa metastásica en la progresión de diversos tipos de tumores (Kessenbrock, *et al.* 2010). La expresión de las MMP es regulada por factores de crecimiento o citocinas, y también por los contactos de las células tumorales con la MEC (Westermarck, *et al.* 1999). Las células A549 son productoras de metaloproteasas (Roomi, *et al.* 2009; Yang-Ling, *et al.* 2014).

En un trabajo previo, nuestro grupo describió que la mucina CD43 permite el crecimiento independiente de anclaje de las células A549 (Camacho-Concha, *et al.* 2013), lo cual constituye una de las premisas para que una célula tumoral pueda migrar. Aunque en nuestro análisis proteómico no encontramos metaloproteasas, encontramos moléculas vinculadas con la remodelación de la matriz extracelular y que eso depende de los niveles de expresión de CD43. Esto nos llevó a evaluar la presencia de metaloproteasas (MMP-2 y MMP-9) en los sobrenadantes de cultivo de las clonas A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}. En los 11 sobrenadantes evaluados encontramos degradación de gelatina producto de la acción de la MMP-2 y/o MMP-9, resultados que concuerdan con reportes previos que demuestran que la línea celular A549 expresa esas metaloproteinasas (Merchant, *et al.* 2017). Consistente con estas observaciones, en los sobrenadantes CD43^{lo} estas últimas se encuentran en una menor proporción. En los sobrenadantes de algunas clonas (CD43^{hi} y CD43^{lo}) no encontramos MMP-9 lo que concuerda con reportes que indican que las células A549 producen más MMP-2 que MMP-9 (Fig. 16A) (Cai, *et al.* 2017). Estos resultados además

sustentan el hecho que la MMP-2 y MMP-9 promueven la angiogénesis (Bergers, *et al.* 2000; Rojiani, *et al.* 2010). Consistentemente, los sobrenadantes CD43^{lo}, mostraron una menos degradación de sustrato, generaron menos tubos y en general tuvieron menor crecimiento angiogénico.

VI.- CONCLUSIONES

- La expresión de CD43 es importante para la sobrevivencia de las células A549 cultivadas en condiciones de confluencia y sin suero. CD43 proporciona señales que incrementan la resistencia a condiciones adversas y proporciona a las células capacidades para enfrentar el estrés.
- Los sobrenadantes provenientes de células A549 CD43^{hi}, favorecen la formación de vasos sanguíneos en ensayos de anillos aórticos, así como formación de tubos en soportes sólidos en comparación con sobrenadantes CD43^{lo}.
- Los sobrenadantes de células A549 CD43^{hi} cultivadas en condiciones de confluencia, baja glucosa y sin suero contienen mayores cantidades de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y, tienen una mayor capacidad de remodelación de la matriz extracelular.
- Por su participación en procesos biológicos cruciales durante el desarrollo tumoral, los resultados que mostramos en este trabajo señalan que CD43 además de considerarse como un marcador de malignidad, es un posible blanco de terapéutico como ha sido sugerido por Tuccillo, *et al.*

VII.- PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, las perspectivas de trabajos futuros están orientados en tres direcciones. En primer lugar, la implementación del sistema CRISPR-Cas9 para abatir completamente la expresión de CD43 y estudiar el impacto del mismo en referencia a la supervivencia y la angiogénesis tumoral. En segundo lugar, demostrar en un modelo *in vivo* que CD43 tiene una participación importante en angiogénesis a través de “ensayos de tapón” con Matrigel. Esta es una técnica simple para detectar los vasos sanguíneos recién formados en tapones de gel trasplantados en ratones desnudos. Además, sería interesante utilizar inhibidores de moléculas que participan en el proceso angiogénico para tratar de revertir el efecto que tiene CD43 sobre las células como otra forma de demostrar el papel de esta mucina. Finalmente, en tercer lugar, sabiendo que para desencadenar el proceso de angiogénesis uno de los factores inductores más importantes es la hipoxia, sería importante cuantificar, en esta condición, los niveles de expresión de la proteína HIF-1.

VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS

8.1.- Transfección de células A459 con el plásmido pSuper

A) Producción

Se amplificó el plásmido pSuper (este vector emplea el promotor de la polimerasa III-H1-RNA) que contiene el RNA interferencia para CD43 (AA ATG GCC ACGCTT CTC CT) en bacterias competentes de la cepa DH5 α (Fig.17). En un microtubo se resuspendieron 100 μ L de bacterias y 100 ng de DNA del plásmido y se incubaron 30 minutos en hielo. Posteriormente se dio un choque térmico, elevando la temperatura a 42° C durante 1.5 minutos, para permitir la entrada del DNA a las bacterias, después de lo cual los tubos se colocaron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, las bacterias se incubaron a 37°C en agitación (150 rpm) durante 60 minutos en tubos de 15 mL con 3 mL de LB líquido para permitir su recuperación. Para seleccionar las bacterias que integraron el plásmido, estas fueron sembradas en medio LB sólido con kanamicina 100 μ g/mL y se incubaron a 37°C durante 12 horas.

Con la ayuda de una punta de pipeta esterilizada o un asa bacteriológica, se tomó una colonia aislada de la placa Petri (este paso es esencial para asegurar la pureza del plásmido que se va a amplificar) y se cultivó en medio LB líquido a 37°C durante 24 horas en agitación. Este cultivo fue utilizado para la extracción y purificación del DNA plasmídico que se detalla a continuación.

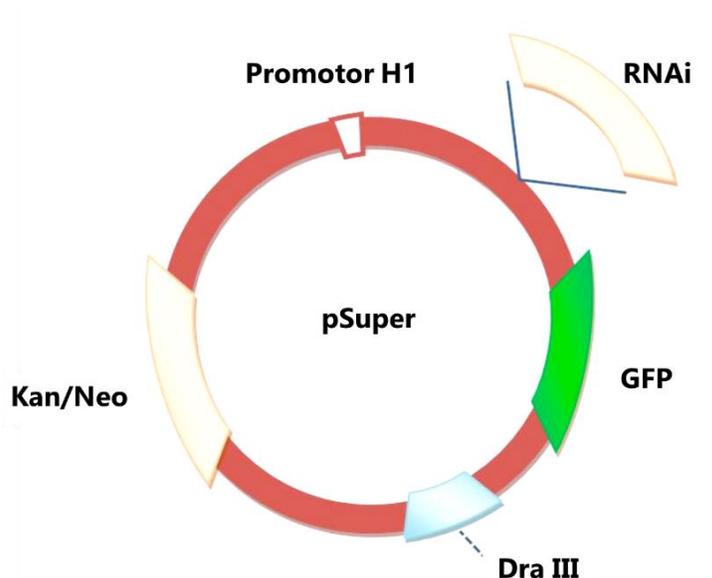


Figura 17.- Representación del plásmido pSuper-RNAi. El vector pSuper tiene un tamaño de 5344 pares de bases (pb), contiene el reportero fluorescente GFP y un sitio de resistencia a neomicina para seleccionar células eucariotas y kanamicina que confiere resistencia en bacterias. Además, sitios de corte para las enzimas de restricción EcoR1, Sal1 y DraIII (Brummelkamp *et al.*, 2002). El oligonucleótido sintético que codifica el RNA interferente específico (AA ATG GCC ACG CTT CTC CT) para CD43 humano se clonó en los sitios BgIII-Sal1 del plásmido pSuper.

B) Extracción

El botón celular bacteriano (pellet) se resuspendió en 100 uL de una solución de recuperación (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 uL de una solución de NaOH 0.2 M, SDS 1% (preparada al momento de usar). La mezcla se dejó incubando en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 150 uL de acetato de potasio 5M pH 4.8 a la solución y se mezcló por inversión y se dejó en reposo 5 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante a un tubo nuevo al cual se

agregó 800 uL de etanol absoluto y se dejó en reposo 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm para obtener el pellet, el cual se lavó con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales. El pellet se dejó secar y se resuspendió en 50 uL de agua miliQ y se guardó a 4°C.

Para analizar si el DNA plasmídico extraído correspondía con el tamaño esperado, 500 ng de DNA fueron digeridos durante 1 hora con las enzimas de restricción EcoRI y SalI. Los fragmentos de DNA resultantes de la digestión fueron separados en base a su peso molecular en geles de agarosa al 1%. Los geles se corrieron a 100 V durante 1 hora con buffer de TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA 2H₂O 2 mM, pH 8.5). Para visualizar el ADN, el gel fue teñido con GelRed durante 10 minutos en agitación suave y visualizada con luz UV.

C) Linearización

Los plásmidos pSuper y pSuper-RNAi fueron purificados por el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas), de acuerdo con las instrucciones del fabricante; una parte se linealizó para transfectar y otra para mandar a secuenciar.

De cada uno de los plásmidos purificados, 8 ug de ADN puro fueron digeridos con la enzima de restricción DraIII durante 1.5 horas a 37°C con el buffer Tango en un volumen final de 100 uL. El ADN digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar que el plásmido estuviera totalmente linearizado. Comprobado esto, el ADN se precipitó con isopropanol, esta mezcla se dejó a -20°C durante 12 horas. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el pellet se lavó con etanol al 70%, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y el pellet se dejó secando con el fin de eliminar el etanol y se resuspendió en 50 uL de agua estéril. El ADN se cuantificó determinando las densidades ópticas a una longitud de onda de 260 nm.

D) Secuenciación

Para comprobar que el plásmido pSuper-RNAi contiene efectivamente la secuencia que codifica para el RNAi de CD43, se secuenció a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del IBT, UNAM. De acuerdo con las recomendaciones de la USSDNA, por el tamaño del plásmido, se sugiere enviar entre 300-500 ng del plásmido en un volumen final de 15 uL. Posteriormente en la Unidad le agregaron los oligos T3 (5'-CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG-3') y T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3').

8.2.- Células A549: mantenimiento y obtención de sobrenadantes

A) Línea celular A549

La línea celular A549 proviene de un carcinoma de pulmón (Fig.18). La línea fue obtenida de ATCC (American Type Culture Collection) y mantenida a 37 °C y 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM Advanced (Gibco) con rojo de fenol, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), PSG (100 U de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de glutamina).

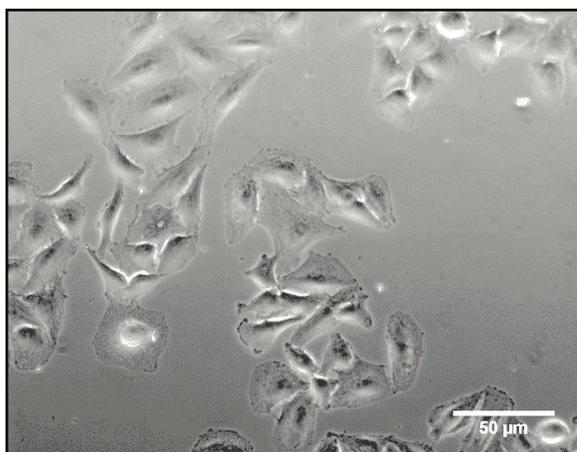


Figura 18.- Línea celular A549. Células provenientes de un carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) son adherentes con forma y tamaño variable, in vitro crecen en monocapa (fotografía tomada con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81).

Las células fueron subcultivadas al llegar al 70-80 % de confluencia, descartando el medio usado y lavando la monocapa con PBS. Para despegar las células de la placa se agregó 500 uL de tripsina-EDTA 1X y se incubó durante 2 minutos a 37°C, permitiendo el desprendimiento de las células. Para inhibir actividad proteolítica de la tripsina se adicionaron 2 mL de medio DMEM suplementado, las células se recolectaron y después se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 3 mL de medio DMEM suplementado, se realizó el recuento celular y se sembraron 2×10^5 células en una caja de cultivo de 6 cm.

Para conservar la disponibilidad de la línea celular se congelaron células de cultivos al 80% de confluencia. Se eliminó el medio de las placas de cultivo y se lavó con PBS, continuando con procedimiento habitual de tripsinización para despegar las células y se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente el botón celular se resuspendió en un criovial con solución de congelación fría (90% SFB, 10% de DMSO). Por último, los viales de congelación fueron guardados inmediatamente a -70°C, para luego ser transferidos al tanque de nitrógeno líquido.

Cuando fue necesario se descongelaron viales a 37°C. Una vez que el vial se descongeló, las células se transfirieron a un tubo cónico con 3-4 mL de medio DMEM suplementado y se centrifugó a 1,200 rpm por 6 minutos para eliminar restos de solución de congelación. El botón celular se decantó, se resuspendió en 3 mL de DMEM suplementado, para luego colocarlo directamente en una caja Petri de 6 cm y se incubó a 37°C y 5% de CO₂.

B) Transfección

Se sembraron células A549 en cajas de 6 cm hasta llegar al 80% de confluencia. El día de la transfección se ayunaron las células con medio DMEM libre de SFB durante 5 horas. Cuando estaban por terminar las horas de ayuno se preparó el tubo A con 6 ug de DNA (pSuper o pSuper-RNAi) en 500 uL de medio Opti-MEM y el tubo B con 8 uL de lipofectamina 2000 más 500 uL de medio Opti-MEM, se

mezclaron las dos soluciones (mezcla AB) y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La monocapa de células A549 se lavó con PBS, retirando completamente el medio. La mezcla AB se agregó por goteo a la caja Petri con células y se incubó a 37°C, 5% CO₂ durante 6 horas cuidando que no se secaran en ningún momento. Una vez transcurrido el tiempo se agregó DMEM suplementado con 10% SFB (sin antibiótico) y se incubó por 48 horas a 37°C, 5% CO₂. Al término de ese tiempo se le agregó PSG (100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 2 mM de glutamina) y el antibiótico de selección G418 a 800 µg/mL.

C) Obtención de sobrenadantes celulares

Se cultivaron 3x10⁶ células A549 en cajas Petri de 10 cm, en medio DMEM (5% SFB, PSG a 37°C, 5% CO₂), al llegar a confluencia (generalmente 24 horas). Se retiró el medio de cultivo, la monocapa fue lavada con PBS y se agregó medio DMEM bajo en glucosa (1g/L) libre de suero. Después de 48 horas se colectaron los sobrenadantes en tubos Falcón de 15 mL, y se sometieron a una primera centrifugación durante 15 minutos a 1,500 rpm a 4°C, después de decantaron en otro tubo falcón y se centrifugaron 15 minutos a 2,700 rpm a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C. Para los ensayos de anillos aórticos, el sobrenadante fue filtrado (0.22 µm) y almacenado en alícuotas.

8.3.- Detección de CD43

A) Inmunofluorescencia

Para detectar la expresión y localización de CD43, se utilizaron células A549 WT, las cuales fueron sembradas en placas chamber-slides de 4 pozos a densidades subconfluentes (7.5x10⁴ células/pozo) en medio DMEM 5% SFB durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y la monocapa fue lavada con PBS. Después las células se fijaron con paraformaldehído (PFA al 2%) durante 10 minutos a TA. Se lavó con PBS tres veces (5 min c/u) a TA, después se bloqueó y permeabilizó simultáneamente con una solución de 3% de BSA (albumina sérica bovina) y 0.05% Tritón X-100 en PBS durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo

primario H300 (Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:500 en BSA 3%) se incubó durante toda la noche a 4°C. Se hicieron lavados con PBS (5 minutos c/u) a temperatura ambiente (TA) para eliminar el exceso de anticuerpo y se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo AF647(Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 37°C en oscuridad. Se realizaron tres lavados con PBS a 37°C y se procedió a la tinción de DNA con DAPI (1µg/ml) como referencia del núcleo, 10 minutos a TA. Finalmente, se lavó con PBS a 37°C (Odell y Cook, 2013).

Las muestras se observaron en el microscopio Olympus IX81 acoplado a la fuente de fluorescencia CoolLED pE-2 System. Además, se observaron en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM, con el microscopio confocal Olympus FV1000 60X. Las imágenes capturadas se analizaron en el software FIJI.

B) Western blot

Para evaluar los niveles de expresión de CD43 en las diferentes clonas obtenidas, se cultivaron células en cajas de 6 cm de diámetro y antes de llegar a confluencia fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas a 1,100 rpm por 6 minutos y lavadas PBS. El botón celular de las células se incubó a 4°C en agitación suave durante 30 minutos con buffer de lisis (TLB– Tritón Lysis Buffer– 0.5% Tritón X-100, Hepes 25 mM, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM pH 7.5) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, BGP 10 mM, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 200 µM, leupeptina 1µg/ml, antipaína 50 µg/ml, aprotinina 10µg/ml y DTT 0.5 mM). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para disminuir la degradación proteica y la pérdida de modificaciones post-traduccionales las muestras fueron congeladas a -70°C.

Se resolvieron 50 ug de proteína en geles SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 um (Whatman) en buffer de transferencia

(Glicina 200 mM, Tris 25 mM y MeOH 20%) a 100 V durante 90 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en solución TBS-T (NaCl 150 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7.4 y Tween 0.05%) durante una hora en agitación a TA. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (CD43-H300, Santa Cruz Biotechnology) diluido en leche descremada al 5% o BSA al 3% durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T (cada lavado de 10 min) y se agregó el anticuerpo secundario (anti-conejo de Santa Cruz Biotechnology) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:5000 en leche descremada al 5%. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con TBS-T y se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer), y las imágenes fueron capturadas con en el transiluminador BioRad.

Las proteínas detectadas se cuantificaron con el software ImageLab (BioRad) o ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). El principio de este análisis es cuantificar la intensidad de pixeles en un área determinada, en este caso las bandas obtenidas en los inmunoblots. Una vez obtenida la intensidad de cada banda se normaliza dividiendo los pixeles de la proteína a evaluar entre los pixeles de la proteína usada como control de carga.

C) Citometría de flujo

Para evaluar los niveles de expresión de CD43 en las diferentes clonas obtenidas, se cultivaron células en cajas de 6 cm de diámetro y antes de llegar a confluencia fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas a 1,100 rpm por 6 minutos y lavadas PBS. Posteriormente se fijaron con (PFA) al 2% durante 10 minutos a 37°C. Para eliminar el exceso de PFA se hizo un lavado con solución de FACS (PBS, 2% SFB) y se centrifugo a 1,200 rpm por 7 minutos. Después de descartar el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 1 mL de metanol frio para permeabilizar a las células y se incubo durante 30 minutos en hielo. Para retirar el metanol se adicionaron 2 ml de solución de FACS y se centrifugo a 1,200 rpm por

7 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó el anticuerpo primario DFT-1 acoplado a Alexa Fluor 647 (1 uL/ muestra [0.2 ug]) y se incubó durante 30 minutos en hielo. Finalmente se hizo un lavado con 3 ml de solución de FACS, se centrifugó a 1,200 rpm por 7 minutos, se fijó con 100 uL de PFA AL 2% y se guardó a 4°C protegido de la luz hasta su análisis en citómetro FACScanto II.

8.4.- Ensayo de sobrevida

A) Condiciones de cultivo

Se cultivaron 2.5×10^5 células A549 de ambas clonas CD43^{hi} y CD43^{lo} por pozo en placas de 48 pozos en medio DMEM suplementado con 5% de SFB y PSG (100 U de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de glutamina). Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio fue sustituido por DMEM bajo en glucosa libre de suero, y las células se cultivaron por 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

B) Tinción con colorante de viabilidad

Posterior a ese tiempo, se despegaron las células como se describe en la sección 8.4. Para evitar perder las células muertas, se centrifugó a 1,300 rpm por 7 minutos y se procedió a hacer la tinción de viabilidad con el colorante eFluor 780 (eBioscience; a una dilución final de 1:10,000) el cual penetra en las células que tienen comprometida la integridad de la membrana.

Los controles de tinción fueron células A549 cultivadas en condiciones óptimas; como control de células muertas, utilizamos células A549 tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) al 30 % durante 15 minutos a 37°C.

Las muestras y controles correspondientes fueron teñidas con 50 uL de eFluor 780 durante 30 minutos en hielo. Después de la tinción, las muestras y controles se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1,300 rpm por 7 minutos. Finalmente, todas

las células fueron fijadas con PFA 2% durante 10 minutos, lavadas con 3 mL de PBS, centrifugadas a 1300 rpm por 7 minutos y resuspendidas en 100 uL PBS y guardadas protegidas de la luz a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.

C) Análisis estadístico

Realizamos pruebas de t de Student para comparar los porcentajes de sobrevivencia de las clonas CD43^{hi} y CD43^{lo} en el software GraphPad Prism 6.0. Se consideró que había diferencias significativas cuando el valor de p fue <0.05

8.5.- Ensayo de anillos aórticos

El ensayo de anillos aórtico se basa en la capacidad de los explantes aórticos de ratón para formar nuevos vasos sobre un sustrato de matriz extracelular que contiene colágeno, fibrina y diversos factores de crecimiento (Aplin, *et al.* 2008). Los anillos aórticos están compuestos por células endoteliales, pericitos, fibroblastos, macrófagos y células dendríticas que interactúan a través de mecanismos paracrinos para producir el crecimiento angiogénico (Nicosia, 2009).

Entre el primer y segundo día, los fibroblastos y macrófagos migran de los anillos aórticos. Los primeros son típicamente células delgadas o tripolares con procesos citoplasmáticos finamente cónicos, los macrófagos por su parte tienen forma redondeada, citoplasma granular y pseudópodos cortos, se acumulan en los sitios de corte de la aorta. Las células endoteliales brotan de los sitios de corte después de 2-3 días de cultivo (Nicosia, 2009).

Los vasos recién formados se ramifican y forman distintos tipos de redes durante la primera semana, en función de los factores angiogénicos presentes en el medio de cultivo. Posterior a este tiempo, dejan de crecer y comienzan a retroceder. A medida que los neovasos se reabsorben, el Matrigel dentro de la luz aórtica y alrededor de los explantes se lisa, causando la formación de un halo periaórtico. Además, la degradación de la matriz también se produce alrededor de cada microvaso, lo que hace que las células endoteliales se desprendan (Zhu, *et al.*

2000). En función de esto, la evaluación del crecimiento angiogénico se realiza en los primeros días en que se produce el crecimiento de los vasos.

A) Extracción de la aorta

Se utilizaron ratones machos BALB/c de entre 1 y 7 meses de edad. Estos fueron sacrificados por dislocación cervical, y fijados a la mesa de disección por las extremidades. Se hizo una incisión en el abdomen con unas tijeras hasta el cuello, se ubicó el diafragma y se cortaron las costillas para exponer los órganos de la caja torácica. Se retiraron los intestinos, el estómago y el hígado. Con una jeringa se inyectó PBS en el corazón para inflar y facilitar la visualización de la aorta, la cual se encuentra justo encima de la columna vertebral. Una vez ubicada, se sujetó la aorta con una pinza de disección recta con dientes y se removió con movimiento finos los restos de tejido circundante. Para liberar la aorta se hizo un corte en la aorta descendente y sin dejar de sujetarla un segundo corte en la aorta abdominal. La aorta se colocó en una caja Petri con PBS frío y bajo el microscopio estereoscópico se removió el tejido conectivo, se eliminaron restos de sangre con una jeringa con PBS, se lavó el interior de la aorta y se procedió a cortarla en anillos de 1 mm aproximadamente (Bellacén & Lewis, 2009).

B) Cultivo y seguimiento de anillos aórticos

En una caja de 24 pozos se colocó una gota de aproximadamente 30 uL de Matrigel (Corning) evitando hacer burbujas y en cada gota se embebió un anillo. La placa se incubó durante una hora a 37°C para permitir la polimerización de la matriz de Matrigel. Se agregó 1 mL de medio DMEM Advanced (Gibco) suplementado con 5% SFB y PSG (2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 ug/ml de estreptomycin) a cada pozo. Los anillos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se observó un crecimiento inicial de vasos (por lo general cuatro días).

Una vez elegidos los pozos con un mínimo de crecimiento, se agregaron los siguientes estímulos: 1) Medios condicionados de células A549 CD43^{hi} o CD43^{lo} cultivadas 48 post-confluencia en DMEM bajo en glucosa y libre de suero (500uL

de medio condicionado + 500uL de DMEM casero suplementado únicamente con PSG). 2) Control negativo: DMEM casero (suplementado con PSG) al 50% igual que los estímulos, es decir, 500 uL de DMEM casero + 500 uL de PBS. 3) Control positivo: VEGF murino recombinante (30ng/mL) en DMEM casero suplementado con PSG. 4) Otro control positivo: IL-8 humano recombinante (50ng/mL) en DMEM casero suplementado con PSG. Los anillos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ y se realizó registro fotográfico por los siguientes seis días, también se tomó una fotografía del día cero, es decir al momento de agregar los estímulos (Fig.19).

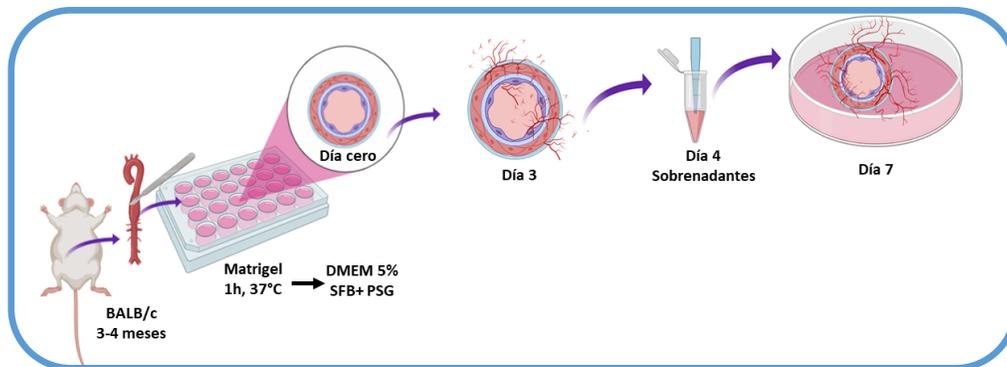


Figura 19.- Estrategia del ensayo de anillos aórticos. Extracción de la aorta murina, cultivo de los anillos aórticos, el crecimiento inicial del anillo es al 3er día, al cuarto día (día cero) del inicio de tratamiento se agregan los sobrenadantes y se fotografían el día 7 o en este caso 3 post-sobrenante para realizar el análisis comparativo.

Análisis de las imágenes

Antes de hacer el análisis de las imágenes se definieron los siguientes términos:

- Área de la aorta (AA): superficie que corresponde al anillo aórtico.
- Área total de la aorta y el crecimiento inicial (ATACI): esta medida corresponde al área de la aorta y al crecimiento inicial de la aorta al inicio del estímulo.

- Área del crecimiento inicial de la aorta (ACIA): área que corresponde al crecimiento de la aorta al día del inicio del estímulo. Para obtener el ACIA se mide ATACI y se resta al AA.
- Área de crecimiento efectivo (ACE): superficie que corresponde al área de crecimiento posterior al inicio del estímulo en el transcurso de los días, ejemplo ACE al día 1, 2...6, sin tomar en cuenta el área de la aorta, ni el crecimiento inicial. Para obtener el ACE se resta el área de crecimiento posterior al estímulo menos el ATACI.
- Índice de crecimiento: este cociente se obtiene de la razón ACE/AA y corresponde al crecimiento angiogénico en relación al área de la aorta.

Las fotografías fueron usadas para medir el área de crecimiento de los vasos sanguíneos con ayuda del software ImageJ (Fiji, 2012; <https://fiji.sc/>). En este programa se midió el AA y ATACI, en primer lugar, se obtuvo el ACIA y luego el ACE del cuarto día.

C) Análisis estadístico

Se obtuvieron los índices de crecimiento de cada anillo con las fórmulas descritas anteriormente, se aplicó una prueba de significancia estadística t de Student usando el software GraphPad Prism 6.0. Los valores debajo de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

8.6.- Ensayo de formación de tubos

El ensayo de formación de tubos mide la capacidad de las células endoteliales, colocadas sobre Matrigel a densidades subconfluentes para formar estructuras similares a capilares, en respuesta a compuestos que promueven o inhiben la formación de tubos. Entre las ventajas que exhibe este tipo de ensayo es que se requieren muy pocas células, el período de cultivo es corto, es fácil de analizar y cuantificar (Arnaoutova, *et al.* 2009). Las células endoteliales inicialmente se adhieren a la matriz, se unen y generan fuerzas mecánicas en la matriz de soporte

circundante para facilitar la migración celular, permitiendo que las células finalmente formen tubos. Las células comienzan a formar estructuras similares a tubos a partir de las 4 horas y, las 6 horas ya están formados (Fig.20). Estas estructuras interconectadas generalmente se mantienen durante aproximadamente 24 horas. La formación de capilares y/o tubos se pueden visualizar utilizando un microscopio invertido de contraste de fase (DeCicco-Skinner, *et al.* 2014).

A) Línea celular TeloHAEC

Las células de la línea celular TeloHAEC son células endoteliales inmortalizadas obtenidas de una aorta humana, fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Fig.19). Para su mantenimiento, las células se cultivan en medio basal de células vasculares (MBV), libre de rojo fenol, con 2% de SFB y un kit de factores de crecimiento humano recombinantes (VEGF[5ng/mL], EGF[5ng/mL], FGF[5ng/mL], IGF-1[15ng/mL]), heparina (0.75 U/mL) e hidrocortisona(1ug/mL).

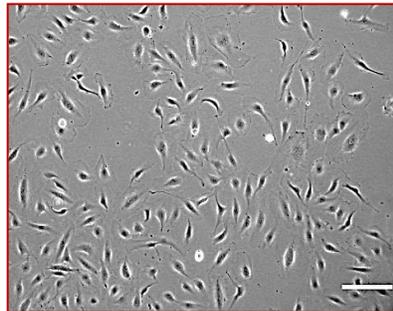


Figura 20.- Línea celular TeloHAEC. Se muestra que las células endoteliales de aorta humana son adherentes. Fotografía tomada con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 (barra de escala 100 μ m).

Las células TeloHAEC fueron subcultivadas al llegar al 70-80 % de confluencia, descartando el medio usado y lavando la monocapa con PBS. Para despegar las células de la placa se agregó 500 μ L de tripsina-EDTA 1X y se incubó durante 2

minutos a 37°C permitiendo el desprendimiento de las células. Para inhibir la actividad proteolítica de la tripsina, se adicionaron 3 mL de una solución inhibidora (PBS, 2% SFB). Las células se recolectaron en un tubo y después se centrifugó a 1,200 rpm durante 7 minutos. Finalmente, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 3 mL de medio vascular basal suplementado y se sembraron a una densidad celular constante de entre $2-3 \times 10^5$ células en cajas de cultivo de 6 cm.

B) Cultivo y seguimiento de la formación de tubos

Para realizar el ensayo de formación de tubos en una caja de 96 pozos se colocaron entre 25-30 uL de Matrigel (Corning) frío, evitando hacer burbujas. La placa fue incubada durante una hora a 37°C para permitir la polimerización de la matriz de Matrigel. Se agregaron las células TeloHAEC (20,000/pozo) en 10 uL de MVB suplementado con 2% de SFB y un kit de factores de crecimiento humano recombinantes (VEGF, EGF, FGF, IGF-1), heparina e hidrocortisona.

Para evaluar la capacidad de los sobrenadantes de las células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo} de inducir la formación de tubos, se agregó 190 uL de sobrenadante de cultivo proveniente de células A549 CD43^{hi} o CD43^{lo}. El registro fotográfico se realizó a la hora, y luego a las 6 horas, con microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 con objetivo 5X (Fig.21)

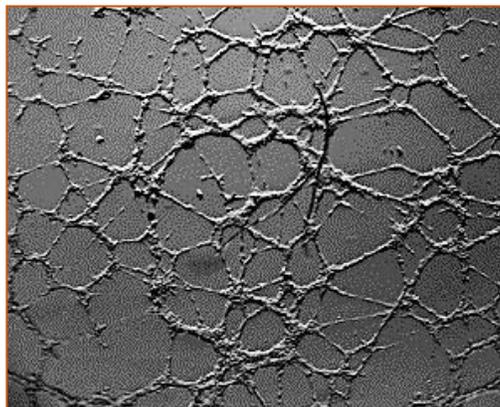


Figura 21.- Células endoteliales TeloHAEC. Se muestra que estas células forman tubos en un soporte de Matrigel, a las 6 horas. Fotografía tomada con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 (aumento 5X).

C) Análisis de las imágenes

Para evaluar la capacidad de inducción a la formación de tubos de cada uno de los sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo} se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: área total en la que se hacen las mediciones, número, longitud y superficie del entramado que forman estas estructuras similares a capilares. Un tubo está definido como una estructura tubular comprendido entre dos puntos de ramificación o un sitio de ramificación y un extremo suelto (Ilgaz, 2017). Un nodo corresponde al punto de conexión donde convergen los tubos. Las mallas se forman por el alineamiento que forman los tubos.

Con ayuda del programa ImageJ con el complemento “analyzer de angiogénesis” (<https://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt>) se introdujo una fotografía tomada en pseudo campo claro, se generó una serie de patrones o arboles ilustrados con diferentes colores indicando diferentes elementos (Fig.22A). Adicionalmente se obtiene una tabla con todos los elementos del mapa cuantificados (Fig.22B; Carpentier, 2012).

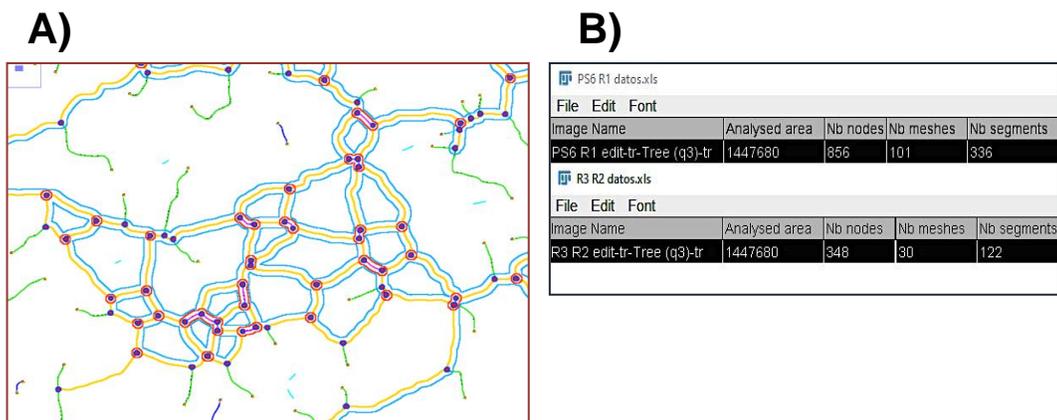


Figura 22.- Mapa de análisis de tubos. (A) Imagen representativa de un mapa de análisis. En verde se indican las ramas; en rosa, los tubos; en azul cielo, las mallas; en rojo rodeado de azul, se representan los nodos; en rojo rodeado de amarillo, las extremidades y en azul oscuro, los elementos aislados. (B) Tabla de las cuantificaciones de cada elemento del mapa.

D) Análisis estadístico

Los resultados que arrojó el programa sobre el número de nodos, tubos, mallas y área de análisis correspondientes a sobrenadantes CD43^{hi} y CD43^{lo} se le aplicó la prueba de significancia estadística t de Student, usando el software GraphPad Prism 6.0. Los valores debajo de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

8.7.- Ensayo de zimografía

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son endopeptidasas dependientes de zinc y calcio capaces de degradar la matriz extracelular, incluida la membrana basal. La zimografía de sustrato es una técnica que identifica las MMPs por la degradación de su sustrato y por su peso molecular. Se utilizó la técnica de zimografía para evaluar la presencia de MMPs en los sobrenadantes de células A549 CD43^{hi} y CD43^{lo}. La actividad proteolítica de los sobrenadantes fue probada en un sustrato con gelatina, el cual es el sustrato más utilizado para detectar MMP-2 y MMP-9.

En la zimografía de sustrato, las proteínas se separan por SDS-PAGE, las muestras no se hierven ni se les agregan agentes reductores y el gel contiene el sustrato de las enzimas a estudiar. La ebullición provoca la desnaturalización de las enzimas y el uso de agentes reductores como el β -mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuro e inhiben el replegamiento de las MMP después de la electroforesis. El SDS lineariza las proteínas y las carga negativamente, por lo que después de la electroforesis, las proteinasas resueltas se renaturalizan mediante el intercambio de SDS por un detergente no iónico, como Tritón X-100. El siguiente paso en la zimografía es la incubación a 37 °C con una solución que contiene Ca^{2+} a pH 7.4, porque las MMPs son enzimas dependientes de calcio. Durante el período de incubación, el sustrato será digerido de manera dependiente del tiempo y cantidad de MMPs en el sobrenadante. Luego de la tinción con azul

de Coomassie, la actividad MMP se detecta como una zona blanca sobre un fondo azul. Las bandas claras en el gel se pueden cuantificar por densitometría (Kupai, *et al.* 2010).

A) Preparación de sobrenadantes

Los sobrenadantes (~10 mL) se obtuvieron como se describe en la sección 8.2, pero solo los destinados para este tipo de ensayo fueron filtrados (0.22 μ m) y concentrados utilizando filtros concentradores (Centricon, con un corte de 10 kDa). Para concentrarlos se centrifugó a 2700 rpm durante aproximadamente 4 horas, llevándolos a un volumen final de 250 μ L. Después de determinar la concentración de proteínas de los sobrenadantes procesados, se hicieron alícuotas para cargar 50 μ g de sobrenadante/carril.

B) Preparación del gel de acrilamida copolimerizado con gelatina

Se preparó un gel de poliacrilamida al 8%, agregando gelatina a una concentración final de 1 mg/mL. La muestra se preparó con 50 μ g del sobrenadante concentrado y 5 μ L de buffer de carga para zimografía (glicerol 25%, SDS 4% y 0.01 % de azul de bromofenol, pH 6.8) libre de agentes reductores. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente se cargaron en el gel y se corrieron a 85 Volts por 2.5 horas (Kupai, *et al.* 2010).

Después de la electroforesis, el gel fue lavado tres veces durante 30 minutos cada vez con Tritón X-100 al 2.5% para quitar el SDS, después de le agrego el buffer de activación (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 5 mM) y se incubo a 37°C durante 20 horas. Los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie brillante azul G 250 en ácido acético 10% y metanol 10% y destenidos con solución desteñidora (8% de ácido acético y 4% de metanol).

La actividad proteolítica fue visualizada como degradación de la gelatina como bandas translucidas en un fondo teñido sin degradar, los geles fueron fotografiados con el transiluminador de BioRad y las bandas cuantificadas con el software ImageLab (BioRad) o ImageJ (software libre, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

C) Inhibidor de MMP-2/9

Se preparó un gel de acrilamida copolimerizado con gelatina y se cargaron 50 ug del sobrenadante concentrado con las condiciones descritas en la sección anterior. Después de la electroforesis y los lavados con Tritón X-100, se agregó el buffer de activación durante 1 hora, posterior a este tiempo se agregó el inhibidor CAS193807-60-2 (1uM) específico para MMP-2/MMP-9 y se incubó en el buffer de activación durante 20 horas a 37°C. Se corroboró con la tinción de Coomassie la inhibición de las metaloproteinasas.

D) Detección de MMP-2 y MMP-9

Se resolvieron 50 ug de sobrenadantes concentrados en geles SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 um (Whatman) en buffer de transferencia (Glicina 200 mM, Tris 25 mM y MeOH 20%) a 100 V durante 90 min. Las membranas se bloquearon con BSA 5% disuelta en solución TBS-T (NaCl 150 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7.4 y Tween 0.05%) durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario MMP-2 (Santa Cruz- 8B4) y MMP-9 (7-11C) diluido en BSA 5% durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T (cada lavado de 10 min) y se agregó el anticuerpo secundario (anti-ratón de Santa Cruz Biotechnology) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:5000 en BSA al 5%. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con TBS-T y se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer), y las imágenes fueron capturadas con en el transiluminador BioRad

E) Análisis estadístico

Con las fotografías tomadas en el transiluminador se midió el área de degradación enzimática de cada sobrenadante y se hizo una prueba de correlación de Pearson para correlacionar la degradación enzimática con los niveles de expresión de CD43 (intensidad media de fluorescencia) analizados por citometría de flujo, usando el software GraphPad Prism 6.0.

IX.- REFERENCIAS

1. Adderley, H., Blackhall, F. H., and Lindsay, C. R. (2019) KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine*, 41,711–716.
2. Aguilar, I., Fierro, N. and Rosenstein, Y. (2006). CD43. *UCSD-Nat Mol Pages*. doi: 10.1038/mp.a000565.01.
3. Altogen Biosystems (2017) How much antibiotic required for stable cell selection? Recuperado de <https://altogen.com/much-antibiotic-required-stable-cell-selection/>
4. Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horejsi, V., and Schmidt, R. E. (1995) MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *European Journal of Immunology*, 24: 1051-1055.
5. Andersson, C., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Sikut, A., Baeckström, D. and Hansson, G.C. (2004) CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *BiochemBiophys Res Commun*, 316: 12-17
6. Andersson, C. X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Baeckström, D., Haass, C., and Hansson, G. C. (2005) Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *The Biochemical journal*, 387(Pt 2): 377–384. <https://doi.org/10.1042/BJ20041387>
7. Aplin, A.C., Fogel, E., Zorzi, P. and Nicosia, R.F.(2008) The aortic ring model of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 443:119–136. doi:10.1016/S0076-6879(08)02007-7
8. Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K. and Benton, G. (2009) The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and theart. *Angiogenesis*,12: 267–274.
9. Auvynet, C., Moreno, S., Melchy, E., Coronado-Martínez, I., Montiel J.L., Aguilar-Delfin, I. and Rosenstein, Y. (2013) Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology*, 23: 32-42.
10. Baeckström, D., Zhang, K., Asker, N., Rüetschi, U., Ek, M., and Hansson, G. C. (1995) Expression of the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43 by a colon carcinoma cell line. *The Journal of biological chemistry*, 270(23): 13688–13692. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13688>
11. Bellacen, K. and Lewis, E. C. (2009) Aortic ring assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 33: 1564. <https://doi.org/10.3791/1564>

12. Balikova, A., Jääger, K., Viil, J., Maimets, J. and Kadaja-Saarepuu, L. (2012) Leukocyte marker CD43 promotes cell growth in co-operation with β -catenin in non-hematopoietic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 41: 299-309.
13. Benesova, L., Minarik, M., Jancarikova, D., Belsanova, B. and Pesek, M. (2010) Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Anticancer Res*, 30(5):1667–1671.
14. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D. (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*, 2(10): 737–744.
15. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7: 248-254.
16. Bravo-Adame, M.E., Sandoval-Hernandez, M.A., Migueles-Lozano, O.A. and Rosenstein, Y. (2012) CD43 en: *Choi, S.D. Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer*, 320-328
17. Bravo-Adame, M. E., Vera-Estrella R., Barkla B. J., Martínez-Campos C., Flores-Alcantar, A., Ocelotl-Oviedo, J. P., Pedraza-Alva, G., and Rosenstein, Y. (2017) An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes. *Immunology*, 150(1): 87–99. <https://doi.org/10.1111/imm.12670>
18. Brummelkamp, T., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 19:550-553.
19. Cai, X., Zhu, H. and Li, Y. (2017) PKC ζ , MMP-2 and MMP-9 expression in lung adenocarcinoma and association with a metastatic phenotype. *Mol Med Rep*, 16(6):8301–8306. doi:10.3892/mmr.2017.7634
20. Camacho-Concha, N., Olivos-Ortiz, A., Nuñez-Rivera, A., Pedroza-Saavedra, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Rosenstein, Y., and Pedraza-Alva, G. (2013). CD43 promotes cells transformation by preventing merlin-mediated contact inhibition of growth. *PloS one*, 8(11), e80806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080806>
21. Chang, J., & Chaudhuri, O. (2019) Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. *The Journal of cell biology*, 218(8): 2456–2469. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903066>

22. Cañas Linares, A. (2017) Participación de CD43 en la proliferación y sobrevivencia de la línea celular A549. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
23. Carpentier, G. (2012) ImageJ contribution: Angiogenesis Analyzer. ImageJ News. Available in: <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en>
24. Cascales, M. y Álvarez-Gómez, J.A. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 76: 59-84.
25. Cawston, T.E. and Wilson, A.J. (2006). Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 20(5): 983-1002.
26. Chakrabarti, S. and Patel, K.D. (2005). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*, 31(6): 599-621.
27. DeCicco-Skinner, K. L., Henry, G. H., Cataisson, C., Tabib, T., Gwilliam, J. C., Watson, N. J., Bullwinkle, E. M., Falkenburg, L., O'Neill, R. C., Morin, A., & Wiest, J. S. (2014). Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (91), e51312. <https://doi.org/10.3791/51312>
28. Deryugina, E. and Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1), 9-34.
29. Dvorak, H.F. (2005). Angiogenesis: update. *J Thromb Haemost*, 3(8): 1835-42.
30. Dvorak H. F. (2015). Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer immunology research*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0209>
31. Fernández-Rodríguez, J., Andersson, C.X., Laos, S., Baeckström, D., Sikut, A., Sikut, R. and Hansson, G.C. (2002) The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol*, 23(4):193-201
32. Fierro, N., Pedraza-Alva, G. and Rosenstein, Y. 2006. TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement. *The Journal of Immunology*, 176: 7346-7353.
33. Folgueras, A., Pendás, A.M., Sánchez, L.M., and López-Otín, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int.J.Dev.Biol*, 48: 411-424.
34. Fulcher, J.A., Chang, M.H., Wang, S., Almazan, T., Hashimi, S.T., Eriksson, A.U., et al. (2009) Galectin-1 Co-clusters CD43/CD45 on Dendritic Cells and Induces Cell Activation and Migration through Syk and Protein Kinase C Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 26860–26870.

35. Fu, Q., Cash, S.E., Andersen, J.J., Kennedy, C.R., Oldenburg, D.G., Zander V.B., et al. (2013) CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *International Journal of Cancer*, 132:1761–1770.
36. Fu, Q., Cash, S.E., Andersen, J.J., Kennedy, C.R., Madadi, A.R., Raghavendra, M., et al. (2014) Intracellular patterns of sialophorin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy. *British Journal of Cancer*, 110:146-155.
37. Folkman, J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16):15–18. doi:10.1053/sonc.2002.37263
38. Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.
39. Hanahan D. and Weinberg R. (2000) Hallmarks of Cancer: *Cell*, 100: 57-70.
40. He, Y.W. and Bevan, M.J. (1999) High Level Expression of CD43 Inhibits T cell Receptor/CD3-Mediated Apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 1903–1908.
41. Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von Felbert, V., Middleton, M., Kato, M., Ergün, S., Augustin, H. G., and Schadendorf, D. (2010) Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *The Journal of experimental medicine*, 207(3): 491–503. <https://doi.org/10.1084/jem.20091846>
42. Ilgaz, Y. (2017) Quantitative Analyses of In-Vitro Tube Formation for Angiogenesis. Available in: https://www.researchgate.net/publication/317054528_Quantitative_Analyses_of_In-Vitro_Tube_Formation_for_Angiogenesis
43. INCan (2019) Papel actual de la inmunoterapia en cáncer de pulmón: ¿Hay diferencias por género? por Dr. Omar Macedo Pérez En: II congreso en Cáncer en la mujer-Oncología y Radioterapia- llevado a cabo en CDMX, México, 27 de Julio de 2019.
44. Kadaja L., Laos, S., Jääger, K., Viil, J., Balikova, A., Lööke, M., Hansson, G.C. and Maimets, T. (2008) CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. *Oncogene*, 27:1705-1715
45. Kadaja L., Laos S. and Maimets T. (2004) Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene*, 23: 2523–2530.

46. Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1): 52–67.
47. Kudo, S. and Fukuda, M. (1991) A short, novel promoter sequence confers the expression of human leukosialin, a major sialoglycoprotein on leukocytes. *The Journal of biological chemistry*, 266(13): 8483–8489.
48. Kufe, D.W. (2010) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 9: 874–885.
49. Kupai, K., Szucs, G., Cseh S, Hajdu I., Csonka C., Csont, T. and Ferdinandy P. (2010) Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 61(2): 205-9.
50. Lakshmanan, I., Ponnusamy, M.P., Macha, M.A., Haridas, D., Majhi, P.D., Kaur, S., Jain, M., (...), Ganti, A.K. (2015) Mucins in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(1): 19 – 27
51. Layseca-Espinosa, E., Pedraza-Alva, G., Montiel, J.L., Del Río, R., Fierro, N., González-Amaro, R. and Rosenstein, Y. (2003) T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *Journal of Leukocyte Biology*, 74: 1083-1096.
52. López-Otín, C. and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 7(10): 800-8.
53. Ma, X.B., Zheng, Y., Yuan, H.P., Jiang, J. and Wang, Y.P. (2015) CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Hum Pathol*, 46(4):593–599. doi: 10.1016/j.humpath.2015.01.002
54. Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M. and Hirata, T. (2005) CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *The Journal of Immunology*, 175: 8042–8050.
55. Metro G. (2018) EGFR targeted therapy for lung cancer: are we almost there?. *Translational lung cancer research*, 7(Suppl 2), S142–S145. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.03.11>
56. Misawa, Y., Nagaoka, H., Kimoto, H., Ishii, Y., Kitamura, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Shibuya, M., and Takemori, T. (1996) CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol*. 26(11): 2573-81
57. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., and Adjei, A. A. (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*, 83(5): 584–594. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
58. Murphy, G. and Nagase, H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 29(5): 290-308.

59. Murphy, G. (2011) Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology*, 12(11): 233. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-233>
60. Merchant, N., Nagaraju, G. P., Rajitha, B., Lammata, S., Jella, K. K., Buchwald, Z. S., Lakka, S. S., and Ali, A. N. (2017) Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*, 38(8):766–780.
61. Nicosia, R. F. (2009). The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(10): 4113–4136. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00891.
62. NIH. 2016. Estadísticas del cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado el 18 de octubre de 2019, de <https://www.cancer.gov/espanol>
63. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006) Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3): 213–219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
64. Odell, I.D. and Cook, D. (2013) Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1): 4.
65. OMS. (2019) Estadísticas del cáncer de pulmón. Consultado el 20 de septiembre de 2019, Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>
66. Ostberg, J., Barth, R. and Frelinger, J. (1998) The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunology Today*, 19: 546-550.
67. Paolillo, M., and Schinelli, S. (2019). Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *International journal of molecular sciences*, 20(19): 4947. <https://doi.org/10.3390/ijms20194947>
68. Park, J.K., Rosenstein, Y., Remold- O'Donnell, E., Bierer, B. E., Rosen, F.S. and Burakoff, S.J. (1991) Enhancement of T- cell activation by CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott- Aldrich syndrome. *Letters to Nature*, 350: 705- 709.
69. Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoffs, S.J. and Rosenstein, Y. (1996) CD43, specific activation of T cell induces association of CD43 to Fyn kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 27564-27568.
70. Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoffs, S.J. and Rosenstein, Y. (1998) T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen- activated protein kinase pathway activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 14218-14224.
71. Pedraza-Alva, G. and Rosenstein, Y. (2007) CD43: One molecule, many tales to recount. *Signal Transduction*, 7: 372-385.
72. Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Del Rio, R., Fierro, N.A., Cruz-Muñoz, M.E., Olivares, N., et al. (2011) CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions. *IUBMB Life*, 63: 940-948.

73. Poh, A. R., and Ernst, M. (2018). Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Frontiers in oncology*, 8: 49. doi:10.3389/fonc.2018.00049.
74. Polacheck, W. J., Zervantonakis, I. K., and Kamm, R. D. (2013) Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(8): 1335–1356. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1115-1>
75. Remold-O'Donnell, E., Kenney, D.M, Parkman, R., Cairns, L., Savage, B. and Rosen, F.S. (1984) Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, 159: 1705-1723.
76. Rojiani, M. V., Alidina, J., Esposito, N., & Rojiani, A. M. (2010) Expression of MMP-2 correlates with increased angiogenesis in CNS metastasis of lung carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 3(8): 775–781.
77. Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., (...), Spanish Lung Cancer Group (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.*, 361(10):958–967. doi:10.1056/NEJMoa0904554
78. Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen, F.S., Bierer, B.E. and Burakoff, S.J. (1991) CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*, 354, 233-235.
79. Rosenstein, Y., Santana, A. and Pedraza-Alva, G. (1999) CD43, a molecule with multiple functions. *Immunology Research*, 20: 89-99.
80. Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M. and Niedzwiecki, A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep.*, 21(5):1323–1333. doi:10.3892/or_00000358
81. Rundhaug, J. E. (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(2): 267–285. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355>.
82. Salvatore, V., Teti, G., Focaroli, S., Mazzotti, M. C., Mazzotti, A. and Falconi, M. (2017) The tumor microenvironment promotes cancer progression and cell migration. *Oncotarget*, 8(6): 9608–9616. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14155>
83. Santamaría, M., López-Beltrán, A., Toro, M., Peña, J. and Molina, I.J. (1996) Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer Res*, 56(15): 3526-9, ISSN 0008-5472.
84. Santana, M.A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S.J. and Rosenstein, Y. (2000) CD43-mediated Signals Induce DNA Binding Activity of AP-1, NF-AT, and NFκB

- Transcription Factors in Human T Lymphocytes. *The journal of Biological Chemistry*, 275: 31460-31468.
85. Seo, W and Ziltener, H.C. (2009) CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood*, 114(17): 3567-77.
 86. Spinale, F.G. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87(4):1285-1342.
 87. Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 17: 463–516. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463
 88. Stockl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W. F., Menzel, J. E. and Knapp, W. (1996) Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *Journal of Experimental Medicine*, 184: 1769–1779.
 89. Tfayli, A., Rafei, H., Mina, A., Khalil, M., Fakhreddin, N., Mahfouz, R., Hamouri, S., (...) and Zaatari, G. (2017). Prevalence of EGFR and ALK Mutations in Lung Adenocarcinomas in the Levant Area - a Prospective Analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(1): 107–114. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.107>
 90. Torres-Huerta, A., Aleman-Navarro, S., Bravo-Adame, M.E., Sandoval-Hernandez, M.A., Migueles-Lozano, O.A. and Rosenstein, Y. (2017) CD43, en S. Choi (ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules*, Springer Science+Business Media LLC, DOI 10.1007/978-1-4614-6438-9_523-1
 91. Treasure, J., Lane, A., Jones, D. B., and Wright, D. H. (1992). CD43 expression in B cell lymphoma. *Journal of clinical pathology*, 45(11): 1018–1022. doi:10.1136/jcp.45.11.1018
 92. Tuccillo, F. M., De Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A., (...) and Scala, G. (2014). Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: Focus on CD43. *BioMed Research International*, 2014, [742831]. <https://doi.org/10.1155/2014/742831>
 93. Van den Berg, T.K., Nath, D., Ziltener, H.J., Vestweber, D., Fukuda, M., Van Die, I. and Crocker, P.R. (2001) Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *Journal of Immunology*, 166: 3637–3640.
 94. Vasudev, N. S., and Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3): 471–494. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9420-y>
 95. Vincent, M. D., Kuruvilla, M. S., Leighl, N. B., & Kamel-Reid, S. (2012) Biomarkers that currently affect clinical practice: EGFR, ALK, MET,

- KRAS. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 19(1): S33–S44.
<https://doi.org/10.3747/co.19.1149>
96. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Guo, C. (2017) Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5): 761–773. <http://doi.org/10.7150/jca.17648>.
97. Westermarck, J. and Kähäri, V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.*, 13(8):781–792.
98. White, E.S., Strom, S.R., Wys, N.L. and Arenberg, D.A. (2001) Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol.* 166(12):7549–7555. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7549
99. Yang, W., Zheng, Y., Xia, Y., Ji, H., Chen, X., Guo, F., (...) and Lu, Z. (2012) ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nature Cell Biology*, 14: 1295–1304
100. Yao-Ling, L., Wer-Erh, C., Shuo-Chueh C., Chih-yu, C. and Chuen-Ming, S. (2014) The effects of hypoxia on the expression of MMP-2, MMP-9 in human lung adenocarcinoma A549 cells. *European Respiratory Journal*, 44: 2699.
101. Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of cell biology*, 140(4): 885–895. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.885>
102. Zeng, Q. and Hong, W. 2008. The Emerging Role of the Hippo Pathway in Cell Contact Inhibition, Organ Size Control, and Cancer Development in Mammals. *Cancer Cell*, 13: 188-192.
103. Zhu, W. H., Guo, X., Villaschi, S., and Francesco-Nicosia, R. (2000) Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(4): 545–555. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780060>

X.- ANEXOS

1.- Fotografías analizadas en ensayos de formación de tubos.

