



*ugr*

Universidad  
de Granada

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEASA ADAMTS1 EN EL MICROENTORNO

TUMORAL: ESTUDIOS EN UN MODELO MURINO DE MELANOMA

Memoria presentada por RUBÉN FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ para optar al grado de DOCTOR.

GRANADA, 2015

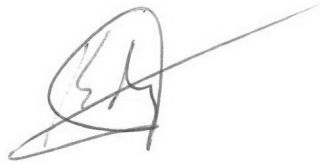
Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Rubén Fernández Rodríguez  
ISBN: 978-84-9125-168-2  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40394>

El doctorando **RUBÉN FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ** y el director de la tesis **JUAN CARLOS RODRÍGUEZ-MANZANEQUE** Escribano garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 2 de Marzo de 2015

Director de la Tesis

Doctorando

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JC', written over a horizontal line.

Fdo.:

Fdo.:







## NOTA

A lo largo del texto se utilizarán las abreviaturas de varios términos en inglés. Esto es debido al uso extendido del inglés en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas en inglés de manera cotidiana en el lenguaje científico. Para simplificar el texto se mantendrán éstas últimas. En el glosario de abreviaturas, al final de esta memoria, se detalla la descripción en inglés y en español de cada una.









# INDICE

INDICE.....	I
FIGURAS.....	V
TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
1. CÁNCER.....	5
ASPECTOS GENERALES.....	5
EVENTOS CLAVE EN EL DESARROLLO TUMORAL.....	5
1. Autosuficiencia en señales de crecimiento.....	7
2. Insensibilidad a las señales que inhiben el crecimiento.....	8
3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis).....	8
4. Potencial ilimitado de replicación.....	9
5. Angiogénesis sostenida.....	10
6. Invasión de tejidos y metástasis.....	11
<i>Características emergentes promotoras del desarrollo tumoral.....</i>	<i>14</i>
ACTUALIZACIÓN DEL CONCEPTO DE TUMOR: PROTAGONISMO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	15
<i>Endotelio y microambiente tumoral.....</i>	<i>17</i>
2. ANGIOGÉNESIS.....	19
ASPECTOS GENERALES.....	19
1. Activación de las células endoteliales.....	20
2. Desarrollo de las ramificaciones.....	21
3. Unión de las ramas y formación del lumen.....	22
PRINCIPALES FACTORES ANGIOGÉNICOS.....	23
<i>Vascular Endothelial Growth Factor.....</i>	<i>23</i>
<i>Factor de crecimiento de fibroblastos.....</i>	<i>25</i>
<i>Angiopoyetinas.....</i>	<i>26</i>
<i>Factor de crecimiento de hepatocitos.....</i>	<i>26</i>
ANGIOGÉNESIS TUMORAL.....	28
MECANISMOS ALTERNATIVOS DE NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL.....	29
<i>Reclutamiento de EPCs.....</i>	<i>29</i>
<i>Angiogénesis intromuscular.....</i>	<i>31</i>
<i>Coopción de vasos.....</i>	<i>31</i>
<i>Mimetismo vascular.....</i>	<i>31</i>
3. MATRIZ EXTRACELULAR.....	34
MEMBRANA BASAL.....	34
PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE LA ANGIOGÉNESIS Y EN CÁNCER.....	36

Matriz extracelular y angiogénesis .....	36
Matriz extracelular y cáncer .....	37
<b>4. PROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR .....</b>	<b>38</b>
MMPs .....	39
<i>Estructura .....</i>	<i>39</i>
<i>Regulación .....</i>	<i>40</i>
<i>Papel de las MMPs en angiogénesis y cáncer.....</i>	<i>40</i>
ADAMS .....	41
<i>Estructura .....</i>	<i>41</i>
<i>Regulación .....</i>	<i>42</i>
<i>Papel de las ADAMs en angiogénesis y cáncer .....</i>	<i>42</i>
ADAMTSs .....	43
<i>Estructura .....</i>	<i>43</i>
<i>Regulación .....</i>	<i>44</i>
<i>Papel de las ADAMTSs en angiogénesis y cáncer.....</i>	<i>44</i>
<b>5. ADAMTS1 .....</b>	<b>46</b>
<b>ESTRUCTURA Y REGULACIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>FUNCIONES.....</b>	<b>48</b>
<i>ADAMTS1 en angiogénesis.....</i>	<i>48</i>
<i>ADAMTS1 en cáncer .....</i>	<i>49</i>
Papel protumorigénico y prometastático de ADAMTS1.....	50
<b>6. MODELOS DE ESTUDIO .....</b>	<b>53</b>
RATÓN KO ADAMTS1 .....	53
MODELO CELULAR DE MELANOMA: B16F1.....	56
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>ADAMTS1 Y SU IMPLICACIÓN EN EL FENÓMENO DE MIMETISMO VASCULOGÉNICO:</b>	
<b>APROXIMACIONES IN VITRO .....</b>	<b>66</b>
<i>Caracterización molecular del fenotipo similar a endotelial en B16F1 frente a otros tipos celulares.....</i>	<i>66</i>
<i>Caracterización de las propiedades de plasticidad tumoral y su relación con la expresión génica en células B16F1 y LLC .....</i>	<i>68</i>
<i>Cocultivo de B16F1 y HUVECS: comportamientos diferenciados .....</i>	<i>72</i>
<i>Distribución de células endoteliales y tumorales en los cocultivos.....</i>	<i>74</i>
<i>Expresión génica en los cocultivos: papel de ADAMTS1 .....</i>	<i>74</i>
<i>Interferencia de Adamts1 en células B16F1 .....</i>	<i>76</i>
<i>Efecto de la interferencia de Adamts1 en características funcionales: formación de redes similares a endoteliales.....</i>	<i>77</i>
<i>Efecto de la interferencia de Adamts1 en características funcionales: proliferación y migración .....</i>	<i>79</i>

<i>Capacidad de movilidad e influencia del cocultivo en las células interferidas</i> .....	79
<i>Evaluación del citoesqueleto ante la interferencia de Adamts1</i> .....	81
<b>PAPEL DE ADAMTS1 EN EL DESARROLLO TUMORAL. IMPLICACIONES EN ANGIOGÉNESIS TUMORAL</b> .....	82
<i>Desarrollo de un modelo singénico subcutáneo de melanoma</i> .....	82
<i>Análisis del desarrollo tumoral y la arquitectura vascular en el modelo tumoral B16F1-ADAMTS1 KO</i> .....	83
<i>Análisis de la expresión génica de distintos marcadores en nuestro modelo tumoral</i> .....	84
<i>Evaluación de la distribución de zonas hipóxicas en los tumores</i> .....	85
<i>Desarrollo de tumores singénicos con células B16F1 en las que se ha inhibido la expresión de Adamts1</i> .....	87
<i>Patrón de expresión génica tras la interferencia de Adamts1</i> .....	89
<i>Análisis de la funcionalidad de la vasculatura</i> .....	90
<i>Evaluación de las zonas hipóxicas en tumores singénicos generados a partir de células de melanoma B16F1 con Adamts1 interferido</i> .....	92
<i>Evaluación del estado de los pericitos como medida de integridad vascular: tinciones con SMA</i> .....	93
<i>Contribución de ADAMTS1 al proceso de metástasis</i> .....	94
<i>VE-cadherina y su expresión en distintos modelos tridimensionales de B16F1</i> .....	96
<i>Análisis de expresión de proteasas en muestras de cáncer de mama</i> .....	100
<b>DISCUSIÓN</b> .....	102
<i>MIMETISMO VASCULOGÉNICO: COMUNICACIÓN ENTRE EL ENDOTELIO Y LAS CÉLULAS TUMORALES</i> .....	105
<i>ADAMTS1 Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE LA VASCULATURA TUMORAL</i> .....	107
<i>ADAMTS1 EN METÁSTASIS</i> .....	110
<i>VE-CADHERINA EN DESARROLLO TUMORAL</i> .....	111
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	113
<b>CONCLUSIONES</b> .....	115
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	116
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	118
1. <b>CULTIVO CELULAR</b> .....	120
2. <b>ENSAYO DE FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIO EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES</b> .....	120
3. <b>ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR</b> .....	121
4. <b>GENOTIPADO DE LOS RATONES ADAMTS1 KO</b> .....	121

Figura 44. Representación esquemática del gen ADAMTS1 y la delección llevada a cabo para generar el animal KO. En la figura se puede ver, en la parte superior, la estructura proteica de ADAMTS1. En la zona central se encuentra la representación esquemática del gen Adamts1 y la correspondencia con la estructura proteica de las zonas deleccionadas. En la parte inferior se encuentra la inserción por la que se sustituyen las zonas deleccionadas. Nótese que además de deleccionarse los exones del 2 al 8 también se ha deleccionado un fragmento del exón 9. .... 122

5. ENSAYO DE DESARROLLO TUMORAL Y METÁSTASIS.....	122
6. MUESTRAS TUMORALES HUMANAS.....	123
7. EXTRACCIÓN DE RNA, SÍNTESIS DE cDNA Y QPCR .....	123
8. WESTERN BLOT Y CUANTIFICACIÓN .....	123
9. INMUNOFLUORESCENCIA.....	124
10. ANALISIS DE LA VASCULATURA .....	124
11. ANÁLISIS DE VIABILIDAD VASCULAR .....	125
12. ENSAYO DE DETECCIÓN DE HIPOXIA.....	125
13. VECTORES, PRODUCCIÓN LENTIVIRAL Y TRANSDUCCIÓN.....	125
14. ANALISIS ESTADÍSTICO .....	126
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>132</b>

# FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL DESARROLLO TUMORAL .....	6
FIGURA 2 LA TELOMERASA Y LA LONGITUD DE LOS TELOMEROS DURANTE LA TUMOROGÉNESIS.. .....	10
FIGURA 3. PROCESO DE DESARROLLO DE METÁSTASIS.....	12
FIGURA 4. MODELO HETEROTÍPICO DEL CÁNCER.....	16
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS .....	22
FIGURA 6. ESPECIFICIDADES DE UNIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE VEGF.....	24
FIGURA 7. MECANISMOS ALTERNATIVOS DE ANGIOGÉNESIS EN LOS TUMORES.....	30
FIGURA 8. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MEMBRANA BASAL .....	35
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS MMPs.....	39
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS ADAMS. ....	42
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS ADAMTSs.....	44
FIGURA 12. ESTRUCTURA DE LA PROTEASA ADAMTS1 .....	47
FIGURA 13. MODELO DE SELECCIÓN DE LAS DIFERENTES SUBLÍNEAS METASTÁSICAS DE B16F1 .....	56
FIGURA 14. PANEL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA, CARCINOMA DE PULMÓN Y CÉLULAS ENDOTELIALES.....	67
FIGURA 15. FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIALES POR LAS LÍNEAS HUVEC, B16F1 Y LLC.....	69
FIGURA 16. EXPRESIÓN GÉNICA DE CULTIVOS CELULARES DE B16F1 Y LLC EN MATRIGEL .....	70
FIGURA 17. FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIAL EN CULTIVOS DE MATRIGEL.....	72
FIGURA 18. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE COCULTIVOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y TUMORALES.....	73
FIGURA 19. DISPOSICIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y TUMORALES EN MATRIGEL .....	74
FIGURA 20. EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS HUVEC Y B16F1 EN COCULTIVO.....	75
FIGURA 21. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE PROTEÍNA EN CÉLULAS B16F1 TRAS LA INFECCIÓN DE UN LENTIVIRUS.....	76
FIGURA 22. FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIALES POR PARTE DE CÉLULAS B16F1 INTERFERIDAS. ALTA DENSIDAD .....	77
FIGURA 23. FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIALES POR PARTE DE CÉLULAS B16F1 INTERFERIDAS. BAJA DENSIDAD.....	78
FIGURA 24. MEDIDA DE LAS CAPACIDADES CELULARES DE PROLIFERACIÓN E INVASIÓN.....	79
FIGURA 25. FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIALES EN MATRIGEL. ....	80
FIGURA 26. DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS DE ACTINA EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS DE MELANOMA B16F1 Y SUS CORRESPONDIENTES CÉLULAS INTERFERIDAS Y CONTROLES.....	81
FIGURA 27. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS TUMORES B16F1 EN ANIMALES WT Y KO. ....	82
FIGURA 28. CARACTERIZACIÓN DE LA VASCULATURA TUMORAL.....	83
FIGURA 29. EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON EL ENDOTELIO Y SUSTRATOS DE ADAMTS1.....	85

FIGURA 30. EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HIF EN TUMORS CRECIDOS EN ANIMALES ADAMTS1 WT Y KO .....	85
FIGURA 31. INMUNOTINCIÓN DE LAS ZONAS HIPÓXICAS EN TUMORES CRECIDOS EN RATONES ADAMTS1 WT Y KO .....	86
FIGURA 32. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES OBTENIDOS AL INYECTAR CÉLULAS INTERFERIDAS Y LOS CORRESPONDIENTES CONTROLES EN ANIMALES ADAMTS1 WT Y KO.....	87
FIGURA 33. EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON EL ENDOTELIO Y SUSTRATOS DE ADAMTS1 TRAS LA INTERFERENCIA DE <i>ADAMTS1</i> .....	89
FIGURA 34. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS VASOS TUMORALES .....	90
FIGURA 35. INMUNOTINCIÓN DE LAS ZONAS HIPÓXICAS EN TUMORES ORIGINADOS A PARTIR DE CÉLULAS B16F1 PARENTALES E INTERFERIDAS PARA <i>ADAMTS1</i> EN RATONES ADAMTS1 WT Y KO .....	92
FIGURA 36. INMUNOTINCIÓN DE SMA EN SECCIONES DE TUMORES ORIGINADOS EN ANIMALES ADAMTS1 WT Y KO A PARTIR DE CÉLULAS B16F1 Y B16-shA <i>TS1</i> .....	93
FIGURA 37. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE MICROMETÁSTASIS ENCONTRADAS EN HÍGADO .....	94
FIGURA 38. EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE MELANOMA EN HÍGADOS Y PULMONES DE RATÓN .....	95
FIGURA 39. EXPRESIÓN DE VE-CADHERINA EN DISTINTAS CONFIGURACIONES.....	96
FIGURA 40. INMUNOMARCAJE DE VE-CADHERINA EN CÉLULAS TUMORALES B16F1 Y ENDOTELIALES EN COCULTIVO. ....	97
FIGURA 41. EXPRESIÓN DE VE-CADHERINA EN SECCIONES DE TUMORES B16F1 CRECIDOS EN ANIMALES ADAMTS1 WT Y KO.....	98
FIGURA 42. INMUNOTINCIÓN DE SECCIONES DE TUMORES B16F1 DESARROLLADOS EN ANIMALES ADAMTS1 WT Y KO.....	99
FIGURA 43. VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEASAS EXTRACELULARES EN MUESTRAS DE TEJIDO DE MAMA SANO Y EN TEJIDO TUMORAL .....	100
FIGURA 44. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GEN ADAMTS1 Y LA DELECCIÓN LLEVADA A CABO PARA GENERAR EL ANIMAL KO .....	122



# TABLAS

TABLA 1. RESUMEN DE INDUCTORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS. FGTO : FRAGMENTO .....	19
TABLA 2. DEFECTOS FENOTÍPICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES ADAMTS1 KO. ....	55
TABLA 3. LISTA DE CEBADORES UTILIZADOS A LO LARGO DE ESTE TRABAJO. ....	127





## RESUMEN

El desarrollo tumoral y la metástasis son dos procesos que están íntimamente ligados al desarrollo de la vasculatura. Al igual que cualquier órgano, los tumores necesitan crear un sistema vascular que colme sus necesidades metabólicas pero para poder desplegar esta nueva red vascular requieren de la modificación de la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*). La proteólisis de la ECM se lleva a cabo por un grupo de proteínas con capacidad proteolítica llamadas metaloproteasas de la matriz. Esta familia de proteasas se divide a su vez en tres familias denominadas MMPs, ADAMs y ADAMTSs. Dentro de la familia ADAMTSs, se ha descrito que el primero de sus miembros es capaz de regular el desarrollo tumoral a través de un mecanismo que influye en la formación de nuevos vasos sanguíneos. A su vez, se ha descrito que ADAMTS1 es necesario para uno de los procesos alternativos de vascularización tumoral, el mimetismo vasculogénico.

En nuestro trabajo nos centramos en estudiar el papel de ADAMTS1 como modulador de la angiogénesis y, a su vez, como regulador del desarrollo vascular. Para ello desarrollamos tumores singénicos mediante la inyección de células de melanoma murino B16F1 en una cepa de ratón C57Bl/6 ADAMTS1 KO. En este contexto observamos que ADAMTS1 actuaba como molécula antiangiogénica aunque promovía el desarrollo tumoral. Esto se debe a que ADAMTS1 disminuye el número de vasos en los tumores desarrollados en ratones ADAMTS1 WT pero promueve la maduración de éstos aumentando su tamaño y su funcionalidad. Posteriormente, tras la inhibición de ADAMTS1 en las células tumorales pudimos comprobar que el efecto de que el ADAMTS1 derivado de los tumores tenía sobre el desarrollo de la vasculatura tumoral era limitado o nulo.

Al mismo tiempo caracterizamos la capacidad de formación de redes similares a endoteliales por parte de las células B16F1 y encontramos que ADAMTS1 participa en la formación de estas redes, aunque de manera limitada.



# INTRODUCCIÓN







# 1. CÁNCER

## ASPECTOS GENERALES

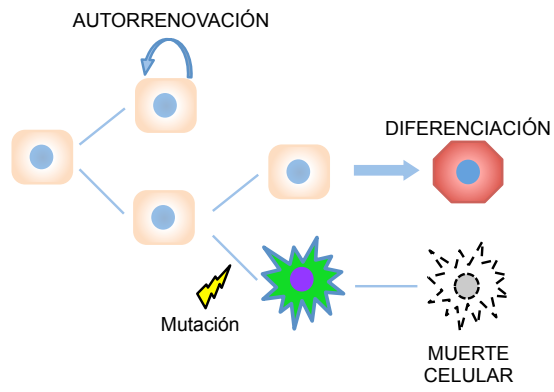
El cáncer es un conjunto de enfermedades en el que células anormales proliferan de manera descontrolada dando lugar a un tumor y pudiendo invadir otros órganos a través de la sangre o del sistema linfático en un proceso conocido como metástasis, siendo ésta última la mayor causa de muerte por cáncer (World Health Organization, 2014).

El crecimiento descontrolado y la posterior capacidad de invasión se producen por cambios genéticos en una única célula. Posteriormente los cambios son fijados en el genoma celular y transmitidos a las células hijas, que irían acumulando mutaciones, dando lugar al crecimiento del tumor (**Figura 1**). Estos cambios son causados por agentes ambientales, en un 90-95% de los casos mientras que el 5-10% de los restantes tienen su origen en defectos genéticos hereditarios. Llama la atención, a la par que refuerza el hecho de que el cáncer es una enfermedad mayormente ambiental, que las poblaciones de inmigrantes padecen cáncer en porcentajes similares a los que se pueden encontrar en sus países de acogida y no a la de sus países de origen (Anand et al., 2008).

## EVENTOS CLAVE EN EL DESARROLLO TUMORAL

El proceso de transformación de célula normal a célula tumoral se da en varios pasos durante el que pueden confluir factores genéticos personales (concretos de cada individuo) y factores ambientales, citados anteriormente. En el año 2000 Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg (Hanahan et al., 2000) recapitulaban los datos obtenidos en la investigación del cáncer de los 25 años precedentes a modo de revisión. En ella exponían que el desarrollo de un tumor era un proceso que se llevaba a cabo en diferentes etapas que reflejan, primeramente, una serie de alteraciones genéticas que dan lugar a una progresiva transformación de las células sanas en cancerígenas. No obstante, la transformación *per se* no es suficiente para el desarrollo de un tumor y la posterior metástasis. Se necesitan además que ocurran otra serie de eventos que permiten la supervivencia de las células tumorales dentro del organismo y que faciliten la posterior invasión de otros órganos. En total son 6 las características adquiridas que Hanahan y Weinberg proponen en esta primera revisión como comunes a la mayoría de los tumores.

# CRECIMIENTO CELULAR NORMAL



# CRECIMIENTO TUMORAL

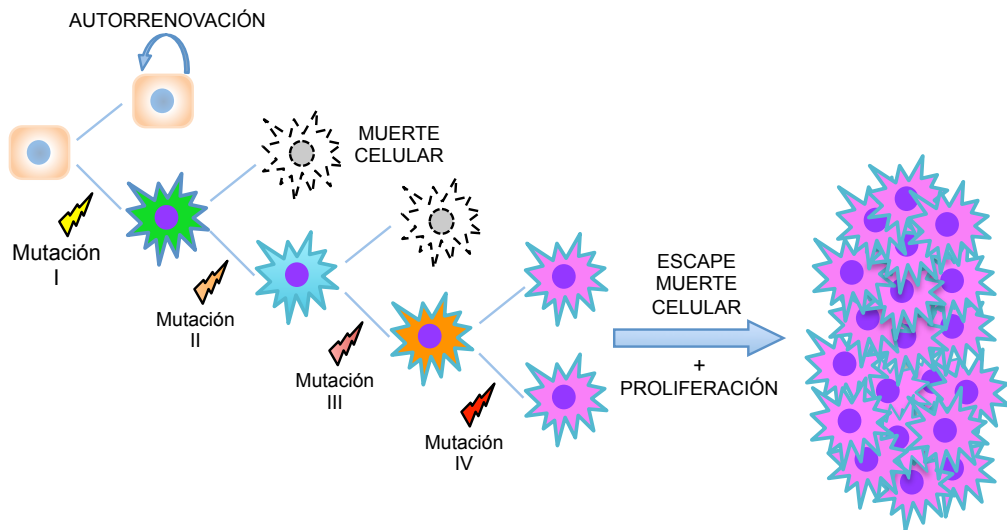


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo tumoral

## 1. Autosuficiencia en señales de crecimiento

La capacidad de una célula de reproducirse es el elemento básico de su supervivencia. Para ello necesita tanto producir como recibir señales mitóticas que la hagan salir de un estado quiescente. La secreción de todas las moléculas que inducen la división celular, llamadas factores de crecimiento (GFs), está finamente controlada tanto a nivel transcripcional como postraduccional, permitiendo la división de la célula en lo que se conoce como ciclo celular. La correcta regulación del ciclo celular es clave a la hora de mantener la arquitectura y homeostasis tisular. Muchos de los mecanismos de acción de las señales mitogénicas así como el origen de cada una de ellas son, sin embargo, todavía desconocidos.

Las mutaciones sufridas por las células tumorales les permiten desregular tanto los mecanismos de producción de factores mitogénicos como el ciclo celular, pudiendo mantener un crecimiento continuo a la par que desorganizado. Las células tumorales son capaces de inducir los mecanismos prometóticos de manera autónoma dándose así una activación autocrina de la mitosis. De la misma manera son capaces de activar otras células del estroma tumoral para que secreten los factores de crecimiento que ellas necesitan denominándose entonces esta activación como paracrina (Witsch et al., 2010). Uno de los mecanismos descritos para la activación de la mitosis consiste en el aumento del número de receptores en la superficie de la célula. Ésto conduce a una hipersensibilidad de actividad celular ante una cantidad determinada de ligando. Algunas mutaciones pueden desencadenar la activación constitutiva de las rutas de señalización en la célula y por tanto una activación permanente de las cascadas de señalización que llevan a la mitosis celular sin necesidad de la unión de ligando por parte de los receptores.

Hemos de tener en cuenta, y será motivo de estudio en este trabajo, que un amplio número de los factores de crecimiento secretados por las células se unen a la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*), la cual regula su distribución, activación y presentación (Hynes, 2009; Vaday and Lider, 2000). Por ejemplo, la biodisponibilidad de mitógenos como FGF, VEGF, EGF, HGF y TGF- $\beta$  está regulada por su interacción con componentes de la ECM (Hynes, 2009; Ishitsuka et al., 2009; Rahman et al., 2005; Wijelath et al., 2006). La acción de las proteasas de la matriz extracelular es también importante ya que son ellas las que modificando la ECM permiten la liberación de los factores de crecimiento (Whitelock et al., 1996).

## 2. Insensibilidad a las señales que inhiben el crecimiento

De manera complementaria y como mecanismo de control existen en la célula mecanismos de parada en la proliferación. Las células tumorales han de escapar a todas estas señales antiproliferación para progresar. Entre ellas se incluyen inhibidores del crecimiento tanto solubles como moléculas inmovilizadas en la ECM. Hablaremos más de la matriz extracelular como reservorio de señales antiproliferativas en un capítulo posterior. Además, muchas de las rutas antiproliferación están controladas por genes supresores de tumores. Los dos genes característicos en la supresión tumoral son Rb y p53. Éstos pueden controlar la transcripción de genes implicados en el ciclo celular, modificar el DNA para ser reparado ante daños e inducir la senescencia y muerte celular si no son capaces de controlar el daño en la cromatina. Se ha demostrado extensamente que mutaciones o el daño en estos genes son un elemento esencial para el desarrollo de un gran número de tumores (Carvajal and Manfredi, 2013; Hollstein et al., 1991; Macaluso et al., 2006; Morris and Dyson, 2001; Vousden and Lu, 2002)

## 3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)

La apoptosis es un proceso en el que la célula media su propia muerte de manera controlada activando una serie de mecanismos internos. Es un mecanismo que ocurre de manera frecuente en el organismo, siendo especialmente relevante en el desarrollo embrionario. Un claro ejemplo de este proceso es la eliminación de las membranas interdigitales en algunos mamíferos (Wood et al., 2000).

Actualmente se han descrito dos mecanismos de señalización que desencadenan la apoptosis. Se conocen como vía extrínseca o mediada por receptores y vía intrínseca o mitocondrial. Ambos mecanismos requieren de la activación en cascada de una serie de proteínas denominadas Caspasas. (Thornberry and Lazebnik, 1998). La activación de los mecanismos apoptóticos puede dar lugar a fragmentación del DNA, degradación del citoesqueleto, pérdida de adhesión a las células vecinas, desmantelamiento de las membranas y proteínas del núcleo, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de los correspondientes ligandos para los receptores de células fagocíticas y finalmente fagocitosis por partes de estas células. Además, la apoptosis es necesaria para evitar la iniciación y el progreso tumoral tal y como se ha venido estudiando de manera muy relevante en la última década (Evan and Vousden, 2001; Lowe et al., 2004). La

desregulación de la apoptosis en los tumores, además de por la pérdida o mutación de p53, se da principalmente por tres factores:

1. un incremento en la expresión de factores antiapoptóticos, o por un incremento de señales de supervivencia
2. desregulando la expresión de factores proapoptóticos
3. bloqueando los receptores que inician la vía extrínseca

El amplio conocimiento de las rutas apoptóticas así como el estudio y el descubrimiento de las moléculas implicadas facilitan el desarrollo de terapias que rescaten o induzcan de manera exacerbada y selectiva el fenotipo apoptótico en las células tumorales.

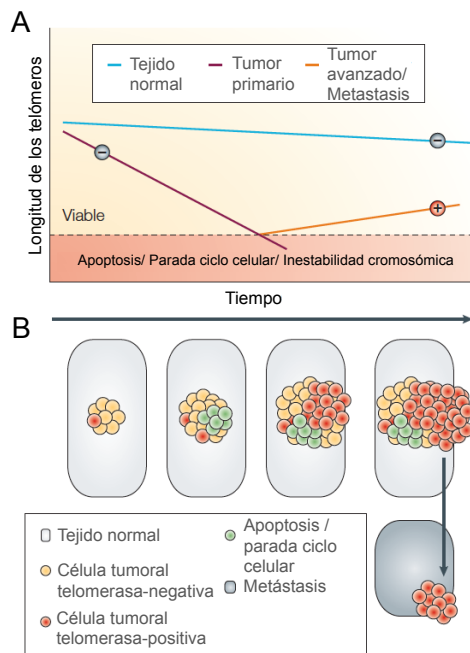
#### 4. Potencial ilimitado de replicación

Todas las capacidades expuestas hasta ahora demuestran que la célula tumoral consigue desvincularse de los mecanismos de control de la replicación de su microambiente. Podría parecer que es suficiente con activar todos los mecanismos ya descritos para dar lugar al desarrollo de un tumor pero no es así. Las células tienen mecanismos intrínsecos que impiden la replicación indefinida tal y como se puede observar cuando se hacen cultivos de células primarias, donde las células acaban entrando en senescencia y finalmente mueren.

Adquirir la capacidad de replicarse de manera indefinida, también llamada inmortalización, requiere de la puesta en marcha de mecanismos adicionales siendo el más significativo la activación de la enzima telomerasa. Los telómeros son secuencias repetitivas de DNA en el extremo de los cromosomas que actúan a modo de “reloj molecular”. Sirven para proteger al DNA de la degradación tras las sucesivas rondas de replicación ya que las polimerasas son incapaces de replicar el genoma completo y en cada división se pierde una porción del extremo. La enzima telomerasa se encarga de reponer este extremo en las células en las que se encuentra activada permitiendo un mayor número de rondas de replicación y en el caso de las células tumorales la replicación indefinida.

Las células tumorales, por lo general, poseen telómeros más cortos que el tejido circundante normal, lo que ocasiona muerte celular en el tumor (**Figura 2A**). Sin

embargo el 90% de los tumores reactiva la expresión de telomerasa en algún momento (Bryan and Cech, 1999). El rescate de la telomerasa implica un beneficio para las células tumorales, que pueden desarrollarse a pesar de poseer una inestabilidad cromosómica importante (**Figura 2B**). Es también importante resaltar que la mayoría de las células metastáticas expresan telomerasa (Chin et al., 1999; Samper et al., 2001).



El estudio de la telomerasa y su función en el desarrollo tumoral es clave ya que su baja o nula expresión en las células de tejido sano junto con la alta expresión encontrada en la gran mayoría de tejido tumoral la convierten en una diana terapéutica ideal. Esto se debe a que su inhibición o bloqueo afectaría de manera muy importante a los tumores mientras que su toxicidad sería nula o muy baja para las células sanas.

**Figura 2 La telomerasa y la longitud de los telómeros durante la tumorigénesis.** (A). Cambios en la longitud de los telómeros en tejido tumoral frente a tejido sano. La presencia o ausencia de actividad telomerasa se representa con un símbolo de más (+) o menos (-) respectivamente. (B) Composición de células en un tumor en el mismo espacio de tiempo (Modificado de Blasco, 2005).

## 5. Angiogénesis sostenida

De la misma manera que los tejidos normales, los tumores necesitan un aporte de nutrientes y oxígeno para su desarrollo. La angiogénesis es un proceso esencial en reproducción, desarrollo, y en reparación de heridas. En condiciones normales, en el organismo adulto, la angiogénesis está completamente inhibida gracias al mantenimiento constante de un balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. El desarrollo de nuevos vasos se inicia sólo cuando es estrictamente necesario (Folkman and Shing, 1992a). Para desarrollarse, los tumores han de construir toda una red vascular a su alrededor, por lo que podemos decir que el cáncer y la metástasis son dependientes de la vasculatura (Folkman, 1990). Actualmente no sólo no se pone en duda el papel de la vasculatura en el desarrollo tumoral si no que se considera un elemento clave para la progresión de las neoplasias. Además, la

vasculatura constituye uno de los elementos indispensables por los que se produce la metástasis (Fidler and Ellis, 1994; Hanahan and Weinberg, 2011) y es ésta última la causante de la muerte del 90% de los pacientes de cáncer (Sporn, 1996).

Al ser la angiogénesis un proceso invasivo se necesita la degradación y remodelamiento de la ECM por proteasas, entre las que destacan las MMPs, ADAMs y ADAMTSs (Egeblad and Werb, 2002; van Hinsbergh et al., 2006). Las funciones más destacadas de estas proteasas durante el desarrollo vascular engloban desde la degradación de la membrana basal de las células endoteliales, permitiendo su movilidad y división, hasta la degradación de la matriz extracelular en las zonas adyacentes para que tenga lugar la elongación de los nuevos vasos a partir de los ya existentes (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008).

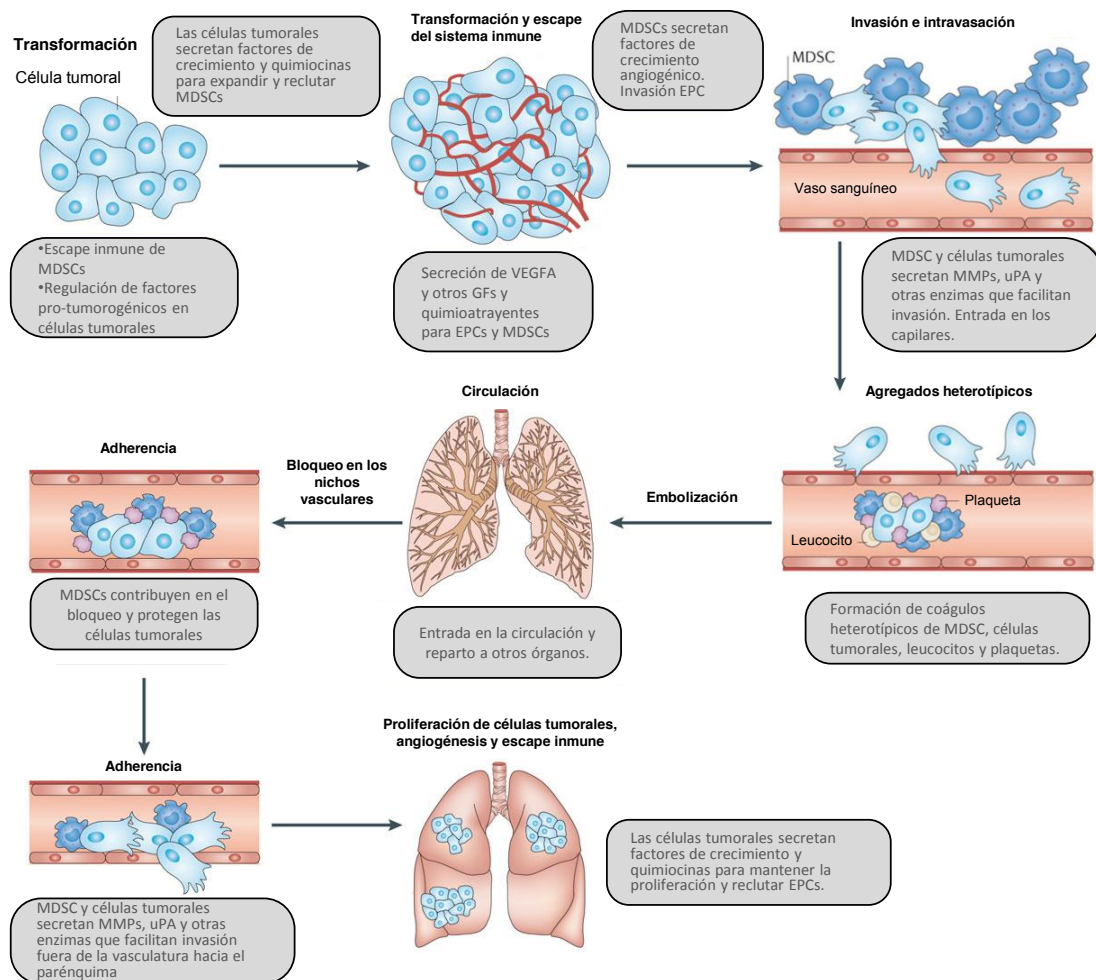
Es por todo esto que la angiogénesis y la función de la metaloproteasas a lo largo del proceso han sido y son actualmente un importante campo de estudio con respecto al cáncer. Son también el tema de estudio de esta tesis y es por ello por lo que desarrollaremos estos conceptos de manera más amplia en los próximos capítulos.

## 6. Invasión de tejidos y metástasis

A medida que los tumores evolucionan hacia grados patológicos mayores tienden a invadir tejidos cercanos. Ésto es debido, mayormente, a la pérdida de moléculas de adhesión a otras células y a la ECM siendo la pérdida de E-cadherina el ejemplo más estudiado (Berx and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004; Cavallaro et al., 2006). La falta de adhesión propicia que las células cancerígenas puedan entrar en el torrente sanguíneo desplazándose entonces hasta órganos lejanos donde pueden formar nuevas colonias y expandirse. Es lo que se conoce como metástasis, término utilizado por primera vez por Jean Claude Récamier en 1829 (Récamier, 1829) (**Figura 3**).

Para desarrollar metástasis han de darse una serie de pasos secuenciales e interconectados a la par que algunos eventos completamente aleatorios (Price et al., 1986). En esencia, se puede resumir que los eventos que han de ocurrir para que se origine una metástasis son, primero que todo, el desarrollo de una red vascular alrededor del tumor primario. Posteriormente las células metastáticas han de ser capaces de escapar del sistema inmune e invadir las vénulas y vasos linfáticos más

pequeños que son los que ofrecen una menor resistencia al tener membranas basales más delgadas en un proceso conocido como trans migración endotelial (TEM, *transendothelial migration*). Durante la TEM las células tumorales secretan principalmente TGF- $\beta$  y VEGF, los cuales reducen la permeabilidad vascular. Es en esta pérdida de permeabilidad del endotelio donde se ven implicadas muchas moléculas como selectinas, integrinas, cadherinas, CD44 y receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas así como sus respectivos ligandos (Reymond et al., 2013). Una vez producida la intravasación, el siguiente paso consiste en la pérdida de adhesión al endotelio por parte de la célula tumoral. Es entonces cuando las células que han sobrevivido al estrés del torrente sanguíneo se adhieren a una nueva vasculatura, para posteriormente extravasar al nuevo órgano.



**Figura 3. Proceso de desarrollo de metástasis.** La formación de metástasis es consecuencia de la supervivencia y el crecimiento de subpoblaciones preexistentes en el tumor primario. (Modificado de Talmadge and Fidler, 2010).



Finalmente la célula tumoral ha de adaptarse a un nuevo microambiente y proliferar, pudiendo repetir todo este proceso y dar lugar a nuevas metástasis (**Figura 3**) (Fidler, 1990; Talmadge and Fidler, 2010). Es importante resaltar que cada uno de los pasos descritos limita estrictamente el desarrollo de los pasos posteriores, es decir, si no se da uno no ocurrirán los siguientes.

La metástasis es un proceso altamente ineficiente. A pesar de ello, basta un número mínimo de células para iniciar un proceso neoplásico. En un experimento vieron que tras la inyección intravenosa de células de melanoma murino B16 marcadas radiactivamente, después de 24 horas en la circulación, sólo un 0.1% ó menos eran viables. Además menos del 0.01% consiguieron producir metástasis en el pulmón (Chambers et al., 2002; Fidler, 1970). En otros modelos experimentales de metástasis dirigida a hígado y pulmón se corroboró esta alta ineficiencia a la hora de producir nuevos focos tumorales por parte de las células cancerígenas (Cameron et al., 2000; Luzzi et al., 1998).

Ya en 1889 Paget, tras unas primeras observaciones, intentó explicar este hecho. Se debe principalmente a que sólo un grupo reducido de células tumorales a las que se denomina “*seed*” (semilla) son capaces de cumplir con todos los requisitos necesarios para metastatizar, mencionados anteriormente. Además, se ha visto que la metástasis tiene lugar en órganos o microambientes de características concretas denominados “*soil*” (tierra) (Paget, 1889). Es, por tanto, correcto decir que la metástasis sólo ocurre si las características de la célula son compatibles con el nuevo microambiente que encuentra.

En 1980 Hart et al. llevaron a cabo una serie de experimentos parabióticos en los que se hacían injertos de tejidos de manera ectópica. En estos estudios utilizaron células de melanoma B16 inyectadas de manera intravenosa en ratones singénicos C57Bl/6. Entre sus resultados encontraron que las células de melanoma causaban metástasis en los pulmones y en los tejidos ectópicos de pulmón y ovario que habían implantado intramuscularmente. Por el contrario no encontraron metástasis en el tejido renal, también implantado en la misma zona, ni en los riñones. Ésto demuestra que el desarrollo de metástasis viene determinado por la predisposición de las células metastáticas de implantarse en un tipo de tejido y no solamente por una distribución aleatoria de las células tumorales tras su viaje por el torrente sanguíneo (Hart and Fidler, 1980).

Actualmente, sabemos además que la vasculatura juega un papel muy relevante en la metástasis ya que se ha comprobado que la vasculatura expresa diferentes receptores celulares y factores de crecimiento en los distintos órganos lo que permitiría la TEM de unas células tumorales y no de otras (Pasqualini and Ruoslahti, 1996; Uehara et al., 2003). Además se ha descrito que la vasculatura tumoral es capaz de expresar metaloproteinasas las cuales son capaces de influir en el desarrollo metastático, principalmente facilitando la salida de la circulación de las células tumorales (Chambers and Matrisian, 1997; Fröhlich et al., 2013; Koop et al., 1994; Wylie et al., 1999). La vasculatura tumoral es, además, defectuosa ya que es aberrante, tortuosa y altamente hemorrágica facilitando así el escape de las células tumorales al torrente sanguíneo.

Otros estudios han demostrado que los distintos tipos celulares presentes en el microambiente facilitan el desarrollo de metástasis. Por ejemplo, nada más exponerse al torrente sanguíneo las células tumorales expresan trombina lo que hace que las plaquetas coagulen a su alrededor y actúen a modo de escudo protegiéndolas del ataque de las células inflamatorias (Gil-Bernabé et al., 2013). La disminución de las plaquetas llega a inhibir la metástasis en algunos modelos de ratón (Camerer et al., 2004; Karpatkin et al., 1988). Igualmente se ha demostrado que leucocitos, macrófagos, monocitos y neutrófilos, entre otras, promueven la extravasación y facilitan el establecimiento de los nichos metastáticos mediante el aumento de la expresión en la membrana celular de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas como IL-8 ó VEGF derivado de monocitos (Reymond et al., 2013).

Todo esto sugiere claramente que el microentorno participa tanto en el desarrollo de la metástasis como en el desarrollo del tumor primario, no dependiendo el progreso neoplásico exclusivamente de la fisiología de la célula tumoral.

### **Características emergentes promotoras del desarrollo tumoral**

Recientemente se han propuesto otras serie de características adicionales a las ya mencionadas. No obstante, estas nuevas propiedades no serían limitantes para el desarrollo tumoral en el mismo grado que las anteriores. Más bien constituyen un apoyo para el desarrollo del tumor funcionando conjuntamente con las cualidades principales (Hanahan and Weinberg, 2011). La principal es el desarrollo de inestabilidad genómica

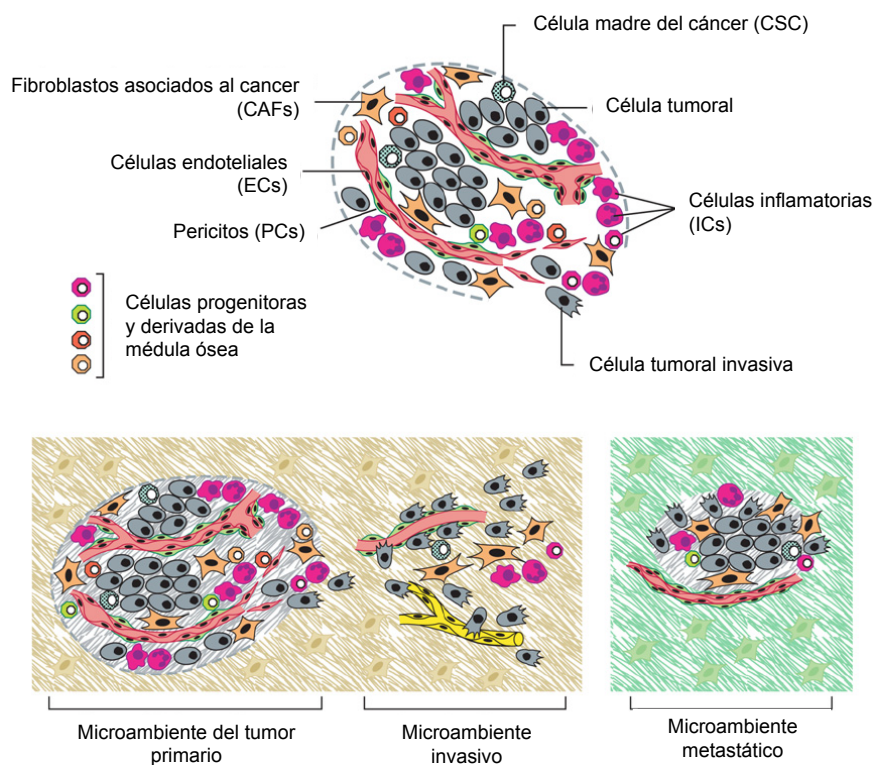
la cual permite una alta tasa de mutación en los tumores pudiendo éstos adaptarse a nuevos ambientes desfavorables rápidamente. El estado inflamatorio del tumor también juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad ya que las células del sistema inmune secretan una gran variedad de factores de crecimiento que acabarían participando en proliferación, supervivencia, invasión y metástasis. También son capaces de secretar enzimas que degradan la ECM facilitando así el desarrollo de angiogénesis (DeNardo et al., 2010). Por otra parte, otra característica consiste en la desregulación del metabolismo celular la cual se hace necesaria a medida que los tumores soportan una mayor tasa de división celular. Para producir mayor cantidad de energía las células tumorales viran hacia un metabolismo anaerobio aún en condiciones de oxígeno. Reducen piruvato a lactato, que es más ineficiente en términos energéticos, además de que acidifica el medio, pero es mucho más rápido que la activación de la cadena transportadora de electrones. Este efecto se conoce como “*metabolic switch*” y fue descrito por Warburg et al. (Wargurg, 1956). Finalmente las células tumorales necesitarían evitar la vigilancia y su destrucción por parte del sistema inmune.

Todos estos apartados nos describen una situación poco común si la comparamos con la mayoría de las enfermedades donde por lo general existe un agente causal que si se elimina o neutraliza se consigue detener la enfermedad. En el cáncer, sin embargo, hay una serie de elementos, que hemos descrito, que sin ser en su mayoría causa directa contribuyen al mantenimiento y la propagación de la enfermedad. Intentar buscar una cura requerirá del abordaje de todos ellos, al menos de forma parcial. Por ello, se hace necesario conocer los procesos anteriormente descritos más en profundidad pero sobre todo se hace indispensable estudiar la relación entre todos estos procesos y su comportamiento como un ecosistema que interactúa y evoluciona.

## ACTUALIZACIÓN DEL CONCEPTO DE TUMOR: PROTAGONISMO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

El estudio del cáncer en las últimas décadas ha provocado una evolución evidente del concepto de tumor que teníamos hasta la fecha. Las primeras investigaciones se centraban en conocer la fisiología de la célula tumoral. Se pensaba que así se conseguiría entender el comportamiento de los tumores. Todos los conocimientos expuestos hasta ahora muestran claramente que para conocer cómo funciona y se

desarrolla un tumor hay que estudiar un conjunto de componentes accesorios que acaban permitiendo la conformación del tumor. Esta situación ha hecho que cambie la manera de concebir el tumor tal y como se entendía hasta la fecha. Pasa de ser un cúmulo de células tumorales, todas ellas con las mismas características, a verse como un microambiente donde varios tipos celulares, junto con factores solubles y componentes de la ECM juegan cada uno un papel específico que permite el desarrollo del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011). Es lo que se conoce como microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*). Adicionalmente, se ha descrito que no todas las células tumorales presentan las mismas características sino que existe una heterogeneidad tumoral lo que facilita el desarrollo del tumor al permitirle hacer frente a situaciones adversas (hipoxia, falta de nutrientes, quimioterapia) más fácilmente (**Figura 4**).



**Figura 4. Modelo heterotípico del cáncer. Representación esquemática del microambiente tumoral** (Modificado de Hanahan and Weinberg, 2011).

El TME es un entorno cambiante, en constante remodelación debido a los desórdenes metabólicos que se suceden en el tumor y al reclutamiento de células estromales, especialmente fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, *cancer-associated fibroblasts*), macrófagos asociados al cáncer (TAMs, *tumor-associated macrophages*) y células endoteliales, entre otras. Por ejemplo, fibroblastos y miofibroblastos facilitan la tumorigénesis

promoviendo el desarrollo angiogénico así como la proliferación, supervivencia, invasión y metastaticidad de las células tumorales epiteliales (Hu and Polyak, 2008). Por otra parte, se ha descrito que las células derivadas de la médula ósea colonizan algunos tejidos antes de la llegada de las células tumorales, estableciendo un nicho premetastático que facilita el desarrollo de la metástasis (Kaplan et al., 2005, 2007).

En definitiva, los cambios que se producen en el microambiente tumoral funcionan de manera sinérgica permitiendo tanto la iniciación del tumor, como su posterior proliferación y la metástasis (Balkwill et al., 2012). Se hace por tanto necesario estudiar los distintos tipos celulares que componen el TME. En el caso que nos ocupa, nos interesa cómo el endotelio es capaz de modificar el TME para promover el desarrollo tumoral.

### Endotelio y microambiente tumoral

De manera fisiológica, un microambiente específico es fundamental incluso para modificar la arquitectura vascular mediante la secreción de citoquinas y factores de crecimiento propias de cada entorno. El ejemplo más claro lo encontramos en la barrera hematoencefálica donde las células endoteliales presentan un nivel mucho mayor de adhesión entre ellas. En el caso del tumor, las células endoteliales expresan distintos receptores de membrana y son fenotípicamente diferentes (Auerbach, 1991). Hay que resaltar que algunas integrinas, moléculas de adhesión a la matriz extracelular, se sobreexpresan en el endotelio ante la presencia de determinados factores de crecimiento producidos por el tumor. Un ejemplo claro es la integrina  $\alpha_v\beta_3$  que es sobreexpresada en células endoteliales en tumores de mama, colon, pulmón, páncreas, neuroblastoma y melanoma (Jung et al., 2002).

En cuanto a la contribución de las células tumorales se ha demostrado, por ejemplo, que células de melanoma expresan IL-8 induciendo la proliferación, migración e invasión por parte de las células endoteliales (Singh et al., 1994a). La situación de hipoxia que podemos encontrar en algunas regiones del microambiente tumoral también inducen la producción de IL-8 además de otros factores de crecimiento como la angiogenina o, por supuesto, el VEGF (Subarsky and Hill, 2003). De esta manera se ve aumentada la activación e invasión de las células endoteliales. El microambiente tumoral, además, no sólo determina qué factores de crecimiento se expresan sino también en que cantidad,

siendo este hecho muy relevante. Por ejemplo, el FGF-2 se expresa 20 veces más en células HRCC cuando éstas se implantan en riñones que cuando se implantan en tejido subcutáneo (Singh et al., 1994b).

Todo esto nos indica que el microambiente condiciona la expresión de factores de crecimiento por parte de las células tumorales y éstos a su vez, pueden modificar la arquitectura vascular.

La matriz extracelular del TME también participa de manera activa en el desarrollo tumoral. Los tumores presentan generalmente una mayor consistencia que el tejido sano circundante principalmente debido a una mayor deposición de proteínas de adhesión a la matriz extracelular por parte de los CAFs (Balkwill et al., 2012). El cambio en la disposición de las fibras de colágeno y su posterior entrecruzamiento con fibras de elastina aumentan la rigidez de la ECM y, por consiguiente, aumentan la consistencia del tumor (Levental et al., 2009). En otras situaciones se ha descrito la imposibilidad por parte de los CAFs de organizar las fibras de colágeno de manera adecuada llegando incluso a formar fibras de colágeno curvadas en vez de planas y paralelas. La incorrecta deposición de la matriz conlleva una distribución aberrante del endotelio tumoral y por tanto una disminución en el aporte de oxígeno, favoreciéndose una vez más la situación de hipoxia (Hanahan and Coussens, 2012).

La interacción entre microambiente tumoral y endotelio es recíproca. De esta manera, se ha observado que las metaloproteasas de la matriz extracelular secretadas por el endotelio se ven también implicadas en el desarrollo y establecimiento del nicho tumoral mediante la proteólisis de sustratos. Por ejemplo, ADAM17 produce el corte proteolítico del Jagged-1 de células endoteliales. Una vez cortado se solubiliza y es captado por los receptores Notch de células tumorales los cuales activan una cascada de señalización que desencadenan características de “*cancer stem cell (CSC)*” en las células tumorales (Lu et al., 2013). La degradación de colágeno mediada por MMPs lleva a la formación de sitios de anclaje de integrinas como la ya mencionada  $\alpha_v\beta_3$  que permite la formación de nuevo endotelio (Weis and Cheresh, 2011)..

## 2. ANGIOGÉNESIS

### ASPECTOS GENERALES

La angiogénesis es un proceso fisiológico en el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Folkman and Shing, 1992b). El crecimiento y el desarrollo requieren del correcto aporte de nutrientes y oxígeno a todos los órganos y tejidos de un individuo. Para ello se necesita desarrollar una extensa red vascular. La mayor parte de la vasculatura de un ser vivo se origina en el desarrollo embrionario a partir del mesodermo. De éste se derivan una serie de células conocidas como células embrionarias progenitoras endoteliales (EPCs, *endothelial progenitor cells*) o angioblastos, que se diferenciarán dando lugar a células propiamente endoteliales (ECs, *endothelial cells*). Este proceso es conocido como vasculogénesis y es un claro ejemplo de regulación eficiente en

el desarrollo tisular ya que las EPCs se multiplican, diferencian a ECs, migran hacia zonas lejanas, se adhieren a la matriz y forman fuertes uniones célula-célula. Además de durante el desarrollo embrionario, se ha descrito que el reclutamiento de EPCs para formar nuevos vasos se produce en algunas situaciones fisiológicas y en enfermedades como el cáncer (Adams and Alitalo, 2007; Potente et al., 2011).

En el organismo adulto la red vascular se mantiene generalmente en un estado de quiescencia y sólo en algunas situaciones fisiológicas, como la reparación de heridas o el ciclo de reproducción femenino, o en patológicas como el cáncer se activa para dar lugar a nuevos vasos (Hanahan and Folkman, 1996). El mantenimiento de la

REGULADORES DE LA ANGIOGÉNESIS	
ACTIVADORES	INHIBIDORES
Familia VEGF	2-metoxiestradiol
FGF1-2	Angiopoyetina-2
Angiogenina	Angiostatina (Fgto. Plasminogeno)
Angiopoyetina 1	aaAT3
COX-2	Anastelina ( Fgto. Fibronectina)
Efrinas	Arrestina
E-selectina	Canstatina
EGF	Condromodulina
Eritropoyetina	EFC-XV
Estrógenos	Endorepelina
HGF	Endostatina (Fgto. ColXVIII)
IL1	IFN $\alpha$
IL3	IFN $\beta$
IL6	IFN $\gamma$
IL8	IL12
Integrinas avb3, avb5,	IL4
a5b1	
NO	IP-10
PDGF	Kringle 2
Pleiotropina	Kringle 5 (Fgto. Plasminógeno)
Proliferina	PAI-1
Prostaglandinas E1-E2	PEDF
TGF $\beta$	PEX
TNF $\alpha$	PF4
VCAM-1	Prolactina
	Fgto. SPARC
	Ácido retinoico
	sFlt-1
	TIMPs
	TSP1/2
	Tumstatina (Fgto: Colágeno IV)
	Troponina I
	Vasostatina (Fgto. Calreticulina)
	VEGI

Tabla 1. Resumen de inductores e inhibidores de la angiogénesis. Fgto : fragmento

vasculatura se produce por un balance constante entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos (Tabla 1) (Liekens et al., 2001; Makrilia et al., 2009; Nyberg et al., 2005; Ribatti, 2009; Yoo and Kwon, 2013). Además del cáncer, algunas patologías como la diabetes, la artritis reumatoide o enfermedades cardiovasculares muestran alteraciones en el desarrollo vascular y en el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos (Hillen and Griffioen, 2007). Sólo cuando se necesita se activa el proceso de formación de nuevos vasos el cual ocurre de manera secuencial y ordenada. A continuación pasamos a describir brevemente los pasos que se dan en el proceso de angiogénesis.

### 1. Activación de las células endoteliales

Ante diversas situaciones tanto fisiológicas como patológicas (como por ejemplo la hipoxia o una herida) se produce la liberación de factores pro-angiogénicos por parte de las células del parénquima (**Figura 5A**). De entre todos estos factores de crecimiento hay que destacar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), del cual hablaremos más en detalle en el capítulo siguiente, por su alta capacidad de inducir la angiogénesis. Una vez secretados los factores de crecimiento y unidos a sus respectivos receptores, se produce una cascada de señalización que inducirá el cambio de polaridad en la célula endotelial, de basal a apical. Simultáneamente, la unión de Ang-2 al receptor Tie2 desestabiliza las células endoteliales y favorece la pérdida de adhesión a las células endoteliales adyacentes y a los pericitos (PCs) mediante la degradación de cadherinas, muy especialmente VE-cadherina (Augustin et al., 2009). Al mismo tiempo, y para evitar la completa desestructuración del vaso, la célula activada secretará a las células vecinas moléculas que induzcan la quiescencia. Una vez hecho ésto y para poder desplazarse, la célula endotelial necesita degradar la membrana basal que rodea a los vasos por lo que iniciará la secreción de proteasas de la matriz extracelular (Herbert and Stainier, 2011). De entre todas las células endoteliales que reciban estos estímulos sólo una pequeña proporción comenzarán la formación de nuevos vasos. La selección de las células que van a liderar el proceso de angiogénesis, conocidas como “*tip cells*” (TCs, células de la punta) y “*stalk cells*” (SCs, células de rama), está regulada principalmente por la ruta DLL4-Notch (Adams and Alitalo, 2007).



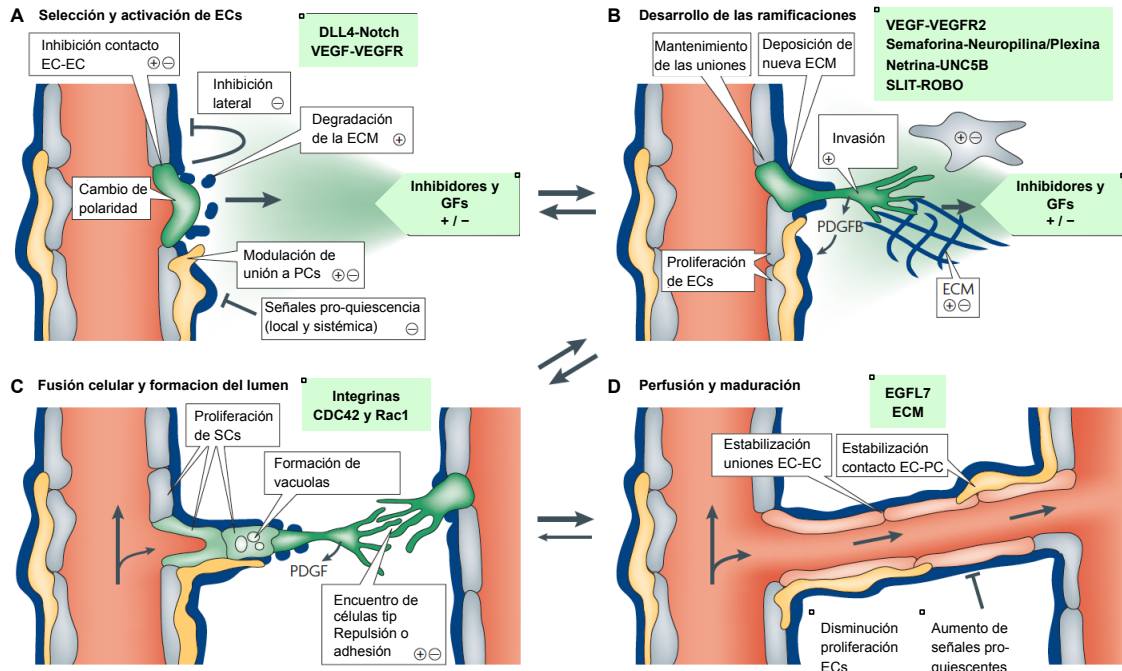
## 2. Desarrollo de las ramificaciones

Una vez activadas y terminada la degradación de la membrana basal, las TCs emiten filopodios y protrusiones del citoplasma para iniciar la migración e invadir los tejidos adyacentes guiadas por un gradiente de VEGF (**Figura 5B**). Las TCs son principalmente invasivas y no proliferan. La invasión está dirigida por muchas moléculas entre las que encontramos las neuropilinas (NRP1 y NRP2) que se unen a semaforinas y VEGFA165 además de efrinas y sus receptores. Todos ellos producen repulsión o atracción de la célula endotelial modulando su desplazamiento. Además, durante la invasión las TCs secretan PDGF- $\beta$  que promueve el reclutamiento de pericitos (Adams and Alitalo, 2007; Herbert and Stainier, 2011). Es en este momento donde las SCs mantienen un perfil proliferativo y poco invasivo, generando uniones fuertes con otras SCs y depositando nuevos componentes de la membrana basal para asegurar la integridad del vaso en formación y siendo ellas las células que finalmente formarán la luz del vaso (**Figura 5C**). Tras el desplazamiento de las TCs se produce la migración de las SCs. Es importante mencionar que en este proceso tiene lugar una transición constante de fenotipo SCs a TCs entre las células endoteliales de manera constante, ya que el ser SCs o TCs es transitorio y no un destino celular definitivo. Cualquier célula endotelial puede funcionar como SCs o como TCs (Phng and Gerhardt, 2009; Potente et al., 2011).

Durante la elongación se necesita establecer una luz del vaso por donde circulará la sangre. En la formación del lumen participarán de manera coordinada multitud de moléculas como las GTPasas pequeñas CDC42 y Rac1, receptores de la membrana celular, moléculas de adhesión célula-matriz y célula-célula. El lumen se produce principalmente por vacuolación: se forman vacuolas que después de la exocitosis conectan el lumen de unas células con otras (**Figura 5C**). No obstante también se ha observado que algunas células se aplanan contra la matriz y repliegan el citoplasma dejando un hueco en el centro que se convertirá en el lumen. Este último mecanismo es dependiente de MMPs (Adams and Alitalo, 2007; Iruela-Arispe and Davis, 2009).

### 3. Unión de las ramas y formación del lumen

Para formar nuevas conexiones las TCs suprimirán su capacidad de movimiento cuando encuentren otras TCs u otras ramas vasculares. Al encontrar un punto de anclaje deberán formar uniones fuertes célula-célula mediante la inducción de proteínas de membrana que habían sido degradadas previamente, fundamentalmente VE-cadherina, Claudina-5 y VCAM (**Figura 5D**). La fusión de dos ramas vasculares a



**Figura 5. Representación esquemática del proceso de angiogenesis** (Modificado de Adams and Alitalo, 2007).

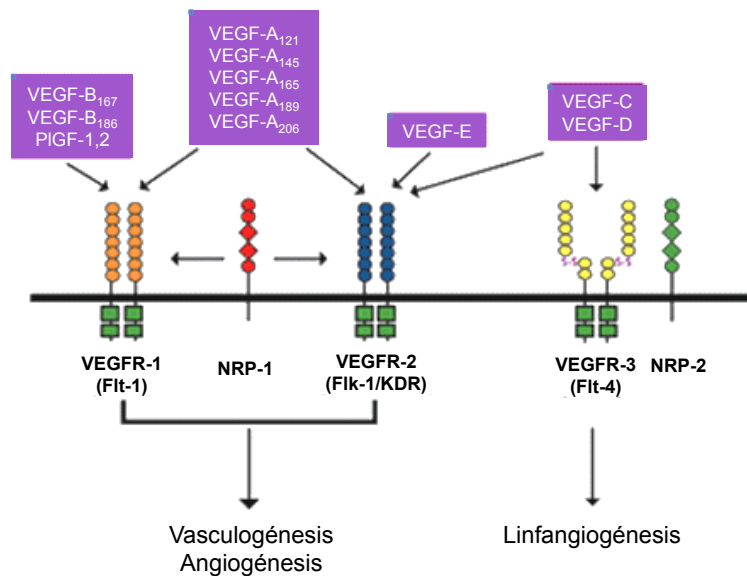
través de sus TCs se conoce como anastomosis y es dependiente de EGFL7. Una vez se ha formado el lumen y se produce el paso de la sangre cargada de oxígeno se inhiben la mayoría de factores pro-angiogénicos ya que muchos de ellos se inducen por hipoxia. Ésto junto con la sobreexpresión en este momento de Ang-1 da lugar al reclutamiento de células murales, PCs y células del músculo liso ( SMCs, *smooth-muscle cells*) así como a una deposición de nueva ECM produciendo todo ello la entrada en quiescencia de manera paulatina de las células endoteliales y marcando así el final del proceso (Adams and Alitalo, 2007).

## PRINCIPALES FACTORES ANGIOGÉNICOS

### Vascular Endothelial Growth Factor

El factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) es una molécula señalizadora secretada por las células que induce la vascularización y la angiogénesis. El VEGF es un realidad una familia de seis proteínas entre las que se encuentran VEGF-A (el más común y al que se hace generalmente referencia), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (*placental growth factor*) (**Figura 8**) (Perona, 2006). Se descubrió en 1983 como una proteína que forma homodímeros unidos covalentemente a través de un puente disulfuro y a pesar de no ser el primer factor de crecimiento descubierto entre los que estimulan la angiogénesis sí que es el más estudiado (Senger et al., 1983). El VEGF estimula las células endoteliales para degradar la ECM, migrar y formar estructuras similares a vasos *in vitro* mientras que *in vivo* regula la permeabilidad vascular e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas en células endoteliales (Veikkola and Alitalo, 1999). Se ha descrito que algunas isoformas de VEGF necesitan de proteasas tanto para ser liberados de la ECM como para activarse (Hicklin and Ellis, 2005; Keyt et al., 1996).

En cuanto a los receptores de VEGF se encontraron inicialmente dos en células endoteliales, VEGFR-1 ó Flt-1 y VEGFR-2 o KDR (Flk-1 en ratones), existiendo una forma soluble de VEGFR-1 que se piensa actúa regulando la angiogénesis de manera negativa al secuestrar VEGFs antes de que se unan a sus receptores (Kendall and Thomas, 1993). Además de en células endoteliales se expresan en varios linaje hematopoyéticos (Hicklin and Ellis, 2005). El VEGFR-3 ó Flk-4 está más relacionado con linfangiogénesis aunque no exclusivamente (Paavonen et al., 2000).



**Figura 6. Especificidades de unión de los miembros de la familia de VEGF y sus respectivos receptores y correceptores** (Modificado de Hicklin and Ellis, 2005).

Los miembros de esta familia tienen afinidades de unión distintas por los receptores (**Figura 6**). Todas las isoformas de VEGF-A se unen a VEGFR-1 y a VEGFR-2 mientras que PlGF y VEGF-B sólo se unen a VEGFR1. VEGF-E solamente se une a VEGFR-2 mientras que VEGF-C y VEGF-D interaccionan tanto con VEGFR-2 como con VEGFR-3. VEGFR-2 se expresa en casi todos los tipos de célula endotelial mientras que VEGFR-1 y VEGFR-3 se expresan de manera selectiva en células endoteliales de distintos nichos (**Figura 6**).

Por último, existen dos correceptores de los VEGFRs: neuropilina 1 y 2 (NRP-1 y NRP-2). La principal diferencia entre las neuropilinas y los VEGFRs es que las primeras carecen de un dominio intracelular que le sirva como transmisor de señal, de ahí que se les considere correceptores. Las especificidades de unión de las NRPs a los miembros de la familia VEGF también es alta y concreta, funcionando cada uno de ellos con un tipo de VEGFs y no con otros, tal y como se describe en la **Figura 6**.

Todos estos receptores participan de forma coordinada en la activación de las células endoteliales para formar nuevos vasos, regulando la permeabilidad endotelial, la proliferación, invasión, migración y supervivencia de las células endoteliales. Por último, también se ha descrito ampliamente su papel en el reclutamiento de EPCs. La

regulación de la familia de VEGF se da principalmente por hipoxia y por citoquinas generalmente segregadas ante la falta de oxígeno (Hicklin and Ellis, 2005).

Se ha demostrado ampliamente que existe una relación directa y clara entre la expresión de VEGF y su actividad el desarrollo de la vasculatura tumoral por lo que nadie duda que VEGF es un componente clave a la hora de abordar clínicamente la angiogénesis tumoral (Dvorak, 2002). Se han desarrollado varios anticuerpos contra VEGF en ensayos preclínicos, siendo sólo utilizado en clínica el Bevacizumab (Goel et al., 2011). El Bevacizumab se usa junto con agentes quimioterapéuticos y ha demostrado mejorar la supervivencia libre de enfermedad y la tasa de respuesta en pacientes. No obstante, la aparición de resistencia así como adversos efectos secundarios entre los que se encuentran la hipertensión, hemorragias, proteinuria, toxicidad cardíaca y dificultades relacionadas con la curación de heridas hacen que el tratamiento se use con cierta reticencia. Otros inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de los receptores de VEGF en este caso, están siendo estudiados. Sunitinib, Sorafenib y Pazopanib inhiben la angiogénesis mediante el bloqueo de los receptores. Sunitinib además es capaz de reducir el tamaño del tumor (Sherbet, 2011).

### Factor de crecimiento de fibroblastos

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblasts growth factor*) es en realidad una familia de proteínas (22 miembros en humanos) relacionados estructuralmente entre sí aunque con distintas funciones entre las que podemos encontrar curación de heridas, desarrollo y angiogénesis. (Ornitz and Itoh, 2001).

De entre todos ellos destacan FGF-1 (aFGF, *acidic FGF*) y FGF-2 (bFGF, *basic FGF*) por ser los más estudiados en cuanto a su papel en la angiogénesis y en el desarrollo tumoral. Tanto FGF-1 como FGF-2 estimulan la proliferación y migración de células endoteliales inhibiendo la apoptosis mediante la unión a FGFR1 y el desencadenamiento de diferentes rutas de señalización (Presta et al., 2005). Es importante también el papel que desarrollan los FGF en relación a la ECM ya que ambos FGF se unen a los proteoglicanos de la ECM a través de una proteína llamada FGF-BP (*FGF binding protein*) actuando así de manera paracrina sobre otras células (Abuharbeid et al., 2006). Además FGF-1 se une directamente a la integrina  $\alpha_3\beta_3$  cuya expresión es regulada por FGF-2 (Klein et al., 1993). Finalmente ambos FGF-1 y -2

participan en la remodelación de la ECM durante la angiogénesis, tanto al principio en su degradación como al final del proceso con su reposición. Al inicio activarían la secreción de proteasas mientras que al final estimularían la deposición de varios componentes de la ECM por parte de las células endoteliales contribuyendo así a la estabilización de los vasos (Presta et al., 2005).

### Angiopoyetinas

Las angiopoyetinas son una familia de proteínas secretadas que se unen a los receptores tirosin-kinasa TIE (*Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1*) que participan en la estabilidad de los vasos sanguíneos (Eklund and Olsen, 2006). Existen cuatro angiopoyetinas de las que sólo dos se han reconocido como moduladoras de la angiogénesis: Angiopoyetina-1 (Ang-1) y angiopoyetina-2 (Ang-2) (Fagiani and Christofori, 2013).

El papel de las angiopoyetinas en angiogénesis no se ha definido por completo y actualmente se han encontrado datos contradictorios sobre su capacidad de inducir o reprimir la angiogénesis tumoral. La visión general que se tiene con respecto a la función de las angiopoyetinas en cáncer es que lo importante es el balance entre Ang-2 y Ang-1 independientemente de sus niveles de expresión. Ésto se ha visto reflejado en varios trabajos que sostiene que niveles de Ang-2 por encima de los de Ang-1 correlacionan con la angiogénesis tumoral así como con un peor pronóstico en muchos tipos de cáncer (Tait and Jones, 2004). Es importante resaltar que los receptores TIE se encuentran expresados en los fenómenos de mimetismo vasculogénico .

### Factor de crecimiento de hepatocitos

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*) es una de las moléculas que poseen actividad angiogénica. Se encuentra en el grupo de moléculas de unión a heparina junto con VEGF, FGF y TGF- $\beta$ . En concreto, HGF se une a proteoglicanos con residuos heparina sulfato lo que hace que se localicen en la membrana celular facilitando así su presentación a sus respectivos receptores (Sherbet, 2011). El HGF es secretado por fibroblastos y actúa como mitogénico en células epiteliales y endoteliales así como en melanocitos, no afectado a los fibroblastos. Se secreta como forma inactiva que necesita de corte proteolítico para pasar a la forma activa (Kataoka et al.).

En cuanto a su función en angiogénesis tumoral, HGF es capaz de desregular la expresión de TSP-1 (Wei et al., 2010) aumentando el fenotipo angiogénico además de trabajar de manera sinérgica con VEGF<sub>165</sub> y NRP-1

Los intentos de inhibir HGF como tratamiento contra el cáncer han sido importantes. Por ejemplo, un anticuerpo contra HGF que impide la unión al receptor aumentó la supervivencia libre de enfermedad de 7 a 40 semanas (Gordon et al., 2010) mientras que el uso de NK4, un dominio de HGF, que se une al receptor pero no es capaz de activar las rutas de señalización, inhibe la proliferación y migración inducidas por VEGF (Nakamura et al., 2010).

## ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Una vez establecido, bien sea un tumor primario o una metástasis, para crecer por encima de los 2 mm<sup>3</sup> necesita crear una red vascular que cubra sus necesidades metabólicas (Folkman and Klagsbrun, 1987; Nicolson, 1984; Talmadge and Fidler, 2010). Para crear esta nueva vasculatura los tumores tienden a desajustar el balance de los factores que regulan la angiogénesis decantando la balanza hacia la producción de factores proangiogénicos, evento que se conoce como “*angiogenic switch*” (Weis and Cheresh, 2011).

Los programas moleculares son comunes entre la angiogénesis fisiológica y a la angiogénesis tumoral. No obstante, en la angiogénesis tumoral se produce una activación casi constitutiva de las rutas de señalización proangiogénicas. Las células tumorales producen VEGF y FGF-2 de manera descontrolada llegando a producir una alta vascularización pero a su vez una vasculatura aberrante. La vasculatura asociada al tumor es tortuosa, tiene una organización caótica, es inestable y tiene zonas en las que se producen escapes del flujo sanguíneo por la baja adhesión entre las células endoteliales que lo componen (De Bock et al., 2011a; McDonald and Baluk, 2002; Weis and Cheresh, 2005). Además, de manera muy significativa se ha encontrado que la vasculatura tumoral expresa proteínas con dominios transmembrana en mucha mayor cantidad que la vasculatura tisular (Ruoslahti, 2002). La membrana basal de la vasculatura tumoral tiene una composición anormal y suele estar irregularmente distribuida. Además la cobertura de estos vasos es menor debido a un descenso generalizado del número de pericitos y de células murales. Todo ello conlleva una pobre distribución de nutrientes y oxígeno lo que mantiene de manera constante la situación inicial hipoxia y falta de nutrientes, originando un círculo vicioso. Ambas darán además lugar a una acidificación del entorno tumoral lo que conlleva a una selección positiva de las células tumorales convirtiendo al tumor en más resistente frente a agentes terapéuticos (Potente et al., 2011).

La vasculatura aberrante y altamente hemorrágica conlleva asimismo dos implicaciones terapéuticas importantes: la primera es que al ser hemorrágica la distribución de los agentes terapéuticos no será completa o, al menos, será más complicada. La segunda es que este tipo de vasculatura facilita la intravasación de células tumorales y su posterior dispersión a zonas metastáticas. Es por ésto que actualmente también ha adquirido un



gran protagonismo, en cuanto a terapia anticancerígena, el cómo normalizar y estabilizar la vasculatura tumoral en vez de inhibir su formación. Algunos estudios han demostrado que la normalización de la vasculatura es eficiente a la hora de inhibir metástasis, el desarrollo de pólipos en pacientes con poliposis adenomatosa familiar o el desarrollo de tumores en modelos de cáncer espontáneo en ratones (ratones MMTV o RipTag) (Bergers and Benjamin, 2003; Bergers et al., 2000).

A pesar de todo, la angiogénesis tumoral puede no ser suficiente para colmar las necesidades metabólicas del tumor por lo que se pueden activar otros mecanismos de desarrollo vascular (Carmeliet and Jain, 2000), que introducimos a continuación.

## MECANISMOS ALTERNATIVOS DE NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL

El mecanismo de angiogénesis descrito hasta ahora se conoce como angiogénesis por ramificación (del inglés *sprouting angiogenesis*) y es el proceso común de desarrollo de un sistema vascular en los tejidos sanos y también en los tumores (**Figura 7A**). No obstante, junto a este tipo de angiogénesis se han observado otros mecanismos de vascularización, sobre todo en tumores, como son la angiogénesis intusceptiva (del inglés *intussusceptive angiogenesis*), la coopción de vasos, el reclutamiento de células endoteliales progenitoras y el mimetismo vascular (del inglés *vasculogenic mimicry*, VM). Pasaremos a describir brevemente cada uno de ellos.

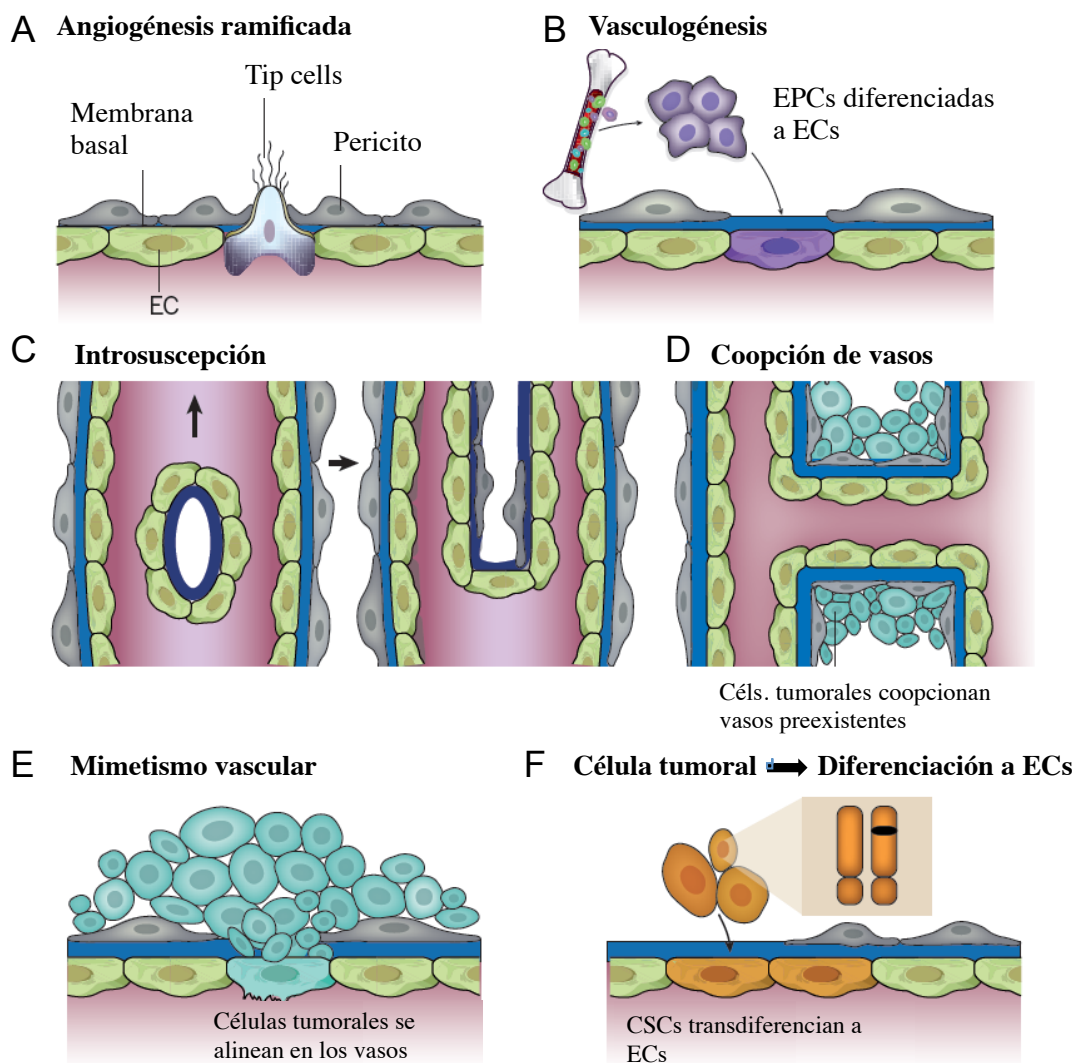
### Reclutamiento de EPCs

Las EPCs (*endothelial progenitor cells*) son una población de células derivadas de la médula ósea con capacidad para diferenciarse a células endoteliales (**Figura 7B**). El reclutamiento de estas células se produce por la secreción de citoquinas y diversos factores de crecimiento generalmente originados ante una situación de isquemia o, en el caso que nos ocupa, la iniciación de un tumor (Asahara and Kawamoto, 2004).

Entre los mecanismos reguladores de estas EPCs, por ejemplo se ha descrito que la salida del nicho puede mediarse por la acción de MMP9, que corta c-kit provocando el abandono de células c-kit positivas de la médula ósea. Esta salida además está promovida por PlGF y VEGF mediante su unión a VEGFR2, altamente expresado por las EPCs. Tras el viaje por el torrente sanguíneo se produce la inserción y la

diferenciación a ECs con la expresión de moléculas propias del endotelio como VE-cadherina y von Willebrand factor, todo ello promovido por VEGF (Hillen and Griffioen, 2007; de la Puente et al., 2013).

Finalmente, algunos trabajos han encontrado que el número de EPCs circulantes es mayor en algunos tipos de tumores como gliomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mieloide, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, linfoma y cáncer de mama (de la Puente et al., 2013). Es por esto por lo que podría considerarse el número de EPCs como un factor pronóstico en la detección de cáncer.



**Figura 7. Mecanismos alternativos de angiogénesis en los tumores.** (Modificado de Carmeliet and Jain, 2011)

## Angiogénesis introsusceptiva

Este fenómeno se observó por primera vez en el proceso de remodelamiento del sistema vascular en los pulmones después del nacimiento ya que durante los dos primeros años de vida de los humanos el volumen de los pulmones se incrementa en más de 20 veces. La angiogénesis introsusceptiva consiste en la formación de dos vasos a partir de la segregación de uno preexistente. La diferencia con respecto a la angiogénesis por ramificación es que aquí se forma una separación del lumen del vaso mediante la formación de un pilar tisular en la luz del vaso (Caduff et al., 1986) (**Figura 7C**).

Se piensa que los posibles mecanismos celulares que desarrollan este tipo de angiogénesis son similares a los que dan lugar a la angiogénesis por ramificación entre los que podríamos encontrar a las angiopoyetinas y sus receptores Tie, al PDGF- $\beta$ , la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 ó CCL2) y las efrinas y sus receptores. Hay que tener en cuenta que al no darse proliferación celular en este fenómeno no podrá ser tratado con agentes antiproliferativos y por tanto se van a necesitar nuevos compuestos que funcionen inhibiendo la migración (Hillen and Griffioen, 2007).

## Coopción de vasos

La coopción de vasos es una habilidad que presentan los tumores de crecer junto a redes vasculares ya desarrolladas sin producir una respuesta angiogénica. Este tipo de crecimiento vascular fue descrito por primera vez cuando se buscaban moléculas iniciadoras de la angiogénesis en las etapas iniciales de formación del tumor (**Figura 7D**). De hecho encontraron que Ang-2 contribuía en este tipo de desarrollo expresándose en altos niveles mientras que VEGF permanecía en niveles bajos y no se induciría hasta un estadio posterior (Holash, 1999).

Se ha observado que frente a este tipo de crecimiento se produce una respuesta del hospedador, que se cree es de defensa, por la que se produce una regresión de este tipo de vasculatura. Al privar al tumor de nutrientes el núcleo se necrosa y es entonces cuando las células de la periferia del tumor secretan VEGF y otras señales proangiogénicas iniciando la angiogénesis por ramificación, previamente descrita (Hillen and Griffioen, 2007).

## Mimetismo vascular

El término de *vasculogenic mimicry* (mimetismo vascular) se utilizó por primera vez para describir la capacidad que tienen las células agresivas de adquirir características típicas

de células endoteliales y formar estructuras similares a la vasculatura (**Figura 7E**). Este fenómeno se observó tanto en cultivos celulares como en tumores (Maniotis et al., 1999). Esta capacidad de plasticidad tumoral se atribuyó inicialmente sólo a células de melanoma. Sin embargo, a día de hoy se ha descrito también para otros tipos de células tumorales entre las que encontramos las de carcinomas de mama, ovario, pulmón, próstata, vejiga, riñón, en sarcomas, en glioblastomas y en astrocitomas (Paulis et al., 2010). Algunas publicaciones recientes distinguen entre mimetismo vascular y transdiferenciación endotelial. En ésta última las células tumorales, más concretamente una subpoblación de CSCs (*cancer stem cells*), son capaces de transdiferenciarse dando lugar a células endoteliales o similares a endoteliales (*endotelial-like*) que pasan a formar parte de los vasos (Carmeliet and Jain, 2011) (**Figura 7F**). Fueron especialmente importantes dos trabajos publicados en Nature al unísono donde se demostraba el origen tumoral de las células de la vasculatura en glioblastomas (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). En un tercer artículo en el año 2012 se reveló que las células madre del glioblastoma (GSCs, *glioblastoma stem cells*) inducían el mimetismo vasculogénico a través de la activación de VEGFR2 (Francescone et al., 2012).

Cuando descubrieron estas estructuras similares a endoteliales se observó que eran capaces de conducir flujo sanguíneo y además formaban estructuras circulares ricas en componentes de la ECM, como lamininas o colágenos, y que eran detectables ante la tinción con PAS (*Periodic acid-Schiff*), la cual tiñe proteoglicanos y estructuras ricas en polisacáridos. Utilizando técnicas de microdissección láser demostraron que estas células de melanoma expresaban una serie de marcadores propios de células endoteliales como son Laminina C2, TIE1, VE-cadherina, Eph2, Neuropilina 1, MMP1, MMP2, MMP14 entre otros (Seftor et al., 2012).

Con respecto al microambiente tumoral, además de la sobreexpresión de las ya mencionadas proteasas se encontró que al menos MMP2, MMP14 y la cadena  $\gamma$ 2 de la Laminina 5 colocalizaban con estas estructuras en matrices de colágeno (Seftor et al., 2012). Recientemente se ha descrito que otras proteasas como ADAMTS1 también juega un papel importante en el proceso de transdiferenciación (Casal et al., 2010). Algunos trabajos además resaltan la importancia de la hipoxia en este proceso ya que puede desencadenar rutas de señalización que apoyan el mecanismo de mimetismo vascular. De hecho, el tratamiento de los tumores con agentes antiangiogénicos que

disminuyen la perfusión y aumentan la hipoxia intratumoral incrementan la tasa de metástasis y el fenómeno de mimetismo vascular (De Bock et al., 2011b; Ebos et al., 2009; Yuan et al., 2012).

Una implicación clínica importante es que se ha documentado que pacientes que presentan fenómenos de mimetismo vascular muestran un peor pronóstico comparados con aquellos pacientes que no lo presentan (Hendrix et al., 2003).

El uso de terapias antiangiogénicas, principalmente basadas en inhibidores de VEGF, se mostraron eficaces a la hora de inhibir la angiogénesis tumoral y de aumentar la tasa de supervivencia en pacientes. No obstante, los tumores desarrollan resistencia a este tipo de terapia con el tiempo y secretan factores de crecimiento alternativos como PlGF, FGF-2 ó PDGF, que pudieran ser responsables de activar algunos de los mecanismos que acabamos de describir (Al-husein et al., 2012; Kerbel, 2008). Las limitaciones mostradas por las terapias antiangiogénicas y la aparición de estos nuevos fenómenos refuerzan la necesidad de estudiar la formación de la vasculatura tumoral y el papel que juegan estos nuevos mecanismos.

### 3. MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) es el conjunto de todos los elementos no celulares que están presentes en un tejido. Fundamentalmente se compone de agua, proteínas y polisacáridos. Entre las proteínas que la forman destacan el colágeno I, la elastina, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos, principalmente los heparán sulfato. No obstante, la estructura de la ECM variará de unos tejidos a otros confiriéndoles sus propiedades físicas y bioquímicas características (Frantz et al., 2010).

Debido a su diversa naturaleza y composición la ECM cumple varias funciones tanto estructurales como biológicas: da soporte físico y estructural a las células y los tejidos, regula la comunicación intercelular y la homeostasis además de servir como reservorio de diversos factores de crecimiento. La ECM es una estructura muy dinámica y en constante remodelación ya que la correcta disposición de sus componentes es lo que asegura un correcto funcionamiento de los tejidos. El remodelamiento de la ECM se lleva a cabo por un extenso grupo de proteínas entre las que destacan las llamadas metaloproteasas de la matriz. Estas incluyen las MMPs, las ADAMs y las ADAMTSs. Estas proteínas, además de remodelar el entorno extracelular, actúan liberando factores de crecimiento anclados a la ECM que son indispensables para las distintas funciones celulares (Daley et al., 2008).

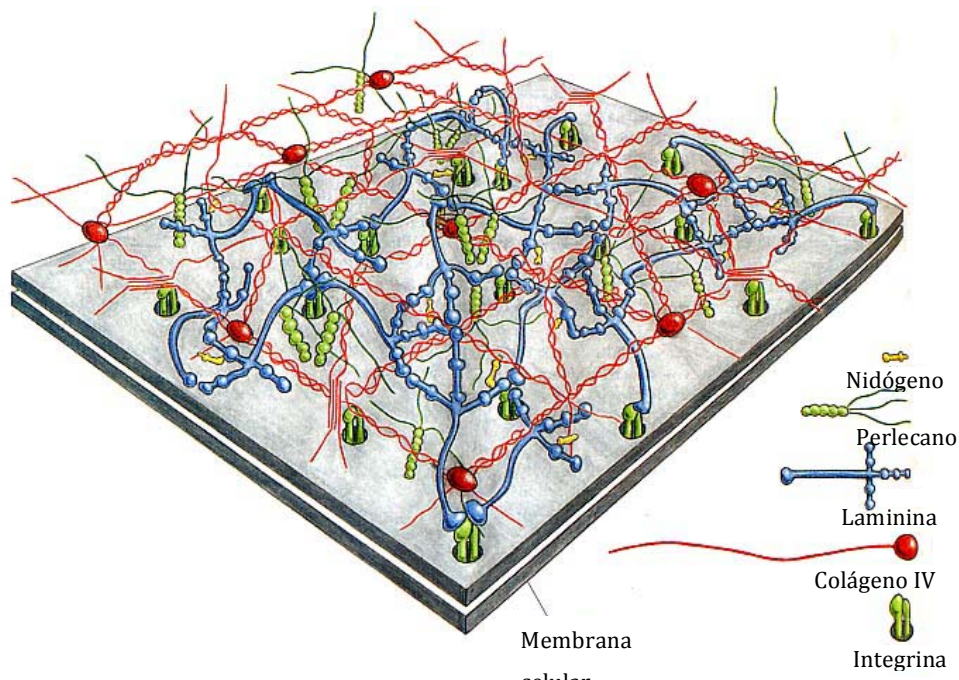
Aunque se desconocen múltiples detalles sobre los mecanismos de ensamblaje de la matriz sí que se sabe que existe una jerarquía en el proceso. Cuando la organización de la ECM se ve alterada puede facilitarse el desarrollo de enfermedades como el cáncer ya que se desregula el comportamiento de las células del estroma las cuales apoyan los procesos de angiogénesis, inflamación e invasión asociados al desarrollo tumoral ya descritos anteriormente (Lu et al., 2012). Es por ello importante conocer los mecanismos por los que se organiza la matriz extracelular además de su composición pudiendo así investigar posibles aplicaciones terapéuticas contra el establecimiento y desarrollo de las neoplasias.

#### MEMBRANA BASAL

La membrana basal (*basement membrane*, *BM*) es un tipo especializado de matriz extracelular que se encuentra alrededor de monocapas de células, especialmente de

epitelio y endotelio. La membrana basal separa las capas de células del tejido conectivo circundante sirviendo de apoyo estructural y pudiendo modificar el comportamiento celular al servir también como transductor de señales que brinda información a la célula sobre su entorno. Al igual que la matriz extracelular en su conjunto, cada tipo de membrana basal tiene una composición específica (LeBleu et al., 2007).

La membrana basal está compuesta principalmente de colágeno IV, laminina, nidógenos y perlecano (**Figura 8**). Existen otros componentes minoritarios como agrina, fibulina, colágenos XV y XVIII, BM40 y BM90 cuyas cantidades son variables y que son los que confieren especificidad y heterogeneidad a la membrana basal. No obstante, la heterogeneidad de la BM se presenta, además de por la cantidad de éstos componentes minoritarios secretados al medio, por la composición de los componentes mayoritarios ya que existen diferentes subtipos. Se pueden formar quince tipos de heterotrímeros de laminina así como seis tipos de colágeno IV que combinados entre sí dan lugar a muchos tipos de BM. Finalmente la regulación génica pero sobre todo las modificaciones postraduccionales, entre las que destacan la proteólisis, acaban por conformar cada una de las BM únicas que se distribuyen en los seres vivos (LeBleu et al., 2007).



**Figura 8. Estructura molecular de la membrana basal en tres dimensiones.** Modificado de (Alberts et al., 2002)

De entre los componentes mayoritarios, colágeno IV y fibronectina conformarían el andamiaje principal de la estructura ya que ambas proteínas se autoensamblan formando superestructuras rígidas que mantienen la integridad de la membrana basal. Posteriormente nidógenos y perlecano servirían de unión entre laminina y colágeno IV incrementando la estabilidad de la estructura (LeBleu et al., 2007). La disposición de la membrana basal se representa en la **Figura 8**.

## PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE LA ANGIOGÉNESIS Y EN CÁNCER

### Matriz extracelular y angiogénesis

La matriz extracelular es esencial en todas las etapas de la angiogénesis. Durante la fase de ramificación la unión de las integrinas a la ECM dictamina a las ECs el camino a seguir en cuanto a proliferación, supervivencia y migración. Particularmente, la adhesión de las ECs a la ECMs es requisito indispensable para la activación de la ruta de las MAP kinasas la cual activa los mecanismos de proliferación, inhibición de la apoptosis y angiogénesis. Es tan importante la adhesión a la ECM que incluso la expresión de las proteínas encargadas de la progresión del ciclo celular está regulada por integrinas que se unen a la ECM. Las ECs también necesitan de la unión a la ECM para promover la migración y el desarrollo de nuevas ramas vasculares ya que los componentes de la matriz extracelular son capaces de promover la migración por si solos independientemente de la presencia de citoquinas (Senger and Davis, 2011).

De manera relevante se ha mostrado que la matriz extracelular es también una fuente de péptidos antiangiogénicos que se producen tras la proteólisis de los componentes de la BM por parte de las metaloproteasas tal y como se muestra en la **Tabla 1**. Esta aparición de péptidos con potencial antiangiogénico modulará el desarrollo vascular (Mettouchi, 2014). Hay que destacar también de manera muy importante la capacidad de la ECM de unir moléculas y actuar así como reservorio. De entre todas las moléculas que se adhieren a la ECM destaca el VEGF cuyo papel se ha descrito con anterioridad. En experimentos con ratones donde carecían del dominio de unión a la ECM se vio una disminución en la irrigación de los órganos y que además los vasos existentes estaban compuestos de un menor número de ramas. En este experimento se comprobó que a



pesar de disponer de la forma soluble de VEGF la falta de un gradiente del mismo retenido en la BM impedía la extensión de las redes vasculares y la correcta orientación de los filopodios que se forman en las ECs durante la invasión en la angiogénesis (Ruhrberg et al., 2002). Por el contrario, los ratones que sólo expresaban la isoforma de unión a la matriz desarrollaban un plexo vascular excesivamente ramificado donde las TCs presentaban numerosos filopodios hacia múltiples direcciones. Todo esto demuestra que no sólo se necesita la secreción de VEGF de manera controlada sino que además su disposición dentro de la ECM por unión a los diferentes sustratos es importante.

La composición de la ECM así como la organización de sus componentes también es relevante. Por ejemplo, se ha comprobado que los distintos tipos de lamininas dirigen de manera distinta la formación de los vasos. Así unas se expresan de manera preferente en los plexos vasculares recién formados mientras que otros tipos de laminina se encuentran principalmente en el frente vascular y de manera importante en las TCs (Stenzel et al., 2011).

## Matriz extracelular y cáncer

La estructura y composición de la ECM tiene un papel determinante en la progresión tumoral ya que la secreción y distribución de componentes anormales en la ECM como respuesta a situaciones de estrés puede ser percibido por las células vecinas como una señal de entrar en proliferación o en otra ruta de señalización. Por ejemplo en ambientes fibróticos, como la cirrosis o la fibrosis renal o pulmonar, el equilibrio entre síntesis y degradación de componentes de la ECM se ve alterado. Un incremento en la producción de fibras de colágeno así como una disposición aberrante puede originar un endurecimiento del microambiente, facilitando la formación y mantenimiento de un nicho donde posteriormente puede producirse una neoplasia (Lu et al., 2012).

En la literatura se ha descrito que algunos tumores tienen una alta tasa de renovación de las fibras de colágeno I que posteriormente se disponen de manera aberrante, lo que se considera característico en cuanto a la composición del estroma tumoral (Tlsty and Coussens, 2006). Además de esto, se ha descrito que la proteólisis del colágeno puede dar lugar a fragmentos antiangiogénicos y proangiogénicos que participan en el desarrollo de la vasculatura tumoral (Mott and Werb, 2004). La hipoxia también

participa en el desarrollo de una ECM aberrante como, por ejemplo, lo descrito con la proteína LOXL2 (*LOX-like protein 2*), que se induce por hipoxia y participa en el entrecruzamiento de las fibras aumentando la rigidez de la ECM (Bignon et al., 2011).

La estructura de la BM también es importante en el desarrollo de cáncer. Se tiene constancia de que la BM de la vasculatura tumoral es más porosa y hemorrágica que la que pertenece a la vasculatura normal. Este hecho facilita la metástasis y la infiltración de las células inmunes fomentando la progresión tumoral (Lu et al., 2012).

## 4. PROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

El conjunto de proteasas presentes en un organismo se denomina degradoma. El degradoma humano lo componen 585 proteasas codificadas por alrededor del 2% del genoma y organizadas en 5 familias: aspartilproteasas, cisteinproteasas, metaloproteasas, serineproteasas y treoninproteasas. La familia metaloproteasa es la más amplia con 192 miembros seguida de las serinproteasas y las cisteinproteasas con 184 con 161 respectivamente (Rawlings et al., 2012). En ratón se han descubierto 670 proteasas hasta el día de hoy de las cuales el 82% tienen su ortólogo en humanos (Puente et al., 2003). El que exista un número tan grande de proteasas concuerda con la necesidad de especificidad a la hora de producirse la proteólisis además de con una alta diversidad de sustratos que cortar.

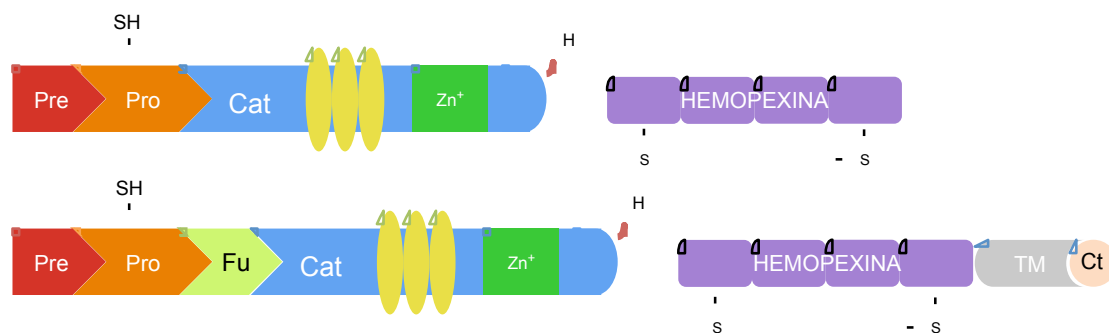
Durante mucho tiempo se tuvo la visión de que las proteasas de la matriz extracelular eran “simples armas de destrucción masiva de la matriz” (McCawley and Matrisian, 2001). No obstante el estudio de sus funciones ha demostrado que participan en una gran variedad de procesos que no sólo implican la degradación sino también la remodelación de la ECM, contribuyendo así durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas o la menstruación pero también en situaciones patológicas como el cáncer, la aterosclerosis o enfermedades pulmonares (Shiomi et al., 2010).

Las proteasas de la matriz extracelular son un conjunto de metaloproteasas que pertenecen a la familia de las metzincinas (dependientes de zinc) entre las que encontramos a las MMPs, las ADAMs y las ADAMTSs. Todas ellas guardan similitud estructural y son capaces de proteolizar componentes de la ECM además de otras proteínas incluyendo receptores, factores de crecimiento y citoquinas decisivos en la configuración del microambiente (Shiomi et al., 2010). Nuestro trabajo se centra en el papel de ADAMTS1 en el contexto tumoral y la angiogénesis pero creemos apropiado hacer una revisión general de las MMPs, ADAMs y ADAMTSs ya que comparten, como hemos dicho, estructura, funciones y afinidad por algunos sustratos.

## MMPs

### Estructura

Las MMPs (*matrix metalloproteinases*) son un grupo de 23 proteínas en humanos. En función de su estructura se clasifican en MMPs secretadas o unidas a la membrana. La estructura principal consiste en tres dominios funcionales comunes a todas las MMPs: el propéptido, que contiene una señal de secreción en algunos casos, el dominio catalítico y el dominio C-terminal similar a hemopexina el cual se une al dominio catalítico a través de una región de unión flexible (Kessenbrock et al., 2010) (**Figura 9**). Las MMPs se secretan como proteínas inactivas (proMMPs) debido a la interacción de una cisteína del prodominio con el sitio catalítico. La eliminación proteolítica del prodominio por convertasas da lugar a la activación de la proteína. En función de la secuencia de la MMPs este corte se produce intracelularmente por parte de furina o extracelularmente por otra MMP o serínproteasas como la plasmina (Kessenbrock et al., 2010). Ante la necesidad de cumplir con diferentes funciones algunas MMPs contienen motivos adicionales y otras carecen del dominio hemopexina (Shiomi et al., 2010).



**Figura 9. Representación esquemática de la estructura de las MMPs.** Pre: péptido señal; Pro: prodominio; Cat: dominio catalítico; TM: dominio transmembrana; Ct: dominio c-terminal.

## Regulación

La regulación de las MMPs se puede dar a distintos niveles. A nivel transcripcional está reguladas por hormonas, factores de crecimientos, citoquinas, uniones célula-célula y uniones célula-matriz. En un segundo nivel su actividad se vería condicionada al corte del prodominio y a su conversión a forma activa y finalmente por la presencia de inhibidores específicos como los TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Teniendo en cuenta que enzimas como furina, plasmina u otras MMPs pueden procesar el corte del prodominio la regulación de estas enzimas afectará también a su actividad (Sternlicht and Werb, 2001). Un mecanismo adicional de activación y desactivación es mediado por ROS (*reactive oxygen species*). Éstos oxidarían la cisteína del prodominio produciéndose así la liberación del sitio catalítico y la activación de la enzima. Posteriormente la enzima mieloperoxidasa inactivaría el sitio catalítico mediante la liberación de ácido hipocloroso (Fu et al., 2003).

## Papel de las MMPs en angiogénesis y cáncer

Dado el elevado número de MMPs, y su expresión en múltiples tipos celulares, se puede concluir que su actividad es prácticamente ubicua en el organismo. Algunos trabajos han descrito también su implicación en la supresión tumoral (López-Otín and Matrisian, 2007).

La liberación de factores de crecimiento junto con moléculas que regulan la angiogénesis tras la proteólisis de la BM es quizá la función más importante de las MMPs en su relación con el cáncer, como se ha expuesto en capítulos anteriores.

Por ejemplo, un estudio demostró que para que se produzca el *angiogenic switch* se necesita de la liberación de VEGF-A de la EMC por parte de MMP9. (Bergers et al., 2000) Otros factores de crecimiento como VEGF-A, FGFs y TGF- $\beta$  también son liberados de la ECM por parte de MMP2 y MMP9 aumentando la progresión tumoral por la inducción de proliferación en las células endoteliales (Shuman Moss et al., 2012).

En cuanto a los proteólisis de moléculas de la BM, encontramos que varias MMPs son capaces de cortar el plasminógeno dando lugar a angiostatina, un factor antiangiogénico. La proteólisis de algunos colágenos por parte de las MMPs también produce péptidos con funciones antiangiogénicas. El primero que se descubrió fue la

endostatina, un fragmento de la proteólisis del colágeno XVIII que actuaba inhibiendo la angiogénesis de manera endógena (O'Reilly et al., 1997). La degradación del colágeno IV puede dar lugar a distintos sustratos antiangiogénicos. Así, de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se producen fragmentos llamados arrestina, canstatina y tumstatina, respectivamente (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008; Lafleur et al., 2004).

Además de cortar proteínas de la ECM se han identificado más de 40 proteínas de superficie que sufren proteólisis por parte de las MMPs. Por ejemplo MMP2 puede cortar el receptor FGFR-1 y el de Efrina B2 junto con MMP9 (López-Otín and Hunter, 2010). Adicionalmente, los estudios con animales KO han aportado información sobre la función de las MMPs y su relación con angiogénesis. Los KO de MMP2, MMP9 y MMP14 presentan patrones de ramificación angiogénica alterados mientras que los KO de MMP2, MMP7, MMP9 y MMP11 presentan una resistencia endógena al desarrollo de tumores (Yoon et al., 2003). En el caso de MMP9 se ha demostrado que esto se debe a la incapacidad de moverse por la ECM de los pericitos (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008).

Por el contrario, y a pesar de todos los ejemplos anteriores, también se han identificado recientemente funciones antitumorígenicas y antiangiogénicas de las MMPs como es el caso de MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP12, MMP19 y MMP26 (López-Otín and Matrisian, 2007).

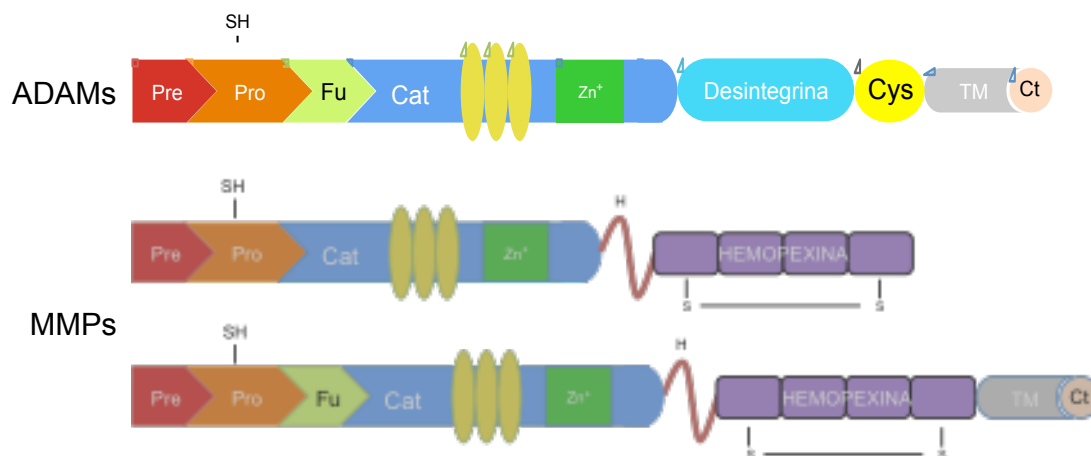
## ADAMS

### Estructura

Las ADAMs (*A disintegrin and metalloproteinase*) son un grupo de proteínas de membrana que pertenecen a la familia de las adamalinas compuesto por 22 miembros en humanos (Klein and Bischoff, 2011). La estructura de las ADAMs es parecida a las de las MMPs y se compone de un péptido señal para la secreción, un prodominio que actúa como chaperona permitiendo el plegamiento de la proteína y que además bloquea el sitio catalítico y un dominio metaloproteínasa (**Figura 10**). Aparte de estos dominios, las ADAMs divergen con respecto a las MMPs en estructura ya que poseen el característico dominio similar a desintegrina, un dominio rico en cisteínas, una región

transmembrana y una cola citoplasmática. Algunas ADAMs presentan además un dominio similar a EGF después del dominio rico en cisteínas (Edwards et al., 2008).

La activación de las ADAMs puede producirse por la acción de furinas aunque también por MMPs como es el caso de ADAM28 que carece de un dominio de reconocimiento de furina (Mochizuki and Okada, 2007).



**Figura 10. Representación esquemática de la estructura de las ADAMs.** Estructura general de las ADAMs y su comparación con la estructura de las MMPs. Pre: péptido señal; Pro: prodominio; Cat: dominio catalítico; Cys: dominio rico en cisteínas; TM: dominio transmembrana; Ct: dominio c-terminal.

## Regulación

La funcionalidad de las ADAMs se muestra limitada por el corte del prodominio al igual que las MMPs, necesitando algunas además de procesamiento autoproteolítico. La hipoxia y algunos factores de crecimiento van a regular la expresión de las ADAMs, algo muy común en el contexto de las proteínas que degradan la ECM (Klein and Bischoff, 2011; Szalad et al., 2009). También se regulan a nivel postraduccional y mediante inhibidores, TIMPs principalmente (Murphy, 2008).

## Papel de las ADAMs en angiogénesis y cáncer

Tal y como venimos describiendo a lo largo de esta introducción, estas proteínas desarrollan papeles tanto en la angiogénesis fisiológica como en cáncer. Se sabe que las ECs expresan ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15 y ADAM-17. Concretamente, la expresión de ADAM-10 Y ADAM-17 es necesaria para el procesamiento de dos proteínas claves en el desarrollo de la angiogénesis, NOTCH y los receptores de angiopoyetinas TIE (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008). Además se encuentran

expresadas en otras células del estroma como PCs, leucocitos y macrófagos (Murphy, 2008).

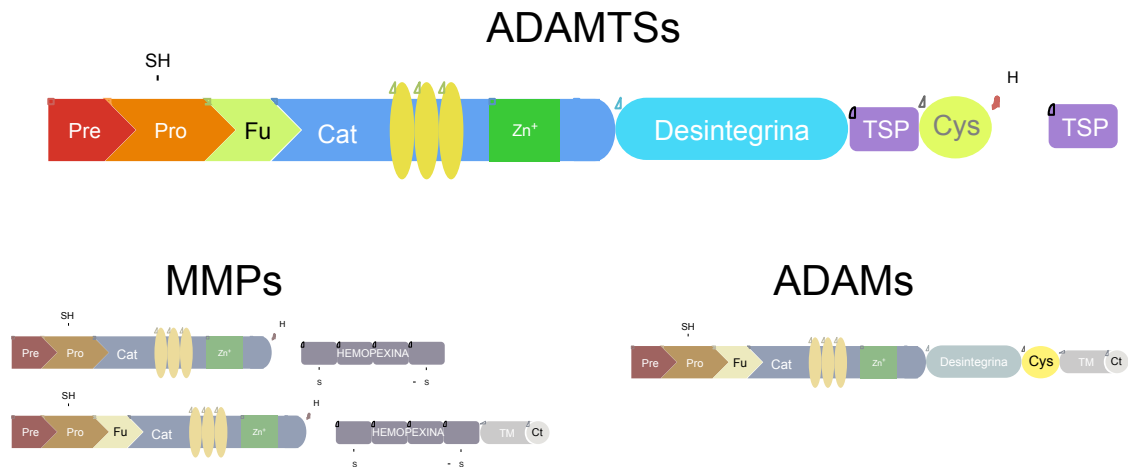
Algunas ADAMs son capaces de cortar receptores de membrana tirosín-kinasa impidiendo la unión de sus ligandos. Por ejemplo, ADAM-17 es capaz de cortar VEGFR2 y MET mientras que ADAM-9, ADAM-10 y ADAM-15 cortan FGFR2 y el receptor de efrinas B2 (EPHB2) (López-Otín and Hunter, 2010).

La expresión de otras ADAMs y su relación con cáncer también ha sido ampliamente documentada. ADAM-13 degrada componentes de la matriz extracelular promoviendo la migración y la metástasis mientras que ADAM-17 libera HGF promoviendo la proliferación de las células endoteliales y la posterior angiogénesis (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008). ADAM-8, ADAM-9, ADAM-12 y ADAM-15 muestran una clara sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de pulmón y participarían en el desarrollo de metástasis. También se ha descrito su participación en cáncer de próstata, hígado, colon, riñón, vejiga y páncreas (Mochizuki and Okada, 2007; Rocks et al., 2008a).

## ADAMTSs

### Estructura

La familia de las ADAMTSs se compone de 19 miembros (Apte, 2009). Las ADAMTSs están estructuralmente relacionadas con las ADAMs y a más distancia con las MMPs. Como éstas, las ADAMTS están formadas por un dominio proteasa y un dominio auxiliar que consta de un dominio desintegrina, un dominio trombospondina central, un dominio rico en cisteínas, una región espaciadora y un número variable de dominios trombospondina en C-terminal (Kumar et al., 2012; Wagstaff et al., 2011) (**Figura 11**). Algunas tienen módulos adicionales en el extremo C-terminal, lo que les proporciona especificidad de unión a sus sustratos y de compartimentalización en los tejidos. Ejemplo de ello son ADAMTS7 y ADAMTS12 que contienen dominios de mucina, ADAMTS20 y ADAMTS9 que contienen dominios GON, ADAMTS13 con dos dominios CUB y ADAMTS2, -3, -10, -12, -14, -17 y -19 que contienen dominios PLCA (Rocks et al., 2008a)



**Figura 11. Representación esquemática de la estructura de las ADAMTSs.** Estructura general de las ADAMTSs y su comparación con las MMPs y las ADAMs. . Pre: péptido señal; Pro: prodominio; Cat: dominio catalítico; Cys: dominio rico en cisteínas; TM: dominio transmembrana; Ct: dominio c-terminal; TSP: dominio trombospondina.

Las ADAMTSs pueden organizarse en subgrupos basándose en su actividad catalítica: procólagenasas (ADAMTS2,3 y 14), degradadoras de proteoglicanos (ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8, ADAMTS9, ADAMTS15 y ADAMTS20), degradadoras de vWF (ADAMTS13) y degradadoras del cartílago oligomérico de la matriz (ADAMTS7 y ADAMTS12). Del resto de ADAMTSs (ADAMTS6 ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18 y ADAMTS19) aún se desconoce su función (Kumar et al., 2012).

### Regulación

Las ADAMTSs se regulan por proteólisis principalmente, al igual que las ADAMs y las MMPs. El corte ocurre en el sitio de reconocimiento similar a furina entre el prodominio y el sitio catalítico. La inhibición por parte de los TIMPs también se da en esta familia de proteínas (Rocks et al., 2008a). La regulación de algunos miembros como ADAMTS1 se ve influenciada por la hipoxia, además de por algunos cofactores (Apte, 2009; Hatipoglu et al., 2009).

### Papel de las ADAMTSs en angiogénesis y cáncer

El papel de las ADAMTS1 en angiogénesis ha sido recientemente recapitulado en una revisión de nuestro propio grupo (Rodríguez-Manzaneque et al., 2015). Casi todas las ADAMTSs son capaces de regular negativamente la angiogénesis. No obstante, a pesar de que las ADAMTSs son capaces de regular la angiogénesis y por tanto el desarrollo



del cáncer no todas lo hacen a través del mismo mecanismo. Algunas de ellas incluso participan en el desarrollo tumoral sin intervenir en la formación de la vasculatura (Kumar et al., 2012).

En relación a la capacidad de promover la angiogénesis los últimos estudios muestran que ADAMTS2, ADAMTS5, ADAMTS8 ADAMTS9 y ADAMTS12 son capaces de inhibir el desarrollo de la vasculatura mientras que ADAMTS1, ADAMTS4 y ADAMTS13 son capaces tanto de inhibir como de promover la angiogénesis en función del contexto y de los dominios que se vean implicados en cada momento. En los casos de ADAMTS1, ADAMTS4 y ADAMTS9 su función es dependiente de su capacidad para proteolizar sustratos mientras que no lo es en el resto de proteasas descritas. Sólo en el caso de ADAMTS9 no se ha descrito la liberación de los dominios trombospondina como parte de su capacidad para inhibir el desarrollo de la vasculatura (Kumar et al., 2012). Un claro ejemplo de cómo funcionan las ADAMTSs es ADAMTS4, además de ADAMTS1 al que dedicaremos el próximo capítulo. Se ha demostrado que los péptidos de TSR liberados de ADAMTS4 son capaces de inhibir la proliferación de células endoteliales además de la proliferación del endotelio inducida por VEGF (Karagiannis and Popel, 2007). Su capacidad de inhibir la angiogénesis se vería complementada por su habilidad de unir y secuestrar VEGF, similar a la de ADAMTS1 (Luque et al., 2003). En cuanto a su capacidad proangiogénica, la forma completa de ADAMTS4 fomenta el desarrollo de la vasculatura mediante su capacidad de proteolizar sustratos ya que un mutante del sitio catalítico no permite este desarrollo (Rao et al., 2013).

Las ADAMTSs participan de manera activa en el desarrollo tumoral, bien sea por su capacidad de modular la angiogénesis o bien por su capacidad de modificar la ECM, funciones ampliamente ligadas entre sí. Se ha descrito que 10 de las 19 ADAMTS muestran valores de expresión alterados en tumores de mama comparados con tejido sano. De hecho la mayoría de ellas muestra una disminución de la expresión. Solamente ADAMTS4, ADAMTS6 y ADAMTS14 estarían sobreexpresadas en estos tumores. No obstante se comprobó que ADAMTS1, ADAMTS8 y ADAMTS15 también se encontraban sobreexpresadas en carcinomas de cabeza y cuello y en líneas celulares derivadas de éstos. En otros estudios encontraron que ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS8, ADAMTS9 y ADAMTS15 se encontraban sobreexpresadas en nódulos

metastáticos mientras que se encontraban desregulados en sus respectivos tumores primarios (Wagstaff et al., 2011).

## 5. ADAMTS1

La proteasa ADAMTS1 (*A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif-1*) fue descrita por primera vez en 1997 por Kuno et al. buscando genes diferencialmente expresados en un modelo de adenocarcinoma de colon que causa caquexia en ratones (Kuno et al., 1997). Fue la primera proteasa descubierta de la que después sería una amplia familia de 19 miembros descritos hasta hoy (Kumar et al., 2012).

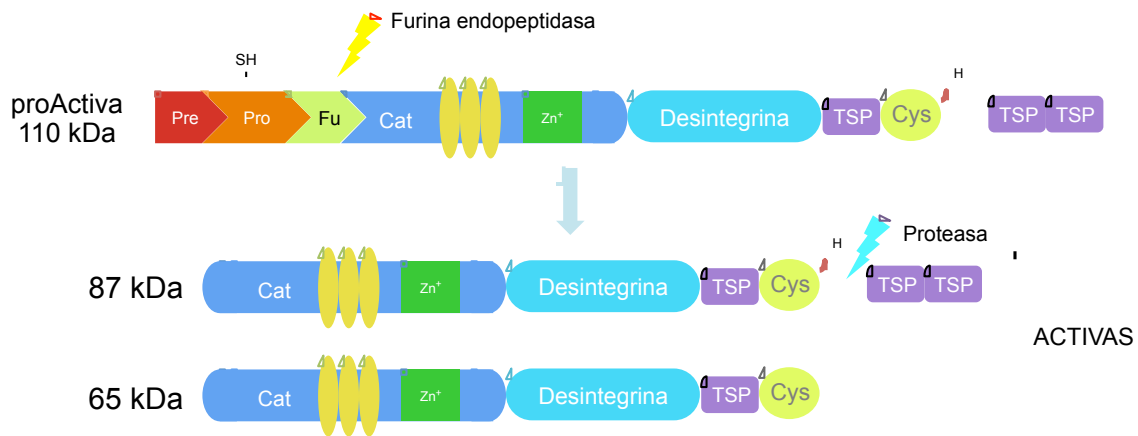
ADAMTS1 fue descrito como un mediador de la inflamación pero desde su identificación hasta hoy se sabe que participa en una amplia variedad de procesos como la formación de los órganos en la etapa embrionaria, en la angiogénesis y en la ovulación además de en situaciones patológicas como el cáncer y la artritis (de Arao Tan et al., 2013).

El gen de ADAMTS1 se encuentra en el cromosoma 21 en humanos y posee un 81,7% de homología con el gen de ratón. La traducción de este gen da lugar a una proteína de 110kDa que guarda similitud de secuencia en un 83,4% con su homólogo de ratón lo que la convierte en adecuada en cuanto a facilidad para extrapolar los resultados obtenidos en ratón a humanos (Vazquez et al., 1999).

### ESTRUCTURA Y REGULACIÓN

ADAMTS1 posee una de las estructuras más sencillas dentro de la familia de las ADAMTSs. En ella se encuentran las regiones comunes descritas en el capítulo anterior para la familia de las proteasas ADAMTSs y tan sólo dos dominios trombospondina en el dominio C-terminal.

La forma completa de la proteína es proteolizada por furina antes de ser secretada dando lugar a la forma activa de 87 kDa (Vazquez et al., 1999). Posteriormente puede volverse a proteolizar por MMP2, MMP8 y MMP15 dentro de la región espaciadora produciendo una forma activa de 65 kDa y liberando dos dominios trombospondina (Rodríguez-Manzaneque et al., 2000) (**Figura 12**). Además puede glicosilarse en cuatro sitios (Kuno and Matsushima, 1998).



**Figura 12. Estructura de la protease ADAMTS1 y sus distintas formas activas.** Modificado de Rodríguez-Manzaneque, 2000.

Recientemente se ha descrito que ADAMTS1 puede autoproteolizarse pudiendo tener este corte efectos prometastáticos o antimetastáticos dependiendo del lugar de proteolisis (Liu et al., 2006).

La expresión génica de Adamts1 se da en todos los tejidos siendo alta en corazón, medula adrenal, placenta, músculo esquelético, glándula tiroides, estómago y en el embrión. Se dan bajos niveles de Adamts1 en el endometrio, en las células vasculares del músculo liso y en algunas células endoteliales (Vazquez et al., 1999). Una gran variedad de moléculas implicadas en inflamación como IL-1, LPS, TNF- $\alpha$  inducen la expresión de ADAMTS1 (Kuno and Matsushima, 1998). La hipoxia también juega un papel importante en la regulación de ADAMTS1. Se ha descrito que los niveles de expresión génica se elevan durante las primeras fases del infarto de miocardio. En concreto se ha encontrado que las células endoteliales y el miocardio expresan altos niveles de ADAMTS1 principalmente en la zona infartada tres horas después de ocurrir el infarto (Nakamura et al., 2004). El estudio del promotor de Adamts1 dio lugar al descubrimiento de tres sitios de unión de HIF (*hipoxia inducible factor*) a los que esta proteína se unía en condiciones de hipoxia (Hatipoglu et al., 2009).

La regulación de la actividad de ADAMTS1 también se da a nivel alostérico ya que su unión a proteínas de la ECM promueve su actividad agreganasa como en el caso de su unión a fibulina-1 y fibronectina donde su capacidad proteolítica se ve aumentada en diez y dos veces respectivamente (Lee et al., 2005)

## **FUNCIONES**

Como proteasa la función central de ADAMTS1 es la de cortar componentes de la matriz extracelular, principalmente proteoglicanos, ambos nidógenos además de semaforina 3C o el inhibidor de proteasas TFPI-2 (Canals et al., 2006; Lind et al., 2006; Rodriguez-Manzaneque et al., 2002; Sandy et al., 2001; Torres-Collado et al., 2006). Actualmente se ha podido relacionar también a ADAMTS1 con la proteólisis de IGFBP2 (Martino-echarri et al., 2014). La proteólisis de todos estos sustratos tiene implicaciones fisiológicas que podrían ocasionar cambios en el desarrollo tumoral.

### **ADAMTS1 en angiogénesis**

Por otro lado, ADAMTS1 presenta una clara actividad regulando la angiogénesis. Se ha observado que presenta dualidad de funciones ya que es capaz tanto de promover como de inhibir la angiogénesis en situaciones fisiológicas y patológicas. ADAMTS1 es capaz de inhibir la angiogénesis de diversas maneras. Una de ellas es mediante su unión a VEGF, lo que impide la activación de su receptor VEGFR2 y el desencadenamiento de rutas de proliferación (Iruela-Arispe et al., 2003; Vazquez et al., 1999). Un segundo mecanismo consiste en liberar dominios TSP-1, antiangiogénicos en si mismos, tras el corte proteolítico de la propia ADAMTS1 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000). Por otra parte, la forma completa de ADAMTS1 puede actuar inhibiendo la angiogénesis. En un estudio en el que usaron modelos de membranas corialantoidea de pollo (CAM, *chicken chorriallantoic membrane*) y retinas de ratón demostraron que la inhibición de la angiogénesis por parte de ADAMTS1 en estos dos modelos animales era mayor que si se añadían TSP-1 ó endostatina de manera exógena (Vázquez et al., 1999). Finalmente, en otro estudio se eliminó la expresión de ADAMTS1 en células endoteliales mediante el uso de siRNAs y se comprobó que ésto aumentaba la proliferación in vitro de las células por lo que ADAMTS1 tendría un papel antiangiogénico dificultando la proliferación celular (Xu et al., 2006).

En cuanto a su capacidad proangiogénica se ha demostrado que ADAMTS1 es necesario para la migración de las células endoteliales en ensayos de matrices de

colágeno y que durante las 3 primeras horas de la formación de esta matriz su expresión génica se ve aumentada de manera considerable (Su et al., 2008).

### ADAMTS1 en cáncer

La capacidad de ADAMTS1 de participar en los procesos neoplásicos está directamente relacionada con su habilidad de regular el desarrollo angiogénico. Es por lo que, al igual que en la angiogénesis fisiológica, ADAMTS1 muestra un papel dual a la hora de influenciar el desarrollo tumoral.

Hay que resaltar como primer aspecto que ADAMTS1 presenta una expresión menor en la mayoría de los tumores cuando se compara con el tejido sano adyacente. (de Arao Tan et al., 2013). Con respecto a la expresión de ADAMTS1 se ha encontrado una expresión elevada en líneas celulares de uso cotidiano en la investigación del cáncer como por ejemplo HeLa y la línea de melanoma G361 (Vazquez et al., 1999). Adicionalmente, estudios en cáncer de páncreas, de NSCLC y de colón encontraron que se producía un silenciamiento del gen *Adamts1* en todos ellos por una hipermetilación del promotor. En el caso de los tumores de páncreas y de NSCLCs vieron que un 75 y un 30% de las biopsias presentaban hipermetilación frente a un 5 y 7% respectivamente en las muestras sanas (de Arao Tan et al., 2013). En este caso los autores sugieren que conocer el estado de metilación del gen *Adamts1* podría servir como biomarcador para predecir el desarrollo tumoral.

El papel antiangiogénico y antitumoral se ve plasmado en trabajos como el de Obika et al, en el que se muestra que ADAMTS1 retrasa el desarrollo tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis, siendo ésta dependiente de la actividad catalítica de ADAMTS1 (Obika et al., 2012). Guardan relación con estos resultados los descubrimientos por parte de Kuno et al. donde observaron que tanto la forma completa de la proteína como las regiones próximas al extremo C-terminal, las que contienen los dominios TSR, eran capaces de inhibir la metástasis (Kuno et al., 2004).

En el trabajo de Liu et al, sin embargo, exponen que la forma completa de ADAMTS1 aumenta los nódulos metastáticos mientras que los fragmentos en las regiones en el dominio C-terminal resultantes de la autocatálisis de ADAMTS1 son capaces de reducir el número de metástasis que se presentan en dos modelos de carcinoma de mama y de

pulmón (Liu et al., 2006). En este estudio se confirma también que la actividad catalítica de ADAMTS1 es importante a la hora del desarrollo tumoral.

De manera análoga, en el trabajo de Reynolds et al., 2010 descubrieron que en el modelo de ratón Tc1 de síndrome de Down aparecían tumores de menor tamaño y que esto era debido a una menor vascularización. Hay que mencionar que los ratones Tc1 al igual que los pacientes de síndrome de Down portan una copia extra de un cromosoma en el que casualmente se encuentra el gen *Adamts1*. Por tanto, estos ratones son considerados en este trabajo como sobreexpresores de ADAMTS1 (Reynolds et al., 2010).

#### *Papel protumorigénico y prometastático de ADAMTS1*

En contraposición, algunos trabajos demuestran que ADAMTS1 tiene un papel protumorigénico y prometastático. En el estudio de Ricciardelli et al. obtuvieron un ratón transgénico que desarrolla tumores de mama espontáneos (MMTV-PyMT) que a su vez era deficiente en ADAMTS1 al cruzar un ratón KO de ADAMTS1 y el ya mencionado ratón MMTV. Pudieron observar que los ratones KO desarrollaban tumores de menor tamaño que los correspondientes WT y que además la tasa de metástasis era también menor en los animales KO.

En otro trabajo se comprobó que la sobreexpresión de ADAMTS1 en la línea tumoral epitelial BZR producía un aumento del tamaño de los xenógrafos junto con un aumento de la proliferación celular. Los autores pudieron demostrar que este efecto estaba asociado a una reacción estromal que conllevaba una mayor infiltración de miofibroblastos y una mayor deposición de componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, no observaron la misma reacción cuando se sobreexpresó un mutante de ADAMTS1 con el sitio catalítico inactivado (Rocks et al., 2008b). En este caso además se pone de manifiesto una comunicación entre las células tumorales y estromales de manera bidireccional en la que participa ADAMTS1. En un caso similar de comunicación estroma-tumor, las células tumorales indujeron la secreción de ADAMTS1 por parte de fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *cancer associated fibroblasts*) en un modelo *in vitro* consiguiendo aumentar la invasividad de las células tumorales (Tyan et al., 2012)..

También se ha descrito que ADAMTS1 posee un papel prometastático. Un claro ejemplo se obtuvo al inhibir ADAMTS1 en las células de mama MDA-MD-231, altamente metastáticas, las cuales presentaban una inducción de 18 veces en la expresión génica de ADAMTS1 con respecto a las células poco metastáticas. En este caso consiguieron revertir el progreso de la enfermedad tras la inhibición así como reducir el tamaño del tumor secundario (Lu et al., 2009). Se ha documentado también que el desarrollo de los tumores va apareado con un incremento en los niveles de ADAMTS1, siendo su expresión mayor en los nódulos metastáticos que en los tumores primarios. En concreto, en el trabajo de Casimiro et al. estudian este fenómeno en cáncer de mama con metástasis a hueso (Casimiro et al., 2012).

Por último, se ha demostrado una relación directa de ADAMTS1 y el fenómeno de mimetismo vascular. En el trabajo de (Casal et al., 2010) se muestra un incremento en el desarrollo tumoral en xenógrafos que sobreexpresan ADAMTS1 en la línea celular HT-1080. Sin embargo, este incremento de la masa tumoral es independiente de angiogénesis. Sorprendentemente encontraron que la sobreexpresión de ADAMTS1 promovía el desarrollo de una red pseudovascular y que la capacidad de formar redes pseudovasculares *in vitro* es dependiente de ADAMTS1.

Toda esta información en su conjunto nos describe una imagen de ADAMTS1 en la que encontramos una proteína con funciones duales o ambiguas en cuanto a su capacidad de inducir la angiogénesis y participar en el desarrollo tumoral y la metástasis tal y como se muestra en los estudios mencionados. Esta ambigüedad se ve influenciada por los sustratos presentes en la ECM, las características específicas del tumor y la interacción de las células del estroma y las células tumorales ya que ADAMTS1 puede tanto inducir como ser inducido por componentes del estroma. Por todo ello, se hace necesario discernir entre las distintas discordancias que muestra ADAMTS1 en los distintos contextos a la hora de participar en el desarrollo tumoral.

No obstante, la ya mencionada dualidad junto con el hecho de que sea una proteasa extracelular no hacen sino dificultar el estudio de esta proteína ya que los modelos celulares bidimensionales, de uso común en biología celular, no acaban de ser apropiados para representar fielmente el estado de ADAMTS1 en un contexto fisiológico o patológico. Además del uso de cultivos celulares tridimensionales, con toda su complejidad añadida para desarrollarlos, es significativo introducir en las

investigaciones sobre ADAMTS1 al ratón ADAMTS1 KO, en un intento de recapitular todas las características que influyen en el desarrollo tumoral y que venimos mencionando a lo largo de toda esta introducción: ADAMTS1, matriz extracelular, vasculatura y microambiente tumoral.



## 6. MODELOS DE ESTUDIO

### RATÓN KO ADAMTS1

Para el desarrollo de nuestros estudios hemos hecho uso del ratón knock-out (KO) de ADAMTS1. Actualmente existen diversos modelos de ratón ADAMTS1 KO (Lee et al., 2005; Mittaz et al., 2004; Shindo et al., 2000). En el modelo de Lee et al. (ADAMTS1<sup>tm1Mila</sup>, MGI:3609982) los ratones portan una construcción que altera la estructura del gen *Adamts1* eliminando los exones del 2 al 8 de un total de 9. Este ratón se produjo por recombinación homóloga de un plásmido que contiene un cassette PGK en lugar de los exones eliminados. En el modelo de Shindo et al. (ADAMTS1<sup>tm1Hku</sup>, MGI:2156168) sustituyeron los exones 3 y 4 de *Adamts1*, que codifican el dominio metaloproteinasas, por un cassette de PGK y en Mittaz (ADAMTS1<sup>tm1Mapr</sup>, MGI:3574351) et al. eliminaron el exón 2 dando lugar a una proteína truncada que sólo codifica el dominio del péptido señal y el propeptido, el extremo N-terminal, de ADAMTS1.

Todos ellos están se han derivado de ratones C57BL/6 y sólo el modelo descrito en Lee et al. mantiene además una línea en BALB/c. A diferencia de otras proteasas, incluso dentro del grupo de las ADAMTSs, la inactivación genética de ADAMTS produce un gran número de alteraciones fenotípicas en los ratones destacando la letalidad embrionaria en alrededor del 40% de los animales KO. De entre todos los ratones desarrollados es en Shindo et al. donde se hace una mayor caracterización de las alteraciones en la anatomía de estos ratones. Cabe destacar de entre todas ellas la disminución en el tamaño corporal, la disminución de la cantidad de tejido adiposo (pudiendo estar directamente asociada a la anterior), malformación del riñón, del ovario tanto en hembras heterocigotas como en KO, así como esterilidad en estas últimas. En cuanto a la reproducción también se ve afectado el tamaño de las camadas debido a dificultad en la implantación de los embriones. Todas las deficiencias que observaron los autores se resumen en la **Tabla 2**.

Los ratones ADAMTS1 KO se han utilizado poco en investigación y hasta hoy solamente se contabilizan dos trabajos que guarden relación con angiogénesis y cáncer.

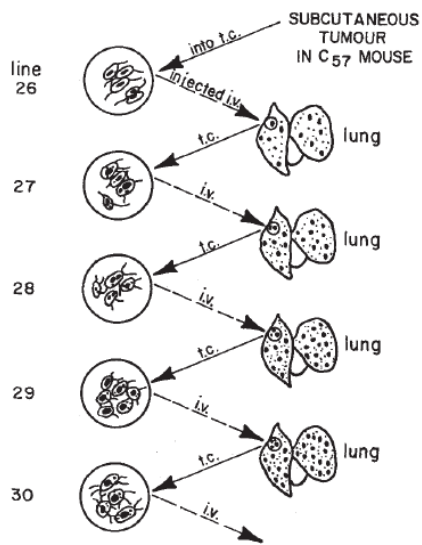
En el primero de ellos, publicado en 2006, se describió que ADAMTS1 es capaz de cortar TSP1 y 2 durante un ensayo de curación de herida. En los ratones KO esta herida presentaba niveles más bajos de TSP1 y 2 proteolizado así como una mayor densidad vascular. Por último observaron que mientras que en los animales WT la herida estaba completamente cerrada, en los animales KO aún permanecía abierta. En este estudio pudieron concluir que ADAMTS1 tenía un papel antiangiogénico (Lee et al., 2006).

En el segundo de ellos el grupo de Darryl Russell (Universidad de Adelaida, Australia) mostraba el efecto de ADAMTS1 en el desarrollo de tumores de mama en ratones MMTV-PyMT, previamente cruzados con una cepa de ADAMTS KO, donde los tumores aparecen de manera espontánea. Los ratones MMTV-PyMT producen antígenos T del virus del poliovirus (*Polyoma virus Middle T antigen*) bajo el control del promotor del virus tumoral mamario de ratón (*Mouse Mammary Tumor Virus*). La expresión de este antígeno tiene como resultado la transformación del epitelio mamario y el desarrollo de adenocarcinomas multifocales así como lesiones metastásicas en los nódulos linfáticos y en los pulmones. El desarrollo de la enfermedad en estos animales es muy similar a en humanos. Estos investigadores encontraron que los tumores generados en los animales KO eran de menor tamaño y se encontraban en una fase temprana de desarrollo en comparación con los que encontraban en los ratones WT. Al mismo tiempo, los animales WT presentaban metástasis pulmonares de mayor tamaño y en un mayor número que los animales KO. Todo ello en su conjunto hacía que la supervivencia de los ratones KO fuese mayor que la de los animales WT por lo que, hasta este punto, podríamos decir que ADAMTS1 es un inductor del desarrollo tumoral en este tipo de neoplasias. Un análisis posterior de los tumores obtenidos mostró que no había diferencias en cuanto a vasculatura tumoral entre los animales WT y KO pero sí que observaron un mayor número de células en apoptosis en los tumores producidos en animales KO. Finalmente demostraron que los tumores WT presentaban una mayor cantidad de versicano cortado. Los fragmentos G1 y G3 de versicano son capaces de promover el la proliferación tumoral mediante la activación de receptores EGF y la interacción con ácido hialurónico (HA, *hyaluronic acid*) (Ricciardelli et al., 2011).

	HEMBRAS	MACHOS
<b>TEJIDO ADIPOSO</b>		
Disminución de la cantidad de grasa total	√	√
<b>ENDOCRINO</b>		
Morfología anormal de la medula adrenal	√	√
Disminución del número de folículos ováricos maduros	√	
<b>TAMAÑO-CRECIMIENTO</b>		
Disminución del peso corporal	√	√
<b>HOMEOSTASIS-METABOLISMO</b>		
Homeostasis/metabolismo	N	N
Disminución de los niveles de cloro, sodio y potasio en la orina	√	√
<b>RIÑÓN Y SISTEMA URINARIO</b>		
Morfología anormal del borde corticomedular el riñón	√	√
Morfología anormal del uréter	√	√
Ausencia de papila renal	√	√
Hipoplasia de la papila renal	√	√
Dilatación del caliz renal	√	√
Morfología ureteropélvica alterada	√	√
Unión ureteropélvica obstruída	√	√
Poliúrea	√	√
Atrofia de la corteza renal	√	√
Atrofia de la médula renal	√	√
Hidronefrosis	√	
<b>SISTEMA REPRODUCTIVO</b>		
Disminución del número de folículos ováricos maduros	√	
Dilatación del útero	√	
Quistes uterinos	√	
Implantación del embrión dificultada	√	
Reducción de la fertilidad	√	
Disminución del tamaño de la camada	√	√
<b>MORTALIDAD-ENVEJECIMIENTO</b>		
Letalidad perinatal parcial	√	√
Letalidad posnatal parcial	√	√

**Tabla 2. Defectos fenotípicos observados en los ratones KO. N= NORMAL.** Modificado de Blake JA, Bult CJ, Eppig JT, Kadin JA, 2014.

## MODELO CELULAR DE MELANOMA: B16F1



**Figura 13. Representación del modelo de selección de las diferentes sublíneas metastásicas de B16F1.** Extraído del artículo original (Fidler, 1973)

y aislamiento y reinoculación de las células procedentes de la metástasis en nuevos ratones (Fidler, 1973).

Las células B16 son capaces de formar “*vessel-like structures*” cuando se siembran en diferentes sustratos como colágeno o Matrigel. Esta característica y el hecho de que son singénicas con nuestros ratones ADAMTS1 KO convierte a las células B16F1 en un buen candidato para el estudio del desarrollo tumoral y su relación con las vasculatura y el fenómeno de mimetismo vascular.

En cuanto a morfología y desarrollo tumoral, los tumores producidos en un modelo subcutáneo suelen alcanzar 1 cm<sup>3</sup> entre 14 y 21 días. Generalmente, después de alcanzar este volumen suelen necrotizarse en el centro, a ulcerarse y a sangrar por lo que no es recomendable dejarlos desarrollarse más ya que se está perdiendo el material de estudio y se hace sufrir al animal de manera innecesaria (Overwijk and Restifo, 2001).

Respecto a la respuesta inmune de las B16F1, se ha comprobado que estas células son poco o nada inmunogénicas cuando producen tumores. No se conoce todavía a ciencia cierta el motivo de esta baja respuesta inmunológica pero se piensa que la baja

expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC, *major histocompatibility complex*) por parte de estas células puede estar entre las causas. Los tumores generados a partir de B16F1 son, además, bastantes resistentes al tratamiento con IL-2 que es uno de los tratamientos para el melanoma metastásico (Overwijk and Restifo, 2001).

Para nuestras investigaciones será interesante tener en cuenta que las células de melanoma producen una serie de proteínas llamadas MDA (*melanoma differentiation antigens*) que contienen una serie de antígenos capaces de ser reconocidos por los linfocitos T. En este grupo podemos encontrar proteínas como gp100, Tirosinasa, Melan-A, y TIRP-1 y 2, entre otras. Es interesante mencionar que tanto Tirosinasa como TIRP-1 y 2 median la producción de melanina, lo que las convierte en marcadores muy relevantes de este tipo celular (Overwijk and Restifo, 2001). Podremos usar moléculas en los distintos experimentos como marcadores de melanoma.



# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





## JUSTIFICACIÓN

La angiogénesis es un elemento clave necesario para el desarrollo tumoral y la metástasis. Para que se produzca el desarrollo de una red vascular en los tumores nacientes es imprescindible la remodelación de la matriz extracelular existente. Esta remodelación es llevada a cabo por metaloproteasas de la matriz las cuales, durante este proceso, modifican además la función de otros componentes celulares entre los que se incluyen algunos factores de crecimiento, receptores celulares y citoquinas configurando así el microambiente tumoral. Una de las proteasas implicadas directamente en el desarrollo angiogénico y en esta remodelación es ADAMTS1. No obstante, no se conoce con exactitud cuándo y cómo modula esta proteína el desarrollo angiogénico y, de hecho, hasta la fecha se le han atribuido distintos mecanismos tanto pro- como antitumorogénicos. Por ende, se desconoce en qué situaciones inducirá o reprimirá el desarrollo tumoral y la metástasis. Como dificultad añadida, además de la angiogénesis, existen mecanismos alternativos de vascularización tumoral y es concretamente en uno de ellos, el mimetismo vasculogénico, donde se ha demostrado recientemente la implicación de ADAMTS1. En la última década se ha podido asociar el mimetismo vasculogénico a determinados tipos de tumores, entre los que sobresalen el melanoma y el glioblastoma. (Francescone et al., 2012; Hendrix et al., 2003). De igual modo, ADAMTS1 se ha descrito como una de las proteínas que influyen y posibilitan el desarrollo del mimetismo vasculogénico (Casal et al., 2010). Es por todo ello que intentaremos indagar en el papel que desarrolla ADAMTS1 en angiogénesis haciendo uso de un ratón ADAMTS KO como herramienta principal.

# OBJETIVOS

En nuestros estudios nos centramos en:

1. ANALIZAR EL PAPEL DE ADAMTS1 EN UN MODELO CELULAR DE MELANOMA
  - a. Caracterizar la línea celular B16F1 y sus propiedades de plasticidad tumoral en cultivos en Matrigel.
  - b. Evaluar la interacción entre las células tumorales B16F1 y las células endoteliales en la formación de estructuras similares a endoteliales.
  - c. Estudiar la influencia de ADAMTS1 en las propiedades plásticas de la línea tumoral B16F1.
  
2. ANALIZAR EL PAPEL ANGIOMODULADOR DE LA METALOPROTEASA ADAMTS1 Y SU RELACIÓN DIRECTA CON EL DESARROLLO TUMORAL.
  - a. Analizar el papel de ADAMTS1 en el microambiente tumoral haciendo uso de ratones KO para ADAMTS1.
  - b. Comprobar la capacidad angiomoduladora de ADAMTS1 en el desarrollo tumoral.
  - c. Identificar los cambios producidos en la vasculatura y sus consecuencias en el desarrollo tumoral.
  
3. ESTUDIOS DE ADAMTS1 Y OTRAS PROTEASAS EN TUMORES HUMANOS
  - a. Analizar la expresión génica de distintas proteasas en tumores de mama



# RESULTADOS



# ADAMTS1 Y SU IMPLICACIÓN EN EL FENÓMENO DE MIMETISMO VASCULOGÉNICO: APROXIMACIONES IN VITRO

## Caracterización molecular del fenotipo similar a endotelial en B16F1 frente a otros tipos celulares

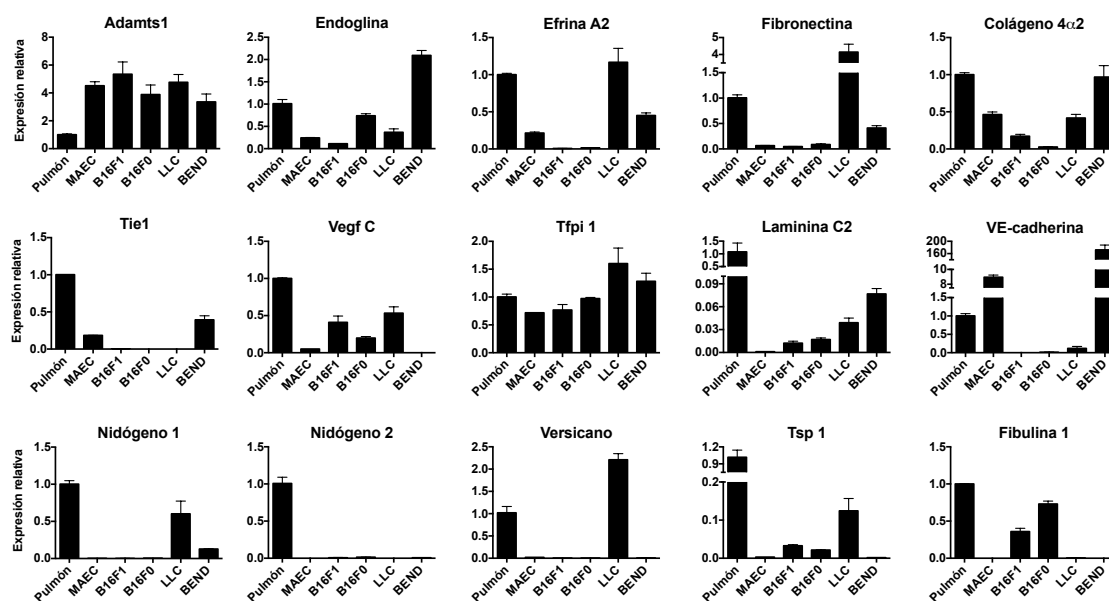
Se ha descrito que algunas células de melanoma, implicadas directamente en fenómenos de mimetismo vasculogénico, sobreexpresan una serie de moléculas de naturaleza endotelial entre las que encontramos: Tie1, Efrina A2, VEGF-C, VE-cadherina, Endogлина, TFPI-1, Laminina C2, Fibronectina 1, Colágeno 4 $\alpha$ 2 (Hendrix et al., 2003). En nuestro caso quisimos evaluar mediante qPCR la expresión de estos marcadores en nuestra línea tumoral de interés, B16F1. Además decidimos analizar una línea tumoral de pulmón que muestra una baja capacidad de formar redes pseudovasculares, LLC (*Lewis lung carcinoma*) además de un clon poco metastásico de B16, B16F0. Incluimos como control en este experimento una línea endotelial primaria (MAEC, *mouse aortic endothelial cells*), una muestra de tejido de ratón (pulmón) para poder comparar con los niveles fisiológicos, y una línea celular endotelial de cerebro (Bend, *brain endothelial cells*). El análisis de B16F1 y su comparación con LLC, además de por sus capacidades de formar redes pseudovasculares, es especialmente relevante por el hecho de compartir el mismo trasfondo genético que nuestros ratones ADAMTS1 KO (C57Bl/6) lo que permitirá hacer ensayos singénicos de formación de tumores. Al mismo tiempo, y de acuerdo con trabajos previos que demuestran la contribución de ADAMTS1 a la plasticidad de células de sarcoma y melanoma (Casal et al., 2010), estudiamos la expresión de *Adamts1* y de algunas moléculas relacionadas como, *Fibulina 1*, y los sustratos de ADAMTS1 *TSP-1*, *Nidógeno 1*, *Nidógeno 2* y *Versicano* en estas líneas celulares.

Este análisis demuestra, primero, que los marcadores de plasticidad tumoral presentan niveles bajos de expresión en las células tumorales de melanoma B16F1 y B16F0. Solamente el *Colágeno 4 $\alpha$ 2* y el *Vegf C* parecen presentar los niveles de expresión descritos en líneas de melanoma humano (Hendrix et al., 2003) donde las células B16F1 presentan mayores niveles de expresión que las poco metastásicas, en este caso las B16F0. Es también interesante señalar que entre todos estos marcadores la VE-cadherina tiene un papel especial ya que se ha descrito que su presencia es necesaria

para formar estas redes y que, de hecho, si se elimina las células pierden su capacidad de formar estructuras pseudovasculares (Hendrix et al., 2001). En el caso de nuestras células tumorales no somos capaces de detectar expresión de VE-cadherina en ninguna de ellas. Como controles positivos, confirmamos que está altamente expresada en las células endoteliales de ratón y en la línea celular endotelial Bend (**Figura 14**).

En relación a ADAMTS1, observamos que está expresado en las diferentes líneas celulares y que sin embargo sus sustratos presentan niveles bajos de expresión. Sólo LLC y BEND expresan niveles medibles de *Nidógeno 1*, siendo los de LLC casi iguales a los del tejido pulmonar. Para el *Versicano*, las LLC muestran una alta expresión. Las moléculas relacionadas con ADAMTS1 presentarían niveles detectables de expresión siendo relevantes en el caso de *Fibulina 1*.

Estos resultados muestran que nuestra línea celulares de interés, B16F1, no muestra altos niveles de expresión de los marcadores de plasticidad tumoral analizados tal y como se había descrito previamente para líneas de origen humano.



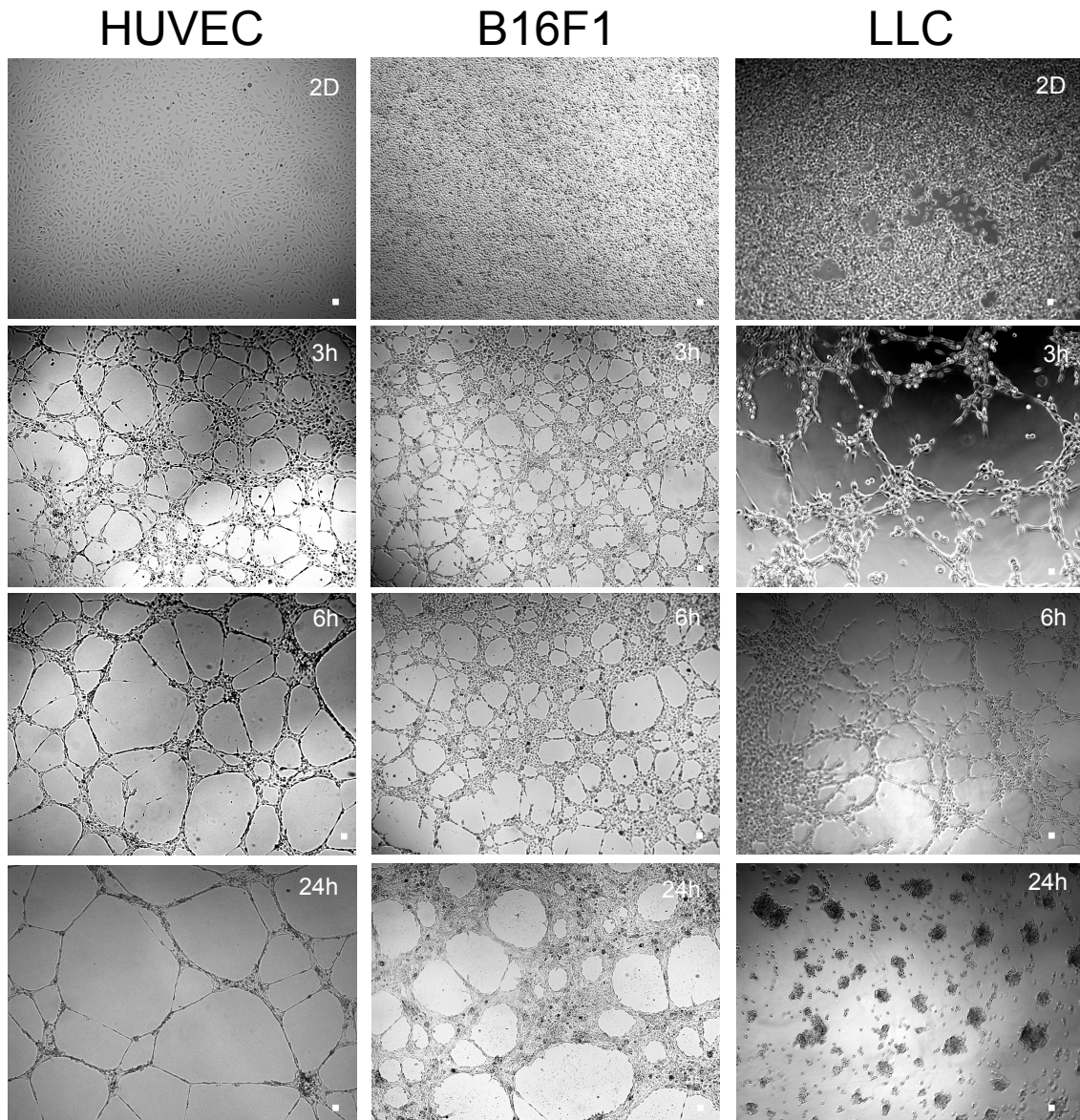
**Figura 14. Panel de expresión génica en líneas celulares de melanoma, carcinoma de pulmón y células endoteliales.** En la línea superior y central se muestran los marcadores relacionados con mimetismo vasculogénico. En la línea inferior se encuentran los sustratos de ADAMTS1 y moléculas relacionadas con ADAMTS1.

## Caracterización de las propiedades de plasticidad tumoral y su relación con la expresión génica en células B16F1 y LLC

La capacidad de las células de melanoma de formar redes similares a endoteliales se ha descrito con anterioridad (Maniotis et al., 1999). Además se ha documentado este fenómeno para células B16F1 (Francescone III et al., 2011) aunque esta habilidad no ha sido estudiada en profundidad en cuanto a marcadores moleculares y su comportamiento. Es por esto que decidimos ver si se producían cambios en la expresión de los marcadores estudiados anteriormente al hacer cultivos tridimensionales en Matrigel de B16F1 y LLC. El Matrigel es una mezcla heterogénea de componentes de la matriz extracelular, extraídos a partir del sarcoma murino EHS, que se utiliza comúnmente para evaluar propiedades de células endoteliales en un contexto 3D frente a los cultivos 2D más clásicos. Además estudiamos la morfología y la disposición en cuanto a la formación de estructuras de las distintas redes vasculares formadas. Como control de formación de estructuras utilizaremos unas células endoteliales humanas (HUVEC).

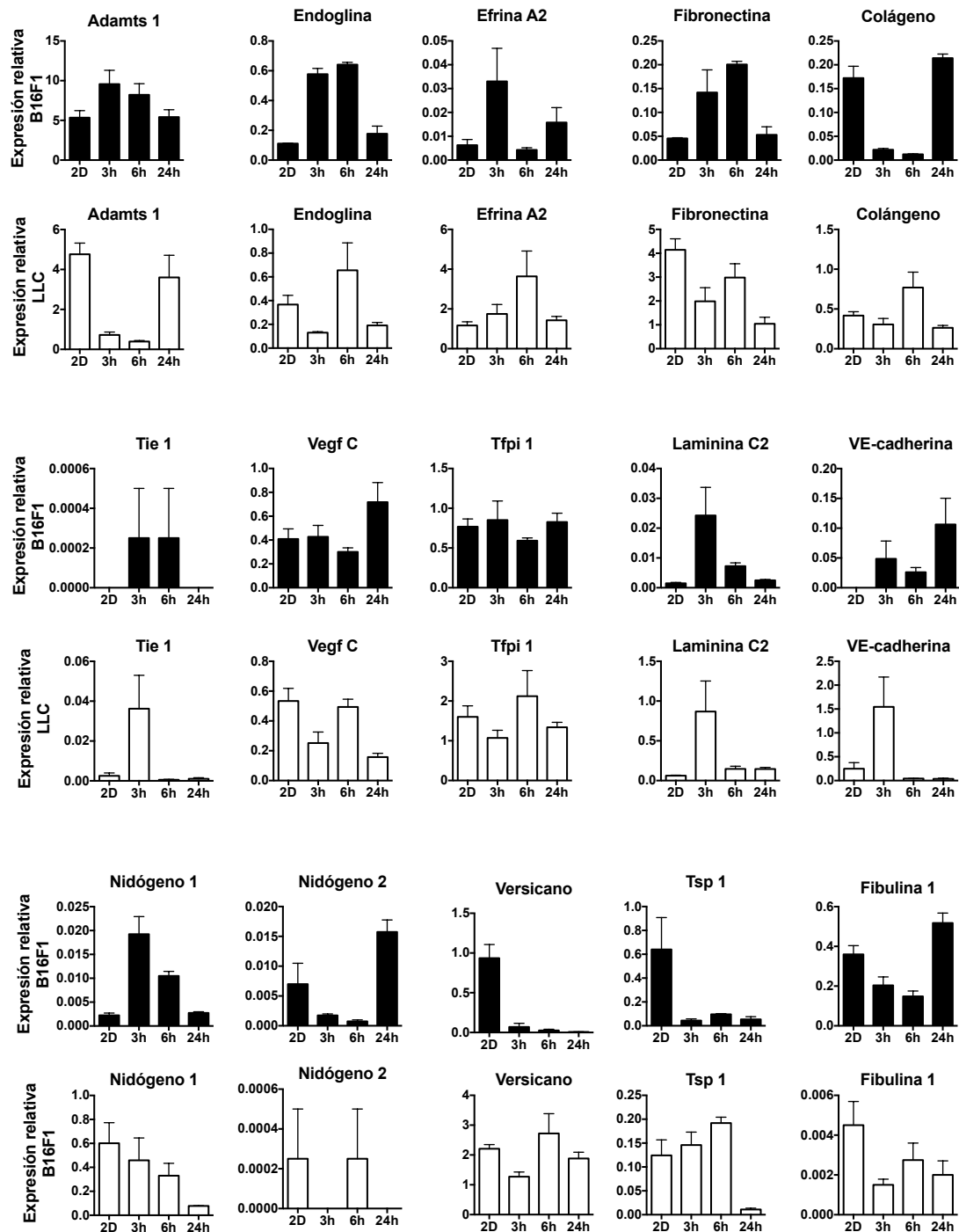
La evaluación microscópica de estos cultivos revela que los distintos tipos celulares no parecen mostrar diferencias estructurales entre sí cuando tenemos en cuenta tiempos bajos (3 horas) (**Figura 15**). Sin embargo, sí que podemos observar patrones distintos de disposición y de formación de estructuras similares a endoteliales a 6 horas y sobre todo a 24 horas. A las 6 horas, las células endoteliales (HUVEC) mostrarían células elongadas que unen los distintos puntos de ramificación entre sí formando un bucle. Además, los lúmenes centrales de estos bucles tendrían una forma menos redondeada que aquellos observados en las células de melanoma. Este efecto es mucho más llamativo cuando se observa en cultivos después de 24 horas. Es en este momento cuando encontramos en los cultivos endoteliales células completamente elongadas uniendo los puntos de ramificación y formando bucles completamente poligonales. En el caso de las células de melanoma B16F1, los bucles son elípticos y son pocas las ramificaciones donde se encuentran células aisladas formando una elongación que una los distintos puntos de ramificación entre sí. Cabe remarcar que las LLC parecen estar más retardadas en cuanto a la formación de estas estructuras a las 6 horas y sin embargo no son capaces de finalizarlas ni mantenerlas a las 24 horas. Lo esperado para estas células es que no formasen ningún tipo de estructura por lo que podemos entonces utilizarlas como control negativo.





**Figura 15. Formación de redes pseudovasculares por las líneas celulares HUVEC, B16F1 y LLC al cultivarlas en Matrigel.** Visualización en campo claro de los cultivos mantenidos en Matrigel durante 24 horas. 2D hace referencia a cultivos bidimensionales que se utilizaron para mostrar que estos cultivos crecen en monocapa de manera estándar. Escala = 200  $\mu$ m.

El análisis de marcadores moleculares en los distintos tiempos mostró diferencias significativas entre las células de melanoma B16F1, capaces de formar redes similares a endoteliales estables, y las células de carcinoma de pulmón LLC cuya capacidad para formar estas redes parece ser limitada (**Figura 16**).



**Figura 16. Expresión génica de cultivos celulares de B16F1 y LLC en Matrigel a 3h, 6h y 24h.** Las gráficas en negro muestra la expresión génica de las células B16F1 mientras que las blancas muestran la expresión génica de las células LLC. En la línea superior y central se muestran los marcadores relacionados con mimetismo vasculogénico mientras que en la línea inferior se encuentran los sustratos de ADAMTS1 y moléculas relacionadas con ADAMTS1.

En estos análisis podemos observar que, por ejemplo, para *Adamts1* el comportamiento de las distintas líneas celulares es diferente entre las que son capaces de formar redes y las que no. Mientras que en B16F1 aumentan los niveles de *Adamts1* con el tiempo, en 70

LLC estos niveles disminuyen a 3 y 6 horas. En ambos casos los niveles son similares a los que tienen las células en cultivos bidimensionales cuando transcurren 24 horas. El resto de genes muestran un comportamiento similar en cuanto a que su expresión varía con el tiempo, bien sea sobreexpresándose o subexpresándose, generalmente volviendo a niveles similar a los obtenidos en cultivos bidimensionales. Los resultados indican que, salvo el *Colágeno 4 $\alpha$ 2*, todos los genes estudiados se inducen en algún momento tras ser sembradas en Matrigel. En este caso, podemos observar que los niveles de expresión de moléculas relacionadas con fenómenos de mimetismo vascular aumentan, en consonancia con lo descrito anteriormente para células humanas (Hendrix et al., 2003). En el caso de las LLC, no se encuentra una clara correspondencia entre estos marcadores de plasticidad tumoral y su capacidad de formar redes similares a endoteliales.

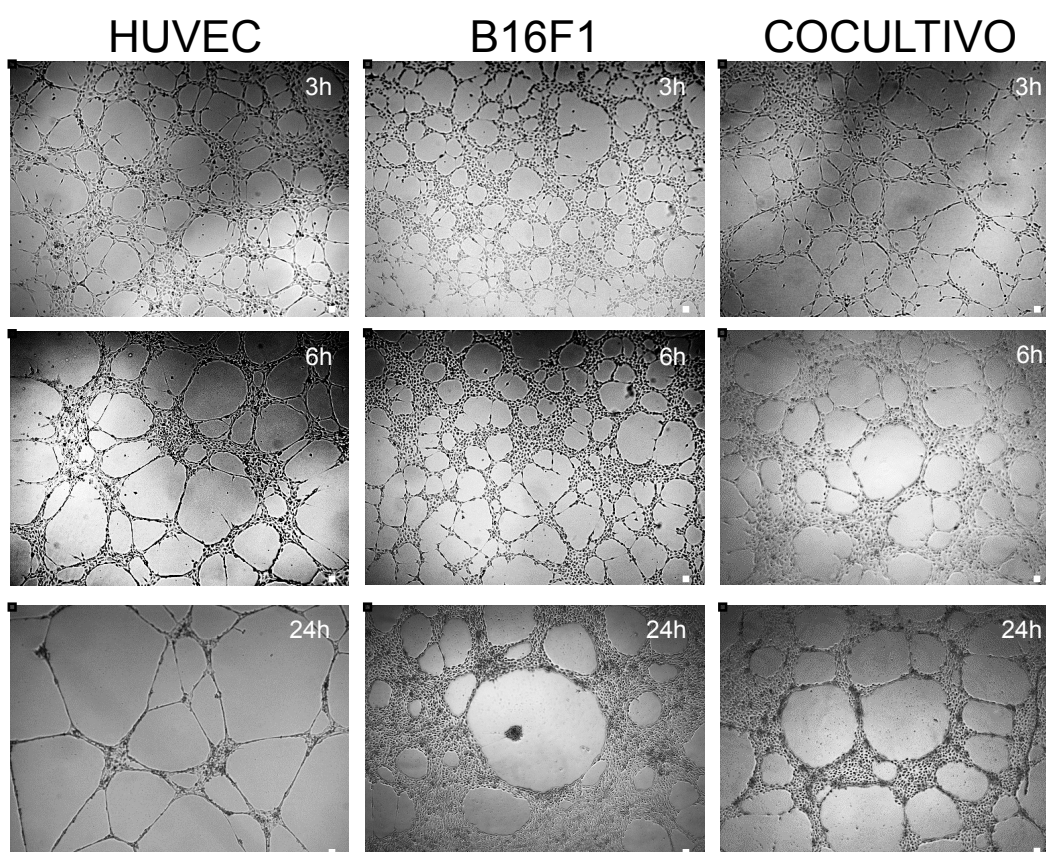
.

En alusión a *Adamts1*, si que concuerda su sobreexpresión con lo que cabría esperar y en consonancia con lo ya descrito en cuanto a que *Adamts1* es necesario para la formación de estas redes (Casal et al., 2010). Los sustratos y moléculas relacionadas con ADAMTS1 parecen desregularse de manera general tras el cultivo de células tumorales en Matrigel. Solamente Nidógeno 1 aparece sobreexpresado en células B16F1.

Este hecho pone de manifiesto que el contexto en el que se encuentran las células modifica su expresión génica y que puede ser importante a la hora de estudiar fenómenos de mimetismo vasculogénico. Si bien en el experimento anterior donde sembrábamos las células en formatos bidimensionales no conseguíamos correlacionar estos marcadores con la capacidad de formar redes similares a endoteliales si que parece que al analizarlos en configuraciones tridimensionales obtenemos un resultados positivo.

### Cocultivo de B16F1 y HUVECS: comportamientos diferenciados

En un intento de simular las condiciones fisiológicas en las que ocurre el fenómeno de mimetismo vasculogénico decidimos cocultivar células endoteliales y tumorales para evaluar cómo era su comportamiento en cuanto a capacidad de formar redes similares a endoteliales y a la expresión de algunos marcadores de interés.

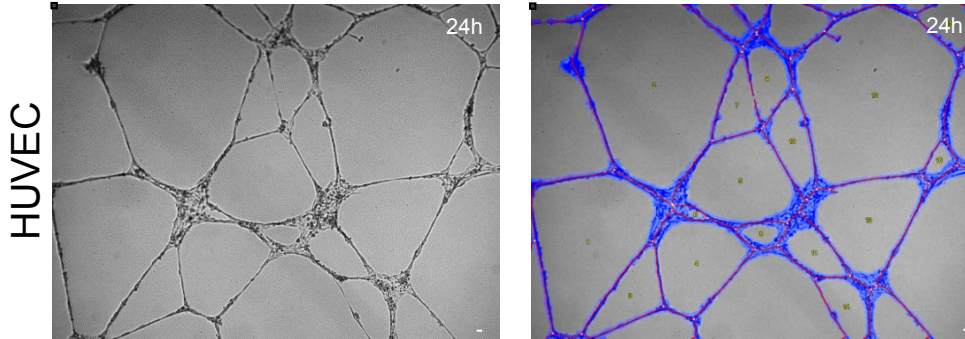


**Figura 17. Formación de redes similares a endotelial en cultivos de Matrigel.** Visualización en campo claro de los cultivos mantenidos en Matrigel Se plaquearon 50.000 células por pocillo en 25  $\mu$ l de Matrigel durante el tiempo indicado. En el caso de cocultivo se sembraron 50.000 células por pocillo en un ratio 1:1. Escala = 200  $\mu$ m

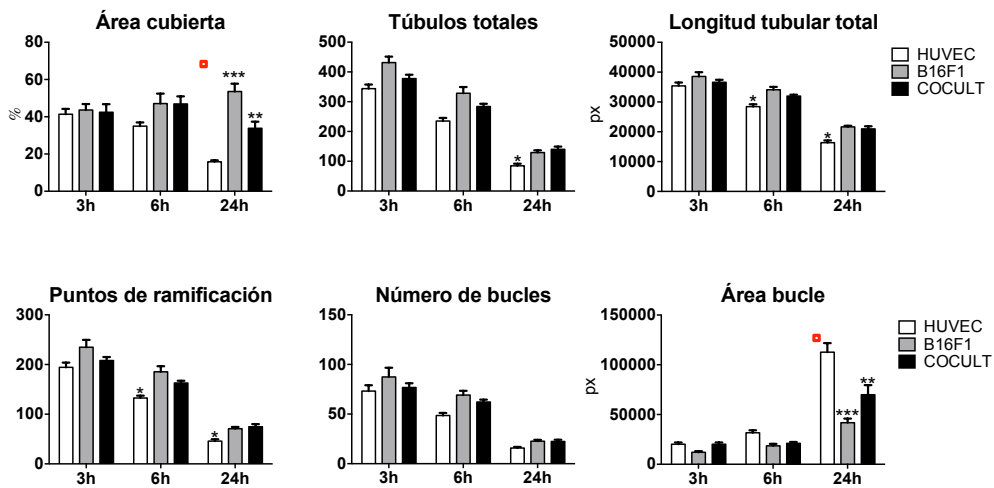
Podemos ver claramente en este experimento (**Figura 17**) que a las 3 horas de la siembra es casi imposible distinguir los tipos celulares ya que su morfología y disposición es muy similar. Es a partir de las 6 horas cuando podemos diferenciar las HUVECs del resto por las características de elongación y disposición ya comentadas en la **Figura 15**. Es importante resaltar que a punto final (24 horas) los cocultivos de HUVECs y células tumorales presentan una morfología y disposición celular que podríamos clasificar como intermedia entre lo que ocurre en los monocultivos respectivos. Podemos observar un alto número de ramificaciones con células dispuestas de manera elongada y a su vez un tipo de bucle circular, más parecida al monocultivo de células tumorales B16F1 que al de células endoteliales. De manera relevante, el análisis de estos ensayos mediante un

software especializado, Wintube (Wimasis, Alemania) (Ver Materiales y Métodos), corroboró nuestras primeras observaciones (**Figura 18**).

A



B



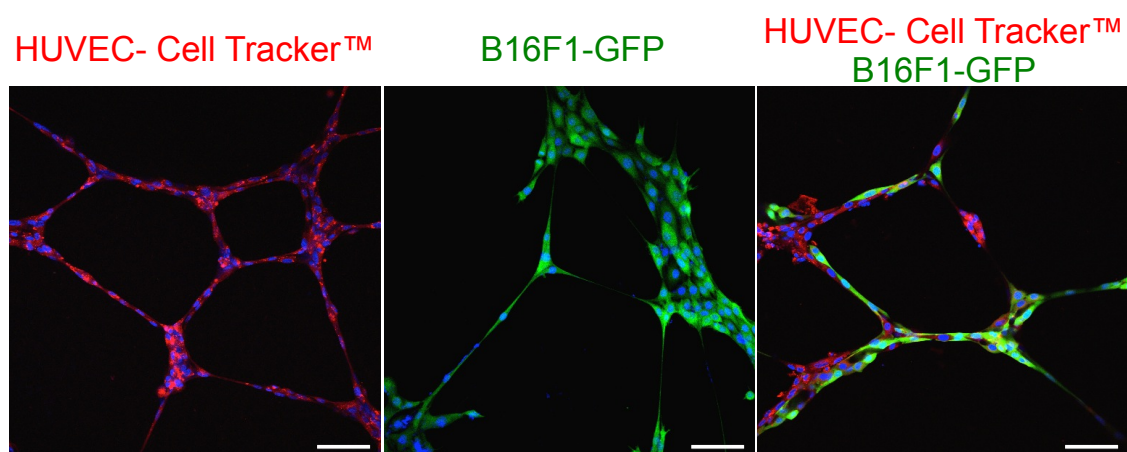
**Figura 18. Análisis morfométrico de cocultivos de células endoteliales y tumorales sembradas en Matrigel.** A, Figura representativa del análisis del programa informático sobre células endoteliales. B, Cuantificación de los parámetros obtenidos tras el análisis informático.

En línea con las observaciones ya mencionadas, el análisis informático muestra que, a las 3 horas del cultivo, todos los parámetros estudiados tienen valores muy similares mientras que sin embargo a las 24 horas el cocultivo presenta un valor intermedio entre los monocultivos de HUVECs y B16F1 siendo muy claro en los parámetros del área cubierta por todas las células que componen la red y área media los bucles que componen la red (**Figura 18B**).

Estos resultados sugieren que hay un fenómeno de adaptación en el que las células tumorales y endoteliales trabajan de manera coordinada para formar una estructura híbrida con características de ambos tipos celulares.

## Distribución de células endoteliales y tumorales en los cocultivos

Una vez caracterizada la formación de estructuras en los cocultivos, decidimos ver si las células de distintos orígenes presentaban alguna disposición predominante. Para ello infectamos las células B16F1 con un lentivirus que expresa la conocida proteína verde fluorescente (GFP) y marcamos las células endoteliales con una sonda roja fluorescente citoplasmática (Cell Tracker™, LifeTechnologies, EE.UU.) (**Figura 19**). Los resultados muestran que tanto las células tumorales como las endoteliales se distribuyen alrededor de toda la red vascular sin adquirir una posición predominante ni en los puntos de ramificación ni en las ramas. Este tipo de marcaje nos permite observar además cambios en la morfología de las células tumorales cuando se siembra en cocultivos. En el monocultivo de células tumorales podemos observar como éstas mantienen una forma redondeada y sólo unas pocas adquieren la morfología alargada de las células endoteliales. En cambio, en el caso de los cocultivos, las células tumorales que adquieren una tipología alargada aumentan en número y se distribuyen de forma paralela a las células tumorales. Estos resultados sugieren que al cocultivar las células tiene lugar un fenómeno comunicación entre ellas que hace que las células tumorales adquieran en mayor medida un fenotipo similar al endotelial.

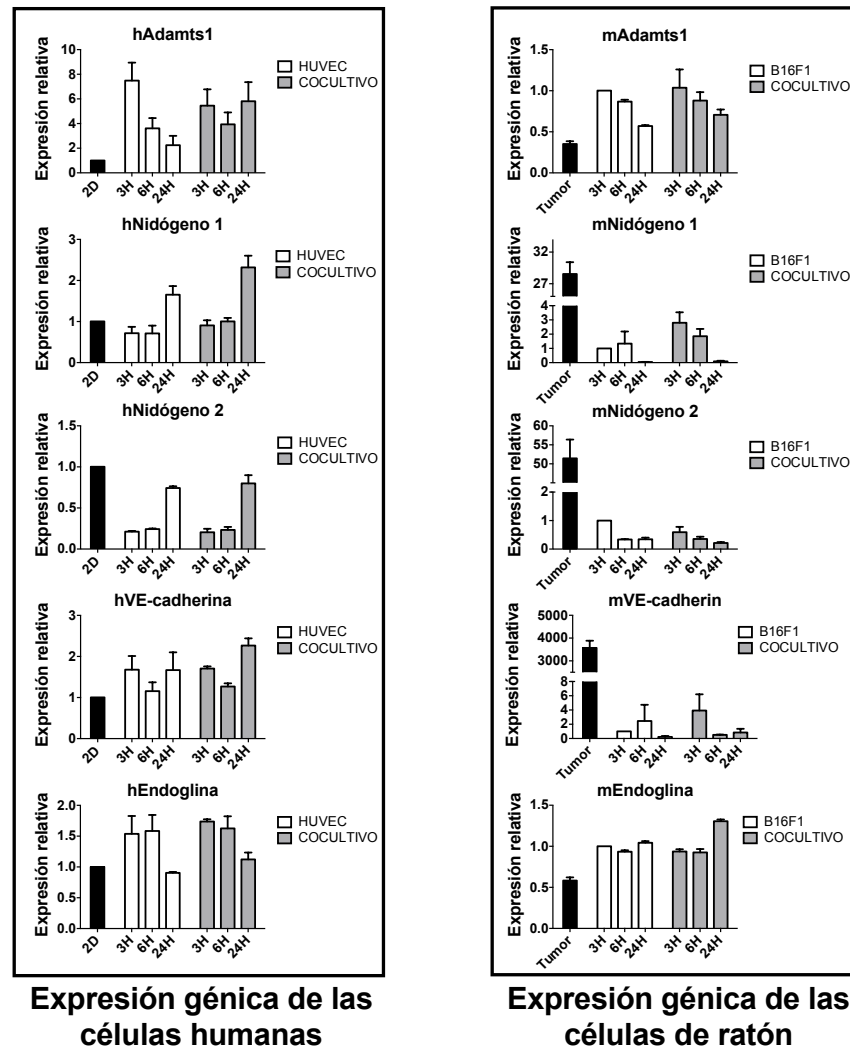


**Figura 19. Disposición de células endoteliales y tumorales formando estructuras similares a endotelial en Matrigel.** Marcaje fluorescente de HUVECs en rojo y B16F1 en verde. Escala = 100  $\mu$ m.

## Expresión génica en los cocultivos: papel de ADAMTS1

Teniendo en cuenta que nuestras células en cocultivo provenían de organismos distintos podíamos analizar los niveles de expresión génica de cada uno de los tipos celulares por separado y en conjunto pudiendo discernir la aportación de cada uno en el cocultivo. Para ello diseñamos cebadores específicos de genes de ratón y humano con la

particularidad de no hibridar con la otra especie. En estos análisis nos enfocamos principalmente en *Adamts1*, *Nidógeno 1 y 2*, *Ve-cadherina* y *Endoglina*. Los primeros por ser nuestra molécula de interés y dos de sus sustratos más relevantes, mientras que *VE-cadherina* y *Endoglina* por considerarse relevantes en la formación de redes vasculares y en el proceso angiogénico (Fonsatti et al., 2010). Tanto *Endoglina* como *VE-cadherina* se encuentran además sobreexpresadas en células tumorales que forman estructuras similares a endotelial (Hendrix et al., 2003).



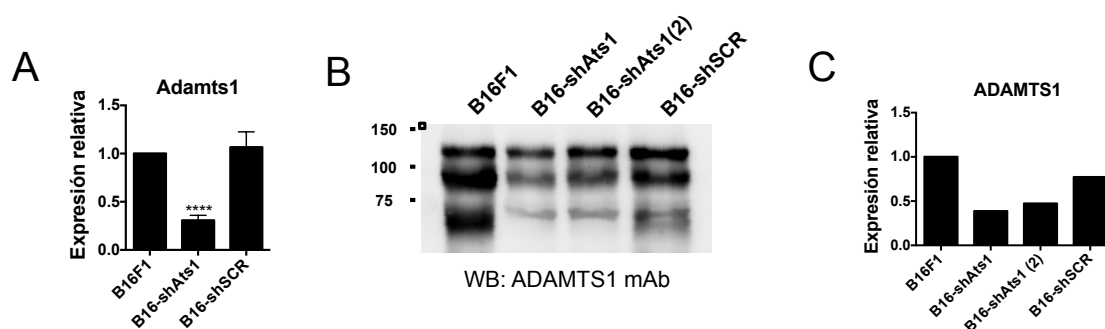
**Figura 20. Expresión génica de células HUVEC y B16F1 en cocultivo y su comparativa con el monocultivo.** 500 ng de RNA se retrotranscribieron a cDNA y se amplificaron mediante la técnica de qPCR utilizando cebadores específicos de ratón para los genes indicados en los paneles.

De los resultados obtenidos podemos señalar que la mayoría de genes estudiados se expresan de igual manera con el tiempo en las células independientemente de estar cultivadas en cocultivos o en monocultivo. No obstante, son llamativos el caso de *Adamts1* en las células HUVEC donde podemos ver que en el monocultivo su expresión disminuye con el tiempo, tal y como se había mostrado en experimentos anteriores. Sin

embargo, puede apreciarse que en el cocultivo el nivel de *Adamts1* en estas células se mantiene alto con el paso del tiempo. Ésto apoya la idea de que existe un fenómeno de comunicación celular en el que se vería implicado ADAMTS1. Los sustratos de ADAMTS1, Nidógeno 1 y 2, no sufrirían cambio en su expresión ni en las células tumorales ni en las endoteliales al igual que VE-cadherina, cuyos niveles en las células tumorales son bajos y casi despreciables. Es llamativo el caso de la Endoglina ya que no sufre ningún tipo de variación en su expresión en las células endoteliales, pero sí en las células tumorales al sembrarse en cocultivo. Al ser ésta un correceptor del receptor TGF- $\beta$  la hipótesis de comunicación intercelular cobra más sentido.

### Interferencia de *Adamts1* en células B16F1

En línea con nuestro interés general en la proteasa ADAMTS1, sobre todo por su implicación en el fenómeno de la plasticidad tumoral (Casal et al., 2010), y ante los resultados mostrados aquí, que indican que *Adamts1* sufre una sobreexpresión en las células, tanto endoteliales como tumorales, al ser sembradas en Matrigel, decidimos inhibir la expresión de *Adamts1* en las células tumorales para ver cuál era el comportamiento de éstas ante la falta de la metaloproteasa. Para ello utilizamos un shRNA que introducimos en las células mediante el uso de lentivirus (ver Materiales y métodos). Comprobamos que la disminución de los niveles de ADAMTS1 se daba tanto a nivel génico (**Figura 21A**) como proteico (**Figura 21B-C**). Posteriormente caracterizamos las capacidades invasivas y proliferativas de estas células, no sólo para evaluar el posible papel directo de ADAMTS1 en estos procesos celulares, sino también de cara a experimentos posteriores más complejos tanto in vivo como in vitro.



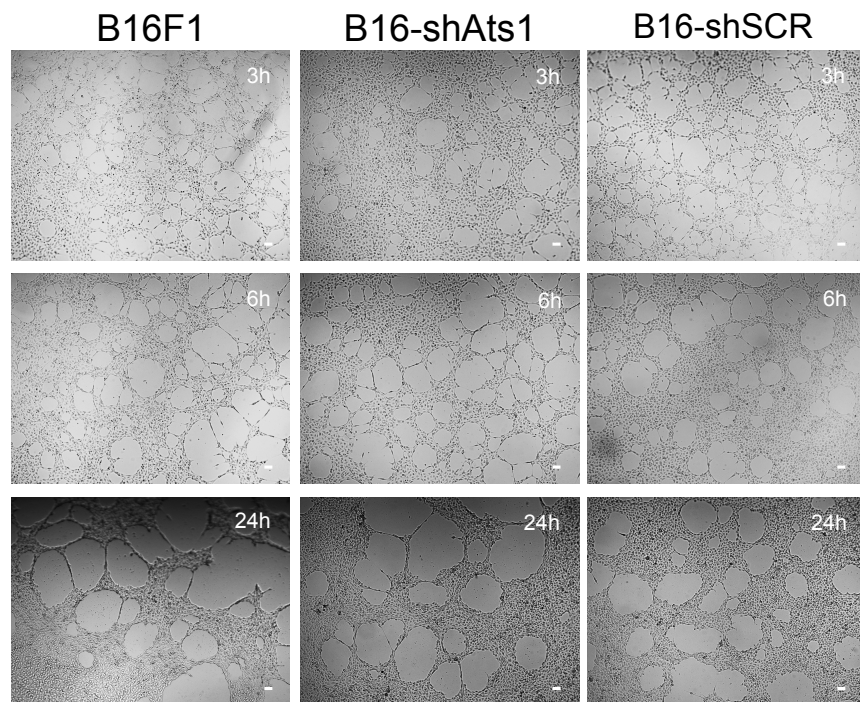
**Figura 21. Niveles de expresión génica y de proteína en células B16F1 tras la infección de un lentivirus que porta un shRNA contra *Adamts1*.** A, Nivel de expresión del gen *Adamts1* medido por qPCR. 500 ng de RNA se retrotranscribieron a cDNA y se amplificaron mediante la técnica de qPCR utilizando cebadores específicos de ratón. B, Nivel de proteína medido por WB. C, Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína medidos en B.



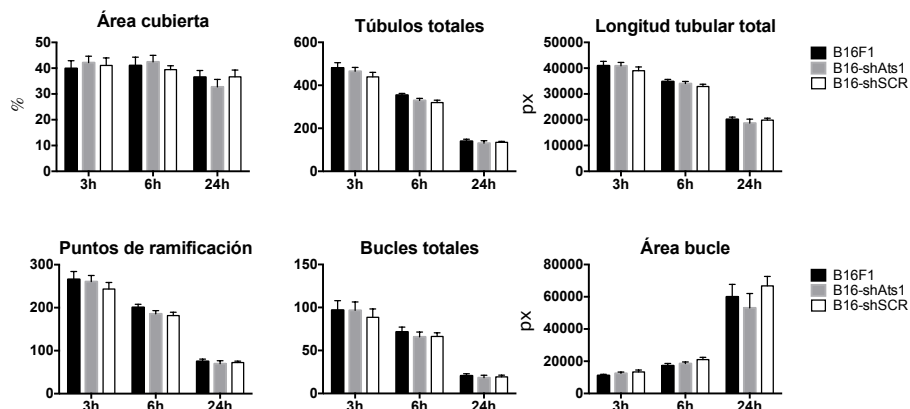
## Efecto de la interferencia de *Adamts1* en características funcionales: formación de redes similares a endoteliales

Una vez probada la interferencia de *Adamts1* lo más inmediato es probar la capacidad de estas células para formar redes vasculares. Para ello seguimos las mismas directrices que en experimentos anteriores en Matrigel (**Figura 22A**). A pesar de que el primer análisis visual no mostraba diferencias en el comportamiento de las distintas células, analizamos las imágenes capturadas al análisis con la plataforma informática Wimasis.

**A**



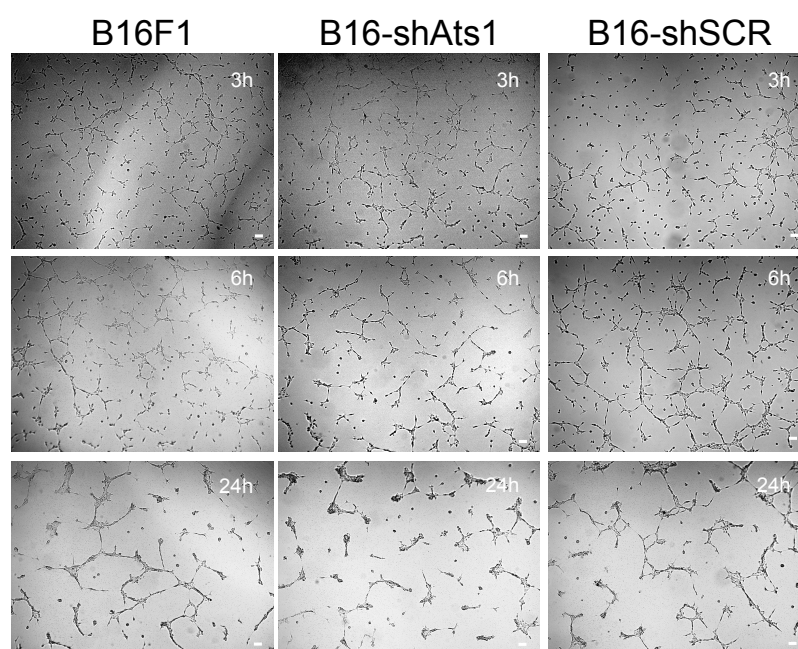
**B**



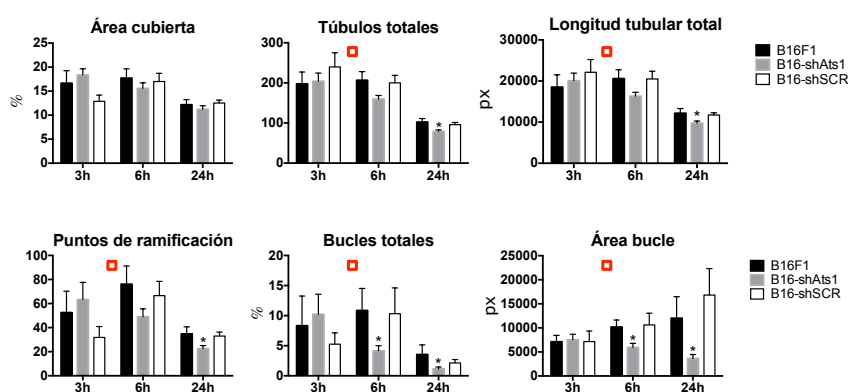
**Figura 22. Formación de redes similares a endotelial por parte de células B16F1 interferidas para *Adamts1* y sus respectivos controles.** A, Se sembraron 50.000 células por pocillo en 25  $\mu$ l de Matrigel durante 24 horas. Escala = 200  $\mu$ m. B, Cuantificación de los parámetros indicados tras el análisis informático.

Esta evaluación tampoco mostró ningún parámetro que se viese modificado por la disminución en la expresión de *Adamts1* en las células tumorales (**Figura 22B**). Por las particularidades de este ensayo, decidimos desafiar la capacidad que tienen estas célula de formar redes vasculares disminuyendo el número de células sembradas, y ver entonces si éramos capaces de observar diferencias o no. Para ello disminuimos la densidad celular a 20.000 células por pocillo (**Figura 23A**). En este caso descubrimos que las células interferidas sí que mostraban una variación en los parámetros analizados, generalmente apreciables a las 24 horas. Es muy llamativa la disminución en los puntos de ramificación, el número de bucles y el área de los bucles, lo que en resumen demuestra que ADAMTS1 participa en la formación de estructuras.

**A**



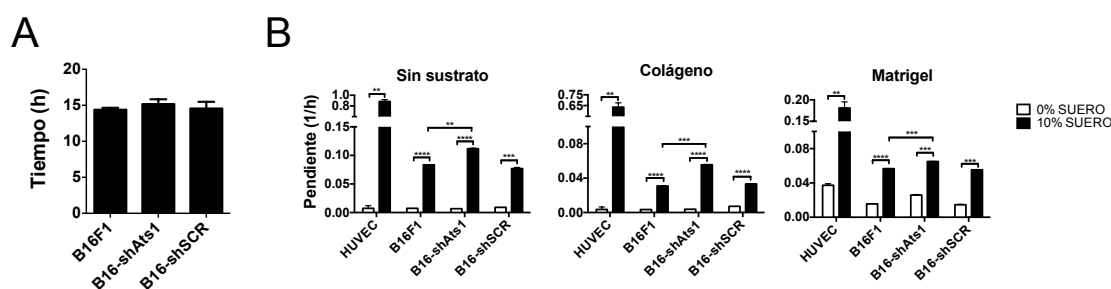
**B**



**Figura 23. Formación de redes similares a endotelial por parte de células B16F1 interferidas para *Adamts1* y sus respectivos controles.** A, Se sembraron 20.000 células por pocillo en 25  $\mu$ l de Matrigel durante 24 horas. Escala = 200  $\mu$ m. B, Cuantificación de los parámetros indicados tras el análisis

## Efecto de la interferencia de *Adamts1* en características funcionales: proliferación y migración

Para medir la capacidad proliferativa e invasiva de las células hicimos uso de la plataforma Xcelligence, (más detalles en Materiales y métodos). Los datos obtenidos muestran que la proliferación celular se mantiene estable a pesar de la interferencia de *Adamts1* (**Figura 24A**). En cuanto a la migración, decidimos probar esta habilidad de nuestras células en ensayos sin sustrato alguno y en presencia de colágeno $\alpha$ 2 ó Matrigel. Los datos muestran que hay un leve aumento de la migración en las células interferidas con respecto a las células parentales, independiente de sustrato (**Figura 24B**). Este aumento de la invasión al inhibir *Adamts1* ya se ha observado previamente en otros trabajos con células tumorales (Freitas et al., 2013).



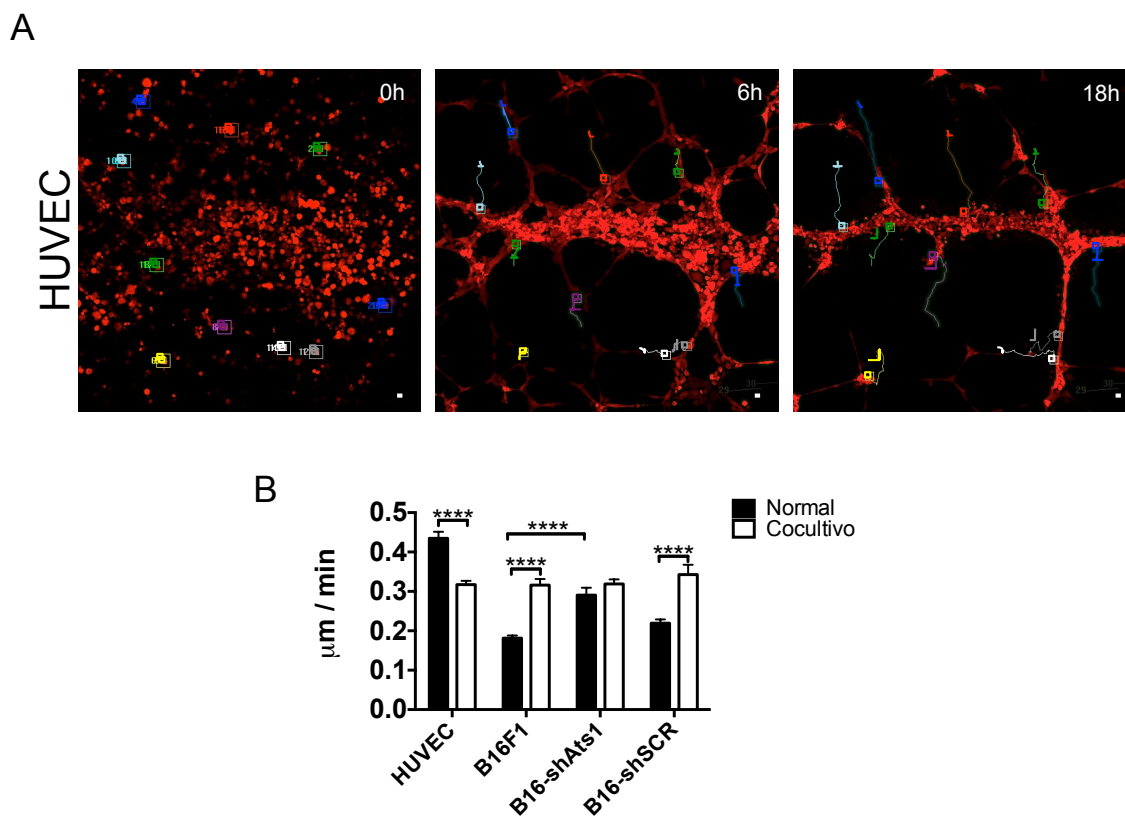
**Figura 24. Medida de las capacidades celulares de proliferación e invasión.** A, Proliferación de las células B16F1 y las correspondientes células interferidas durante 72 horas. B, Medición de la migración celular en los distintos sustratos indicados.

## Capacidad de movilidad e influencia del cocultivo en las células interferidas

Por otro lado, medimos la movilidad de las células en Matrigel a tiempo real. En este ensayo incluimos el análisis de cocultivos pudiendo así medir la influencia de la comunicación intercelular en el desarrollo de las redes vasculares. Para ello cultivamos las células B16F1 interferidas y marcadas con GFP junto con HUVECs que expresan dsRED además de los controles sin interferir. Seguimos la evolución de la formación de redes similares a endoteliales mediante microscopía *in vivo* cada 20 minutos durante 18 horas. Posteriormente, haciendo uso del programa informático Metamorph 7 fuimos capaces de medir la velocidad de movimiento de las células (**Figura 25A**).

En esta serie de datos podemos identificar que las células tumorales interferidas se desplazan más rápidamente que las células no modificadas. En segundo término se puede observar una situación llamativa en los cocultivos y es que las células endoteliales

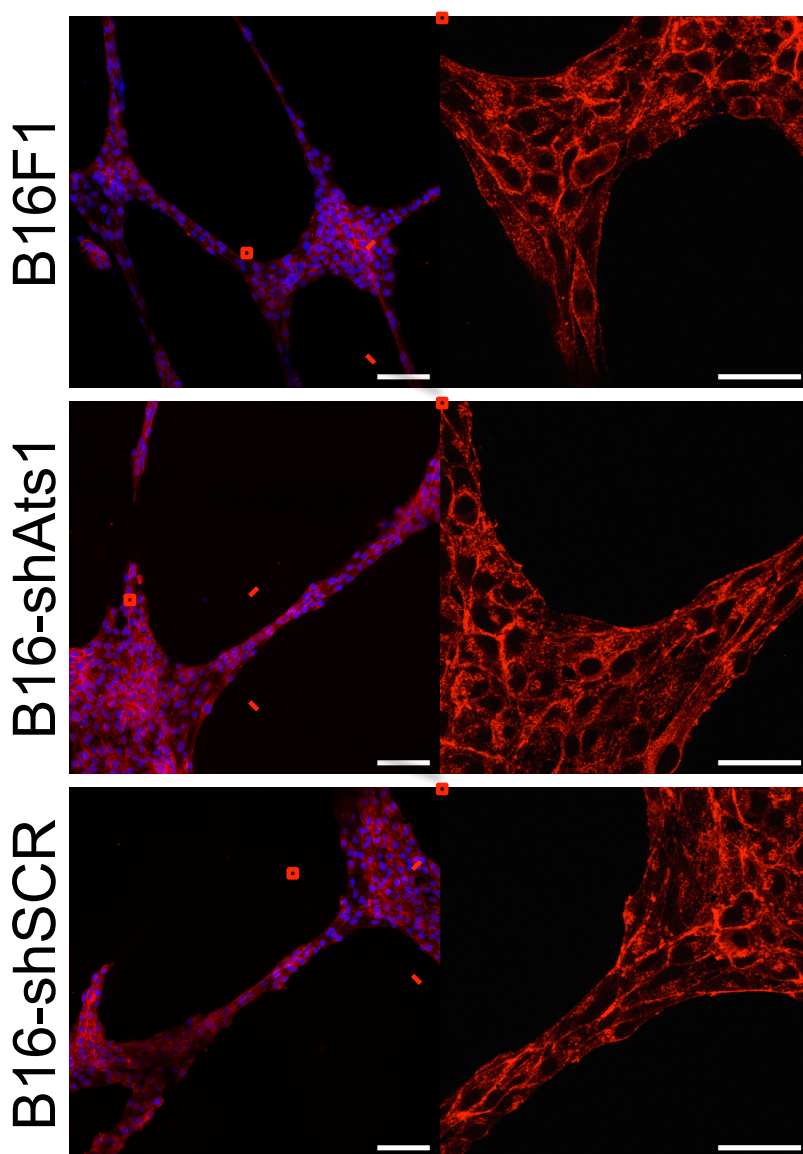
disminuyen su velocidad hasta casi la mitad. En el caso de las células tumorales, la sembrarlas con células endoteliales produce un aumento de la velocidad de desplazamiento con respecto a las células tumorales en el monocultivo. A diferencia de las células controles, las células interferidas no aumentan la velocidad de desplazamiento ya que de por sí, las células se mueven a mayor velocidad (**Figura 25B**).



**Figura 25. Formación de redes similares a endoteliales en Matrigel.** A, Figura representativa del movimiento celular de células HUVEC y su análisis en el programa informático Metamorph 7. B, Cuantificación de la velocidad celular en los cultivos en matrigel de células HUVEC, B16F1 y B16F1 interferidas para *Adams1*.

### Evaluación del citoesqueleto ante la interferencia de *Adamts1*.

En otros trabajos se ha comprobado que la interferencia de *Adamts1* produce una pérdida de adhesión de las células entre sí formando éstas estructuras más frágiles y menos estables (Casal et al., 2010). Es por ello que decidimos comprobar si en nuestro modelo también ocurría. Para ello cultivamos las células en Matrigel y teñimos las fibras de actina con Faloidina- Texas Red. Este compuesto se une a las fibras de actina del citoesqueleto permitiendo ver las zonas de contacto célula-células. En nuestro caso, a diferencia del trabajo de Casal et al., no conseguimos observar diferencias en la disposición de las fibras de actina (**Figura 26**). Esto sugiere que la disminución de los niveles de ADAMTS1 no dificulta la adhesión entre células tumorales.

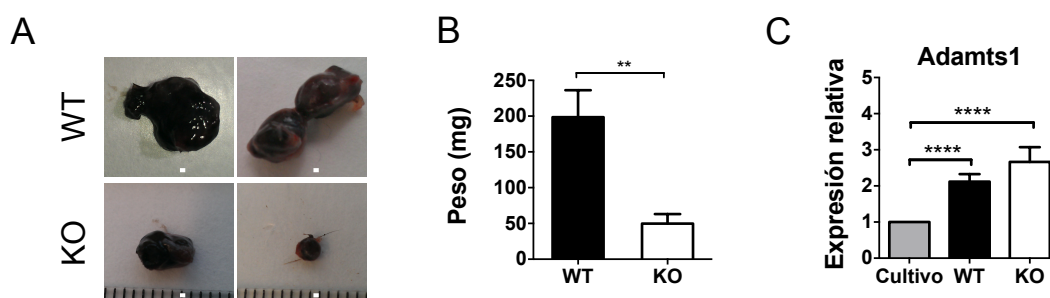


**Figura 26.** Distribución de las fibras de actina en cultivos tridimensionales de células de melanoma B16F1 y sus correspondientes células interferidas y controles. Se sembraron 50.000 células por pocillo y se tiñeron con Faloidina-Texas Red y DAPI. Escala = 100  $\mu$ m. Escala en magnificación = 50  $\mu$ m.

## PAPEL DE ADAMTS1 EN EL DESARROLLO TUMORAL. IMPLICACIONES EN ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

### Desarrollo de un modelo singénico subcutáneo de melanoma

Para entender el papel de ADAMTS1 en la angiogénesis tumoral y comprender su actividad dependiente de la matriz generamos y caracterizamos tumores singénicos utilizando células de melanoma de ratón B16F1 en animales WT (*wild type*) y KO para ADAMTS1. Como se ha descrito en el anterior apartado, las células B16F1 se caracterizaron profundamente en cuantos a sus propiedades plásticas en Matrigel y la importancia de ADAMTS1. Este modelo tumoral que desarrollamos a continuación nos va a permitir caracterizar la influencia del ADAMTS1 microambiental ya que sólo se elimina la expresión de la proteína en el hospedador y no en las células tumorales. Para la generación de tumores inyectamos las células subcutáneamente a los animales y seguimos su progresión durante 18 días tras lo que se sacrificaron los animales y diseccionaron siguiendo los protocolos pertinentes. En este punto, la evaluación de los tumores reveló una reducción significativa del desarrollo tumoral en ratones KO frente a WT, medida como peso final (**Figura 27A-B**).



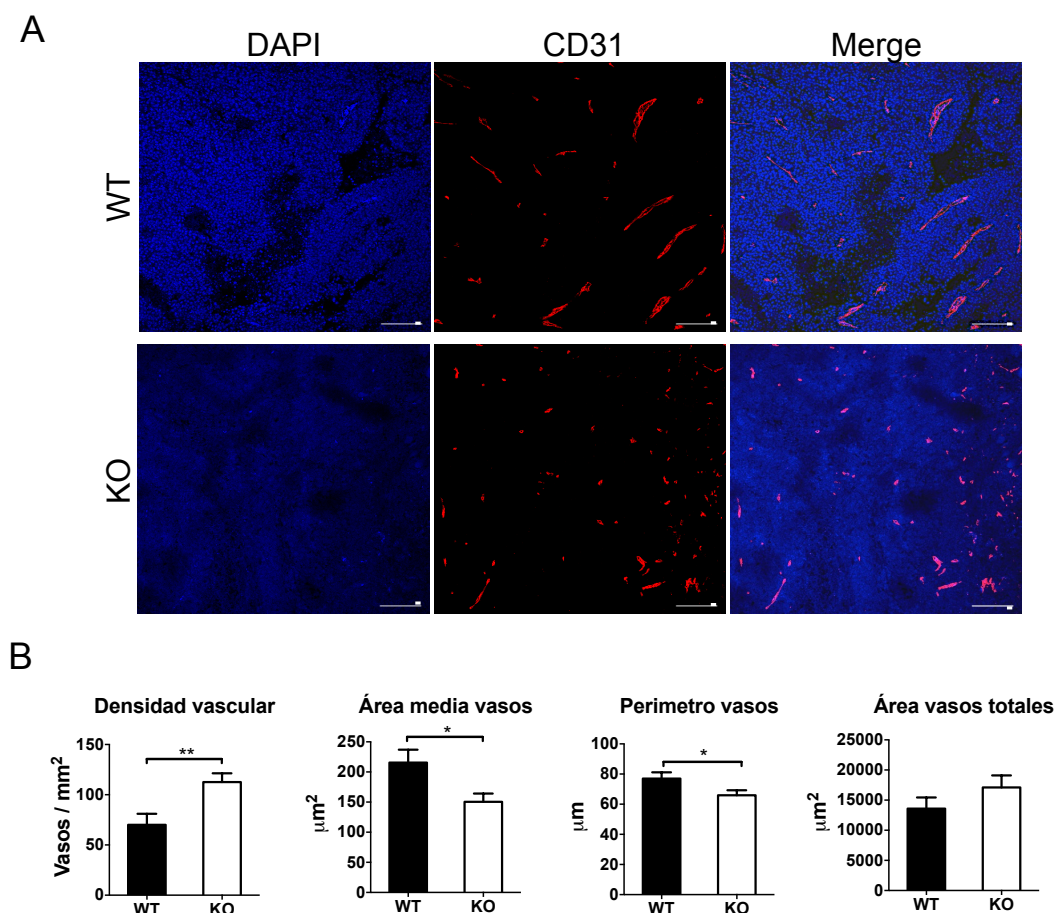
**Figura 27. Caracterización fenotípica de los tumores B16F1 en animales WT y KO.** A, Tumores representativos obtenidos de animales WT (n=7) y KO (n=6). Escala = 0,5 mm. B, Peso de los tumores representado como media  $\pm$  SEM. C, Expresión génica de *Adamts1* en los tumores obtenidos.

Teniendo en cuenta que los niveles de ADAMTS1 en las células B16F1 en cultivo eran relevantes, tanto de proteína como de mRNA (**Figura 21**), decidimos evaluar la expresión de *Adamts1* en los tumores obtenidos (**Figura 27C**). Este análisis no mostró diferencias significativas entre los tumores generados en animales ADAMTS1 WT y KO. Sin embargo, pudimos observar que *Adamts1* sí que aparecía significativamente inducido en los tumores frente si se comparaba con los niveles ya descritos en nuestros cultivos celulares. Este hecho corrobora que *Adamts1* se sobreexpresa en modelos

tridimensionales tal y como pudimos observar en los modelos celulares (**Figura 16**) y como observamos ahora en los tumores de ratón. Finalmente, la disminución del tamaño tumoral junto con el mantenimiento de niveles similares de expresión de *Adamts1* entre animales ADAMTS1 WT y KO implican que la ausencia de ADAMTS1 en una población celular directamente derivada del hospedador (por ejemplo, fibroblastos, células endoteliales o células del sistema inmune) es suficiente para producir un retraso severo en el desarrollo tumoral.

### Análisis del desarrollo tumoral y la arquitectura vascular en el modelo tumoral B16F1-ADAMTS1 KO

Tal y como han mostrado estudios anteriores, las alteraciones en los niveles de ADAMTS1 puede estar acompañada de cambios en la morfología general y en la consistencia del tumor. Adicionalmente estos cambios pueden asociarse a alteraciones en la vasculatura (Gustavsson et al., 2010; Iruela-Arispe et al., 2003; Liu et al., 2006;



**Figura 28. Caracterización de la vasculatura tumoral.** A, Secciones parafinadas de tejido tumoral mostrando una tinción mediante inmunofluorescencia de Endomucina. Escala= 200 µm. B, Análisis morfométrico de la vasculatura. Se muestran Densidad vascular (número de vasos/ mm<sup>2</sup> de tejido), área media de los vasos, perímetro medio de los vasos y Área de vasos totales como el área que cubren todos los vasos

Martino-Echarri et al., 2013; Obika et al., 2012; Rodríguez-Manzaneque et al., 2015). Por ello, decidimos explorar la arquitectura vascular en nuestro modelo. Primero hicimos inmunotinciones con un anticuerpo primario dirigido contra Endomucina, un marcador endotelial (**Figura 28A**). Posteriormente, a partir de imágenes de estas tinciones obtenidas mediante microscopía confocal, hicimos uso del programa informático Metamorph 7, el cual nos permite cuantificar múltiples parámetros de manera objetiva. Estos análisis revelaron diferencias claras en una serie de parámetros relacionados con la naturaleza de la vasculatura. A primera vista ya encontramos un aumento significativo de la densidad vascular en el grupo de animales KO cuando se compararon con el grupo control WT (**Figura 28B**). El aumento en el número de vasos correlaciona negativamente con los resultados previos en los que se encontraba una reducción del tamaño tumoral. No obstante, parámetros adicionales tales como el área media del lumen del vaso, el área total que cubren los vasos y el perímetro de los vasos no seguían la línea de los datos de densidad vascular. De hecho, los vasos que encontramos en los tumores desarrollados en los ratones KO mostraban una reducción en el área del lumen así como en el perímetro de los vasos, todo ello correlacionando directamente con el desarrollo tumoral. Finalmente, el área total cubierta por todos los vasos no mostraba diferencias significativas (**Figura 28B**).

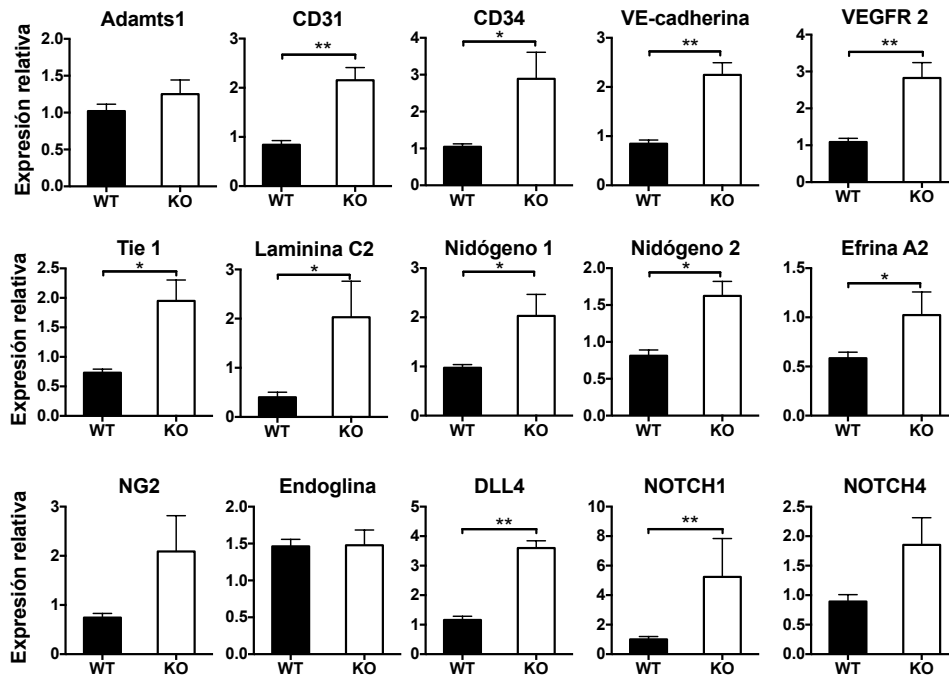
### **Análisis de la expresión génica de distintos marcadores en nuestro modelo tumoral**

En consonancia con los cambios observados en la vasculatura, decidimos complementar estos estudios con un análisis de la expresión génica de distintos marcadores relacionados con el endotelio como CD31, CD34, VE-cadherina, VEGFR2, Endogлина, Tie1, NG2, DLL4, NOTCH1 y NOTCH4, y también ADAMTS1 y sus sustratos Nidógeno 1 y 2. De acuerdo al aumento de la densidad vascular descrita anteriormente, los resultados de este perfil de expresión mostraron que todos estos genes relacionados con el endotelio, con excepción de la Endogлина, aparecen significativamente sobreexpresados en los tumores de ratones KO en comparación con los WT (**Figura 29**).

Estos datos, junto con los del apartado anterior corroboran que la ausencia de ADAMTS1 en las células derivadas del hospedador conllevan un incremento significativo en la densidad vascular. Sin embargo estos nuevos vasos parecen ser no funcionales ya que el tamaño de los tumores es significativamente menor en los animales



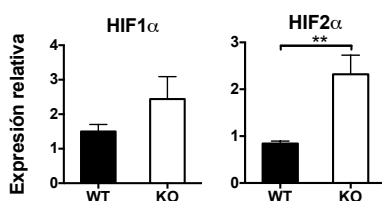
KO. En cualquier caso, nuestros resultados confirman el papel de ADAMTS1 en mecanismos con un claro componente angiomodulatorio, aunque aún se hace necesario investigar más profundamente estas acciones.



**Figura 29. Expresión génica de marcadores moleculares relacionados con el endotelio y sustratos de ADAMTS1.** La expresión génica se determinó mediante qPCR. 1 µg de mRNA se obtuvo de los lisados tumorales. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados.

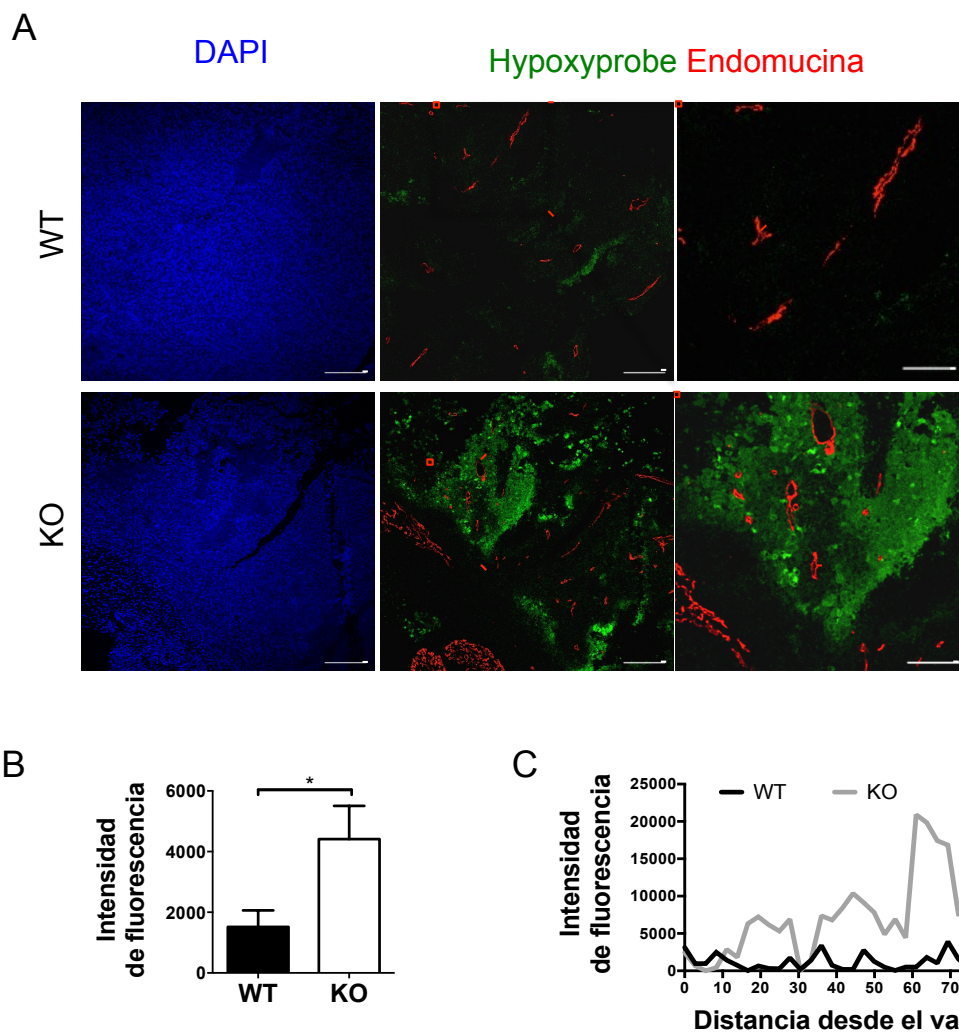
### Evaluación de la distribución de zonas hipóxicas en los tumores

Como he comentado anteriormente, el hecho de descubrir tumores de menor tamaño pero con una mayor densidad vascular en los ratones ADAMTS1 KO, nos dirigió a investigar la funcionalidad de la vasculatura. Para ello era importante evaluar las zonas hipóxicas en los tumores ya que variaciones en la funcionalidad vascular conllevan cambios en la distribución de nutrientes y oxígeno. De manera preliminar evaluamos la expresión génica de los marcadores de hipoxia HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  mediante qPCR. Nuestros resultados muestran que ambos marcadores aparecen sobreexpresados en los tumores de los animales ADAMTS1 KO en comparación con los WT (**Figura 30**).



**Figura 30. Expresión génica de los factores de transcripción HIF en tumores crecidos en animales ADAMTS1 WT y KO.** La expresión génica se determinó mediante qPCR. 1 µg de mRNA se obtuvo de los lisados tumorales. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados.

Posteriormente analizamos directamente la existencia de regiones hipóxicas en los tumores. Para estos estudios hemos hecho uso de una sonda fluorescente comercial que se une a regiones hipóxicas, Hypoxyprobe, ampliamente utilizada en investigación (Boutrid et al., 2008; Carlin et al., 2009; Gaustad et al., 2012; Zhou et al., 2014). Esta sonda se inyecta intraperitonealmente a los animales antes de sacrificarlos (Materiales y métodos). Tras la disección y parafinado de los tumores, la sonda se puede visualizar con un anticuerpo secundario antiHypoxyprobe-FITC, en combinación con la inmunolocalización de Endomucina que nos permite identificar la vasculatura (**Figura 31A**). Este ensayo reveló que en los tumores de animales WT se apreciaban un menor número de regiones hipóxicas (**Figura 31B**). Por el contrario, los tumores de los animales KO mostraban múltiples regiones hipóxicas. Una evaluación más detallada



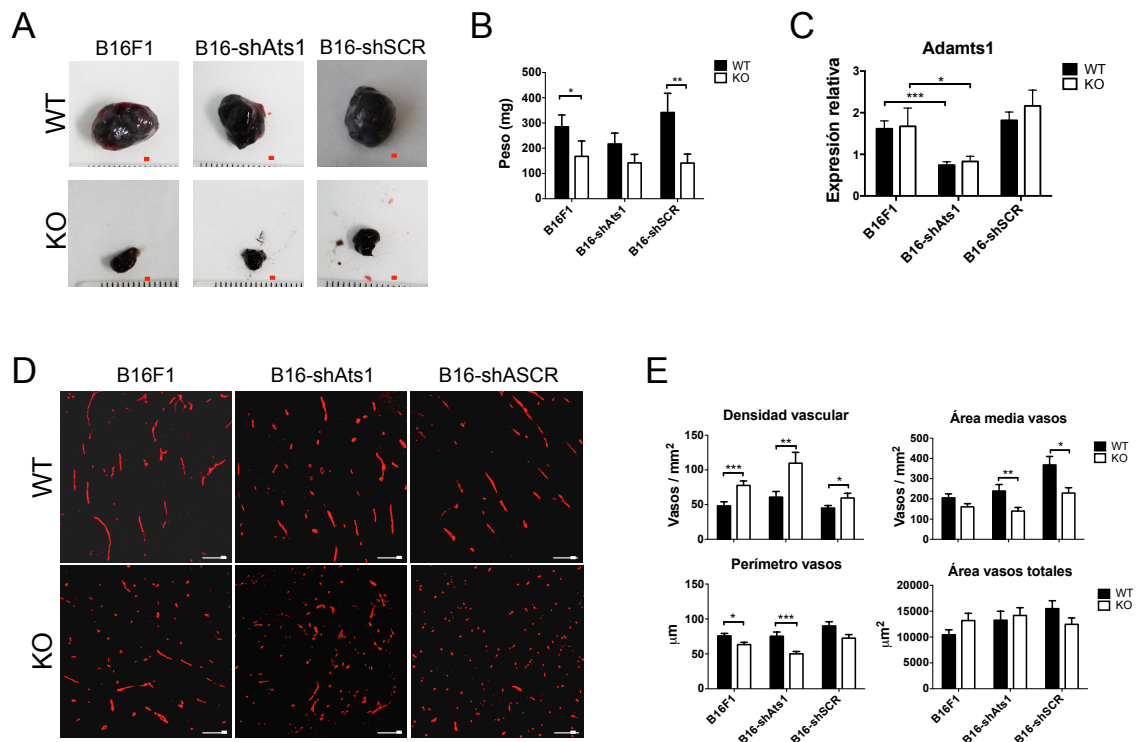
**Figura 31. Inmunotinción de las zonas hipóxicas en tumores crecidos en ratones ADAMTS1 WT y KO.** A, Los paneles muestran el inmunomarcaje con Hypoxyprobe (verde) y Endomucina (rojo) de tumores originados a partir de células B16F1 de melanoma. Escala = 200 µm. Escala en magnificación = 100µm. B, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media que encontramos en las secciones tumorales. C, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las zonas adyacentes a los vasos.

mostró que las zonas hipóxicas no colocalizaban necesariamente con regiones avasculares confirmando la disfuncionalidad de algunos de parte de la neovasculatura (**Figura 31A, Zoom**).

Al medir la intensidad de fluorescencia en las zonas adyacentes a algunos vasos representativos pudimos observar que ésta aumenta en los tumores derivados de los animales KO a medida que nos alejamos del vaso (**Figura 31C**). Se puede deducir, entonces, que a medida que nos alejamos del vaso la hipoxia es mayor y por tanto la capacidad de los vasos para difundir oxígeno debe ser limitada.

### Desarrollo de tumores singénicos con células B16F1 en las que se ha inhibido la expresión de *Adamts1*

Llegados a este punto, para analizar la contribución de ADAMTS1 proveniente de las células tumorales, decidimos centrarnos en el uso de células B16F1 cuya expresión de *Adamts1* había sido inhibida en los experimentos previos, y evaluar sus propiedades tumorogénicas en animales WT y KO para ADAMTS1. Tal y como mostramos en la



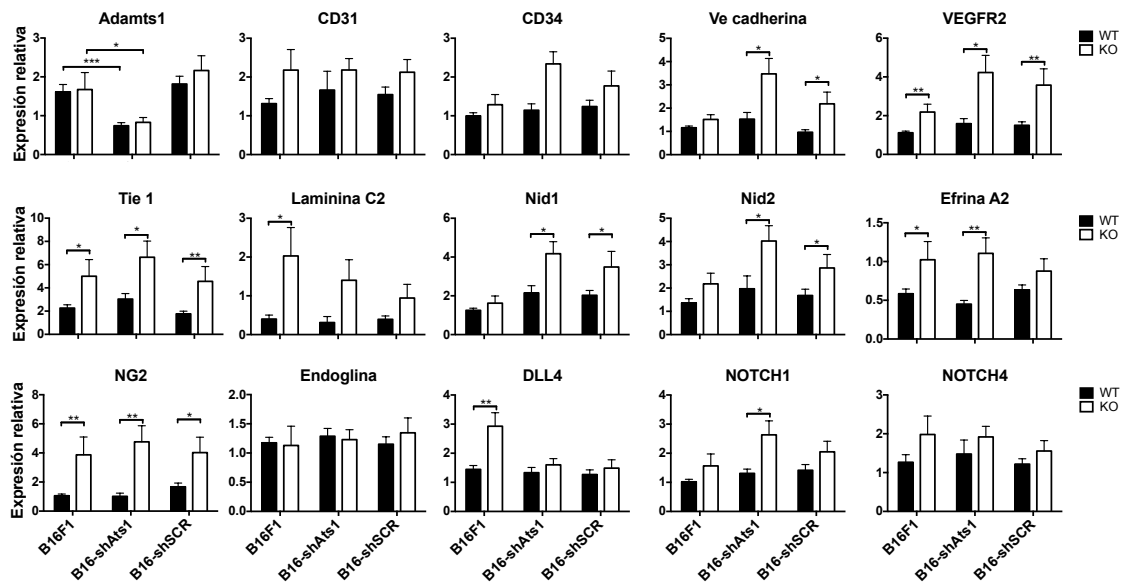
**Figura 32. Caracterización de los tumores obtenidos al inyectar células interferidas y los correspondientes controles en animales ADAMTS1 WT y KO.** A, Tumores representativos obtenidos. Escala = 5mm. B, Peso de los tumores tras 18 días. C, Expresión génica de *Adamts1* en los tumores obtenidos. D, Inmunotinción de secciones tumorales mostrando tinción con Endomucina. Escala = 200 µm. E, Análisis morfométrico de la vasculatura.

**Figura 21**, conseguimos reducir los niveles de *Adamts1* en un 50% aproximadamente. Seguimos el mismo protocolo que en experimentos anteriores e inyectamos 1 millón de células por ratón durante 18 días tras lo cual procedimos al sacrificio del animal y a la extracción de los tumores. El análisis del tamaño y del peso de los tumores no mostraba diferencias significativas entre los tumores generados con células B16F1 ó con las correspondientes células inhibidas B16-shAts1, ni en animales WT ni en animales KO. Sin embargo seguíamos observando diferencias entre los tumores generados en animales WT y KO independientemente del tipo celular con el que se desarrollasen sus tumores (**Figura 32A-B**).

En los tumores generados con células B16-shAts1 confirmamos un porcentaje de expresión de *Adamts1* menor al 50%, similar al que encontrábamos en los cultivos celulares (**Figura 32C**). En línea con nuestros experimentos previos, evaluamos la composición de la vasculatura mediante una inmunotinción de Endomucina. Este análisis confirmó los datos obtenidos previamente. Podemos observar, entre los animales KO, un aumento de la densidad vascular con respecto a los grupos WT junto con una disminución del área y el perímetro vascular (**Figura 32D**). El área total que ocupan el total de vasos permanece invariable entre animales WT y KO independientemente de los niveles de *Adamts1* en la célula tumoral. En su conjunto, todos estos datos apoyan los resultados previos en los que ADAMTS1 derivado de las células del huésped tendría un papel predominante en el desarrollo tumoral, mientras que el papel del ADAMTS1 derivado del tumor parece ser más limitado al no observar cambios significativos en aquellos tumores generados con células tumorales inhibidas.

## Patrón de expresión génica tras la interferencia de *Adamts1*

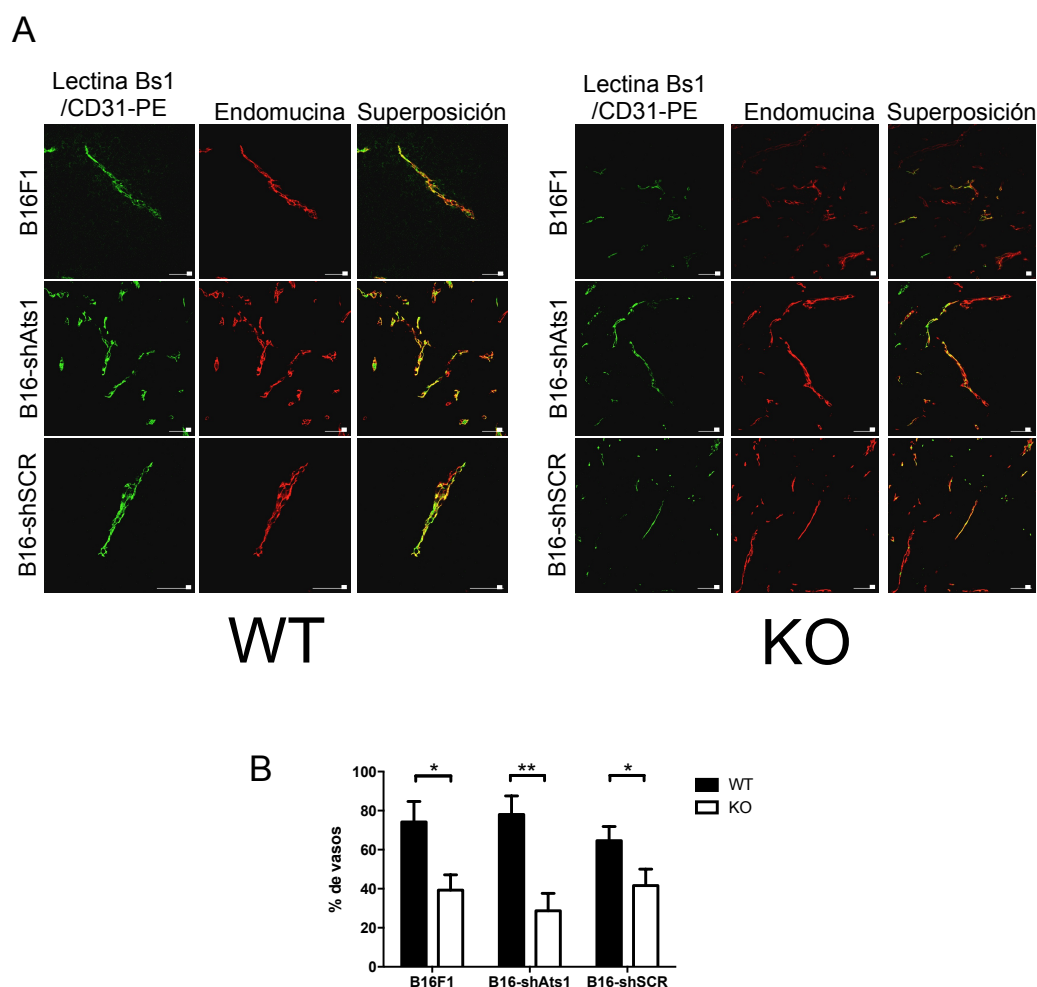
Una vez analizada la estructura vascular de los tumores producidos con células interferidas, caracterizamos la expresión génica de éstos para ver si se mantenían los patrones obtenidos en experimentos anteriores. Efectivamente, los resultados de qPCR confirmaron que las alteraciones ocurrían solamente cuando comparábamos animales WT y KO y que la interferencia de la expresión de *Adamts1* tumoral no afectaba en general a la expresión de los marcadores de endotelio, sustratos de ADAMTS1 y otras moléculas relacionadas que venimos analizando (**Figura 33**). Estos datos confirman que posiblemente el papel del ADAMTS1 derivado del tumor tiene un papel limitado en cuanto a influir en el desarrollo tumoral, al menos en este modelo tumoral.



**Figura 33. Expresión génica de marcadores moleculares relacionados con el endotelio y sustratos de ADAMTS1 tras la interferencia de *Adamts1* en las células de melanoma B16F1.** La expresión génica se determinó mediante qPCR. 1 µg de mRNA se obtuvo de los lisados tumorales. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados.

## Análisis de la funcionalidad de la vasculatura

Con el objetivo de analizar la funcionalidad de la vasculatura *in situ*, en esta serie de experimentos incluimos el uso de otra técnica adicional, consistente en la inyección intravenosa, antes del sacrificio de los animales, de Lectina Bs1-FITC (más detalles en Materiales y métodos). De esta manera la Lectina se distribuye a través de la vasculatura del animal. Si los vasos no son funcionales no hay tal distribución y no se producirá el marcaje. Una vez se diseccionan los tumores y se parafinan hicimos una tinción



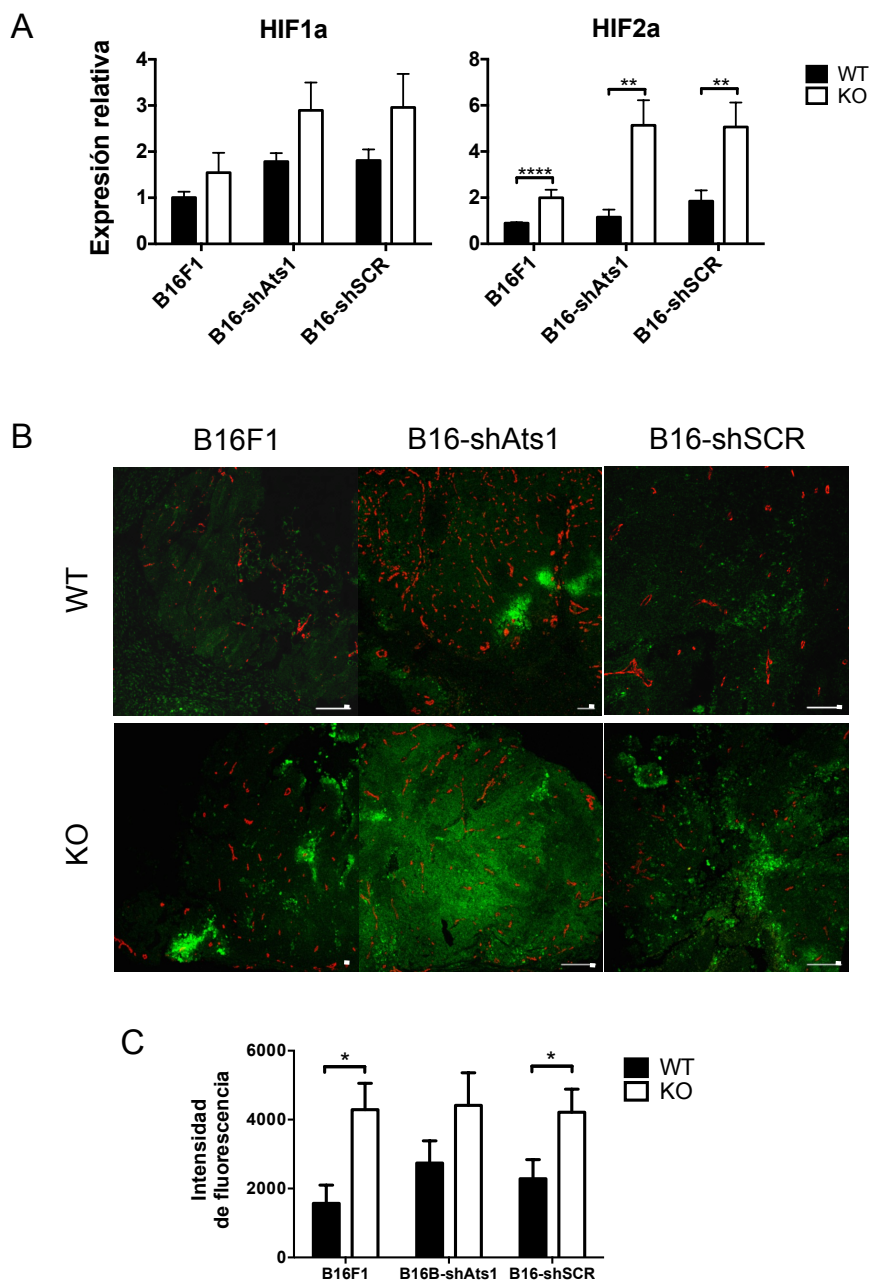
**Figura 34. Determinación de la viabilidad de los vasos tumorales.** A, Inmunotinción de secciones tumorales marcadas con Lectina Bs1 ó CD31-PE (verde) y su posterior tinción con Endomucina (rojo). Escala = 200  $\mu$ m. B, Cuantificación del número de vasos que colocalizan en cada sección tumoral.

diferencial para todos los vasos con un anticuerpo contra Endomucina. De esta forma los vasos funcionales quedaban marcados en amarillo como resultado de la superposición de los rojo y verde, correspondientes a las tinciones con Endomucina y Lectina respectivamente, mientras que los no funcionales aparecen sólo rojos. Paralelamente, con la misma finalidad, en un grupo control inyectamos CD31/PE

marcando al final con Endomucina. Sin embargo, en este caso el secundario era FITC y los colores se invertían al estar CD31 conjugando con un fluoróforo rojo, PE. No obstante, el programa informático del microscopio confocal nos permite modificar la configuración de visualización de las imágenes y así poder mostrar todos los vasos funcionales en amarillo y los no funcionales en rojo. La evaluación al microscopio reveló que los vasos sanguíneos de los tumores originados en animales ADAMTS1 KO mostraban un menor porcentaje de colocalización de ambas moléculas, en claro contraste con el grupo ADAMTS1 WT (**Figura 34A**). Adicionalmente y sustentando nuestros datos anteriores, la cuantificación del número de vasos que mostraban colocalización (**Figura 34B**) ponía de manifiesto que el número de vasos funcionales en los tumores de los animales ADAMTS1 WT es mayor al de los animales ADAMTS1 KO y que la inhibición de ADAMTS1 en las células tumorales no produce ninguna diferencia significativa entre los tumores desarrollados en animales WT y KO.

## Evaluación de las zonas hipóxicas en tumores singénicos generados a partir de células de melanoma B16F1 con *Adamts1* interferido

En consonancia con nuestras observaciones de anteriores apartados, también llevamos a cabo el estudio de la hipoxia en esta última serie de tumores. Primero evaluamos por qPCR los niveles de expresión de los factores de transcripción HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  (**Figura 35A**). En estas ocasiones volvimos a encontrar que los niveles en los que vemos los



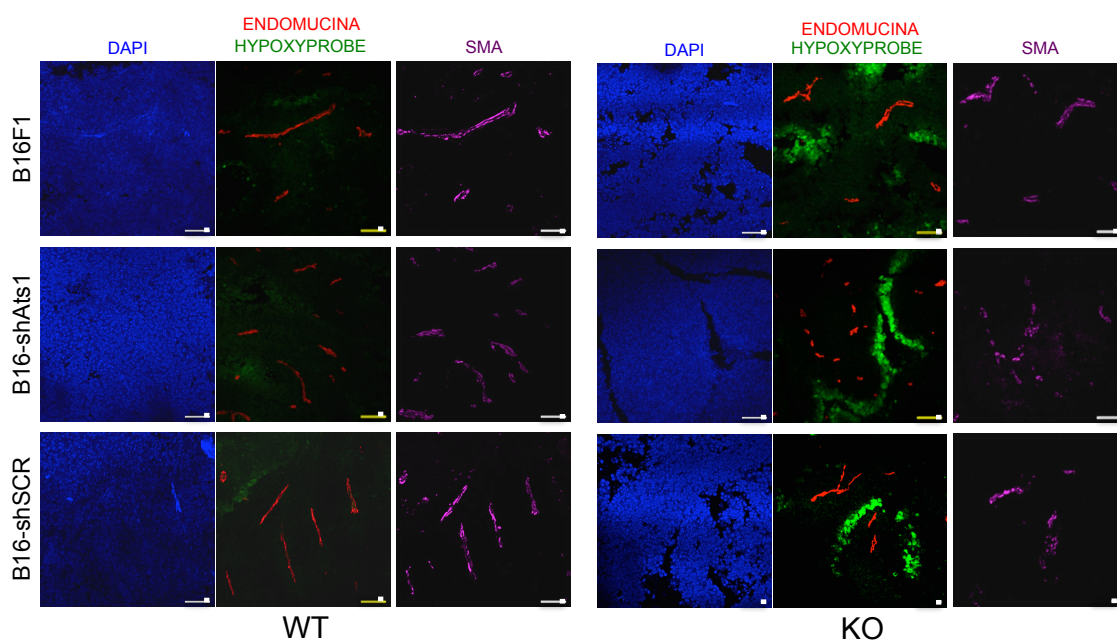
**Figura 35. Inmunotinción de las zonas hipóxicas en tumores originados a partir de células B16F1 parentales e interferidas para *Adamts1* en ratones ADAMTS1 WT y KO.** A, La expresión génica se determinó mediante qPCR. Se retrotranscribió a cDNA 1 $\mu$ g de mRNA de los lisados tumorales. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados. B, Los paneles muestran el inmunomarcado con Hypoxyprobe (verde) y Endomucina (rojo) de secciones tumorales. Escala = 200  $\mu$ m. C, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media emitida por la sonda Hypoxyprobe en las secciones tumorales.



cambios más significativos entre los grupos ADAMTS1 WT y ADAMTS1 KO, independientemente de las células tumorales inyectadas, inhibidas o no. La visualización de la sonda Hypoxyprobe y las posteriores mediciones de intensidad de fluorescencia (**Figura 35B-C**) muestran que hay un aumento de zonas de hipoxia en ratones ADAMTS1 KO frente a ADAMTS1 WT y que la influencia de la interferencia de *Adamts1* es limitada o nula a la hora de incrementar la hipoxia con respecto a los controles. Todos estos datos juntos refuerzan la idea de que es ADAMTS1 secretado por las células derivadas del hospedador, y no el secretado por las células tumorales, el responsable del crecimiento del tumor a través de la inducción de un mecanismo que promueve el desarrollo de la vasculatura en los animales ADAMTS1 WT.

### Evaluación del estado de los pericitos como medida de integridad vascular: tinciones con SMA

Por último, también en línea con nuestras observaciones que confirman una disminución en la funcionalidad de los vasos y un aumento de la hipoxia en ratones KO, decidimos analizar el recubrimiento de pericitos en torno a las estructuras vasculares, como medida de su integridad. Tal y como pudimos observar tras el marcaje con SMA (**Figura 36**), en todas las secciones tumorales los vasos aparecen recubiertos de pericitos, no pudiéndose encontrar diferencia alguna ni entre los grupos WT y KO ni entre las células B16F1 interferidas o las parentales. El hallazgo de vasos recubiertos de

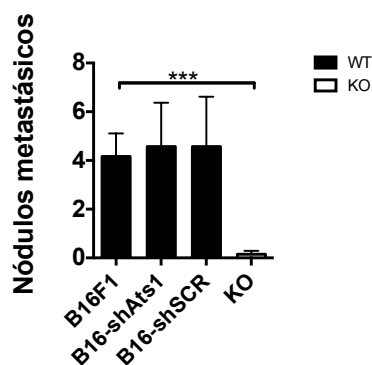


**Figura 36. Inmunotinción de SMA en secciones de tumores originados en animales ADAMTS1 WT y KO partir de células B16F1 y B16-shAts1.** Los paneles muestran el inmunomarcaje con Hypoxyprobe (verde), Endomucina (rojo) y SMA (magenta) de secciones tumorales Escala = 100  $\mu$ m

pericitos también en zonas de hipoxia (mayoritarias en animales ADAMTS1 KO) nos sugiere que la causa de una menor funcionalidad de esa vasculatura no se debe a la madurez del vaso, o al menos en cuanto a su recubrimiento por pericitos (**Figura 34**).

### Contribución de ADAMTS1 al proceso de metástasis

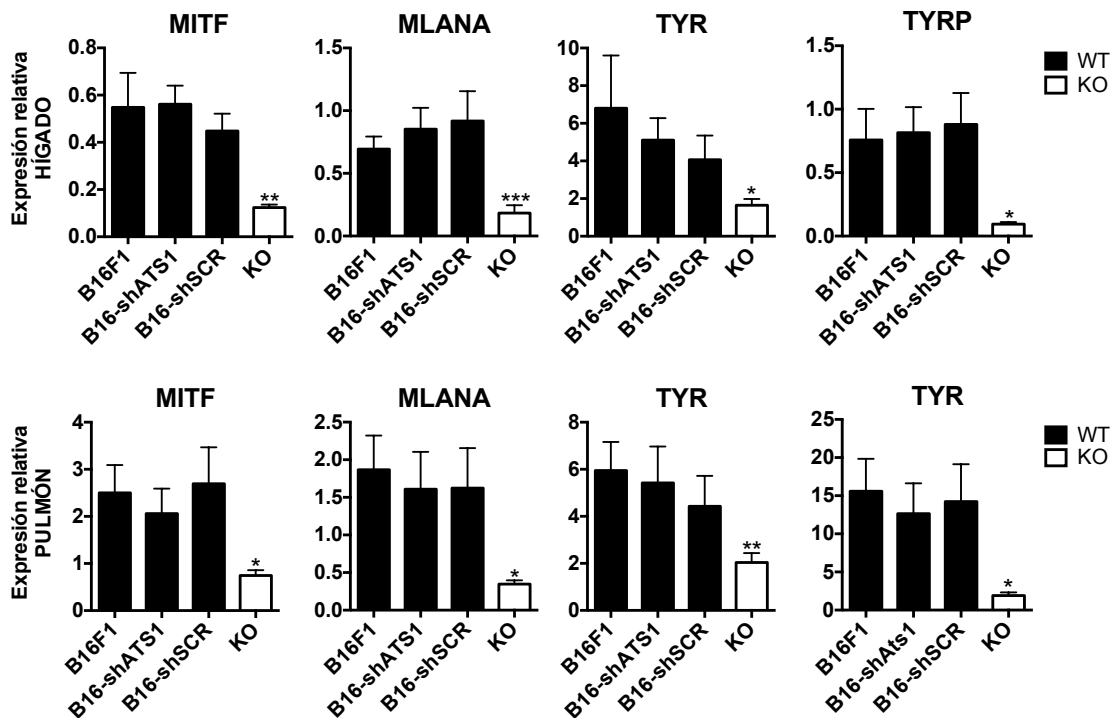
El papel de las proteasas en general y su influencia en el desarrollo de metástasis se ha documentado en la introducción. Respecto a ADAMTS1, son varios los trabajos que indican su implicación en este proceso. Por ejemplo se observó que el corte proteolítico de TSP1, como sustrato de ADAMTS1, juega un papel relevante (Lee et al., 2010). Con toda esta información precedente, y en línea con el desarrollo de nuestra propia línea de trabajo, decidimos estudiar el papel de ADAMTS1 en la formación de metástasis. Para ello inyectamos 300.000 células B16F1 interferidas y parentales de manera I.V. durante 13 días a ratones ADAMTS1 WT pudiendo así valorar la contribución del ADAMTS1 tumoral al desarrollo de metástasis. Paralelamente, inoculamos un grupo de ratones KO con células B16F1 para evaluar el papel de ADAMTS1 del hospedador en la aparición de metástasis. En un estudio previo verificamos que esta configuración experimental daría lugar solamente a micrometástasis. Para evaluar el desarrollo de las micrometástasis analizamos mediante qPCR la expresión de cuatro genes identificados como marcadores de melanoma: *Mitf*, *Mlana*, *Tyr*, *Tyrp*. Además contabilizamos la aparición de metástasis en forma de nódulos metastáticos y analizamos secciones tumorales al microscopio mediante tinciones de Hematoxilina-Eosina. A nivel macroscópico constatamos que la aparición de metástasis era muy reducida y sólo conseguimos observar nódulos metastáticos en el hígado de algunos animales, no encontrando ninguna metástasis visible en los pulmones (**Figura 37**).



**Figura 37.** Cuantificación del número de micrometástasis encontradas en los hígados de los animales.

En cuanto a la interferencia de las células tumorales, vimos que la interferencia no influía en la capacidad de estas células formar metástasis. Donde si fuimos capaces de detectar cambios fue entre los animales WT y KO, ya que éstos últimos no mostraban metástasis observables tampoco en el hígado. Estos datos concuerdan con los eventos que venimos analizando de desarrollo tumoral, sugiriendo que ADAMTS1 tumoral tampoco tendría un papel en el inicio de la metástasis y que una vez más esta función correspondería al ADAMTS1 microambiental.

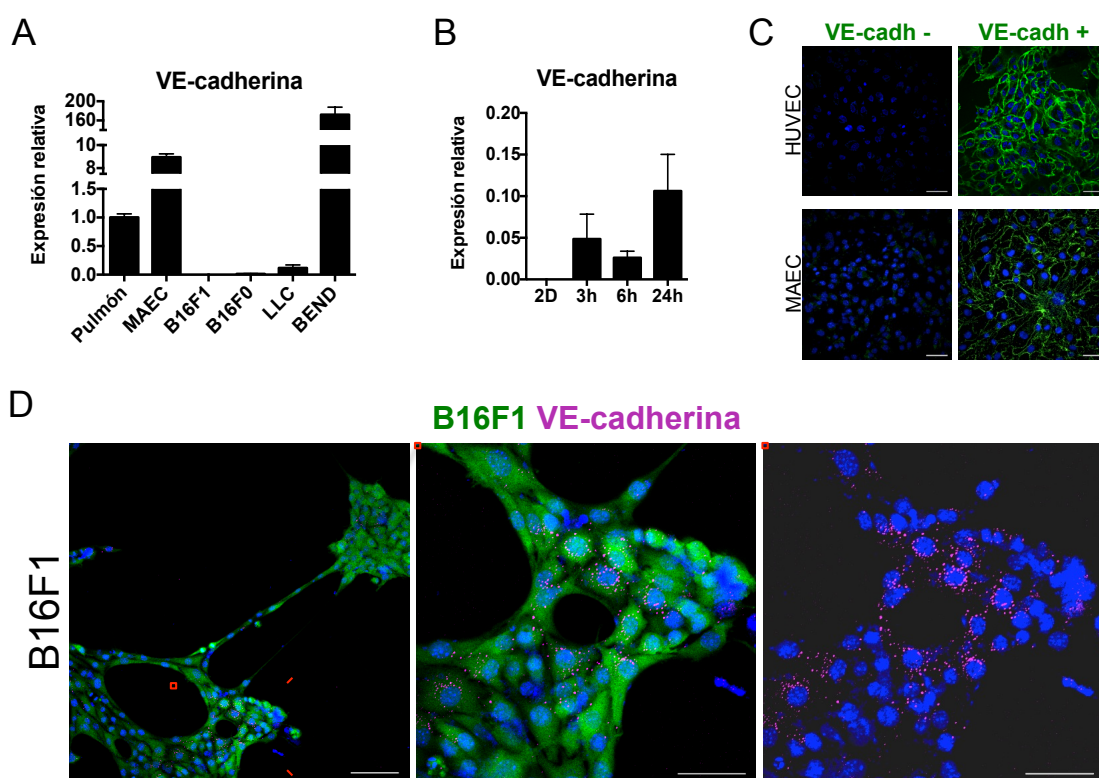
En cuanto al análisis de expresión de los marcadores de melanoma, encontramos que reproducían la situación observada a nivel macroscópico, aunque esta vez sí, con resultados positivos para el pulmón. La tendencia sigue siendo la misma, con niveles superiores en aquellos casos en los que se utilizaba el animal WT frente al KO y con niveles similares entre las células interferidas, las parentales y los correspondientes controles (Figura 38).



**Figura 38. Expresión génica de marcadores de melanoma en hígados y pulmones de ratón.** La expresión génica se determinó mediante qPCR. 200 ng de mRNA de los lisados tisulares se retrotranscribieron a cDNA. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados.

## VE-cadherina y su expresión en distintos modelos tridimensionales de B16F1

La VE-cadherina es una molécula clave en la vasculatura y en los fenómenos de mimetismo vascular. Los trabajos de Hendrix et al., en la última década, explican por ejemplo que es una molécula necesaria para la formación de redes similares a endotelial y que su desregulación acababa con la formación de redes en cultivos tridimensionales por completo (Hendrix et al., 2001). Además en este mismo trabajo observan que esta molécula se expresa solamente por aquellas líneas de melanoma más agresivas y que no está presente en las líneas poco agresivas. Ante esta situación decidimos explorar el papel de VE-cadherina en nuestra línea celular B16F1 tanto en cultivos tridimensionales como en modelos tumorales. Tal y como podemos ver en la **Figura 39A** los niveles de mRNA de VE-cadherina en nuestra línea celular B16F1 son bajos en comparación con las líneas endoteliales y el pulmón a pesar de, como ya hemos mostrado anteriormente, son capaces de formar redes similares a endoteliales. En cuanto a cultivos

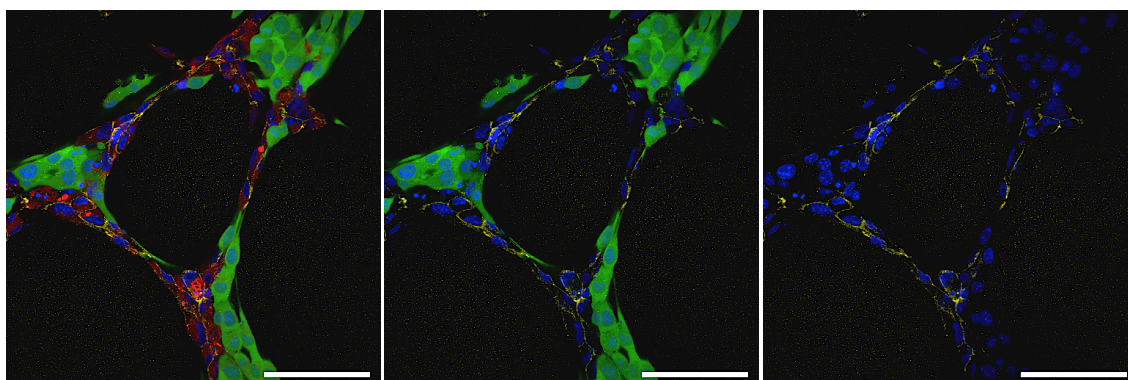


**Figura 39. Expresión de VE-cadherina en distintas configuraciones.** A, Expresión génica medida mediante qPCR en distintas líneas celulares. B, Expresión génica en las células B16F1 sembradas en Matrigel. C, Inmunotinción de VE-cadherina en células endoteliales humanas (HUVEC) y de ratón (MAEC). D, Inmunotinción de VE-cadherina (magenta) en células B16F1-GFP sembradas en Matrigel.

tridimensionales, observamos que existe una ligera sobreexpresión de los niveles de VE cadherina cuando sembramos nuestro modelo celular B16F1 en matrigel. No obstante

los niveles de sobreexpresión siguen siendo modestos (**Figura 39B**). La inmunotinción de células endoteliales, tanto de humanas (HUVEC) como de ratón (MAEC) dio un marcaje positivo característico en el que podemos ver la VE-cadherina en las zonas de unión célula-célula (**Figura 39C**). Cuando sembramos nuestras células tumorales en Matrigel y las sometimos a inmunotinción observamos que los niveles de VE-cadherina eran muy bajos y la poca tinción positiva que conseguíamos encontrar era en un formato de granulado disperso en el citoplasma y no en las zonas de unión célula-célula como cabría de esperar (**Figura 39D**).

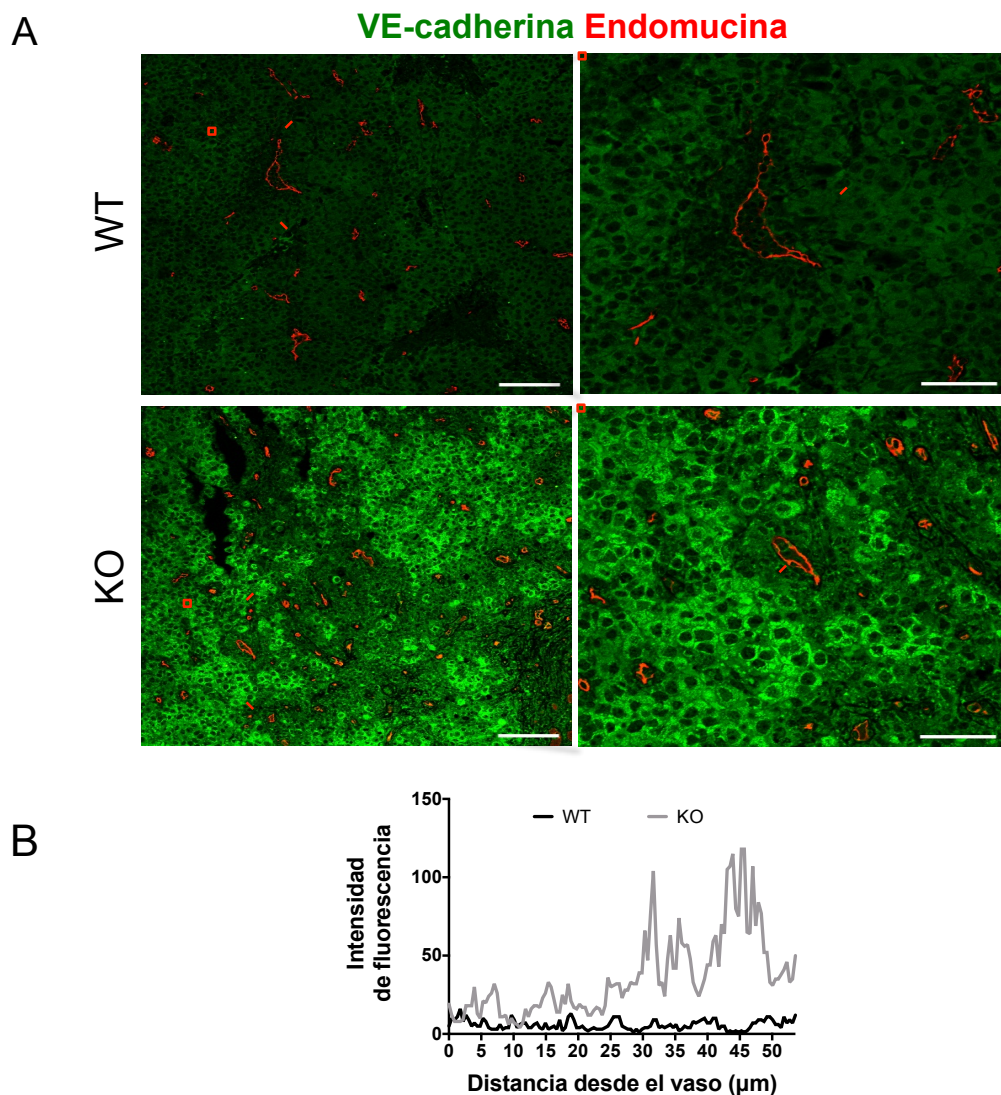
Ante esta situación decidimos analizar nuestras células en cocultivo para ver si eran capaces de establecer algún tipo de interacción célula-célula entre las células tumorales B16F1 y las células endoteliales. Pudimos observar que sólo las células endoteliales expresan VE-cadherina y que no forman ningún tipo de interacción en las zonas de contacto con las células tumorales. (**Figura 40**). Es interesante resaltar que los niveles que observamos se corresponden con los ya obtenidos en experimentos anteriores y que se muestran en la **Figura 20**.



**Figura 40. Inmunomarcaje de VE-cadherina en células tumorales B16F1 y endoteliales en cocultivo.** Células HUVEC en rojo, B16F1 en verde y VE-cadherina en amarillo. Escala = 100  $\mu$ m.

Finalmente, y yendo un paso más lejos en cuanto a complejidad, analizamos la expresión de VE-cadherina en nuestro modelo tumoral. Encontramos un aumento de la expresión génica de VE-cadherina en los animales ADAMTS1 KO cuando los comparábamos con la expresión de los animales WT y que además estos niveles eran superiores a los que podíamos encontrar en los cultivos celulares (**Figura 29**). Además, pudimos observar en las inmunotinciones que la sobreexpresión de VE-cadherina la encontrábamos en las células tumorales. La inmunotinción de VE-cadherina en secciones tumorales mostró que efectivamente se producía un aumento en la cantidad de VE-cadherina y que además esta se expresaba en mayor medida cuanto más

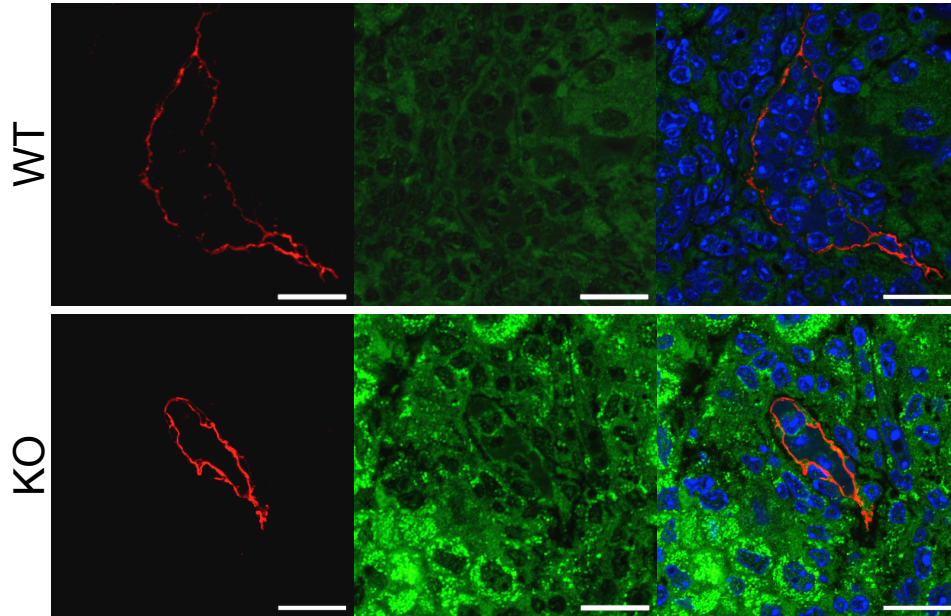
distancia había desde los vasos del tumor (**Figura 41A**). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia mostraba, que efectivamente, la disposición de VE-cadherina era homogénea a en toda la sección tumoral, mientras que se veía aumentada en las secciones KO a medida que la separación con los vasos era mayor (**Figura 41B**). Este de marcaje gradual es reminiscente de lo observado también en nuestras determinaciones de las regiones hipóxicas, documentado anteriormente, y correlaciona en gran medida con el hecho de que VE-cadherina es una molécula inducida por hipoxia y relacionada con fenómenos de mimetismo vasculogénico (Zhao et al., 2012).



**Figura 41. Expresión de VE-cadherina en secciones de tumores B16F1 crecidos en animales ADAMTS1 WT y KO.** A, Inmunotinción de VE-cadherina en secciones tumorales. VE-cadherina (verde) y Endomucina (rojo). Escala = 200  $\mu\text{m}$ . Escala en magnificación = 50  $\mu\text{m}$ . A, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la secciones tumorales en A.

Otra característica importante que hemos de resaltar, y que ya encontramos en los cultivos en Matrigel de B16F1 es que la presencia de VE-cadherina se muestra en forma

de gránulos en el citoplasma (**Figura 43**) y no en la membrana formando las uniones características célula-célula que se pueden ver en la **Figura 39C**.

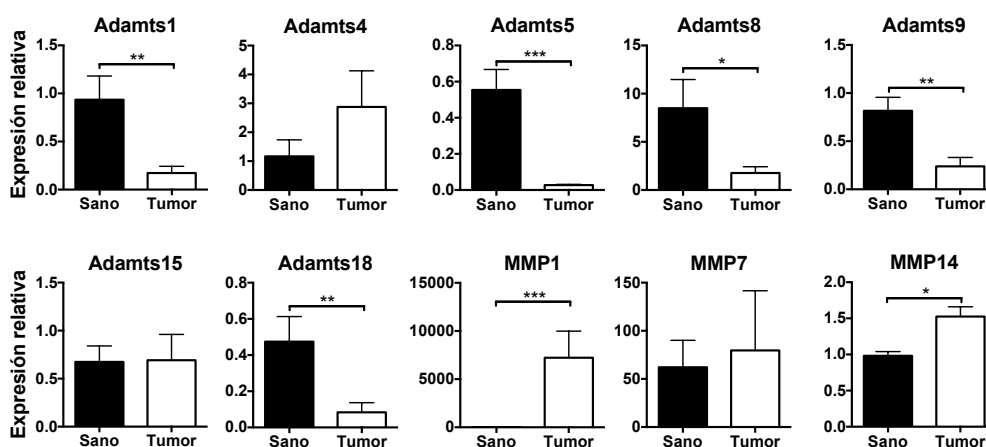


**Figura 42. Inmunotinción de secciones de tumores B16F1 desarrollados en animales ADAMTS1 WT y KO.** A, Inmunotinción de VE-cadherina (verde) y Endomucina (rojo). Escala = 20  $\mu$ m.

Estos datos muestran, en contraposición a lo ya descrito, que VE-cadherina no es una molécula imprescindible a la hora de formar estructuras similares a endotelio. Tal y como hemos visto en nuestros cultivos en Matrigel, nuestras células poseen la capacidad de formar estructuras y sin embargo no somos capaces de detectar la presencia de VE-cadherina ni por qPCR ni en inmunotinción. De la misma manera, aunque la expresión de VE-cadherina es elevada en los tumores la disposición de ésta no sería la apropiada para formar uniones estables entre células. Los resultados obtenidos manifiestan la necesidad de seguir estudiando el papel de VE-cadherina en este modelo tumoral ya que su expresión si que es relevante en el sistema *in vivo*.

## Análisis de expresión de proteasas en muestras de cáncer de mama

Se ha descrito ampliamente el papel de ADAMTS1 en desarrollo tumoral, como ya describimos ampliamente en la introducción. En consonancia con varias líneas de trabajo del laboratorio, todas ellas con el afán de entender los mecanismos de acción de esta proteasa en distintos contextos tumorales, también ha sido relevante mi contribución en estudios con muestras humanas de carcinomas de mama y con glioblastomas. Los trabajos de Martino et al, desarrollados con tumores de mama revelan que los sustratos de ADAMTS1, Nidógeno 1 y Nidógeno 2, muestran una menor cantidad de proteólisis en muestras tumorales en comparación con el tejido sano. Sin embargo, la cantidad total de nidógenos parecía no variar. Es por ello, que decidimos analizar los niveles de ADAMTS1 en estos mismos tejidos ya que ambos nidógenos son sustratos de ADAMTS1. Así mismo lo acompañamos del análisis de expresión una serie de proteasas cuya participación podría tenerse en cuenta en futuros estudios. Los resultados obtenidos muestran, en primer lugar, una disminución de los niveles de expresión de *Adamts1* que correlacionan con la menor proteólisis de nidógenos que se menciona en Martino et al,2014 (**Figura 43**). Por otro lado, otras proteasas analizadas sufren diferencias de expresión en la misma dirección. Estas son *Adamts5*, *Adamts8*, *Adamts9*, *Mmp1* y *Mmp14*. Finalmente, algunas de las proteasas analizadas no muestran diferencias en cuanto a su expresión (*Adamts4*, *Adamts15* y *Mmp7*) y sólo en el caso de *Mmp14* encontramos una sobreexpresión en los tejidos tumorales. Los datos muestran que efectivamente hay una disminución de *Adamts1* y que podría darse el caso de que alguna proteasa más estuviese interviniendo en la proteólisis de estos sustratos a tener de los niveles de expresión encontrados.



**Figura 43. Valores de expresión génica de proteasas extracelulares en muestras de tejido de mama sano y en tejido tumoral.** La expresión génica se determinó mediante qPCR. 1 µg de mRNA de los lisados tisulares se retrotranscribieron a cDNA. Se utilizaron cebadores de ratón específicos para los genes indicados.





# DISCUSIÓN



La investigación del cáncer en los últimos años ha puesto de relieve la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo de esta enfermedad. La interacción y comunicación de los distintos tipos celulares entre sí es un punto clave en la investigación hoy día. De manera relevante destaca el papel del endotelio en la formación de un plexo vascular para suplir los requerimientos metabólicos del tumor. En la misma línea, el desarrollo de la vasculatura tumoral es un proceso que se encuentra limitado por la necesidad de remodelar la matriz extracelular para que las células endoteliales puedan proliferar e invadir los tejidos adyacentes. La remodelación de la matriz extracelular es llevada a cabo por un conjunto de proteínas entre las que destacan las metaloproteasas. Esta superfamilia de proteínas está compuesta a su vez por tres familias: MMPs, ADAMs y ADAMSTSs, las cuales comparten semejanzas estructurales. El trabajo desarrollado aquí forma parte de las investigaciones más generales de mi equipo para describir el papel que juega la metaloproteasa ADAMTS1, primera proteasa descrita de la familia ADAMTS, en el desarrollo de la vasculatura tumoral y cómo éste influye en el progreso neoplásico.

ADAMTS1 es una proteasa con múltiples dominios entre los que destacan el dominio desintegrina además de un número variable de dominios trombospondina de tipo 1 (TSR) (Kuno et al., 1999). El papel de ADAMTS1 regulando la angiogénesis tumoral se ha descrito ampliamente aunque aún presenta controversias al no llegar a entenderse completamente. Como un número importante de proteasas, ADAMTS1 se ve implicada en más de un proceso que tiene como resultado la inducción o supresión de la angiogénesis. Por ejemplo, es capaz de secuestrar VEGF impidiendo la proliferación de las células endoteliales o autoproteolizarse para liberar sus dominios antiangiogénicos TSR (Lee et al., 2006; Luque et al., 2003; Rodríguez-Manzaneque et al., 2000). En cuanto a sus capacidades proangiogénicas y protumorigénicas, ADAMTS1 se ha demostrado capaz de promover el desarrollo tumoral y la metástasis en modelos de ratón (Casal et al., 2010; Lu et al., 2009; Ricciardelli et al., 2011; Rocks and Cataldo, 2011).

En la última década se viene dando importancia al hecho de que los tumores poseen la capacidad de activar mecanismos alternativos de vascularización. Ésto les permite desarrollarse y hacer frente a situaciones adversas. De entre todos ellos destaca el fenómeno de mimetismo vasculogénico en el que las células tumorales adquieren

características endoteliales para posteriormente alinearse formando canales pseudovasculares capaces de conducir fluidos. En un trabajo de nuestro grupo se describió como ADAMTS1 también participa en este fenómeno de plasticidad tumoral (Casal et al., 2010).

## MIMETISMO VASCULOGÉNICO: COMUNICACIÓN ENTRE EL ENDOTELIO Y LAS CÉLULAS TUMORALES

La capacidad de las células tumorales, y más concretamente las células de melanoma, de formar redes pseudovasculares ha sido ampliamente descrita a lo largo de la pasada década (Hendrix et al., 2003; Seftor et al., 2012). El perfil genético de las células propensas a formar estas redes comprende moléculas relacionadas con el endotelio y la matriz extracelular, entre otras. En nuestra investigación hemos constatado que la línea celular B16F1 sobreexpresa algunos de los marcadores descritos cuando se siembran en Matrigel. Hemos de mencionar que los niveles de expresión de estas moléculas no son altos cuando las células se cultivan en configuraciones bidimensionales. Esta observación indica que la composición del microambiente en el que se encuentran las células es crucial para su comportamiento, y en este caso sembrarlas en Matrigel, en una mezcla heterogénea de moléculas de la ECM, es necesario para poder observar su transdiferenciación a células con propiedades endoteliales y poder comparar su perfil genético *in vitro*.

Igualmente se ha descrito que la interacción entre células endoteliales y tumorales produce cambios en los fenotipos de ambos tipos celulares y que estos cambios promueven la invasividad de las células tumorales (Mierke, 2011). En nuestro trabajo describimos que las células de melanoma son capaces de interactuar con las células endoteliales mimetizando su capacidad de alineamiento y de formar redes similares a endotelio de manera aparentemente aleatoria. Así mismo podemos destacar los cambios de expresión génica que hemos observado tanto en las células endoteliales como en las células de melanoma al sembrarlas de manera conjunta. Basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos de migración en cocultivos podemos afirmar que el comportamiento de ambos tipos celulares se muestra influenciado por la presencia del otro tipo celular. Estos hechos apoyan la existencia de una interacción entre las células tumorales y endoteliales en el fenómeno de mimetismo vasculogénico y además sugieren que la transdiferenciación de las células de melanoma puede estar influenciada por la

presencia de células endoteliales (McDonald et al., 2000). Así mismo, en nuestro trabajo hemos podido observar que la distribución de las células endoteliales y tumorales en los cultivos en Matrigel parece ser aleatoria dando lugar a una vasculatura mixta, formada tanto por células endoteliales como por células tumorales con características endoteliales. Este resultado concuerda con la visión que se tiene actualmente del mimetismo vasculogénico ya que se piensa que no existe una vasculatura que se forme completamente por células tumorales si no que la vasculatura tumoral se formaría por vasos híbridos, o mosaico, con células endoteliales y tumorales intercaladas (Chen et al., 2014)

La implicación de ADAMTS1 en el desarrollo del fenotipo de mimetismo vasculogénico fue descrito por nuestro grupo con anterioridad (Casal et al., 2010). En este caso volvemos a observar que la disminución de ADAMTS1 en el medio extracelular limita el desarrollo de las estructuras similares a endotelio que forman las células de melanoma cuando se siembran en Matrigel. No obstante, parece ser que el papel de ADAMTS1 es contexto dependiente ya que sólo advertimos cambios en la formación de estructuras similares a endotelial cuando la concentración de células tumorales es baja.

La capacidad de invasión de las células se debe en parte a la capacidad de secretar proteasas que les permitan degradar la ECM y desplazarse. En este contexto, algunos estudios han demostrado que la desregulación de *Adamts1* disminuye la capacidad de las células endoteliales de desplazarse en modelos tridimensionales (Su et al., 2008). Sin embargo, la inhibición de *Adamts1* en células tumorales produce el efecto contrario. En un trabajo reciente han comprobado que las células tumorales tienen más capacidad de desplazamiento tras la inhibición de *Adamts1* (Freitas et al., 2013). En nuestros experimentos pudimos observar que la interferencia de *Adamts1* en nuestras células de melanoma aumentaba la capacidad de desplazamiento. Adicionalmente, comprobamos que cultivar las células tumorales junto con células endoteliales tiene el mismo efecto en ambos tipos celulares que la inhibición de *Adamts1*. Es decir, cocultivar las células disminuye la movilidad de las células endoteliales y aumenta la de las células tumorales. Esta observación hace necesario seguir investigando las relaciones que existen entre los distintos componentes del microentorno tumoral ya que, como hemos podido observar, el comportamiento celular cambia cuando las células se encuentra en contacto con otros

tipos celulares. Finalmente, este cambio en el comportamiento celular sugiere una vez más una intercomunicación celular en los fenómenos de mimetismo vasculogénico.

## ADAMTS1 Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE LA VASCULATURA TUMORAL

Existe una gran controversia en cuanto al papel de ADAMTS1 en la angiogénesis. Mientras que algunos estudios muestran su papel proangiogénico otros sustentan la idea de que ADAMTS1 actúa inhibiendo el desarrollo de la vasculatura. La mayoría de estos estudios se basan en la sobreexpresión de ADAMTS1 o en su desregulación en líneas tumorales. Posteriormente en muchos de ellos se desarrollan xenógrafos en modelos de ratón y se estudia la vasculatura (revisado recientemente en Rodríguez-Manzaneque et al., 2015). En estos trabajos se analiza la contribución de ADAMTS1 de manera local sin tener en cuenta cual es el papel del ADAMTS1 secretado las células derivadas del hospedador. Actualmente sólo se conocen dos trabajos en los que se analice la contribución la proteasa derivada del hospedador mediante el uso de ratones ADAMTS1 KO. En el primero de ellos Lee et al. describían como ADAMTS1 se encargaba de proteolizar TSP1 en los animales WT y que por ello mostraban una menor densidad vascular, atribuyendo de esta manera un papel antiangiogénico de ADAMTS1 (Lee et al., 2006). Recientemente Ricciardelli et al. muestran, sin embargo, que ADAMTS1 no tiene un papel determinante en cuanto al desarrollo de la vasculatura. Hay que resaltar que estos últimos autores determinan la densidad vascular mediante la medición del porcentaje de área del tumor que expresa un marcador endotelial, CD34 en este caso, sin detallar el número de vasos que encuentran ni el tamaño de éstos en las respectivas secciones tumorales de los animales ADAMTS1 WT y KO. En nuestro trabajo atribuimos a ADAMTS1 una función antiangiogénica, ya que encontramos un menor número de vaso en aquellos animales que expresan ADAMTS1 en comparación con los animales KO tal y como muestran Lee et al. No obstante, si utilizamos el mismo parámetro que Ricciardelli et al, para determinar la densidad vascular no somos capaces de encontrar diferencias significativas en los distintos grupos animales. Si estudiamos en detalle los análisis de los trabajos anteriores que relacionan ADAMTS1 con el desarrollo de la vasculatura tumoral y los comparamos con nuestros resultados podemos darnos cuenta fácilmente que las diferencias en cuanto a atribución de un papel antiangiogénico o proangiogénico a ADAMTS1 se deben simplemente a la diferencia en cuanto a la metodología de

cuantificación de la densidad vascular. Mientras que en Lee et al. se cuantifican el número de vasos Ricciardelli et al. cuantifican el área total cubierta por todos los vasos. En nuestro caso, el desarrollo de nuevas herramientas de análisis de imagen nos ha permitido obtener más información en cuanto a la estructura de los vasos tumorales y por tanto obtenemos los mismos resultados que ambos autores. De esta manera obtenemos una visión más amplia del desarrollo de la vasculatura en los tumores logrando así un mejor entendimiento del papel que juega ADAMTS1.

Nuestro trabajo unifica las observaciones obtenidas previamente en cuanto a que el aumento de la expresión de ADAMTS1 correlaciona con un aumento del desarrollo tumoral y que, sin embargo, el mayor desarrollo tumoral implica una disminución en la densidad vascular. No obstante en nuestras investigaciones constatamos que los vasos que se presentan en menor número son sin embargo más grandes. Todo esto indica que ADAMTS1 participa en el desarrollo de la vasculatura permitiendo la maduración de los vasos, los cuales aumentan de tamaño y disminuyen en número a medida que avanza el desarrollo tumoral. Nuestros datos además concuerdan con un modelo de fibrosarcoma en el que describen que mayor cantidad de ADAMTS1 implica mayor desarrollo tumoral y menor densidad vascular (Casal et al., 2010).

En un intento por dilucidar el papel de ADAMTS1 producido por las células tumorales y su relación con el ADAMTS1 secretado por las células derivadas del hospedador, inhibimos su expresión en las células tumorales y desarrollamos tumores singénicos en el mismo contexto anterior en el que utilizamos los ratones ADAMTS1 WT y KO. En esta ocasión pudimos constatar que el papel que juega el ADAMTS1 tumoral en el desarrollo de la vasculatura es limitado puesto que no somos capaces de observar diferencias significativas en cuanto a la arquitectura vascular entre aquellos animales que expresan un shRNA interferente y aquellos que no lo portan.

La composición de la vasculatura es igualmente importante al número y el tamaño de los vasos. Así, varios trabajos han documentado el recubrimiento de pericitos en los modelos tumorales de ADAMTS1 (Gustavsson et al., 2010; Martino-Echarri et al., 2013; Ricciardelli et al., 2011). En nuestro trabajo, al igual que en éstos, no observamos cambios en el recubrimiento de pericitos en ninguno de los animales estudiados. Tampoco encontramos cambios cuando interferimos la expresión de *Adams1* en las



células tumorales. No obstante, hemos descrito que el recubrimiento de pericitos en nuestro modelo no se correlaciona con una funcionalidad de la vasculatura. Hemos podido confirmar en este estudio que la capacidad de los vasos para distribuir fluidos en el tumor se ve afectada por la ausencia de ADAMTS1 derivado de las células del hospedador. Al igual que con la arquitectura vascular, la desregulación de *Adamts1* tumoral no parece afectar a la distribución de oxígeno y nutrientes. Estas observaciones otorgan un papel importante al ADAMTS1 del huesped frente al ADAMTS1 tumoral a la hora de promover el desarrollo de las neoplasias. Finalmente, el análisis de regiones hipóxicas intratumorales ratificaba la noción de una menor funcionalidad vascular en los animales ADAMTS1 KO frente a los animales WT ya que el número de regiones hipóxicas encontradas en los animales que carecen de ADAMTS1 es mayor que en aquellos que expresan la proteína. Una vez más se corrobora el hecho de que ADAMTS1 procedentes de las células derivadas del hospedador es quien dirige el desarrollo de la vasculatura tumoral ya que la interferencia de ADAMTS1 en las células tumorales no parece tener un efecto sobre el desarrollo de la vasculatura.

Recapitulando los hechos descritos hasta el momento observamos que ADAMTS1 favorece la formación de estructuras vasculares de mayor tamaño, las cuales conducen de forma más eficiente los nutrientes y el oxígeno en el tumor. La maduración de estas estructuras es independiente del recubrimiento de pericitos. Podemos hipotetizar entonces que la menor funcionalidad de los vasos se puede deber a la incorrecta disposición de los componentes de la membrana basal. Algunos trabajos en modelos tumorales donde se estudia el papel de ADAMTS1 muestran alteraciones en la composición de la matriz extracelular. Así, se han descrito una disminución en la proteólisis de Nidógeno 1, Nidógeno 2 y Versicano en la membrana basal de los tumores que carecen de ADAMTS1 (Martino-Echarri et al., 2013; Ricciardelli et al., 2011). Es por ello que hemos mantenido el análisis de los sustratos de ADAMTS1 a lo largo de todo este estudio.

A pesar de todo lo descrito hasta ahora, en algunas muestras tumorales se encuentra que los niveles de ADAMTS1 son inferiores en los tejidos tumorales en comparación con el tejido sano circundante. Así, en un trabajo reciente de nuestro grupo se constata que el tejido mamario expresa niveles mayores de *Adamts1* que el tejido tumoral (Martino-Echarri et al., 2013). Sin embargo, el análisis de otras proteasas de la matriz extracelular en estos mismos tejidos muestra que una sobreexpresión de algunas MMPs como

MMP14 y muy significativamente MMP1. Ya se ha descrito con anterioridad como MMP1 funciona promoviendo el desarrollo tumoral de manera conjunta con ADAMTS1 (Lu et al., 2009). Estos resultados sugieren que además de los niveles de las proteasas por separado hay que tener en cuenta la expresión y funcionalidad del conjunto de proteasas que componen el degradoma celular ya que algunas de ellas comparten funcionalidad y redundan en las mismas actividades.

Las diferencias de expresión de las distintas proteasas en un contexto tumoral da mayor relevancia a la necesidad de conocer las funciones de los distintos sustratos y su implicación en el desarrollo tumoral. Adicionalmente es necesario conocer en qué situaciones se produce la modificación postraducciona de los sustratos, tanto de ADAMTS1 como de otras proteasas, para así poder elaborar una estrategia terapéutica que pueda abordar la complejidad y amplitud de la ECM como nicho tumoral.

## ADAMTS1 EN METÁSTASIS

Varios estudios han demostrado que ADAMTS1 juega un papel también en el desarrollo de metástasis. Por ejemplo, se ha descrito que los niveles de expresión de *Adamts1* se correlacionan positivamente con la metástasis a hueso, pulmón e hígado (Casimiro et al., 2012; Lee et al., 2010; Lu et al., 2009; Ricciardelli et al., 2011). De manera concreta, Lee et al. asocian los niveles de TSP-1 con el corte proteolítico que ADAMTS1 produce sobre TSP-1. Nuestras observaciones en un modelo de metástasis de melanoma manifiestan que ADAMTS1 induce la formación de nódulos metastáticos tal y como ya describen las publicaciones anteriores. De manera adicional, se ha descrito que la fuente principal de producción de ADAMTS1 y TSP-1 en hígado y pulmón son las células endoteliales y no las células del parénquima (Lee et al., 2010). Este podría ser el motivo por el que al inhibir la expresión de *Adamts1* en las células de melanoma no conseguimos ver una reducción en el número de metástasis en nuestro modelo animal y sin embargo la metástasis se ve claramente reducida al eliminar ADAMTS1 en las células derivadas del hospedador tal y como ocurre en los animales ADAMTS1 KO. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la importancia del ADAMTS1 microambiental frente al ADAMTS1 derivado del tumor a la hora de promover el desarrollo neoplásico.

## VE-CADHERINA EN DESARROLLO TUMORAL

Esta proteína es una cadherina específica de endotelio que regula la morfología y la estabilidad vascular, y ya hace unos años se le dio un protagonismo muy importante en el desarrollo del fenómeno del mimetismo vasculogénico (Hendrix et al., 2001). En nuestros estudios no podemos observar, sin embargo, que esta proteína sea necesaria para la producción de redes similares a endotelio ya que a pesar de carecer de la expresión de VE-cadherina nuestras células de melanoma son capaces de disponerse en Matrigel de manera similar a como lo hacen las células endoteliales. Por otro lado, el papel que juega la hipoxia en el mimetismo vasculogénico y su relación con VE-cadherina se describió recientemente (Zhao et al., 2012). En nuestras secciones tumorales somos capaces de encontrar VE-cadherina en los animales ADAMTS1 KO. Es en estos mismos animales donde encontramos un aumento de las zonas de hipoxia pudiendo relacionar así que la falta de oxígeno es un factor determinante para la expresión de VE-cadherina, al menos en este modelo celular. Estos descubrimientos sugieren que el microambiente es un importante modulador del comportamiento celular y que en el caso de VE-cadherina es crucial a la hora de modular su expresión. La importancia de la regulación de VE-cadherina para el desarrollo tumoral se encuentra ejemplificada en trabajos como Mao et al. donde se demuestra que esta cadherina se activa por hipoxia en células madre del cáncer en un modelo de glioblastoma contribuyendo al fenómeno de mimetismo vasculogénico (Mao et al., 2013).

De esta situación se desprende que ADAMTS1 juega un papel importante modificando la ECM. Esta modificación de la ECM, a su vez, induce la producción de proteínas claves en el desarrollo tumoral como es el caso que acabamos de definir de la VE-cadherina. Si tenemos en cuenta el papel que juega VE-cadherina en el fenómeno de mimetismo vasculogénico es inevitable pensar que si ADAMTS1 modifica la producción de VE-cadherina *in vivo* también es capaz de influir en el desarrollo de mecanismos alternativos de vascularización tumoral y de manera relevante el mimetismo vasculogénico.



CONCLUSIONES Y  
PERSPECTIVAS  
FUTURAS



## CONCLUSIONES

1. ADAMTS1 participa en el fenotipo de mimetismo vasculogénico en células de melanoma B16F1 de manera contexto dependiente.
2. La interacción entre células endoteliales y tumorales induce cambios morfológicos, funcionales y de expresión génica en ambos tipos celulares en cultivos en Matrigel. *Adamts1*, nuestra proteína de interés, se encuentra sobreexpresado en las células endoteliales, mientras que *Endogлина*, un correceptor de TGF- $\beta$ , lo hace en las células tumorales.
3. ADAMTS1 producido por las células no tumorales, derivadas del hospedador, participa en los mecanismos de maduración de la vasculatura tumoral.
4. Estas alteraciones de la maduración vascular, inducidas por ADAMTS1, son relevantes para la progresión tumoral.
5. La inhibición de ADAMTS1 producido por las células tumorales B16F1 tiene un efecto limitado o nulo tanto sobre el desarrollo vascular como sobre el crecimiento tumoral.
6. La presencia de ADAMTS1 en el hospedador es importante para promover la aparición de metástasis en el nuestro modelo B16F1 de melanoma.
7. El balance de proteasas de la matriz extracelular en muestras tumorales es importante a la hora de inducir o reprimir el desarrollo tumoral. Dados los diferentes datos según diferentes modelos es necesario estudiar estas proteasas y sus sustratos para definir nuevas herramientas terapéuticas.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Utilizar nuevas herramientas de edición génica para eliminar la expresión de ADAMTS1 en las líneas tumorales y en células endoteliales.
2. Ver la contribución de ADAMTS1 derivado del endotelio en la formación de redes similares a endotelio formadas por células endoteliales y tumorales (ensayos de cocultivo).
3. Analizar la disposición de los sustratos que conforman la membrana basal en nuestro modelo de ratón ADAMTS1 KO.
4. Investigar moléculas que intervienen en el desarrollo de la vasculatura con especial interés en la vía de señalización NOTCH.
5. Utilizar modelos animales donde podamos reprimir de manera condicional la expresión de ADAMTS1 en las células endoteliales.
6. Estudiar el papel del sistema inmune en nuestro modelo tumoral detalladamente.
7. Identificar el papel de ADAMTS en otros modelos tumorales: mama, pulmón, glioma, etc.





# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares de ratón B16F0, B16F1, Bend and LLC se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS, *fetal calf serum*) y un 1% de penicilina-estreptomina. Las células primarias de ratón MAEC (*Mouse aortic endothelial cells*) procedentes de ratones C57BL/6 se mantuvieron en medio completo de cultivo de células endoteliales de ratón (M1168-Kit, Cell Biologics, EE.UU.). La línea celular humana HEK293T se cultivó en DMEM suplementado con un 10% de FCS, un 1% de penicilina-estreptomina y 2 mM L-glutamina. Las células primarias HUVECs (Lonza, Suiza) se mantuvieron en medio de crecimiento de células endoteliales EGM-2. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad.

## 2. ENSAYO DE FORMACIÓN DE REDES SIMILARES A ENDOTELIO EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

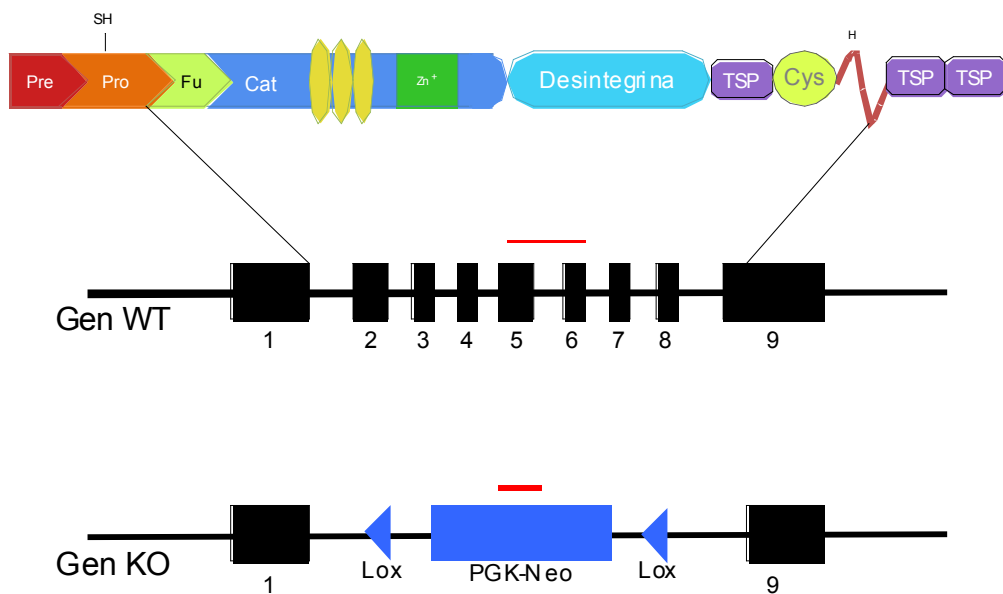
Este ensayo se utilizó inicialmente para analizar las propiedades de células endoteliales *in vitro* al comprobarse que al sembrarlas en algunas matrices (como el Matrigel) se distribuían de manera particular mimetizando características fenotípicas de estas células. Posteriormente se han venido utilizando de manera generalizada para el estudio de fenómenos de mimetismo vasculogénico en células tumorales. Al cultivar células con capacidad plástica en Matrigel estas forman redes similares a las que forman las células endoteliales cuando se las siembra en el mismo formato (Maniotis et al., 1999). Para nuestros ensayos añadimos 30 µl de Matrigel (BD Bioscience, EE.UU.) en portaobjetos de 8 pocillos (BD Bioscience, EE.UU.), y se añadieron 50x10<sup>3</sup> células en 400 µl de medio en cada pocillo. En los cultivos de baja densidad el número final de células fue de 20x10<sup>3</sup>. En los cocultivos se sembraron células endoteliales y tumorales en proporción 1:1 manteniendo el número final de células en cada caso. Posteriormente el desarrollo de redes similares a endoteliales se observa a distintos tiempos, documentándolo adecuadamente mediante la adquisición de imágenes en el microscopio, y extrayendo RNA en aquellos ensayos que lo requerían. El análisis de imágenes se llevó a cabo usando la plataforma WimTube (Wimasis, Alemania). Este programa mide una serie de parámetros como son el número de puntos de ramificación, la longitud tubular, el número de bucles o el área cubierta por las células, entre otros (**Figura 18**).

### 3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR

Las mediciones de proliferación y migración celular se hicieron en la plataforma Xcelligence (ACEA Bioscience, EE.UU.). Este sistema permite medir estos parámetros a tiempo real. De manera genérica, las células se siembran en placas que contienen microsensores electrónicos donde la interacción entre la célula y los sensores genera una respuesta de impedancia que se correlaciona con la viabilidad celular y el número de células sembradas que hay en el pocillo. En nuestros ensayos sembramos  $10^5$  células por pocillo siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto la proliferación como la migración se midieron durante 96 horas. Para los ensayos de migración, el recubrimiento de las correspondientes microplacas se hizo con PureCol®, una solución de Colágeno bovino tipo I (Advanced Biomatrix, EE.UU.) diluido 1/30, ó con Matrigel (BD Bioscience, EE.UU.) diluido 1/10, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 4. GENOTIPADO DE LOS RATONES ADAMTS1 KO

El DNA genómico se aisló de muestras de oreja de ratón utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue y una estación automática QIAcube (Qiagen, Países Bajos). El genotipado se hizo por PCR usando el reactivo iQ SYBR Green Supermix (BIORAD) manteniendo la temperatura de anillamiento en 60°C durante 37 ciclos de termociclado. La posición WT se amplificó utilizando cebadores que flanqueaban los exones 5 y 6 dando lugar a un fragmento amplificado de DNA de 333 bp. El alelo KO se amplificó con cebadores que hibridaban en el cassette PGK-Neo que portan nuestros animales transgénicos dando lugar a un fragmento de 177 bp (Lee et al., 2006). Las zonas amplificadas de los animales WT y KO se muestra en rojo en la **Figura 44**. La secuencia de los cebadores se indica en la Tabla 1.



**Figura 44. Representación esquemática del gen ADAMTS1 y la delección llevada a cabo para generar el animal KO.** En la figura se puede ver, en la parte superior, la estructura proteica de ADAMTS1. En la zona central se encuentra la representación esquemática del gen *Adamts1* y la correspondencia con la estructura proteica de las zonas deleccionadas. En la parte inferior se encuentra la inserción por la que se sustituyen las zonas deleccionadas. Nótese que además de deleccionarse los exones del 2 al 8 también se ha deleccionado un fragmento del exón 9.

## 5. ENSAYO DE DESARROLLO TUMORAL Y METÁSTASIS

Para la generación de tumores singénicos se inyectaron  $1 \times 10^6$  células tumorales en 200  $\mu\text{l}$  de PBS en la zona dorsal a ratones C57Bl/6 (tanto WT como ADAMTS1-KO). El desarrollo tumoral se monitoreó durante 18 días tras lo que se sacrificó a los animales. Se tomó el peso del tumor a punto final como medida de desarrollo tumoral. Se extrajeron diferentes muestras de cada uno de los tumores con la intención de extraer RNA y proteína. Algunas muestras además se conservaron en PFA 4% durante 12 horas y posteriormente se incluyeron en parafina para conseguir secciones tumorales.

Como modelo de metástasis, en estas mismas líneas de ratones inyectamos  $3 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{l}$  de PBS de manera intravenosa a través de la vena de la cola. Estos animales se mantuvieron en observación durante 13 días tras lo que se procedió a su sacrificio. Por las características del experimento se evaluó de manera macroscópica la posible presencia de metástasis en distintos órganos, aunque los análisis posteriores se limitaron al estudio de pulmón e hígado como órganos donde principalmente metastatizan las células utilizadas en nuestros estudios. Todos los animales se mantuvieron y sacrificaron

de acuerdo con la normativa española de manejo y experimentación con animales de laboratorio.

## 6. MUESTRAS TUMORALES HUMANAS

Las muestras humanas de carcinoma de mama y las muestras no neoplásicas (bloques tisulares y secciones de parafina) se obtuvieron del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España). Todas las pacientes fueron informadas y dieron su consentimiento para utilizar las muestras en este estudio

## 7. EXTRACCIÓN DE RNA, SÍNTESIS DE cDNA Y QPCR

El RNA total, tanto de cultivos celulares como de muestras tumorales humanas y murinas, se extrajo usando el kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel). Para comprobar la integridad del RNA se corrieron entre 50 y 100 ng de RNA en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris base, ácido acético, EDTA). Posteriormente sintetizamos el cDNA con el kit de Bio-Rad iScript cDNA Synthesis utilizando entre 200 y 1000 ng de RNA de partida. La reacción de PCR se llevo a cabo en el termociclador 7900HT (Applied Biosystems) utilizando la master mix Fast SYBR Green (Applied Biosystems) y 2  $\mu$ l de una dilución 1/10 de cDNA por muestra. Todas las muestras se analizaron por duplicado como mínimo. Los valores de cuantificación relativa representan el valor de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  normalizado con los genes endógenos Actina,  $\beta$ -2-microglobulina y 18S RNA. La lista de cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 3**, página X.

## 8. WESTERN BLOT Y CUANTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que ADAMTS1 es una proteína extracelular, su análisis en este trabajo se ha limitado al medio condicionado de las células. Para estos ensayos el medio recogido se concentró usando la resina StrataClean (Stratagene) de acuerdo a lo descrito previamente (Canals et al., 2006). Las proteínas se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuel) o PVDF (Bio-Rad). Posteriormente, las membranas se bloquearon en leche al 5% en PBS y se incubaron con el siguiente anticuerpo primario: anti-ADAMTS1 humano monoclonal murino (AF5867, R&D Systems). Después de la incubación con un secundario adecuado conjugado con peroxidasa se detectó la señal con SuperSignal West Dura

Chemiluminescence Kit (Pierce). Previo a la inmunodetección, se comprobaba la carga adecuada de proteína con una tinción con Red Ponceau. Para cuantificar la cantidad de proteína presente en el WB hicimos un análisis densitométrico de las bandas obtenidas usando del programa informático ImageJ.

## 9. INMUNOFLUORESCENCIA

Las tinciones de células HUVECs en los cocultivos se hicieron usando la sonda de membrana Cell Tracker™, (LifeTechnologies, EE.UU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La inmunotinción de VE-cadherina en estos mismos cocultivos se hizo con el anticuerpo VE-cadherina anti-humano policlonal (Cayman, 160840). La fijación de los cocultivos se hizo con paraformaldehído al 4% en PBS y 2% de sacarosa. Posteriormente se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 15 minutos. El bloqueo se hizo con una dilución de BSA al 3%, suero del animal hospedador en el que se había producido el anticuerpo secundario (cabra en este caso) al 1% en PBS durante 1 hora. Finalmente el anticuerpo secundario se incubó en BSA al 1% y suero del animal hospedador donde se había producido el anticuerpo secundario al 1% en PBS durante 1 hora. Todas las inmunotinciones se montaron con el medio de montaje con DAPI VECTASHIELD (Vector Laboratories, EE.UU.)

Para analizar la disposición de las fibras de actina las células tumorales se marcaron con Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich, L9381) en una concentración final de 5 µg/ml después de haber fijado los cultivos celulares previamente en paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hora. Las imágenes fluorescentes se adquirieron con el microscopio AxioImager A1 (Zeiss) o con el microscopio confocal LSM710 (Zeiss). La cuantificación de las imágenes se llevó a cabo con el programa ZEN 2010B SP1 (Zeiss) o con el programa Metamorph 7 (Molecular Devices, EE.UU.)

## 10. ANALISIS DE LA VASCULATURA

Las inmunofluorescencias de secciones tumorales se llevaron a cabo usando los siguientes anticuerpos: VE-cadherina anti-humano policlonal (Cayman, 160840), Endomucina monoclonal de rata anti-ratón (SC65495, SCBT), SMA (Sigma-Aldrich, A2547). Para desparafinar las secciones tumorales seguimos un protocolo estándar de gradiente de



etanol. Los tampones para desenmascarar los antígenos se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante de los anticuerpos. El análisis morfométrico de los vasos se obtuvo mediante la cuantificación de la señal del anticuerpo contra Endomucina (SC65495, SCBT) en secciones tumorales completas, dividiendo el resultado por el área de cada sección tumoral. Todas las medidas se hicieron mediante el uso del programa informático Metamorph 7 (Molecular Devices, California, EE.UU.).

## 11. ANÁLISIS DE VIABILIDAD VASCULAR

Para la detección de vasos funcionales se inyectó a los ratones 100  $\mu$ l de Lectina de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con FITC a una concentración de 50  $\mu$ g/ml de manera intravenosa. 5 minutos más tarde se anestesió a los ratones con ketamina 100 mg/kg y xilacina 10 mg/kg administrados intraperitonealmente. Tras la sedación se administró 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% de manera intracardiaca en el ventrículo izquierdo a los ratones para fijar la Lectina a los vasos. Con el mismo propósito se inyectó otro grupo de ratones de manera intravenosa 100  $\mu$ l de anticuerpo CD31-PE anti-ratón (102408, Biolegend, EE. UU.).

## 12. ENSAYO DE DETECCIÓN DE HIPOXIA

Para evaluar la hipoxia tumoral se usó el kit Hypoxyprobe-1 (hidrocloruro de pimonidazol) (Hypoxyprobe, EE.UU.). Se inyectaron 60 mg/kg de pimonidazol intraperitonealmente a los ratones y se sacrificaron 30 minutos después. Los tumores se diseccionaron y se embebieron en parafina tras ser extraídos. La tinción de inmunofluorescencia se llevo a cabo usando un anticuerpo monoclonal antipimonidazol conjugado con FITC siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 13. VECTORES, PRODUCCIÓN LENTIVIRAL Y TRANSDUCCIÓN

Tanto los vectores con los shRNAs para desregular la expresión de *Adams1* (TCRN0000032034, NM\_009621.1-2330s1c1) como los shRNAs control (SHC016) pertenecen al sistema shRNA MISSION desarrollado por Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). Producimos partículas lentivirales pseudotipadas con la proteína VSV-G, con los plásmidos pVSVG y pSPAX2 (cedidos ambos por Dr. P. Menéndez, Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras, Barcelona), en células 293T usando

un protocolo de transfección estándar con fosfato de calcio. Los plásmidos que codificaban las proteínas GFP y dsRED utilizados para visualizar las células en los ensayos de movilidad en Matrigel fueron donados por el Dr. Francisco-Martín (GENYO, Granada). Las células de melanoma B16F1 se infectaron durante 12 horas. Al día siguiente se retiró el medio que contenía las partículas virales y se añadió medio nuevo dejando que las células se expandieran durante 4 días, tras lo que se añadió medio con el antibiótico puromicina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para seleccionar las células. La selección se mantuvo durante 2 semanas.

## 14. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para todo los ensayos los valores muestran la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se utilizó la t Student desapareada como método de análisis estadístico y se consideraron valores estadísticamente significativos a partir de  $p < 0.05$ .

Gen	Especie	Forward	Reverse	Uso
Actina	Humano	GATGGCCACGGCTGCTT	AGGACTCCATGCCAGGAA	Expresión Génica
Actina	Ratón	GCGAGCACAGCTTCTTTGC	CGACCAGCGCAGCGATA	Expresión Génica
Adams1	Ratón	AAAGCCATCAGGACCCAGGAA	GGTCAGCTACGAGCATGGTTTC	Expresión Génica
Adams1	Humano	CCCACAGGAAGTGAAGCATA	CCACTGCCGTGGAATTCTG	Expresión Génica
CD31	Ratón	TCCAGGTGTGCGAAATGCT	TGGCAGCTGATGCCTATGG	Expresión Génica
CD34	Ratón	AGCCATCTCAGAGACTATGGTCAA	AAGTCTGTGGTTGTGAAAAAGTGTGT	Expresión Génica
Colágeno 4	Ratón	GGGTGAAAAGGGTGACATAGGA	GGGCCAACAAAGTGTGATG	Expresión Génica
DLL4	Humano	AGTGGGCAGCGAAGCTACA	GCCATCCTCCTGGTCCCTTACA	Expresión Génica
DLL4	Ratón	GATGACCACTTCGGACATTATGAG	GAAAGACATATAGGCTGGTCACAGTACT	Expresión Génica
Endoglin	Ratón	CTCGATAGCAGCACTGGATGAC	AGCTTCTGGCAAGCACAAGAA	Expresión Génica
Endoglin	Humano	CCCACAAGTCTTGACAGAAACAG	CGAGACCTGGCTAGTGGTATATGTC	Expresión Génica
Efrina A2	Ratón	AGCAAAGTGCACGAGTTCCA	CCAGAAGCAAAACAACACCTACAG	Expresión Génica
Fibronectina 1	Ratón	CACCTGTACCTCCAGAAACAGATG	TGCTCCACGTGTCTCCAATC	Expresión Génica
Fibulina 1	Ratón	GGCCAGCGAGCCAGAA	AGTGGCAGCACCTCTTTATGAAG	Expresión Génica
HIF1 $\alpha$	Ratón	GAGAAAAGGGAAAGAATAACACACA	GTGCAGTGAAGCACCTTCCA	Expresión Génica
HIF2 $\alpha$	Ratón	CCTGGCCATCAGCTTCCCT	GGTCGGCCTCAGCTTCCAG	Expresión Génica
Laminina C2	Ratón	GTGTTTCTGCTATGGGCATTCA	CCAACCATCCACATCCTGACT	Expresión Génica
MITF	Ratón	ACCAGCCTGGCGACCAT	CTCCTCAAACCTATAAAATGCCTCTTTT	Expresión Génica
MLANA	Ratón	ACGCTCCTATGTCACTGCTG	TGACGCCTTTTGTCCATCAAG	Expresión Génica
NG2	Ratón	GACGGCGCACACACTTCTC	CAGACTCTGGACAGACGGTCAA	Expresión Génica
Nidógeno 1	Humano	ACGCAGTCTACGTCACCACAAA	GCGACTGCACCGAATGTTG	Expresión Génica
Nidógeno 1	Ratón	CGGTCTATGTCACCACAAATGGTA	AGGTTCCGGGATGGTATTCTGT	Expresión Génica
Nidógeno 2	Humano	GCGCTTACGAGGAGGTCAA	ACCCATCAGATGCCAAAACCTG	Expresión Génica
Nidógeno 2	Ratón	TTCCTGTCCCTCCTCTGGAA	GCCATTATACGTGAAGACTTGATCAT	Expresión Génica
NOTCH1	Humano	CGACGTACCCACGAGTGT	TCCTGGACAATCGTCGATATTTT	Expresión Génica
NOTCH1	Ratón	ACCCATACTGGTCCCCTACTGT	CAGCAAAACCTGGCAAGCA	Expresión Génica
NOTCH4	Humano	CTGCTATGTGTCTCAGTGGTCAGA	CTCCATTGGCACAGGGTTCT	Expresión Génica
NOTCH4	Ratón	CATCCTGACCAGAGAGCTTCTGT	TCCCTTGTCCTCCGAGATAGC	Expresión Génica
TFPI 1	Ratón	GCCTTTTGGGCCACTGTGT	CCAGCTCAGAATCTGTGTCATCA	Expresión Génica
TIE1	Ratón	GCCTTGGTGTGTATCCGAAGA	TTCACCCGATCCTGACTGGTA	Expresión Génica
Tsp1	Ratón	CCGAAAAGTGCAGGAAGAGAA	ACTGGACTCCATTGTGAAAGCA	Expresión Génica
Tirosinasa	Ratón	CTGGAAGGATTTGCCAGTCCAC	CCTTCGAGCCATTGTTCAA	Expresión Génica
TYRP	Ratón	GCACACTTTCACTGATGCGG	GTGTTGGTAACTGGAGGCCA	Expresión Génica
VE-cadherina	Humano	CATCATGTAGGCAAGATCAAGTCAA	CGGAAGACCTTGCCACATA	Expresión Génica
VE-cadherina	Ratón	GCAGCATCGGGTACTCCAT	CAGTTCTTTCTCGTTATAGATGTTTCC	Expresión Génica
VEGF C	Ratón	CAAGACATGTCCAACAACTATGTGT	AATCCATTGGTTGAGTCATCTTCA	Expresión Génica
VEGFR2	Humano	CCACTGGTATTGGCAGTTGGA	CACAAGGGTATGGTTTGTCACT	Expresión Génica
VEGFR2	Ratón	CATCACCGAGAACAAGAACAACAACT	GATACCTAGCGCAAAGAGACACATT	Expresión Génica
Versicano	Ratón	CAGTGTGAACTTGATTTTGTGAATG	CAACATAACTTGGGAGACAGAGACA	Expresión Génica
Adams1	Ratón	CAAGTGGGTGAACAAGACAGACA	GTATTGAACTCCACCACCACAG	Genotipado
PGK-NEO		TGAATGAACTGCAGGACGAG	ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	Genotipado

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados a lo largo de este trabajo.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Inglés	Español
aaAT3	anti-angiogenic anti-thrombin	Antitrombina antiangiogénica
ADAMs	A desintegrin and metalloprotease	Desintegrina y metaloproteasa
ADAMTs	A desintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs	Desintegrina y metaloproteasa con dominios trombospondina
aFGF	acid Fibroblast growth factor	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
ANG	Angiopoietin	Angiopoyetina
bFGF	basic Fibroblast growth factor	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BM	Basement membrane	Membrana basal
BM40, BM90	Basement membrane protein 40 or 90	Proteína de la membrana basal 40 ó 90
CAF	cancer associated fibroblast	Fibroblastos asociados al cáncer
CAM	Chicken chorriallantoic membrane	Membrana corialantoidea de pollo
Cat	Catalytic	Catalítico
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ligando quimicóna 2 con motivos C-C
CD	cluster of differentiation	Cluster de diferenciación
CSC	cancer stem cell	Célula madre del cáncer
Ct	C-terminal	C-terminal
CUB	Complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1	Complemento de C1r/C1s, Uegf, Bmp1
DLL	Delta like ligand	Ligando similar a Delta
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Extracellular matrix	Matriz extracelular
ECs	endothelial cells	Células endoteliales
EGF	epithelial growth factor	Factor de crecimiento epitelial
EGFL7	EGF-like domain-containing protein 7	Proteína 7 que contiene dominios similares a EGF
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EPCs	endothelial progenitor cells	Células progenitoras endoteliales
Eph	Ephrin	Efrina
FGF	Fibroblast growth factor	Factor de crecimiento de fibroblasto
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

GFs	Growth factors	Factores de crecimiento
GON	Gonadotropin	Gonadotropina
GSCs	Glioblastoma stem cells	Células madre de glioblastoma
HA	Hyaluronic acid	Ácido hialurónico
HDACs	Histone deacetylases	Deacetilasas de histonas
HGF	Hepatocyte growth factor	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Hypoxia inducible factor	Factor inducible por hipoxia
HRCC	Human renal cell carcinoma	Célula de carcinoma renal humano
ICAM	Intracellular adhesion molecule	Molécula de adhesión intracelular
IFN	Interferon	Interferón
IGF	Insuline-like growth factor	Factor de crecimiento similares a insulina
IGFBP2	Insuline-like growth factor binding protein 2	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a insulina
IL	Interleukin	Interleucina
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10	Proteína 10 inducida por interferón gamma
kDa	kiloDalton	kiloDalton
KDR	Kinase insert domain receptor	Receptor del dominio de inserción a kinasa
KO	Knock-out	Noquear
LOXL2	LOX-like protein 2	Proteína 2 similar a LOX
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacárido
MCP	Monocyte chemoattractant protein-1	Proteína 1 quimioattractiva de monocitos
MDA	Melanoma differentiation antigen	Antígeno de diferenciación de melanoma
MDSC	Mesenchymal-derived stem cells	Células madres de origen mesenquimal
MHC	Major histocompatibility complex	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Matrix metalloproteases	Metalloproteasas de la matriz
MMT-V	Mouse mammary tumor virus	Virus de tumor de mama de ratón
NK	Natural killer	Linfocitos NK, "asesino natural"
NK4	Natural killer protein 4	Proteína 4 de los Linfocitos NK
NRP	Neuropilin	Neuropilina
NSCLC	Non-small cell lung cancer	Células no pequeñas de cáncer de pulmón
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	Inhibidor 1 del activador de plasminógeno

PAS	Periodico acid-Shiff	Ácido peryódico-Shiff
PCs	Percytes	Pericitos
PDGF beta	Platelet-derived growth factor	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	Factor derivado del epitelio pigmentado
PEX	Non-catalytic fragment of MMP2	Fragmento no catalítico de MMP2
PF4	Platelet Factor 4	Factor de plaquetas 4
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinasa	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PIGF	Placental growth factor	Factor de crecimiento placentario
Pre	Signal peptide	Péptido señal
Pro	Prodomain	Prodominio
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Homólogo de fosfatasa y tensina
PvMT	Polyoma virus middle T antigen	Antígeno de media T del virus del polioma
ROS	Reactive oxygen species	Especies reactivas de oxígeno
SCs	Stalk cells	Células de la rama
SMCs	Smooth muscle cell	Células del músculo liso
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine	Proteína secretada ácida y rica en cisteína
TAM	tumor associacted macrophages	Macrófagos asociados al tumor
TCs	Tip cells	Células de la punta
TEM	transendothelial migration	Migración transendotelial
TGF-beta	Tumoral growth factor beta	Factor de crecimiento tumoral beta
TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	Tirosina kinasa con dominios similares a inmunoglobulinas y a EGF, número 1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TIRP	Tyrosinase related protein	Proteína relacionada con tirosinasa
TM	Transmembrane	Transmembrana
TNFa	Tumor necrosis factor	Factor de necrosis tumoral
TSP	Thrombospondin	Trombospondina
VCAM	Vascular cell adhesion molecule	Molécula celular de adhesión vascular

VEGF	Vascular endothelium growth factor	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	VEGF receptor	Receptor de VEGF
VEGI	Vascular endothelial growth inhibitor	Inhibidor del crecimiento endotelial vascular
VM	Vasculogenic mimicry	Mimetismo vasculogénico

# BIBLIOGRAFÍA

Abuharbeid, S., Czubyko, F., and Aigner, A. (2006). The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 1463–1468.

Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 464–478.

Al-husein, B., Abdalla, M., Pharm, D., Trepte, M., Deremer, D.L., Somanath, P.R., and Ph, D. (2012). Antiangiogenic Therapy for Cancer: An Update. *Pharmacotherapy*.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Programmed Cell Death (Apoptosis).

Anand, P., Kunnumakara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* *25*, 2097–2116.

Apte, S.S. (2009). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* *284*, 31493–31497.

De Arao Tan, I., Ricciardelli, C., and Russell, D.L. (2013). The metalloproteinase ADAMTS1: A comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *Int. J. Cancer*.

Asahara, T., and Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *287*, C572–C579.

Auerbach, R. (1991). Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int. J. Radiat. Biol.* *60*, 1–10.

Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 165–177.

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* *125*, 5591–5596.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 401–410.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* *2*, 737–744.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003129.



- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., et al. (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* *118*, 3979–3989.
- Blake JA, Bult CJ, Eppig JT, Kadin JA, R.J. (2014). The Mouse Genome Database Group. 2014. The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* *42 (D1)*, D810–D817.
- Blasco, M. a (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 611–622.
- De Bock, K., Cauwenberghs, S., and Carmeliet, P. (2011a). Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 73–79.
- De Bock, K., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2011b). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 393–404.
- Bryan, T.M., and Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends . *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 318–324.
- Caduff, J.H., Fischer, L.C., and Burri, P.H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat. Rec.* *216*, 154–164.
- Camerer, E., Qazi, A. a, Duong, D.N., Cornelissen, I., Advincula, R., and Coughlin, S.R. (2004). Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* *104*, 397–401.
- Cameron, M.D., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V, Morris, V.L., Groom, A.C., Chambers, A.F., and Macdonald, I.C. (2000). Temporal Progression of Metastasis in Lung: Cell Survival , Dormancy , and Location Dependence of Metastatic Inefficiency. *Cancer Res.* *60*, 2541–2546.
- Canals, F., Colome, N., Ferrer, C., Plaza-Calonge Mdel, C., and Rodriguez-Manzaneque, J.C. (2006). Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* *6 Suppl 1*, S28–S35.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.
- Carvajal, L. a, and Manfredi, J.J. (2013). Another fork in the road—life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* *14*, 414–421.
- Casal, C., Torres-Collado, A.X., Plaza-Calonge, M.D.C., Martino-Echarri, E., Ramón Y Cajal, S., Rojo, F., Griffioen, A.W., and Rodríguez-Manzaneque, J.C. (2010). ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res.* *70*, 4676–4686.
- Casimiro, S., Luis, I., Fernandes, A., Pires, R., Pinto, A., Gouveia, A.G., Francisco, A.F., Portela, J., Correia, L., and Costa, L. (2012). Analysis of a bone metastasis gene expression signature in patients with bone metastasis from solid tumors. *Clin. Exp. Metastasis* *29*, 155–164.

- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.
- Cavallaro, U., Liebner, S., and Dejana, E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 312, 659–667.
- Chambers, A.F., and Matrisian, L.M. (1997). Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.-L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W., and DePinho, R. a (1999). p53 Deficiency Rescues the Adverse Effects of Telomere Loss and Cooperates with Telomere Dysfunction to Accelerate Carcinogenesis. *Cell* 97, 527–538.
- Daley, W.P., Peters, S.B., and Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* 121, 255–264.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
- Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368–4380.
- Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232–239.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258–289.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Eklund, L., and Olsen, B.R. (2006). Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp. Cell Res.* 312, 630–641.
- Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342–348.
- Fagiani, E., and Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 328, 18–26.
- Fidler, I.J. (1970). Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 773–782.

- Fidler, I.J. (1990). Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth. *Cancer Res.* *50*, 6130–6138.
- Fidler, J.I. (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat. New Biol.* *242*, 148–149.
- Fidler, I.J., and Fidler, J. (1975). Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in vivo. *Cancer Res.* *35*, 218–224.
- Fidler, J.I., and Ellis, L.M. (1994). The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* *79*, 185–188.
- Fidler, I.J., Gersten, D.M., and Budmen, M.B. (1976). Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* *36*, 3160–3165.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* *82*, 4–6.
- Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* *235*, 442–447.
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992a). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *267*, 10931–10934.
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992b). Angiogenesis. *Journal* *267*, 10931–10934.
- Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., and Shao, R. (2012). Glioblastoma-Derived Tumor Cells Induce Vasculogenic Mimicry through Flk-1 Activation. *J. Biol. Chem.* M111.334540 – .
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 4195–4200.
- Fröhlich, C., Klitgaard, M., Noer, J.B., Kotzsch, A., Nehammer, C., Kronqvist, P., Berthelsen, J., Blobel, C., Kveiborg, M., Albrechtsen, R., et al. (2013). ADAM12 is expressed in the tumour vasculature and mediates ectodomain shedding of several membrane-anchored endothelial proteins. *Biochem. J.* *452*, 97–109.
- Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C., and Heinecke, J.W. (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J. Biol. Chem.* *278*, 28403–28409.
- Gil-Bernabé, A.M., Lucotti, S., and Muschel, R.J. (2013). Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br. J. Haematol.* *162*, 433–441.
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* *91*, 1071–1121.
- Gordon, M.S., Sweeney, C.S., Mendelson, D.S., Eckhardt, S.G., Anderson, A., Beaupre, D.M., Branstetter, D., Burgess, T.L., Coxon, A., Deng, H., et al. (2010). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of AMG 102, a

fully human hepatocyte growth factor-neutralizing monoclonal antibody, in a first-in-human study of patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* *16*, 699–710.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *21*, 309–322.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hart, I.R., and Fidler, I.J. (1980). Role of Organ Selectivity in the Determination of Metastatic Patterns of B16 Melanoma. *Cancer Res.* *40*, 2281–2287.

Hatipoglu, O.F., Hirohata, S., Cilek, M.Z., Ogawa, H., Miyoshi, T., Obika, M., Demircan, K., Shinohata, R., Kusachi, S., and Ninomiya, Y. (2009). ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 16325–16333.

Hendrix, M.J., SefTOR, E.A., Hess, A.R., and SefTOR, R.E. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* *3*, 411–421.

Herbert, S.P., and Stainier, D.Y.R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 551–564.

Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 1011–1027.

Hillen, F., and Griffioen, A.W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 489–502.

Van Hinsbergh, V.W.M., and Koolwijk, P. (2008). Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc. Res.* *78*, 203–212.

Van Hinsbergh, V.W.M., Engelse, M. a, and Quax, P.H. a (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 716–728.

Holash, J. (1999). Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science* (80-. ). *284*, 1994–1998.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* (80-. ). *253*, 49–53.

Hu, M., and Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 27–34.

Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* *326*, 1216–1219.

- Iruela-Arispe, M.L., and Davis, G.E. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev. Cell* *16*, 222–231.
- Iruela-Arispe, M.L., Carpizo, D., Luque, A., Lq, D., Uhxowv, W., Uhjuhvlrq, L.Q., Wxpriu, R.I., Wkh, L.Q., Lv, I., Xqghuvwdqglqj, W., et al. (2003). ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci* *995*, 183–190.
- Ishitsuka, T., Ikuta, T., Ariga, H., and Matsumoto, K.-I. (2009). Serum tenascin-X strongly binds to vascular endothelial growth factor. *Biol. Pharm. Bull.* *32*, 1004–1011.
- Jung, Y.D., Ahmad, S. a, Liu, W., Reinmuth, N., Parikh, A., Stoeltzing, O., Fan, F., and Ellis, L.M. (2002). The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *12*, 105–112.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* *438*, 820–827.
- Kaplan, R.N., Psaila, B., and Lyden, D. (2007). Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol. Med.* *13*, 72–81.
- Karagiannis, E.D., and Popel, A.S. (2007). Anti-angiogenic peptides identified in thrombospondin type I domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *359*, 63–69.
- Karpatkin, S., Pearlstein, E., Ambrogio, C., and Coller, B.S. (1988). Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Invest.* *81*, 1012–1019.
- Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S., and Itoh, H. Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev.* *22*, 223–236.
- Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10705–10709.
- Kerbel, R.S. (2008). Tumor Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2039–2049.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52–67.
- Keyt, B.A., Berleau, L.T., Nguyen, H. V, Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N. (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* *271*, 7788–7795.
- Klein, T., and Bischoff, R. (2011). Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *J. Proteome Res.* *10*, 17–33.
- Klein, S., Giancotti, F.G., Presta, M., Albelda, S.M., Buck, C.A., and Rifkin, D.B. (1993). Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* *4*, 973–982.

- Koop, S., Khokha, R., Schmidt, E.E., Macdonald, I.C., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1994). Overexpression of Metalloproteinase Inhibitor in B16F10 Cells Does Not Affect Extravasation but Reduces Tumor Growth Overexpression of Metalloproteinase Inhibitor in B16F10 Cells Does Not Affect Extravasation but Reduces Tumor Growth. *Cancer Res.* *54*, 4791–4797.
- Kumar, S., Rao, N., and Ge, R. (2012). Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. *Cancers (Basel)*. *4*, 1252–1299.
- Kuno, K., and Matsushima, K. (1998). ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* *273*, 13912–13917.
- Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., and Matsushima, K. (1997). Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloprotease-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* *272*, 556–562.
- Kuno, K., Bannai, K., Hakozaki, M., Matsushima, K., and Hirose, K. (2004). The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *319*, 1327–1333.
- De la Puente, P., Muz, B., Azab, F., and Azab, A.K. (2013). Cell trafficking of endothelial progenitor cells in tumor progression. *Clin. Cancer Res.* *19*, 3360–3368.
- Lafleur, M. a., Handsley, M.M., and Edwards, D.R. (2004). Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* *5*, 1–39.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. *232*, 1121–1129.
- Lee, N. V., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Thai, S.N., Twal, W.O., Luque, A., Lyons, K.M., Argraves, W.S., and Iruela-Arispe, M.L. (2005). Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1. *J Biol Chem* *280*, 34796–34804.
- Lee, N. V., Sato, M., Annis, D.S., Loo, J. a, Wu, L., Mosher, D.F., and Iruela-Arispe, M.L. (2006). ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J.* *25*, 5270–5283.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891–906.
- Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* *61*, 253–270.
- Lind, T., Birch, M.A., and McKie, N. (2006). Purification of an insect derived recombinant human ADAMTS-1 reveals novel gelatin (type I collagen) degrading activities. *Mol. Cell. Biochem.* *281*, 95–102.

- Liu, Y.-J.J., Xu, Y., and Yu, Q. (2006). Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 25, 2452–2467.
- López-Otín, C., and Hunter, T. (2010). The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 278–292.
- López-Otín, C., and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7, 800–808.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307–315 proliferation.
- Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Scusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., et al. (2013). Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 23, 171–185.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395–406.
- Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Van Poznak, C., Fleisher, M., Reiss, M., Massague, J., and Kang, Y. (2009). ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* 23, 1882–1894.
- Luque, A., Carpizo, D.R., and Iruela-Arispe, M.L. (2003). ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J. Biol. Chem.* 278, 23656–23665.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* 153, 865–873.
- Macaluso, M., Montanari, M., and Giordano, a (2006). Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* 25, 5263–5267.
- Makrilia, N., Lappa, T., Xyla, V., Nikolaidis, I., and Syrigos, K. (2009). The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur. J. Intern. Med.* 20, 663–671.
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Sefter, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739–752.
- Martino-echarri, E., Fernández-rodríguez, R., Bech-serra, J.J., Seoane, J., Canals, F., and Rodríguez-manzanque, J.C. (2014). Relevance of IGFBP2 proteolysis in glioma and contribution of the extracellular protease ADAMTS1. *Oncotarget* 5.
- McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 534–540.

- McDonald, D.M., and Baluk, P. (2002). Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer. *Cancer Res.* *62*, 5381–5385.
- Mettouchi, A. (2014). The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell Adh. Migr.* *6*, 528–534.
- Mittaz, L., Russell, D.L., Wilson, T., Brasted, M., Tkalcevic, J., Salamonsen, L.A., Hertzog, P.J., and Pritchard, M.A. (2004). Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod* *70*, 1096–1105.
- Mochizuki, S., and Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* *98*, 621–628.
- Morris, E.J., and Dyson, N.J. (2001). Retinoblastoma protein partners. *Adv. Cancer Res.* *82*, 1–54.
- Mott, J.D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 558–564.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 929–941.
- Nakamura, K., Hirohata, S., Murakami, T., Miyoshi, T., Demircan, K., Oohashi, T., Ogawa, H., Koten, K., Toeda, K., Kusachi, S., et al. (2004). Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction. *J. Biochem.* *136*, 439–446.
- Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., and Matsumoto, K. (2010). Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *10*, 36–46.
- Nicolson, G. (1984). *Cancer invasion and metastasis: biologic and therapeutic aspects* (New York: Raven Press).
- Nyberg, P., Xie, L., and Kalluri, R. (2005). Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Res.* *65*, 3967–3979.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* *88*, 277–285.
- Obika, M., Ogawa, H., Takahashi, K., Li, J., Hatipoglu, O.F., Cilek, M.Z., Miyoshi, T., Inagaki, J., Ohtsuki, T., Kusachi, S., et al. (2012). Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Sci.* *103*, 1889–1897.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* *2*, 1–12.
- Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 20*, Unit 20.1.
- Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T., and Alitalo, K. (2000). Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am. J. Pathol.* *156*, 1499–1504.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 99–101.



- Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* *380*, 364–366.
- Paulis, Y.W.J., Soetekouw, P.M.M.B., Verheul, H.M.W., Tjan-Heijnen, V.C.G., and Griffioen, A.W. (2010). Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim. Biophys. Acta* *1806*, 18–28.
- Perona, R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* *8*, 77–82.
- Phng, L.-K., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* *16*, 196–208.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* *146*, 873–887.
- Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., and Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 159–178.
- Price, J.E., Aukerman, S.L., Fidler, I.J., and Aukerman, L. (1986). Evidence That the Process of Murine Melanoma Metastasis Is Sequential and Selective and Contains Stochastic Elements Evidence. *Cancer Res.* *46*, 5172–5178.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 544–558.
- Rahman, S., Patel, Y., Murray, J., Patel, K. V., Sumathipala, R., Sobel, M., and Wijelath, E.S. (2005). Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* *6*, 8.
- Rao, N., Ke, Z., Liu, H., Ho, C.-J., Kumar, S., Xiang, W., Zhu, Y., and Ge, R. (2013). ADAMTS4 and its proteolytic fragments differentially affect melanoma growth and angiogenesis in mice. *Int. J. Cancer.*
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* *40*, D343–D350.
- Récamier, J. (1829). *Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée et sur l’histoire générale de la même maladie* (Paris: chez Gabon).
- Reymond, N., D’Água, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 858–870.
- Reynolds, L.E., Watson, A.R., Baker, M., Jones, T. a, D’Amico, G., Robinson, S.D., Joffre, C., Garrido-Urbani, S., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Martino-Echarri, E., et al. (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down’s syndrome. *Nature* *465*, 813–817.
- Ribatti, D. (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk. Res.* *33*, 638–644.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* *468*, 824–828.

- Ricciardelli, C., Frewin, K.M., Tan, I. de A., Williams, E.D., Opeskin, K., Pritchard, M.A., Ingman, W. V, and Russell, D.L. (2011). The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. *Am. J. Pathol.* *179*, 3075–3085.
- Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D. (2008a). Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* *90*, 369–379.
- Rocks, N., Paulissen, G., Quesada-Calvo, F., Munaut, C., Gonzalez, M.-L.L.A., Gueders, M., Hacha, J., Gilles, C., Foidart, J.-M.M., Noel, A., et al. (2008b). ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res.* *68*, 9541–9550.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Milchanowski, A.B., Dufour, E.K., Leduc, R., and Iruela-Arispe, M.L. (2000). Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *J. Biol. Chem.* *275*, 33471–33479.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., Westling, J., Thai, S.N., Luque, A., Knauper, V., Murphy, G., Sandy, J.D., and Iruela-Arispe, M.L. (2002). ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* *293*, 501–508.
- Rodríguez-Manzaneque, J.C., Fernández-Rodríguez, R., Rodríguez-Baena, F.J., and Luisa Iruela-Arispe, M. (2015). ADAMTS proteases in vascular biology. *Matrix Biol.*
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., and Shima, D.T. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* *16*, 2684–2698.
- Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 83–90.
- Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2001). Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*<sup>-/-</sup> mice with short telomeres. *EMBO Rep.* *2*, 800–807.
- Sandy, J.D., Westling, J., Kenagy, R.D., Iruela-Arispe, M.L., Verscharen, C., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Zimmerman, D., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Wight, T.N., et al. (2001). Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site which is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* *276*, 13372–13378.
- Seftor, R.E.B., Hess, A.R., Seftor, E. a, Kirschmann, D. a, Hardy, K.M., Margaryan, N. V, and Hendrix, M.J.C. (2012). Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am. J. Pathol.* *181*, 1115–1125.
- Senger, D.R., and Davis, G.E. (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a005090.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., and Peruzzi, C.A. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (80-. ). *219*, 983–985.

- Sherbet, G. V. (2011). *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy* (Elsevier).
- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., et al. (2000). ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* *105*, 1345–1352.
- Shiomi, T., Lemaître, V., D'Armiento, J., and Okada, Y. (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol. Int.* *60*, 477–496.
- Shuman Moss, L. a, Jensen-Taubman, S., and Stetler-Stevenson, W.G. (2012). Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am. J. Pathol.* *181*, 1895–1899.
- Singh, R.K., Gutman, M., and Radinsky, R. (1994a). Expression of Interleukin 8 Correlates with the Metastatic Potential of Human Melanoma Cells in Nude Mice Expression of Interleukin 8 Correlates with the Metastatic Potential of Human Melanoma Cells in Nude Mice1. *Cancer Res.* *54*, 3242–3247.
- Singh, R.K., Bucana, C.D., Gutman, M., Fan, D., Wilson, M.R., and Fidler, I.J. (1994b). Organ Site-Dependent Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Human Renal Cell Carcinoma Cells. *Am. J. Pathol.* *145*, 365–374.
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* *347*, 1377–1381.
- Stenzel, D., Franco, C. a, Estrach, S., Mettouchi, A., Sauvaget, D., Rosewell, I., Schertel, A., Armer, H., Domogatskaya, A., Rodin, S., et al. (2011). Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing DLL4/Notch signalling in vivo. *EMBO Rep.* *12*, 1135–1143.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 463–516.
- Su, S.-C., Mendoza, E.A., Kwak, H.-I., and Bayless, K.J. (2008). Molecular profile of endothelial invasion of three-dimensional collagen matrices: insights into angiogenic sprout induction in wound healing. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C1215–C1229.
- Subarsky, P., and Hill, R.P. (2003). The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin. Exp. Metastasis* *20*, 237–250.
- Szalad, A., Katakowski, M., Zheng, X., Jiang, F., and Chopp, M. (2009). Transcription factor Sp1 induces ADAM17 and contributes to tumor cell invasiveness under hypoxia. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *28*, 129.
- Tait, C.R., and Jones, P.F. (2004). Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J. Pathol.* *204 Suppl*, 1–54.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* *70*, 5649–5669.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* *281*, 1312–1316.

- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.* *1*, 119–150.
- Torres-Collado, A.X., Kisiel, W., Iruela-Arispe, M.L., and Rodriguez-Manzaneque, J.C. (2006). ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem* *281*, 17827–17837.
- Tyan, S.-W., Hsu, C.-H., Peng, K.-L., Chen, C.-C., Kuo, W.-H., Lee, E.Y.-H.P.Y.-H.P., Shew, J.-Y., Chang, K.-J., Juan, L.-J., and Lee, W.-H. (2012). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. *PLoS One* *7*, e35128.
- Uehara, H., Kim, S.J., Karashima, T., Shepherd, D.L., Fan, D., Tsan, R., Killion, J.J., Logothetis, C., Mathew, P., and Fidler, I.J. (2003). Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 458–470.
- Vaday, G.G., and Lider, O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 149–159.
- Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M.A., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., and Iruela-Arispe, M.L. (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angi-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* *274*, 23349–23357.
- Vázquez, F., Hastings, G., Ortega, M., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., Iruela-arispel, L., and Iruela-arispel, M.L. (1999). PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE: METH-1, a Human Ortholog of a New Family of Proteins with Angio-inhibitory Activity METH-1, a Human Ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 Are Members of a New Family of Proteins with Angio-inhibitory Activity\*. *J. Biol. Chem.*
- Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *9*, 211–220.
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 594–604.
- Wagstaff, L., Kelwick, R., Decock, J., and Edwards, D.R. (2011). The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Front. Biosci.* 1861–1872.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* *468*, 829–833.
- Wargurg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* *124*, 269–270.
- Wei, W., Kong, B., Yang, Q., and Qu, X. (2010). Hepatocyte growth factor enhances ovarian cancer cell invasion through downregulation of thrombospondin-1. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 79–87.
- Weis, S.M., and Cheresh, D. a (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* *437*, 497–504.

- Weis, S.M., and Cheresh, D. a (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* *17*, 1359–1370.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R. V, and Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* *271*, 10079–10086.
- Wijelath, E.S., Rahman, S., Namekata, M., Murray, J., Nishimura, T., Mostafavi-Pour, Z., Patel, Y., Suda, Y., Humphries, M.J., and Sobel, M. (2006). Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ. Res.* *99*, 853–860.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. *25*, 85–101.
- Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R.A., Mckercher, S.R., and Martin, P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU . 1 null mouse embryos. *5252*, 5245–5252.
- World Health Organization (2014). FactSheet 297. WHO | Cancer.
- Wylie, S., MacDonald, I.C., Varghese, H.J., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (1999). The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* *17*, 111–117.
- Xu, Z., Yu, Y., and Duh, E.J. (2006). Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 4059–4066.
- Yoo, S.Y., and Kwon, S.M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* *2013*, 127170.
- Yoon, S.-O., Park, S.-J., Yun, C.-H., and Chung, A.-S. (2003). Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Metastasis and Angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* *36*, 128–137.
- Yuan, X., Qin, L., Xiao-Yu, L., Qiu-Ya, Y., Wei-Wei, X., and Gao-Lin, L. (2012). Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *31*, 16.