



UNIVERSIDAD DE TALCA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

# Estandarización de un modelo de adhesión de células tumorales en flujo.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: JOSE ORELLANA ANDRADE  
PROFESOR TUTOR: DR. RODRIGO MOORE CARRASCO

TALCA-CHILE

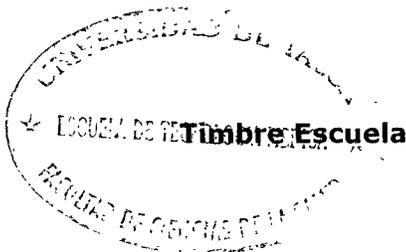
2018

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN  
 DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, ...Jose Orellana Andrade... cédula de Identidad N° 18 572 133 - 7.....  
 autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, (**SI** o **NO**) autorizo a la Universidad de Talca para  
 publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad  
 Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	Estandarización de un modelo de adhesión.
Unidad Académica:	Biopunto Clínica e inmunogenética.
Carrera o Programa:	Tecnología Médica.
Título y/o grado al que se opta:	Licenciado en Tecnología Médica.
Nota de calificación	6,8



Firma de Alumno	
Rut:	<u>18572 133 - 7</u>
Fecha:	<u>4 / 3 / 19</u>

## **DEDICATORIA:**

*A quien mediante su oración constante ha velado por mi bienestar, quien mediante sus palabras me ha impulsado a la superación personal y el progreso en todo ámbito, enseñándome a siempre a mantener la confianza en Dios y esperar en su voluntad perfecta. Mi padre en la Fe Naasón Joaquín García, Siervo de Dios y Apóstol de Jesucristo.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios, por su infaltable ayuda a lo largo toda de mi vida, y quien me ha permitido avanzar en esta carrera universitaria, dándome la comprensión y toda capacidad para alcanzar lo que hasta este momento he alcanzado, siendo El, el autor de todos mis logros.

A mis padres, José Orellana González y Cecilia Andrade Rojas, quienes me han educado y me han dado todo de sí, cuyo sacrificio diario he incesante ha hecho de mi lo que soy hasta el día de hoy. A mis hermanas Laura, Cecilia y Claudia, apoyos importantes en mi vida, cuyo cariño y entrega siempre han estado conmigo.

A mis amigos y hermanos que me han alentado y me han acompañado con sus oraciones, brindándome afecto y apoyo incondicional. Felipe, Andrés, Misael, Damaris, Margot, Germán e Israel.

Al Dr. Rodrigo Moore Carrasco y al Laboratorio de investigación de plaquetas de la Universidad de Talca, quienes me asistieron y ayudaron en esta memoria, aportando conocimientos y dirección, además de insumos y equipamiento para la realización de esta.

A la Universidad de Talca, la Facultad de Ciencias de la Salud y la Escuela de Tecnología Médica y sus docentes, por aportar en mi formación profesional con conocimiento, infraestructura y calidad humana.

## INDICE

1- RESUMEN .....	7
2- INTRODUCCION.....	8
3- HIPOTESIS: .....	10
4- REVISION BIBLIOGRAFICA.....	11
4.1- Autosuficiencia de señales de crecimiento: .....	13
4.2- Insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento: .....	14
4.3- Evasión de la muerte celular: .....	15
4.4- Capacidad ilimitada de replicación: .....	15
4.5- Inducción de angiogénesis: .....	16
4.6- Inestabilidad del genoma y mutaciones: .....	16
4.7 Inflamación pro-tumoral:.....	17
4.8- Reprogramación del metabolismo: .....	18
4.9- Evasión de la destrucción inmune:.....	20
4.10- Invasión y metástasis: .....	21
4.10.1- Invasión de la matriz extracelular.....	21
4.10.2- Diseminación vascular y alojamiento de las células tumorales.....	23
5- OBJETIVOS .....	27
5.1- Objetivo general:.....	27
5.2- Objetivo específico: .....	27
6- MATERIALES Y METODOS.....	28
6.1- Líneas celulares:.....	28
6.1.2- Preparación de los grupos celulares .....	28
6.2- Equipamiento: .....	29
6.2.1- Controlador Bioflux 200: .....	29
6.2.2- Sistema de imagen:.....	30
6.2.3- Software:.....	30
6.3- Metodología: .....	30
6.3.1- Estandarización y preparación de las placas de trabajo: .....	30
6.3.2- Preparación de la matriz con fibronectina: .....	31

6.3.3- Preparación de la matriz con Matrigel®: .....	31
6.4- Estandarización del ensayo con células tumorales: .....	32
6.4.1- Ensayos de prueba en la placa con matriz de fibronectina: .....	32
6.4.2- Ensayo de adhesión de células tumorales en matriz de fibronectina: .....	33
6.4.3- Ensayo de adhesión de células tumorales en una matriz de Matrigel®: .....	34
6.5- Análisis estadístico:.....	34
7- RESULTADOS .....	35
7.1- Estandarización de las condiciones óptimas para el ensayo: .....	35
7.1.1- Adhesión de células tumorales en una matriz de fibronectina a 1mg/ml: .....	35
7.1.2- Adhesión de células tumorales en una matriz de fibronectina a 20ug/ml: .....	37
7.3- Ensayo de adhesión de células tumorales en matriz de fibronectina: .....	39
8- DISCUSION DE RESULTADOS.....	43
8.1- Ensayos de prueba para la determinación de los parámetros óptimos: .....	43
8.2- Estudio de adhesión y “rolling” en células tumorales.....	45
8.3- Ensayo realizado con Matrigel® .....	46
9- CONCLUSION.....	48
11- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	50
12- Anexos .....	54

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

Tabla 1: Resultados obtenidos del primer ensayo de prueba para establecer las condiciones óptimas de trabajo.....	36
Figura 1: Gráficos de los resultados de adhesión y “rolling” celular del primer ensayo de prueba.....	36
Tabla 2: Resultados obtenidos del segundo ensayo de prueba para establecer las condiciones óptimas de trabajo.....	38
Figura 2: Gráficos de los resultados de adhesión y “rolling” celular del segundo ensayo de prueba.....	38
Tabla 3: Conteo de células tumorales adheridas tratadas con BF6 y de las células control tratadas con DMSO. ....	39
Tabla 4: Datos estadísticos de los grupos contrastados de adhesión.....	40
Tabla 5: Resultados del test T de Student para el estudio de la adhesión.....	40
Tabla 6: Conteo de células que realizaron rolling en la matriz de fibronectina (20ug/mL).....	41
Tabla 7: Datos estadísticos de los grupos contrastados en el conteo de “rolling”.....	42
Tabla 8: Resultados de la comparación de medias por el test T de Student en el ensayo de “rolling”.....	42

## 1- RESUMEN

El ciclo celular es un complejo conjunto de etapas de crecimiento, maduración y división celular que permite desarrollo biológico y fisiológico de un organismo. El cáncer es el producto de una alteración de este ciclo, ocasionada tanto por factores genéticos, como también la exposición a agentes tóxicos o nocivos, factores biológicos como la edad, el sexo. También algunas infecciones de curso crónico pueden ser causantes de neoplasias malignas, como por ejemplo las producidas por virus como *Hepatitis (B y C)*, bacterias como *Helicobacter pylori*, entre otras(1). Una de las complicaciones más importantes y determinante a la hora de realizar cualquier tipo de tratamiento, es la metástasis, que se conoce como la diseminación de células cancerígenas provenientes de un tumor primario que se desprenden de él y que se propagan por vías sanguíneas o linfáticas, mediante las cuales invaden otros órganos y tejidos desarrollando en ellos nuevos tumores malignos.

A nivel mundial es una patología que sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en el orbe(2), En Chile la realidad, en cuanto al cáncer, es similar, posicionándose como la segunda causa de muerte(1), antecedida solo por enfermedades de tipo cardiovascular.

Dada la importancia de esta enfermedad es necesario la búsqueda de técnicas que faciliten y permitan ampliar las opciones terapéuticas. Hoy en día, en cáncer, la utilización de ensayos que se realicen bajo condiciones de flujo son poco conocidos. Estos se basan en el flujo controlado de células cancerígenas en un capilar que está revestido con proteínas de matriz, donde finalmente mediante un software se puede evaluar adhesión de estas células a dicha matriz, pudiéndose emular la adhesión de células malignas, por ejemplo, a vasos sanguíneos previo a la extravasación producida en el comienzo del proceso metastásico.

## **2- INTRODUCCION**

“Los cánceres son enfermedades producidas por influencias combinadas de factores genéticos, biológicos (como edad y sexo), exposiciones ambientales (como el asbesto, las aflatoxinas, la luz ultravioleta o el arsénico), infecciones crónicas (virus de la hepatitis B y C, virus del papiloma y *Helicobacter pylori*) y estilos de vida no saludables (dieta inadecuada, sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol)”(1). Es un problema de alta importancia para la salud pública a nivel mundial, debido a que, Según la Organización Mundial de la Salud (OMS)(2) “el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y es responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes en 2018. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer”. En Chile esta realidad no está alejada, pues según los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud (MINSAL)(1) “los tumores malignos son la segunda causa de muerte en Chile después de las enfermedades cardiovasculares, con 24.592 fallecidos en 2013 (25,6% del total de muertes) y una tasa de 139 por 100.000 habitantes”, solo antecedida por enfermedades cardiovasculares. Actualmente “la mortalidad por tumores malignos aumenta con la edad, especialmente después de los 59 años, y es mayor en los hombres. El primer lugar como causa de muerte en los hombres lo ocupa el cáncer de estómago seguido por próstata; en las mujeres, es el cáncer de mama, seguido de estómago, tráquea, bronquio y pulmón, y vesícula”(1).

“La metástasis implica la propagación de las células cancerosas desde el tumor primario a los tejidos circundantes y a los órganos distantes y es la causa principal de morbilidad y mortalidad por cáncer”(3). La cascada metastásica, se completa una vez que las células cancerosas se desprenden del tumor primario, se introducen en el interior de sistemas como el circulatorio y linfático, evaden la reacción inmune, y se extravasan en lechos capilares distintos al de origen para así invadir y proliferar en otros órganos (3).

“La metástasis de células tumorales a través de la circulación sanguínea es un proceso complejo y es uno de los grandes desafíos en la investigación del cáncer, ya que la propagación metastásica es responsable del 90% de la mortalidad relacionada con el cáncer” (4). Este proceso implica una serie de pasos a los cuales se les denomina cascada metastásica, que involucra la intravasación al torrente sanguíneo, la adhesión en las paredes internas vaso y la posterior extravasación de las células tumorales.

La adhesión que se produce entre las células tumorales y el endotelio vascular es uno de los puntos críticos en la cascada metastásica. Este fenómeno se puede visualizar *in vitro* sometiendo células cancerígenas a condiciones de flujo fisiológico controlado.

La presente investigación entrega información respecto a la utilización del sistema Bioflux de Fluxion® que permite un flujo controlado con el que se puede conseguir la evaluación de la adhesión de células tumorales, buscando con ello la estandarización de un nuevo método de análisis.

### **3- HIPOTESIS:**

El sistema Bioflux de Fluxion® permite la evaluación de la adhesión de células tumorales en condiciones de flujo.

#### **4- REVISION BIBLIOGRAFICA**

El ciclo celular es un conjunto de etapas por las cuales la célula debe participar para lograr la madurez en cuanto a su estructura, la proliferación o lograr la especialización dependiendo del tejido al cual pertenezca, este proceso está estrictamente controlado tanto por sistemas que tienen acciones estimulantes como inhibitorias. En las células eucariontes, este ciclo está compuesto de las fases G1, S, G2 y M (5). y también G0 conocida como una fase donde la célula se encuentra en un estado quiescente, que entra al ciclo por inducción producida por algún estímulo. En la fase M a su vez “es posible distinguir las siguientes cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase” (6). Esta fase, también conocida como cariocinesis, “se caracteriza por la generación de dos núcleos hijos dotados de un paquete de cromosomas idéntico al del núcleo progenitor (previa replicación de su ADN)” (6).

“La regulación del ciclo celular involucra a las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas, así como a otro tipo de proteínas, que son producto de los protooncogenes y los genes supresores de tumor que, de igual forma, participan de manera orquestada en este control” (5). Esta regulación se realiza en ciertos puntos de control que “son momentos concretos y específicos del ciclo en los cuales la célula evalúa su estado y/o las condiciones del medio y detecta posibles aberraciones” (6). Existen tres puntos de control principales, que concuerdan con la transición entre las fases: el punto G1, el punto G2 y el punto M (6). En primer punto de control (de G1) se evalúan tres condiciones necesarias para que el ciclo continúe desde el punto G1 a S estas son: el estado del ADN, en donde se detectan posibles lesiones, el tamaño celular, y las condiciones del medio ambiente (6), este punto de control es necesario debido a que los procesos posteriores del ciclo requieren altas cantidades de energía, y por lo tanto esta debe ser utilizada de manera segura, con células que estén integras en los parámetros que se evalúan, si la célula en este punto de control no logra superar los parámetros que se evalúan, el ciclo para ella se detendrá en fase G1 de manera transitoria o permanente, a esta última se le denomina estado Go. (6). El segundo punto de control se denomina punto de control de G2, y está ubicado entre las fases G2 y M del ciclo, en este se

evaluará, además del tamaño celular y las condiciones de medio extracelular, si la replicación del ADN fue completa y si las dos copias son idénticas (6), de este punto dependerá si se llega a realizar la mitosis. El tercer punto de control (M) se corresponde con el paso de metafase a anafase. La segregación de las cromátidas hermanas y su reparto equitativo demanda de la célula comprobar que, en el plano ecuatorial, los cromosomas se encuentran correctamente unidos al huso mitótico. Por ese motivo, el punto M es conocido también como el punto de control del ensamblaje del huso (6).

El cáncer se caracteriza por ser una patología que tiene muchos factores que afecta el normal crecimiento y proliferación de las células, con ello también produce alteraciones de la diferenciación celular, lo que posteriormente provoca la formación de un tumor en el tejido afectado (5). “Por ello, el término cáncer implica, además de un descontrol en el crecimiento y la proliferación celular, una transformación maligna, es decir, una pérdida de las características y funciones normales de las células en un tejido” (5). El proceso en el cual se lleva a cabo la formación de un tumor maligno se denomina carcinogénesis el cual consta de varias etapas debido a la acumulación de diversas alteraciones genéticas que, en conjunto, dan lugar al fenotipo transformado (7). Estas mutaciones genéticas, en la célula provocan que se duplique a tasas más altas que el resto, generando células que mantienen esta característica descontrolada, a las que se les denomina clones. Estas células hijas a su vez van acumulando una mayor cantidad de mutaciones, aumentando así su supervivencia y su proliferación en cantidades mayores a la célula tumoral primaria (8). En las células humanas los genes encargados de la proliferación y crecimiento celular son denominados protooncogenes, estos al sufrir una mutación de tipo dominante cambian a oncogenes, lo que se traduce en una desmesurada proliferación y supervivencia de las células tumorales (8). Por otra parte estos no son los únicos genes que pueden encontrarse alterados para que se desarrolle una respuesta tumoral, sino que también los genes supresores de tumores, como por ejemplo el gen P53 se desactiva con frecuencia en cánceres humanos, es más estos sufren mutaciones con mayor frecuencia que los oncogenes (9)-(10). Normalmente la inactivación de ambas copias de los genes supresores de tumores manifestaría la aparición de un fenotipo. En cáncer ocurre primeramente la inactivación de uno de estos genes, con la consiguiente inactivación del segundo y la posterior aparición de un fenotipo tumoral (10).

En los últimos años, han sido descubiertos centenares de genes relacionados con el cáncer. Por ejemplo, los genes TP53 que habitualmente están mutados; otros como ABL son afectados en algunas determinadas leucemias. Cada uno de estos genes tiene una tarea específica en la célula, cuya desregulación originará alguna neoplasia maligna (7). Las células cancerígenas cumplen con diez características distinguibles en cuanto a su fisiología:

#### **4.1- Autosuficiencia de señales de crecimiento:**

Las células normales, para proliferar son, generalmente estimuladas, externamente, por factores del crecimiento, los que interaccionaran con receptores de membrana que típicamente poseen dominios tirosina-quinasa a nivel intracelular, lo que permite una activación de diversas vías de señalización las que favorecen la continuación del ciclo celular y con ello el crecimiento y supervivencia celular (8). Muchas células cancerígenas son capaces de sintetizar moléculas similares a los factores de crecimiento que ellas necesitan para proliferar (7), “Por ejemplo, numerosos glioblastomas secretan factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y expresan el receptor PDGF” (7), pero también pueden estimular a células vecinas, como por ejemplo las células del estroma, para que ellas sinteticen ligandos similares a los factores de crecimiento a los que es sensible (7)-(8). Otro tipo de alteración que puede provocar un exceso de señales de crecimiento, son las mutaciones que se producen en los genes que codifican los receptores de tirosina quinasa o de factores de crecimiento, lo que causa una señal sin pausa, ejemplo de ello son los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en tumores de mamas, pulmón, etc (7). Cuando existe una mutación en genes que codifican moléculas de transmisión de señales, como por ejemplo la mutación de la proteína RAS, que se encuentra con alta frecuencia en canceres humanos, se bloquea la hidrólisis de GTP a GDP causando una sobreexpresión de señales (7) lo que favorece la proliferación celular. Los complejos ciclina con ciclinas dependientes de quinasas (CDK) son los encargados, mediante fosforilación de sustratos, de favorecer el ciclo celular, las CDKs, además, tienen inhibidores que regulan su acción. Las mutaciones que activan a los genes de las ciclinas o que inactivan a los reguladores negativo

de las ciclinas y quinasas dependientes de ciclina, provocan una progresión descontrolada del ciclo celular, esto se puede observar con frecuencia en melanomas, cánceres cerebral, pulmonar y pancreático (7).

#### **4.2- Insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento:**

La célula cancerígena pierde la capacidad de inhibir la proliferación dependiente por contacto (6). En una célula normal los oncogenes codifican proteínas que promueven el crecimiento celular, por otra parte hay otros genes supresores de tumores que frenan esta proliferación celular. En esta característica de las células tumorales hay una alteración en estos genes lo que la hace refractaria a la inhibición del crecimiento, teniendo una mayor acción de oncogenes (7). Como ejemplos se pueden mencionar:

El gen del retinoblastoma (RB), posee efectos antiproliferativos, y está encargado de actuar en el paso G1/S del ciclo celular, esta acción la realiza mediante la hiperfosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) por quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (7),(11). La interacción de la proteína de RB con el factor de transcripción E2F, no permite la transcripción de genes de algunas ciclinas con la ciclina E, necesaria para la replicación de ADN, con lo que la célula se detiene en G1 (7). La pRB se inactiva y desacopla de E2F cuando es fosforilada por el complejo ciclina D-CDK4/6, el cual es activado por factores de crecimiento (7), es así como se pierde el control del ciclo celular. Además muchos virus ADN oncogénicos pueden inactivar la pRB directamente, como por ejemplo el VPH (7).

El gen TP53 es un gen supresor tumoral, que codifica a la proteína p53 (7), es conocido como “guardián del genoma” pues su función es detectar daños en ADN, detener el proceso y permitir la reparación, y si no se logra lo anterior, inducir apoptosis (12), tiene una acción similar a la del gen RB, que es impedir el paso a la fase S. Cuando hay daño en el ADN se activa p53 mediante fosforilación, esta activa a la proteína p21, que impide la fosforilación

de pRB, impidiendo que prosiga el ciclo celular (7). “La pérdida de p53 puede causar la replicación celular continua a pesar del daño en el ADN y la falla para activar la muerte celular programada.”(12) La inactivación de p53, al igual que pRB puede ser por virus ADN oncogénicos como VPH (7).

#### **4.3- Evasión de la muerte celular:**

La apoptosis se puede llevar a cabo mediante dos vías, intrínseca o extrínseca, en ambas vías se produce la activación de la cascada de proteolítica de caspasas que posteriormente destruye la célula (7). Las células tumorales son capaces de evadir la muerte por apoptosis, a pesar de la acumulación de aberraciones genéticas, y estar en un ambiente desfavorable, muchas de estas células expresan factores antiapoptóticos como Bcl-2 que inhibe a Bax o Bim que son factores proapoptóticos, alterándose así el balance normal que requiere para inducir muerte celular (6).

#### **4.4- Capacidad ilimitada de replicación:**

La mayor parte de las células tiene un número limitado de divisiones celulares, condición que está dada por la presencia de telómeros en los cromosomas, que son secuencias múltiples dispuestas en tándem, lo cuales se acortan con cada división celular llegando a un “punto de control” del ciclo celular donde se produce una crisis mitótica (7)-(8). La telomerasa es una ADN polimerasa que adiciona segmentos repetitivos a los extremos del ADN telomérico, evitando su acortamiento, está presente en las células germinales las cuales pueden dividirse de manera indefinida (8). Las células tumorales reactivan esta telomerasa evitando la catástrofe mitótica y perpetuándose alcanzando la inmortalidad (7).

#### **4.5- Inducción de angiogénesis:**

La angiogénesis comienza a partir de vasos pre existentes y es necesaria para suplir nutrientes y oxígeno a los tejidos en formación. Está regulada por diversas vías en las que participan moléculas anti- y pro-angiogénicas que en tejidos normales se encuentran en balance (8). Un tumor no puede crecer más de 1 o 2 centímetros si no tiene una correcta irrigación (7). Sánchez (8) indica “El crecimiento tumoral genera hipoxia local que funciona como estímulo para la producción de citoquinas angiogénicas como VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) entre otras”.

#### **4.6- Inestabilidad del genoma y mutaciones:**

Esta cualidad es considerada como una de las de las dos características facilitadoras del desarrollo de una neoplasia.

La existencia de mutaciones y la acumulación de estas en la célula tumoral, están favorecidas por la inestabilidad genómica de estas células. Esta característica está presente en la mayoría de los tumores y acelera la acumulación de cambios genéticos (8). La progresión tumoral puede representarse como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales se desencadena por la adquisición aleatoria de un genotipo mutante, el cual otorga a sus subclones una ventaja selectiva por sobre el resto, permitiéndole el crecimiento y su eventual dominio del tejido en el que se encuentra (13).

En una célula normal los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y reparar aberraciones en el ADN aseguran que las tasas de mutaciones espontaneas sean muy bajas durante cada generación celular (13). Esto cambia en las células neoplásica a medida que van adquiriendo los genes mutantes necesarios para el comienzo y desarrollo de la tumorigenesis, ya que esta tasa de mutación aumenta (14). Esta mutabilidad se logra debido a que hay una mayor sensibilidad a los agentes mutagénicos y/o a la ruptura de uno o varios componentes de esta maquinaria de mantenimiento genómico (13), esto último producto de mutaciones en

genes supresores de tumor o reparadores de ADN (8). Otra causa de inestabilidad genómica, además de los trastornos en los mecanismos de control celular, es la pérdida de ADN en los telómeros (8). Esta pérdida genera, en muchos tumores, inestabilidad cariotípica tales como delección o amplificación de segmentos cromosomales (8).

“A pesar de que las mutaciones varían entre distintos tipos de tumores, su cantidad y presencia en el genoma tumoral ha demostrado que la inestabilidad genómica es inherente a los tumores. Esta finalmente, aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones en oncogenes que generan las capacidades que mejoran su sobrevivencia”(8).

#### **4.7 Inflamación pro-tumoral:**

Corresponde a la segunda característica facilitadora del proceso tumoral. A pesar que la inflamación es considerado un mecanismo de defensa, o bien, una respuesta protectora frente a los tumores, también puede activar un proceso tumoral maligno (7). En los tumores hay interacción de células cancerosas con células que colaboran con el crecimiento tumoral, estas dan soporte tanto nutricional como funcional, permitiendo la formación de un microambiente tumoral (8), este está formado por varios componentes, tales como, células transformadas, fibroblastos anormales, células endoteliales, células madre mesenquimales, y células del sistema inmune innato y adaptativo, las que son responsables de la secreción de sustancias como citoquinas, quimioquinas, péptidos, metaloproteasas, y componentes de matriz extracelular, haciendo a este microentorno apto para el desarrollo de una neoplasia (15). Este microentorno inflamatorio es capaz de aumentar las tasas de mutación, además de aumentar la proliferación de células mutadas (16).

Las células del sistema inmune, son las principales encargadas de la inmunovigilancia tumoral y de la eliminación de los clones de células tumorales(8). Durante este proceso se produce un estadio de inflamación crónico(8), en donde leucocitos, como por ejemplo mastocitos y macrófagos, se infiltran en los tumores, produciendo factores que promueven el

crecimiento tumoral en todas sus etapas (7, 8). Hoy en día se conoce que en prácticamente todas las lesiones neoplásicas hay presencia de células del sistema inmune, en distintas densidades, las cuales van desde infiltraciones leves, las que son detectadas solo con anticuerpos específicos de tipo celular, hasta infiltraciones graves (13). En esta infiltración las células inmunes producirán citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y sustancias reactivas del oxígeno y nitrógeno (16).

La inflamación promueve la iniciación tumoral al generar estrés genotóxico, el cual favorece la adquisición de mutaciones; también participa en la promoción al inducir la proliferación tumoral y la progresión tumoral al incrementar la angiogénesis alrededor del tumor y la invasión tisular al favorecer la extravasación, lo que facilita la metástasis (8).

El estado de inflamación crónica descrito anteriormente también se puede alcanzar en respuesta a infecciones microbianas o en respuesta a una reacción autoinmune (7). Ejemplo de ello son infecciones bacterianas como la producida por *H. pylori*, o por virus, tales como el virus de la hepatitis B y C, o también patologías como pancreatitis crónica, esófago de Barret (7). En respuesta compensatoria al daño tisular sufrido en estas afecciones las células inmunes se encargan secretar citoquinas, quimioquinas y sustancias bioactivas. Esta condición acompañada de la disminución de la apoptosis y de replicación celular persistente, puede dar cabida a la adquisición de alguna mutación en algún gen involucrado en la carcinogénesis.

#### **4.8- Reprogramación del metabolismo:**

El ATP es la fuente de energía más utilizada por las células de mamíferos, la forma de obtención puede ser mediante fosforilación oxidativa donde se produce hasta 36 ATP por mol de glucosa, o de manera no oxidativa en un proceso denominado glucólisis donde solo se producen 2 ATP, esta última se conoce como un metabolismo de reserva en casos de hipoxia (17, 18). En base a lo anterior los modelos convencionales de dinámica energética

celular establecen que la disponibilidad de oxígeno es la que determinará la vía metabólica productora de ATP más óptima (18).

La proliferación crónica exacerbada que esencialmente representa a una patología neoplásica, no solo involucra un descontrol de la proliferación, sino que también otros ajustes o cambios los cuales tienen relación con el metabolismo energético para alimentar el crecimiento y división de las células (13). “En condiciones normales aeróbicas, las células procesan glucosa hasta su degradación completa a dióxido de carbono en la mitocondria. En células tumorales, ciertas mutaciones y la presencia de un medio pobre en oxígeno conducen al efecto Warburg”(8) en el cual la célula tumoral aumenta su tasa de captación de glucosa de manera drástica con la consiguiente formación de lactato, esto en presencia de oxígeno y con mitocondrias en un pleno funcionamiento (19). La reprogramación metabólica de la glucosa producida por la célula tumoral, la lleva a un estado conocido como “glucolisis aeróbica” (13).

La reprogramación del metabolismo energético de la célula tumoral, es aparentemente contraria a lo que se pudiera imaginar, debido a que debe compensar un déficit en la formación de ATP, ya que en la fosforilación oxidativa se tiene una eficiencia aproximada de 18 veces mayor al que se realiza por glucolisis (13). Esta condición de desventaja se compensa con la sobreexpresión de transportadores de glucosa (GLUT1) que aumenta la disponibilidad de esta macromolécula en el interior de la célula (8).

La glucolisis aeróbica permite que las células utilicen el nutriente extracelular más abundante (la glucosa) para producir ATP de manera abundante, esto a pesar que el rendimiento de ATP por glucosa consumida es bajo, si se obtiene un flujo glicolítico, lo suficientemente alto, por métodos como la sobreexpresión de transportadores GLUT1, el porcentaje de ATP producido puede superar incluso al de la fermentación oxidativa (8, 20). Por otra parte, en la degradación de la glucosa, se proporcionan a la célula distintos intermediarios necesarios para otras rutas biosintéticas como azúcares de ribosa para

nucleótidos, glicerol y citrato para lípidos, aminoácidos no esenciales y NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato (20).

#### **4.9- Evasión de la destrucción inmune:**

La teoría de la vigilancia inmune, que tiene larga data, indica que las células y los tejidos son constantemente monitoreados por el sistema inmune, el cual se encuentra siempre alerta, y que por él, gran parte las células cancerosas nacientes son eliminadas y por lo tanto también los tumores nacientes (13). Esto evidencia que si una célula tumoral puede evolucionar a un tumor sólido es porque ha logrado evadir los distintos brazos del sistema inmune o han logrado limitar el alcance de la destrucción inmunológica, evitando así su eliminación (13).

Uno de los mecanismos de escape de las células tumorales al sistema inmune es la “pérdida de la expresión de MHC para evitar el reconocimiento por los T-linfocitos”(21). Esta pérdida es gran importancia, debido a que cualquier defecto en el procesamiento y presentación de antígenos afecta y perjudica la capacidad de reconocimiento de los linfocitos T (21). Este tipo de defectos se han atribuido a mutaciones de genes del complejo MHC o a mutaciones puntuales de la proteína  $\alpha$ -2-microglobulina, también se han descrito mutaciones en proteosomas y las proteínas TAP (transportadoras asociadas al procesamiento antigénico), que son proteínas que participan en el proceso de presentación antigénica (22). Otros mecanismos de evasión del sistema inmune son la disfunción o pérdida de la expresión de antígenos en el tumor o también de moléculas coestimuladoras en el tumor o en las células dendríticas, las cuales son necesarias para una interacción eficiente con los linfocitos T (21). También puede ocurrir una neutralización de la respuesta inmune a través de la inducción de anergia o por la eliminación total de clones de linfocitos T específicos (21). El sistema inmune puede secretar, en su activación, factores de crecimiento tumoral como por ejemplo el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), a su vez el tumor puede liberar factores inmunosupresores tales como prostaglandina E2 e IL-10 (21).

#### **4.10- Invasión y metástasis:**

Corresponde a una de las características más importantes de las células tumorales. Esta importancia radica en que el pronóstico de un paciente está estrechamente ligado a la diseminación metastásica de la enfermedad a sitios locales, ya que estas representan un alto porcentaje de la mortalidad por cáncer (23). A pesar que la presencia de metástasis tiene una alta mortalidad en pacientes que la padecen, solo un pequeño porcentaje, alrededor del 0,01% de las células tumorales que entran en circulación a partir de un tumor primario, tienen esta cualidad (24). Esta capacidad es exclusiva de tumores malignos y se desarrolla por vía hematogena, linfática o serosa (6). Este es un proceso complejo que involucra pasos secuenciales que se conocen como cascada invasión-metástasis, el cual se puede resumir en dos etapas, siendo el primero la invasión de la matriz extracelular (MEC) y la segunda la diseminación vascular y posterior alojamiento de las células tumorales (7).

##### **4.10.1- Invasión de la matriz extracelular**

La invasión se puede describir en cuatro pasos (7). El primer paso de la cascada metastásica corresponde al desprendimiento de las células neoplásicas del tumor denominado primario, debido a la disminución de la expresión de la E-cadherina, que corresponde a una proteína fundamental en la adhesión con otras células o con la matriz extracelular (MEC) (7, 8), esto debido a que la E-cadherina se encuentra unida al citoesqueleto de actina de la célula mediante proteínas denominadas  $\alpha$ -catenina y  $\beta$ -catenina que están presentes en su cola citoplasmática de esta (24). La función se pierde en los tumores malignos debido a mutaciones que pueden ser en el gen mismo de esta proteína (CDH1) o los de la  $\beta$ -catenina o también la expresión inadecuada de factores de transcripción como TWIST o SNAIL, los cuales suprimen la expresión de la E-cadherina (7, 24).

En la segunda etapa de la invasión de la MEC ocurre una degradación local de la membrana basal y del tejido conjuntivo intersticial, por acción de proteasas liberadas por las células tumorales, tales como metaloproteasas de matriz (MMP), catepsina D y la urocinasa

(7). Las metaloproteasas pertenecen a una familia de endopeptidasas cuya actividad es dependiente de zinc (25). Durante la invasión las MMP se ubican en estructuras especializadas llamadas invadopodios, esta estructura representa un sitio activo de degradación de la MEC (26), esta utiliza proteínas de transmembrana que están relacionadas con ella tales como MMP-14, proteínas de la familia ADAM, así como otras MMP secretadas y activadas en el sitio (MMP-2 y MMP-9) para así degradar una gran variedad de macromoléculas de MEC facilitando la invasión celular (26). Cabe destacar que las MMP no solo regulan la invasión tumoral mediante la degradación de componentes insolubles de la membrana basal y de la matriz, sino que también mediante la liberación de factores de crecimiento que han sido secuestrados en la MEC, como por ejemplo, los derivados de la degradación de colágeno, quienes tienen acción quimiotáctica, angiogénica, y promueven el crecimiento (7).

El tercer paso dentro de esta cascada corresponde las alteraciones de las uniones entre células tumorales y proteínas de la MEC, el desprendimiento de una célula normal de la MEC produciría la apoptosis de la misma, pero en una célula tumoral esta reacción es evadida (7). Además se debe destacar que la matriz está alterada, de manera que se favorece la invasión y la metástasis, como ejemplo se puede mencionar lo que ocurre en la escisión de las proteínas de la laminina y del colágeno tipo IV mediada por las MMP-9 y MMP-2 respectivamente, lo que genera nuevos lugares de adhesión para los receptores de células tumorales y que estimulan a su migración (7).

La citocinesis corresponde al último paso de la invasión, donde las células tumorales son empujadas a través de membranas basales degradadas y zonas proteolizadas de la matriz (7). Esta migración es un proceso complejo y que consta de muchas etapas, que involucran familias de receptores y proteínas de señalización que finalmente permiten la compresión del citoesqueleto de actina(7). Existen factores autocrinos de motilidad, los cuales potencian la migración, estos son denominados también factor “scatter”(7, 27). Algunos ejemplos de factores “scatter” son el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que permiten la movilización de las células haciéndolas invasivas (27).

Las células del estroma producen efectores paracrinos de la motilidad celular, como por ejemplo, el factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SCF), que se unen a los receptores de células tumorales (7).

#### **4.10.2- Diseminación vascular y alojamiento de las células tumorales**

Una vez en el torrente sanguíneo las células tumorales forman embolias al agregarse y adherirse a leucocitos circulantes y sobre todo a plaquetas confiriéndole a ellas protección frente a células anticancerígenas de huésped (7). Las células tumorales pueden también diseminarse de manera individual, sin agregarse, sea cual sea la forma en la que viaje a través del torrente sanguíneo (también en el linfático o seroso), la adhesión al endotelio vascular y su salida al parénquima de los órganos es un proceso similar al descrito anteriormente de invasión de la matriz extracelular (28).

Los émbolos formados entre las células tumorales y leucocitos o plaquetas llegan a un punto en donde se detienen en el flujo sanguíneo, lo que implica que se ha conseguido la adhesión al endotelio, proceso el cual será seguido de la salida a través de la membrana basal (28). En esta adhesión y salida participan moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas, una de gran importancia es la molécula CD44, que también está presente en linfocito T y que media su migración. Se cree que las células tumorales presentan variantes de esta molécula con la que consiguen realizar la diseminación extravascular (28, 29)

#### **4.10.3- Adhesión celular y metástasis.**

La adhesión de las células tumorales al endotelio vascular es una de los puntos críticos en la cascada metastásica. Esto debido a que cuando las células neoplásicas están en circulación

sanguínea, en una instancia final, interactúan con el endotelio lo que podría provocar la detención y consiguiente extravasación de ellas (30).

“Se cree que el desarrollo de metástasis se inicia a través de mecanismos similares a los utilizados por los leucocitos para la adhesión y la transmigración a través del endotelio sanguíneo” (29). Si bien el mecanismo mediante el cual se logra la adhesión de las células tumorales al endotelio es diferente al proceso de reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación, las moléculas involucradas en esta adhesión al endotelio son potencialmente las mismas en ambos procesos (30). Ejemplo de ellos son las selectinas y las integrinas.

#### **4.10.3.1- Selectinas:**

Pertenecen a la familia de las lectinas, estas se encuentran en las membranas plasmáticas y tienen por función el reconocimiento y la adhesión intercelular en una amplia gama de procesos celulares (17). Existen tres miembros en la familia de las selectinas, la P-selectina, la cual se expresa en plaquetas activadas y células endoteliales, la E-selectina expresada en las células endoteliales activadas, y la L-selectina encontrada en leucocitos (31).

Cada tipo de selectina se ha descrito que tiene alguna relación con el proceso metastásico. La P-selectina juega un rol importante en evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales, esto debido a que existe una interacción células tumorales-plaquetas, que, de no existir, las células tumorales serían eliminadas por las células *Natural killer* (NK) (30). La L-selectina es la encargada de mediar el reclutamiento y la adhesión de leucocitos en el microambiente de las células tumorales metastatizantes, esto en el trombo tumoral en sí o con el endotelio adyacente (31).

Según Gakhar (29) “Numerosos estudios que utilizan líneas de células tumorales y modelos de ratones sugieren que la Selectina endotelial (E) también participa en la adhesión de células tumorales, la migración y el desarrollo de metástasis”. En modelos experimentales

de ratones con colonización metastásica en hígado se demostró que en las células endoteliales activadas expresan E-selectina (30, 32, 33). Cuando se inhibió la acción de la E-selectina dio como reacción la atenuación de la metástasis en el modelo experimental, y por el contrario, la sobreexpresión de esta proteína redirigió la metástasis en este órgano (30). Con esto se confirmó la participación de la E-selectina en el proceso.

Se ha descrito que la mayoría de los ligandos de E-selectina corresponden a mucinas (31). Estas mucinas son proteínas ricas en treonina y serina con O-glicosilación por carbohidratos sulfatados, además contienen tetrasacáridos sLex, sLes o sus forma sulfatadas que son reconocidas también por los otros tipos de selectina (34). Pero también existen otros ligandos como el receptor de muerte 3 y una glicofoma específica de CD44 (31, 35, 36).

#### **4.10.3.2- Integrinas:**

Son una familia de glicoproteínas de transmembrana que consisten en heterodímeros formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidos de manera no covalente (37). En mamíferos se conocen 18 tipos de integrinas  $\alpha$  y 8  $\beta$ , las cuales se combinan para formar 24  $\alpha/\beta$  (30).

Las integrinas tienen un rol de adhesión celular, específicamente lo hace con las proteínas de MEC, tales como laminina, fibronectina, colágeno o vitronectina, proporcionando a la célula un anclaje y motilidad para la invasión (30).

“La presencia ubicua de integrinas en células tumorales, componentes sanguíneos, vasculatura y células estromales sugiere que las integrinas podrían contribuir esencialmente a diferentes pasos en la cascada metastásica”(30). Se han identificado varias integrinas presentes en células tumorales de carcinoma de mama, próstata, cáncer de páncreas y pulmón, estas son las integrinas  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 4$  (30).

“La expresión en células tumorales de la integrina  $\alpha v \beta 3$  junto con su capacidad para unirse a varios componentes de la MEC, incluida la fibronectina, la vitronectina y la osteopontina, se ha considerado como un factor crítico para afectar el sitio de la metástasis.”(30). El fibrinógeno, en específico, se ha identificado como un puente entre las integrinas  $\alpha IIb \beta 3$  en la plaquetas y  $\alpha v \beta 3$  en las células neoplásicas(30, 38). “Esta interacción facilita la detención de las células tumorales en la vasculatura y la metástasis en diversos tejidos, incluidos la médula ósea y los pulmones”(30)

## **5- OBJETIVOS**

### **5.1- Objetivo general:**

Estandarizar una técnica de adhesión de células tumorales en flujo.

### **5.2- Objetivo específico:**

- Evaluar la adhesión celular sobre una matriz de fibronectina y otra de Matrigel®.
- Evaluar variaciones a distintas presiones de flujo.
- Calcular la adhesión y el “rolling” celular.

## **6- MATERIALES Y METODOS**

### **6.1- Líneas celulares:**

Se utilizó la línea celular de tumor de epitelio mamario MDA-MB 231, despertada de criogenización, las que fueron divididas en dos grupos una tratada con el compuesto BF6 y el otro con DMSO, este último para ser utilizado como control.

#### **6.1.2- Preparación de los grupos celulares**

Las células de esta línea celular fueron despertadas desde la criogenia, primero resuspendiéndolas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, insulina, gentamicina y anfotericina, posteriormente fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, obteniéndose así un pellet.

El pellet fue resuspendido en 7 mL de medio completo y se sembró en placas de 100 mm hasta llegar a la confluencia deseada. Cuando la confluencia llegó aproximadamente a un 80% las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pocillos. En cada pocillo se depositó una concentración de células de 400.000 células/mL de medio. Al día siguiente se agregó el tratamiento con BF6 y DMSO durante 24 horas, previo a esto se debió lavar los pocillos con PBS 1X para retirar el medio. Luego se agregó el tratamiento en 2 mL de medio completo.

Tres pocillos (de los seis) se utilizaron para preparar el control con DMSO al 0,02% (4 uL en 2 mL de medio). Por otra parte los otros 3 pocillos se utilizaron para el tratamiento con el compuesto con BF6 el que estaba a una concentración de 30 uM, por lo tanto se preparó

una suspensión de 1,8 uL en 6 mL de medio para ser distribuidos de manera equivalente en los tres pocillos.

A las 24 horas de tratamiento, cada pocillo fue tripsinizado de manera independiente, estas tripsinaciones fueron resuspendidas en 1 millón/mL de medio semi-completo el cual no tenía suero, pero si BSA al 0,1% y calceína al 4uM. Terminando así el proceso.

## **6.2- Equipamiento:**

Para lograr realizar el ensayo bajo condiciones de flujo se utilizó el equipo Bioflux 200z, Fluxion ®. Equipo cuyos componentes eran un controlador o modulo principal Bioflux 200 y un sistema de imagen, acoplado a un módulo informático que procesaba la información obtenida.

### **6.2.1- Controlador Bioflux 200:**

Este sistema permitía una opción de flujo de un rango de presión entre 0,5-200 dyn/cm<sup>2</sup> en las placas que se deseaban utilizar. La placa que se utilizó en este experimento correspondía al formato de 48 pocillos y 24 canales de flujo de poliestireno cuya presión máxima soportada era de 20 dyn/cm<sup>2</sup>. Los canales de flujo tenían unas medidas de 70µm de alto x 350µm de ancho. La disposición de los pocillos era pareada, lo que quiere decir que por cada pocillo de entrada había uno de salida, conectados por un capilar donde eventualmente se permitió el flujo.

La temperatura ambiente para el experimento pudo modificarse en el mismo controlador, siendo transmitida está en una placa temperada la cual se acoplaba a la placa del ensayo, permitiendo ajustar la temperatura del ensayo hasta los 50°C si así se deseaba.

### **6.2.2- Sistema de imagen:**

Se contó con un microscopio invertido de alta resolución Nikon Eclipse TS100® en conjunto con una fuente de poder Nikon C-SHG® que permitió la visualización con luz UV y además de una cámara CCD de alta resolución, la que permitió la visualización y captación de imágenes a tiempo real.

### **6.2.3- Software:**

El software Bioflux 200 utilizado permitía la configuración de la perfusión tanto manual como automatizada de fluidos, con la captación de imágenes programada en tiempo y cantidad. En estos ensayos se utilizó solo el modo manual, empleando un sistema operativo Windows XP.

## **6.3- Metodología:**

### **6.3.1- Estandarización y preparación de las placas de trabajo:**

Para la preparación de las placas se tuvo en consideración las dos fases de análisis. La primera fase fue realizada utilizando una matriz proteica de fibronectina (Sigma-Aldrich®), mientras que la segunda fase, fue realizada en una segunda placa, utilizando como matriz proteica, Matrigel® Corning® que es una preparación de membrana basal proveniente de un sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), el cual es un tumor rico en proteínas de matriz extracelular, cuyos principales componentes son: laminina, colágeno IV, entactina y heparan sulfato.

### **6.3.2- Preparación de la matriz con fibronectina:**

Con la finalidad de determinar una concentración adecuada para la realización del ensayo se utilizó en una placa dos concentraciones de fibronectina. En una primera instancia se utilizó una concentración de esta proteína de 1 mg/mL y posteriormente se utilizó una concentración de 20 ug/mL, en ambos casos el protocolo de preparación de la placa fue el mismo. Se prepararon pocillos para cada concentración de fibronectina (1 mg/mL y 20 ug/ml). Se depositó la fibronectina en los pocillos de entrada de la placa y se dejó perfundir por el capilar controlando el flujo laminar a una presión de 2 dyn/cm<sup>2</sup>, posteriormente la placa se mantuvo en incubación a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de fibronectina de los pocillos de entrada y salida, se realizó un lavado utilizando como solución de lavado una compuesta por PBS, ClCa<sub>2</sub> (18 mM) y MgCa<sub>2</sub> (18 mM), utilizando el equipo para ello, controlando el flujo a 2 dyn/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de solución de lavado y se prosiguió con el bloqueo de la placa utilizando para este fin una solución de PBS, ClCa<sub>2</sub> (18mM), MgCa<sub>2</sub> (18mM) y BSA 0,5% perfundiendo por el capilar con una presión controlada de 2 dyn/cm<sup>2</sup>, finalmente se quitó el exceso de los pocillos y se dejó reposar la placa en el refrigerador durante la noche.

### **6.3.3- Preparación de la matriz con Matrigel®:**

En la preparación de esta placa de trabajo se debió considerar ciertos resguardos respecto a la utilización de Matrigel®, debido que este permanecía líquido solo cuando se encontraba a una temperatura menor a los 4°C, por lo tanto se descongeló a esta temperatura y una vez líquido se mantuvo en hielo. Por otra parte, la placa, fue previamente incubada durante 10 minutos a temperatura de 4°C antes de realizar la preparación de la misma.

Para este procedimiento se prepararon 5 pocillos. El primer paso consistió en realizar un cebado del capilar, el que fue realizado con BSA al 1%, tomando para ello 100 uL de BSA depositándolo en cada pocillo de salida de la placa, y se realizó la perfusión en sentido

reverso, esto es, desde el pocillo de salida al de entrada, utilizando para ello una presión de  $5 \text{ dyn/cm}^2$  por un tiempo aproximado de 30 segundos. Se consideró como indicativo de un cebado satisfactorio la presencia de una pequeña gota en el pocillo de entrada posterior a los 30 segundos. Seguido a esto se colocó la placa en hielo y se agregaron 100 uL de Matrigel® en cada pocillo de entrada evitando la formación de burbujas, y se realizó la perfusión a  $1.9 \text{ dyn/cm}^2$  manteniendo la placa en hielo durante 3 minutos. Al acabar este tiempo se transfirió la placa a temperatura ambiente sin detener la perfusión y se mantuvo así durante 3 minutos. Por último se transfirió la placa (sin detener el flujo) a la placa calentadora, la cual estaba previamente preparada a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , y se mantuvo en ella durante 3 minutos. Cumplido este lapso de tiempo se detuvo la perfusión se dejó reposar la placa a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 minutos y se retiraron los excesos de Matrigel de los pocillos de entrada y salida. Finalizada esta incubación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se almacenó la placa lista a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche.

#### **6.4- Estandarización del ensayo con células tumorales:**

##### **6.4.1- Ensayos de prueba en la placa con matriz de fibronectina:**

Se procedió a realizar los ensayos de prueba en dos pocillos de la placa los que estaban preparados con fibronectina a una concentración de  $1 \text{ mg/ml}$ , se tomó una alícuota de 400 uL de células tratadas con el compuesto BF6 y se depositaron en un primer pocillo de entrada, se aplicó una presión controlada de  $0,3 \text{ dyn/cm}^2$  y se realizó la perfusión durante 10 minutos desde el momento que se observaron las primeras células pasar por el capilar. Luego, en un segundo pocillo, se repitió el procedimiento, pero en esta ocasión con las células control que fueron tratadas con DMSO.

Luego se repitió el procedimiento pero a una presión de  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$  en dos pocillos preparado a una concentración de fibronectina de  $20 \text{ ug/mL}$ , debido a que se consideró excesiva la concentración de  $1 \text{ mg/mL}$ , para el diámetro del capilar utilizado, para ello, al

igual que la prueba anterior se dispense una alícuota de 400 uL de la suspensión celular tratada con el compuesto a un primer pocillo, y en un segundo pocillo 400 uL de las células control tratadas con DMSO, con lo que se evaluó las diferencias de adhesión celular entre las concentraciones de las matrices utilizadas.

A partir de las pruebas antes realizadas se estableció una concentración única de fibronectina, y una presión definitiva para los ensayos, los que corresponden a una concentración de fibronectina de 20 uL/ml y una presión de flujo aplicada a las células tumorales de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>. La alícuota utilizada de 400 uL no se vio modificada para el ensayo definitivo.

#### **6.4.2- Ensayo de adhesión de células tumorales en matriz de fibronectina:**

En seis pocillos previamente preparados con una matriz de fibronectina a una concentración de 20 ug/ml se procedió a cargar las muestras de células tratadas con el compuesto (BF6) utilizando para ello tres pocillos de entrada, para así lograr ensayos en triplicado. Se tomó una alícuota de 400 uL de las células en cuestión y se dispensó en un primer pocillo de entrada y se comenzó la perfusión, programando el equipo a una presión de flujo controlado de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>, durante 10 minutos, en este lapso de tiempo se tomaron fotografías a tiempo real con la cámara CCD cuya configuración establecida era la captura de una foto por segundo, una ganancia (gain) de 15, una exposición 10 milisegundos (ms), y un “binning” de 2x2. Este procedimiento se repitió en un segundo pocillo, y finalizado este, en un tercer pocillo, logrando así el triplicado. Por otra parte en un cuarto pocillo se dispensó una alícuota de 400 uL de las células control tratadas con DMSO, y se realizó una perfusión conservando las mismas características del ensayo con células tratadas con BF6, repitiendo también este proceso en un quinto y sexto pocillo, completando también el ensayo en triplicado para el control.

Las fotografías tomadas a tiempo real fueron editadas en un video, utilizando el software Sony VEGAS pro 16, reduciendo los 10 minutos que duró la perfusión experimental a aproximadamente un promedio de 1 minuto y 30 segundos. Una vez obtenidos los videos se realizó el conteo tanto de células adheridas, como de células que realizaron “rolling”.

#### **6.4.3- Ensayo de adhesión de células tumorales en una matriz de Matrigel®:**

En una placa se prepararon seis pocillos con Matrigel®, para proceder con la evaluación de la adhesión de las células tumorales en esta matriz, para ello se tomó una alícuota de 400uL de las células neoplásicas tratadas con BF6, y se dispuso en un primer pocillo de entrada. Se configuró la presión del flujo, emulando lo realizado con fibronectina, utilizando una presión de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup> y se dio inicio a la perfusión, pero pasado unos segundos, no se evidenció flujo por el capilar, debido a un taponamiento manifiesto en la entrada del mismo y que posiblemente se extendiera por toda su extensión. De igual forma se trataron todos los pocillos, para eliminar la posibilidad de un error en particular del primer pocillo y no de la placa preparada en general, pero los resultados fueron los mismos. Por este motivo la experimentación con Matrigel se detuvo.

#### **6.5- Análisis estadístico:**

Una vez obtenidos los datos de la experimentación tanto de la determinación de las condiciones óptimas para el ensayo como para el ensayo definitivo, se realizó el análisis estadístico, el cual fue desarrollado con la ayuda del software IBM® SPSS® Statistics versión 20. Empleando la comparación de medias por test T de Student.

## **7- RESULTADOS**

### **7.1- Estandarización de las condiciones óptimas para el ensayo:**

Como se presentó anteriormente se realizaron ensayos para la determinación de la concentración de fibronectina a utilizar para generar la matriz de adhesión para las células tumorales, así también se estableció una presión de flujo fija para la realización de los ensayos definitivos. Estas pruebas se realizaron utilizando, en el caso de la determinación de la concentración de fibronectina, dos concentraciones de prueba, en una primera instancia 1mg/ml y posteriormente 20 ug/ml. Mientras que para la determinación de la presión adecuada para la evaluación de la adhesión y el “rolling” se utilizó en una primera instancia una presión de 0.3 dyn/cm<sup>2</sup> y finalmente una segunda presión de 0.6 dyn/cm<sup>2</sup>.

#### **7.1.1- Adhesión de células tumorales en una matriz de fibronectina a 1mg/ml:**

Se realizó este ensayo aplicando una presión de perfusión de 0,3 dyn/cm<sup>2</sup>, a partir del cual se capturaron imágenes a tiempo real, para la formación de un video en el que se realizó el conteo. En este conteo se logró evidenciar la adhesión de las células tumorales a la matriz de fibronectina a la concentración antes mencionada, tanto para las células tratadas con el compuesto BF6 como para las células control (Figura 1A), no encontrándose diferencias significativas entre ambas células en este apartado. La evaluación de “rolling” celular también fue realizada a partir de este video generado, comparando también las células tratadas con BF6 y las células control tratadas con DMSO (Figura 1B), donde tampoco se evidenciaron grandes diferencias en este apartado. A partir de estos datos preliminares se confeccionó una tabla comparativa en los parámetros evaluados (adhesión y “rolling”) entre las células tratadas con BF6 y el respectivo control (Tabla 1), además de graficas con los mismos datos (Figura 1).

Tipo de células	Frecuencias	
	N° de células adheridas	N° de células en "rolling"
Tratadas con BF6	3	11
Control tratadas DMSO	3	14

Tabla 1: Resultados obtenidos del primer ensayo de prueba para establecer las condiciones óptimas de trabajo. Se expresa el número de células que realizaron adhesión y "rolling", a una presión de flujo de 0,3 dyn/cm<sup>2</sup>, utilizando una matriz de fibronectina de concentración de 1 mg/ml.

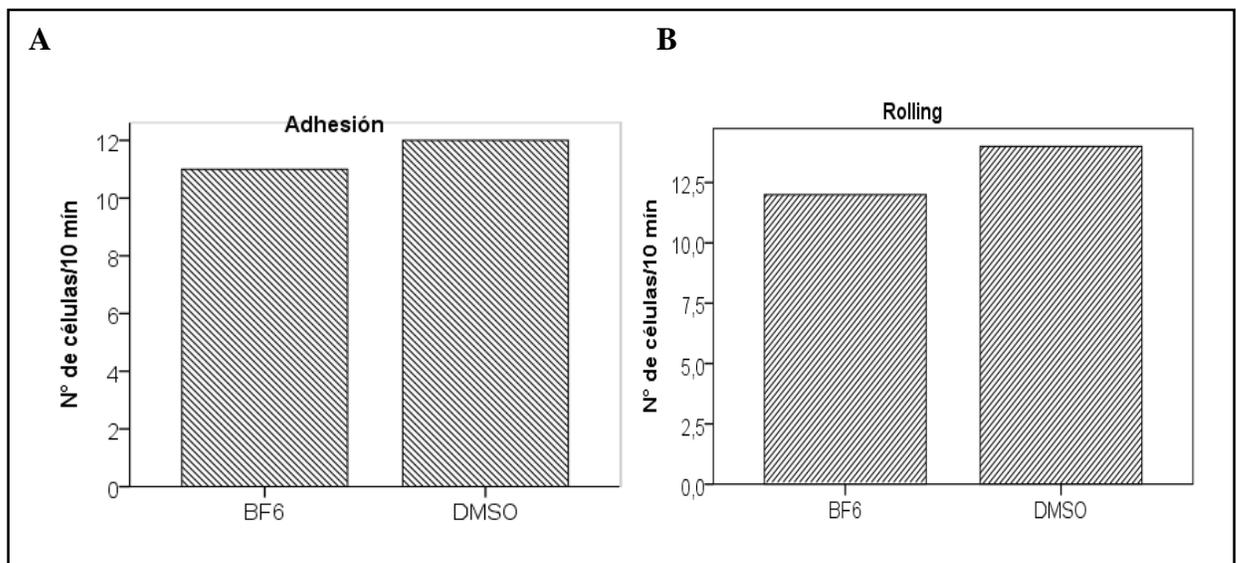


Figura 1: Gráficos de los resultados de adhesión y "rolling" celular del primer ensayo de prueba. En el gráfico A se muestra la comparativa entre las células tratadas con BF6 y las células control tratadas con DMSO respecto a la adhesión que estas tuvieron a la matriz de fibronectina a 1mg/ml. En el gráfico B se realiza una comparación respecto al "rolling" celular, entre las células tratadas con BF6 y el control de células tratadas con DMSO. Ambos ensayos realizados en un tiempo de perfusión de 10 minutos, a una presión constante de 0,3 dyn/cm<sup>2</sup>.

La visualización de la adhesión a  $0,3 \text{ dyn/cm}^2$  y a una concentración de  $1 \text{ mg/ml}$  de fibronectina presento ciertos problemas debido a que la concentración de fibronectina era demasiado alta para el diámetro del capilar de la placa utilizada, y agregado a esto la presión de perfusión al parecer era demasiado baja, por lo que se formaban agregados de células tumorales que impedían el claro conteo de las células que se adherían y mucho más complejo fue la observación del “rolling” celular, fenómeno que era manifiesto en el video cuando una célula tumoral disminuía su velocidad de flujo respecto al resto, debido al roce que esta tenía con la matriz de fibronectina, en su intento de lograr la adhesión.

### **7.1.2- Adhesión de células tumorales en una matriz de fibronectina a $20 \text{ ug/ml}$ :**

Teniendo en cuenta la primera prueba para determinar las condiciones óptimas del ensayo se decidió cambiar tanto la concentración de fibronectina, como la presión de perfusión. En este caso se utilizó una concentración de  $20 \text{ ug/ml}$  de fibronectina y una presión de perfusión de  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ .

Al aplicar la modificación de las condiciones utilizadas en el primer ensayo de prueba se logró mejorar la visualización de la adhesión y del “rolling”. En este ensayo las principales diferencias manifestadas en los resultados fueron la disminución de la adhesión tanto de las células tumorales tratadas con el compuesto, como de las células control (Figura 2A), esto era un resultado previsible debido a la disminución de la concentración de fibronectina en la matriz, pero se favoreció el análisis de los eventos estudiados de adhesión y “rolling” debido a que mejoró la apreciación de ambos eventos en la captura de imágenes manteniendo la condición del ensayo anterior al no manifestarse diferencias significativas entre el número de células adheridas tratadas con el compuesto y las células control, tampoco se vieron grandes diferencias en el “rolling” celular en ambos tipos de células (Figura 2B).

Tipo de células	Frecuencias	
	N° de células adheridas	N° de células en "rolling"
Tratadas con BF6	3	11
Control tratadas DMSO	3	14

Tabla 2: Resultados obtenidos del segundo ensayo de prueba para establecer las condiciones óptimas de trabajo. Se describe el conteo realizado de células tumorales adheridas en la matriz de fibronectina a una concentración de 20 ug/ml, y una presión de perfusión de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>. Se observa diferencias en cuanto a la adhesión, respecto a lo expresado en la Tabla 1, debido a la disminución de la concentración de fibronectina, el rolling por su parte no presenta variación significativa respecto a la Tabla 1.

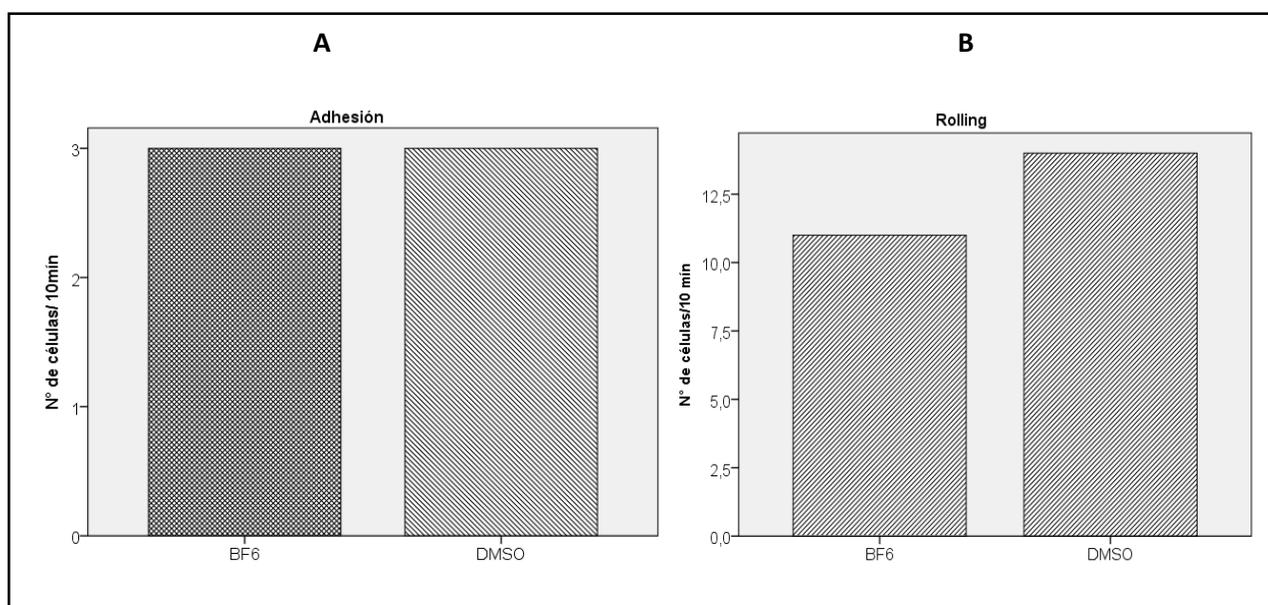


Figura 2: Gráficos de los resultados de adhesión y “rolling” celular del segundo ensayo de prueba. En la gráfica A se muestra la comparación de la adhesión entre las células tratadas con BF6 y las células control tratadas con DMSO. Se puede apreciar que no hay diferencia en este caso. Respecto al Rolling, en el grafico B se muestra la comparación entre las células tratadas con BF6 y con el control (tratadas con DMSO), donde hay diferencias, pero estas siguen la misma tendencia que el primer ensayo de prueba (Figura 1).

### **7.3- Ensayo de adhesión de células tumorales en matriz de fibronectina:**

El ensayo definitivo para evaluar la adhesión celular y el “rolling” se llevó a cabo utilizando las condiciones experimentadas en el segundo ensayo de prueba, utilizando una matriz de fibronectina a 20 ug/ml y empleando una presión de flujo de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>.

Como ya se mencionó en la metodología este ensayo se realizó en triplicado, tanto para las células tumorales sometidas a tratamiento con BF6, y las células control tratadas con DMSO, y además se repitió en ensayo en tres días distintos, con la finalidad de obtener datos estadísticos respecto al ensayo, los datos fueron tabulados (Tabla 3), realizando las comparaciones de adhesión entre las células tratadas con BF6 y controles, de la misma forma con el “rolling” celular.

Día	N° de células adheridas	
	Tratadas con BF6	Células control tratadas con DMSO
1	3	3
	6	2
	2	3
2	2	1
	4	2
	2	3
3	2	1
	4	2
	3	2

Tabla 3: Conteo de células tumorales adheridas tratadas con BF6 y de las células control tratadas con DMSO. Utilizando una matriz de fibronectina (20ug/mL) y a una presión de flujo de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup> se consiguió adhesión. Se expresa el conteo realizado en tres ensayos independientes, durante tres días diferentes, expresados como valores absolutos del número de células adheridas.

### Estadísticos de grupo

tipo	Media	Desviación típ.
N° de células Adheridas	Células tratadas con BF6 3,1111	1,36423
	Células control tratadas con DMSO 2,1111	,78174

Tabla 4: Datos estadísticos de los grupos contrastados de adhesión. Se muestra la media y el desvío estándar tanto de las células tratadas con BF6 como de las células control tratadas con DMSO de los ensayos realizados en triplicado durante los tres días de experimentación.

A partir de los datos estadísticos obtenidos, era necesario determinar si existía diferencias significativas entre las media de las células tratadas en comparación con las células control. Para este fin se realizó una comparación de medias mediante el test T de Student para variables independientes, obteniéndose lo siguiente:

### Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
adhesion	Se han asumido varianzas iguales	2,050	,171	2	16	,075	1,00000	,52411	-,11106	2,11106
	No se han asumido varianzas iguales			2	12,74	,079	1,00000	,52411	-,13460	2,13460

Tabla 5: Resultados del test T de Student para el estudio de la adhesión. Con un intervalo de confianza del 95% se realizó la comparación de medias. A partir prueba de Levene, se puede asumir que las varianzas de los grupos estudiados son iguales (valor  $p=0,171 > 0,05$ ). Se puede aseverar que no hay diferencias significativas en la comparación de medias (valor  $p=0,075 > 0,05$ )

Los resultados obtenidos en la comparación de medias mediante el test T de Student (Tabla 5), permitieron establecer, con un intervalo de confianza de 95%, que no existían diferencias significativas en las medias del número de células tumorales tratadas adheridas con las células tumorales control. La prueba de Levene permitió asumir que las varianzas de

los grupos de estudio eran iguales, esto al establecer que el valor  $p=0,171 > 0,05$ , por consiguiente la comparación de medias se realizó siguiendo esta condición, obteniéndose una significancia bilateral de 0,075 (mayor que 0,05) por lo que se comprueba que no hay diferencia significativa entre las medias de los grupos de estudio comparados.

También se realizó un análisis de los resultados obtenidos en el estudio del “rolling” celular, en donde se contrastaron nuevamente las células tumorales tratadas con BF6 y las células control tratadas con DMSO (Tabla 6). La metodología empleada para el análisis fue similar a lo realizado en el estudio de la adhesión, ya que el conteo de las células se llevó a cabo de la misma forma.

Día	N° de células en rolling	
	Tratadas con BF6	Células control tratadas con DMSO
1	13	13
	17	12
	10	10
2	7	8
	6	9
	6	10
3	8	10
	9	12
	7	11

Tabla 6: Conteo de células que realizaron rolling en la matriz de fibronectina (20ug/mL). Conteo realizado a las células tumorales tratadas con BF6 y a las células control tratadas con DMSO, a una presión de flujo de  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ . Se expresa la cuantificación efectuada en los tres ensayos individuales, durante tres días diferentes expresados como valores absolutos del número de células en “rolling”.

**Estadísticos de grupo**

tipo		Media	Desviación típ.
rolling	Celulas tratadas con BF6	9,2222	3,66667
	Células control tratadas con DMSO	10,5556	1,58990

Tabla 7: Datos estadísticos de los grupos contrastados en el conteo de “rolling”. Se muestra la media tanto de las células tratadas con BF6 como de las células control tratadas con DMSO de los ensayos realizados en triplicado durante los tres días de experimentación.

Al igual que en el análisis de datos de los conteos de adhesión celular, una vez teniendo la media de ambos grupos se realizó la comparación de medias mediante el test T de Student para muestras independientes (Tabla 8).

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
rolling	Se han asumido varianzas iguales	3,370	,085	-1,001	16	,332	-1,33333	1,33218	-4,15742	1,49075
	No se han asumido varianzas iguales			-1,001	10,906	,339	-1,33333	1,33218	-4,26853	1,60187

Tabla 8: Resultados de la comparación de medias por el test T de Student en el ensayo de “rolling”. Se asume, en base a la prueba de Levene, que las varianzas de ambos grupos son iguales (valor  $p=0,085 > 0,05$ ). Además, se comprueba que no hay diferencia significativa entre las medias (valor  $p=0,332 > 0,05$ )

En función de los datos entregados por la comparación de medias por test T de Student, se establece con intervalo de confianza del 95% que no hay diferencia significativa entre la media de las células tumorales tratadas con BF6 y las respectivas células del control tratadas con DMSO que realizaron rolling (valor  $p=0,332 > 0,05$ )

## **8- DISCUSION DE RESULTADOS**

### **8.1- Ensayos de prueba para la determinación de los parámetros óptimos:**

Según los resultados obtenidos en la determinación de las condiciones óptimas del ensayo no se encontraron diferencias significativas al comparar la adhesión de células tumorales tratadas con el compuesto BF6 y las células control tratadas con DMSO. Así mismo no se encontró diferencia significativa entre los conteos de células en “rolling” de las mismas células mencionadas anteriormente.

El primer ensayo de prueba realizado fue utilizando una presión de flujo de  $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ , en una matriz de fibronectina a  $1 \text{ mg/mL}$ , obteniéndose adhesión tanto en las células tumorales tratadas con BF6 como en las células control. El conteo se logró llevar a cabo con dificultad debido que las células se adherían entre sí y formaban agregados celulares, esto debido a que en las células tumorales la formación de fibronectina está sobre expresada (39), por lo tanto, cabe la posibilidad que algunas moléculas de adhesión celular (CAM), presentes en las misma células neoplásicas, como las integrinas, pudieran producir adherencia entre ellas, esto favorecido por la baja presión de flujo, que permitiera mayor contacto entre las células.

El inconveniente de la adhesión entre células tumorales fue solucionado al aumentar al doble la presión de flujo, es decir, en el segundo ensayo de prueba se utilizó una presión de flujo de  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$ , esto teniendo en consideración estudios anteriores como lo realizado por Reinhardt et al (40), quienes en ensayos de adhesión de neutrófilos en una matriz de fibronectina, utilizaron una cámara de flujo, aplicando una presión de  $2 \text{ dyn/cm}^2$ , en la cual no consiguieron adhesión a la matriz. Por lo tanto se buscaron presiones de flujo menores a este valor. Edwards et al (41) en un ensayo de adhesión en flujo en el que buscaba dilucidar el efecto de la presión de flujo en la adhesión producto de la acción las selectinas de

leucocitos, se utilizó un rango de presiones de flujo de entre 0,5-1,5 dyn/cm<sup>2</sup>, llegando a la conclusión de que esta adherencia disminuía al aumentar dicha presión. En el presente estudio a la presión de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>, en el equipo Bioflux 200®, si se consiguió adherencia, y además una buena visualización de ella, con lo que se consiguió realizar un conteo y posterior análisis.

Se disminuyó la concentración de fibronectina de la matriz presente en el capilar a 20 ug/mL, para comparar ambas condiciones y evidenciar si existía variación entre la cantidad de células adheridas a la matriz y la concentración de fibronectina en la misma. Consiguiéndose lo previsto, la adhesión entre la matriz y las células tumorales (tanto las tratadas con BF6 como las control tratadas con DMSO) disminuyó. Esto se condice con algunos estudios, en donde se inhibe la interacción entre células MDA-MB 321 y fibronectina utilizando compuestos como la baicaleina consiguiendo la disminución en la adhesión dependiente de la concentración del compuesto (42). Al disminuir la concentración de fibronectina se obtiene un efecto similar, ya que en ambos casos se disminuye la interacción entre receptores y ligandos. Esta disminución en la concentración de la fibronectina fue de gran utilidad para mejorar la visualización de los recuentos realizados a ambos grupos celulares, Reinhardt et al (40) en un ensayo de adhesión de neutrófilos, utilizaron una concentración de 20 mg/mL no consiguió adhesión en condiciones de flujo, por lo tanto es importante recalcar que a una concentración mucho menor de fibronectina, en este estudio, si se obtuvo adhesión celular, esta concentración de fibronectina utilizada se condice con algunos estudios como el realizado por Konya et al (43) quienes en un ensayo de adhesión de eosinófilos, trató estas células con prostaglandina 2 (PGD2) y empleó una matriz de fibronectina de 20 ug/mL en un sistema biochips (Vena8), logrando adhesión con diferencias significativas respecto al control utilizado.

En cuanto al “rolling” o rodamiento, este tampoco presentó grandes diferencia entre las células tratadas con BF6 y las células control, pero si hubo una mayor cantidad de células que realizaron esta acción respecto a las que se adhirieron. Al igual que en los leucocitos el “rolling” o rodamiento es un proceso previo a la adhesión firme entre la célula y la matriz,

por lo tanto se comprobó que a pesar que no se logró ver la adhesión *in situ* si hubo atracción e interacción entre la matriz de fibronectina, y las células tratadas (ya sea con BF6 o con DMSO). Respecto a este apartado Levy et al (44), en un estudio realizado en el que evaluaron la comparación del “rolling” en una línea celular HL-60 (línea celular promielítica de la leucemia humana) en dos matrices una de fibronectina (20 ug/mL) y otra con P y L-selectina, evidenciaron que estas células no realizaban “rolling” en la matriz de fibronectina pero si en la otra matriz generada.

## **8.2- Estudio de adhesión y “rolling” en células tumorales**

La utilización de las condiciones consideradas como óptimas para este ensayo (obtenidas en los ensayos de prueba) mejoró obtención de datos definitivos para realizar los estudios pertinentes y comparar los resultados obtenidos.

La adhesión que se consiguió en las células tratadas con BF6 no fue significativamente distinta a la obtenida por las células control tratadas con DMSO, esto se comprobó realizando una comparación de medias entre estas células, ya que como se mencionó anteriormente se realizó el conteo celular para ambas en triplicado y realizando ensayos independientes durante tres días , obteniendo, a partir de estos ensayos, la media de células adheridas tratadas con BF6 y de igual forma las control, las que se compararon mediante el test T de Student para variables independientes. Y con un intervalo de confianza (IC) del 95% se comprobó que no había diferencias significativas en cuanto a adhesión. Mismo proceso fue realizado con el análisis de la cantidad de células que realizaron “rolling”. Además de la comparación de medias, el valor obtenido de la desviación estándar es bajo, por lo tanto nos indica que los datos obtenidos tienen una dispersión cercana a los valores de la media.

El compuesto BF6 fue sintetizado para estudios de inhibición del metabolismo celular, no teniendo resultados positivos, por otra parte si afecto la migración de las células, disminuyéndola. Por lo tanto se utilizó en estos ensayos como una condición para comprobar

si se veía afectada la adhesión. Respecto a las comparaciones realizadas entre las células tratadas con el compuesto BF6 y las control con DMSO se puede establecer que, el compuesto BF6 no tiene mayor implicancia en la adhesión celular, si bien en la mayoría de los conteos realizados presentaba una menor adherencia respecto al control (DMSO), no existe diferencia estadísticamente significativa.

### **8.3- Ensayo realizado con Matrigel®**

El ensayo en adhesión y “rolling” en una matriz de Matrigel®, correspondía a la segunda fase de este estudio, donde se buscaba comprobar la utilidad de este tipo de matriz en la evaluación de los parámetros antes mencionados. En esta experimentación se adaptó un protocolo de un ensayo donde se evaluaba la invasión de células tumorales en una matriz compuesta de Matrigel®.

La adaptación de este protocolo consistía principalmente en cambiar el ensayo original, que se realizaba en una placa de 24 pocillos y que además tenía la diferencia de que el capilar de flujo era doble, por lo tanto en una vía del capilar transitaban las células tumorales, mientras que en el otro se establecía la matriz de Matrigel® lográndose en ese ensayo no solo la adhesión sino que también la invasión de esta matriz. En el estudio que se ha expuesto hasta ahora, se utilizó una placa de 48 pocillos, y que, como se mencionó en la metodología, poseía un solo capilar por lo cual el inconveniente presentado a la hora de realizar el ensayo fue la obstrucción del capilar que impedía el flujo de las células a través de él.

El resultado esperado para esta experimentación era una mejor adhesión de las células tumorales, esto debido a que esta matriz contiene una mayor variedad de proteínas de matriz, que ciertamente están involucradas en muchos tipos de cáncer. Proteínas tales como laminina, colágeno IV, entactina y heparan sulfato, proveniente de un sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)(45).

Este error posiblemente se podía solucionar mediante la dilución del compuesto a utilizar como matriz, pero se presentaba otro problema, el cual tiene relación con el manejo de este reactivo, debido a que es muy sensible a la temperatura, si se diluía con alguna solución como PBS probablemente no mantendría sus características óptimas para el ensayo. Cabe destacar que lo que se buscaba hacer en el capilar era la formación de un gel, el cual se lograba al colocar la placa en incubación a 37°C durante la preparación de la misma. Esta formación podría haberse visto afectada al realizar una dilución.

A pesar de no obtener resultados satisfactorios en el ensayo utilizando Matrigel® este no deja de ser una opción interesante para evaluar la adhesión de células tumorales bajo condiciones de flujo. Por otra parte los resultados obtenidos en los ensayos realizados en una matriz de fibronectina (20ug/ml) y a una presión de flujo constante de 0,6 dyn/cm<sup>2</sup>, permite evaluar la adhesión celular, y además el “rolling” de las mismas, con lo cual se logró estandarizar una metodología de adhesión en flujo. Actualmente no hay ensayos descritos en los que se utilicen los mismos materiales y parámetros descritos en esta experimentación, por lo tanto es un importante avance en la búsqueda de técnicas que ayuden a favorecer la investigación en lo que a cáncer respecta.

## **9- CONCLUSION**

En vista de lo logrado de la investigación expresada en las páginas de esta memoria se logró dilucidar lo siguiente:

1- El equipamiento de Fluxion, BioFlux 200z si está capacitado para realizar ensayos de adhesión de células tumorales en flujo y además permite la evaluación del rolling celular, a partir de la captura de fotografías a tiempo real.

2- Bajo las condiciones de presión de flujo ( $0.6 \text{ dyn/cm}^2$ ) y la concentración de fibronectina ( $20\text{mg/mL}$ ) a las que se sometieron las células, se logró estandarizar un modelo para evaluar la adhesión y el “rolling” celular.

3- La adhesión de células tumorales de epitelio mamario MDA-MB 231 presentan adhesión a la matriz de fibronectina, y esta es dependiente de la concentración de la misma.

4- Bajo las condiciones de este ensayo tales como presión de  $0.6 \text{ dyn/cm}^2$ , fibronectina a  $20\text{ug/mL}$  y una placa de 48 pocillos, el Matrigel® no pudo emplearse como matriz de adhesión para las células tumorales utilizadas. A pesar de esto no se descarta que al modificar variables como la concentración de este reactivo se pueda tener alguna utilidad.

5- La presión de flujo es una importante variable a considerar al realizar este tipo de ensayos, debido a que esta tiene implicancia en el contacto que realizan las células tumorales entre ellas mismas y con la matriz, pudiendo afectar la firmeza de la adhesión. Lo cual puede

afectar la visualización de los parámetros de estudio mencionados en esta memoria (adhesión y “rolling”).

## **11- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

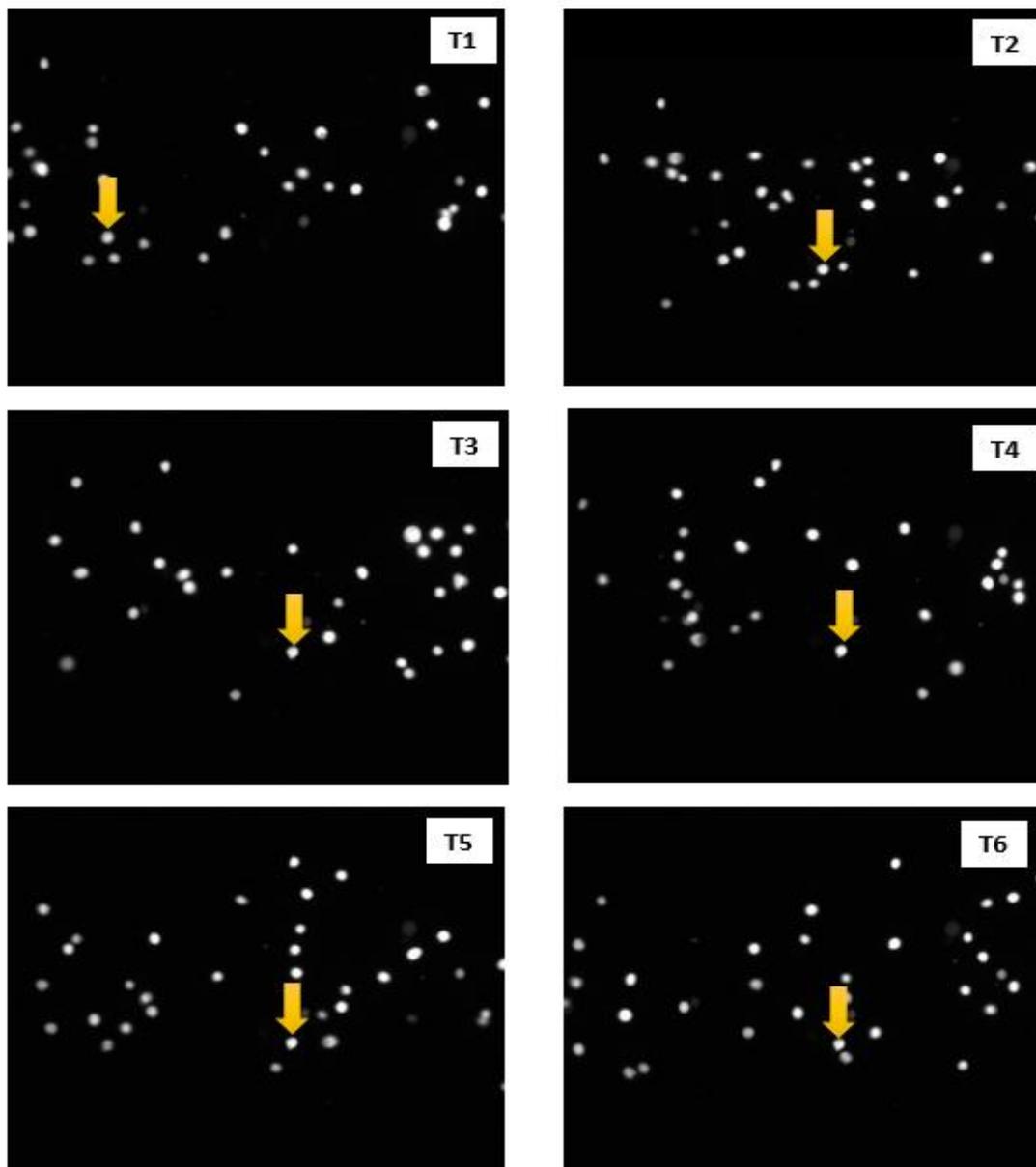
1. Chile MdSd. Estrategia Nacional de Cancer. Chile 2016. In: Salud Md, editor. Santiago2016. p. 3-5.
2. Salud OMDL. Cáncer 2018 [cited 2018 2 de noviembre]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
3. Thomas N. Sayfried LCH. On the Origin of Cancer Metastasis Critical Reviews™ in Oncogenesis. 2013;18(1-2):43-73.
4. Fu BM. Tumor Metastasis in the Microcirculation. Advances in experimental medicine and biology. 2018;1097:201-18.
5. Montes AMS, Borunda JSA, Rodríguez ASS. Principios de biología molecular: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2016.
6. González AC. Biología celular biomédica + StudentConsult en español: Elsevier Health Sciences Spain; 2015.
7. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional + StudentConsult: Elsevier Health Sciences Spain; 2015.
8. Sánchez C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. Revista Médica Clínica Las Condes. 2013;24(4):553-362.
9. Hu D, Jablonowski C, Cheng PH, Altahan A, Li C, Wang Y, et al. KDM5A Regulates a Translational Program that Controls p53 Protein Expression. iScience. 2018;9:84-100.
10. Morris LGT, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. Cancer. 2015;121(9):1357-68.
11. Dimaras H, Corson TW, Cobrinik D, White A, Zhao J, Munier FL, et al. Retinoblastoma. Nature reviews Disease primers. 2015;1:15021.
12. Joyce C KA. Cancer, Tumor-Suppressor Genes. : StatPearls [Internet]; 2018 [cited 2018 2 noviembre]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532243/?report=classic>.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

14. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):220-8.
15. Castro-Manreza ME. Participation of mesenchymal stem cells in the regulation of immune response and cancer development. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2016;73(6):380-7.
16. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
17. Nelson DL, Cox MM, Foix CMC, León S, Roca JV. *Lehninger : principios de bioquímica*: Ediciones Omega, S.A.; 2014.
18. Epstein T, Gatenby RA, Brown JS. The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLOS ONE*. 2017;12(9):e0185085.
19. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*. 2016;41(3):211-8.
20. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*. 2008;7(1):11-20.
21. Salazar O. F. El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. *Revista chilena de pediatría*. 2000;71:296-306.
22. Seliger B, Dunn T, Schwenzer A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. Analysis of the MHC Class I Antigen Presentation Machinery in Human Embryonal Carcinomas: Evidence for Deficiencies in TAP, LMP and MHC Class I Expression and their Upregulation by IFN- $\gamma$ . *Scandinavian Journal of Immunology*. 2003;46(6):625-32.
23. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35:S244-S75.
24. Chiang AC, Massagué J. Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(26):2814-23.
25. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Tumour progression and metastasis. *Ecancermedalscience*. 2016;10:617-.
26. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal*. 2011;278(1):16-27.

27. Arvelo F, Poupon M-F. Aspectos moleculares y celulares de la metastasis cancerosa 2001.
28. Fandiño MÁQ, Sabag RH, Funes HC, de Salamanca RE. Impacto pronóstico de las células tumorales residuales aisladas en sangre periférica en cáncer de mama de alto riesgo: Universidad Complutense de Madrid; 2005.
29. Gakhar G, Navarro VN, Jurish M, Lee GY, Tagawa ST, Akhtar NH, et al. Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients Interact with E-Selectin under Physiologic Blood Flow. PLOS ONE. 2013;8(12):e85143.
30. Bendas G, Borsig L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. International Journal of Cell Biology. 2012;2012:10.
31. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. Seminars in Cancer Biology. 2010;20(3):169-77.
32. Khatib A-M, Kontogianea M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P. Rapid Induction of Cytokine and E-Selectin Expression in the Liver in Response to Metastatic Tumor Cells. Cancer Research. 1999;59(6):1356-61.
33. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. International Journal of Cancer. 1997;71(4):612-9.
34. Panés J. Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Gastroenterología y Hepatología. 1999;22(10):514-24.
35. Burdick MM, Chu JT, Godar S, Sackstein R. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells. The Journal of biological chemistry. 2006;281(20):13899-905.
36. Gout S, Morin C, Houle F, Huot J. Death Receptor-3, a New E-Selectin Counter-Receptor that Confers Migration and Survival Advantages to Colon Carcinoma Cells by Triggering p38 and ERK MAPK Activation. Cancer Research. 2006;66(18):9117-24.
37. Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. Nature reviews Molecular cell biology. 2007;8(12):957-69.
38. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(4):1853-8.

39. Insua-Rodriguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;97:41-55.
40. Reinhardt PH, Elliott JF, Kubes P. Neutrophils Can Adhere Via  $\alpha^4\beta^1$ -Integrin Under Flow Conditions. *Blood*. 1997;89(10):3837-46.
41. Edwards EE, Oh J, Anilkumar A, Birmingham KG, Thomas SN. P-, but not E- or L-, selectin-mediated rolling adhesion persistence in hemodynamic flow diverges between metastatic and leukocytic cells. *Oncotarget*. 2017;8(48):83585-601.
42. Wang L, Ling Y, Chen Y, Li C-L, Feng F, You Q-D, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2010;297(1):42-8.
43. Konya V, Peinhaupt M, Heinemann A. Adhesion of eosinophils to endothelial cells or substrates under flow conditions. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1178:143-56.
44. Levy O, Anandakumaran P, Ngai J, Karnik R, Karp JM. Systematic analysis of in vitro cell rolling using a multi-well plate microfluidic system. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(80):e50866-e.
45. Debbie M, Brooks SA. In vitro invasion assay using Matrigel®. *Metastasis research protocols*: Springer; 2001. p. 61-70.

## 12- Anexos



Anexo 1: Secuencia de fotos del ensayo de adhesión celular. Imágenes obtenidas de la perfusión a  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$  sobre una matriz de fibronectina a  $20 \mu\text{g/mL}$ , con una diferencia de 1 segundo (seg) entre fotos. En donde T1 fue capturada a los 24 seg, T2, T3, T4, T5, T6 a los 25, 26, 27, 28, 29 seg respectivamente. La flecha hace un seguimiento a una célula tratada con BF6 que logra la adhesión en T3 manteniéndose, como se muestra en la secuencia, en T4, T5 y T6

