



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**FibroStatin**

## **GPBP REGULA LA RESPUESTA INMUNE Y ES UNA DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER**

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tesis doctoral presentada por María Aida Artigot Algarra,  
licenciada en Biología y Biotecnología, para optar al grado de Doctora  
por la Universidad de Valencia.

Programa de Doctorado: Bioquímica y Biomedicina

Directores de tesis: Dr. Juan Saus Mas y Dr. Fernando Revert Ros

Valencia, Mayo de 2017







Don Juan Saus Mas y Don Fernando Revert Ros,

CERTIFICAN:

Que María Aida Artigot Algarra, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia y licenciada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo que lleva por título:

*GPBP regula la respuesta inmune y es una diana terapéutica en cáncer*

El cual consideramos satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

Y para que conste, expedimos este certificado en Valencia, a 30 de Mayo de 2017

Fdo.: Prof. Juan Saus Mas

Fdo.: Dr. Fernando Revert Ros



## **Agradecimientos:**

En primer lugar, quiero agradecer al doctor Juan Saus la oportunidad que me ha brindado para formar parte de este proyecto apasionante, años de mucho aprendizaje y enriquecimiento personal. Le agradezco la formación recibida y permitirme poder llevar a cabo esta tesis doctoral. También quiero dar las gracias al doctor Fernando Revert, por su dedicación, tiempo, paciencia y por transmitirme su pasión por el proyecto. Gracias a mis directores de tesis las innumerables horas invertidas en mi formación y la perseverancia que han mostrado para que este trabajo saliera adelante. Por supuesto, también gracias a FIBROSTATIN S.L., indispensable para que todo el trabajo sea posible.

Quiero dar las gracias a mis compañeros “de batalla”: Ernesto, Zahara, Dani, Águeda, Roberto, Raúl, Francisco y Luis, que siguen enseñándome y ayudándome. A los que ya no están, pero que igualmente participaron en este proyecto, de los cuales aprendí también muchísimo: Héctor, Jesús, Sandra, Carmen, Marcos, Elain, Nacho, Filo, Carolina y Christine. Gracias a Paco, por su sabiduría, sus consejos y su amabilidad.

Por último, quiero dar las gracias también a mis familiares y amigos.

Gracias a mis niñas, mis amigas, que me dan vida: Pilar, Elena, Irene y Marta. Gracias por el apoyo incondicional y por la alegría que me transmiten, que lo es todo. Por supuesto, no me olvido de la última incorporación al grupo, Sara, nuestra pequeñaja.

Gracias a Fer, porque sabes que sin ti no hubiera sido posible. Por tu apoyo, tu confianza y tus ánimos.

Gracias a mi familia, a todos por formar parte de mi vida y ayudarme a convertirme en quién soy hoy. A mis padres, Pepe y Rosa, mi hermana Alba, Quique y Vicen. Mis abuelos Pilar, Maruja, Segundo y Pepe, porque no os olvido ni os olvidaré. A todos por la paciencia que habéis tenido y tenéis conmigo, y por vuestra ayuda, porque sin vosotros no hubiera sido posible.

Por último, gracias a ti. Mi amigo, mi compañero, mi apoyo, mi energía. Contigo todo es fácil. Gracias José.



## **Resumen:**

GPBP es una serina/treonina cinasa no convencional exportable descubierta en nuestro laboratorio que fosforila al colágeno IV y cuya actividad ha sido relacionada por otros con la progresión del cáncer y la quimiorresistencia. Recientemente nuestro grupo de investigación ha puesto en evidencia que las células tumorales secretan GPBP al espacio extracelular (cGPBP) induciendo al colágeno IV a adoptar una estructura en red que facilita la transición epitelio-mesénquima que convierte a las células cancerosas en quimiorresistentes. cGPBP también ha sido relacionada por nosotros y otros con la patogénesis autoinmune e inflamatoria, respectivamente. Ahora en esta tesis demostraremos que cGPBP es un nuevo efector de la célula tumoral quimiorresistente que pervierte la respuesta inmune y adecua el microambiente para la diseminación tumoral.

Los macrófagos asociados a tumores (TAM) promueven la proliferación, invasión y metástasis. La producción de cGPBP por parte de células tumorales y macrófagos TAM sugiere que cGPBP es un efector de las células tumorales y de los macrófagos en el establecimiento del diálogo perverso que subyace en la progresión del cáncer. En esta tesis ponemos de manifiesto que cGPBP participa activamente en el reclutamiento y la polarización pro-tumoral de los macrófagos.

Las células tumorales y el sistema inmune inducen un aumento de cGPBP en plasma durante la etapa pre-metastásica de la enfermedad, de forma que cGPBP extravasa al nicho pre-metastásico antes de la llegada de las células diseminadas.

De acuerdo con estos hallazgos un anticuerpo bloqueante mAb N26 y un inhibidor T12 de cGPBP inhiben el crecimiento tumoral y las metástasis.

Los resultados consolidan a cGPBP como una nueva diana terapéutica en cáncer que actúa en el compartimento extracelular orquestando la organización del nicho tumoral y la respuesta inmune que promueven la formación de metástasis.

# Abreviaturas

---

%, Porcentaje

$\alpha 1\alpha 2$ (IV), cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del colágeno IV

$\alpha 3$ (IV), cadena  $\alpha 3$  del colágeno IV

5-FU, 5-fluorouracilo

*ADN, ácido desoxirribonucleico*

*ADNc, ADN complementario*

ANOVA, análisis de la varianza

Arg1, arginasa-1

*ARN, ácido ribonucleico*

*ARNm, ARN mensajero*

ATP, adenosina-5'-trifosfato

B6, C57BL/6

bioT12, T12 biotinilado

BMDC, células de la médula ósea (*bone marrow derived cells*)

BMDM, macrófagos derivados de la médula ósea (*bone marrow derived macrophages*)

bNLS, secuencia de localización nuclear bipartita

BSA, albúmina sérica bovina

CAF, fibroblastos asociados a tumores (*cancer-associated fibroblasts*)

C-C, secuencia *coiled-coil* ("hélice superenrollada")

CEEA, comité de ética de experimentación y bienestar animal

CERT, *ceramide transfer protein*

CF, citometría de flujo

cGPBP, GPBP extracelular o circulante

CKI $\gamma$ 2, caseína cinasa I $\gamma$ 2

CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CRP, proteína C-reactiva

CSF-1, *colony stimulating factor 1*

Ct, extremo C-terminal.

CTC, célula tumoral circulante

DAMP, *danger-associated molecular patterns*

DAPI, 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMEM-F12, DMEM con F-12 de Ham

ECM, matriz extracelular

EGF, *epidermal growth factor*

ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMT, transición epitelio-mesénquima

FDG, 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa

FFAT, motivo con dos fenilalaninas en un tracto ácido

G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*

GIP130, *GPBP-interacting protein of 130 kDa*

GM-CSF, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

Golgi, aparato de Golgi

GP, *Goodpasture*

GPBP, *Goodpasture antigen binding protein*

h, horas

HBSS, *Hanks Balanced Salt Solution*

HE, hematoxilina-eosina

HGF, *hepatocyte growth factor*

hGPBP, GPBP humano

IC, inmunocomplejo

IF, inmunofluorescencia

IFN- $\gamma$ , interferón gamma

Ig, inmunoglobulinas

IL-1 $\alpha$ , interleucina-1 alfa

IL-1 $\beta$ , interleucina-1 beta

IL-10, interleucina-10

IL-12, interleucina-12

IL-13, interleucina-13

IL-15, interleucina-15

IL-4, interleucina-4

IL-5, interleucina-5

IL-6, interleucina-6

IL-7, interleucina-7

IL-8, interleucina-8

iNOS, *inducible nitric oxide synthase*

IP, inmunoprecipitación

IP-10, *interferon gamma-induced protein 10*

KC, *Keratinocyte chemoattractant*

LLC, *Lewis Lung Carcinoma*

LPS, lipolisacárido

mAb, anticuerpo monoclonal

MBG, membrana basal glomerular

MC, microscopía confocal

MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*

M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*

MDSC, células supresoras de origen mieloide (*myeloid derived suppressor cells*)

Met, metionina

MET, transición mesénquima-epitelio

mGPBP, GPBP murino

MIG, *Monokine induced by gamma interferon*

MIP-1 $\alpha$ , *Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*

MIP-1 $\beta$ , *Macrophage Inflammatory Protein-1 beta*

MMP-9, metaloproteinasa-9

MTD, dosis máxima tolerada

NC1, dominio no colagenoso-1 (NC1)

NF- $\kappa$ B, NF-kappaB

NK, *Natural Killer*

NOD, *Non Obese Diabetic*

Nt, Extremo N-terminal

NZW, *New Zealand White*

OVA, ovoalbúmina

p, valor *p* (estadística)

PAMP, *Pathogen-associated molecular patterns*

PBS, tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PDGF, *Platelet-derived growth factor*

PET, tomografía por emisión de positrones

PGE2, prostanglandina E2

PH, dominio homólogo a pleckstrina

PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato

PKD, proteína cinasa D

PMN, granulocitos polimorfonucleares

PP2C $\epsilon$ , proteína fosfatasa 2C $\epsilon$

PVDF, fluoruro de polivinilideno (*Polyvinylidene difluoride*)

qPCR, PCR cuantitativa

RANTES, *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

RE, retículo endoplasmático

RNI, reactivos intermediarios de nitrógeno

ROI, reactivos intermediarios de oxígeno

RPMI 1640, *Roswell Park Memorial Institute medium 1640*

RQ, expresión génica relativa (*relative quantification*)

SAP, proteína amiloide del suero

Sbnt, sobrenadante

SCID, *severe combined immunodeficiency*

SD, desviación estándar (*standard deviation*)

SDS, dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE, gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

SHCIE, secuencia <sup>260</sup>Ser-His-Cys-Ile-Glu<sup>264</sup> de GPBP

SR1, dominio rico en serinas 1

SR2, dominio rico en serinas del exón XI

SRBC, *Sheep Red Blood Cells*

START, *Steroidogenic acute regulatory protein-related*

T12, terfenilo 12

TAC, Tomografía axial computarizada

TAM, macrófagos asociados a tumores

TBST, *Tris-Buffered Saline*

TBST, *Tris-Buffered Saline Tween-20*

Tc, T citotóxicos

TCR, receptor de células T

Tg, transgénico

TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor beta*

Th, *T-helper*

TLRs, *Toll-like receptors*

TNF- $\alpha$ , *Tumor necrosis factor alpha*

UTR, *Untranslated region*

VAP, *Vesicle-associated membrane protein*

WB, *western blot*

wt, *wild type*



# Índice

---

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. EL SISTEMA INMUNITARIO.....	3
1.1. Respuesta inmune innata .....	5
1.2. Polarización de los macrófagos.....	7
1.3. Respuesta inmune adaptativa .....	11
2. CÁNCER.....	13
2.1. Metástasis .....	15
2.1.1. EMT, intravasación y células tumorales circulantes 16	
2.1.2. Extravasación, MET y nicho metastásico .....	17
2.2. Estroma tumoral y nicho metastásico .....	19
2.3. Carcinogénesis y sistema inmune .....	22
3. GOODPASTURE ANTIGEN BINDING PROTEIN (GPBP) .....	26
3.1. Colágeno IV .....	26
3.2. Enfermedad de Goodpasture.....	28
3.3. Antígeno Goodpasture.....	28
3.4. GPBP.....	29
3.5. Expresión de GPBP e isoformas .....	32
3.6. Funciones biológicas y patologías asociadas a GPBP .....	34
3.6.1. Colágeno IV y autoinmunidad.....	34
3.6.2. Transporte de ceramida.....	36
3.6.3. Organización de miofibrillas musculares .....	38
3.6.4. Secreción de proteínas.....	38
3.6.5. Estrés oxidativo .....	39
3.6.6. Desarrollo embrionario.....	39

3.6.7. Decidualización .....	40
3.6.8. Estrés de retículo.....	40
3.6.9. Inflamación.....	40
3.6.10. Cáncer y quimiorresistencia.....	41
4. DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPUESTOS TERFENÍlicos INHIBIDORES DE GPBP.....	43
5. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER METASTÁSICO.....	48
5.1. Modelo BALB/c-4T1.....	49
5.2. Modelo C57BL/6-LLC .....	50
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Cultivos celulares.....	59
2. Obtención de macrófagos murinos derivados de la médula ósea .....	59
3. Aislamiento y cultivo de esplenocitos .....	61
4. Tratamientos celulares .....	61
5. Análisis de expresión génica: Extracción de ARN y qPCR .....	63
6. Western blot.....	64
7. Ensayos ELISA .....	65
8. Ensayos Luminex <sup>TM</sup> xMAP <sup>TM</sup> .....	66
9. Citometría de flujo.....	67
10. Inmunoprecipitación .....	67
11. Inmunofluorescencia.....	68
12. Análisis histológico .....	69

13. Anticuerpos y conjugados .....	70
14. Producción de células 4T1-GPBP <sup>-/-</sup> mediante la tecnología CRISPR/Cas9 .....	71
15. Procesado de tejidos .....	73
16. Experimentación animal.....	74
16.1 Ratones knockout y transgénicos para GPBP .....	74
16.2 Modelo C57BL/6-LLC.....	74
16.3 Modelo BALB/c-4T1 .....	75
16.4 Resección quirúrgica del tumor primario en el modelo BALB/c-4T1.....	77
17. PET-TAC .....	77
18. Análisis estadístico .....	78
IV. RESULTADOS .....	79
1. GPBP EN LA POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS .....	81
1.1. La polarización M2 de los macrófagos RAW 264.7 aumenta la expresión y secreción de GPBP .....	81
1.2. Las células tumorales secretan GPBP .....	90
1.3. GPBP media en la polarización M2d pro-tumoral y T12 inhibe esta polarización favoreciendo la polarización M1 anti-tumoral .....	91
2. cGPBP EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER METASTÁSICO: BALB/c-4T1 .....	98
2.1. Caracterización del modelo murino de cáncer de mama BALB/c-4T1.....	98
2.2. cGPBP aumenta en ratonas BALB/c-4T1.....	109
2.3. Caracterización de cGPBP en el modelo BALB/c-4T1...	110
2.4. El sistema inmune participa en la producción de cGPBP en respuesta a la inoculación de células 4T1 .....	112

2.4.1. Los esplenocitos de ratones BALB/c con cáncer metastásico secretan cGPBP .....	112
2.4.2. La inmunocompetencia es un requerimiento para que el tumor induzca los niveles de cGPBP .....	113
2.5. Las células que no forman tumores no inducen la secreción de cGPBP .....	115
3. MODELO ANIMAL DE CÁNCER METASTÁSICO: C57BL/6-LLC .	117
3.1. Caracterización y descripción del modelo murino de cáncer de pulmón C57BL/6-LLC. ....	119
3.2. cGPBP en el modelo C57BL/6-LLC.....	120
3.3. Caracterización de cGPBP en el modelo C57BL/6-LLC .	121
3.4. cGPBP producido por el hospedador promueve la diseminación tumoral .....	123
3.5. La deficiencia en cGPBP no reduce el crecimiento del tumor.....	125
4. GPBP ES UNA DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER.....	128
4.1. mAb N26, un anticuerpo bloqueante de cGPBP, inhibe el crecimiento tumoral y la formación de metástasis.....	128
4.2. T12 inhibe el crecimiento tumoral y las metástasis.....	130
4.3. T12 y N26 no son sinérgicos.....	132
4.4. Las células tumorales son diana de T12 .....	133
4.5. cGPBP se localiza en el nicho premetastásico.....	135
4.6. T12 interfiere en la respuesta inmune que favorece la progresión tumoral .....	137
4.7. Resección quirúrgica del tumor y tratamiento con T12 .....	140
V. DISCUSIÓN.....	147
VI. CONCLUSIONES .....	165
VII. REFERENCIAS .....	169

# **I. INTRODUCCIÓN**



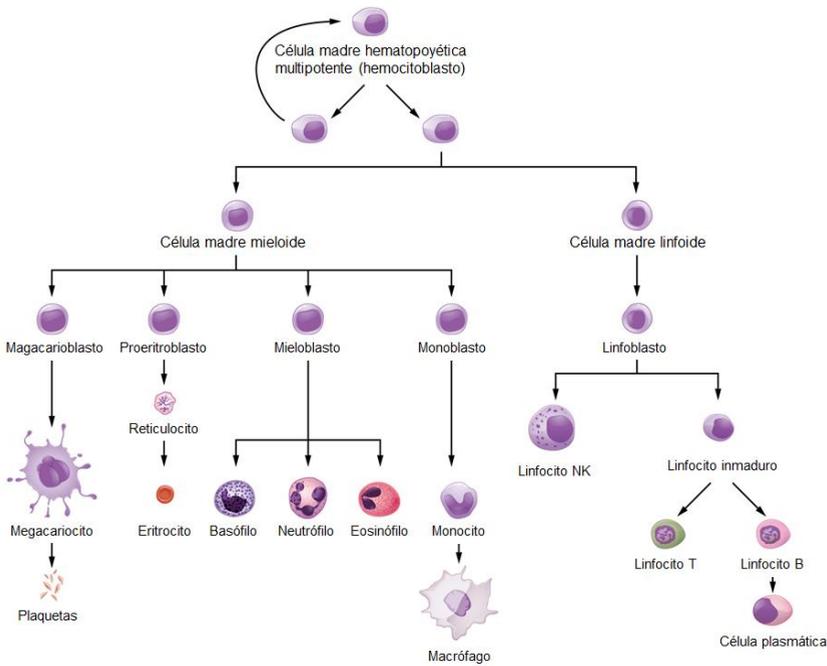
## 1. EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmune es un conjunto de células y tejidos cuya función es proteger el huésped de los diversos agentes patógenos y eliminar sustancias tóxicas o alergénicas que entran a través de las superficies mucosas del organismo. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias claramente diferenciadas: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. El organismo utiliza ambos mecanismos para eliminar cualquier agente perjudicial.

La respuesta inmune innata incorpora las respuestas más rápidas, inespecíficas y filogenéticamente más primitivas, como lo son las defensas superficiales (barreras químicas y físicas), la producción de citoquinas, activación del complemento y respuestas fagocíticas. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa engloba un conjunto de eventos más lentos, específicos, con “memoria” y de mayor complejidad. Se trata de respuestas contra antígenos mediante la producción de anticuerpos e inmunidad mediada por células, que muestra rangos extraordinariamente diversos de especificidad (García *et al.*, 1999). En el caso de los mamíferos, la inmunidad adaptativa ha alcanzado un grado de sofisticación muy elevado, ya que se precisa mantener con vida al individuo durante los años suficientes para su reproducción, y a ese objetivo contribuye la memoria inmunitaria, que es una de sus principales propiedades. En contraste, los organismos con ciclos de vida más breves, como los insectos, sólo tienen inmunidad innata.

La inmunidad innata y adaptativa actúan de forma conjunta, complementaria y coordinada. Aunque las respuestas sean

fundamentalmente distintas en sus mecanismos de acción, la sinergia entre ellas es esencial para una respuesta inmunitaria efectiva.



**Figura 1. Sistema hematopoyético de la médula ósea.** Todas las células del sistema inmune, así como los eritrocitos, provienen de la diferenciación de células madre hematopoyéticas.

Los leucocitos y las células accesorias que intervienen en la respuesta inmunitaria están distribuidas por todo el cuerpo, aunque preferentemente en los órganos linfoides (médula ósea, timo, bazo, nódulos linfáticos y mucosa asociada al tejido linfoide). Estos órganos se localizan estratégicamente en distintas áreas para proteger al organismo frente a las agresiones, de forma que los leucocitos puedan migrar a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático hasta las zonas donde se requiera su actuación. Todos los leucocitos provienen de las

células madre hematopoyéticas de la médula ósea, las cuales alcanzan distintos grados de diferenciación en forma de precursores hasta llegar a completar el proceso dando lugar a los distintos tipos de células. Dentro de este proceso de diferenciación, se distinguen dos linajes principales: la línea linfoide y la línea mieloide (**Fig. 1**). El progenitor mieloide común dará lugar a los granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas, megacariocitos y eritrocitos. El progenitor linfoide común dará lugar a los linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK (Huston, 1997).

### **1.1. Respuesta inmune innata**

Es la primera respuesta inmune en activarse debido a su rapidez de estimulación y actuación, y se caracteriza por ser una respuesta inespecífica que tiene como finalidad reclamar la presencia de células inflamatorias para eliminar a los agentes dañinos. Se considera la primera línea de defensa y está presente en todos los animales.

Existen diferentes leucocitos que intervienen en estos mecanismos como los monocitos/macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares (PMN), las células dendríticas, los mastocitos y las plaquetas, todos pertenecientes al linaje mieloide. Las únicas células linfoides que participan directamente en la inmunidad innata son los linfocitos *Natural Killer* (Linfocitos NK). Las plaquetas o trombocitos en realidad no son células, sino fragmentos citoplasmáticos carentes de núcleo derivados de sus células precursoras, los megacariocitos.

La inflamación es la respuesta de la inmunidad innata que sucede como reacción al daño tisular y a la infección. Se trata de una

respuesta por etapas en las que se secretan sustancias que vasodilatan (facilitar la llegada de la sangre) y quimioquinas que atraen a los PMN que son los encargados de destruir el agente infeccioso o desencadenante de la inflamación e inducir la respuesta adaptativa.

Brevemente, en la herida, los factores de coagulación y la calicreína producen bradicininas vasodilatadoras y las plaquetas liberan serotonina que es un atrayente de leucocitos.

Las bacterias que infectan la herida activan el complemento que produce anafilotoxinas (C3a, C4a y C5a) que liberan histamina vasodilatadora desde los mastocitos y atrae a leucocitos y macrófagos.

Bradicininas, histamina, serotonina y complemento causan vasodilatación con extravasación de plasma y leucocitos.

Las bacterias activan a los macrófagos que secretan citoquinas que atraen aún más potentemente a los neutrófilos, células inmunitarias (células dendríticas) y además células para la reparación de tejidos (fibroblastos, células epiteliales y endoteliales).

En la herida, las plaquetas, leucocitos y endotelio sintetizan *de novo* eicosanoides que mantienen y regulan la respuesta inflamatoria local (calor, rubor, coagulación, edema y dolor).

Los neutrófilos producen y secretan factores líticos que matan y degradan patógenos.

Neutrófilos y macrófagos fagocitan patógenos y productos derivados. Las células dendríticas también fagocitan patógenos e inician la respuesta inmunitaria adquirida específica.

Los fibroblastos, células epiteliales y endoteliales reparan la herida.

Los macrófagos son las células centrales en la respuesta innata a través de sus receptores de membrana, TLR (*Toll-like receptors*), y citoplasmáticos, como los receptores NLR (*Nod-like receptors*). Estos receptores se unen a patrones moleculares expresados en microorganismos invasores llamados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) y patrones moleculares originados por las células dañadas llamados DAMPs (*danger-associated molecular patterns*). La estimulación de los receptores de membrana induce la expresión de muchas citoquinas incluyendo la pro-IL-1 $\beta$ . Todas las citoquinas se van secretando conforme se sintetizan excepto ésta que requiere de la activación de los receptores intracelulares y ensamblado del inflamasoma, un complejo multiproteico con actividad caspasa que mediante procesamiento proteolítico libera una gran cantidad de IL-1 $\beta$  (Schroder y Tschopp, 2010), una citoquina que estimula a todas las células de alrededor de la zona de lesión a secretar quimioquinas para que acudan los PMN en grandes cantidades.

### **1.2. Polarización de los macrófagos**

Los macrófagos poseen diversas funciones claves en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Además de los macrófagos que se originan a partir de monocitos circulantes, existen macrófagos residentes especializados que se encuentran en la mayoría de los tejidos del organismo. Algunos ejemplos son las células de Kupffer en el hígado, las células de Langerhans en la piel, la microglia en el cerebro, macrófagos esplénicos en el bazo, los macrófagos alveolares

del pulmón, los macrófagos del tejido adiposo y los osteoclastos del hueso. El origen de los macrófagos residentes se cree que es embrionario, diferente a los macrófagos reclutados y diferenciados a partir de los monocitos circulantes, cuyo origen es la médula ósea (Perdiguero y Geissmann, 2016). Estas células del sistema inmune, además de ejercer su función gracias a la fagocitosis y la presentación de antígenos, son críticas durante el proceso inflamatorio participando directamente en su regulación.

Los macrófagos expresan diferentes receptores que permiten su interacción con el microambiente y su activación en respuesta a los diferentes estímulos. Estas señales activarán los macrófagos de distinta forma, reflejando su enorme plasticidad en la adquisición de distintos fenotipos y diferentes respuestas. En función del tipo de polarización que se produzca los macrófagos se clasifican en dos grandes grupos, mimetizando la respuesta Th1/Th2 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver en respuesta inmune adaptativa): macrófagos con activación clásica (M1) y macrófagos con activación alternativa (M2). Los macrófagos M1 poseen propiedades inmunoestimuladoras Th1 y destructivas, y se caracterizan por un perfil de expresión IL-1<sup>alta</sup>, IL-6<sup>alta</sup>, IL-12<sup>alta</sup>, IL-10<sup>baja</sup>, IL-23<sup>alta</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>alta</sup>. Por el contrario, los macrófagos M2 poseen propiedades inmunosupresivas y protectoras, y se caracterizan por un perfil IL-1<sup>baja</sup>, IL-6<sup>baja</sup>, IL-12<sup>baja</sup>, IL-10<sup>alta</sup>, CD206<sup>alta</sup>, además inhiben las señales Th1 y poseen poca capacidad de presentación de antígenos (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2005; Allavena *et al.*, 2008).

Sin embargo, esta clasificación estricta entre M1 y M2 no representa la gran plasticidad de los macrófagos y proporciona una visión muy simple de la polarización. Es por ello que, en trabajos más

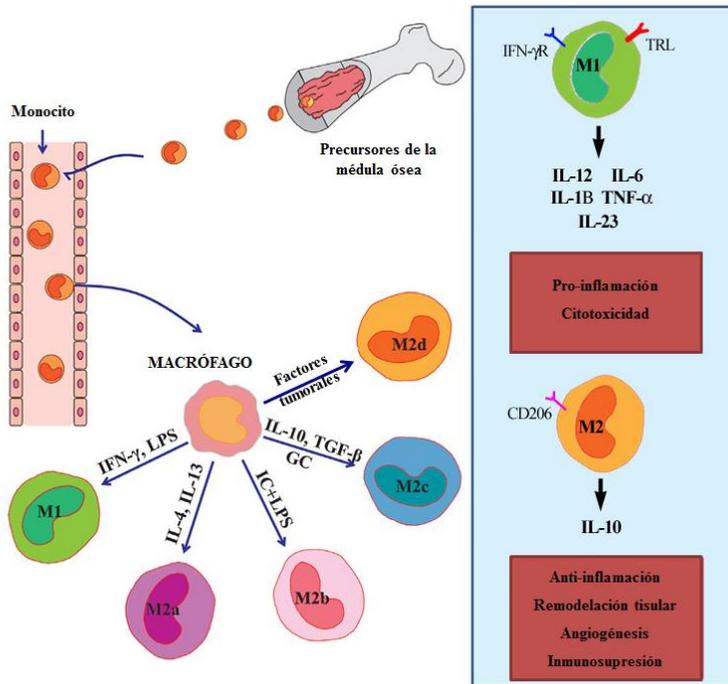
recientes, se describen un mayor número de fenotipos con funciones biológicas y perfiles de expresión más detallados (M1, M2a, M2b, M2c, M2d) (**Fig. 2**).

Los macrófagos **M1** se activan en respuesta a IFN- $\gamma$ , lipopolisacárido (LPS) o citoquinas (TNF- $\alpha$ , GM-CSF...). Se caracterizan por la secreción de niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ ; elevada producción de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI) y reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI); alta capacidad de presentación de antígenos y elevada producción de IL-12. Poseen alta capacidad endocítica y constituyen la primera línea de defensa contra patógenos, además promueven y amplifican la respuesta Th1 de los linfocitos CD4+ gracias a la producción de IL-12. Por tanto, se trata de células efectoras potentes capaces de matar microorganismos y células tumorales (Balkwill y Mantovani, 2001).

Los macrófagos **M2a** estimulan la respuesta anti-inflamatoria y se activan con las citoquinas IL-4 y/o IL-13, mayoritariamente producidas por linfocitos CD4+ Th2, mastocitos y basófilos. Estas citoquinas pueden inhibir la respuesta de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 o IFN- $\gamma$ . Además, los macrófagos M2a expresan proteínas que promueven la fibrogénesis, la reparación tisular y la proliferación (Mantovani *et al.*, 2002).

Los macrófagos **M2b** aparecen debido a la estimulación del receptor de IL-1 o con la exposición a inmunocomplejos y LPS. Se caracterizan por una elevada producción de IL-10 y baja producción de IL-12, un perfil de expresión que favorece la respuesta inmune Th2 (Nesbit *et al.*, 2001).

Los macrófagos **M2c** se activan con IL-10, TGF- $\beta$  o glucocorticoides y se caracterizan por la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias y participan muy activamente en la eliminación de sustancias extrañas y materiales de desecho gracias a los receptores *scavenger* (Allavena *et al.*, 2008).



**Figura 2. Polarización de macrófagos.** Los macrófagos tisulares y los derivados de monocitos circulantes adquieren diferentes fenotipos. Los macrófagos adquieren un fenotipo M1 (pro-inflamatorio) o M2 (anti-inflamatorio) dependiendo de los estímulos del microambiente. El fenotipo M1 produce grandes cantidades de IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . El fenotipo M2 se caracteriza por secretar niveles elevados de IL-10 y se subdivide en M2a, M2b, M2c y M2d dependiendo de los estímulos. LPS, lipopolisacárido; IC, inmunocomplejo; GC, glucocorticoide; CD206, receptor de manosa; TLR, Receptor Toll-like, IFN- $\gamma$ R, receptor de IFN- $\gamma$ . Modificado de Chanmee *et al.*, 2014.

Los macrófagos **M2d** o macrófagos asociados a tumores (**TAM**, *tumor associated macrophages*) se caracterizan por una elevada producción de IL-10, baja producción de IL-12 y son activados por células tumorales, tanto mediante factores solubles como contacto célula-célula (Mantovani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

### **1.3. Respuesta inmune adaptativa**

Al contrario que la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa manifiesta una especificidad exquisita por sus antígenos diana. Los antígenos son cualquier molécula, ajena o propia, capaz de ser reconocida por el sistema inmune adaptativo y activarlo. Este tipo de respuesta, además de ser una respuesta específica, se caracteriza por aumentar en intensidad a medida que aumenta el número de exposiciones a un mismo agente patógeno, por tanto, el sistema inmunitario adaptativo posee memoria y es capaz de prevenir un contagio de una enfermedad anteriormente detectada y combatida.

Las respuestas adaptativas se basan principalmente en receptores específicos de antígenos expresados en la superficie de linfocitos B y T. Al contrario que las moléculas de reconocimiento de patrones de la inmunidad innata, los receptores de antígenos de la inmunidad adaptativa están codificados por genes ensamblados por recombinación somática para formar los receptores de células T (TCR, T-cell receptor) y las inmunoglobulinas (receptor de las células B, anticuerpos). El ensamblaje de los receptores de antígenos a partir de cientos de genes codificados en la línea germinal permite la formación de millones de diferentes receptores de antígenos y, por tanto, una inmensa diversidad. Cada uno de estos receptores tendrá una

especificidad única por un antígeno en concreto (Bonilla y Oettgen, 2010; Schroeder y Cavacini, 2010).

Las células que se encargan de llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa provienen todas del linaje linfoide y son los linfocitos B, linfocitos T colaboradores (Th, T-helper), linfocitos T reguladores y los linfocitos T citotóxicos (Tc).

La característica fundamental por la que se definen todos los linfocitos T es por la expresión del receptor T (TCR) en la superficie de la célula. Cada linfocito consta de un único tipo de receptor T (TCR) como resultado de una selección durante el desarrollo y maduración de las células en el timo. La unión entre el antígeno y el TCR, gracias a las células presentadoras de antígenos, inducen la activación de las células T. Estas células activadas proliferan muy rápido (expansión clonal) y migran hacia los tejidos donde están presentes los antígenos. Allí ejercen funciones efectoras como citotoxicidad mediada por células o producción de citoquinas. La mayoría de las células T efectoras desaparecerán después de la eliminación de los agentes antigénicos pero una pequeña población permanecerá estable para futuros ataques formando las llamadas células T de memoria.

Los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) están especializados en la lisis directa de células diana de donde provienen los antígenos. Su función es eliminar células malignas o células infectadas por virus u otros microorganismos patógenos intracelulares.

Los linfocitos Th o colaboradores (CD4<sup>+</sup>) producen citoquinas que pueden inducir respuestas tóxicas directamente sobre las células diana o pueden estimular otras funciones de células T efectoras y la

producción de anticuerpos por parte de linfocitos B, además de movilizar fuertes mecanismos inflamatorios. En función del tipo de estimulación darán lugar a diferentes tipos de respuestas. Se distingue la respuesta Th1 pro-inflamatoria, importante en la defensa frente a microorganismos; la respuesta Th2 anti-inflamatoria, importante en la defensa contra parásitos; y la respuesta Th17 implicada directamente en las reacciones alérgicas (Kaiko *et al.*, 2008).

Los linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) juegan un papel fundamental en la homeostasis y la modulación de la respuesta inmune. Se trata de células que se encargan de suprimir la actividad de otros linfocitos y ayudar a controlar las respuestas inmunitarias. Su función principal es eliminar la inmunidad mediada por células al final de la reacción inmune y eliminar células T autorreactivas (Shimizu *et al.*, 2006).

Los linfocitos B son células programadas genéticamente para codificar receptores de superficie específicos para un antígeno determinado. Una célula B, una vez reconoce un antígeno determinado, se multiplica y se diferencia a célula plasmática. La función de estas células es la producción de grandes cantidades del receptor específico en forma soluble que será secretado al medio extracelular (anticuerpos o inmunoglobulinas).

## 2. CÁNCER

La oncogénesis es un proceso en el cual las células normales se transforman en células del cáncer debido a una acumulación de

alteraciones hereditarias (mutaciones y cambios epigenéticos) que reprograman a la célula para entrar en un proceso incontrolado de división. Estas células adquieren una ventaja de crecimiento selectivo y sufren una expansión clonal como resultado de la activación de protooncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores.

Los cambios necesarios para originar una célula cancerosa pueden ser llevados a cabo de forma diferente. Aunque todos los tumores malignos deben superar las mismas funciones regulatorias para poder crecer y progresar, los genes involucrados y el orden en que lo hacen pueden variar. Cuando se producen múltiples mutaciones que afectan a múltiples genes, de forma progresiva, se generan unos atributos fenotípicos característicos del tumor que afectan a su agresividad y a su potencial maligno. Este fenómeno se denomina “progresión tumoral” y da lugar al fenotipo maligno del tumor, lo que conlleva autosuficiencia en las señales del crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión del sistema inmune, capacidad para invadir y metastatizar, transición epitelio-mesénquima (EMT) y mesénquima-epitelio (MET) (Hannahna y Weiberg, 2000).

El punto de inflexión fundamental en la carcinogénesis es la formación de metástasis. Para lograr metastatizar las células tumorales necesitan degradar e invadir la matriz extracelular, intravasarse, circular a través de vasos sanguíneos y/o linfáticos, extravasarse y, finalmente, establecer tumores secundarios. En este nuevo ambiente hostil deben escapar del sistema inmune para lograr sobrevivir y crecer (Nguyen *et al.*, 2009).

## 2.1. Metástasis

La metástasis, y no el crecimiento del tumor primario, es la principal causa de muerte debido a la enfermedad del cáncer, y se trata de la propagación de células tumorales a otros tejidos del organismo. Desde un punto de vista clínico, entender la enfermedad en los sitios metastásicos es fundamental.

En el momento del diagnóstico, el número de pacientes con metástasis, detectadas u ocultas, es substancial. En muchos pacientes la formación de metástasis ya se ha producido en el momento del diagnóstico del tumor primario, aunque clínicamente no existan evidencias de éstas (Talmadge y Fidler, 2010) y otros muchos pacientes aun no teniendo lesiones metastásicas en el momento del diagnóstico sí las desarrollarán a lo largo del tratamiento de la enfermedad (Tao *et al.*, 2008). Por ejemplo, aproximadamente entre el 25% y el 30% de los pacientes con cáncer de mama presentan recurrencia de la enfermedad tras la extirpación del tumor primario (Janni *et al.*, 2005a; Riethdorff *et al.*, 2008). Esto indica que debe existir una diseminación oculta (Janni *et al.*, 2005b; Riethdorff *et al.*, 2008) y que ésta es indetectable por los métodos diagnósticos tradicionales empleados (Hosch *et al.*, 2001; Hawes *et al.*, 2001).

Las metástasis suelen tratarse como una enfermedad sistémica con agentes quimioterápicos y/o radiación, independientemente de que los factores, que influyen en la aparición y desarrollo de los focos, y las respuestas a los tratamientos difieren muchos de unos a otros. Es bien cierto que estos tratamientos pueden ser capaces de ralentizar el

proceso de la enfermedad, pero pocas veces son capaces de pararlo por completo o revertirlo.

La “cascada” metastásica conlleva diversos procesos: crecimiento de las células del tumor primario, escapar del tumor primario, EMT, modificación de la matriz extracelular, motilidad y penetración en el estroma local, entrada en los vasos vasculares o linfáticos locales (intravasación), agregación con plaquetas, interacción y adhesión con zonas endoteliales distantes, extravasación, MET, recolonización (micrometástasis) y expansión (macrometástasis). Todo este proceso se lleva a cabo mientras las células metastásicas escapan del sistema inmune y sobreviven en estos ambientes adversos (Thompson y Newgreen, 2005; Gupta y Massagué, 2006; Paterlini-Brechot y Benali, 2007; Miyazono, 2009; Chaffer y Weinberg, 2011).

### ***2.1.1. EMT, intravasación y células tumorales circulantes***

Para que las células tumorales puedan abandonar el tumor primario deben sufrir un cambio de fenotipo desde célula epitelial a célula mesenquimal y, por tanto, móvil. Este proceso se caracteriza por ser un conjunto complejo y coordinado de cambios moleculares que conducen a cambios en el comportamiento celular. La EMT que se produce durante el proceso metastásico se origina cuando las células tumorales epiteliales abandonan el tumor primario y migran. Para ello, inicialmente ocurre una rotura de las uniones de las células epiteliales; la deslocalización de las proteínas de estas uniones; y una reorganización del citoesqueleto celular (Zeiberg y Neilson, 2009; Miyazono, 2009). Con la EMT las células pierden la polaridad apico-basal, presentando una morfología en forma de huso y expresando marcadores mesenquimales.

Las señales que inducen este proceso derivan principalmente del estroma tumoral y son señales como HGF, EGF, PDGF, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (Massagué, 2008).

Una vez las células tumorales completan el proceso de EMT, y se convierten en células móviles, deben atravesar la matriz extracelular del estroma tumoral y terminar intravasando vasos sanguíneos y/o linfáticos para convertirse en células tumorales circulantes (CTC). Las CTC son células tumorales que se han desprendido completamente del tumor primario y circulan por el organismo, cuya diseminación desde el tumor primario puede ocurrir por dos vías: linfática y sanguínea. En el momento que las CTC logran alcanzar el torrente sanguíneo o los vasos linfáticos tendrán que circular por estas vías sin afectar a su viabilidad hasta lograr llegar a un tejido cuyo ambiente le permita la supervivencia y proliferación. Cuando las CTC alcanzan la circulación, sanguínea o linfática, únicamente un pequeño número de las células diseminadas serán capaces de sobrevivir durante el transporte sistémico. Las CTC mantienen características mesenquimales durante toda esta etapa porque la EMT convierte a las células en refractarias a anoikis, apoptosis que sufren las células epiteliales por el desanclaje al privarlas de las correspondientes señales de supervivencia que aporta el estroma. El proceso de EMT permitiría la supervivencia de las células, así como la asociación con leucocitos y plaquetas durante el proceso (Tsai y Yang, 2013).

### **2.1.2. Extravasación, MET y nicho metastásico**

Las CTC tienen potencial maligno y capacidad de formación de metástasis y se caracterizan, entre otras cosas, por la expresión de

marcadores de la EMT (Aktas *et al.*, 2009) y por su elevado potencial proliferativo (Solakoglu *et al.*, 2002). Estas células van a ser capaces de infiltrar un órgano determinado solamente si poseen las funciones necesarias para atravesar las paredes de los capilares de este órgano y, por tanto, llevar a cabo el proceso de extravasación (Minn *et al.*, 2005; Minn *et al.*, 2007; Padua *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009; Bos *et al.*, 2009). De las células individuales que pasan esta selección, solamente van a ser viables aquellas que estén dotadas de funciones para sobrevivir en el nuevo entorno (Minn *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2005) y un pequeño número de estas tendrá la habilidad de reiniciar el crecimiento tumoral (Gupta *et al.*, 2005).

Después de la salida de estas células tumorales circulantes del sistema circulatorio por extravasación, las células tumorales colonizan un tejido nuevo y para ello el primer paso que deben de llevar a cabo es la transición mesénquima-epitelio. Diversos estudios demuestran que la reversión de la EMT es esencial para la colonización metastásica (Vega *et al.* 2004; Mejlvang *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2012). Las células tumorales necesitan revertir el fenotipo y adquirir rasgos epiteliales para aumentar la proliferación en el tejido colonizado.

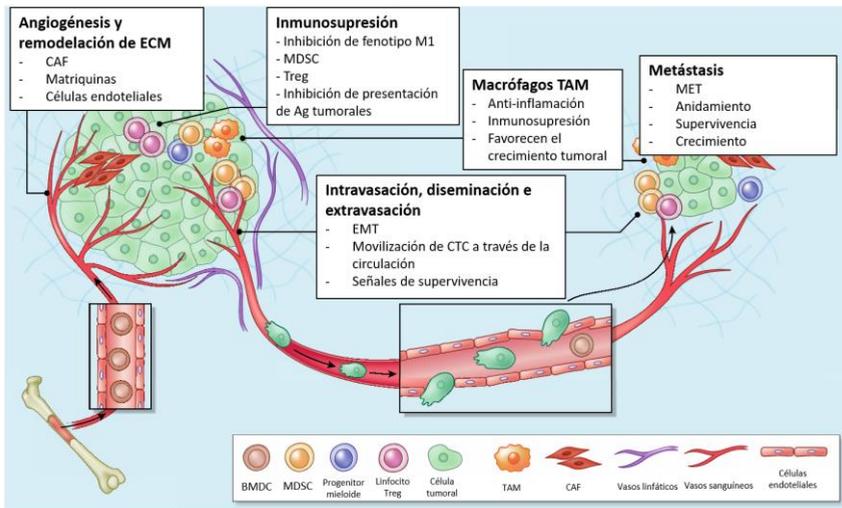
Además de las propiedades intrínsecas de las CTC, el microambiente del lugar de anidamiento en órganos secundarios es crítico para el destino de estas células. El término de nicho metastático ha sido establecido para describir las condiciones microambientales requeridas para la supervivencia y crecimiento de las CTC en los tejidos secundarios invadidos. Su formación puede ser inducida, al menos en parte, por el tumor primario antes de la llegada y establecimiento de las células tumorales (denominado nichos premetastáticos) (Jaoyce y

Pollard, 2009; Lyden y Psaila, 2009; Sleeman, 2012). Esta capacidad que tienen las células tumorales de afectar tejidos alejados del tumor primario permite a las células cancerosas colonizar órganos específicos donde puedan crecer tumores secundarios. Factores secretados a partir del tumor primario de forma directa y células derivadas de la médula ósea movilizadas por el tumor primario y dirigidas al nicho premetastásico se creen que son claves en este proceso (Kaplan *et al.*, 2005; Hiratsuka *et al.*, 2006; Kovanetz *et al.*, 2010; Granot *et al.*, 2011). El concepto de nicho premetastásico y la participación del estroma en la progresión tumoral abre un nuevo campo de estudio y nuevas estrategias para el diagnóstico, evaluación del pronóstico y terapia contra el cáncer.

## 2.2. Estroma tumoral y nicho metastásico

El estroma tumoral está compuesto por matriz extracelular, células no tumorales y otras moléculas que producen. Se trata de un componente vital de los tumores primarios que, junto con los defectos genéticos subyacentes en las células tumorales, determinan las características de crecimiento, morfología, e invasividad del tumor. Paralelamente a los cambios genéticos en las células tumorales, el estroma tumoral evoluciona progresivamente en el desarrollo del tumor primario. Las células tumorales que se diseminan desde el tumor primario dependen de este estroma, así como dependen del microambiente en el tejido secundario donde desarrollarán metástasis (**Fig. 3**). La formación de un estroma que favorece la supervivencia y crecimiento de las células tumorales, tanto en el tumor primario como en el nicho metastásico, es clave en el desarrollo de la enfermedad (Sleeman, 2012).

El desarrollo y evolución del estroma y de los nichos metastáticos deben de considerarse en el amplio contexto de la tumorigénesis y la progresión tumoral. La formación de tumores primarios es dependiente no solo de los cambios hereditarios acumulativos, sino también del desarrollo de un estroma tumoral inflamatorio. Estos dos procesos son mutuamente dependientes en una co-evolución continua.



**Figura 3. El microambiente promueve el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.** El estroma tumoral es un elemento clave en el desarrollo del cáncer. El proceso de angiogénesis facilita la llegada de células no tumorales, como células del sistema inmune o fibroblastos. Las células tumorales sufren un proceso de EMT para convertirse en células móviles y lograr diseminarse por el organismo. Estas células tumorales circulantes llegarán a tejidos alejados donde anidarán e iniciarán nuevos focos de crecimiento, consolidando el proceso de metástasis. BMDC, células de la médula ósea; MDSC, células supresoras de origen mieloide; Treg, Linfocito T regulador; TAM, macrófagos asociados a tumores; CAF, Fibroblastos asociados al cáncer; EMT, transición epitelio-mesénquima; MET, transición mesénquima-epitelio. Modificado de Quail y Joice, 2013.

La dependencia de las células del tumor primario del estroma es crítica, lo cual significa que cuando estas células se diseminan la ausencia de este estroma en los tejidos secundarios a colonizar determina su viabilidad. La formación de estos nichos, sean premetastásicos o después de la llegada de las células tumorales, sirve para restablecer el ambiente estromal que las células necesitan para crecer como tumores. Por tanto, la evolución de los nichos metastáticos recapitula la progresión del estroma en el tumor primario (Sceneay *et al.*, 2013).

El cáncer se considera una enfermedad crónica que implica múltiples compartimentos tisulares y engloba una población muy diversa de células, incluyendo las células tumorales, fibroblastos, células del sistema inmune y células endoteliales (Tlsty y Coussens, 2006). Estudios ultraestructurales junto con análisis inmunohistoquímicos y bioquímicos muestran la plasticidad del estroma tumoral (Hoff, 1988; Ronnov-Jessen *et al.*, 1996). Existen cambios en la expresión de proteínas como la actina, vimentina, miosina, calpolina, tenascina o desmina (Hoff, 1988; Mackie *et al.*, 1987). Estas proteínas se expresan durante los procesos de inflamación y cicatrización y reflejan un programa de diferenciación mesenquimal. Durante la progresión del cáncer, estas proteínas y otras relacionadas con la matriz extracelular favorecen la proliferación, inflamación, angiogénesis y migración de las células tumorales. El tipo celular mayoritario en el estroma tumoral son los fibroblastos, denominados CAF (*cancer-associated fibroblasts*), los cuales se caracterizan por patrones desorganizados de crecimiento, proliferación exacerbada y una elevada producción de colágeno, hialuronato y factores de crecimiento (Bauer *et al.*, 1979; Knudson *et al.*, 1984). Esta gran reacción fibrótica, denominada desmoplasia, se

caracteriza por la acumulación de colágenos fibrilares tipo I y III, así como una remodelación continua de colágeno no-fibrilar tipo IV (Egeblad *et al.*, 2010). En este contexto, la matriz extracelular juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer encargándose de proveer un soporte estructural y participando en las respuestas a diversos estímulos. La matriz contiene una mezcla de proteínas fibrilares, glicoproteínas, proteoglicanos, citoquinas y factores de crecimiento (Tlsty y Coussens, 2006). Existen incluso proteínas bioactivas embebidas en la matriz que son activadas por cortes proteolíticos y liberadas como fragmentos activos solubles, como por ejemplo la angiostatina, endostatina o tumstatina, denominadas matriquinas (Monboisse *et al.*, 2014). Con todo ello, el estroma tumoral forma parte activamente del proceso de carcinogénesis y favorece la supervivencia, proliferación y migración de las células tumorales durante la progresión tumoral.

### **2.3. Carcinogénesis y sistema inmune**

Hoy en día no hay duda de que la reacción inmune asociada al tumor y la inflamación son factores indispensables en la progresión tumoral y la metástasis (Bui *et al.*, 2007; DeNardo *et al.*, 2007; Ostrand-Rosenberg, 2008; Mantovani *et al.*, 2008; Allavena *et al.*, 2008).

En 2000 se publicó el trabajo “The Hallmarks of cancer” escrito por Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg donde se recogían 6 propiedades básicas de la enfermedad del cáncer. En este trabajo se describieron aspectos muy claros dentro de la progresión tumoral: la evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, la auto-señalización para la proliferación, resistencia a señales supresoras de proliferación, angiogénesis e invasión tisular y metástasis. En este

momento, la importancia del sistema inmune en la progresión tumoral se limitaba a la teoría de la inmunovigilancia. En esta teoría la inmunidad inspecciona los tejidos propios, lo cual le permite detectar, eliminar y recordar los cambios genéticos que dan lugar a los tumores, de manera que éstos no pueden progresar y, lo que es más importante, no se repiten gracias a la memoria inmunitaria.

Gracias a estudios desarrollados en esa época (Shankaran *et al.*, 2001; Real *et al.*, 2001; Cabrera, 2003) comenzó una nueva era para la inmunología tumoral y con ello un cambio fundamental en la visión de la misma. En la última actualización de las propiedades básicas de la enfermedad del cáncer en “Hallmarks of cancer: Next generation” publicado en 2011, por los mismos autores, se añadieron 4 nuevas propiedades emergentes: capacidad de modificar el metabolismo para lograr la proliferación celular, inestabilidad genómica y mutaciones, evasión del sistema inmune y la inflamación como un proceso estimulador de la tumorigénesis. Plantear la hipótesis de que el sistema inmune podía ser manipulado y modificado a expensas de una enfermedad para contribuir a la progresión de la misma fue realmente transgresor y desconcertante. Todo ello en una época donde se asumía que el sistema inmune era nuestra principal arma de defensa para agresiones intrínsecas como las células tumorales.

Este hecho no está en desacuerdo con la idea de que el sistema inmune sí que detecta aberraciones internas y de que sí que es capaz de destruirlas. Se han descrito numerosos antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por las células T, por lo que se ha demostrado la presencia de células T activas que atacan al tumor. Además, se conoce que tanto linfocitos NK, linfocitos T citotóxicos, como otros tipos

celulares relacionados con el sistema inmune, están implicados también en el ataque frente al desarrollo de tumores. Aún con todo, muchas células tumorales consiguen evadir e incluso modificar estos procesos para obtener beneficios y favorecer su proliferación y progresión.

La evasión del sistema inmune se consigue a través de diversos mecanismos, tanto directos como indirectos. Algunos ejemplos son la secreción de moléculas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  o IL-10, la inducción de poblaciones inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores o células mieloides supresoras (MDCS, *myeloid derived suppressor cells*) o la inducción de fenotipos pro-tumorigénicos como los macrófagos TAM. Está demostrado que se dan de forma simultánea múltiples mecanismos de evasión y, por tanto, no son excluyentes (Real *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2013). La realidad es que las células del sistema inmune forman parte activamente del estroma tumoral y del desarrollo de la enfermedad, por lo que la infiltración de leucocitos en tumores primarios es muy común en diversos tipos de cáncer (Mantovani *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010). A pesar de que la composición de los leucocitos infiltrantes y el papel que juegan puede variar en cada tumor, en general tienen una función inmunosupresora y proveen un microambiente pro-tumoral. Existen estudios en modelos animales donde se observa que el microambiente tumoral se altera considerablemente al disminuir la infiltración de leucocitos, lo cual tiene como consecuencia una disminución en las metástasis (Bunt *et al.*, 2007). Por tanto, está demostrado que la cooperación entre las células inmunes del estroma y las células tumorales es crítica para el desarrollo de metástasis.

En este sentido, uno de los tipos celulares más importantes en el desarrollo de la enfermedad del cáncer son los macrófagos y/o monocitos. Está descrito en pacientes de cáncer que las células tumorales secretan factores para reclutar estas células del sistema inmune (Kurahara *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2011), así como la producción de diversos factores que promueven la diferenciación y polarización de monocitos infiltrantes en macrófagos M2 (Mantovani *et al.*, 2008). Como ya se ha comentado anteriormente, este fenotipo en cuestión se denomina TAM y se asocia con mal pronóstico en cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas (Kurahara *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Un ejemplo de la importancia de los macrófagos TAM en la carcinogénesis es el trabajo de Lin y colaboradores, donde en un modelo murino de cáncer de mama se demostró la reducción de metástasis pulmonares al producir una mutación deletérea en el gen que codifica la proteína M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), también denominada CSF-1 (*colony stimulating factor 1*) (Lin *et al.*, 2001). M-CSF es una citoquina que induce a las células madre hematopoyéticas a diferenciarse a monocitos y macrófagos. Otros autores han demostrado la efectividad de una vacuna que tiene como diana los macrófagos TAM, de forma que logran inhibir el proceso de angiogénesis y metástasis, utilizando el modelo ortotópico de cáncer de mama BALB/c-4T1 (Luo *et al.*, 2006).

### 3. GOODPASTURE ANTIGEN BINDING PROTEIN (GPBP)

#### 3.1. Colágeno IV

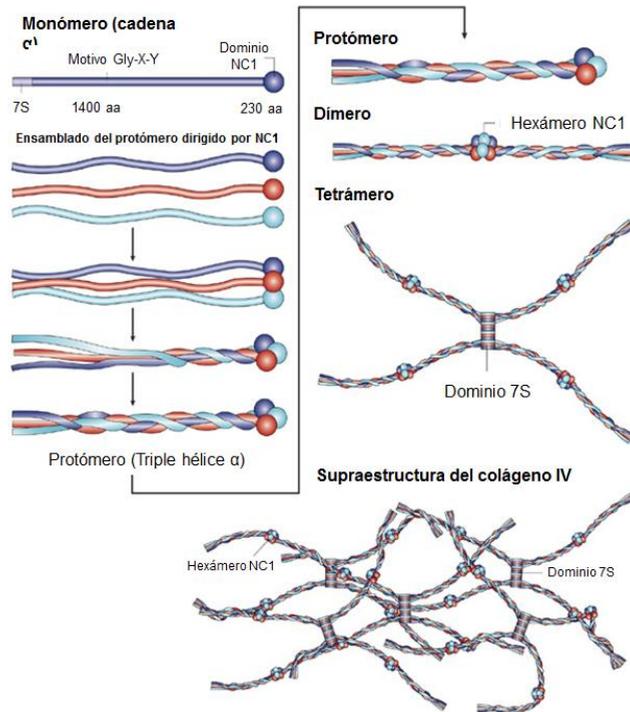
El colágeno IV es un componente principal de las membranas basales, una matriz extracelular altamente especializada que sirve de soporte físico y proporcionan microambientes dinámicos y versátiles que modulan el comportamiento celular. Una función principal de las membranas basales epiteliales es la polarización de las mismas definiendo polo apical y basal tan importante en las mucosas.

La estructura básica del colágeno IV está formada por tres hélices levógiras muy estiradas, cadenas  $\alpha$ , que se asocian entre sí para formar una triple hélice dextrógira muy estrecha e inextensible, que recibe el nombre de protómero. Existen 6 genes que codifican cadenas  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ) y aunque el número de posibles combinaciones es muy elevado, sólo se han descrito tres protómeros:  $\alpha 1$ . $\alpha 1$  $\alpha 2$ (IV),  $\alpha 3$ . $\alpha 4$ . $\alpha 5$ (IV) y  $\alpha 5$ . $\alpha 5$ . $\alpha 6$ (IV) (Mao *et al.*, 2015).

El protómero posee tres dominios principales: un dominio central en triple hélice con una secuencia característica G-X-Y necesaria para que las tres cadenas se puedan superenrollar, un dominio N terminal también triple helicoidal denominado 7S y un dominio C terminal globular no colagenoso, denominado NC1 (Hudson *et al.*, 2003).

Los protómeros se asocian formando estructuras cuaternarias características. Cuatro protómeros de colágeno IV se unen a través de sus extremos 7S, por el otro extremo dos dominios NC1 interaccionan para formar una estructura cuaternaria de naturaleza hexamérica (**Fig. 4**). El hexámero NC1 están estabilizados por puentes disulfuro

intramoleculares e intracatenarios y enlaces sulfilimina intermoleculares que se forman entre un residuo hidroxilisina y una metionina de protómeros adyacentes (Vanacore *et al.*, 2009). La estructura cuaternaria esquematizada del colágeno IV sobre un plano es en forma de red romboidal.



**Figura 4. Ensamblaje y estructura del colágeno IV.** El dominio NC1 es central en el ensamblaje de la molécula triple helicoidal del colágeno IV (protómero). Este proceso comienza cuando los dominios NC1 de tres cadenas  $\alpha$  interactúan entre sí. El siguiente paso es la dimerización, de forma que dos protómeros se asocian a través del extremo C formando un hexámero NC1. Posteriormente, cuatro protómeros interactúan en el extremo N denominado 7S formando tetrámeros. La asociación de esta red bidimensional mediante interacciones laterales poco conocidas da lugar a la red de colágeno IV que se encuentra en las membranas basales. Adaptado de Kalluri, 2003.

### 3.2. Enfermedad de Goodpasture

La enfermedad de Goodpasture (GP) es un desorden autoinmune específicamente humano caracterizado por una glomerulonefritis rápidamente progresiva asociada frecuentemente a una hemorragia pulmonar (Hudson *et al.*, 2003).

La autoinmunidad se define como un fenómeno inmunitario frente a componentes propios (autoantígenos) y, por tanto, un fallo en la tolerancia inmunológica. En las enfermedades autoinmunes se establece una respuesta inmunitaria adaptativa específica contra antígenos propios del organismo (Shlomchik *et al.*, 1987). En la enfermedad de GP, el ataque inmunológico que tiene lugar se lleva a cabo mediante autoanticuerpos (anticuerpos GP) circulantes dirigidos contra el dominio  $\alpha 3\text{NC1}$  (Saus *et al.*, 1988) y, más recientemente, se ha descrito una variante contra el dominio  $\alpha 5\text{NC1}$  con las mismas manifestaciones clínicas (Pedchenko *et al.*, 2010). Estos autoanticuerpos circulantes se depositan de forma linear en la membrana basal glomerular (MBG) y en la membrana basal alveolar, causando los dos signos cardinales de esta enfermedad.

Los epítomos patogénicos que residen en el dominio NC1 de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno IV son críticos en la estructura cuaternaria (Hudson *et al.*, 2003). Por consiguiente se espera que en la patogénesis se produzca la exposición y activación del sistema inmunitario.

### 3.3. Antígeno Goodpasture

El dominio NC1 está altamente conservado entre cadenas y especies (Leinonen *et al.*, 1994). La inmunopatogenicidad del dominio

$\alpha$ 3NC1 humano fundamentaba estudios que identificaron una región divergente en el extremo N terminal exclusiva que conforma un sitio de fosforilación para cinasas de tipo A (Quinones *et al.*, 1992; Revert *et al.*, 1995) y un sitio de unión a integrinas (Quinones *et al.*, 1992; Borza *et al.*, 2008). Además, el gen humano pero no genes ortólogos genera múltiples transcritos por medio de un *splicing* alternativo (Bernal *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Penadés *et al.*, 1995) con extremos C terminal divergentes que regulan la fosforilación de la región N terminal divergente (Saus *et al.*, 2000).

### 3.4. GPBP

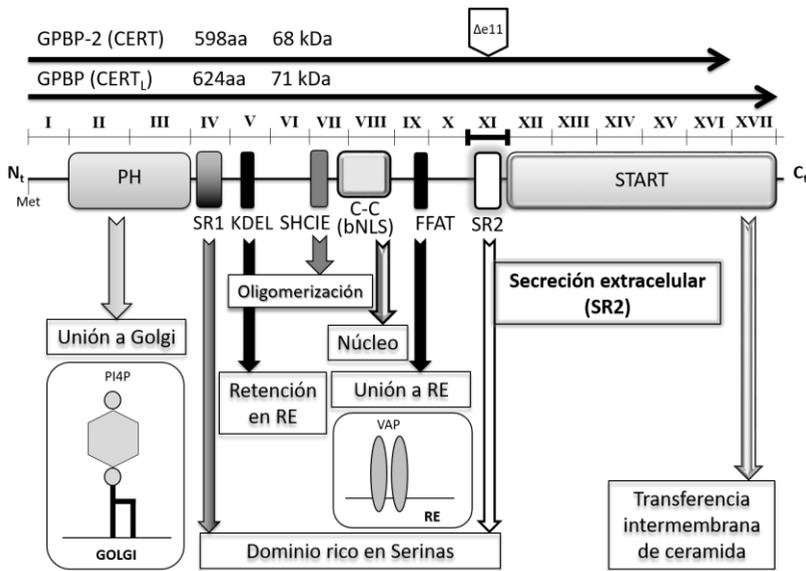
GPBP se descubrió buscando proteínas que se unían y fosforilaban la región N terminal divergente del dominio  $\alpha$ 3NC1 humano (Raya *et al.*, 1999). Posteriormente, nuestro laboratorio demostraba que la acumulación de GPBP en el compartimento extracelular inducía una disociación de los componentes epitelial [ $\alpha$ 3 $\alpha$ 4 $\alpha$ 5(IV)] y endotelial [ $\alpha$ 1 $\alpha$ 2(IV)] de la MBG y depósito de inmunocomplejos en el componente epitelial disociado (Revert *et al.*, 2007). Más recientemente, hemos observado que con la disociación de los dos componentes epitelial y endotelial también se produce una desorganización del colágeno IV epitelial con exposición del epítipo GP (resultados no publicados). De este modo, la acumulación extracelular de GPBP emerge como un evento patogénico central en la enfermedad de GP.

GPBP es una proteína que se expresa en todos los tejidos. El músculo estriado, tanto esquelético como de corazón, es el tejido con mayor expresión de GPBP, mientras que pulmón e hígado son los tejidos donde menor expresión se detecta.

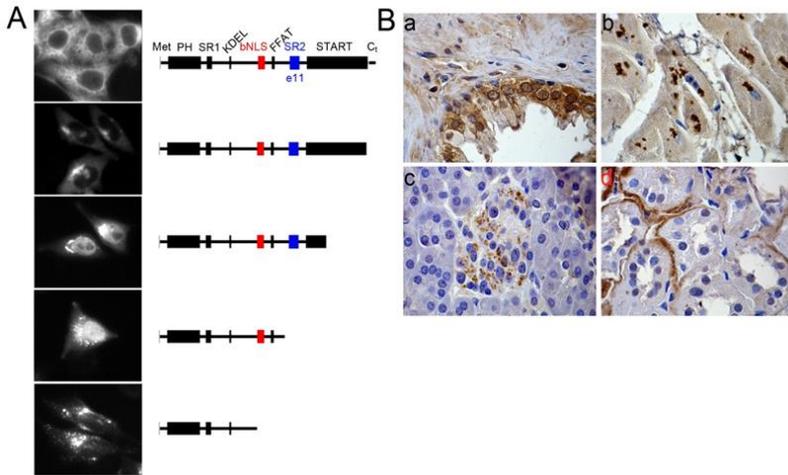
La proteína GPBP está compuesta por 624 aminoácidos y contiene diferentes elementos estructurales (**Fig. 5**), que permiten que GPBP acceda a múltiples compartimentos celulares además de ser exportable (**Fig. 6**). Posee un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) en su extremo N, que permite la unión de GPBP al aparato de Golgi a través de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P). Presenta una región de 19 aminoácidos rica en serinas (SR1), fosforilable y con una secuencia característica Ser-X-Y codificada en el exón IV (Raya et al, 1999; Kumagai *et al.*, 2007). En el centro de la estructura primaria posee una señal de localización nuclear bipartita insertada en un dominio *coiled-coil*, seguido de un motivo con dos fenilalaninas en un tracto ácido (FFAT) codificado en el exón IX, que interacciona con proteínas asociadas a vesículas (VAP) en el retículo endoplásmico (RE) (Wyles *et al.*, 2002; Loewen *et al.*, 2003; Kanekura *et al.*, 2006). En la mitad C terminal presenta una segunda región rica en serinas fosforilable de 26 aminoácidos (SR2), codificada en el exón XI, y junto con motivos para la autofosforilación (Raya *et al.*, 1999) seguido de un dominio START (*steroidogenic acute regulatory protein-related*). El dominio START permite la unión a lípidos, incluyendo ceramida, fosfolípidos y esteroides (Soccio y Breslow, 2003; Alpy y Tomasetto, 2005).

Además hemos identificado dos motivos interactivos adicionales. El primero comprende la secuencia <sup>260</sup>Ser-His-Cys-Ile-Glu<sup>264</sup> (SHCIE), ubicada en el exón VII que estabiliza la formación de grandes agregados de GPBP (Saus y Revert, 2004). El segundo es un motivo KDEL, ubicado en el exón V. Los motivos KDEL habitualmente se encuentran en los extremos C de proteínas que circulan entre el RE y el aparato de Golgi (p.ej. chaperonas). Las proteínas que lo portan pueden interactuar con

un receptor que se expone hacia el lumen (interior) de estos orgánulos (Raykhel *et al.*, 2007). El receptor está implicado en la exportación y en el “control de calidad” en el plegamiento de las proteínas en el RE. En un principio se consideraron motivos de “retención en el retículo”. Posteriormente se comprobó que influyen en la distribución de estas proteínas en los orgánulos y no tanto en la retención de las proteínas. En el caso de GPBP el motivo se sitúa en la parte central de la proteína, lo que no es convencional, y en el caso de GPBP-2 sí actúa como secuencia de retención en el RE, ya que la mutación del motivo permite su secreción (Ventura, 2014).



**Figura 5. Regiones funcionales de la proteína GPBP.** Se muestra una representación esquemática de la estructura de GPBP (CERT<sub>L</sub>) y GPBP-2 (CERT). Los exones se representan mediante número romanos y segmentos. GPBP se compone de diferentes dominios, cuya función se muestra de forma esquematizada. N<sub>t</sub>, extremo N terminal; Met, metionina de inicio; PH, dominio homólogo a pleckstrina; SR1, dominio rico en serinas 1; SHCIE, secuencia <sup>260</sup>Ser-His-Cys-Ile-Glu<sup>264</sup>; bNLS, secuencia de localización nuclear bipartita, situada en medio de una secuencia *coiled-coil* (C-C); FFAT, motivo FFAT; SR2, dominio rico en serinas del exón XI; START, dominio START; RE, retículo endoplasmático; Golgi, Aparato de Golgi; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato; C<sub>t</sub>, extremo C terminal.



**Figura 6. GPBP es una proteína con recursos estructurales para acceder virtualmente a todos los compartimientos de la célula.** En **A**, se observan las inmunofluorescencias teñidas con anticuerpos anti-GPBP de células HeLa transfectadas transitoriamente con plásmidos que expresan FLAG-GPBP-1 o los mutantes de deleción esquematizados a la derecha. En **B**, se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía convencional de cortes de tejidos teñidos con mAb N26: a, próstata; b, músculo estriado; c, páncreas; d, túbulos renales. Se observa tinción reticular intracelular, en núcleos, membrana plasmática y en tejido fibroso (a), en pigmentos lipofuscínicos (lisosomas asociados al envejecimiento, b), en vesículas de secreción (c) y en membranas basales (d). Nt, extremo N-terminal; Met, metionina de inicio; PH, dominio homólogo a pleckstrina; SR1, dominio rico en serinas 1; bNLS, secuencia de localización nuclear bipartita, situada en medio de una secuencia *coiled-coil* (C-C); FFAT, motivo FFAT; SR2, dominio rico en serinas del exón XI; START, dominio START; RE, retículo endoplasmático; Golgi, Aparato de Golgi; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato; Ct, extremo C-terminal.

### 3.5. Expresión de GPBP e isoformas

La proteína GPBP está codificada por el gen *COL4A3BP* que se encuentra en el cromosoma 5q13.3. Este gen está situado junto al gen *POLK*, el gen que codifica la ADN polimerasa kappa, en orientación cabeza con cabeza. Ambos genes comparten un promotor bidireccional de 140 pb que contiene un sitio Sp1, un elemento TATA y un sitio de unión para el factor NF- $\kappa$ B. De esta forma, está descrito que la citoquina

pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  es capaz de modular la transcripción en dirección del gen *COL4A3BP*, aumentando los niveles del ARNm a través del incremento en los niveles del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual sitúa a GPBP en la cascada de señalización de TNF- $\alpha$  (Granero *et al.*, 2005).

Las células expresan tres isoformas principales de GPBP, con diferentes características y distintas localizaciones estructurales. GPBP-1, conocida también como GPBP o CERT<sub>L</sub> (Raya *et al.*, 1999); GPBP-2, llamada también GPBP $\Delta$ 26 o CERT (Raya *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2003); y GPBP-3 (Revert *et al.*, 2008).

GPBP tiene un tamaño de 71 kDa y es la forma canónica. Interacciona con el colágeno IV y se secreta al compartimento extracelular como una proteína soluble (cGPBP<sup>1</sup>) gracias al motivo FFAT y a la región SR2 (Revert *et al.*, 2008). GPBP-2/CERT, tiene un tamaño de 68 kDa y procede de un procesamiento alternativo de exones; carece del fragmento de 26 residuos del exón XI (Raya *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2003). Al igual que GPBP, GPBP-2 se une al RE a través del motivo FFAT (Kawano *et al.*, 2006; Perry y Ridgway, 2006), sin embargo se encuentra localizada en el citosol, sugiriendo que la diferencia de localización es debida al exón XI (Revert *et al.*, 2008). GPBP-3 es una variante de 707 aminoácidos que resulta de un inicio alternativo de traducción del ARNm. La secuencia adicional en el extremo N (83-residuos) ancla la proteína a las membranas de la vía secretora incluyendo la membrana plasmática y promueve la secreción de GPBP. Se trata de un polipéptido

---

<sup>1</sup> cGPBP es la abreviatura de GPBP (o GPBP-1) circulante en plasma. En esta tesis cGPBP hace referencia a la forma exportable de GPBP, incluyendo aquella que se encuentra fuera de la células o en la vía secretora y aún es intracelular.

de 91 kDa que que entra en la ruta secretora y sufre modificaciones covalentes que dan lugar a una isoforma de 120 kDa (Revert *et al.*, 2008).

### **3.6. Funciones biológicas y patologías asociadas a GPBP**

Como ya se ha comentado anteriormente, la proteína GPBP fue descubierta en 1999 durante la búsqueda de proteínas que interaccionasen con la región divergente fosforilable del dominio  $\alpha$ 3NC1. Desde entonces a GPBP y a sus isoformas se les han atribuido otras funciones biológicas muy diferentes (**Tabla 1**).

#### **3.6.1. Colágeno IV y autoinmunidad**

Se ha demostrado que ratones *New Zealand White* (NZW) de avanzada edad, una cepa propensa a padecer glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos (Theofilopoulos y Dixon, 1985), se caracterizan por una elevada expresión glomerular de GPBP (Revert *et al.*, 2007) y un aumento de los niveles plasmáticos de cGPBP (Macías, 2014). En estos animales, los niveles elevados de cGPBP cursan junto con una disociación de los componentes endotelial y epitelial de la MBG, depósitos de inmunocomplejos tipo IgA sobre el componente epitelial disociado y una expansión del colágeno IV (glomeruloesclerosis) que colapsaba las estructuras glomerulares (Revert *et al.*, 2007). El tratamiento de estos ratones con anticuerpos monoclonales anti-GPBP hacía retroceder estas alteraciones revelando el papel central de cGPBP en la patogénesis de esta glomerulonefritis de base autoinmune (nefropatía IgA) que cursaba con una profunda alteración en la organización del colágeno IV glomerular (Macías, 2014). De acuerdo con esta propuesta, la expresión forzada de GPBP humana mediante transgénesis en ratones C57BL/6 (Tg-hGPBP), sin predisposición a

padecer glomerulonefritis por inmunocomplejos, tuvo consecuencias estructurales y patológicas similares (Revert *et al.*, 2007).

En conjunto, estos resultados ponían de manifiesto que la sobreexpresión de GPBP, incluyendo cGPBP, altera la organización del colágeno IV glomerular independientemente del genotipo de los animales con exposición o formación de sitios para el depósito de inmunocomplejos o autoanticuerpos en la barrera de filtración glomerular (Revert *et al.*, 2007).

En contraste, la ablación selectiva mediante procedimientos genéticos de GPBP resultaba en ratones GPBP<sup>-/-</sup> que no mostraban un fenotipo defectuoso en la organización del colágeno IV glomerular ni de ninguna otra índole (Revert-Ros *et al.*, 2011; Macías, 2014), revelando que la deficiencia en GPBP puede ser compensada por GPBP-2/CERT dentro de la célula pero también que GPBP-2/CERT no puede sustituir a cGPBP en la patogénesis glomerular.

Todo ello apunta a cGPBP como la isoforma de GPBP con relevancia en la patogénesis mediada por una alteración en la organización del colágeno IV.

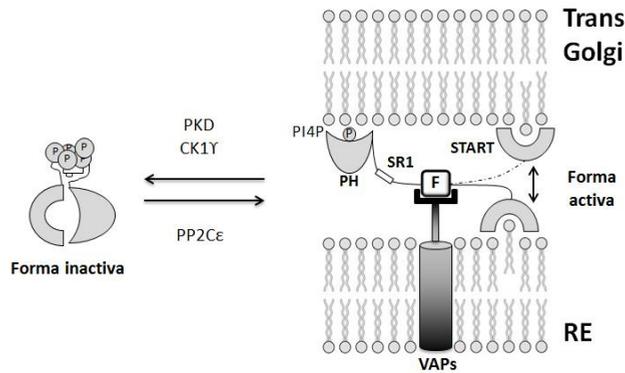
El mecanismo por el cual un aumento de la expresión de cGPBP causa una disrupción en la MBG es desconocido. Las estructuras terciarias y cuaternarias del dominio  $\alpha$ 3NC1 se estabilizan, al menos en parte, por enlaces covalentes intra- e intermoleculares, respectivamente. El dominio NC1 sufre diversificación estructural y se ensambla en múltiples isoformas conformacionales (confórmeros) que divergen según el estado redox de residuos de cisteína específicos.

Ensayos recientes sugieren que GPBP regularía la estructura terciaria del dominio  $\alpha$ 3NC1 y que la co-expresión de GPBP y  $\alpha$ 3NC1 condiciona la conformación que finalmente adopta  $\alpha$ 3NC1, modificando tanto su reactividad inmunológica frente a autoanticuerpos como su estructura terciaria (Gozalbo, 2014). La capacidad de GPBP de fosforilar selectivamente  $\alpha$ 3NC1 humano (Raya *et al.*, 1999) y de regular la síntesis de confórmers de este dominio (Gozalbo, 2014), sugiere que cGPBP fosforila  $\alpha$ 3NC1 como parte de un proceso catalítico que induce cambios conformacionales en este dominio y resulta en el ensamblaje supramolecular de múltiples confórmers en la estructura cuaternaria de la red de colágeno.

Finalmente, el ensamblaje de confórmers aberrantes como consecuencia de una expresión aumentada de cGPBP causaría disrupción de la MBG y exposición de epítomos inmunopatogénicos.

### **3.6.2. Transporte de ceramida**

En 2003, Hanada y colaboradores describieron una función de la proteína GPBP distinta y no relacionada con la organización del colágeno. Estos autores establecen que GPBP-2 es una proteína clave en el transporte no vesicular de ceramida entre el retículo endoplasmático (RE) y el trans-Golgi, el último compartimento del aparato de Golgi que alcanzan las proteínas que se exportan. De ahí que en algunas publicaciones GPBP-2 sea referido como CERT (*ceramide transfer protein*). La ceramida del RE es transportada por GPBP-2 al trans-Golgi, donde se utiliza para la síntesis de esfingomielina (Hanada *et al.*, 2003) y ceramida-1-fosfato (Lamour *et al.*, 2007).



**Figura 7. Transporte de ceramida no vesicular mediado por GPBP-2.** La fosforilación del motivo SR1 por la proteína cinasa D (PKD) o la caseína cinasa I $\gamma$ 2 (CKI $\gamma$ 2), inactiva GPBP-2 para el transporte de ceramida, mientras que la proteína fosfatasa 2C $\epsilon$  (PP2C $\epsilon$ ) que se asocia a VAP en el RE, desfosforila el motivo SR1 y activa el transporte de ceramida entre el RE y el trans-Golgi a través del dominio PH y el motivo FFAT respectivamente. El dominio START actúa como un brazo articulado que extrae ceramida del RE y la deposita en el trans-Golgi. PH, dominio homólogo a pleckstrina; SR1, dominio rico en serinas 1; F, motivo FFAT; START, dominio START; RE, retículo endoplasmático; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato.

GPBP-2 interacciona con VAP en la membrana del RE a través del motivo FFAT y esta unión favorece la desfosforilación de la región SR1. Esta desfosforilación la lleva a cabo la proteína 2C $\epsilon$  (Saito *et al.*, 2008), un polipéptido transmembrana que se asocia a VAP en el RE. La consecuencia de la desfosforilación de GPBP-2 es un aumento de afinidad por VAP, pero también por PI4P. Por tanto, GPBP-2 desfosforilado en la región SR1 tiene mayor afinidad por VAP (RE) y por el PI4P (trans-Golgi) al mismo tiempo, por lo que la proteína se une a ambos orgánulos a la vez. El dominio START quedaría como un brazo móvil que extraería ceramida del RE y la depositaría en el trans-Golgi. GPBP-2 desfosforilado se localizaría en los sitios de contacto RE-Golgi, que son sitios donde las membranas de ambos orgánulos se sitúan a una distancia mínima, permitiendo que una molécula se una a ambos

compartimentos a la vez y se lleve a cabo el transporte de ceramida (**Fig. 7**) (Hanada *et al.*, 2009).

### **3.6.3. Organización de miofibrillas musculares**

GPBP es esencial en la diferenciación de los mioblastos porque regula la organización de la miosina en las miofibrillas del músculo estriado a través de una proteína efectora, GIP130 (*GPBP-interacting protein of 130 kDa*) (Revert-Ros *et al.* 2011). De especial relevancia fue la observación que, *in vivo* y en ratones GPBP<sup>-/-</sup>, GPBP-2 suplía esa deficiencia, de nuevo poniendo en evidencia que dentro de la célula GPBP y GPBP-2/CERT son intercambiables.

### **3.6.4. Secreción de proteínas**

Se ha relacionado a GPBP con la exportación de proteínas desde el trans-Golgi (Fugmann *et al.*, 2007; Florin *et al.*, 2009). La fosforilación del motivo SR1 por la PKD (proteína cinasa D) regula negativamente la secreción de proteínas. La serina 132 (Ser132) condiciona la fosforilación del resto de serinas de SR1 y cuando se introduce una mutación que cambia la Ser132 por una alanina, la proteína no es fosforilable en el motivo SR1 y se promueve la exportación de proteínas al medio extracelular (Fugmann *et al.*, 2007). Otro trabajo relacionado, mostró que la expresión de GPBP-2 recombinante en células aumentaba significativamente la exportación de proteínas al medio extracelular, lo que situó a GPBP-2 como una diana potencial en la mejora de producción de proteínas terapéuticas en cultivos de células de mamífero (Florin *et al.*, 2009).

### **3.6.5. Estrés oxidativo**

Rao y colaboradores realizaron un estudio en *Drosophila* donde se muestra que la pérdida de función de GPBP produce daño oxidativo y reduce la esperanza de vida de la mosca. Cabe destacar que en el género *Drosophila* únicamente está presente una forma proteica de GPBP, ya que el *splicing* alternativo aparece, filogenéticamente, en los vertebrados (Mencarelli *et al.*, 2010; Hanada, 2014). La pérdida de función de la proteína en el organismo completo dio como resultado un incremento en la fluidez de la membrana plasmática, lo cual se traducía en la susceptibilidad a especies reactivas de oxígeno y, por tanto, un incremento de estrés oxidativo en proteínas celulares. En consecuencia, las moscas mostraron una menor tolerancia térmica que empeoró con la edad, así como la disminución de los niveles de ATP y glucosa, indicativo de un envejecimiento prematuro (Rao *et al.*, 2007).

### **3.6.6. Desarrollo embrionario**

En otro estudio diferente se observó que GPBP, y no GPBP-2, posee actividad anti-apoptótica durante la embriogénesis temprana y que, además, se trata de un factor clave en el correcto desarrollo de tejidos como el músculo esquelético y cerebro. Se demostró que GPBP y GPBP-2 poseen diferente función en el desarrollo embrionario del pez cebra. Ambas isoformas se expresan dinámicamente durante el desarrollo embrionario, pero únicamente la eliminación de GPBP tuvo efectos deletéreos apoptóticos en diversos tejidos, resaltando la importancia en el desarrollo del cerebro y el músculo esquelético (Granero-Moltó *et al.*, 2008).

### **3.6.7. Decidualización**

La proteína GPBP se regula dinámicamente durante la decidualización, describiendo cambios en sus niveles de expresión y de localización espacio-temporal (Jones-Paris *et al.*, 2016). Interesantemente, durante la implantación del embrión se produce una expansión del colágeno IV que va precedida de un aumento en la expresión de GPBP alrededor de las células epitelioides de la decidua, sugiriendo que también cGPBP participaría en una expansión del colágeno IV que protege al embrión durante su desarrollo.

### **3.6.8. Estrés de retículo**

La degeneración mitocondrial es la principal causa de la letalidad de los embriones de ratón *knockout* para *Col4a3bp* (Wang *et al.*, 2009). Además, aunque se consigue el aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en GPBP, estos son células que sufren un proceso de senescencia prematura y pérdida de viabilidad celular. Estas células sufren estrés de retículo y las funciones mitocondriales están afectadas (producen menor cantidad de ATP, poseen una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno y muestran un incremento de la actividad de la glutatión reductasa).

### **3.6.9. Inflamación**

Además de estos trabajos que relacionan a cGPBP con diversos procesos asociados a autoanticuerpos y patologías autoinmunes, también existen estudios que relacionan a GPBP con la respuesta inmune innata y el proceso de inflamación. En este sentido, se ha descrito que GPBP y la proteína amiloide del suero (SAP) forman

complejos estables en el compartimento extracelular a través del dominio START (Mencarelli *et al.*, 2012). SAP es una proteína de fase aguda, estructuralmente relacionada con la proteína C-reactiva (CRP), la cual se sintetiza en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias en la fase temprana de la respuesta inmune innata (Bottazzi *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha descrito que GPBP puede unirse a la proteína del complemento C1q y, por tanto, formar parte de la respuesta inmune innata. La proteína C1q es el iniciador de la vía clásica de activación del complemento. La unión de GPBP a C1q permite la activación de la vía clásica del complemento y SAP regula negativamente esa interacción (Bode *et al.*, 2014). Relacionado también con el proceso de inflamación, otro trabajo muestra que la ceramida transportada por GPBP-2 se fosforila y promueve la síntesis de ácido araquidónico y prostaglandina E2 (PGE2), moléculas de un marcado carácter pro-inflamatorio. También se muestra que niveles bajos de GPBP-2 dificultan la activación de la ruta inflamatoria en respuesta a IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que GPBP-2 es una nueva diana en tratamientos anti-inflamatorios (Lamour *et al.*, 2007). Además, *COL4A3BP* se activa por TNF- $\alpha$  mediante NF- $\kappa$ B (Granero *et al.*, 2005; Miralem *et al.*, 2010).

Colectivamente todos los resultados sugieren que GPBP es un efector en la respuesta inflamatoria.

### **3.6.10. Cáncer y quimiorresistencia**

Otras investigaciones han relacionado GPBP con la quimiorresistencia que las células del cáncer adquieren frente a los fármacos anti-neoplásicos. Específicamente, la activación de *COL4A3BP* induce resistencia a múltiples fármacos (Swanton *et al.*, 2007; Lee *et al.*,

2012) y más recientemente, esta multirresistencia ha sido asociada a EMT (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). Todo ello señala a la proteína GPBP como una diana terapéutica potencial para tratar quimiorresistencia.

**Tabla 1. Funciones biológicas de GPBP.** Se representa un esquema de todos los estudios que relacionan a GPBP con diversas funciones biológicas.

<b>Organización del colágeno</b>	GPBP fosforila $\alpha 3\text{NC1}$	Raya <i>et al.</i> , 1999
	GPBP cataliza la síntesis de confórmers de $\alpha 3\text{NC1}$	Gozalbo, 2014
	Ratones Tg-hGPBP presentan alteraciones en el colágeno IV glomerular	Revert <i>et al.</i> , 2007
	Ratones NZW expresan niveles elevados de GPBP y alteraciones en el colágeno IV glomerular	Revert <i>et al.</i> , 2007
<b>Transporte no vesicular de ceramida</b>	GPBP-2 transporta ceramida entre el RE y el aparato de Golgi	Hanada <i>et al.</i> , 2003
<b>Organización de miofibrillas musculares</b>	GPBP regula la miofibrillogénesis	Revert-Ros <i>et al.</i> , 2011
<b>Secreción de proteínas</b>	La fosforilación del motivo SR1 (Ser132) disminuye la secreción de proteínas	Fugmann <i>et al.</i> , 2007
	La sobreexpresión de GPBP-2 aumenta la secreción de proteínas	Florin <i>et al.</i> , 2009
<b>Estrés oxidativo</b>	La pérdida de función de GPBP produce daño oxidativo	Rao <i>et al.</i> , 2007
<b>Desarrollo embrionario e implantación del embrión</b>	La eliminación de GPBP da lugar a apoptosis durante la embriogénesis del pez cebra	Granero <i>et al.</i> , 2008
	Cambios en los niveles de expresión génica y en la localización espacio-temporal durante la implantación del embrión.	Jones-Paris <i>et al.</i> , 2016
<b>Estrés de retículo</b>	Fibroblastos embrionarios murinos <i>knockout</i> para <i>Col4a3bp</i> muestran estrés de retículo y degeneración mitocondrial	Wang <i>et al.</i> , 2009
<b>Inmunidad innata</b>	Unión extracelular cGPBP-SAP	Mencarelli <i>et al.</i> , 2012
	Unión extracelular cGPBP-C1q	Bode <i>et al.</i> , 2014
	GPBP-2 participa en la producción de PGE2	Lamour <i>et al.</i> , 2007
	<i>COL4A3BP</i> está regulado por TNF- $\alpha$ y NF- $\kappa$ B	Granero <i>et al.</i> , 2005
<b>Cáncer</b>	<i>COL4A3BP</i> está implicado en quimiorresistencia	Swanton <i>et al.</i> , 2007
	La activación de <i>COL4A3BP</i> se asocia a mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama	Lee <i>et al.</i> , 2012

#### 4. DISEÑO Y DESARROLLO DE COMPUESTOS TERFENÍLICOS INHIBIDORES DE GPBP

El principal objetivo de Fibrostatin S.L. es el desarrollo clínico de inhibidores de GPBP. Estos compuestos son además una herramienta insustituible para estudiar la actividad *ex vivo*<sup>2</sup> e *in vivo* de GPBP.

GPBP presenta dos niveles principales de oligomerización: trímeros y multímeros. La forma más activa de GPBP es multimérica (Raya *et al.*, 2000). Utilizando la técnica de doble híbrido en levadura se identificó que la secuencia <sup>260</sup>Ser-His-Cys-Ile-Glu<sup>264</sup> (SHCIE) y el Glu<sup>264</sup> eran esenciales para el reconocimiento proteína-proteína que interviene en la formación de multímeros de GPBP. Interesantemente, un péptido sintético denominado Q2 que contenía esa secuencia (Ac-<sup>256</sup>LATLSHCIELMVKR<sup>269</sup>-NH<sub>2</sub>) inhibía la actividad cinasa de GPBP *in vitro* (Saus y Revert, 2004; Saus *et al.*, 2011). Los péptidos tienen propiedades farmacocinéticas limitadas y un alto coste de producción, lo que limita los ensayos *in vivo*. Se decidió buscar alternativas farmacológicas basadas en la peptidomimesis mediante compuestos orgánicos más baratos y fáciles de producir.

Q2 tiene una estructura secundaria en hélice  $\alpha$ , que es mimetizable con compuestos de estructura terfenílica. En este tipo de compuestos, se pueden simular las cadenas laterales de los aminoácidos mediante sustituyentes equivalentes en ciertas posiciones de los anillos aromáticos (Orner *et al.*, 2001). La estructura terfenílica permite que las

---

<sup>2</sup>Aunque este término se acuñó para hablar de tratamientos de células extracorpóreas para luego reintroducirlas en animales de experimentación o en pacientes, en esta tesis el término *ex vivo* hace referencia a los ensayos con cultivos de células, para distinguirlos del ensayo *in vitro* que sería sin elementos vivos.

cadenas laterales se dispongan en el espacio con distancias y relaciones angulares muy semejantes a las encontradas en la hélice  $\alpha$ .

Se sintetizaron compuestos terfenílicos que contenían la cadena lateral del glutámico que es el residuo crítico para mantener la estructura multimérica de GPBP (Saus *et al.*, 2011). A partir del compuesto canónico (T14) que mimetizaba la secuencia en Q2 (**Fig. 8 A**), se elaboró una librería de peptidomiméticos relacionados, con el objetivo de seleccionar el que mostrara mejores propiedades farmacológicas. La selección del compuesto se realizó mediante ensayos de inhibición de la actividad cinasa de GPBP *in vitro* y de la quimiorresistencia en ensayos *ex vivo* con células de adenocarcinoma de pulmón humano A549. La silenciación de GPBP potencia el efecto de los quimioterápicos como la doxorubicina en células A549 cultivadas (Swanton *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). Utilizamos esta propiedad para analizar la capacidad de los peptidomiméticos de Q2 para sinergizar con la doxorubicina comprometiendo la viabilidad de estas células. Este modelo celular permitía realizar un cribado de los compuestos de forma sencilla. Mediante el análisis de curvas dosis-respuesta, se calculó la IC50 (concentración inhibitoria 50) de la doxorubicina sobre células A549 en presencia de los peptidomiméticos a diferentes concentraciones. El terfenilo T12 reunía buenas propiedades como inhibidor *in vitro* y *ex vivo* (**Fig. 8 A**), y fue seleccionado para futuros ensayos en modelos animales.

La expresión recombinante de GPBP en células de insecto revelaba que la forma multimérica de GPBP era eminentemente extracelular y la trimérica intracelular (**Fig. 8 B**). En la línea de estos resultados, T12 inhibía específicamente GPBP multimérico y no inhibía la actividad cinasa de la forma trimérica de GPBP (**Fig. 8 B**). En

consecuencia, T12 emergía como un inhibidor específico de cGPBP, la isoforma de GPBP extracelular implicada en patogénesis.

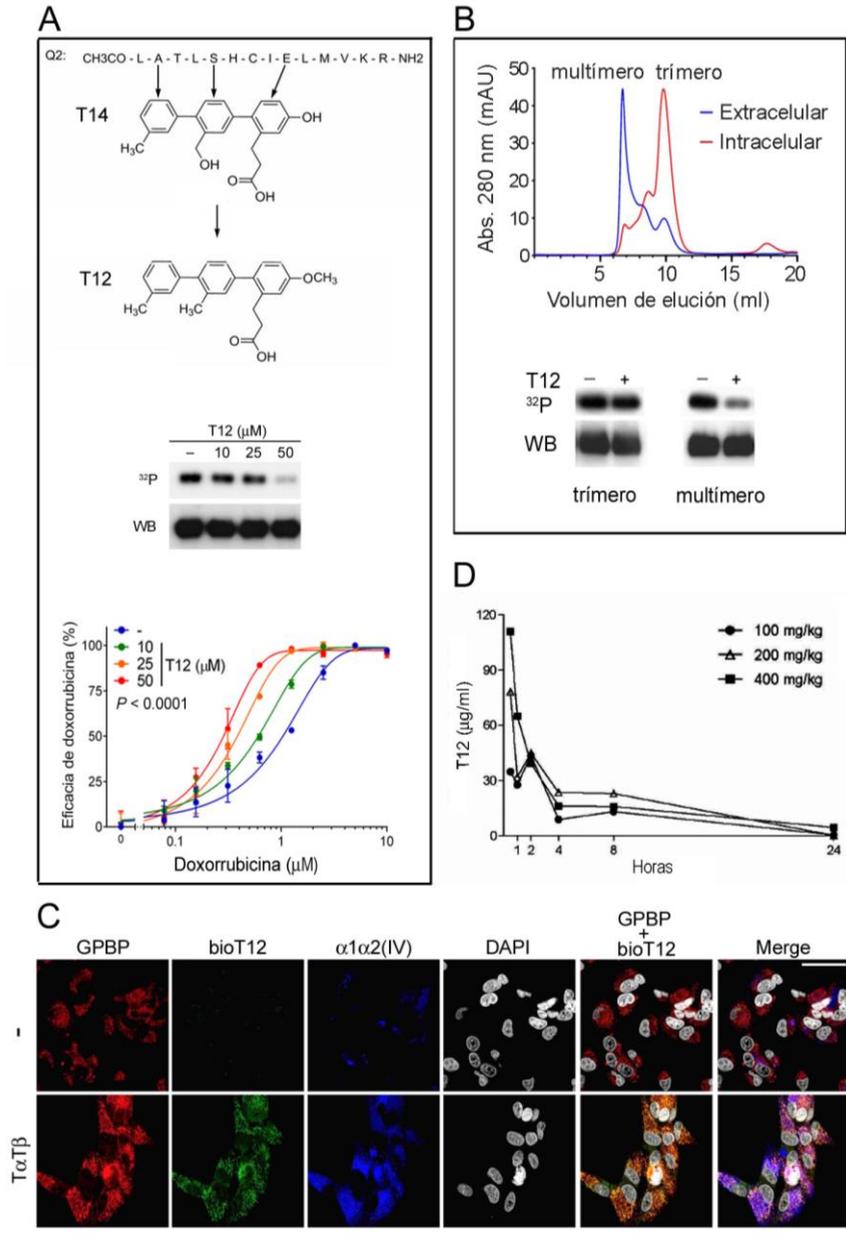
Se utilizó esta propiedad para identificar células o tejidos diana de T12. Se obtuvo un derivado conjugado con biotina (bioT12) que era activo *in vitro* y *ex vivo* (no se muestra).

bioT12 se puede marcar con estreptavidina-AF488 y forma complejos estables con cGPBP de células A549 estimuladas con TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (**Fig. 8 C**). Estos resultados indicaban que T12 era específico de cGPBP producido por las células de cáncer con fenotipo mesenquimal (después de EMT).

Los bajos niveles de cGPBP mesenquimal en individuos sanos (no se muestra) y la especificidad de T12 por esta isoforma anticipaba una baja toxicidad del compuesto. Su baja toxicidad se confirmó en ensayos de toxicocinética de 8 días con dosis diarias de entre 100 y 800 mg/kg-día, en los que se determinó una máxima dosis tolerada (MDT) de 400 mg/kg-día siguiendo esta pauta (no se muestran).

T12 tiene una farmacocinética bicompartimental, se distribuye a tejidos periféricos y en 24 horas se ha eliminado casi en su totalidad (**Fig. 8 D**).

T12 es una herramienta muy útil para estudiar las características biológicas y bioquímicas de cGPBP producido por células tumorales que han sufrido una EMT (cGPBP mesenquimal). T12 tiene buenas propiedades farmacológicas y una baja toxicidad que lo hace un buen candidato a fármaco.



**Figura 8. T12, un inhibidor de GPBP, es un candidato a fármaco. (A) T12, inhibe GPBP *in vitro* y *ex vivo*.** Arriba, se representa la secuencia Q2 y sus peptidomiméticos con estructura terfenólica T14 y T12. De una librería de 23 compuestos derivados de T14 se seleccionó T12. *En medio*, se muestra la inhibición de la actividad cinasa de GPBP *in vitro*. Se ensayaron cantidades equivalentes de FLAG-GPBP producido en levadura, en reacciones de fosforilación con  $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ ]-ATP en presencia de las concentraciones indicadas de T12 y se analizaron mediante SDS-PAGE, autorradiografía ( $^{32}\text{P}$ ) y *western blot*, revelado con anticuerpos anti-FLAG. Abajo, se muestran curvas dosis-respuesta de células A549 tratadas con doxorrubicina y T12. Las curvas se elaboran analizando la viabilidad de las células A549 cultivadas en placas de 96 pocillos, en presencia de la combinación de tratamientos indicados. La viabilidad se determina con el reactivo fluorescente alamarBlue®, que mide actividad mitocondrial. Para representar la eficacia de la doxorrubicina como un porcentaje, se da un valor de 100 al efecto máximo de la doxorrubicina en el ensayo (menor fluorescencia/actividad mitocondrial) y de 0 a la actividad de partida (células sin tratar), y se calculan el resto de valores y se representan las curvas que mejor ajustan. En este caso se observa la sinergia de T12 con doxorrubicina como un desplazamiento de la curva hacia la izquierda a medida que aumentamos la concentración de T12 en el ensayo, lo que indica que la IC<sub>50</sub> de la doxorrubicina se reduce, mientras que el efecto máximo no cambia. **(B) T12 es un inhibidor específico de cGPBP.** Arriba, se muestra el perfil de elución de GPBP recombinante producido en células de insecto Sf9 y purificado a partir del medio de cultivo (extracelular) o a partir de lisados de células (intracelular). Abajo, se muestra una autorradiografía y el *western blot* correspondiente de fosforilaciones hechas como en A, con el material procedente de los picos de elución mostrados arriba, en presencia de T12. **(C) bioT12 se une a cGPBP.** Un derivado de T12 conjugado con biotina (bioT12) se utiliza para teñir células A549 estimuladas con TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  para inducir EMT y se comparan con las originales sin estimular. Se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de una inmunofluorescencia teñida con los anticuerpos indicados y bioT12 conjugado con estreptavidina-AF488. Las células A549 estimuladas expresan cGPBP que se secreta (no se muestra). bioT12 reconoce las formas agregadas de cGPBP que siguen la ruta secretora, y muestra una buena colocalización con mAb N27 (anti-GPBP). **(D) Farmacocinética de T12.** Se muestran los niveles plasmáticos de T12 de ratones a los que se les ha administrado las dosis indicadas, en una única toma por vía oral con una sonda intragástrica. Mediante HPLC-masas se analizaron muestras de plasma en los tiempos indicados. T12 presenta tres fases bien diferenciadas: 1) 0 - 4h: a la media hora (primera toma de muestra) se alcanzan los niveles plasmáticos más altos, lo que sugiere que T12 se absorbe en el estómago. Los niveles caen rápidamente; 2) 4 - 8 h: la concentración de T12 se estabiliza, lo que demuestra que en la primera fase los niveles de T12 caen porque se está distribuyendo por los tejidos. En esta segunda fase T12 retorna al plasma y compensa el que se pierde por eliminación, lo que permite que los niveles sean constantes; y 3) 8 - 24 h: los niveles plasmáticos disminuyen lentamente hasta su completa eliminación. En esta fase predomina la eliminación y el retorno de T12 al plasma no compensa la pérdida y los niveles van disminuyendo más lentamente que en la primera fase.

## 5. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER METASTÁSICO

Uno de los mayores impedimentos en la investigación contra el cáncer y el proceso de metástasis es la baja disponibilidad de modelos adecuados que realmente representen todos los procesos biológicos implicados en la enfermedad *in vivo* (Tao *et al.*, 2008). Existen diversos modelos de xenoinjerto donde células tumorales humanas son inyectadas en ratones inmunocomprometidos. Estos modelos han sido ampliamente utilizados en el estudio del crecimiento tumoral y la validación de posibles fármacos antitumorales. Mientras algunos de estos modelos animales pueden ser útiles para el estudio del crecimiento del tumor primario no lo son para el estudio de la fase de metástasis (Bibby, 2004; Eccles *et al.*, 1994; Hoffman, 1999). Las líneas celulares humanas no son capaces de metastatizar en estos modelos animales y cuando lo hacen, se suelen observar características atípicas que no se observan en la enfermedad humana. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta la importancia del microambiente tumoral y las interacciones entre el tumor y el hospedador.

Sin embargo, sí que existen modelos murinos de cáncer que son capaces de desarrollar metástasis de forma eficaz y con características mucho más similares a las encontradas en pacientes (Vernon *et al.*, 2007). Los modelos murinos singénicos permiten la utilización de animales inmunocompetentes, por lo que también es posible llevar a cabo el estudio del sistema inmune en la enfermedad del cáncer. Debido a la importancia del sistema inmune en esta enfermedad, este tipo de modelos son esenciales en el análisis de la progresión neoplásica y la evaluación de posibles agentes antitumorales (Tao *et al.*, 2008).

### 5.1. Modelo BALB/c-4T1

El modelo murino BALB/c-4T1 constituye uno de los pocos modelos de cáncer que posee la capacidad de metastatizar de forma espontánea a órganos que también se ven afectados en la enfermedad de cáncer de mama humano (Tao *et al.*, 2008). Se trata de un carcinoma mamario triple negativo y constituye un modelo singénico y ortotópico.

La línea celular de carcinoma mamario 4T1 fue originariamente aislada por Fred Miller en el Instituto de Cáncer de Karmanos (Miller, 1983; Miller *et al.*, 1983). Esta línea celular fue aislada inicialmente como una subpoblación denominada 410.4 a partir de un tumor mamario originado de forma espontánea en una ratona BALB/c. Su utilización ha crecido en los últimos años debido a su gran capacidad para metastatizar. La línea celular 4T1 se caracteriza por ser resistente al agente antineoplásico 6-tioguanina (Yamashina y Heppner, 1985) y por responder muy poco a tratamientos *in vivo* con doxorubicina (Gao *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

La inyección de células 4T1 en el panículo adiposo mamario de ratonas BALB/c, de forma ortotópica, induce la formación de un tumor primario en la glándula mamaria y un posterior proceso de metástasis; por lo que se desarrolla una enfermedad letal incluso después de la resección tumoral (Lelekakis *et al.*, 1999; Pulaski *et al.*, 2000). Las células 4T1 metastatizan a través de la ruta hematógona y linfática a hígado, pulmón, hueso y cerebro, haciendo de este modelo animal un excelente modelo de cáncer de mama metastático (Heppner *et al.*, 2000).

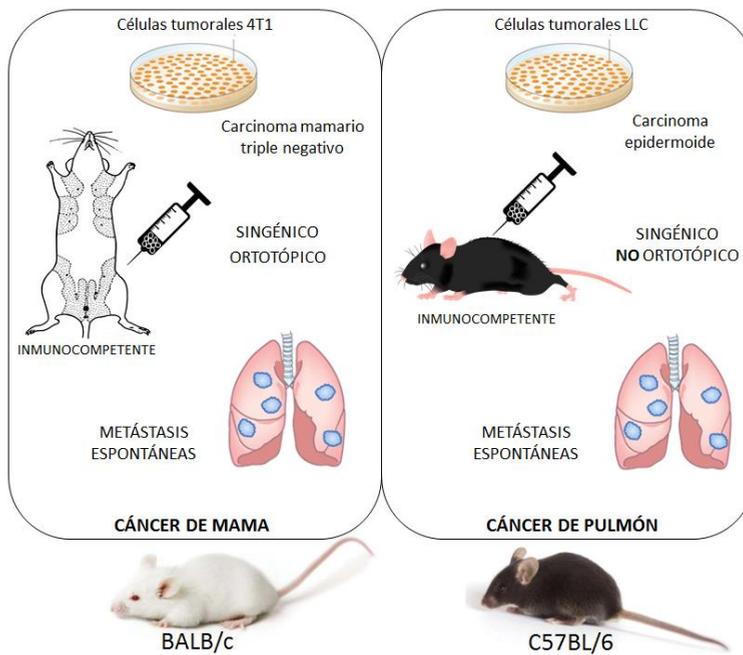
## 5.2. Modelo C57BL/6-LLC

Las células LLC (*Lewis Lung Carcinoma*), también denominadas 3LL, originalmente provienen de un tumor descrito en 1951 por Margaret R. Lewis en el Instituto Wistar. Se trata de un carcinoma epidermoide que se originó espontáneamente en los pulmones de un ratón C57BL/6 (Sugiura y Stock, 1955). Este modelo animal fue un modelo animal muy importante en el estudio del proceso de metástasis, angiogénesis y quimioterapia neoadyuvante (Gorelik *et al.*, 1980; Himmele *et al.*, 1986; Fichtner y Tanneberger, 1987; O'Reilly *et al.*, 1994; Maniwa *et al.*, 1998; Savai *et al.*, 2005; Chen, 2000).

Las células LLC han probado a inocularse en diversos sitios en ratones C57BL/6, incluyendo la vena de la cola (Maniwa *et al.*, 1998), músculo (Argilés *et al.*, 2008), tejido subcutáneo (Lippman *et al.*, 1975; Liu *et al.*, 2010) o pulmones (Li *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2010). El modelo B6-LLC ha sido utilizado en modelos experimentales de cáncer de pulmón (Savai *et al.*, 2009), metástasis de cerebro (Zhang *et al.*, 2008) y caquexia (Argilés *et al.*, 2008). En el estudio realizado por Liu y colaboradores compararon la inoculación subcutánea con la implantación intrapulmonar y llegaron a la conclusión de que la ausencia de metástasis distantes en el modelo intrapulmonar descartaba este modelo para su uso en estudios de metástasis. Además, en el modelo ortotópico no se puede evaluar de forma sencilla la evolución del volumen tumoral con el paso del tiempo.

Las células LLC, así como las células 4T1, son células tumorales muy utilizadas en modelos singénicos de metástasis espontáneas en animales inmunocompetentes (**Fig. 9**). Estas células también se

caracterizan por responder poco a tratamientos *in vivo* con doxorubicina, a pesar de demostrar sensibilidad en ensayos en cultivos (Yoshimoto *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2012). Sin embargo, las células LLC poseen una invasividad más local en comparación con las células 4T1, ya que la recidiva del tumor primario es más común en estas últimas (Mastria *et al.*, 2015).



**Figura 9. Modelos de cáncer metastásico.** La utilización de modelos de cáncer en ratones inmunocompetentes permite el estudio de la interacción estroma-célula tumoral y el análisis de los eventos del proceso metastásico. En el modelo de cáncer de mama BALB/c-4T1, las células tumorales 4T1 se inyectan en el panículo adiposo mamario, tejido en que se desarrollaron originalmente en una ratona del mismo fondo genético (modelo ortotópico). En el modelo de cáncer de pulmón C57BL/6-LLC, las células tumorales LLC se inyectan subcutáneamente en el dorso del animal. Las células LLC proceden de un tumor que se desarrolló espontáneamente en un ratón del mismo fondo genético, pero las células no se inyectan ortotópicamente (modelo heterotópico).







## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La glomerulonefritis de los ratones NZW se caracteriza por una desorganización del colágeno IV de la MBG, depósitos de inmunocomplejos e infiltrados inflamatorios, que se acompañan y dependen de niveles elevados de cGPBP en plasma (Revert *et al.*, 2007; Macías, 2014). cGPBP induce la expansión del colágeno IV que causa glomerulonefritis de base autoinmune, inflamación tubulointersticial y fracaso renal.

Por otro lado, un aumento de expresión de GPBP se asocia a otros desórdenes entre los que destaca el cáncer, donde GPBP induce quimiorresistencia y se asocia a un mal pronóstico (Swanton *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012).

En los tumores, el sistema inmune forma parte activa en su evolución hacia su diseminación metastásica. Los macrófagos, las células centrales que regulan la respuesta inflamatoria tienen una elevada expresión de GPBP (p.ej. consultar *arrays* de expresión en [www.nextbio.com](http://www.nextbio.com)).

En este trabajo queremos investigar la siguiente hipótesis: **cGPBP regula la respuesta inflamatoria tumoral que media en la diseminación metastásica y los inhibidores de cGPBP son candidatos farmacológicos para su tratamiento.**

Para comprobar esta hipótesis, se fijaron los siguientes objetivos:

- 1- Caracterizar la polarización de macrófagos en respuesta a cGPBP.
- 2- Analizar la respuesta inflamatoria y caracterizar cGPBP en modelos murinos de cáncer metastásico.

- 3- Estudiar la relevancia de cGPBP en la formación de metástasis mediante la utilización de ratones *knockout* y transgénicos.
- 4- Validar cGPBP como diana terapéutica en cáncer.
- 5- Valorar la eficacia terapéutica de anticuerpos anti-cGPBP y de peptidomiméticos inhibidores de cGPBP en cáncer metastásico.

# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cultivos celulares

Todas las líneas celulares utilizadas fueron obtenidas del banco de ATCC.

Las células RAW 264.7, LLC, NMuMG, MDA-MB-231 y HTC-116 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Lonza) y 1% penicilina/streptomina (Lonza). En el caso de las células NMuMG, además se añade como suplemento al medio de cultivo 10 µg/ml de insulina (Sigma).

Las células 4T1 y A7C11 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640; Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Lonza) y 1% penicilina/streptomina (Lonza).

Las células A427, L929, los cultivos primarios de macrófagos murinos y los esplenocitos se cultivaron en medio DMEM-F12 (DMEM con F-12 de Ham; Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Lonza) y 1% penicilina/streptomina (Lonza).

Los co-cultivos llevados a cabo con las células RAW 264.7 y 4T1 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Lonza) y 1% penicilina/streptomina (Lonza). La proporción de células cultivadas fue de 1:4 (RAW 264.7:4T1).

## 2. Obtención de macrófagos murinos derivados de la médula ósea

El protocolo para la obtención de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM, *bone marrow-derived macrophages*) requiere de

un paso previo de extracción y su posterior diferenciación (Zhang *et al.*, 2008). Los ratones C57BL/6 *wild type* y C57BL/6-GPBP-1<sup>-/-</sup> fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Inmediatamente después, con una cuchilla se rasuraron las patas traseras y se rociaron con etanol al 70%. En condiciones asépticas, y con la ayuda de pinzas y tijeras estériles, se realizó una incisión y se separó la piel de ambas extremidades. Sin afectar al fémur, se cortaron ambas patas a nivel de la articulación de las caderas y a nivel del tarso, descartado la piel. Con el objetivo de quedarnos con el fémur, la tibia y el peroné, se extrajo todo el músculo intentando dejar los huesos libres de tejido y separándolos de forma individual, seccionando cuidadosamente las articulaciones que los unían. Una vez obtenidos, se introdujeron en PBS estéril. En este momento, se corta cada hueso por cada extremo para poder introducir una aguja de 25G en la cavidad interna de la médula ósea. Con la ayuda de la aguja, se introdujo 5 ml de PBS frío para extraer las células de la médula ósea. El PBS con las células se recogieron en una placa Petri y se traspasaron a un tubo estéril de 15 ml. El material se centrifugó 5 minutos a 500 xg en una centrífuga basculante (Eppendorf), se eliminó el PBS y se añadió 5 ml de medio DMEM-F12. Las células se cuantificaron (Moxi<sup>2</sup>, ORFLO) y se cultivaron a razón de  $5 \times 10^5$  células por placa Petri estéril sin tratar (Corning) en medio BMDM (medio DMEM-F12 con 20% de medio L929). Tras cultivar las células durante 3 días, se añadió 5 ml de medio BMDM por placa y después de un total de 7 días de incubación, los macrófagos finalizaron el proceso de diferenciación.

### **3. Aislamiento y cultivo de esplenocitos**

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se esterilizó la piel del abdomen con etanol al 70% y, con la ayuda de unas pinzas estériles, se separó la piel junto con la pared abdominal para realizar una incisión sin afectar a ningún órgano interno. Se cortó la piel y el peritoneo utilizando unas tijeras estériles y se extrajo el bazo. El bazo fue introducido en un tubo estéril con medio de cultivo. Con la ayuda de un tamizador de 70  $\mu\text{m}$  (Corning) se separaron las células, en medio de cultivo y en una placa Petri. La solución se recogió y se introdujo en un tubo estéril. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con tampón de lisis de eritrocitos (Gibco) y se cuantificaron (Moxi<sup>2</sup>, ORFLO). Después de asilar y cuantificar las células, se analizaron por citometría de flujo o se cultivaron durante 24 horas para el análisis de la secreción de cGPBP.

### **4. Tratamientos celulares**

Los macrófagos RAW 264.7 y BMDM se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos (1,5 x 10<sup>6</sup> células/pocillo). Para la obtención de M1 las células se estimularon con 500 ng/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, *E. coli* serotipo 026:B6) y 20 ng/ml de IFN $\gamma$  (R&D Systems). Para la obtención de M2a se utilizó 30 ng/ml de IL-13 (R&D Systems) y 30 ng/ml de IL-4 (R&D Systems). Para obtener M2b los macrófagos se incubaron durante 16 horas con 20 ng/ml de IFN $\gamma$  (R&D Systems), se quitó este estímulo y, posteriormente, se trataron con LPS a 10 ng/ml e inmunocomplejos (ver abajo). En el caso de M2c las células se estimularon con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems). Por último, M2d se obtuvo mediante la adición de medio condicionado de células 4T1 diluido 1:2 en DMEM. El medio condicionado se obtuvo cultivando 10<sup>5</sup>

células 4T1 en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (Corning) y recogiendo el medio tras alcanzar una confluencia del 80-90%. Todas las citoquinas utilizadas en la estimulación son proteínas recombinantes de ratón.

Los inmucomplejos se obtuvieron mediante dos protocolos distintos, ambos funcionales. En el primer protocolo, las células SRBC (*Sheep Red Blood Cells*, Sigma-Aldrich) se resuspendieron en solución equilibrada HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*, Sigma-Aldrich) con 0,1 M EDTA pH 7,4 (1:1) y se incubaron con inmunoglobulinas de conejo anti-SRBC (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C. Las SRBC opsonizadas se lavaron con HBSS, se precipitaron y se resuspendieron en medio de cultivo. Estos inmucomplejos se añadieron al medio de cultivo de células RAW 264.7 a razón de 10:1 (IC:células). En el segundo protocolo, se incubó ovoalbúmina (*albumin from chicken egg white*, Sigma-Aldrich) con anticuerpos específicos contra la proteína (*monoclonal anti-chicken egg albumin*, Sigma-Aldrich). Esta incubación se realizó durante 1 hora a 37 °C y utilizando una proporción de 1:10 (OVA:IgG). Posteriormente, en la estimulación de macrófagos, los inmucomplejos formados se utilizaron a una concentración de 20µg/ml OVA-200 µg/ml IgG.

En el caso de los co-cultivos de macrófagos RAW 264.7 y células tumorales 4T1, se sembraron 5 x 10<sup>5</sup> células 4T1 junto con 1,25 x 10<sup>5</sup> células RAW 264.7. Las células se sembraron en placas de 100 mm (Corning) y el tratamiento con T12 se inició en el mismo momento de la siembra, a una concentración de 50 µM (en las muestras indicadas).

## 5. Análisis de expresión génica: Extracción de ARN y qPCR

La extracción de ARN total de las muestras se llevó a cabo mediante el uso del kit Illustra RNAspin Mini kit (GE Healthcare). Posteriormente, se utilizó 1 µg de ARN de cada muestra para su retrotranscripción a ADNc utilizando el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems); y utilizando un termociclador 2720 (Applied Biosystems).

**Tabla 2. Sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de expresión génica.** Para cada gen objeto de estudio, se indican los códigos específicos de las sondas y las figuras en las que aparecen.

Gen	Proteína	Sonda TaqMan	Figura
<i>Il1b</i>	IL-1β	Mm00434228_m1	12-16, 20
<i>Il10</i>	IL-10	Mm01288386_m1	12-16, 22
<i>Arg1</i>	Arginasa 1	Mm00475988_m1	12-16, 20
<i>Nos2</i>	iNOS	Mm00440502_m1	12-16, 20
<i>Il6</i>	IL-6	Mm00446190_m1	16, 21
<i>Col4a3bp</i>	GPBPs	Mm00445754_m1	17
<i>Col4a3bp-1</i>	GPBP-1	Diseño personalizado	22
<i>Il12b</i>	IL-12B (p40)	Mm00434174_m1	20
<i>Mrc1</i>	CD206	Mm01329362_m1	21
<i>Mmp9</i>	proMMP-9	Mm00442991_m1	21
<i>Ccl2</i>	MCP-1	Mm00441242_m1	21
<i>Tnfa</i>	TNF-α	Mm00443258_m1	22
<i>Hprt</i>	HPRT1	Mm03024075_m1	12-17, 20-22

Finalmente, con el objetivo de analizar la expresión génica, se utilizó el ADNc para su análisis por qPCR mediante la tecnología *TaqMan* (Applied Biosystems). Para ello, se utilizó 2,5 µl de ADNc (25 ng de ARN),

mezclado con la solución comercial *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) y las sondas específicas *TaqMan* para cada gen objeto de estudio (**Tabla 2**). En cada análisis se realizaron dos réplicas por muestra y gen analizado. Los ensayos de qPCR se realizaron en un sistema StepOnePlus (Applied Biosystems).

El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo normalizando los datos usando como gen de referencia *Hprt* y para el cálculo de la expresión relativa de cada muestra analizada se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ .

## **6. Western blot**

La transferencia de proteínas de membrana se realiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se mezclan con tampón de carga 6x (Tris 187,5 mM pH 6,8 glicerol al 30% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 15% (v/v), SDS al 6% y azul de bromofenol 600 mg/l) y se hierven a 100°C durante 3 min. Se carga la misma cantidad de proteína en cada carril sobre el sistema Mini Protean (BioRad) en tampón Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles (4-20%; mini-protean® TGX stain-free™; BIO-RAD) se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Polyvinylidene difluoride; BIO-RAD) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v) a pH 8,3) utilizando el sistema Trans-Blot turbo (BIO-RAD). Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 hora con leche desnatada 5% (p/v) en tampón de lavado TBST (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,05% Tween-20 (v/v)) con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TBST. Tras este tiempo de incubación,

las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos en TBST (3 x 5 min). Una vez lavadas las membranas, se procedió a la incubación de las mismas con el anticuerpo secundario diluido en TBST. La reactividad de los anticuerpos se visualizó mediante quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando distintos tiempos de exposición. Las imágenes fueron analizadas con el equipo ImageQuant LAS 4000 Mini system (GE Healthcare).

## 7. Ensayos ELISA

La cuantificación de GPBP se llevó a cabo mediante ELISA sándwich directo *one-step* (la muestra se incuba directamente con el anticuerpo de detección). Las placas se incuban con 3 µg/ml de anticuerpo monoclonal N26 en PBS durante toda la noche. Posteriormente, las placas se lavan 3 veces con TBST, se bloquean con BSA al 3% en TBST durante al menos una hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo se vuelve a lavar con TBST 3 veces y se procede a la incubación de las muestras junto con al anticuerpo de detección mAb N27-HRP o mAb e11-2-HRP. Esta incubación se lleva a cabo durante 2 horas y a temperatura ambiente en agitación. Las placas se vuelen a lavar 3 veces con TBST. Por último, las placas se revelan con Quanta Blue, un sustrato fluorescente de HRP (Thermo Fisher Scientific). La intensidad fluorescente se midió con un lector de fluorescencia de placas SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices). Todas las diluciones se realizaron en TBST.

Las muestras de plasma se diluyen 1:10 en TBST. La matriz utilizada para diluir el estándar de GPBP es TBST con 0,5% BSA y 0,1%

IgG de cabra no desnaturalizada (SIGMA-ALDRICH). Las muestras de medio de cultivo se diluyen 1:2 en TBST.

Como estándares se utilizaron diluciones seriadas de GPBP recombinante, en un rango que va desde 0,31 ng/ml hasta 40 ng/ml. A lo largo de la realización de todo el proyecto se han utilizado diferentes proteínas recombinantes como estándares. En la etapa inicial se utilizó GPBP recombinante producida en *Escherichia coli*. En la última etapa, se puso a punto la producción de GPBP recombinante producido en células de insecto Sf9, purificado a partir del medio de cultivo (extracelular).

## **8. Ensayos Luminex™ xMAP™**

Los inmunoanálisis basados en la tecnología Luminex™ xMAP™ permiten la cuantificación y la detección simultánea de distintas proteínas secretadas (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, etc.). Esta tecnología de alto rendimiento produce resultados comparables a los ensayos ELISA, pero con mayor eficacia, velocidad e intervalo dinámico. La detección multianálisis se lleva a cabo a partir de una única muestra.

Se utilizó un panel multiplex configurado para analizar los analitos en plasma de ratonas BALB/c inoculadas con 4T1. Este panel permitió medir: las citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-10, IL-15; las quimioquinas IP-10, MCP-1, KC, MIG, MIP-1 $\alpha$ , RANTES; el factor de crecimiento G-CSF; y el enzima proMMP-9. El instrumento utilizado fue MAGPIX™.

Para la realización de los ensayos se siguieron las recomendaciones indicadas en los kits adquiridos. Se lavan las placas y

se añade una solución matriz específica para el análisis de plasmas. Tras incluir los estándares, el control positivo, el control negativo y las muestras, se añade una mezcla de las bolas magnéticas específicas del kit para el estudio del panel de citoquinas. Todo ello se incubó en cámara húmeda y durante 16 horas a 4 °C. Después se lavó la placa para hacer una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, en una cámara húmeda, con el anticuerpo de detección. Sin lavar la placa, se añadió estreptavidina-PE y se volvió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. Después de lavar la placa se añadió el buffer de detección y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando el equipo MAGPIX™ y su software.

## 9. Citometría de flujo

Los esplenocitos o las células de la médula ósea, se lavaron 3 veces con tampón de lisis de eritrocitos (Gibco) y se cuantificaron las células (Moxi<sup>z</sup>, ORFLO) para luego separar 10<sup>6</sup> células en 100 µl de PBS para cada tinción a realizar. La suspensión se bloqueaba con anti-mouse CD16/CD32 (Fc Block, BD biosciences) durante 15 minutos a 4 °C y se añadieron las mezclas de anticuerpos (1 µg/ml) para la tinción de las células, sin eliminar el bloqueante, y se incubaron 30 minutos a 4 °C. Por último, las muestras se lavaron 3 veces con PBS (500 x g, 5 min, 4 °C) antes de su análisis por citometría de flujo.

## 10. Inmunoprecipitación

Los anticuerpos (N26, N27 y e11-2) se unieron a bolas de sefarosa *Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4B beads* (Sigma Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plasmas se

diluyeron a 1:10 con TBST y se incubaron con 40  $\mu\text{g}$  de bolas de agarosa anti-GPBP durante toda la noche a 4 °C en agitación. Las bolas se recuperaron mediante centrifugación (500 x g, 10 min, 4 °C) y se lavaron 3 veces con TBST enfriado en la nevera. Finalmente, las bolas de sefarosa fueron mezcladas con el tampón de carga para su posterior análisis por *western blot*.

## **11. Inmunofluorescencia**

Para el procesado de células, éstas se fijaron con 4% de formaldehído durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, fueron permeabilizadas con 0,2% Tritón X-100 durante 5 minutos y bloqueadas con 3% BSA durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se volvieron a bloquear con una solución específica para avidina/biotina (Biotin blocking system, Dako); todo realizado a temperatura ambiente. En este momento, se procedió al incubado con anticuerpos marcados con sondas fluorescentes, diluidos en 3% BSA durante 16 horas a 4 °C. Por último, tras el lavado con PBS de las muestras se realizó el montaje de las mismas para su posterior visualización por microscopía confocal. Todas las soluciones utilizadas durante este procedimiento fueron preparadas en PBS.

En el caso del procesado de tejido, las muestras fueron embebidas en OCT (Sakura) y congeladas inmediatamente a -80°C. Mediante un criostato (Microm), se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor para situarlas en portaobjetos. Estas secciones posteriormente se fijaron durante 10 minutos con acetona 100% enfriada en congelador y se lavaron con PBS. El bloqueo se llevó a cabo, en primer lugar, con suero de caballo al 2,5 % (Vector Laboratories) y, en segundo lugar, con un kit

especial de bloqueo de avidina/biotina (Biotin blocking system, Dako). Sea cual fuere el marcaje utilizado, las criosecciones se incubaron durante 16 horas a 4 °C, se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos para su visualización por microscopía confocal.

Para la tinción con T12, se utilizó el diluyente comercial *EnVision Flex Antibody Diluent* (Dako), con bioT12 (1  $\mu$ M) y estreptavidina-fluoróforo 488 (1:300; Invitrogen). Los anticuerpos-fluoróforo, se diluyeron con el mismo diluyente. La detección de los núcleos se realizó empleando el marcador fluorescente DAPI (Molecular Probes). Sea cual fuese la combinación de marcaje empleada, se realizó una pre-incubación de 2 horas de bio-T12, estreptavidina-488 y DAPI. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 16 horas con estas mezclas, se lavaron con PBS, y se analizaron por microscopía confocal.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas mediante un microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus) combinado con un microscopio invertido IX8 (Leica Microsystems) y analizadas utilizando el software WCIF ImageJ.

## **12. Análisis histológico**

Las muestras se fijaron en 4% formaldehído (Panreac), se deshidrataron y fueron embebidas en parafina. Mediante un microtomo electrónico (Microm) se obtuvieron secciones de 3  $\mu$ m de grosor que fueron teñidas mediante HE (Hematoxilina/Eosina).

### 13. Anticuerpos y conjugados

La detección de GPBP se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) desarrollados por Fibrostatin S.L.: N26, N27 y e11-2. Estos mAbs fueron obtenidos utilizando GPBP recombinante producido en levadura *Pichia pastoris* (Raya *et al.*, 1999 y 2000). En función de la técnica de detección llevada a cabo, se utilizaron diferentes modalidades de anticuerpos en lo que se refiere al marcaje. En los ensayos ELISA y *western blot* se utilizaron anticuerpos conjugados con peroxidasa HRP (EZ-LINK Plus Activated Peroxidase, Thermo Fisher Scientific), biotinilados (Sulfo-NHS-LC-Biotin; Thermo Fisher Scientific) o anticuerpos sin marcar detectados posteriormente con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón marcado con HRP o biotina. Para los ensayos de inmunofluorescencia se marcaron los anticuerpos con Alexa Fluor® 546 (Life Technologies). En los ensayos *in vivo* se utilizó el mAb sin alterar; previo análisis y eliminación de endotoxinas con kit comercial (*LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* y *High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns*; Pierce).

Para la detección del colágeno IV se utilizó el anticuerpo policlonal anti- $\alpha 1-\alpha 2$ (IV) (Merck Millipore), marcado con Alexa Fluor® 647 (Thermo Fisher Scientific).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron diferentes según el tipo de estudio (**Tabla 3**). La biotina la detectamos con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) y neutravidina conjugada con HRP (Thermo Fisher Scientific).

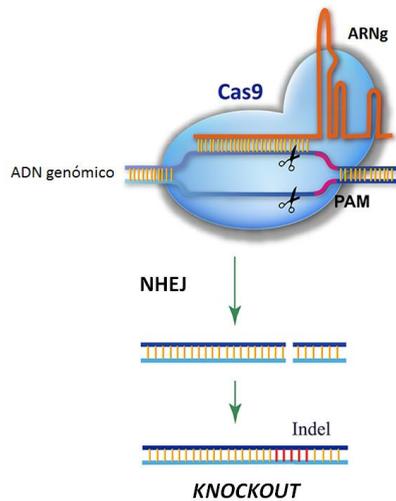
**Tabla 3. Anticuerpos y conjugados utilizados en las diferentes técnicas y ensayos de esta Tesis.** Se indica la casa comercial que distribuye cada anticuerpo utilizado y las figuras en las que aparecen. IF, inmunofluorescencia; IP, inmunoprecipitación; WB, western blot; MC, microscopía confocal; CF, citometría de flujo; Tto, Tratamiento. GPBPs, todos los productos de *Col4a3bp*.

Anticuerpo/Conjugado	Diana	Casa comercial	Técnica	Figura
mAbN26	GPBPs	-	Tto	
mAbN26-sefarosa	GPBPs	-	IP	30
mAbN27-sefarosa	GPBPs	-	IP	38
mAbe11-2-sefarosa	GPBP	-	IP	30, 38
mAbe11-2-biotina	GPBP	-	WB	30, 34, 38
mAbN27-HRP	GPBPs	-	ELISA/WB	18, 19, 29-34, 37, 38
mAbe11-2-HRP	GPBP	-	ELISA/WB	18, 19, 29, 32, 33
mAbN27-AF546	GPBPs	-	IF	45
anti- $\alpha 1\alpha 1$ (IV)-AF647	$\alpha 1\alpha 1$ (IV)	Millipore	IF	44, 45
p13	GPBP	Producción por encargo	WB	30
Neutravidina-HRP	Biotina	Thermo Fisher	WB	30, 34, 38
Anti-Gr1-FITC	Gr1	BioLegend	CF	26
Anti-CD11b-APC	CD11b	BioLegend	CF	26
Anti-CD19-FITC	CD19	BD Pharmingen	CF	46
Anti-F4/80-PerCP-Cy5.5	F4/80	eBiosciences	CF	46
Anti-CD4-PerCP	CD4	BioLegend	CF	46
Anti-CD8-PE	CD8	BD Pharmingen	CF	46

#### 14. Producción de células 4T1-GPBP<sup>-/-</sup> mediante la tecnología CRISPR/Cas9

Las células 4T1 se co-transfectaron con lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) para introducir un plásmido que expresa Cas9 y un plásmido que expresa un ARN guía (ARNg), generado por Sigma Aldrich siguiendo nuestras especificaciones. El ARNg hibrida con nuestra

secuencia diana, el exón XI de *Col4a3bp* (ccctatagtcgctcttctcca), y permite que Cas9 corte el ADN genómico. De esta forma, se activa el mecanismo de reparación por recombinación no homóloga y finalmente se introduce una mutación (pequeñas inserciones o deleciones) que impedirá el correcto funcionamiento del gen (**Fig. 10**).



**Figura 10. Edición del genoma mediante tecnología CRISPR/Cas9.** El ARN guía (ARNg) está diseñado específicamente para hibridar en la secuencia diana y permitir la acción de Cas9. Cas9 reconoce el ARNg y, gracias al motivo PAM (*protospacer adjacent motifs*), se une a la secuencia diana para producir un corte. El corte lo produce en ambas cadenas del ADN genómico, de manera que se activa la reparación mediante recombinación no homóloga (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*). La reparación por NHEJ es la ruta de reparación más activa, capaz de reparar la cadena de doble hebra rápidamente, pero que frecuentemente introduce pequeñas deleciones o inserciones (Indel) en el sitio a reparar. Estos errores son los que inactivarán la función génica dando lugar a una célula *knockout* para el gen diana. Adaptado de Ding *et al.*, 2016.

Se amplificó mediante PCR el ADN genómico de las células transfectadas utilizando oligonucleótidos diseñados por Sigma Aldrich. Antes de proseguir con la selección de clones, se comprobó la eficiencia

del procedimiento mediante la digestión con Cel-I (GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit, Invitrogen) del producto de PCR genómico que incluía la secuencia diana. Este enzima reconoce la presencia de nucleótidos desapareados. Posteriormente, los clones se aislaron mediante dilución límite y fueron seleccionados mediante inmunofluorescencia con e11-2 (GPBP) y N27 (GPBPs). Los clones seleccionados fueron caracterizados finalmente por *western blot* con los mismos anticuerpos. Para determinar las mutaciones introducidas en el exón XI de GPBP, los productos de PCR genómicos fueron secuenciados.

## 15. Procesado de tejidos

El procesado de los tejidos se realizó de forma diferente en función del tejido a analizar. La extracción de sangre siempre se realizó en primer lugar después del sacrificio de los animales. Para ello, se introdujo una aguja hipodérmica de 25G (BD Biosciences) en la vena cava y se recolectó la sangre en una jeringuilla con 0,1 ml de EDTA al 2%. Para obtener el plasma, la sangre se centrifugó a 1000 xg 10 minutos y se guardó el sobrenadante a -80 °C. En el caso de los pulmones, estos fueron embebidos en solución Bouin durante 24 horas para fijar el tejido y poder realizar el análisis visual de las metástasis. Para el análisis de poblaciones del sistema inmune por citometría de flujo, se extrajo bazo, fémur, tibia y peroné. El bazo se procesó para la obtención de esplenocitos y el fémur, tibia y peroné para la obtención de las células de la médula ósea (**Fig. 11**). El resto de tejidos, incluyendo el tumor primario, se fijaron en formaldehído al 10% (Panreac®) o se embebieron en OCT (Sakura) para su análisis por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, respectivamente.

## 16. Experimentación animal

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las directrices institucionales y con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal (CEEA) para el uso de animales de experimentación. Los ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia).

### 16.1 *Ratones knockout y transgénicos para GPBP*

Nuestro grupo de investigación dispone de ratones en fondo genético C57BL/6 transgénicos y *knockout* para la proteína GPBP. Se trata de animales no comerciales, por lo que el mantenimiento de las colonias se lleva a cabo en las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia).

Los ratones C57BL/6-GPBP<sup>-/-</sup> son ratones *knockout* para el exón XI de *Col4a3bp*, es decir, no expresan GPBP-1 y GPBP-3. Los ratones C57BL/6-Tg-mGPBP son ratones transgénicos que contienen un inserto de ADNc de *Col4a3bp* murino, denominado secuencia n4' (Raya *et al.*, 1999). Este transgén contiene 408 pb de la región 5'-UTR, una pauta de lectura abierta de 1872 pb que codifica los 624 residuos de GPBP y una secuencia 3'-UTR de 109 pb. Por tanto, estos animales transgénicos sobreexpresan GPBP-1 y GPBP-3.

### 16.2 *Modelo C57BL/6-LLC*

Los animales utilizados fueron machos y hembras de 7-8 semanas de edad, obtenidos a partir de colonias de mantenimiento estabuladas en las instalaciones del animalario de la Facultad de

Medicina. En función del ensayo realizado, se utilizaron ratones C57BL/6 *wild type*, C57BL/6-GPBP<sup>-/-</sup> y C57BL/6-Tg-mGPBP.

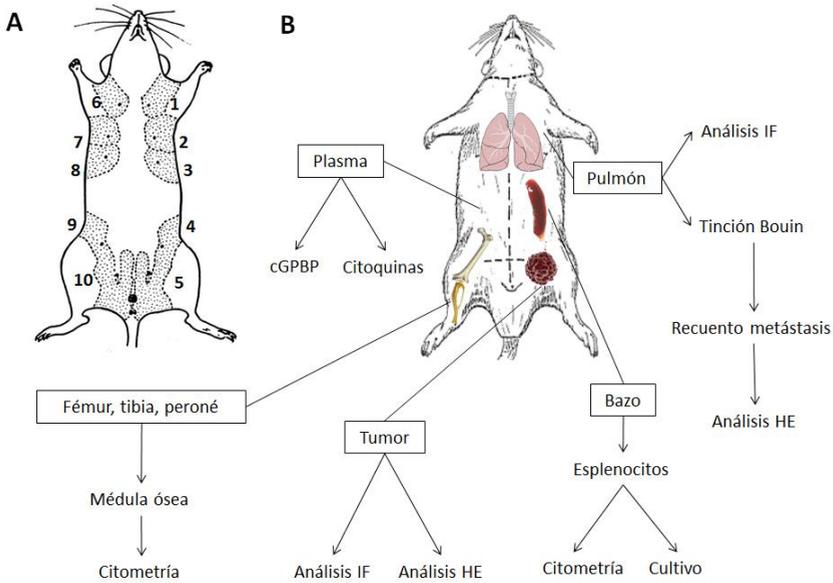
Se inocularon  $10^4$  células LLC de forma subcutánea en cada animal. Para ello, las células LLC se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS y fueron inyectadas subcutáneamente en el dorso derecho de los animales. La inoculación se llevó a cabo con una aguja hipodérmica de 27 G (BD Biosciences) anestesiando a los ratones para su inmovilización. Se realizó anestesia inhalatoria de isoflurano al 5% en la fase de inducción y al 1,5-2% en la fase de mantenimiento. Posteriormente se monitorizó el crecimiento tumoral mediante la medición con un pie de rey digital. El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula  $D*d^2*0,52$ , donde D es el diámetro mayor y d es el diámetro menor. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. En los ensayos piloto se sacrificaron animales a día 2, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 post-inoculación de las células LLC.

#### **16.3 Modelo BALB/c-4T1**

Los animales utilizados fueron hembras de 4-5 semanas de edad (Janvier). En función del ensayo realizado, se utilizaron animales BALB/c *wild type* (BALB/cJrj), BALB/c-NUDE (BALB/cAnNRj-Foxn1<sup>nu</sup>/ Foxn1<sup>nu</sup>), CB17-SCID (CB-17/icr-Prkdcscid/Rj) y CB17-NOD-SCID (NOD.CB17/Alhrj-prkdcscid/Rj).

En todos los ensayos se inocularon  $10^4$  células 4T1 por cada ratona, excepto en aquellos experimentos donde se menciona lo contrario. Las células 4T1 se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS para posteriormente inocularlas subcutáneamente en el panículo adiposo mamario número 4 (**Fig. 11**). La inoculación y procedimientos de

anestesia, monitorización, sacrificio y piloto se llevó a cabo como se indican arriba. Los animales control sanos fueron inoculados con 100 $\mu$ L de PBS.



**Figura 11. Modelo BALB/c-4T1 y el procesamiento de los tejidos.** En A se muestra la nomenclatura de las 10 glándulas mamarias presentes en una ratona. Las células tumorales 4T1 se inyectaron en el panículo adiposo mamario de la glándula número 4. En B se muestra un diagrama donde se esquematiza el procesamiento de los tejidos y su posterior análisis. IF, inmunofluorescencia; HE, hematoxilina-eosina.

Para los ensayos terapéuticos, se administró N26 con inyecciones intraperitoneales semanales (1  $\mu$ g/g de peso corporal) mediante el uso de una aguja hipodérmica de 25G (BD Biosciences). El tratamiento con T12 se administró diluyendo el compuesto en agua de bebida con dosis de 12 mg/Kg-día (12 mg/Kg de peso corporal).

#### **16.4 Resección quirúrgica del tumor primario en el modelo BALB/c-4T1**

Para paliar el dolor, se administró buprenorfina (0,05 mg/kg) antes de la cirugía, por vía subcutánea. La intervención quirúrgica se llevó a cabo utilizando la anestesia inhalatoria. Durante el procedimiento, se realiza una pequeña incisión (1-2 cm de longitud), en la zona previamente afeitada y esterilizada, para extraer el tumor primario. Por último, se cierra la incisión con grapas de 9 mm.

#### **17. PET-TAC**

Para el análisis *in vivo* de metástasis se desarrollaron estudios de radiofarmacología con técnicas de imagen molecular microPET/TAC (equipo Albira ARS, Oncovisión). Para ello, los animales se inocularon con 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG) mediante una inyección intraperitoneal. La dosis administrada fue de 0,2-0,3 mCi por cada animal y en un volumen máximo de 0,2 ml. Tras esperar unos 40 minutos para la distribución del radiofármaco, los animales se anestesiaron por inhalación para ser inmovilizados durante la adquisición de las imágenes. Las imágenes adquiridas fueron de cuerpo entero, con 15 minutos de adquisición PET y 7 minutos de adquisición TAC (45 kV; 0,8 mA). Las imágenes fueron adquiridas y reconstruidas utilizando el software propio del equipo microPET/TAC (equipo Albira ARS, Oncovisión) y la visualización y análisis de las mismas utilizando el software AMIDE.

## 18. Análisis estadístico

Para la realización de los diferentes análisis estadísticos se utilizó el software Prism 4.0 (GraphPad software). Para determinar las diferencias entre series de datos con una variable se utilizó el test-*t* de Student, si se trataba de 2 muestras, y el test ANOVA de una vía (ANOVA-1 vía), si se trataba de más de 2 muestras. Para determinar la significación estadística entre más de dos series con dos variables se utilizó el test ANOVA de dos vías (ANOVA-2 vías). Para comparar dos variables dicotómicas se utilizó el test exacto de Fisher. Este test se utilizó porque la muestra a estudiar fue demasiado pequeña, y no se cumplían las condiciones necesarias para la aplicación del test  $\chi^2$ . Para las curvas de supervivencia se utilizaron curvas Kaplan–Meier utilizando el test log-rank (Mantel-Cox). Un  $p < 0,05$  se consideró significativo.

## **IV. RESULTADOS**



## 1. GPBP EN LA POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Para estudiar la relevancia de GPBP en la inflamación estudiamos su expresión y secreción en un modelo celular que reproduce la polarización de los macrófagos *in vivo*.

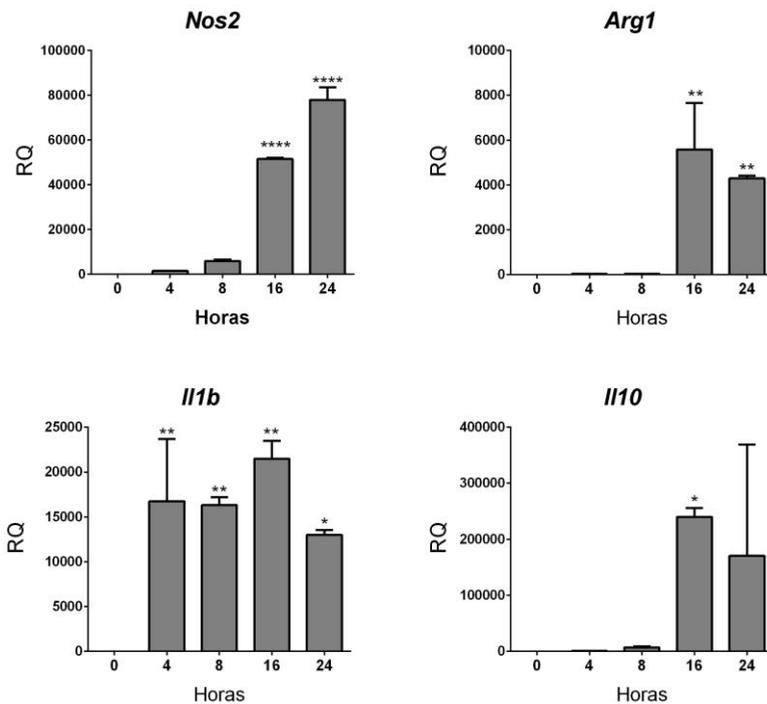
### 1.1. La polarización M2 de los macrófagos RAW 264.7 aumenta la expresión y secreción de GPBP

Para conseguir las distintas polarizaciones de los macrófagos, en una primera aproximación utilizamos macrófagos murinos RAW 264.7 inmortalizados a partir un tumor causado por el *virus* de la *leucemia* murina de Abselon (Raschke *et al.*, 1978). Con esta finalidad se testaron diferentes condiciones (estímulos, concentraciones y tiempos de incubación) y se analizaba la expresión génica de *Il1b* (IL-1 $\beta$ ), *Arg1* (arginasa-1), *Il10* (IL-10) y *Nos2* (óxido nítrico sintasa inducible, iNOS) para caracterizar la polarización. La expresión relativa de estos genes permite determinar si los macrófagos adquieren fenotipos pro- o anti-inflamatorios. En los estudios que se presentan a continuación los fenotipos se determinan analizando la expresión génica mediante qPCR.

#### 1.1.1. La expresión de *Col4a3bp* en la polarización de macrófagos RAW 264.7

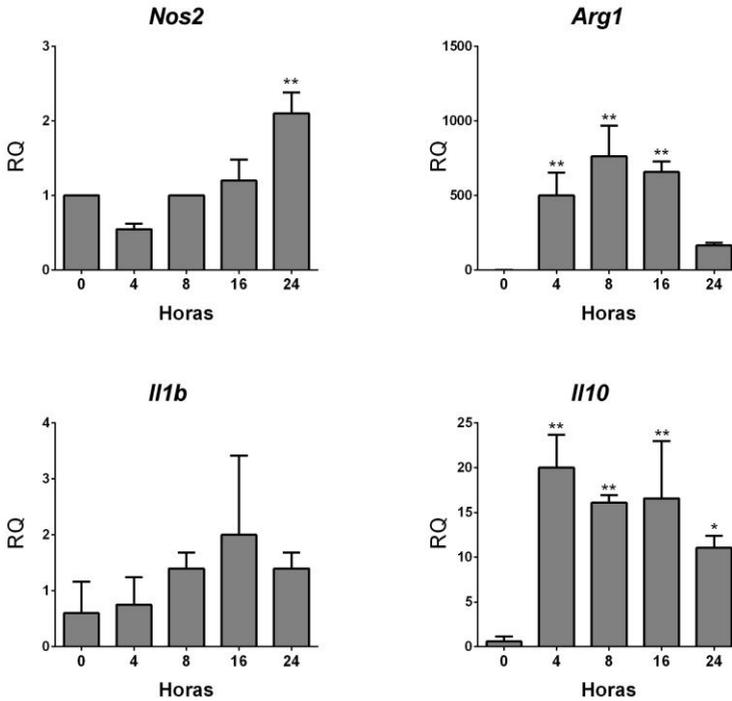
El fenotipo pro-inflamatorio M1 se obtuvo estimulando los macrófagos RAW 264.7 con LPS e IFN- $\gamma$ . El fenotipo M1, caracterizado por ser *Il1b*<sup>+</sup>, *Nos2*<sup>+</sup>, *Arg1*<sup>-</sup>, *Il10*<sup>-</sup>, se observó a partir de 4 horas de estimulación (**Fig. 12**). Un aspecto a destacar es que con el paso de las horas la polarización evolucionaba y los macrófagos cambiaban su

fenotipo de M1 a M2. De este modo, a las 16 horas la expresión de marcadores anti-inflamatorios como *Il10* o *Arg1* aparecía aumentada y a las 24 horas disminuía la expresión de marcadores pro-inflamatorios como *Il1b*. La expresión de *Nos2* siguió siempre una tendencia ascendente desde la estimulación.



**Figura 12. Expresión génica de macrófagos RAW 264.7 con polarización M1.** Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon con 500 ng/ml de LPS y 20 ng/ml de IFN $\gamma$  y se analizó la expresión de *Nos2*, *Il10*, *Il1b* y *Arg1* en los tiempos indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular). En esta y en las siguientes figuras: Se muestran valores medios  $\pm$  SD; RQ, expresión relativa (*Relative Quantification*); \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001.

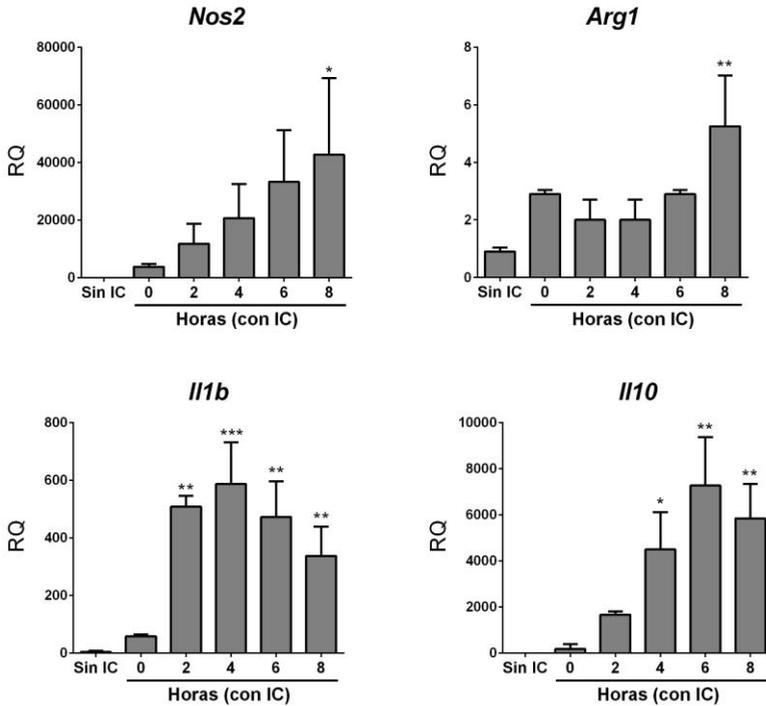
El fenotipo anti-inflamatorio M2a se obtuvo estimulando con IL-13 e IL-4 (**Fig. 13**). De nuevo, se alcanzaba el fenotipo buscado tras 4 horas de incubación: *Il1b*<sup>-</sup>, *Nos2*<sup>-</sup>, *Arg1*<sup>+</sup>, *Il10*<sup>+</sup>.



**Figura 13. Expresión génica en macrófagos RAW 264.7 con polarización M2a.** Los macrófagos RAW 264.7 fueron estimulados con 30 ng/ml de IL-4 y 30 ng/ml de IL-13 a analizados a diferentes tiempos. Se analizó la expresión génica de los genes *Nos2*, *Il10*, *Il1b* y *Arg1*. Estadística: ANOVA-1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular).

El fenotipo M2b se alcanza estimulando con LPS e inmunocomplejos (**Fig. 14**). Los macrófagos se cultivaron primero con IFN- $\gamma$  durante 16 horas que actúa como un “pre-estímulo” (estímulo necesario, pero no suficiente), y posteriormente se estimularon con LPS e inmunocomplejos. Los macrófagos M2b muestran un perfil de

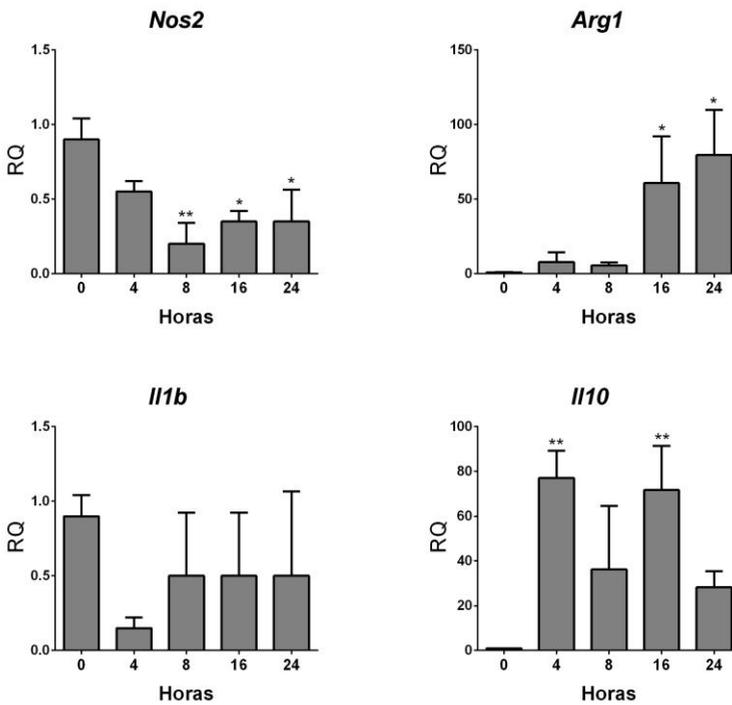
expresión *Il1b*<sup>+</sup>, *Nos2*<sup>+</sup>, *Arg1*<sup>-</sup>, *Il10*<sup>+</sup>. En este caso, el fenotipo se inicia a partir de las 4 horas de la estimulación con inmunocomplejos. Se quiere hacer notar que, aunque se produce una elevación relativa de *Arg1*, los aumentos son bajos (comparar con M2a en **Fig. 13**).



**Figura 14. Expresión génica en macrófagos RAW 264.7 con polarización M2b.** Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon con 20 ng/ml de IFN $\gamma$  durante 16 horas. Posteriormente, se cambió el medio y se añadió 10 ng/ml de LPS junto con inmunocomplejos (IC) y se analizó la expresión de *Nos2*, *Il10*, *Il1b* y *Arg1* en los tiempos indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular).

Cuando estimulamos los macrófagos RAW264.7 con TGF- $\beta$ 1 se polarizan a M2c (**Fig. 15**). A partir de las 4 horas se detectó un aumento de expresión de *Arg1* e *Il10* indicando que las células empezaban a

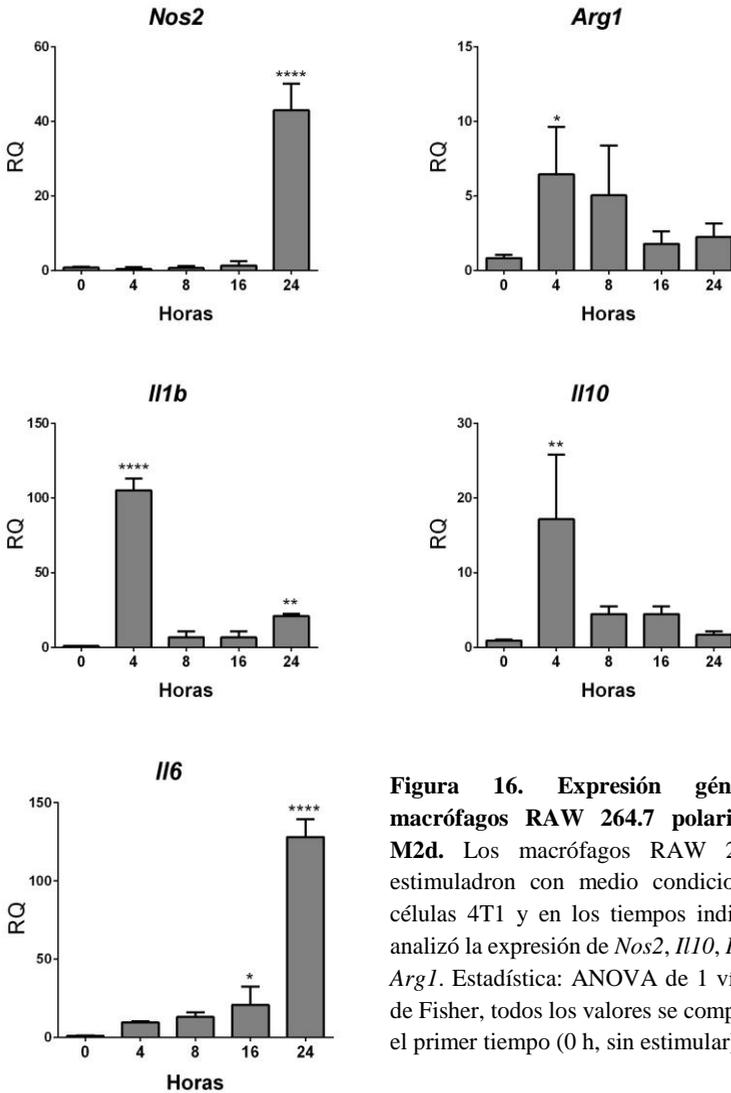
polarizarse. El fenotipo muestra un perfil de expresión *Il1b*<sup>-</sup>, *Nos2*<sup>-</sup>, *Arg1*<sup>+</sup>, *Il10*<sup>+</sup>.



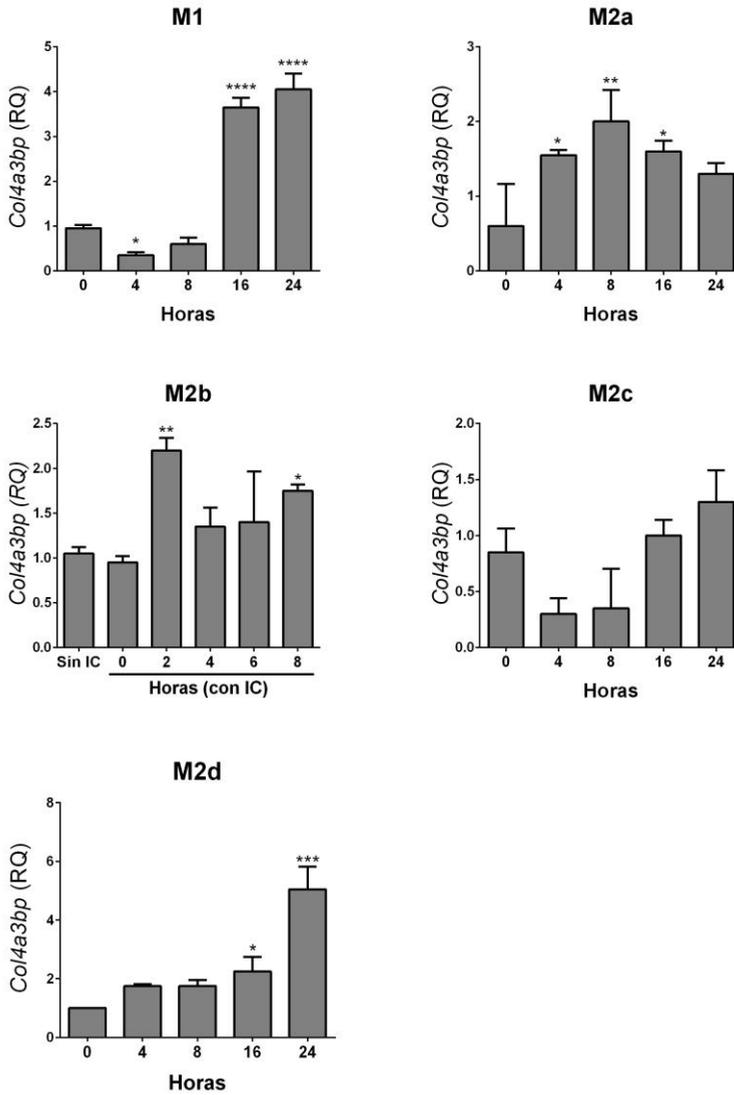
**Figura 15. Expresión génica en macrófagos RAW 264.7 polarizados a M2c.** Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 y se analizó la expresión de *Nos2*, *Il10*, *Il1b* y *Arg1* en los tiempos indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular).

Por último, el fenotipo M2d, propio de los TAM, se consiguió estimulando las células con medio condicionado de células tumorales 4T1 (**Fig. 16**). A partir de las 4 horas se empezaron a observar cambios de expresión en respuesta al estímulo. Inicialmente se detectó una subida de expresión de *Il1b* y *Arg1*. Después de 24 horas, la expresión de los genes *Il1b* y *Arg1* descendió, y aumentó drásticamente la expresión de *Il6*, que se incluyó en el análisis porque está descrito que es

fundamental en la polarización M2d con este tipo de estímulo (Wang *et al.*, 2010). El fenotipo M2d obtenido se caracteriza por el perfil de expresión  $Il1b^+$ ,  $Nos2^+$ ,  $Arg1^+$ ,  $Il10^+$ ,  $Il6^+$ .



**Figura 16. Expresión génica en macrófagos RAW 264.7 polarizados a M2d.** Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon con medio condicionado de células 4T1 y en los tiempos indicados se analizó la expresión de *Nos2*, *Il10*, *Il1b*, *Il6* y *Arg1*. Estadística: ANOVA de 1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular).



**Figura 17. Expresión génica de *Col4a3bp* en la polarización de macrófagos RAW 264.7.** Se muestra la expresión de *Col4a3bp* en las polarizaciones M1, M2a, M2b, M2c y M2d de macrófagos RAW264.7 en los tiempos indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con el primer tiempo (0 h, sin estimular).

El análisis de *Col4a3bp* revelaba un aumento de su expresión asociada a fenotipos anti-inflamatorios M2 (**Fig. 17**). El fenotipo M2d, era el que mostraba mayor aumento de la expresión (RQ = 5,1). Las

polarizaciones M2a (IL-13 y IL-14) y M2b (IFN- $\gamma$ , LPS + inmunocomplejos) también se acompañan de una activación de *Col4a3bp*. En este sentido también se observaba que con el estímulo pro-inflamatorio (LPS + IFN- $\gamma$ ) aumenta la expresión de *Col4a3bp* cuando la polarización evoluciona de M1 a M2 (RQ = 3,0).

En conjunto, los resultados mostraban que la expresión *Col4a3bp* está aumentada en la polarización antiinflamatoria de los macrófagos.

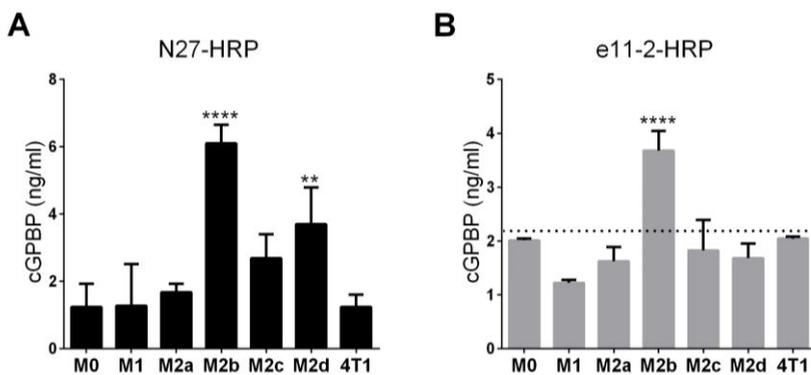
### **1.1.2. Producción de cGPBP en macrófagos RAW 264.7**

La producción de cGPBP por los macrófagos polarizados se analizó por ELISA. Existen limitaciones técnicas en este tipo de ensayos al no existir una referencia que normalice los resultados (p. ej. una segunda proteína secretada que no cambia con los estímulos). Por ello, es conveniente hacer las estimulaciones de los cultivos en paralelo para que el resto de condiciones experimentales sean iguales. En este caso se analizaron medios de cultivo de 24 horas de todos los fenotipos. Se hicieron dos ELISA sándwich directos, utilizando dos anticuerpos monoclonales de detección diferentes, mAb N27-HRP y mAb e11-2-HRP (**Fig. 18**).

Los resultados mostraron que la mayor secreción de cGPBP se consigue con la polarización M2b, y se detectada tanto con mAb N27 como con mAb e11-2, confirmando que se secreta GPBP. La polarización M2d también producía cGPBP, pero solamente era detectable por mAb N27 y no por mAb e11-2 porque este anticuerpo no detectaba con fiabilidad concentraciones de cGPBP inferiores a 2 ng/ml. Los fenotipos

M1 y M2a no producían cGPBP, y el fenotipo M2c generaba niveles de cGPBP que no alcanzaban relevancia estadística.

No se detectaba cGPBP en el medio de cultivo (resultado no mostrado), y tanto los macrófagos como las células 4T1 secretaban GPBP de forma constitutiva (sin estímulos) (**Fig. 18**).



**Figura 18. Los macrófagos RAW 264.7 polarizados a M2b y M2d producen cGPBP.** Las células RAW 264.7 se estimularon para polarizarlas a M1, M2a, M2b, M2c y M2d. A las 24 h se colecciona el medio de cultivo y se analizan los niveles de cGPBP mediante dos ELISA en los que cambia el anticuerpo de detección. Se utilizaron (A) mAb N27-HRP; y (B) mAb e11-2-HRP. La línea discontinua muestra el límite de sensibilidad del ELISA utilizando mAb e11-2. Estadística: ANOVA-1 vía y LSD de Fisher, todos los valores se comparan con M0.

Las polarizaciones M2b y M2d son las que más aumentan la expresión de *Col4a3bp* y son las que secretaban mayores cantidades de GPBP (**Tabla 4**). Indicando que el aumento de expresión se destina, al menos en parte, a la producción de cGPBP.

En conjunto, los resultados confirman que los macrófagos son una fuente natural regulada de cGPBP.

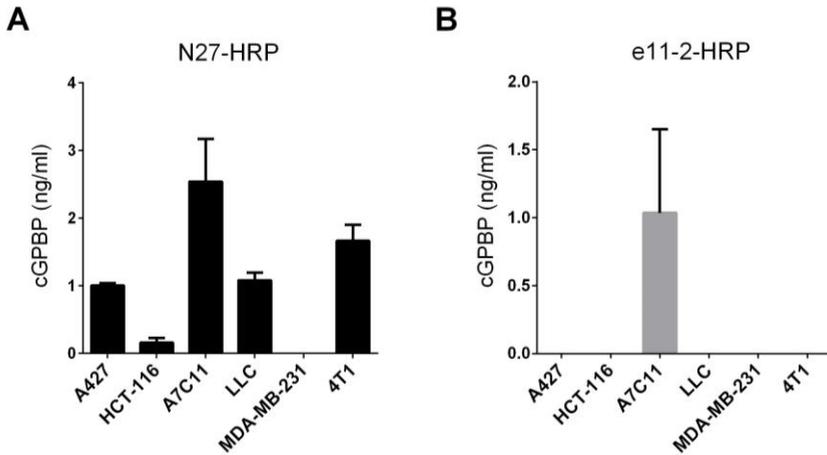
**Tabla 4. Expresión de *Col4a3bp* y producción de cGPBP en macrófagos RAW 264.7 polarizados.** Se muestran los estímulos utilizados para obtener los fenotipos que se indican, la expresión máxima de *Col4a3bp* cuando se ha alcanzado el fenotipo y niveles de cGPBP a 24 h después del correspondiente estímulo.

Fenotipo	Estímulo	<i>Col4a3bp</i> (RQ)	cGPBP (ng/ml)
<b>M0</b>	Sin tratar	<b>1,0</b>	<b>0,47</b>
<b>M1</b>	LPS (500 ng/ml) + IFN $\gamma$ (20 ng/ml)	<b>0,4</b>	<b>0,00</b>
<b>M2a</b>	IL-4 (30 ng/ml) + IL-13 (30 ng/ml)	<b>1,5</b>	<b>0,41</b>
<b>M2b</b>	IFN $\gamma$ (20 ng/ml) + [LPS (10 ng/ml) + IC]	<b>2,3</b>	<b>4,84</b>
<b>M2c</b>	TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml)	<b>1,3</b>	<b>1,42</b>
<b>M2d (TAM)</b>	Medio condicionado 4T1 (1:2)	<b>5,1</b>	<b>2,43</b>

## 1.2. Las células tumorales secretan GPBP

En el estudio anterior comprobamos que las células tumorales 4T1 son una fuente de cGPBP. Estas células no necesitaban ningún tipo de estímulo para inducir su secreción y presentaban niveles detectables en el medio de cultivo de 24 horas.

Para determinar si es una propiedad exclusiva de las células 4T1 se analizaron medios de cultivo de diferentes líneas celulares tumorales, tanto murinas como humanas y de distinto origen: mama, pulmón y colon (**Fig. 19**). Además de las células 4T1 se utilizaron: A427 (adenocarcinoma de pulmón, humano); HCT-116 (adenocarcinoma de colon, humano); A7C11 (adenocarcinoma ductal de mama, murino); LLC (adenocarcinoma de pulmón, murino) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama, murino).



**Figura 19. Las células cancerosas producen cGPBP.** Análisis de cGPBP en cultivos de líneas de células tumorales de distinta naturaleza. La detección se realizó a partir de medio de cultivo de 24 horas después de sembrar  $10^5$  células. Los medios se analizaron como en la Figura 18 (A) mAb N27-HRP; y (B) mAb e11-2-HRP. No hay una detección fiable con mAb-e11-2-HRP.

De nuevo se realizaron análisis de ELISA que mostraron cGPBP en el medio de 4T1, A7C11, LLC y A427, pero sólo en el medio de A7C11 éstos niveles eran detectados niveles con mAb e11-2-HRP. Los resultados indicaban que células cancerosas de distintas procedencias (humanos o murinos, mama o pulmón) producían cGPBP de forma constitutiva.

### **1.3. GPBP media en la polarización M2d pro-tumoral y T12 inhibe esta polarización favoreciendo la polarización M1 anti-tumoral**

Los macrófagos M2d son uno de los fenotipos que muestran una mayor expresión y secreción de GPBP, y las células tumorales pueden contribuir a aumentar los niveles de cGPBP en el seno de un tumor secretándolo de forma constitutiva. Todo ello sugiere que GPBP puede

tener una función relevante en la polarización de los TAM y contribuir a la progresión tumoral.

Estudiamos la contribución de GPBP en la polarización M2d a partir de macrófagos procedentes de cultivos primarios obtenidos de médula ósea de ratones (BMDM). Estos procedimientos nos permitieron aislar y estudiar BMDM a partir de ratones C57BL/6-GPBP<sup>-/-</sup>. Los BMDM se obtuvieron tras un proceso de diferenciación de células precursoras de la médula ósea, extraída de ratones *wt* y GPBP<sup>-/-</sup>, y se polarizaron a M2d. Además, se analizó también la polarización M1 como opuesta a M2d. Los estímulos utilizados para obtener M1 y M2d fueron los mismos que se utilizaron en macrófagos RAW 264.7.

En este ensayo se incorporó al estudio nuevos genes como *Il12b*, *Ccl2*, *Mmp9*, *Tnfa* y *Mcr1*. El gen *Il12b* codifica la citoquina pro-inflamatoria IL-12 p40 (IL-12B) y su producción es deficiente en las células RAW 264.7 (Matsuura *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2006). *Ccl2* codifica la quimioquina MCP-1 que regula la infiltración y migración de monocitos/macrófagos. *Mmp9* codifica el enzima proMMP-9 en su forma latente, que tras su activación a MMP-9 participa en la degradación de matriz extracelular. *Ccl2* y *Mmp9* facilitan la progresión tumoral (Yoshimura *et al.*, 2013; Mehner *et al.*, 2014). *Tnfa* codifica la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ . *Mrc1* codifica el receptor de manosa CD206, cuyo aumento de expresión es un indicativo de polarización M2 (Rószler, 2015).

Como los resultados previos sugerían que el aumento de expresión de *Col4a3bp* se destinaba principalmente a la secreción de GPBP, se cuantificó de forma específica la expresión del exón XI de GPBP (*Col4a3bp-1*), diseñando una sonda Taqman específica. Este tipo de

análisis también permitía además confirmar el carácter *knockout* de los macrófagos aislados a partir de ratones C57BL/6-GPBP<sup>-/-</sup>.

La ausencia de GPBP impedía la polarización M2d (**Fig. 20 ,21 y 22**). Los macrófagos GPBP<sup>-/-</sup> estimulados con medio de células 4T1 apenas aumentaban la expresión de *Il10* en respuesta al estímulo y en este sentido tampoco aumentaba la expresión de *Il6* y *Mcr1*, otros biomarcadores del fenotipo M2d (Mehner *et al.*, 2014; Yoshimura *et al.*, 2013). Además, tampoco aumentaban la expresión de la quimioquina *Ccl2* y la proteasa extracelular *Mmp9*. Los macrófagos GPBP<sup>-/-</sup> inducidos a M2d tampoco conseguían elevar la expresión de *Il1b*, *Nos2* y *Tnfa* a las 24 h, mientras que la expresión de *Il12b* se adelantaba.

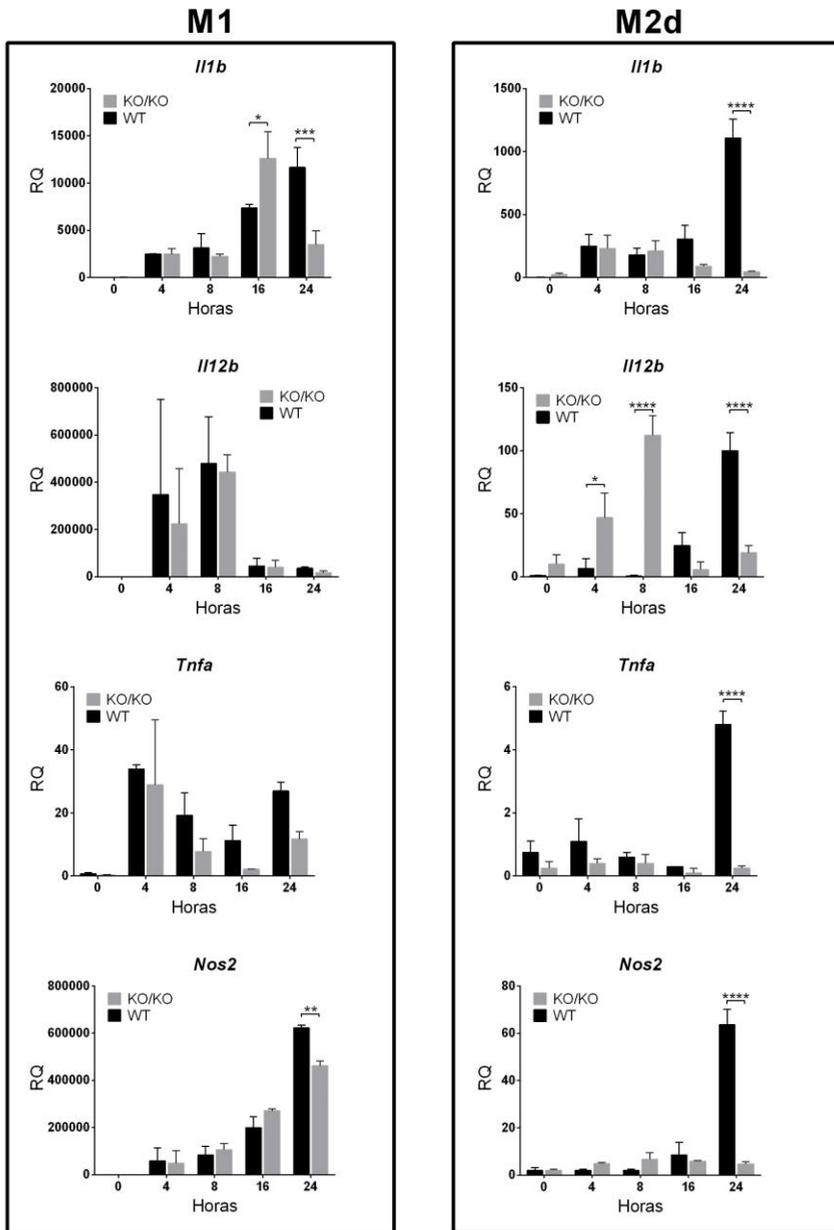
La polarización M1 de los macrófagos GPBP<sup>-/-</sup> no se alteraba tan profundamente. La expresión de *Il12b*, *Tnfa* e *Il10* no cambiaba significativamente, otros genes como *Nos2* e *Il6* mostraron un descenso menos acusado que en la polarización M2d, e *Il1b* sólo adelantaba su expresión máxima. En cambio, de modo similar a lo que sucedía en la polarización M2d, la ausencia de GPBP redujo ampliamente la expresión de *Mmp9* y de *Ccl2*.

La expresión de *Arg1* no se alteró de forma significativa en ninguno de los casos, si bien es cierto que en la polarización M2d - en su conjunto - se reducía, presentando un área bajo la curva menor (no se muestra).

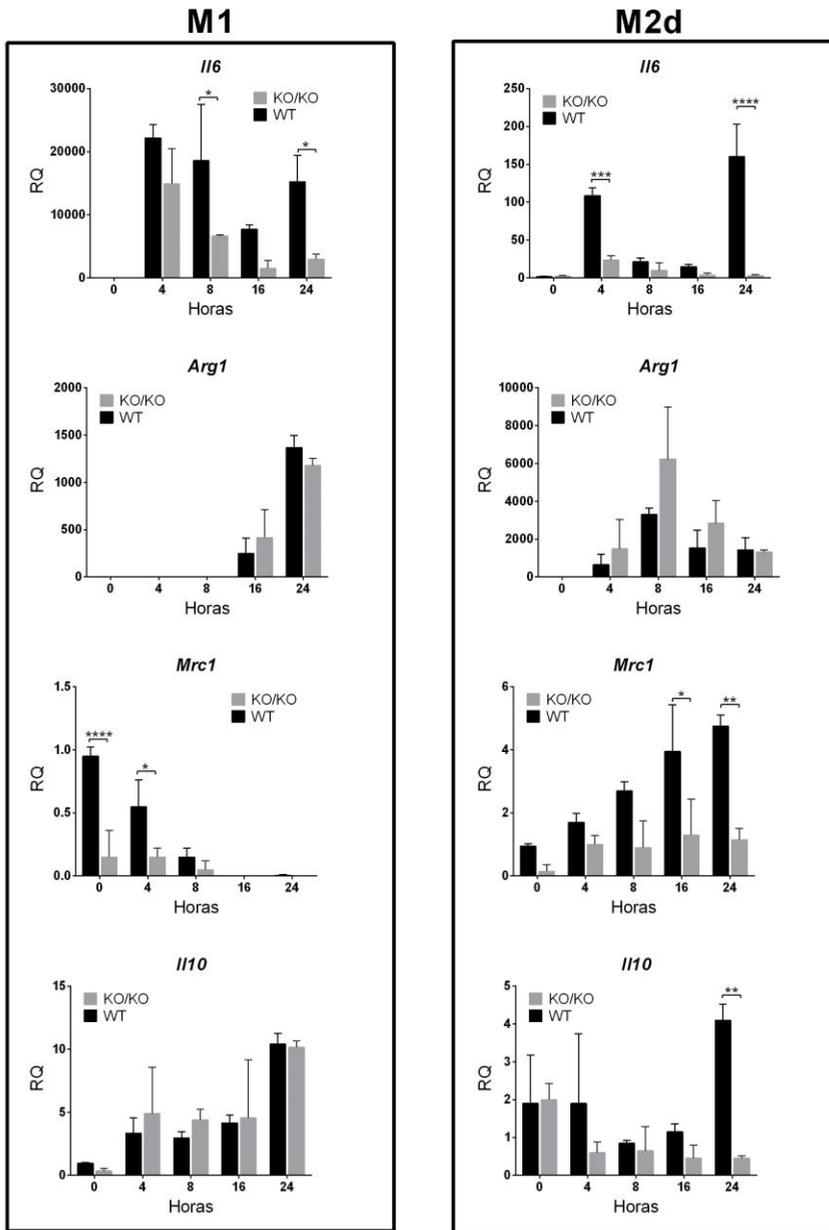
En la línea de los resultados obtenidos con macrófagos RAW264.7, la expresión de GPBP en BMDM aumentaba en la polarización M2d y no en la M1. El análisis también confirmó el carácter

*knockout* de los macrófagos, al no detectarse ninguna señal con la sonda específica de *Col4a3bp-1* (**Fig. 22**).

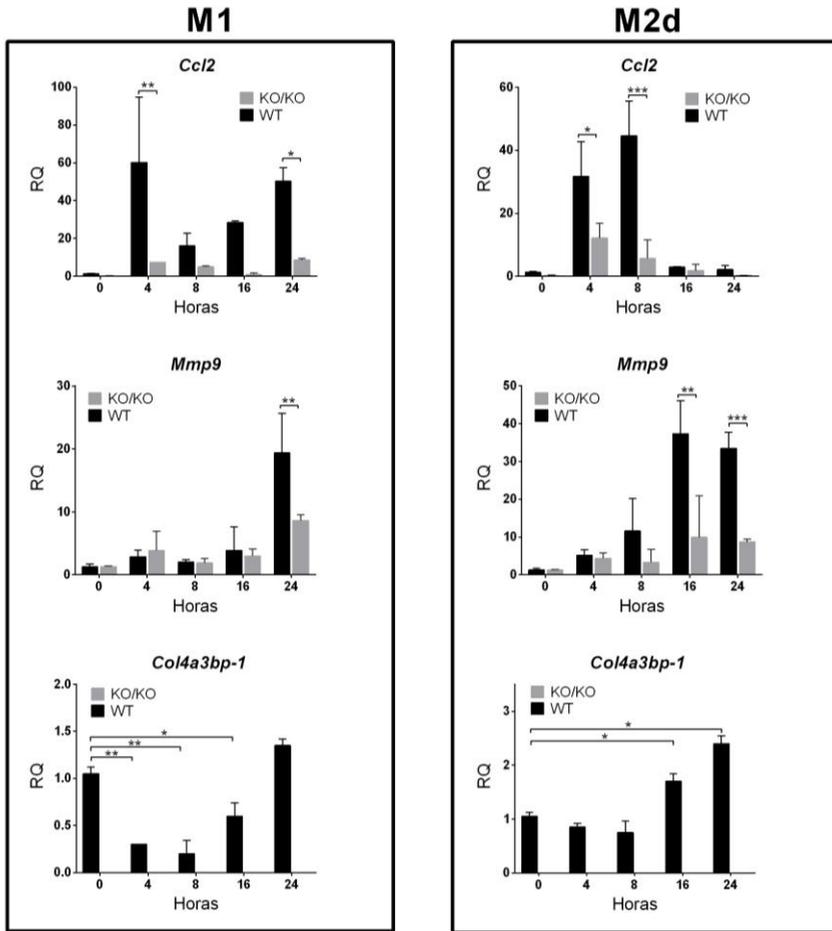
El fenotipo M2d es el que define a los TAM. Los factores secretados por las células tumorales inducen un fenotipo M2 característico (M2d), donde se combina la expresión de factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios para favorecer la progresión tumoral. Los resultados muestran que la ausencia de GPBP inhibía la polarización M2d, sugiriendo que GPBP participa en la interacción entre sistema inmune y células tumorales que favorece la progresión de la enfermedad. En este sentido, aprovechando la disponibilidad de T12, un compuesto que inhibe cGPBP producida por las células tumorales después de EMT (ver resultados preliminares), hemos tratado co-cultivos de 4T1 y macrófagos RAW 264.7 (**Tabla 5**). El tratamiento de los co-cultivos puso de manifiesto que T12 inhibía la polarización M2d (anti-inflamatorio pro-tumoral) y promovía la polarización M1 (pro-inflamatorio anti-tumoral). Estos resultados ponían de manifiesto que las células tumorales adquirirían un fenotipo EMT que producía cGPBP que induce la polarización del macrófago a M2d o TAM.



**Figura 20. Los BMDM  $GPBP^{-/-}$  no se polarizan a M2d.** Los BMDM de ratones *wt* y  $GPBP^{-/-}$  se estimularon con LPS y  $IFN\gamma$  (M1) o medio condicionado de células 4T1 (M2d) y se analizó la expresión y tiempos indicados. Estadística: ANOVA-2 vías y Sidak ( $n = 2$ ). Se comparan los valores de ambos genotipos en cada tiempo analizado.



**Figura 21. Los BMDM GPBP<sup>-/-</sup> no se polarizan a M2d.** Los BMDM de ratones wt y GPBP<sup>-/-</sup> se estimularon con LPS y IFN $\gamma$  (M1) o medio condicionado de células 4T1 (M2d) y se analizó la expresión y tiempos indicados. Estadística: ANOVA-2 vías y Sidak (n = 2). Se comparan los valores de ambos genotipos en cada tiempo analizado.



**Figura 22. Los BMDM GPBP<sup>-/-</sup> no se polarizan a M2d.** Los BMDM de ratones wt y GPBP<sup>-/-</sup> se estimularon con LPS y IFN $\gamma$  (M1) o medio condicionado de células 4T1 (M2d) y se analizó la expresión los genes y tiempos indicados. Estadística: *Ccl2* y *Mmp9*: se comparan los valores de ambos genotipos en cada tiempo analizado utilizando el test ANOVA-2 vías y Sidak (n = 2). *Col4a3bp-1*: se comparan los valores de los distintos tiempos con el primero (0 h, sin estimular) utilizando el test ANOVA-1 vía y Sidak.

**Tabla 5. T12 impide la polarización M2d en co-cultivos de macrófagos RAW 264.7 y células 4T1.** Se muestra la expresión de los genes indicados en los correspondientes cultivos o co-cultivos que se incubaron durante 4 días. La proporción de células al inicio del cultivo es de 1:4 (RAW264.7:4T1). T12 se utilizó a 50  $\mu$ M.

RQ	<i>Mmp9</i>	<i>Il1b</i>	<i>Arg1</i>	<i>Il6</i>	<i>Nos2</i>
RAW 264.7	1	1	1	1	1
4T1	33	2	8	64	24
4T1 + RAW 264.7	85	243	717	41	18
4T1 + RAW 264.7 + T12	10	1243	76	48	25

## 2. cGPBP EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER METASTÁSICO: BALB/c-4T1

Nos propusimos analizar la producción de cGPBP y analizar su papel en la formación de tumores secundarios o metástasis.

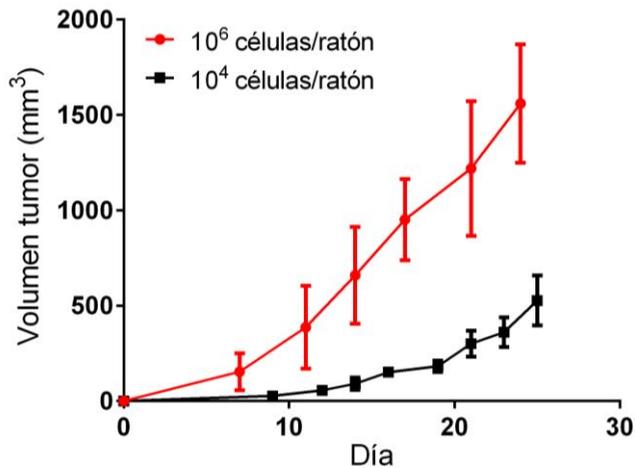
En una primera aproximación recurrimos al modelo BALB/c-4T1, un modelo murino de cáncer de mama metastásico, singénico y ortotópico. Además, los ratones utilizados son inmunocompetentes, una condición necesaria para el estudio de la producción de cGPBP.

### 2.1. Caracterización del modelo murino de cáncer de mama BALB/c-4T1

Se llevaron a cabo una serie de estudios piloto con objeto de caracterizar el modelo. Se realizaron diferentes ensayos, inoculando distintas cantidades de células 4T1 en cada ratona:  $10^4$  (Luo *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2012) y  $10^6$  (Hiraga *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2008). Las células se inocularon en el panículo adiposo mamario de ratonas BALB/c de 4-5 semanas de edad (día 0) y se monitorizó el crecimiento tumoral durante

28 días (**Fig. 23**). En los ensayos se sacrificaron animales a distintos tiempos con el fin de obtener el volumen y calidad de plasma necesario para su correcto análisis inmunológico. El análisis *post-mortem* de los tejidos nos permitió determinar la aparición de nódulos metastásicos visibles en tejidos secundarios, y caracterizar con mayor detalle el transcurso de la enfermedad en este modelo. En cualquier caso, los animales alcanzan los criterios de punto final en torno al día 28 debido a la rápida y agresiva progresión del tumor.

Los tumores empezaban a ser palpables el día 7 y lo eran en todos los ratones a partir del día 10.



**Figura 23. Crecimiento del tumor primario en el modelo de cáncer metastásico BALB/c-4T1.** Se muestra el volumen del tumor primario en los tiempos indicados después de la inoculación de las células 4T1.

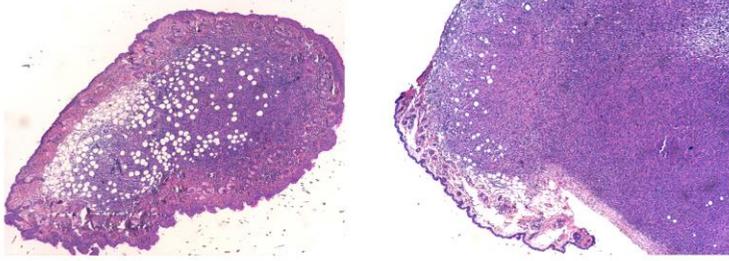
El análisis histoquímico confirmaba que los tumores primarios están formados por células muy poco diferenciadas, que se localizaban en el pániculo adiposo de la mama envueltos por la epidermis que delimita el tejido mamario (**Fig. 24 A y B**). También se observaron infiltrados inflamatorios en respuesta al tumor. El tumor de 7 días estaba infiltrado por células mieloides (polimorfonucleares y monocitos/macrófagos, **Fig. 24 C**) y el tumor de 10 días por células linfoides (**Fig. 24 D**). Esto último se acompañaba de la aparición de células tumorales con aspecto mesenquimal (**Fig. 24 D**). También se observaron zonas necróticas en el interior de los tumores de más de 10 días (no se muestra), probablemente consecuencia de un rápido crecimiento que se acompaña de una irrigación deficiente.

El pulmón es el primer tejido que alcanzan las células metastásicas 4T1 en el 95% de los casos (Amer, 1982; Kamby *et al.*, 1987; Tomin y Donegan, 1987; Rutgers *et al.*, 1989; Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 1998). Se confirmó la aparición de nódulos metastásicos visibles en los pulmones a partir del día 17 (**Fig. 24 E y F**).

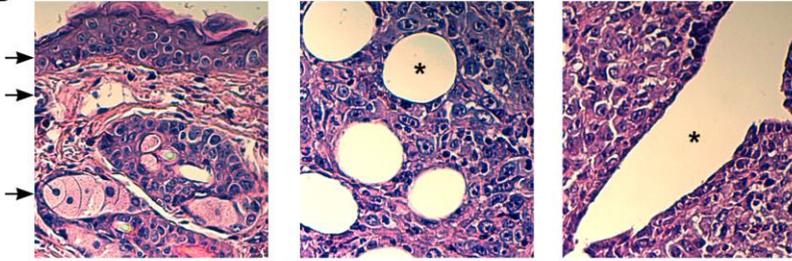
Mediante un PET-TAC se identificaron metástasis en hueso en ratonas de 24 días (**Fig. 25**).

Se ha descrito que las células 4T1 son capaces de metastatizar otros órganos como hígado o cerebro. En este ensayo de 28 días únicamente se observaron macrometástasis en pulmón y hueso, por lo que es probable que la metástasis en otros tejidos requiera un periodo de tiempo más largo.

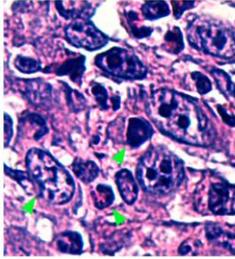
**A**



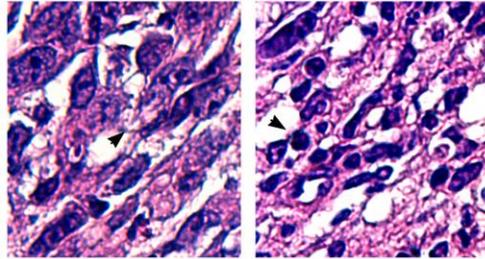
**B**



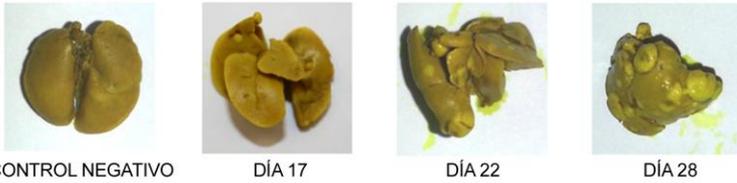
**C**



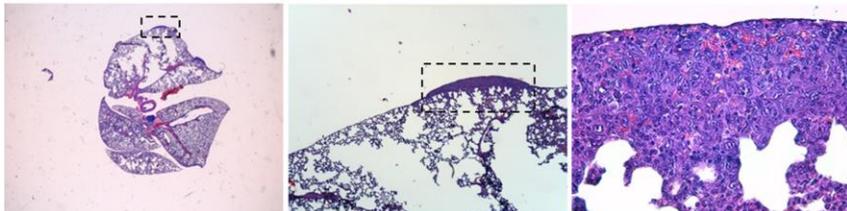
**D**



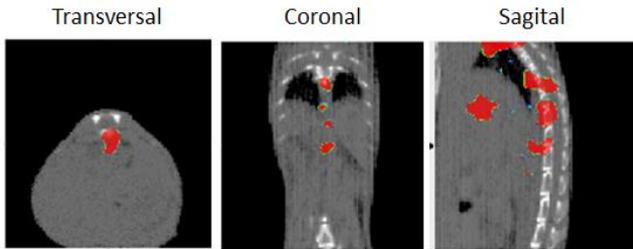
**E**



**F**

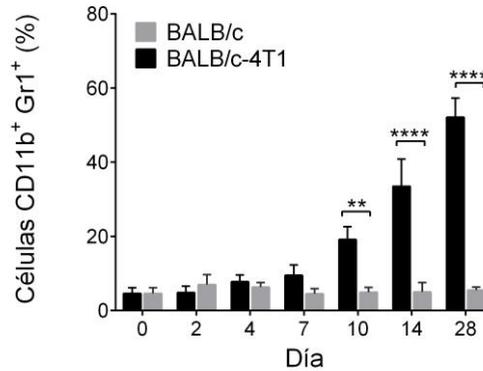


**Figura 24. Análisis histoquímico del tumor primario y de las metástasis pulmonares en el modelo BALB/c-4T1.** (A-D) Tinción HE de tumores primarios del modelo BALB/c-4T1. (A) *Izquierda*, tumor de 7 días. Se observa el tumor localizado en el pániculo adiposo de la mama (células claras), rodeado de la epidermis, lo que demuestra que se ha implantado correctamente. *Derecha*, tumor de 10 días. El tumor aumenta considerablemente de tamaño y el tejido adiposo se retrae, ocupando menos espacio. (B) Se muestra detalles de la localización subcutánea del tumor, en el pániculo adiposo de la mama. *Izquierda*, detalle de la piel en el que puede observar (flechas de arriba a abajo) la epidermis, la dermis y una glándula sebácea. *Centro*, adipocitos (asterisco) rodeados de células tumorales. *Derecha*, células tumorales rodeando un ducto mamario (asterisco). (C) Los infiltrados mieloides son mayoritarios en un tumor de 7 días. Se indican con flechas verdes una célula tumoral (*izquierda*), un polimorfonuclear (*derecha abajo*) y un monocito/macrófago (*derecha arriba*). (D) *Izquierda*, en el tumor de 10 días aparecen células tumorales con aspecto mesenquimal (*flecha*). *Derecha*, los infiltrados linfoides (*flecha*) son mayoritarios en un tumor de 10 días, junto con algunas zonas de necrosis (no se muestra). (E) Metástasis macroscópicas en pulmones de ratonas BALB/c-4T1. Se visualizan tiñendo con solución Bouin y son apreciables a partir del día 17. (F) Tinción HE de un pulmón de una ratona BALB/c-4T1 que presenta una metástasis (recuadro, ampliado en 40x).



**Figura 25. Metástasis óseas en el modelo BALB/c-4T1.** Las imágenes se obtuvieron mediante PET-TAC en una ratona inoculada con células tumorales después de 24 días. La emisión PET (glucosa radiactiva, colores) está superpuesta con la imagen TAC (grises). Se observan cuatro nódulos tumorales en la columna vertebral del ratón. La 5ª señal que se observa en el corte sagital se corresponde a la captación “natural” (no patológica) de glucosa por parte del corazón.

Durante el transcurso de la enfermedad se producía una granulocitosis creciente significativa a partir de los 10 días (**Fig. 26**), que se acompaña de esplenomegalia y de aumentos de los niveles plasmáticos en sangre de citoquinas y factores de crecimiento (**Fig. 27 y 28**).



**Figura 26. Granulocitosis progresiva en el bazo de ratonas BALB/c-4T1.** Se muestra el aumento de esplenocitos CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> determinado mediante citometría de flujo. Estadística: ANOVA-2 vías y Sidak. Se comparan los valores de ratones inoculados y control en cada tiempo analizado.

Para caracterizar mejor la respuesta inmune frente al tumor se analizaron los niveles de proteínas en plasma relacionadas con esta respuesta (**Fig. 27 y 28**). Concretamente el factor de crecimiento G-CSF, las citoquinas TNF- $\alpha^3$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-15, IL-5, IL-1 $\alpha$  y IL-13, las quimioquinas KC, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, RANTES, IP-10 y MIG, y la proteína proMMP-9. Se analizaron los plasmas de los ensayos piloto con 10<sup>4</sup> y 10<sup>6</sup> células inoculadas y los resultados en ambos casos fueron similares.

<sup>3</sup> No se detectó TNF- $\alpha$  en ninguna de las muestras analizadas. No se muestra.

Con el transcurso de la enfermedad aumentan los niveles de G-CSF, proMMP-9, IP-10 y MCP-1 (CCL2). IP-10 aumenta de forma abrupta a partir del día 17. Es una quimioquina secretada por células monocíticas en respuesta a IFN $\gamma$  y cuyas células diana son mayoritariamente los linfocitos T activados (Farber, 1997). Las proteínas G-CSF, proMMP-9, y MCP-1 aumentaron de forma progresiva desde la inoculación de las células tumorales. G-CSF es un factor de crecimiento que estimula la granulocitosis promoviendo la aparición de MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) en el modelo BALB/c-4T1 (Kowanetz *et al.*, 2010; Waight *et al.*, 2011). Y recordemos que proMMP-9 es el precursor de MMP-9, una enzima que degrada la matriz extracelular y que favorece la migración e invasión de las células tumorales en cáncer de mama (Mehner *et al.*, 2014), mientras que MCP-1/CCL2 es una quimioquina que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos y es clave en el desarrollo de metástasis en el modelo BALB/c-4T1 (Yoshimura *et al.*, 2013).

Otras proteínas, en cambio, varían su concentración sólo de forma puntual, no existe un aumento constante, sino que se producen picos. Los niveles plasmáticos de las quimioquinas MIG, MIP-1 $\alpha$ , RANTES o KC, y las citoquinas IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-13, presentan este patrón. Niveles elevados de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-13 en plasma de ratonas BALB/c-4T1 se asocian a progresión tumoral y metástasis (Jovanovic *et al.*, 2014). La citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\alpha$ , tiene idénticas funciones que IL-1 $\beta$ , y también participa activamente en la carcinogénesis (Apte *et al.*, 2006; Bunt *et al.*, 2006). RANTES, MIP-1 $\alpha$  y KC son quimioquinas potentes que atraen leucocitos a las zonas de inflamación (De Filippo *et al.*, 2008; Kobayashi, 2008; Aldinucci y

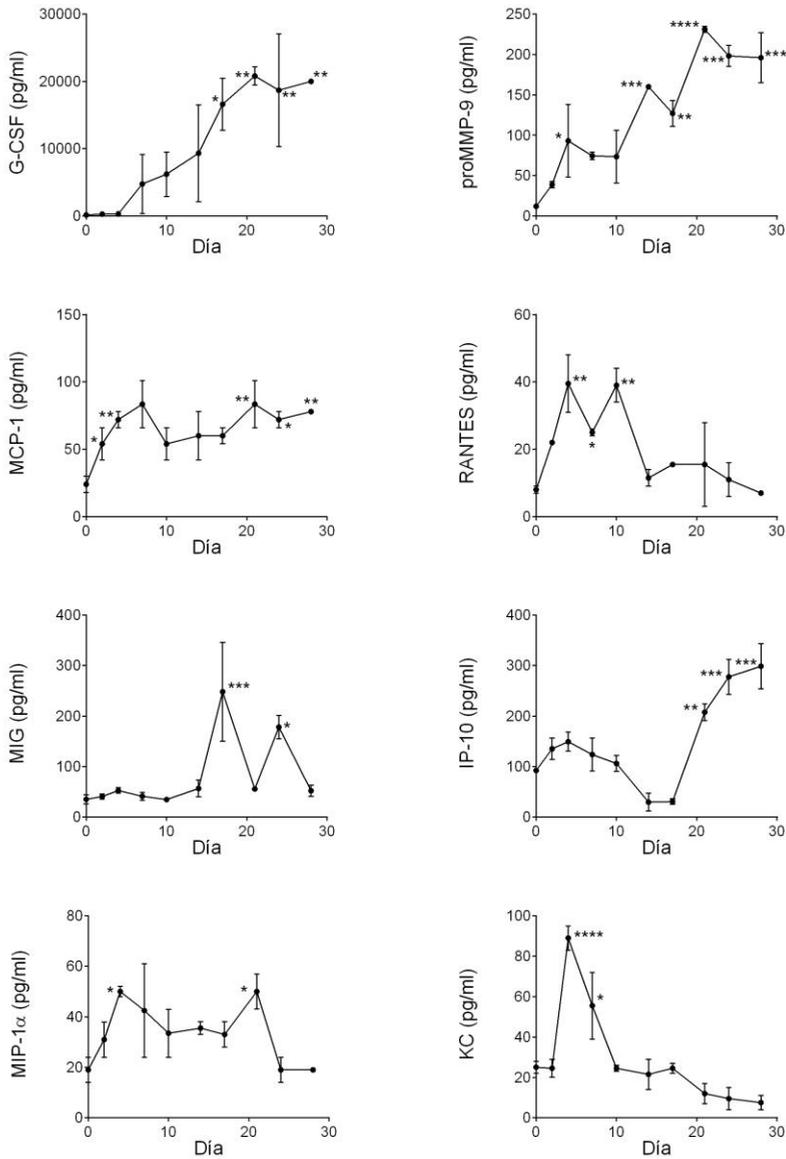
Colombatti, 2014). MIG está relacionada con IP-10, ya que también es una quimioquina inducida por IFN- $\gamma$  y cuyas células diana son los linfocitos T activados (Farber, 1997).

Otras citoquinas como IL-5 e IL-15 no varían sus niveles en plasma hasta pasados 10 días. IL-5 es secretado por linfocitos Th2 y sus principales células diana son los linfocitos B y los eosinófilos; se ha demostrado que participa activamente en la migración de células tumorales (Lee *et al.*, 2013). IL-15 es una citoquina pro-inflamatoria que induce la activación de células T de memoria y células NK, con actividad anti-tumoral (Waldmann, 2013).

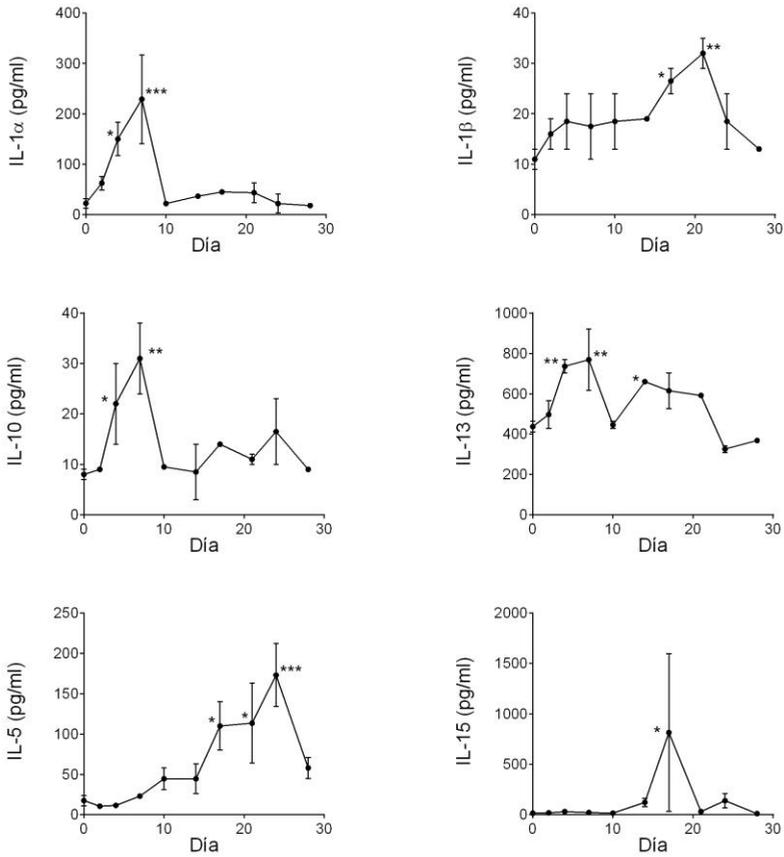
Las diferencias en los patrones de secreción de las proteínas analizadas reflejan numerosas interacciones biológicas complejas. Existen diversos factores que influyen en la detección *in vivo* como: 1) la fuente de producción (células tumorales o estroma); 2) su utilización, que reduce su disponibilidad; y 3) los sitios de actuación (local o sistémica).

Aunque la cinética plasmática es diferente, todas estas proteínas se relacionan con el desarrollo de la enfermedad. Observando la secreción de las proteínas podemos establecer dos fases: 1) desde el día 0 hasta el día 10, donde se perfilan picos de secreción de RANTES, MIP-1 $\alpha$ , KC, IL-1 $\alpha$ , IL-10 e IL-13; y 2) desde el día 10 en adelante, donde aparecen aumentos de otras proteínas como IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-15, MIG o IP-10 y se describen nuevos picos de IL-13, RANTES y MIP-1 $\alpha$ . Estas observaciones concuerdan con la aparición de tumores palpables a partir de los días 7-10 y los procesos de granulocitosis y esplenomegalia que comienzan a partir del día 10.

Las células 4T1 expresan G-CSF, KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES (DuPré *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2009; Kowanetz *et al.*, 2010), lo que muestra la importancia de la atracción de las células del sistema inmune (quimiotaxis) para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales. Además, co-cultivos de células 4T1 y macrófagos M2 inducen la liberación de G-CSF, IL-1 $\alpha$ , IP-10, KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES (Cho *et al.*, 2012), proteínas que también registran aumentos en el plasma de las ratonas BALB/c-4T1, lo que sugiere que se estaría produciendo una respuesta M2d en este modelo.



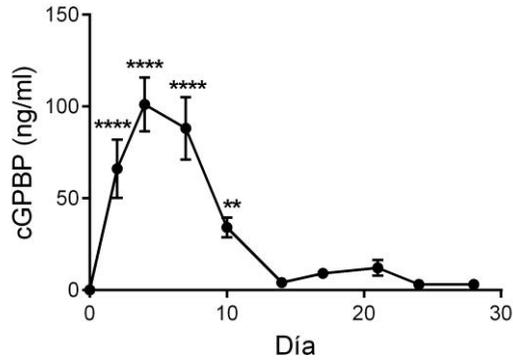
**Figura 27. Evolución de los niveles plasmáticos de quimioquinas, factores de crecimiento y proMMP-9 en ratonas BALB/c-4T1.** Se inocularon  $10^4$  células por ratona. Se muestran los niveles plasmáticos de las quimioquinas y días indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher ( $n = 2$ ). Se comparan los valores de los distintos tiempos con el tiempo 0 (ratona sana). Se obtuvieron resultados similares en un ensayo inoculando  $10^6$  células ( $n = 4$ ).



**Figura 28. Evolución de los niveles plasmáticos de citoquinas en el modelo de cáncer metastásico BALB/c-4T1.** Se inocularon  $10^4$  células por ratona. Se muestran los niveles plasmáticos de las citoquinas y días indicados. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher ( $n = 2$ ). Se comparan los valores de los distintos tiempos con el tiempo 0 (ratona sana). Se obtuvieron resultados similares en un ensayo inoculando  $10^6$  células ( $n = 4$ ).

## 2.2. cGPBP aumenta en ratonas BALB/c-4T1

Se determinaron los niveles de cGPBP en el plasma de los ratones de los ensayos piloto (**Fig. 29**) caracterizados en el apartado 2.1.



**Figura 29. Niveles plasmáticos de cGPBP en el modelo de cáncer metastásico BALB/c-4T1.** Se muestran los niveles de cGPBP analizados en el plasma de ratonas enfermas a distintos días utilizando N27 como anticuerpo de detección. Se muestra el ensayo con  $10^4$  células pero se obtuvieron resultados similares inoculando  $10^6$  células. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher ( $n = 2$ ). Se comparan los datos de los distintos días con el tiempo 0 (ratona sana).

Se observaba un aumento de los niveles de cGPBP inmediatamente después de la inoculación de las células tumorales, que alcanzaba un máximo entorno al día 5 y los niveles disminuían hasta llegar a niveles basales. La elevación transitoria de cGPBP se producía antes de la aparición de metástasis visibles en los pulmones e independientemente del número de células inoculadas por ratón (**Fig. 29**).

Los resultados muestran que los niveles de cGPBP están regulados en un modelo murino de cáncer de mama metastásico y

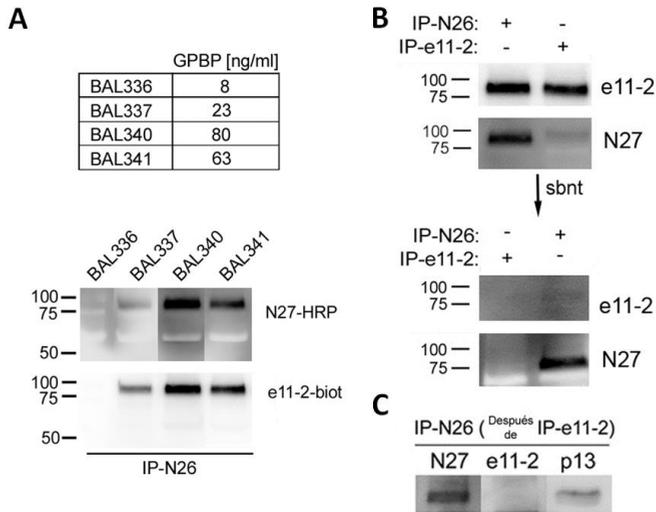
sugieren que cGPBP podría ser un biomarcador que anticipa la aparición de metástasis.

### 2.3. Caracterización de cGPBP en el modelo BALB/c-4T1

Para validar nuestro ELISA, analizamos cGPBP en una selección de plasmas de ratones BALB/c-4T1 mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo de captura (N26) y análisis de los inmunoprecipitados mediante *western blot* con los anticuerpos de detección (N27 y e11-2). Comprobamos que existe una buena correlación entre los resultados del ELISA y las inmunoprecipitaciones (**Fig. 30 A**).

Además, se describieron dos isoformas inmunorreactivas de cGPBP (**Fig. 30 B y C**). Con sefarosa-N26 se extraía un polipéptido que reaccionaba con N27 y e11-2. En cambio, con sefarosa-e11-2 el polipéptido extraído sólo reaccionaba con e11-2 y no con N27. Indicando que en el sobrenadante de la inmunoprecipitación debía contener un polipéptido reactivo con N27, lo que se confirmó mediante una segunda inmunoprecipitación con sefarosa-N26. El polipéptido extraído no reaccionaba con e11-2 en *western blot*, aunque su tamaño era virtualmente idéntico al extraído con e11-2 y apenas se podían distinguir con el material primariamente inmunoprecipitado con sefarosa-N26 y detectado secuencialmente con los anticuerpos.

Estos resultados mostraban la existencia de al menos dos isoformas inmunorreactivas de cGPBP, una N26<sup>+</sup>N27<sup>+</sup>e11-2<sup>-</sup> (en adelante N27<sup>+</sup>) y otra N26<sup>+</sup>N27<sup>-</sup>e11-2<sup>+</sup> (en adelante e11-2<sup>+</sup>). La reactividad diferencial entre las isoformas de cGPBP no podía ser atribuido a factores estructurales conformacionales, sino más bien a algún tipo de modificación post-traducciona en el epítipo o en residuos próximos.



**Figura 30. Caracterización de cGPBP del plasma de ratonas BALB/c-4T1.** (A) *Arriba*, en la tabla se muestran los niveles de cGPBP determinados mediante ELISA utilizando mAb N27-HRP como anticuerpo de detección, en los plasmas de los ratones indicados. *Abajo*, se muestra el análisis mediante *western blot* revelado de forma seriada con los anticuerpos indicados, del material inmunoprecipitado (IP) con sefarosa-N26 en los mismos plasmas. (B) Se muestra el análisis mediante *western blot* con los mAb indicados del material IP de forma consecutiva con sefarosa-N26 y sefarosa-e11-2 y viceversa. La segunda IP se hace con el sobrenadante (sbnt) de la primera IP. (C) Se muestra un *western blot* analizado con los anticuerpos indicados, del material IP con sefarosa-N26 a partir del sobrenadante de un plasma que se había extraído primero con sefarosa-e11-2. El anticuerpo p13 reconoce el péptido que codifica el exón XI de GPBP.

Un análisis adicional con un anticuerpo policlonal específico del exón XI (p13 en **Fig. 30 C**) mostraba que el polipéptido N27<sup>+</sup> contenía los 26 residuos del exón XI característicos de GPBP.

Mediante análisis proteómico y *western blot* comprobamos que las células cancerosas de naturaleza mesenquimal A427 secretan al medio de cultivo la isoforma N27<sup>+</sup> mientras que las células A549 de naturaleza epitelial secretaban e11-2<sup>+</sup> (no se muestra).

## **2.4. El sistema inmune participa en la producción de cGPBP en respuesta a la inoculación de células 4T1**

Las células tumorales producen cGPBP y los macrófagos secretan cGPBP cuando son polarizados por las células tumorales. En este contexto nos propusimos estudiar la participación del sistema inmune en la producción de cGPBP *in vivo*.

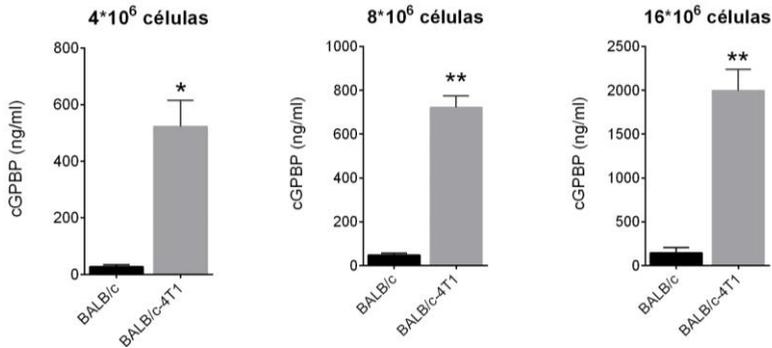
### **2.4.1. Los esplenocitos de ratones BALB/c con cáncer metastásico secretan cGPBP**

Se analizó la producción de cGPBP por parte de células del sistema inmune aisladas de ratonas BALB/c-4T1, que se extrajeron del bazo con un tumor primario de 28 días. El bazo es un órgano linfoide que alberga diversos tipos celulares del sistema inmune. Es de fácil acceso y tiene un gran tamaño. El bazo se procesó para aislar esplenocitos que se caracterizaron mediante citometría de flujo: 48% granulocitos CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>, 2% monocitos/macrófagos CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, 7% linfocitos B CD19<sup>+</sup>, 10% linfocitos Th CD4<sup>+</sup>, 9% linfocitos Tc CD8<sup>+</sup>; se cultivaron y a las 24 h se recogió el medio y se midió cGPBP (**Fig. 31**).

Los resultados muestran que los esplenocitos de ratonas con cáncer de mama producen más cGPBP que los esplenocitos de ratonas control sanas, sugiriendo que son una fuente de cGPBP plasmático.

En este modelo animal se produce una esplenomegalia caracterizada por un aumento drástico de poblaciones celulares CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> (granulocitosis) (**Fig. 26**). Por tanto, la población de esplenocitos de ratonas sanas es muy diferente a la de las ratonas enfermas. El aumento de los niveles de cGPBP y la granulocitosis

sugieren que el tumor induce a: 1) las células del sistema inmune de ratones enfermos a producir cGPBP; y/o 2) diferenciarse en células productoras de cGPBP.



**Figura 31. Los esplenocitos de ratonas con cáncer de mama secretan cGPBP.** Análisis de cGPBP utilizando mAb N27 como anticuerpo de detección. Se cultivaron esplenocitos provenientes de ratonas sanas y ratonas con tumores de 28 días. Se realizaron tres cultivos diferentes, con distintas cantidades de esplenocitos, y se recogió medio después de 24 h. Estadística: t de Student (n = 2).

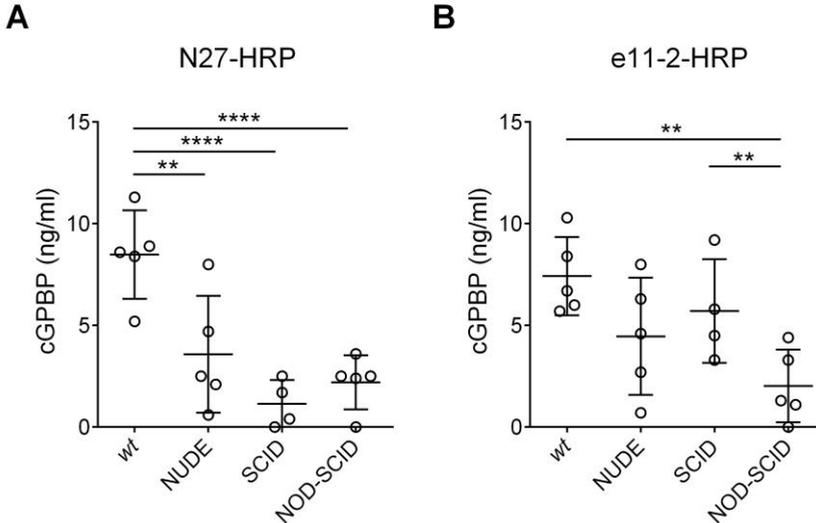
#### **2.4.2. La inmunocompetencia es un requerimiento para que el tumor induzca los niveles de cGPBP**

Para confirmar la participación del sistema inmune en el aumento de los niveles de cGPBP en respuesta al tumor, el modelo 4T1 se realizó usando cepas de animales con distinto grado de inmunosupresión: *wild type*, NUDE, SCID y NOD-SCID.

Los ratones NUDE se caracterizan por la presencia de una mutación autosómica recesiva que produce aplasia del timo y carecen de linfocitos T. Los ratones SCID poseen una mutación autosómica recesiva que impide la diferenciación de los linfocitos, T y B. Finalmente,

los ratones NOD/SCID poseen la misma mutación que los ratones SCID, pero el fondo genético de estos animales es diferente. Se trata de un fondo genético NOD (*non-obese diabetic*) que se caracteriza por funciones deficientes de células presentadoras de antígenos, células mieloides y células NK. Estas tres cepas poseen diferente grado de inmunodepresión, siendo NUDE la que menor grado presenta y NOD/SCID la que mayor grado presenta.

Se inocularon células 4T1 en 5 hembras de cada genotipo. En el 5º día se sacrificaron y se analizaron los niveles de cGPBP (**Fig. 32**). Los plasmas se analizaron con mAb N27 y mAb e11-2 como anticuerpos de detección.



**Figura 32. Niveles de cGPBP en plasma en ratones enfermos con diferente grado de inmunosupresión.** Se muestra los niveles plasmáticos de cGPBP en el 5º día después de la inyección de las células 4T1. Se inocularon  $10^4$  células en el pániculo adiposo mamario de ratonas wt, NUDE, SCID y NOD-SCID. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher, se comparan todos los valores por pares.

Las ratonas *wt* mostraron los niveles más altos de cGPBP, reactivo con ambos anticuerpos. Cualquier grado de inmunosupresión redujo significativamente los niveles de cGPBP N27<sup>+</sup>. La disminución de cGPBP e11-2<sup>+</sup> requería de una deficiencia en las células presentadoras de antígenos, células mieloides y NK, sugiriendo que el sistema inmunitario interviene de forma desigual en la producción de las isoformas reactivas de cGPBP: más en la producción de cGPBP N27<sup>+</sup> que en la producción de cGPBP e11-2<sup>+</sup>. En cualquier caso, los resultados ponían de manifiesto que el sistema inmune participa activamente regulando los niveles de cGPBP en respuesta al tumor.

Las células tumorales 4T1 desarrollan un tumor primario de crecimiento exponencial en ratones inmunodeprimidos (Tao *et al.*, 2008). Esta característica igualaba la participación de las células 4T1 en los distintos genotipos, aunque no descartaba la posibilidad de que la respuesta inmune regule la secreción de GPBP por parte del tumor.

Este tipo de análisis no determinaba el origen de cGPBP, pero sí la participación de distintos componentes del sistema inmune en la respuesta. Las ratonas del fenotipo NOD-SCID no consiguieron elevar los niveles de cGPBP y las ratonas SCID, que carecen de linfocitos T y B maduros, respondían a la inoculación de las células 4T1 con un aumento selectivo de la isoforma e11-2<sup>+</sup> de cGPBP.

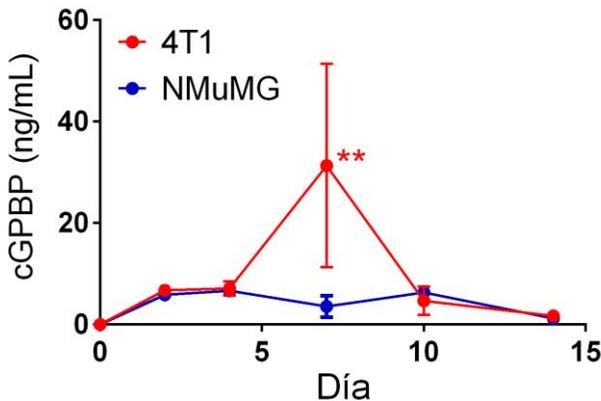
## **2.5. Las células que no forman tumores no inducen la secreción de cGPBP**

El organismo reacciona frente a la inoculación de células 4T1 y no frente a la inoculación de PBS, pero se desconocía si reaccionaba de la misma forma frente a células no tumorales.

Recurrimos a las células NMuMG epiteliales que no forman tumores, procedentes de la glándula mamaria de un ratón (Owens, 1974). Se han usado como línea celular “control” en ensayos con células 4T1 (Shi *et al.*, 2015; Solár *et al.*, 2016).

Se inocularon ratonas BALB/c con células 4T1 y NMuMG el mismo día y se determinaron los niveles de cGPBP a diferentes días (**Fig. 33**).

La inoculación de las células NMuMG no dio lugar al desarrollo de ningún tumor palpable. Las ratonas no presentaron ninguna alteración aparente, y los niveles de cGPBP no aumentaron.



**Figura 33.** Niveles de cGPBP en ratonas BALB/c inoculadas con células 4T1 y NMuMG. Se representan los niveles plasmáticos de cGPBP N27<sup>+</sup> en ratonas BALB/c inoculadas con las células indicadas ( $10^4$ ). Estadística: ANOVA-2 vías y Tukey (n = 4).

Además, mientras que las ratonas BALB/c-4T1 presentaron la granulocitosis característica, las ratonas inoculadas con células NMuMG no mostraron ninguna alteración de las poblaciones de células del

sistema inmune del bazo y de la médula ósea, ninguno de los días analizados en el ensayo (resultados no mostrados).

Sólo las células tumorales inducían la producción de cGPBP en el organismo, lo que dependía, al menos en parte, de la respuesta inmune que activaba el tumor.

En conjunto, los resultados sugieren que cGPBP es un efector del tumor y de la respuesta inmune que éste provoca (**Figs. 32 y 33**). Los niveles plasmáticos de cGPBP aumentan de forma temprana (**Fig. 29**) junto con quimioquinas como MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$  y KC, la proteasa MMP-9 (**Fig. 27**), y citoquinas como IL-1 $\alpha$ , IL-10 e IL-13 (**Fig. 28**). En la respuesta frente a las células tumorales aparecen dos isoformas de cGPBP, N26<sup>+</sup>N27<sup>-</sup>e11-2<sup>+</sup> y N26<sup>+</sup>N27<sup>+</sup>e11-2<sup>-</sup> (**Fig. 30**). Las células mieloides, que incluyen a los macrófagos, serían una de las fuentes de cGPBP *in vivo* (**Fig. 31**).

### 3. MODELO ANIMAL DE CÁNCER METASTÁSICO: C57BL/6-LLC

El estudio de un único modelo murino inmunocompetente de cáncer limita la proyección de las conclusiones que se obtienen.

Por este motivo, y para profundizar en la relevancia de cGPBP en la progresión tumoral, recurrimos a un segundo modelo de cáncer. El modelo C57BL/6-LLC (B6-LLC) es el único modelo singénico que existe actualmente de cáncer de pulmón (Kellar *et al.*, 2015). La elevada incidencia del cáncer de pulmón y su mal pronóstico hacen que esta

enfermedad sea una de las que tiene mayor importancia en salud pública (Coleman *et al.*, 2008).

En este modelo el sistema inmune también participa en el desarrollo de la enfermedad. En cambio, a diferencia del modelo BALB/c-4T1, no se trata de un modelo ortotópico, sino que las células se inyectan en un tejido diferente del cual provienen (heterotópico). Existen diversos grupos de investigación que utilizan este modelo inoculando las células directamente en pulmón, pero debido a la limitación que plantea este método, se decidió inocular las células subcutáneamente en el dorso. Además, la implantación ortotópica de las células LLC no incrementa la tumorigenicidad (Li *et al.*, 1990) y el proceso de metástasis en este modelo es limitado, localizándose únicamente en los nódulos linfáticos del mediastino (Doki *et al.*, 1999).

Este modelo nos permitió estudiar la contribución de cGPBP del hospedador<sup>4</sup> en la progresión tumoral. En este sentido, nuestro grupo de investigación dispone de ratones *knockout* para el exón XI de *Col4a3bp* (GPBP<sup>-/-</sup>) y ratones transgénicos de GPBP (Tg-mGPBP), ambos en un fondo genético C57BL/6. El modelo BALB/c-4T1 no nos permitía utilizar los ratones B6-GPBP<sup>-/-</sup> ni B6-Tg-mGPBP puesto que dejaría de ser un modelo singénico y las células 4T1 serían rechazadas por el sistema inmune.

---

<sup>4</sup>Se utiliza en parasitología para identificar al organismo que sufre al parásito (que lo “hospeda”). En este caso lo utilizamos para referirnos al ratón que “hospeda” las células tumorales.



pulmones para la observación de macrometástasis ya que es el tejido principal en cual se desarrollan (Storey *et al.*, 2004). Sin embargo, el número de metástasis en los pulmones es mucho menor que en modelo BALB/c-4T1 (**Fig. 34 B**) y se detectan a partir del 25° día.

Hay que destacar que se observó una mayor dispersión en el crecimiento tumoral, en comparación con el modelo BALB/c-4T1. Además, el proceso de metástasis fue menos eficiente, bien sea por: 1) la incapacidad de muchas células LLC de alcanzar el pulmón o 2) el proceso metastásico es más lento y requiere más tiempo. En cualquier caso, la enfermedad de este modelo animal es más errática.

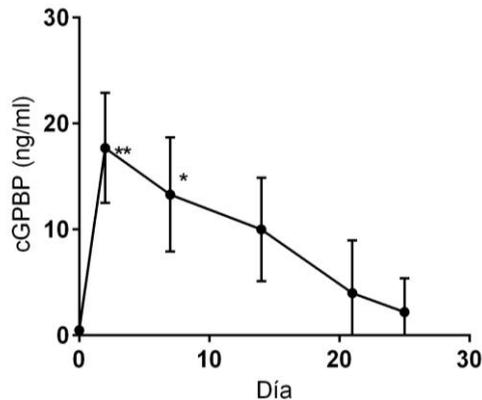
### **3.2. cGPBP en el modelo C57BL/6-LLC**

Para el análisis de cGPBP en plasma se inocularon  $10^5$  células LLC de forma subcutánea y en el flanco derecho de cada ratón, incluyendo hembras y machos. Estos animales se sacrificaron a distintos días después de la inoculación de las células tumorales.

Los resultados mostraron que los niveles de cGPBP aumentan en plasma durante el desarrollo de la enfermedad en este modelo (**Fig. 35**). Los niveles aumentan inmediatamente después de la inyección de las células tumorales, y fueron descendiendo de forma paulatina hasta igualar los niveles de un animal control sano a día 25 post-inyección. Se analizaron los plasmas con mAb N27 y mAb e11-2 y los resultados fueron similares (no se muestra).

Aunque también se observa un incremento de cGPBP transitorio en este modelo, existen algunas diferencias en comparación con el modelo BALB/c-4T1. Por un lado, el aumento y posterior descenso de

cGPBP en B6-LLC es menos acusado, más dilatado en el tiempo. Por otro lado, los niveles eran más heterogéneos en B6-LLC, como también lo es la evolución de la enfermedad.



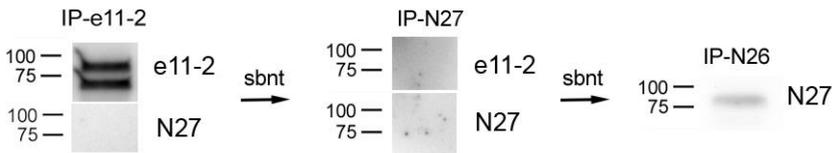
**Figura 35. Niveles plasmáticos de cGPBP en el modelo de cáncer metastásico B6-LLC.** Niveles de cGPBP en los días indicados tras inoculación de  $10^5$  células LLC, utilizando mAb N27 como anticuerpo de detección. Estadística: ANOVA-1 vía y Fisher. Se comparan los valores de los distintos tiempos con el tiempo 0 (ratona sana).

### 3.3. Caracterización de cGPBP en el modelo C57BL/6-LLC

Se realizaron IP de plasmas ratones B6-LLC con dos anticuerpos diferentes (**Fig. 36**). Se realizaron de forma sucesiva, primero con sefarosa-e11-2 y la segunda a partir del sobrenadante de la primera, con sefarosa-N27.

El material inmunoprecipitado se analizó mediante *western blot* utilizando mAb N27 y no se logró visualizar ninguna proteína, en ninguna de las inmunoprecipitaciones. Posteriormente se analizó la misma membrana con mAb e11-2 y se observaron 2 polipéptidos. El de mayor

tamaño (>75 kDa) es similar por tamaño y reactividad a la isoforma de cGPBP e11-2<sup>+</sup> descrita en BALB/c-4T1. La segunda inmunoprecipitación con mAb N27 no precipitó material.



**Figura 36. Análisis mediante *western blot* de inmunoprecipitaciones de plasmas B6-LLC.** Se muestra el material detectado mediante *western blot* de las inmunoprecipitaciones (IP) consecutivas utilizando primero mAb e11-2, segundo mAb N27 y luego mAb N26. Los anticuerpos de detección utilizados fueron mAb e11-2 biotinilado y mAb N27-HRP. En todos los análisis se utilizó como control positivo proteína recombinante GPBP de *E. coli*.

Estos resultados no concordaban con los resultados previos, de forma que la proteína que detectábamos en el ELISA N26/N27 podría estar aún en el sobrenadante. Se decidió realizar una tercera inmunoprecipitación con sefarosa-N26 utilizando el último sobrenadante. Esta tercera inmunoprecipitación nos mostró muy poca proteína, probablemente parte del material se perdió después de tantas manipulaciones.

Los resultados confirman que en el plasma de los ratones B6-LLC contiene las isoformas e11-2<sup>+</sup> y N27<sup>+</sup> de cGPBP que previamente se habían descrito en el modelo BALB/c-4T1. La isoforma e11-2<sup>+</sup> es comparativamente más abundante y se presenta en forma de dos polipéptidos, uno de tamaño esperado (entre 75-100 kDa) y otro relacionado de menor tamaño y origen desconocido.

### 3.4. cGPBP producido por el hospedador promueve la diseminación tumoral

En los siguientes ensayos se utilizaron ratones C57BL/6 con los tres genotipos *wild type*, GPBP<sup>-/-</sup> y Tg-mGPBP.

Se realizaron dos ensayos consecutivos. El primero utilizando 36 ratones, de los cuales 19 eran B6 *wt* (9 hembras y 10 machos) y 17 eran B6-Tg-mGPBP (8 hembras y 9 machos). El segundo utilizando 34 ratones, de los cuales 17 eran B6-GPBP<sup>-/-</sup> (9 hembras y 8 machos) y 17 eran B6 *wt* (6 hembras y 11 machos). En todos los casos se inocularon 10<sup>4</sup> células por ratón en el flanco derecho, por vía subcutánea. Tras 28 días los ratones se sacrificaron y estudiaron.

En el primer ensayo se observó que la sobreexpresión de GPBP no afectó al desarrollo de la enfermedad de forma significativa: no afectó al crecimiento del tumor primario, ni afectó al número de metástasis pulmonares (**Fig. 37**).

En el segundo ensayo la ausencia de GPBP (ratones GPBP<sup>-/-</sup>) dificultó la implantación de las células tumorales y el desarrollo de metástasis (**Fig. 38 A**), pero no afectó al crecimiento de los tumores primarios (no se muestra). La mayoría de ratones GPBP<sup>-/-</sup> no desarrollaron tumor primario y el número de metástasis se vio reducido, aunque no significativamente por la falta de ratones GPBP<sup>-/-</sup> con tumor primario.



Además, se realizó un ensayo adicional con el objetivo de analizar la producción de cGPBP en ratones GPBP<sup>-/-</sup>, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Este ensayo demostró la producción de cGPBP *in vivo* por parte de las células tumorales (**Fig. 38 B**).

Las células LLC expresan y secretan cGPBP pero necesitan cGPBP del hospedador para implantarse y diseminarse eficazmente (tumor primario y metástasis). Cabe destacar que la falta de cGPBP en el hospedador reduce la carga tumoral pero la evidencia indica que una mayor expresión no la aumenta.

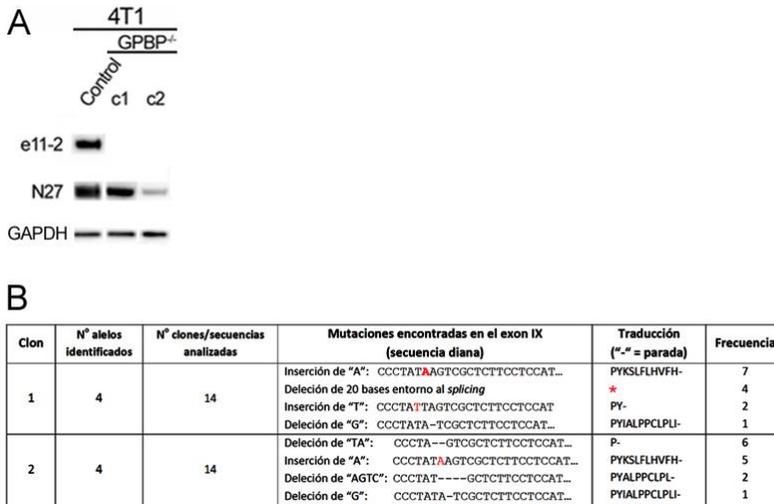
### **3.5. La deficiencia en cGPBP no reduce el crecimiento del tumor**

Los ensayos anteriores no permiten determinar la participación de cGPBP tumoral en la progresión de la enfermedad.

Para estudiar este aspecto recurrimos a la técnica CRISPR/Cas9, que se utiliza para editar el genoma de líneas celulares, con el objetivo de mutar el genoma en el exón XI del gen *Col4a3bp* y obtener células tumorales *knockout* para GPBP. Mediante esta técnica se consiguieron clones *knockout* para GPBP en la línea celular 4T1. El mismo procedimiento se utilizó con células LLC sin éxito.

Los clones se aíslan mediante dilución límite, a partir de una población de células que se ha transfectado con los plásmidos que expresan el ARNg (sonda guía) y Cas9. Los clones de células 4T1-GPBP<sup>-/-</sup> se seleccionaron mediante *western blot*: con mAb e11-2 se comprobó la ausencia de GPBP, y con mAb N27 se comprobó que sí expresaban GPBP-

2 (Fig. 39 A). Finalmente, mediante PCR del genoma y clonado del producto, se analiza el genoma de los 2 clones para comprobar las ediciones introducidas en el exón XI (Fig. 39 B).

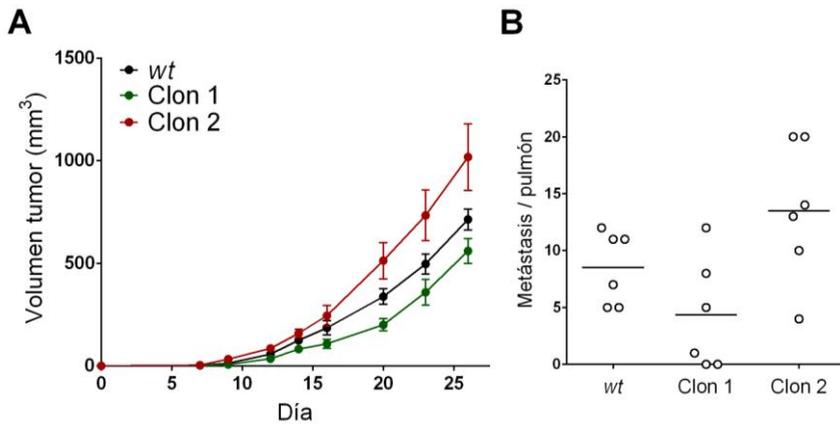


**Figura 39. Caracterización de clones de células 4T1-GPBP<sup>-/-</sup> obtenidas mediante el método CRISPR/Cas. (A)** Análisis mediante *western blot* de la expresión de GPBP (e11-2) y GPBP y GPBP-2 (N27) en los clones 4T1 GPBP<sup>-/-</sup> indicados y en las células 4T1 de las que proceden (Control). **(B)** En la tabla se indican las mutaciones del genoma halladas en los distintos alelos del exón XI de *Col4a3bp* y secuencias adyacentes de los clones mostrados en A. También se indica el número de secuencia analizadas por clon, el número de alelos identificados, su frecuencia y la traducción del exón XI según la pauta de lectura esperada.

La evidencia indicaba que las células 4T1 tienen una duplicación de *Col4a3bp* ya que se identificaron 4 alelos por clon. El clon 1 mostraba una edición diferente al clon 2, uno de sus alelos había perdido el motivo de *splicing* por lo que el exón XI no aparecería en ARNm maduro, es decir, el exón XI no era reconocido como tal y era eliminado como si de una secuencia intrónica se tratara. Además, el Clon 1 mostraba una

expresión mayor de *Col4a3bp* que el clon 2, analizada mediante qPCR (no se muestra).

Se realizó un ensayo con ratonas BALB/c inoculadas con  $10^4$  células de los 2 clones. En este ensayo se inocularon un total de 18 hembras BALB/c, 6 por grupo, incluyendo uno de células *wt*. Se monitorizó el crecimiento del volumen tumoral y a día 28 se sacrificaron todas las ratonas y se analizaron las metástasis pulmonares (**Fig. 40**).



**Figura 40. Una expresión deficiente de cGPBP no reduce la carga tumoral.** Se inocularon ratonas BALB/c con las células 4T1 (*wt*) y los clones 1 y 2 de las células 4T1-GPBP<sup>-/-</sup> ( $10^4$  células/ratona). Se muestra: **(A)** el volumen de los tumores primarios de los grupos de ratones y tiempos indicados; **(B)** el número de metástasis pulmonares superficiales macroscópicas por ratona (círculos) al finalizar el ensayo el 28º día. También se indica el valor medio de cada serie con un segmento. Estadística: **(A)** ANOVA-2 vías y Tukey, y **(B)** test t-Student.

La eliminación de GPBP en las células tumorales no afectaba ni al crecimiento del tumor primario ni al desarrollo de metástasis pulmonares de forma significativa. Sin embargo, un 30% de los animales

tenían los pulmones libres de metástasis en el grupo inoculado con el clon 1 que expresaba niveles de GPBP-2 similares a los de las células control (**Fig. 40 B**).

En conjunto, los resultados sugieren que cGPBP del hospedador participa en diseminación tumoral mientras que la participación de cGPBP del tumor en este proceso no pudo establecerse.

#### **4. GPBP ES UNA DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER**

La inoculación de células tumorales provoca un aumento de los niveles plasmáticos de cGPBP en el que contribuyen el tumor (**Fig. 38**) y la respuesta inmune (**Fig. 32**). Por tanto, cGPBP podría ser una nueva diana terapéutica en cáncer, y los inhibidores de cGPBP fármacos potenciales.

Elegimos el modelo BALB/c-4T1 para determinar si cGPBP es una diana terapéutica y para valorar el potencial farmacológico de los inhibidores de cGPBP, en concreto de T12 y N26.

##### **4.1. mAb N26, un anticuerpo bloqueante de cGPBP, inhibe el crecimiento tumoral y la formación de metástasis**

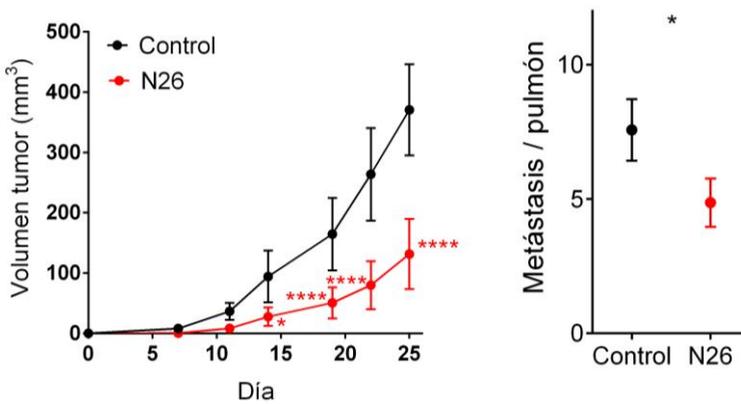
La primera aproximación terapéutica consistió en la utilización del anticuerpo N26 como agente bloqueante de cGPBP.

mAb N26 se había utilizado con éxito como agente terapéutico en modelos animales de lupus nefrítico (Macías, 2014). Además, mAb

N26 es capaz de reconocer en condiciones nativas todas las isoformas de cGPBP detectadas en los modelos murinos de cáncer estudiados.

Se inocularon células 4T1 en el panículo adiposo mamario de ratonas BALB/c y la mitad se trataron con N26 administrando con dosis semanales de 1  $\mu\text{g/g}$  (anticuerpo/peso corporal) mediante una única inyección intraperitoneal.

Las células 4T1 son metastásicas desde el momento de la inoculación, y el aumento de los niveles de cGPBP es casi inmediato, por lo que el tratamiento se inició el mismo día de la inoculación de las células. Los animales se monitorizaron durante 4 semanas y finalmente se sacrificaron el 28<sup>o</sup> día, siguiendo el mismo protocolo de ensayos anteriores.



**Figura 41. N26 reduce el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en el modelo BALB/c-4T1.** Se inocularon ratonas BALB/c con  $10^4$  células 4T1 y se trataron desde el primer día con mAb N26 (1  $\mu\text{g/g}$ -semana, vía intraperitoneal, 1 inyección semanal). Se muestra: (A) el volumen del tumor primario de los grupos de ratones y tiempos indicados; (B) el número de metástasis macroscópicas superficiales en pulmones al finalizar el ensayo el 28<sup>o</sup> día. Estadística: (A) ANOVA-2 vías y Tukey (n = 10), se obtuvieron resultados similares en 2 ensayos adicionales, (B) t-Student (n = 30, correspondiente a 3 ensayos).

Los resultados mostraron que el tratamiento con mAb N26 reduce de forma significativa el crecimiento del tumor (**Fig. 41 A**) y el número de metástasis en los pulmones (**Fig. 41 B**), consiguiendo un 20% de los animales tratados libres de metástasis. Se obtuvieron resultados similares en 3 ensayos independientes.

Estos resultados establecen que cGPBP es una diana terapéutica en cáncer metastásico, y sugieren que anticuerpos monoclonales humanizados derivados de mAb N26 son una posible alternativa terapéutica.

#### **4.2. T12 inhibe el crecimiento tumoral y las metástasis**

La segunda aproximación terapéutica consistió en la administración de T12, un compuesto orgánico que inhibe la actividad cinasa de cGPBP secretada por los fenotipos EMT del tumor, que tiene buenas propiedades toxicocinéticas y que se puede administrar por vía oral (resultados preliminares). El uso de compuestos orgánicos sigue siendo de elección frente a los fármacos de origen biológico, por su bajo coste de producción y porque suelen presentar mejores propiedades fisicoquímicas (p.ej. estabilidad térmica) o farmacocinéticas (p.ej. administración por vía oral).

La administración de T12 en los ensayos toxicocinéticos se hizo por vía oral utilizando sondas gástricas y con una única toma al día (resultados preliminares). Las características farmacocinéticas sugieren que una administración repartida a lo largo del día puede mejorar los efectos farmacológicos de T12, al conseguir unos niveles más constantes en el plasma. Ante la imposibilidad de administrar el compuesto tres veces al día, por los horarios y por el peligro que supone el uso repetido

de una sonda gástrica, optamos por administrar T12 disuelto en el agua de bebida y controlar las dosis medias midiendo el volumen de agua que consumen.

Se realizaron pruebas en animales sanos, y se comprobó que los ratones admiten hasta 0,1 mg/ml en el agua de bebida y a concentraciones superiores dejan de beber, probablemente porque T12 es una sal sódica.<sup>5</sup>

La dosis que reciben las ratonas BALB/c a las que se les administra T12 disuelto a 0,1 mg/ml son aproximadamente de 13 mg/kg-día, muy inferiores a 400 mg/kg-día, la MTD calculada en el ensayo toxicocinético de 8 días.

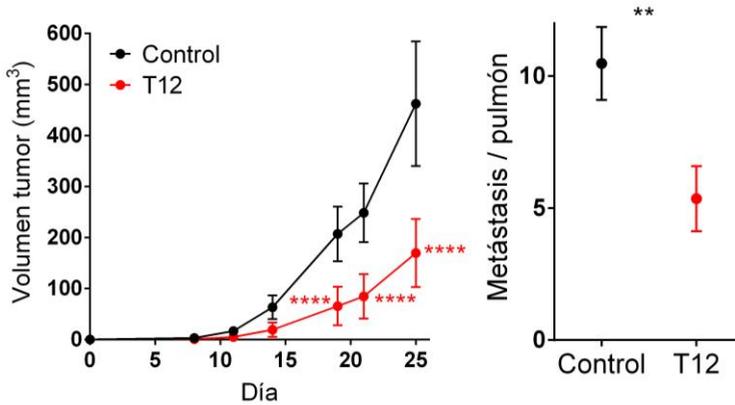
Se trataron ratonas BALB/c-4T1 con T12 desde el primer día. Los animales se monitorizaron durante 4 semanas y finalmente se sacrificaron a día 28, siguiendo los mismos procedimientos que en ensayos anteriores.

El tratamiento con T12 redujo el crecimiento del tumor primario (**Fig. 42 A**) y el número de metástasis pulmonares (**Fig. 42 B**), consiguiendo un 27% de los animales tratados libres de metástasis. Se obtuvieron resultados similares en 3 ensayos independientes.

Los resultados demuestran el potencial terapéutico de T12 para tratar cáncer metastásico.

---

<sup>5</sup> Se puede aumentar la dosis añadiendo sacarosa a la solución.



**Figura 42. T12 reduce el crecimiento del tumor primario y las metástasis de ratonas BALB/c-4T1.** Se inocularon ratonas BALB/c con  $10^4$  células 4T1 y se trataron desde el primer día con T12 (0,1 mg/ml en agua de bebida, ~13 mg/kg-día). Se muestra: (A) el volumen del tumor primario de los grupos de ratones y tiempos indicados; (B) el número de metástasis macroscópicas superficiales en pulmones en el 28º día. Estadística: (A) ANOVA-2 vías y Tukey ( $n = 10$ ), se obtuvieron resultados similares en 2 ensayos adicionales, (B) t-Student ( $n = 30$ , correspondiente a 3 ensayos).

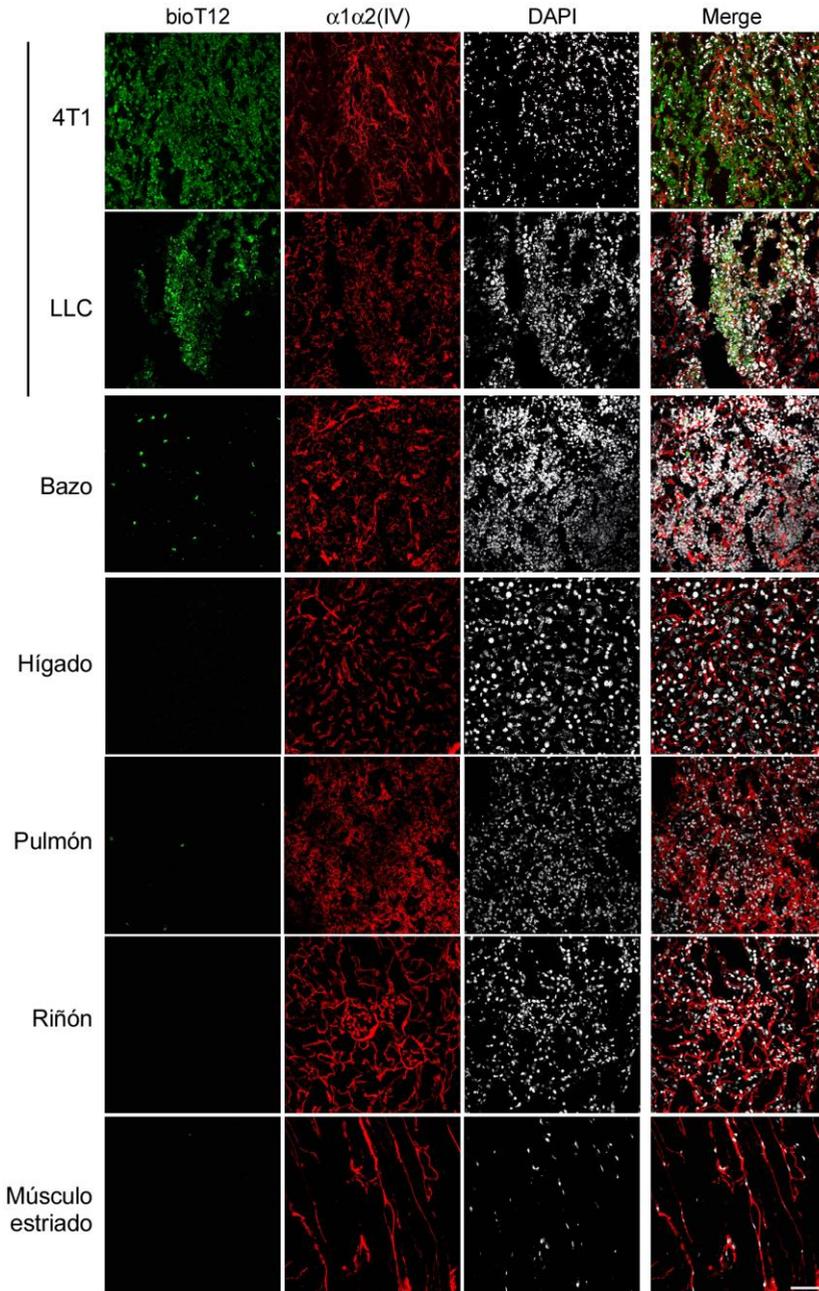
### 4.3. T12 y N26 no son sinérgicos

Después de comprobar la eficacia terapéutica de N26 y T12, estudiamos la eficacia de ambos tratamientos por separado y en conjunto, para determinar la posible sinergia entre los dos compuestos.

Siguiendo los procedimientos y pautas de administración descritas se observó que el tratamiento con T12 era más eficaz que el de N26. El tratamiento combinado no mejoraba el efecto conseguido con T12 e incluso la tendencia es que ambos candidatos no solamente no eran compuestos aditivos ni sinérgicos, sino que la combinación mostraba cierta tendencia a que se neutralizaban uno a otro, al menos siguiendo las pautas de administración descritas (**Fig. 43**).

Los resultados sugieren que T12 y N26 actúan sobre la misma diana, cGPBP, a través de mecanismos diferentes.





**Figura 44.** Las células 4T1 y LLC son diana de T12. Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal de secciones congeladas de tumor de BALB/c-4T1 y B6-LLC, y de los tejidos indicados de ratones C57BL/6 sanos. Se muestra cGPBP teñido con bioT12 (verde),  $\alpha 1\alpha 2(IV)$  (rojo) y núcleos (blanco).

Sólo los tumores de células 4T1 y LLC, y algunas células del bazo se tiñeron con bioT12. De acuerdo con este resultado, las células tumorales expresan y secretan cGPBP.

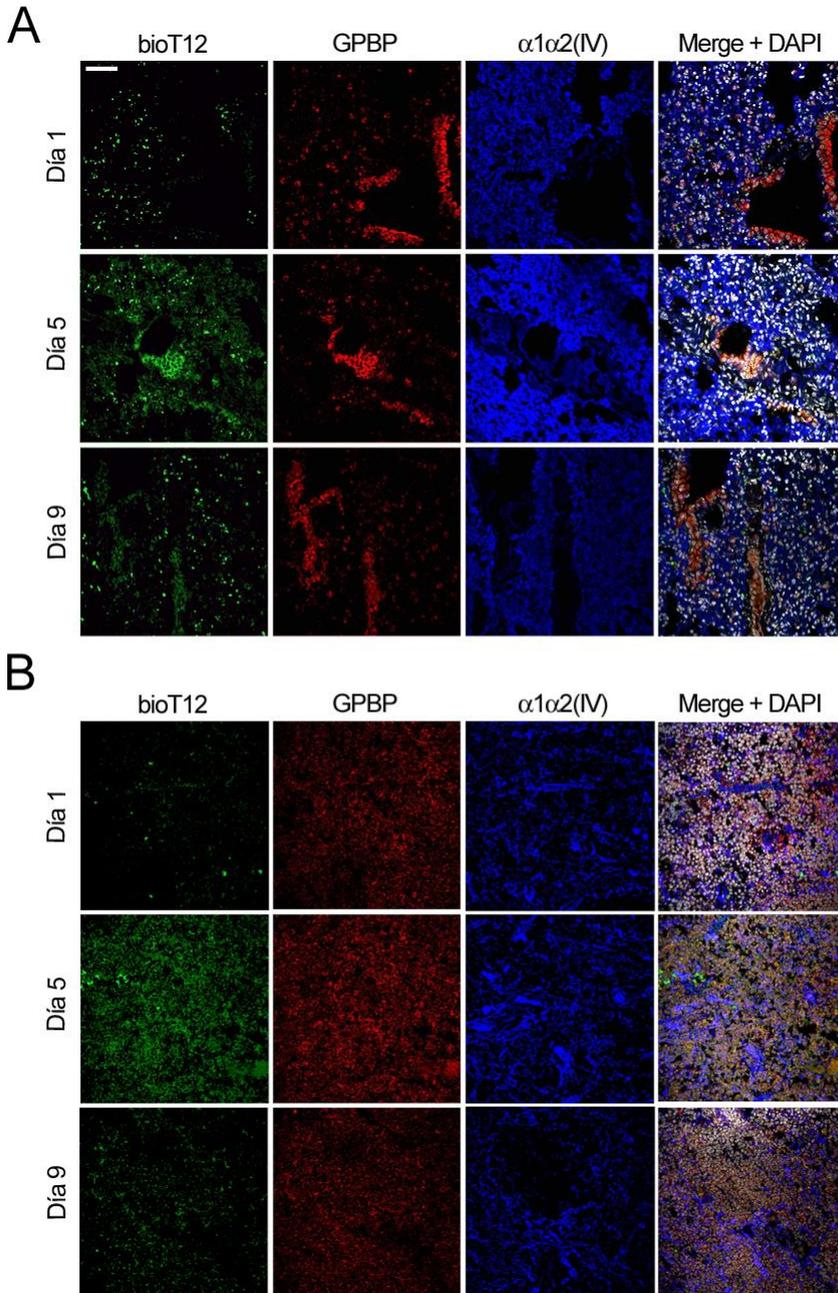
En conjunto, los resultados sugieren que la baja toxicidad de T12 es consecuencia de su alta especificidad por cGPBP y de la limitada expresión de la misma en los tejidos de individuos adultos sanos.

#### **4.5. cGPBP se localiza en el nicho premetastásico**

Los niveles de cGPBP son máximos a los días 5-7. La secreción regulada de cGPBP y la caída de las concentraciones plasmáticas sugieren que cGPBP se puede estar distribuyendo en los tejidos periféricos.

Utilizando bioT12 como sonda monitorizamos la distribución de cGPBP producida por el tumor. Teñimos tejidos de ratonas BALB/c-4T1 sacrificadas durante los primeros días del ensayo: día 1, inicio de la respuesta inmune, niveles bajos de cGPBP; día 5, niveles máximos de cGPBP; y día 9, niveles de cGPBP en descenso (**Fig. 45**).

De todos los tejidos analizados sólo se observó unión *in situ* de bioT12 en muestras de pulmón y bazo. También se analizó hígado, riñón y tejido adiposo (no se muestran). Coincidiendo con los niveles máximos de cGPBP en plasma se observa tinción de bioT12 en los esplenocitos y en el epitelio bronquial de los pulmones de ratonas BALB/c-4T1 de 5 días. La tinción disminuye el 9º día en consonancia con los niveles plasmáticos.



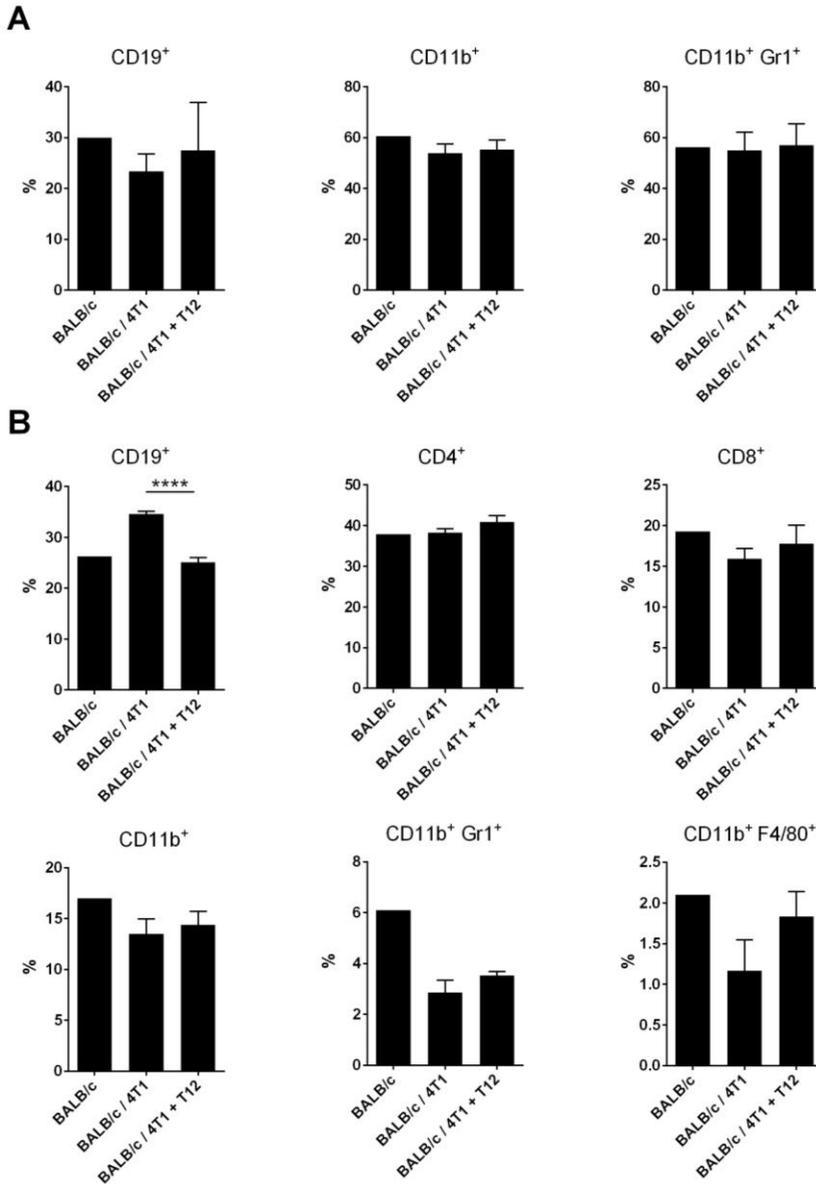
**Figura 45. Caracterización de cGPBP en tejidos de ratonas BALB/c-4T1 durante la máxima producción de cGPBP.** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de secciones de pulmón (A) y bazo (B) de ratonas BALB/c sanas (día 1) e inoculadas con  $10^4$  células tumorales 4T1 (día 5 y 9). Se muestra la detección de GPBP mediante bio-T12 (verde) y N27 (rojo); junto con  $\alpha 1\alpha 2(IV)$  (azul) y núcleos (blanco).

Teniendo en cuenta la cinética de cGPBP en plasma y que en el pulmón de un ratón sano no se observa tinción con bioT12 (**Fig. 44**), se puede concluir que cGPBP que identifica bioT12 en el pulmón procede de cGPBP circulante secretado por el tumor ya que bioT12 solamente se une a cGPBP producido por los fenotipos EMT del tumor. En este sentido, comprobamos que cuando se suplementa el medio de cultivo con cGPBP recombinante, este puede encontrarse en el interior de las células A549 y HEK-293 (no se muestra), poniendo en evidencia que cGPBP está sometido a un proceso de recaptura por al menos las células epiteliales del pulmón y los esplenocitos del bazo.

Los pulmones son el primer tejido sólido colonizado por las células 4T1 metastásicas. La tinción selectiva de este tejido con bioT12 sugiere que cGPBP proveniente del tumor se extravasa y participa en la preparación del nicho premetastásico (Sleeman, 2012).

#### **4.6. T12 interfiere en la respuesta inmune que favorece la progresión tumoral**

cGPBP y la progresión tumoral dependen en parte de la respuesta inmune del hospedador. La respuesta inmune en el modelo BALB/c-4T1 se activa casi instantáneamente y se acompaña con un aumento de los niveles de cGPBP, que a su vez condicionan la propia respuesta inmune. T12 y N26 inhiben o bloquean cGPBP, por lo que es esperable que afecte este proceso. Para estudiar la validez de esta hipótesis utilizamos T12 porque mostró mejores resultados en este modelo (**Fig. 43**).



**Figura 46. T12 modifica la respuesta inmune de ratones BALB/c-4T1.** Se muestra el análisis mediante citometría de flujo de poblaciones celulares del sistema inmune aisladas a partir de la médula ósea (**A**) y bazo (**B**) 2 días después de la inoculación de  $10^4$  células 4T1 y del inicio del tratamiento con T12. Se analiza la cantidad relativa (%) de linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ), linfocitos Th ( $CD4^+$ ), linfocitos B ( $CD19^+$ ), células mieloides ( $CD11b^+$ ), granulocitos ( $CD11b^+Gr1^+$ ) y monocitos/macrófagos ( $CD11b^+F4/80^+$ ). Estadística: t-Student.

Se inocularon ratonas BALB/c con células 4T1 y se trataron con T12 por vía oral siguiendo el procedimiento de ensayos anteriores (13 mg/Kg-día). Después de 2 días, coincidiendo con el inicio de la detección de cGPBP, se sacrificaron las ratonas y se analizaron las poblaciones celulares de la médula ósea (**Fig. 46A**) y del bazo (**Fig. 46B**).

En las poblaciones procedentes de la médula ósea no se observaron diferencias significativas entre ratonas control e inoculadas con células 4T1, tanto control y como tratadas con T12. Si bien es cierto que se aprecia un ligero descenso de la proporción de linfocitos B CD19<sup>+</sup> que se recupera con el tratamiento.

En cambio, en el bazo de ratonas inoculadas con células 4T1 hay una mayor proporción (relativa) de linfocitos B CD19<sup>+</sup>. El tratamiento con T12 iguala la población de linfocitos B CD19<sup>+</sup> con la que presentan los ratones control. La inoculación de las células 4T1 reduce las poblaciones de células mieloides (CD11b<sup>+</sup>), incluyendo granulocitos (Gr1<sup>+</sup>) y monocitos/macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), pero el tratamiento con T12 no modifica sustancialmente el resultado, aunque sí se observa una ligera recuperación de la población de monocitos/macrófagos (F4/80<sup>+</sup>).

La disminución de linfocitos B en la médula ósea y el aumento en el bazo (en ratonas enfermas) puede ser consecuencia de: 1) un incremento en la producción en bazo; o 2) incremento en la migración de los linfocitos recién formados desde la médula ósea al bazo. Diversas citoquinas inducen un aumento de poblaciones de linfocitos B en bazo. Por ejemplo, algunas citoquinas inducen linfopoyésis, como IL-7 (Finkelman *et al.*, 1993), y otras inducen la redistribución de linfocitos B hacia el bazo y un aumento de supervivencia de las nuevas células

generadas, como IL-4 (Mori *et al.*, 2000). En nuestro estudio, no se detectó un aumento de producción de linfocitos B en médula ósea, por lo que no se observó una inducción de linfopoyésis. Por tanto, las células tumorales podrían estar movilizando linfocitos B hacia el bazo.

El tratamiento con T12 podría estar afectando a este proceso e impedir la respuesta inmune del ratón frente a las células tumorales. Se requieren estudios más detallados para definir este mecanismo de acción, pero los resultados mostraron que T12, directa o indirectamente, afecta a la respuesta inmune en el modelo BALB/c-4T1.

#### **4.7. Resección quirúrgica del tumor y tratamiento con T12**

El compuesto T12 logró reducir el crecimiento tumoral con mayor eficiencia que el anticuerpo N26 y la combinación de ambos tratamientos no sumaba su eficacia.

Independientemente del tratamiento administrado, además de disminuir el crecimiento del tumor primario, se logró reducir el número de metástasis pulmonares, y el 28º día un 20-30% de ratones estaban libres de focos metastásicos. En todos estos ensayos se sacrificaban los ratones sobre el 28º día para poder comparar los grupos. Aunque los tratamientos enlentecen el crecimiento del tumor primario, debido a la alta agresividad de este modelo, los ratones siempre llegaban a criterios de punto final.

La principal causa de muerte de pacientes con cáncer no es el crecimiento del tumor primario, sino las metástasis. En base a todos estos resultados, se planteó mimetizar un tratamiento en pacientes humanos. La resección quirúrgica de los tumores sigue siendo un recurso

fundamental en el tratamiento contra el cáncer. Como sabemos, el tumor primario puede ser operado y extirpado en muchos casos clínicos. Aunque la extirpación de los tumores primarios forma parte del tratamiento, suele ir acompañado de la administración de fármacos para eliminar las células que se hayan podido dispersar por el resto del organismo.

Con el objetivo de reproducir este escenario, se utilizó el modelo BALB/c-4T1 incluyendo la resección quirúrgica del tumor primario. Se tuvieron en cuenta varios aspectos a la hora de llevar a cabo este tipo de ensayos. El tumor de este modelo es accesible, lo que facilita su extirpación. Pero la zona donde se encuentra posee poco tejido y dificulta la sutura posterior a la cirugía, por lo que tumores de gran tamaño complicarían el procedimiento. En segundo lugar, para lograr mimetizar el tratamiento de un paciente enfermo de cáncer con metástasis, hay que permitir el crecimiento del tumor primario lo suficiente para que las células metastásicas se diseminen antes de la cirugía. Por otro lado, la resección del tumor nos permitiría monitorizar más tiempo el desarrollo de la enfermedad, ya que en todos los ensayos realizados hasta el momento, los animales se sacrificaron a día 28 debido fundamentalmente al tamaño del tumor primario. Con la extirpación del tumor primario, serían las metástasis las que iban a determinar la entrada en criterios de punto final.

Se hizo un estudio piloto para establecer el momento idóneo para resear el tumor primario. Se inocularon 8 animales con células 4T1 ( $10^4$  células por ratona). A día 7, 9, 14 y 16 después de la inoculación de las células, se procedió a la mastectomía de dos animales por día. Los animales se recuperaron sin problemas de la cirugía y finalmente se

sacrificaron después de 32 días. La primera cirugía se hizo el 7º día, cuando el tumor era palpable, y se optó por no pasar del 16º día para evitar extirpar tumores demasiado grandes que complicaran la convalecencia.

Los resultados mostraron que a partir del 9º día las células pueden diseminarse por el organismo, demostrando la gran agresividad de este modelo de cáncer metastásico (estadio IV). En uno de los dos animales operados el día 9 y 14 se observaron metástasis pulmonares. En cambio, el día 16 los 2 ratones presentaban metástasis, por lo que finalmente se decidió realizar las mastectomías en el 16º día en futuros ensayos.

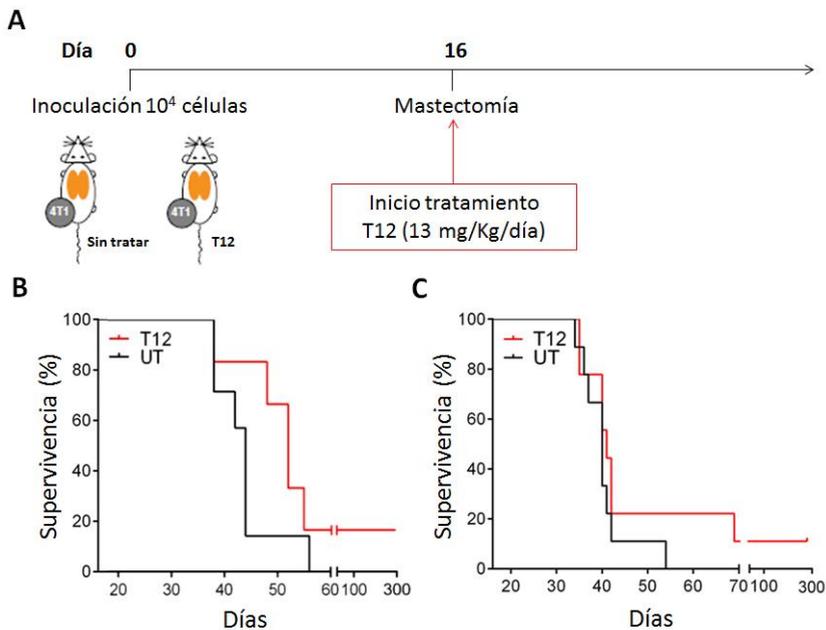
Una vez establecido el día de la cirugía, se realizaron ensayos de supervivencia con ratonas BALB/c-4T1 que incluían la extirpación del tumor mamario y el tratamiento con T12 como parte del procedimiento.

Se realizaron dos ensayos consecutivos de forma independiente, cada uno de ellos con 20 ratonas: 10 sin tratar y 10 tratados con T12. Como se ha mencionado anteriormente, se decidió testar T12 y no N26 porque es un candidato a fármaco con buenas propiedades farmacocinéticas, del que se puede obtener cantidades elevadas con un coste reducido y que es trasladable a la clínica sin modificaciones adicionales (al contrario que N26 que es necesario humanizarlo). Además, T12 no puede ser rechazado por el sistema inmune y N26 sí, aunque esté humanizado.

En ambos ensayos se modificó el inicio del tratamiento. En ensayos anteriores, el tratamiento comenzó en el mismo momento de la inoculación de las células tumorales. En estos ensayos el tratamiento comenzó en el momento de la intervención quirúrgica. El motivo por el

cual se cambió la pauta de administración de T12 fue la voluntad de querer mimetizar, en la medida de lo posible, el tratamiento de un paciente. En la mayoría de pacientes que no logran superar la enfermedad, la formación de metástasis ya se ha producido en el momento del diagnóstico del tumor primario. Por tanto, el objetivo de estos ensayos era alargar la vida de los animales, atacando el proceso metastásico de la enfermedad.

El tratamiento con T12 aumentó la supervivencia en el primer ensayo, pero no de forma significativa (**Fig. 47**). Sin embargo, en cada ensayo realizado una de las ratonas sobrevivió.



**Figura 47. Curva de supervivencia de ratonas BALB/c-4T1 tratadas con cirugía y T12.** Se inocularon ratonas BALB/c con  $10^4$  células tumorales 4T1. El 16º día se realizó la extirpación quirúrgica del tumor primario y comenzó el tratamiento con T12 (~13 mg/kg-día). Se muestra: (A) Esquema del procedimiento seguido. (B y C) Curva Kaplan-Meier del primer (B) y segundo (C) ensayo de supervivencia. Estadística: el test log-rank (Mantel-Cox). (A)  $n = 20$ ;  $P = 0,15$ ; (B)  $n = 20$ ;  $P = 0,26$ .

Las 2 ratonas se analizaron mediante PET-TAC y se observó que tenían metástasis. Las metástasis permanecen estables e inactivas gracias al tratamiento con T12 después de más de 1 año (**Fig. 48**). Desde el inicio de las experimentaciones y hasta la actualidad, estos dos animales han sido monitorizados, realizando sesiones PET-TAC cada 1-2 meses, con el objetivo de caracterizar la evolución de la enfermedad con un tratamiento mantenido de T12. Hasta la actualidad, las ratonas presentan un buen estado y las metástasis permanecen inactivas.



**Figura 48. Imágenes PET-TAC de ratonas BALB/c-4T1 supervivientes con resección quirúrgica del tumor primario y tratadas con T12.** Se muestran imágenes PET-TAC que confirman la presencia de nódulos metastásicos en ambos animales. Se observan también las zonas de captación fisiológica de cerebro y corazón, así como la inyección intraperitoneal del radiofármaco. (A) Ratona superviviente del ensayo de supervivencia nº 1. (B) Ratona superviviente del ensayo de supervivencia nº 2.

Este ensayo abre las puertas hacia un nuevo tratamiento antitumoral. A pesar de no haber obtenido significación estadística, se ha logrado la supervivencia del 10% de las ratonas con cáncer de mama triple negativo y estadio IV.



## **V. DISCUSIÓN**



Una de las propiedades más relevantes de las células tumorales es su elevada plasticidad fenotípica, que les permite adaptarse al entorno y sobrevivir y propagarse en condiciones cambiantes. Desde este punto de vista, se puede afirmar que el cáncer es la suma de diversos fenotipos de células cancerosas que van cambiando con el tiempo, lo que dificulta el éxito de las terapias. Aunque los cambios fenotípicos pueden ser consecuencia de la aparición de nuevas mutaciones a medida que las células se van dividiendo, una cantidad creciente de trabajos, muestran que los cambios fenotípicos pueden ser consecuencia del ambiente que rodea la célula tumoral.

Uno de los cambios fenotípicos mediados por el microambiente del tumor es la EMT. Las células cancerosas con fenotipo epitelial adquieren propiedades mesenquimales en condiciones adversas (p. ej. hipoxia), lo que les permiten separarse de otras células, moverse con más facilidad en el seno del estroma y les confiere una elevada quimiorresistencia. Los últimos estudios apuntan a que las células metastásicas de los pacientes serían, o células epiteliales de tumores no tratados, o células mesenquimales que han superado la quimioterapia (Zheng *et al.*, 2015).

Las células cancerosas con fenotipos EMT producen cGPBP, que es sensible a T12 (GPBP mesenquimal). En este sentido, T12 muestra una alta especificidad por los tejidos tumorales comparado con los tejidos de individuos sanos. Esta especificidad está en consonancia con su baja toxicidad. El efecto anti-tumoral de T12 está mediado por la desorganización de la red de colágeno IV mesenquimal dependiente de cGPBP, que confiere quimiorresistencia a las células cancerosas después de la EMT (Revert *et al.*, 2017, manuscrito en preparación).

Las células epiteliales expresan una forma de GPBP que permanece preferentemente en el RE y que es sensible a doxorubicina (Saus *et al.*, 2014, WO 2014/006020; Revert *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). Los fenotipos epiteliales pueden capturar cGPBP y secretarlo de nuevo, contribuyendo a aumentar la malignidad de la enfermedad (Revert *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). La ablación genética de GPBP del hospedador produce efectos similares al tratamiento con T12 lo que sugiere que GPBP producido en el tumor recluta GPBP del hospedador para facilitar la diseminación del tumor aumentando la malignidad de la enfermedad.

La ablación genética de las células 4T1 produjo dos clones, ninguno de los dos expresaba GPBP, y uno de ellos (c2) presentaba una expresión reducida de GPBP-2. El primer clon, que no mostraba una alteración significativa de la expresión de GPBP-2, formaba tumores que crecían de forma similar al tumor de células *wt*, pero mostraban una mayor dificultad para metastatizar en los pulmones. El segundo clon crecía y metastatizaba de forma similar a las células *wt*. La disparidad de resultados sugiere que cGPBP de las células 4T1 facilita las metástasis cuando la expresión de GPBP-2 no se reduce como consecuencia del tipo de edición del genoma. Para poder sacar conclusiones adicionales es necesario estudiar la formación de tumores y metástasis de las células 4T1 *wt* y *knockout* en ratones BALB/c-GPBP<sup>-/-</sup>.

### **GPBP en la polarización de macrófagos**

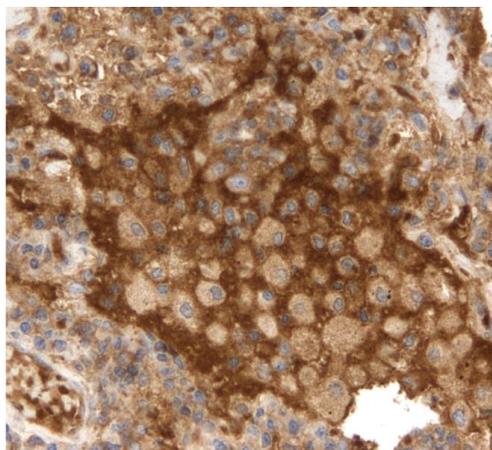
Los niveles de cGPBP aumentan en la glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos de ratones NZW. Esta enfermedad se caracteriza por una expansión de colágeno IV (glomeruloesclerosis), que se acompaña de depósitos de inmunocomplejos. Las alteraciones glomerulares se pueden reproducir con la expresión transgénica de GPBP (Revert *et al.*, 2007). Además de las alteraciones glomerulares, cuando la enfermedad del ratón NZW avanza se pueden observar infiltrados inflamatorios tubulointersticiales.

Cuando los ratones NZW se tratan con mAb N26 se reduce la glomeruloesclerosis y los infiltrados inflamatorios tubulointersticiales (Macías, 2014). Por tanto, existe una relación causal entre cGPBP, la expansión del colágeno IV, el depósito de inmunocomplejos y la respuesta inmune.

La secreción de cGPBP por parte de macrófagos M2b (en respuesta a inmunocomplejos) confirman la relación entre inmunocomplejos y cGPBP, pero no demuestra que cGPBP regule la respuesta innata.

Otros estímulos M2, como las células tumorales, también inducen la producción de cGPBP en macrófagos. *Ex vivo*, la expresión de cGPBP del propio macrófago es necesaria para su correcta polarización a TAM, ya que su ausencia (macrófago GPBP<sup>-/-</sup>) impide la expresión de los marcadores que caracterizan este fenotipo. *In vivo*, podría ser el propio cGPBP secretado por las células tumorales el que promueva la polarización a TAM ya que la presencia de T12 en co-cultivos impedía la polarización M2d. La expresión de GPBP en macrófagos de tumores

humanos sugieren que estas observaciones tienen relevancia clínica (Fig. 49).



**Figura 49. Los macrófagos asociados a tumores expresan mucho GPBP.** Se muestra una imagen adquirida con un microscopio convencional de una biopsia de un adenocarcinoma humano teñida con mAb e11-2. Se obtuvieron resultados similares con mAb N27. Se observan macrófagos (células redondeadas del centro) con abundante GPBP infiltrando el tumor. El patrón de membrana o extracelular sugiere que es cGPBP de macrófagos polarizados a M2d. Todas biopsias analizadas mostraban macrófagos CD206<sup>+</sup>, que indica una polarización M2 (no se muestra).

Podemos afirmar que, en general, la ausencia de cGPBP compromete la respuesta inmune innata. Los macrófagos GPBP<sup>-/-</sup> tienen una expresión menor de *Ccl2*. El gen *Ccl2* codifica la proteína MCP-1, una quimioquina clave en el reclutamiento de monocitos y macrófagos durante la respuesta inmune. La baja producción de MCP-1 alteraría la respuesta, pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, de forma generalizada. Existen varios tipos celulares que secretan MCP-1, pero los monocitos/macrófagos constituyen la principal fuente productora (Satish *et al.*, 2009).

Los macrófagos GPBP<sup>-/-</sup> M2d expresan menos *Mcr1*, *Il6*, *Il1b*, *Nos2*, *Mmp9*, *Tnfa* e *Il10* y la expresión de *Il12b* se adelanta. En la polarización a M2d, los niveles de expresión de los genes *Il6*, *Il1b*, *Nos2*, *Tnfa* e *Il12b* son mucho menores que en el fenotipo M1, pero a diferencia de otros fenotipos M2, sí que se expresan. Son genes que codifican factores pro-inflamatorios, por lo que podemos considerar M2d una polarización M2 modificada para favorecer a las células tumorales. Por ejemplo, está descrito que la producción de bajas cantidades de óxido nítrico por iNOS favorece la progresión tumoral previniendo la apoptosis y favoreciendo la angiogénesis. Por el contrario, elevadas cantidades de óxido nítrico favorecen la apoptosis de células tumorales y el ataque pro-inflamatorio, inhibiendo la progresión tumoral (Lechner *et al.*, 2005). Esta dualidad de proteínas pro-inflamatorias la utilizan las células tumorales para favorecer su crecimiento y metástasis, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 (Esquivel-Velázquez *et al.*, 2015). Por tanto, la ausencia de cGPBP y la consecuente disminución de la expresión de estos genes podrían modificar el fenotipo pro-tumoral M2d hacia un fenotipo anti-tumoral, o al menos neutro.

Los macrófagos M2d GPBP<sup>-/-</sup> también expresan menos *Il10* y *Mrc1*, genes con carácter anti-inflamatorio. IL-10 es una citoquina clave en la inmunosupresión que activa los linfocitos T reguladores en la carcinogénesis (Kristen *et al.*, 2013). El gen *Mrc1* codifica el receptor de manosa, CD206, que se sobreexpresa en macrófagos M2 durante la resolución de los procesos inflamatorios. Una de sus principales funciones es eliminar agentes inflamatorios de la circulación sanguínea que pueden ser perjudiciales para el organismo, como hidrolasas o peroxidasas (Röszer, 2015). Además, se ha demostrado que los

macrófagos M2 participan en la remodelación del colágeno mediante un mecanismo CD206-dependiente, internalizando el colágeno para su degradación lisosomal. Se cree que internalizan productos de degradación del colágeno originados por proteasas como MMP-9, codificado por el gen *Mmp9*, cuya expresión también se reduce en ausencia de GPBP. Los macrófagos M2 participan en la remodelación de la matriz extracelular, proceso clave durante la progresión tumoral (Wynn y Vannella, 2016). La ausencia de cGPBP provoca una disminución de CD206 en la superficie de macrófagos y una menor expresión de MMP-9, que menguaría la actividad de remodelación de la ECM.

Por tanto, los resultados muestran que cGPBP participa en el reclutamiento y polarización de TAM que favorecerían la progresión tumoral y las metástasis.

### **cGPBP en la patogenia de la enfermedad del cáncer: interacción con el sistema inmune**

El cáncer se considera una enfermedad inflamatoria crónica. Las interacciones entre las células cancerosas y las células del sistema inmune son extremadamente complejas y de gran importancia en el desarrollo del tumor primario y las metástasis. Los modelos celulares muestran una visión simplificada en comparación con los procesos de un organismo completo. De ahí la necesidad de utilizar modelos animales.

Para poder estudiar la relación entre el sistema inmune y cGPBP, se buscaron modelos de cáncer inmunocompetentes donde tuviera lugar un proceso espontáneo metastásico: BALB/c-4T1 y B6-LLC. Los

modelos nos permitieron obtener información complementaria. Debido a la heterogeneidad y la menor capacidad metastásica descrita en B6-LLC, recurrimos preferentemente al modelo BALB/c-4T1.

El tumor 4T1 posee muchas características similares a la enfermedad homóloga humana, a diferencia de otros modelos animales (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000). Una de las mayores ventajas de este modelo es que las células 4T1, al ser inyectadas de forma ortotópica y singénica, metastatizan espontáneamente con un patrón análogo al cáncer mamario humano (Amer, 1982; Kamby *et al.*, 1987; Tomin y Donegan, 1987; Rutgers *et al.*, 1989; Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 1998; Lelekakis *et al.*, 1999).

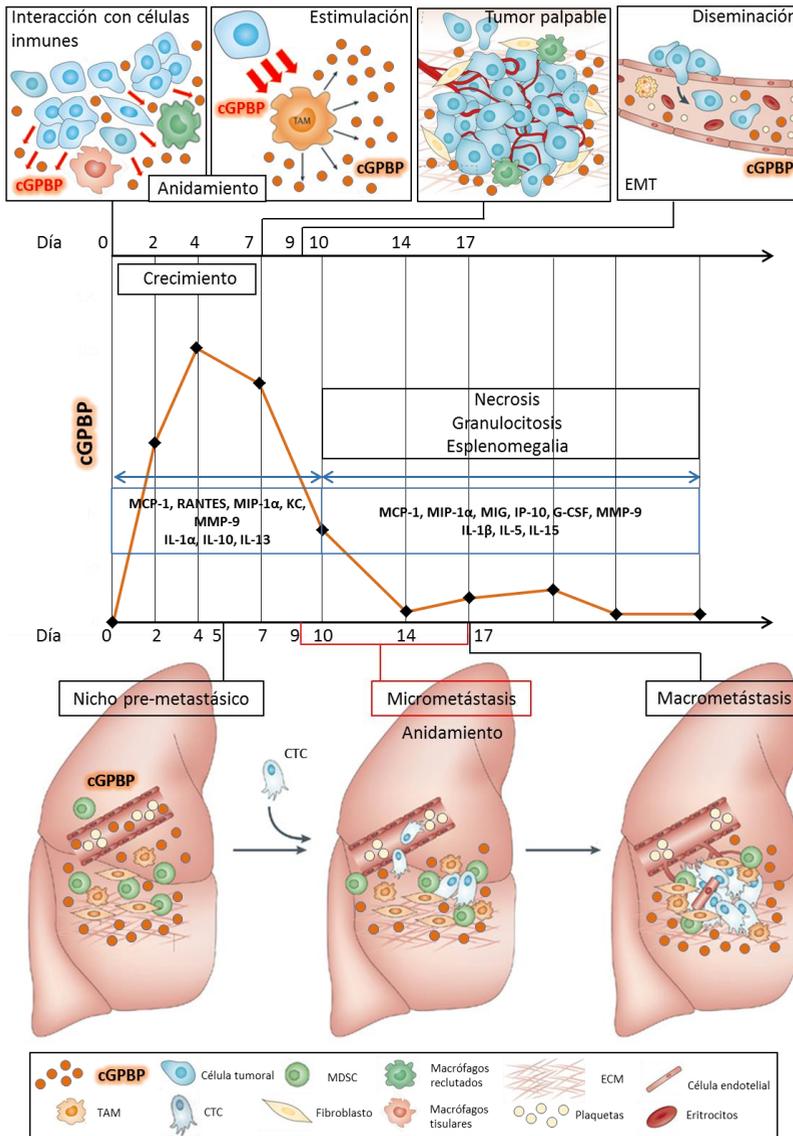
En ambos modelos se observa un aumento de los niveles de cGPBP *in vivo* de forma temprana, antes de que las metástasis sean evidentes, lo que sugiere que es un fenómeno transversal a tumores de distintos orígenes. Con la inoculación de las células tumorales aparecen dos isoformas de cGPBP,  $N26^+N27^+e11-2^+$  y  $N26^+N27^+e11-2^-$  cuya relevancia patogénica no ha sido establecida pero las diferencias encontradas entre estos modelos animales y entre modelos animales con diferente grado de inmunodeficiencia sugieren que la producción de cGPBP y sus isoformas reactivas depende del repertorio de células del sistema inmune del hospedador. Desde el primer momento en el que se analizaron muestras de plasma, 2 días después de la inoculación de las células 4T1, se registró un aumento de biomarcadores plasmáticos proteicos incluyendo cGPBP. Las células tumorales inoculadas producirán cGPBP e inducirán su secreción por parte de los macrófagos residentes (Arango y Descoteaux, 2014), así como de los nuevos macrófagos procedentes del reclutamiento de monocitos. Los

macrófagos sufrirán un proceso de polarización inducido por las células tumorales, de forma que la secreción de citoquinas y quimioquinas se activará en cuestión de horas (Kemna *et al.*, 2005; Taudorf *et al.*, 2007; Fairchild *et al.*, 2009; van den Boogaard *et al.*, 2010; Kiers *et al.*, 2017). Además de las células tumorales y los macrófagos, los esplenocitos podrían contribuir a expandir la malignidad mediante la producción de cGPBP adicional instigado por las células tumorales.

En base al perfil de secreción de biomarcadores plasmáticos se distinguen dos fases en la enfermedad: 1) desde el día 0 hasta el día 10, donde se perfilan picos de secreción de cGPBP, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , KC, IL-10, IL-13 y IL-1 $\alpha$ ; y 2) desde el día 10 en adelante, donde aparecen aumentos de otras proteínas como IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-5, IP-10 y MIG, así como nuevos picos de IL-13 y MIP-1 $\alpha$ . El inicio de la segunda fase comienza con la aparición de tumores palpables, granulocitosis y esplenomegalia. También se detecta un cambio en los infiltrados tumorales. Los infiltrados durante los primeros días son mayoritariamente mieloides (granulocitos y monocitos/macrófagos), y en el inicio de la segunda etapa, 10<sup>o</sup> día, los infiltrados son mayoritariamente linfoides. Además, en el 10<sup>o</sup> día se observan células tumorales con rasgos mesenquimales y zonas necróticas en el interior de los tumores, momento en el cual las células inician un proceso de diseminación. En concordancia con nuestros resultados, diversos estudios muestran que las células tumorales 4T1 escapan del tumor primario entre 7-12 días después de su inoculación (Aslakson y Miller, 1992; Kershaw *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2013; Mastria *et al.*, 2015). En cambio, no se visualizaron metástasis macroscópicas pulmonares hasta el día 17.

Los niveles de cGPBP aumentan drásticamente desde la llegada de las células tumorales y hasta que las células se diseminan por el organismo. Por tanto, el aumento de cGPBP en plasma es un evento previo al inicio de la metástasis. La inducción de niveles aberrantes de cGPBP en plasma antes de la migración de las CTC indicaría que cGPBP desempeña un papel en este proceso (**Fig. 50**).

Esta función podría estar relacionada con la resolución de las etapas previas al proceso metastásico: 1) regulación del estroma tumoral; 2) EMT, extravasación y migración; 3) modificación del nicho premetastásico y/o 4) MET, intravasación y anidamiento en tejidos secundarios. cGPBP intervendría en distintos procesos. Por un lado, cGPBP está presente en grandes cantidades en el tumor primario con lo que podría formar parte de la regulación del estroma (respuesta inmune) y la salida de las CTC. En este sentido, las células cancerosas con fenotipos EMT producen cGPBP, que es sensible a T12. cGPBP induce la organización de la red de colágeno IV que confiere quimiorresistencia a las células cancerosas después de la EMT (Revert *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). Por otro lado, cGPBP extravasa al nicho premetastásico, por lo que también podría participar en su alteración para propagar la malignidad y en el anidamiento de las CTC. La dificultad que tienen las células tumorales para su diseminación y anidamiento en ratones GPBP<sup>-/-</sup> nos sugiere la importancia de cGPBP en este proceso.



**Figura 50. cGPBP en cáncer.** Secuencia temporal de eventos descritos en la progresión tumoral de BALB/c-4T1. Las células 4T1 se inoculan en el panículo adiposo mamario (día 0), donde se encontrarán con los macrófagos residentes y se iniciará una respuesta inmune. Las células tumorales secretan cGPBP e instigan a las células del sistema inmune a secretar cGPBP que colaborará en la expansión de la malignidad. Los niveles plasmáticos de cGPBP y otras proteínas aumentan de forma temprana, en anticipo a la diseminación de las CTC y la formación de macrometástasis. Durante esta fase, cGPBP extravasa al nicho premetastásico. CTC, células tumorales circulantes; TAM, macrófagos asociados a tumores; MDSC, células mieloides supresoras; ECM, matriz extracelular; EMT, transición epitelio-mesénquima. Modificado de Psaila y Lyden, 2009.

Se desconoce el motivo por el cual existe una alteración de los niveles plasmáticos de cGPBP, y no un aumento constante, durante el transcurso de la enfermedad BALB/c-4T1. Las células tumorales secretan cGPBP. El descenso de los niveles detectados en plasma podría ser debido a: 1) La secreción de cGPBP está regulada; 2) cGPBP se distribuye, extravasa a tejidos y es capturado por células; 3) existe cGPBP circulante también en la segunda fase de la enfermedad, no detectable por los anticuerpos. Los tumores avanzados de ratonas tienen cGPBP y sus esplenocitos secretan cGPBP *ex vivo*, por lo que aunque sistémicamente no se detecte cGPBP, existe secreción, al menos, a nivel local. En este contexto, la bajada de los niveles plasmáticos podría deberse a la distribución de cGPBP hacia tejidos periféricos y su internalización por parte de células de distinta naturaleza, por ejemplo las propias células tumorales o células del estroma y el nicho metastásico. En este sentido, resultados previos muestran que las células son capaces de internalizar cGPBP *ex vivo* (resultados no publicados). Otra posibilidad, que no es excluyente con esta hipótesis, es que la acumulación de elevadas cantidades de cGPBP en plasma de lugar a multímeros de muy alto peso molecular que presenten modificaciones que impiden el reconocimiento por parte de los anticuerpos de detección. De acuerdo con ello, se han descrito dos isoformas inmunorreactivas.

La eliminación de poblaciones celulares del sistema inmune en ratones inmunodeprimidos disminuyó los niveles plasmáticos de cGPBP. Está descrito que las células tumorales 4T1 son capaces de desarrollar un tumor primario en ratones inmunodeprimidos, describiendo un crecimiento exponencial debido al mal funcionamiento de la respuesta inmune (Tao *et al.*, 2008). A pesar de desarrollar un crecimiento mucho

más rápido, las células no son capaces de metastatizar en ratones NOD/SCID (Olkhanud *et al.*, 2009). Por tanto, el desarrollo del tumor primario con una respuesta inmune truncada y sin metástasis no está asociado a un aumento de cGPBP en plasma. En este sentido, cGPBP está directamente relacionada con el sistema inmune y las metástasis. Si el sistema inmune no funciona correctamente no se produce metástasis y no se detectan niveles elevados de cGPBP en plasma.

Este trabajo confirma la naturaleza pleiotrópica de GPBP. Nuestras observaciones apoyan estudios previos donde diversos autores señalan la interacción entre GPBP y respuesta inmune (Lamour *et al.*, 2007; Mencarelli *et al.*, 2012; Bode *et al.*, 2014); y la importancia de GPBP en la enfermedad del cáncer (Swanton *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). GPBP y su forma secretada podría ejercer su función a través de diversos procesos. Por un lado, otras líneas de investigación desarrolladas en Fibrostatin S.L. demuestran que cGPBP actúa directamente sobre las células tumorales, influyendo sobre el colágeno IV y su expansión mesenquimal. cGPBP induce la organización de la red de colágeno IV mesenquimal, que confiere quimiorresistencia a las células cancerosas después de la EMT (Revert *et al.*, 2017, manuscrito en preparación). Por otro lado, en este trabajo se confirma que cGPBP participa en la polarización de macrófagos TAM y en su reclutamiento a través de MCP-1, indispensable en la progresión de la enfermedad (Cho *et al.*, 2012; Yoshimura *et al.*, 2013).

Con todo, la proteína GPBP establece un nexo de unión entre matriz extracelular, respuesta inmune y tumorigénesis. Los resultados de esta tesis implican a cGPBP en la regulación del sistema inmune y en la diseminación/anidamiento de las células tumorales, lo cual podría

estar relacionado con la modificación de la ECM. No olvidemos que GPBP modifica la estructura cuaternaria del colágeno IV y, por tanto, participa en la remodelación de la ECM, proceso crítico en cáncer (Bissell y Radisky, 2001; Lu *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015). El colágeno IV, específicamente, es importante en la progresión tumoral (Wang y Xu 2000; Tanjore y Kalluri, 2006; Öhlund *et al.*, 2009; Öhlund *et al.*, 2013).

La modificación del colágeno IV a través de cGPBP podría ser importante también para una correcta polarización a M2d. La morfología de los macrófagos condiciona la expresión génica y secreción de citoquinas y, por tanto, el proceso de polarización (McWhorter *et al.*, 2013). La ECM participaría en la regulación de este proceso durante la carcinogénesis a través de las interacciones célula-ECM (Bissell y Radisky, 2001). Por otro lado, los propios macrófagos son claves en la remodelación de la ECM durante la progresión tumoral (Wynn y Vannella, 2016), constituyendo *un feed-back* positivo. A su vez, la ausencia de cGPBP induce un fenotipo con menor actividad remodeladora (menos CD206 y MMP-9). Con todo, la regulación de la organización del colágeno IV de la ECM por parte de cGPBP, tanto en el tumor primario como en el nicho metastásico, podría formar parte de los eventos necesarios para el progreso de la enfermedad. Se requieren estudios más detallados para confirmar el mecanismo por el que cGPBP afecta a la respuesta inmune.

## **Aproximaciones terapéuticas anticancerosas basadas en la dianización de cGPBP**

La relevancia de cGPBP en la progresión tumoral se confirmó con la utilización del anticuerpo monoclonal mAb N26 como terapia biológica en BALB/c-4T1. El bloqueo específico de cGPBP afectó al desarrollo de la enfermedad, reduciendo el crecimiento del tumor primario y el número de metástasis pulmonares. A su vez, la utilización de un compuesto orgánico como T12, inhibidor de la actividad cinasa de la forma multimérica extracelular de GPBP, confirma la importancia de cGPBP en la patogenia de la enfermedad.

Nuestras observaciones sitúan a cGPBP como una nueva diana terapéutica en cáncer, proteína que actúa como factor clave en la interacción entre sistema inmune, ECM y células tumorales, promoviendo la cascada metastásica. En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas con el objetivo de restaurar la actividad anti-tumoral del sistema inmune con resultados prometedores, pero sin éxito en todos los pacientes. En los tiempos actuales, estudios de procesos básicos en la biología de la interacción cáncer-sistema inmune-ECM están teniendo un gran impacto traslacional y la inmunoterapia emerge como la principal modalidad terapéutica en cáncer.

Se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas que *dianizan* específicamente los macrófagos TAM para el tratamiento contra el cáncer. Algunos ejemplos son BLZ945 y Emactuzumab, que bloquean la polarización y el reclutamiento de macrófagos TAM en el microambiente pro-tumoral. Otros, como MLN1202 y PF-04136309,

inhiben el reclutamiento de los macrófagos a través del bloqueo del receptor de MCP-1 (Panni *et al.*, 2013). También se han desarrollado estrategias terapéuticas que utilizan como diana proteínas que alteran los componentes de la ECM durante la carcinogénesis. Algunos ejemplos son simtuzumab (anticuerpo monoclonal contra el enzima lisil oxidasa LOX), marimastat y tanomastat (inhibidores de metaloproteasas) o upamostat (inhibidor de la uroquinasa uPA) (Jiang y Lim, 2016).

Los resultados sugieren que T12 y N26 actúan sobre la misma diana, cGPBP. El compuesto T12 logró reducir el crecimiento tumoral con mayor eficiencia que el anticuerpo N26 y la combinación de ambos tratamientos no mostró un efecto aditivo. T12 es un compuesto orgánico con bajo coste de producción, con buenas propiedades toxicocinéticas y se puede administrar por vía oral. Las ratonas BALB/c-4T1 supervivientes obtenidas durante el tratamiento con T12 demuestran su valor potencial como tratamiento anti-canceroso.

cGPBP se establece como una nueva diana terapéutica y T12 como un nuevo fármaco (*First-in-class*) para tratar cáncer avanzado.



## **VI. CONCLUSIONES**



1. Las células tumorales con fenotipo EMT producen cGPBP.
2. El cGPBP tumoral recluta cGPBP del hospedador para formar tumores secundarios (metástasis).
3. cGPBP del hospedador procede de los macrófagos y otras células del sistema inmune (p.ej. esplenocitos).
4. cGPBP regula la formación de TAM (fenotipo M2d).
5. La ausencia de cGPBP del hospedador o la inhibición de cGPBP del tumor impide la polarización M2d.
6. Existen 2 fases en la respuesta inmune frente al tumor de células 4T1 una temprana (1 – 10 días) y una tardía (> 10 días). cGPBP aumenta transitoriamente en la fase temprana de la respuesta inmune, anticipando la aparición de metástasis.
7. cGPBP es una nueva diana terapéutica en cáncer metastásico.
8. Los anticuerpos monoclonales anti-GPBP (mAb N26) y los peptidomiméticos inhibidores de GPBP (T12) son fármacos potenciales para el tratamiento del cáncer avanzado.



## **VII. REFERENCIAS**



Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res. 2009; 11(4):R46.

Aldinucci D, Colombatti A. *The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression*. Mediators Inflamm. 2014; 292376.

Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. *Pathways Connecting inflammation and cancer*. Curr Opin Genet Dev. 2008; 18:3-10.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. *The inflammatory microenvironment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol. 2008; 66:1–9.

Alpy F, Tomasetto C. *Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals*. J Cell Sci. 2005; 118(Pt 13):2791-801.

Amer, MH. *Chemotherapy and pattern of metastases in breast cancer patients*. J. Surg. Oncol. 1982; 19:101-105.

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions*. Cancer Metastasis Rev. 2006; 25(3):387-408.

Arango DG, Descoteaux A. *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol. 2014; 7:5:491.

Argilés JM, Figueras M, Ametller E, Fuster G, Oliván M, de Oliveira CC, López-Soriano FJ, Isfort RJ, Busquets S. *Effects of CRF2R agonist on tumor growth and cachexia in mice implanted with Lewis lung carcinoma cells*. Muscle Nerve. 2008; 37:190–195.

Aslakson CJ, Miller FR. *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Res. 1992; 52(6):1399-405.

Balkwill F, Mantovani A. *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet. 2001; 357:(9255):539–545.

Bauer EA, Uitto J, Walters RC, Eisen AZ. *Enhanced collagenase production by fibroblasts derived from human basal cell carcinomas*. Cancer Res. 1979; 39(11):4594-9.

Bernal D, Quinones S, Saus J. *The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced*. J Biol Chem. 1993; 268(16):12090-4.

Bibby MC. *Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages*. Eur J Cancer. 2004; 40(6):852-857.

Bissell MJ, Radisky D. *Putting tumours in context*. Nat Rev Cancer. 2001; 1(1):46-54.

Bode GH, Losen M, Buurman WA, Veerhuis R, Molenaar PC, Steinbusch HW, De Baets MH, Daha MR, Martínez-Martínez P.

*Complement activation by ceramide transporter proteins.* J Immunol. 2014; 192(3):1154-61.

Bonilla FA, Oettgen HC. *Adaptive immunity.* J Allergy Clin Immunol. 2010; 125:S33–S40

Borza C, Borza DB, Pedchenko V, Saleem MA, Mathieson PW, Sado Y, Hudson HM, Pozzi A, Saus J, Abrahamson DR, Zent R, Hudson BG. *Human Podocytes Adhere to the KRGDS Motif of the  $\alpha3\alpha4\alpha5$  Collagen IV Network.* J Am Soc Nephrol. 2008; 19(4): 677–684.

Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. *Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain.* Nature. 2009; 459(7249):1005-9.

Bottazzi B, Inforzato A, Messa M, Barbagallo M, Magrini E, Garlanda C, Mantovani A. *The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling.* J Hepatol. 2016; 64(6):1416-27.

Bui JD, Schreiber RD. *Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?* Curr Opin Immunol. 2007; 19:203-8.

Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. *Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression.* J Immunol. 2006; 176(1):284-90.

Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. *Reduced inflammation in the tumor microenvironment*

*delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression.* Cancer Res. 2007; 67(20):10019-26.

Cabrera T, López-Nevot MA, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F. *Analysis of HLA expression in human tumor tissues.* Cancer Immunol Immunother. 2003; 52(1):1-9.

Calvete JJ, Revert F, Blanco M, Cervera J, Tárrega C, Sanz L, Revert-Ros F, Granero F, Pérez-Payá E, Hudson BG, Saus J. *Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the alpha3 chain of collagen IV.* Proteomics. 2006; 6 Suppl 1:S237-44.

Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, Au A, Baehner F, Chen Y, Malaka DO, Lin A, Adeyanju OO, Li S, Gong C, McGrath M, Olopade OI, Esserman LJ. *Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome.* Breast Cancer Res Treat. 2011; 128:703–711.

Chaffer CL, Weinberg RA. *A perspective on cancer cell metastasis.* Science. 2011; 331: 1559–1564.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. *Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment.* Cancers (Basel). 2014; 6(3):1670-90.

Cho HJ, Jung JI, Lim DY, Kwon GT, Her S, Park JH, Park JH. *Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid*

*tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model.* Breast Cancer Res. 2012;14(3):R81.

Coleman MP, Cuaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R. *Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD).* Lancet Oncol. 2008; 9:730-756.

Dai F, Liu L, Che G, Yu N, Pu Q, Zhang S, Ma J, Ma L, You Z. *The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer.* BMC Cancer. 2010; 10:220.

De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. *Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways.* J Immunol. 2008; 180(6):4308-15.

DeNardo DG, Coussens LM. *Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression.* Breast Cancer Res. 2007;9:212.

Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K. *Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9.* Front Plant Sci. 2016; 7:703.

Doki Y, Murakami K, Yamamura T. et al. *Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice.* Br J Cancer. 1999; 79: 1121–6.

DuPré SA, Redelman D, Hunter KW Jr. *The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary*

*tumours and metastatic tumour foci*. Int J Exp Pathol. 2007;88(5):351-60.

DuPré SA, Hunter KW Jr. *Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors*. Exp Mol Pathol. 2007; 82(1):12-24.

Eccles SA, Box G, Court W, Sandle J, Dean CJ. *Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease*. Cell Biophys. 1994; 24-25:279-291.

Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. Curr Opin Cell Biol. 2010; 22(5):697-706

Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. *The role of cytokines in breast cancer development and progression*. J Interferon Cytokine Res. 2015;35(1):1-16.

Fairchild KD, Saucerman JJ, Raynor LL, Sivak JA, Xiao Y, Lake DE, Moorman JR. *Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009; 297(4):R1019-27.

Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. *Collagen as a double-edged sword in tumor progression*. Tumour Biol. 2014; 35(4):2871-82.

Farber JM. *Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes*. J Leukoc Biol. 1997; 61(3):246-57.

Feng L, Xia Y, Wilson CB. *Alternative splicing of the NC1 domain of the human alpha 3(IV) collagen gene. Differential expression of mRNA transcripts that predict three protein variants with distinct carboxyl regions.* J Biol Chem. 1994; 269(3):2342-8.

Fichtner I, Tanneberger S. *Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy in the murine Lewis lung carcinoma and possible implications for clinical use.* Anticancer Research. 1987; 7: 227–33.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D. *Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance.* Nature. 2015; 26;527(7579):472-6.

Finkelman FD, Madden KB, Morris SC, Holmes JM, Boiani F, Katona IM, Maliszewski CR. *Anti-cytokine antibodies as carrier proteins: Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of antibody complexes.* J. Immunol. 1993; 151: 1235.

Florin L, Pegel A, Becker E, Hausser A, Olayioye MA, Kaufmann H. *Heterologous expression of the lipid transfer protein CERT increases therapeutic protein productivity of mammalian cells.* J Biotechnol. 2009; 141(1-2):84-90.

Fugmann T, Hausser A, Schöffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. *Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein.* J Cell Biol. 2007; 178(1):15-22.

Gao ZG, Tian L, Hu J, Park IS, Bae YH. *Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles*. J Control Release. 2011; 152(1):84-9.

García KC, Teyton L, Wilson IA. *Structural basis of T cell recognition*. Annu Rev Immunol. 1999; 17: 369-397.

Gordon S. *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol. 2003; 3:23-35.

Gorelik E, Segal S, Feldman M. *Control of lung metastases progression in mice: role of growth kinetic of 3LL Lewis lung carcinoma and host immunity reactivity*. J Natl Cancer Inst. 1980; 65: 1257–64.

Gozalbo R. *Hacia la caracterización del epítipo del autoantígeno en el Síndrome de Goodpasture*. 2014. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Granero F, Revert F, Revert-Ros F, Lainez S, Martínez-Martínez P, Saus J. *A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein*. FEBS. 2005; 272(20):5291-305.

Granero-Moltó F, Sarmah S, O'Rear L, Spagnoli A, Abrahamson D, Saus J, Hudson BG, Knapik EW. *Goodpasture antigen-binding protein and its spliced variant, ceramide transfer protein, have different functions in the modulation of apoptosis during zebrafish development*. J Biol Chem. 2008; 283(29):20495-504.

Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. *Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung*.

Cancer Cell. 2011; 20(3):300-14.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell. 2010; 140: 883–899.

Gupta GP, Massagué J. *Cancer metastasis: building a framework*. Cell. 2006; 127(4):679-95.

Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. *The evolving portrait of cancer metastasis*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005; 70:291-7.

Hanada K. *Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT*. Biochim Biophys Acta. 2014;1841(5):704-19.

Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T. *CERT-mediated trafficking of ceramide*. Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1791:684–91.

Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. *Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide*. Nature. 2003; 426:803–9.

Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell. 2000; 100(1):57-70.

Hawes D, Neville AM, Cote RJ. *Detection of occult metastasis in patients with breast cancer*. Semin Surg Oncol. 2001; 20(4):312-8.

Heppner GH, Miller FR, Malathy Shekhar PV. *Nontransgenic models of breast cancer*. Breast Cancer Res. 2000; 2(5): 331–334.

Himmele JC, Rabenhorst B, Werner D. *Inhibition of Lewis lung tumor growth and metastases by Ehrlich ascites tumor growth in the same host*. J Cancer Res Clin. Oncol. 1986; 111:160–65.

Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. *Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model*. Clin Cancer Res. 2004; 10(13):4559-67.

Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. *Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis*. Nat Cell Biol. 2006; 8(12):1369-75.

Hoffman RM. *Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic*. Invest New Drugs. 1999; 17(4):343-359.

Hosch SB, Braun S, Pantel K. *Characterization of disseminated tumor cells*. Semin Surg Oncol. 2001; 20(4):265-71.

Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. J Biol Chem. 1993; 268(35):26033-6.

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. *Alport's syndrome. Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. N Engl J Med. 2003; 348:2543–56.

Huston DP. *The biology of the immune system*. JAMA. 1997; 10;278(22):1804-14.

Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer. 2005; 103(5):884-91.

Janni W, Rack B, Lindemann K, Harbeck N. *Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time?* Oncologist. 2005; 10(7):480-92.

Jia Y, Yuan M, Yuan H, Huang X, Sui X, Cui X, Tang F, Peng J, Chen J, Lu S, Xu W, Zhang L, Guo Q. *Co-encapsulation of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery*. Int. J. Nanomedicine. 2012; 7:1697–1708.

Jiang D, Lim SY. *Influence of Immune Myeloid Cells on the Extracellular Matrix During Cancer Metastasis*. Cancer Microenviron. 2016;9(1):45-61.

Jones-Paris CR, Paria S, Berg T, Saus J, Bhave G, Paria BC, Hudson BG. *Embryo implantation triggers dynamic spatiotemporal expression of the basement membrane toolkit during uterine reprogramming*. Matrix Biol. 2017; 57-58:347-365.

Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. *Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells*. Int J Cancer. 2014; 134(7):1669-82.

Joyce JA, Pollard JW. *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer. 2009; 9(4):239-52.

Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology. 2008; 123(3):326-38.

Kalluri R, Sun MJ, Hudson BG, Neilson EG. *The Goodpasture autoantigen. Structural delineation of two immunologically privileged epitopes on alpha3(IV) chain of type IV collagen*. J Biol Chem. 1996; 271(15):9062-8.

Kalluri R. *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer. 2003; 3(6):422-33.

Kamby C, Dirksen H, Vejborg I, Daugaard S, Guldhammer B, Rossing N, Mouridsen HT. *Incidence and methodologic aspects of the occurrence of liver metastases in recurrent breast cancer*. Cancer. 1987; 59:1524-29.

Kanekura K, Nishimoto I, Aiso S, Matsuoka M. *Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8)*. J Biol Chem. 2006; 281(40):30223-33.

Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. *Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond*. Cancer Metastasis Rev. 2006; 25(4):521-9.

Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K. *Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi*

*apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT.* J Biol Chem. 2006; 281(40):30279-88.

Kellar A, Egan C, Morris D. *Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications.* Biomed Res Int. 2015; 621324.

Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. *Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS.* Blood. 2005; 106(5):1864-6.

Kershaw MH, Jackson JT, Haynes NM, Teng MW, Moeller M, Hayakawa Y, Street SE, Cameron R, Tanner JE, Trapani JA, Smyth MJ, Darcy PK. *Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer.* J. Immunol. 2004; 173:2143–2150.

Kiers D, Koch RM, Hamers L, Gerretsen J, Thijs EJ, van Ede L, Riksen NP, Kox M, Pickkers P. *Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin.* Sci Rep. 2017; 7:40149.

Knudson W, Biswas C, Toole BP. *Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81(21):6767-71.

Kobayashi Y. *The role of chemokines in neutrophil biology.* Front Biosci. 2008; 13:2400-7.

Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T, Bou-Reslan H, Kallop D, Weimer R, Ludlam MJ, Kaminker JS, Modrusan Z, van Bruggen N, Peale FV, Carano R, Meng YG, Ferrara N. *Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung*

*metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(50):21248-55.

Kristen L. Dennis, Nichole R. Blatner, Fotini Gounari, Khashayarsha Khazaie. *Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer.* Curr Opin Oncol. 2013; 25(6): 637–645.

Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. *Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer.* J Surg Res. 2011; 167:e211–e219.

Lamour NF, Stahelin RV, Wijesinghe DS, Maceyka M, Wang E, Allegood JC, Merrill AH Jr, Cho W, Chalfant CE. *Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis.* J Lipid Res. 2007; 48(6):1293-304.

Lechner M, Lirk P, Rieder J. *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin.* Semin Cancer Biol. 2005; 15(4):277-89.

Lee AJ, Roylance R, Sander J, Gorman P, Endesfelder D, Kschischo M, Jones NP, East P, Nicke B, Spassieva S, Obeid LM, Birkbak NJ, Szallasi Z, McKnight NC, Rowan AJ, Speirs V, Hanby AM, Downward J, Tooze SA, Swanton C. *CERT depletion predicts chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and polyploid-specific cancer cell death through autophagy induction.* J Pathol. 2012; 226(3):482-94.

Lee EJ, Lee SJ, Kim S, Cho SC, Choi YH, Kim WJ, Moon SK. *Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells*

via ERK1/2-mediated MMP-9/NF- $\kappa$ B/AP-1 pathway: involvement of the p21WAF1 expression. *Cell Signal*. 2013; 25(10):2025-38.

Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reenders ST. *Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains*. *J Biol Chem*. 1994; 269(42):26172-7.

Lelekakis M, Moseley J, Martin T, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller F, Slavin J, Anderson R. *A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone*. *Clin. Exp. Metastasis*. 1999; 17:163-170.

Li L, Shin DM, Fidler IJ. *Intrabronchial implantation of the Lewis lung tumor cell does not favor tumorigenicity and metastasis*. *Invasion Metastases*. 1990; 10: 129–41.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. *Colony-stimulating factor promotes progression of mammary tumors to malignancy*. *J Exp Med*. 2001; 193: 727–739.

Lippman MM, Laster WR, Abbott BJ, Venditti J, Baratta M. *Antitumor activity of macromomycin B (NSC 170105) against murine leukemias, melanoma, and lung carcinoma*. *Cancer Res*. 1975;35:939–945.

Liu M, Jin X, He X, Pan L, Zhang X, Zhao Y. *Macrophages Support Splenic Erythropoiesis in 4T1 Tumor-Bearing Mice*. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121921.

Liu X, Wu Z, Zuo S, Zhou Y, Chen Y, Wang X. *Establishment of orthotopic Lewis lung cancer model in mouse*. Chin J Lung Cancer. 2010; 13:42–47.

Loewen CJ, Roy A, Levine TP. *A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP*. EMBO J. 2003; 22(9):2025-35.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression*. J Cell Biol. 2012; 20;196(4):395-406.

Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee SH, Dolman C, Markowitz D, Wu W, Liu C, Reisfeld RA, Xiang R. *Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer*. J Clin Invest. 2006; 116:2132–2141.

Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Liao D, Markowitz D, Liu C, Chen T, Chuang TH, Xiang R, Reisfeld RA. *The Role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression*. Oncogene. 2010; 29(5): 662–673.

Macías J. *GPBP circulante, un nuevo factor patógeno en las glomerulonefritis mediadas por inmunocomplejos*. 2014. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Mackie EJ, Chiquet-Ehrismann R, Pearson CA, Inaguma Y, Taya K, Kawarada Y, Sakakura T. *Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(13):4621-5.

Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. *Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer*. Trends Biotechnol. 2015; 33(4):230-6.

Maniwa Y, Okada M, Ishii N, Kiyooka K. *Vascular endothelial growth factor increased by pulmonary surgery accelerates the growth of micrometastases in metastatic lung cancer*. Chest. 1998; 114(6):1668-75.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. *Macrophage polarization: tumor-associated macrophage as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol. 2002; 23(11):549–555.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Cancer-related inflammation*. Nature. 2008; 454:436–444.

Mantovani A, Sica A, Locati M. *Macrophage polarization comes of age*. Immunity. 2005; 23(4):344–346

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol. 2004; 25(12):677–686.

Mao M, Alavi MV, Labelle-Dumais C, Gould DB. *Type IV Collagens and Basement Membrane Diseases: Cell Biology and Pathogenic Mechanisms*. Curr Top Membr. 2015; 76:61-116.

Mastria EM, Chen M, McDaniel JR, Li X, Hyun J, Dewhirst MW, Chilkoti A. *Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit*

*metastasis in two murine models of carcinoma*. J Control Release. 2015; 208:52-8.

Matsuura M, Saito S, Hirai Y, Okamura H. *A pathway through interferon- $\gamma$  is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells*. Eur. J. Biochem. 2003; 270:4016–4025.

Mayo JG. *Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor*. Cancer Chemother Rep 2. 1972; 3(1):325-30.

McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. *Modulation of macrophage phenotype by cell shape*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 22;110(43):17253-8.

Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. *Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer*. Oncotarget. 2014; 5(9):2736-49.

Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. *Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition*. Mol Biol Cell. 2007; 18: 4615–4624.

Mencarelli C, Bode GH, Losen M, Kulharia M, Molenaar PC, Veerhuis R, Steinbusch HW, De Baets MH, Nicolaes GA, Martinez-Martinez P. *Goodpasture antigen-binding protein/ceramide transporter*

*binds to human serum amyloid P-component and is present in brain amyloid plaques.* J Biol Chem. 2012; 287(18):14897-911.

Mencarelli C, Hammels C, Van Den Broeck J, Losen M, Steinbusch H, Revert F, Saus J, Hopkins DA, De Baets MH, Steinbusch HW, Martinez-Martinez P. *The expression of the Goodpasture antigen-binding protein (ceramide transporter) in adult rat brain.* J Chem Neuroanat. 2009; 38(2):97-105.

Mencarelli C, Losen M, Hammels C, De Vry J, Hesselink MK, Steinbusch HW, De Baets MH, Martínez-Martínez P. *The ceramide transporter and the Goodpasture antigen binding protein: one protein--one function?* J Neurochem. 2010; 113(6):1369-86.

Miller FR, Miller BE, Heppner GH. *Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability.* Invasion Metastasis. 1983; 3:22–31.

Miller FR. *Tumor subpopulation interactions in metastasis.* Invasion Metastasis. 1983; 3:234–242.

Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massagué J. *Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(16):6740-5.

Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J. *Distinct organ-specific*

*metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors.* J Clin Invest. 2005; 115(1):44-55.

Miralem T, Gibbs PE, Revert F, Saus J, Maines MD. *Human biliverdin reductase suppresses Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) kinase activity: the reductase regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -NF-kappaB-dependent GPBP expression.* J Biol Chem. 2010; 285(17):12551-8.

Monboisse JC, Oudart JB, Ramont L, Brassart-Pasco S, Maquart FX. *Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy.* Biochim Biophys Acta. 2014; 1840(8):2589-98.

Mori M, Morris SC, Orekhova T, Marinaro M, Giannini E, Finkelman FD. *IL-4 promotes the migration of circulating B cells to the spleen and increases splenic B cell survival.* J Immunol. 2000; 164(11):5704-12.

Nesbit M, Schaider H, Miller TH, Herlyn M. *Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in non-tumorigenic melanoma cells.* J Immunol. 2001; 166(11):6483–6490.

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.* Nat Rev Cancer. 2009; 9(4):274-84.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. *Angiostatin: A novel*

*angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. Cell. 1994; 79: 315–25.

Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. *Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop*. BMC Cancer. 2013; 26;13:154.

Öhlund D, Lundin C, Ardnor B, Oman M, Naredi P, Sund M. *Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer*. Br J Cancer. 2009; 7;101(1):91-7.

Orner BP, Ernst JT, Hamilton AD. *Toward proteomimetics: terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an alpha-helix*. J Am Chem Soc. 2001; 123(22):5382-3.

Ostrand-Rosenberg S. *Immune surveillance: a balance between pro-tumor and antitumor immunity*. Curr Opin Genet Dev. 2008; 18:11-8.

Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. *TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4*. Cell. 2008; 133(1):66-77.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. Cancer Lett. 2007; 253(2):180-204.

Panni RZ, Linehan DC, DeNardo DG. *Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer*. Immunotherapy. 2013; 5(10):1075-87.

Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, Wieslander J, Kashtan C, Borza DB, Neilson EG, Wilson CB, Hudson BG. *Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis*. N Engl J Med. 2010; 22;363(4):343-54.

Penadés JR, Bernal D, Revert F, Johansson C, Fresquet VJ, Cervera J, Wieslander J, Quinones S, Saus J. *Characterization and expression of multiple alternatively spliced transcripts of the Goodpasture antigen gene region. Goodpasture antibodies recognize recombinant proteins representing the autoantigen and one of its alternative forms*. Eur J Biochem. 1995; 229(3):754-60.

Perdiguero EG, Geissmann F. *The development and maintenance of resident macrophages*. Nat Immunol. 2016; 17(1):2-8.

Perry RJ, Ridgway ND. *Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein*. Mol Biol Cell. 2006; 17(6):2604-16.

Psaila B, Lyden D. *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat Rev Cancer. 2009; 9(4):285-93.

Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. *Mouse 4T1 breast tumor model*. Curr Protoc Immunol. 2001; Chapter 20:Unit 20.2.

Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. *Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines*. Cancer Res. 1998; 58:1486-1493.

Quail DF, Joyce JA. *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med. 2013;19(11):1423-37.

Quinones S, Bernal D, García-Sogo M, Elena SF, Saus J. *Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha3(IV)NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction*. J Biol Chem. 1992; 267(28):19780-4. Erratum in: J Biol Chem. 1994;269(25):17358.

Rao RP, Yuan C, Allegood JC, Rawat SS, Edwards MB, Wang X, Merrill AH Jr, Acharya U, Acharya JK. *Ceramide transfer protein function is essential for normal oxidative stress response and lifespan*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(27):11364-9.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. *Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus*. Cell. 1978;15(1):261-7.

Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, Graham L, Yamada A, Spiegel S, Bear HD, Takabe K. *Resection of the primary tumor improves survival in metastatic breast cancer by reducing overall tumor burden*. Surgery. 2013; 153(6):771-8.

Raya A, Revert F, Navarro S, Saus J. *Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen*. J Biol Chem. 1999; 274(18):12642-9.

Raya A, Revert-Ros F, Martinez-Martinez P, Navarro S, Rosello E, Vieites B, Granero F, Forteza J, Saus J. *Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an*

*alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis.* J Biol Chem. 2000;275(51):40392-9.

Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Nguyen VD, Latva-Ranta M, Ruddock L.A *molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors.*J Cell Biol. 2007; 179(6):1193-204. Erratum in: J Cell Biol. 2008; 180(3):645.

Real LM, Jimenez P, Kirkin A, Serrano A, García A, Cantón J, Zeuthen J, Garrido F, Ruiz-Cabello F. *Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient.* Cancer Immunol Immunother. 2001; 49(11):621-8.

Revert F, Merino R, Monteagudo C, Macias J, Peydró A, Alcácer J, Muniesa P, Marquina R, Blanco M, Iglesias M, Revert-Ros F, Merino J, Saus J. *Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane.* Am J Pathol. 2007;171(5):1419-30.

Revert F, Penadés JR, Plana M, Bernal D, Johansson C, Itarte E, Cervera J, Wieslander J, Quinones S, Saus J. *Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinases.* J Biol Chem. 1995;270(22):13254-61.

Revert F, Ventura I, Martínez-Martínez P, Granero-Moltó F, Revert-Ros F, Macías J, Saus J. *Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms.* J Biol Chem. 2008;283(44):30246-55.

Revert-Ros F, López-Pascual E, Granero-Moltó F, Macías J, Breyer R, Zent R, Hudson BG, Saadeddin A, Revert F, Blasco R, Navarro C, Burks D, Saus J. *Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) directs myofibril formation: identification of intracellular downstream effector 130-kDa GPBP-interacting protein (GIP130)*. J Biol Chem. 2011;286(40):35030-43.

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiol Rev. 1996; 76(1):69-125.

Rószler T. *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm. 2015; 2015: 816460.

Rutgers EJTh, Van Slooten EA, Kluck HM. *Follow-up treatment of primary breast cancer*. Br. J. Surg. 1989; 76:187-190.

Saito S, Matsui H, Kawano M, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K, Echigo S, Tamura S, Kobayashi T. *Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes*. J Biol Chem. 2008;283(10):6584-93

Saito S, Matsuura M, Hirai Y. *Regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production by activation of repressor element GA-12 through hyperactivation of the ERK pathway*. Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(8):876-83.

Salant DJ. *Immunopathogenesis of crescentic glomerulonephritis and lung purpura*. *Kidney Int.* 1987; 32(3):408-25.

Saus J, Fustero S, Sanz-Cervera JF, Pérez-Paya E, Blasco R, Revert-Ros F y Revert F. *GPBP inhibition using Q2 peptidomimetics*. 2011. Número de solicitud: PCT/EP2010/006757. Número de publicación: WO2011/054530 A1.

Saus J, Revert F. *Goodpasture antigen binding protein and its detection*. 2010. Número de solicitud: PCT/EP2009/005258. Número de publicación: WO 2010/009856 A3.

Saus J, Revert F, Revert-Ros F. *Novel Goodpasture antigen-binding protein isoforms and protein misfolded-mediated disorders*. 2004. Número de solicitud: PCT/EP04/01074. Número de publicación: WO 2004/070025.

Saus J, Revert-Ros F, Revert F, Aguado-Velasco C, López-Pascual E, Pérez-Sastre A, Blasco R, Pérez-Montoyo H. *GPBP-1 inhibition and its therapeutic use*. 2014. Número de solicitud: PCT/EP2013/063892. Número de publicación: WO 2014/006020.

Saus J, Wieslander J, Langeveld JP, Quinones S, Hudson BG. *Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV*. *J Biol Chem.* 1988; 263(26):13374-80.

Saus, J. *Goodpasture antigen binding protein*. 2000. Número de solicitud: PCT/IB00/00324. Número de publicación: WO00/50607.

Savai R, Langheinrich AC, Schermuly RT, et al. *Evaluation of angiogenesis using micro-computed tomography in a xenograft mouse model of lung cancer*. Neoplasia. 2009; 11:48–56.

Savai R, Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hänze J, Voswinckel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, Seeger W, Rose F. *Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography*. Am J Pathol. 2005; 167(4):937-46.

Sceneay J, Smyth MJ, Möller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. Cancer Metastasis Rev. 2013; 32(3-4):449-64.

Schroeder HW, Cavacini L. *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125:S41–S52.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell. 2010; 140(6):821-32.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature. 2001; 410(6832):1107-11.

Shi J, Ren Y, Zhen L, Qiu X. *Exosomes from breast cancer cells stimulate proliferation and inhibit apoptosis of CD133+ cancer cells in vitro*. Mol Med Rep. 2015; 11(1):405-9.

Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL, Weigert MG. *The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity*. Nature. 1987; 328(6133):805-11.

Sica A, Mantovani A. *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest. 2012; 122(3):787-95.

Sleeman JP. *The metastatic niche and stromal progression*. Cancer Metastasis Rev. 2012; 31(3-4):429-40.

Soccio RE, Breslow JL. *StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism*. J Biol Chem. 2003; 278(25):22183-6.

Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR, Pantel K. *Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(4):2246-51.

Solár P, Hřčková G, Koptašíková L, Velebný S, Solárová Z, Bačkor M. *Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells in vitro: Anticancer and hepatoprotective effects of atranorin in vivo*. Chem Biol Interact. 2016; 250:27-37.

Stewart TJ, Liewehr DJ, Steinberg SM, Greenelch KM, Abrams SI. *Modulating the expression of IFN regulatory factor 8 alters the protumorigenic behavior of CD11b+Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol. 2009; 183(1):117-28.

Storey BT, Pittman HK, Christian JF, Haisch CE, Verbanac KM. *Characterization of Lewis lung clonal variants in a model of syngeneic pulmonary murine metastases*. Clin Exp Metastasis. 2004;21(3):265-73

Sugiura K, Stock CC. *Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors.* Cancer Res. 1955; 15: 38–51.

Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, Elustondo F, Chang J, Temple J, Ahmed AA, Brenton JD, Downward J, Nicke B. *Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs.* Cancer Cell. 2007; 11(6):498-512.

Tanjore H, Kalluri R. *The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis.* Am J Pathol. 2006; 168(3):715-7.

Talmadge JE, Fidler IJ. *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.* Cancer Res. 2010; 70(14):5649-69.

Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. *Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer.* BMC Cancer. 2008;8:228.

Taudorf S, Krabbe KS, Berg RM, Pedersen BK, Møller K. *Human models of low-grade inflammation: bolus versus continuous infusion of endotoxin.* Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(3):250-5.

Theofilopoulos AN, Dixon FJ. *Murine models of systemic lupus erythematosus.* Adv Immunol. 1985; 37:269-390.

Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer Res. 2005; 65(14):5991-5.

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. *A network model for the organization of typeIVcollagen molecules in basement membranes*. Eur J Biochem. 1981; 120(2):203-11.

Tlsty TD, Coussens LM. *Tumor stroma and regulation of cancer development*. Annu Rev Pathol. 2006; 1:119-50.

Tomin R, Donegan WL. *Screening for recurrent breast cancer-its effectiveness and prognostic value*. J. Clin. Oncol. 1987; 5:62-67.

Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. *Spatiotemporal regulation of epithelial–mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis*. Cancer Cell. 2012; 22: 725–736.

Tsai JH, Yang J. *Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis*. Genes Dev. 2013; 27(20): 2192–2206.

Van den Boogaard M, Ramakers BP, Van Alfen N, Van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, Verbeek MM, Schoonhoven S, Van der Hoeven JG, Pickkers P. *Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain*. Crit Care. 2010; 14(3): R81.

Vanacore R, Ham AJ, Voehler M, Sanders CR, Conrads TP, Veenstra TD, Sharpless KB, Dawson PE, Hudson BG. *A sulfilimine bond identified in collagen IV*. Science. 2009; 325(5945):1230-4.

Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA. *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev. 2004; 18: 1131–1143.

Vernon AE, Bakewell SJ, Chodosh LA. *Deciphering the molecular basis of breast cancer metastasis with mouse models*. Rev Endocr Metab Disord. 2007; 8(3):199-213.

Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. *Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism*. PLoS One. 2011; 6(11):e27690.

Wang D, DuBois RN. *Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment*. Carcinogenesis. 2015; 36(10):1085-93.

Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R, Wang, Y. *Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages*. Cell Res. 2010; 20: 701-712.

Wang X, Rao RP, Kosakowska-Cholody T, Masood MA, Southon E, Zhang H, Berthet C, Nagashim K, Veenstra TK, Tessarollo L, Acharya U, Acharya JK. *Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice*. J Cell Biol. 2009; 184(1):143-58.

Wang ZN, Xu HM. *Relationship between collagen IV expression and biological behavior of gastric cancer*. World J Gastroenterol. 2000; 6(3):438-439.

Wieslander J, Langeveld J, Butkowski R, Jodlowski M, Noelken M, Hudson BG. *Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. Cryptic properties of the Goodpasture antigen*. J Biol Chem. 1985; 260(14):8564-70.

Wyles JP, McMaster CR, Ridgway ND. *Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem. 2002; 277(33):29908-18.

Wynn TA, Vannella KM. *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. Immunity. 2016; 44(3):450-62.

Xiao Q, Ge G. *Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis*. Cancer Microenviron. 2012; 5(3): 261–273.

Yamashina K, Heppner GH. *Correlation of frequency of induced mutation and metastatic potential in tumor cell lines from a single mouse mammary tumor*. Cancer Res. 1985; 45(9):4015-9.

Yang Y, Pan D, Luo K, Li L, Gu Z. *Biodegradable and amphiphilic block copolymer-doxorubicin conjugate as polymeric nanoscale drug delivery vehicle for breast cancer therapy*. Biomaterials. 2013; 34(33):8430-43.

Yoshimoto Y, Kawada M, Ikeda D, Ishizuka M. *Involvement of doxorubicin-induced Fas expression in the antitumor effect of doxorubicin on Lewis lung carcinoma in vivo* Int. Immunopharmacol. 2005; 5:281–288.

Yoshimura T, Howard OM, Ito T, Kuwabara M, Matsukawa A, Chen K, Liu Y, Liu M, Oppenheim JJ, Wang JM. *Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells*. PLoS One. 2013; 8(3): e58791.

Zhang BC, Gao J, Wang J, Rao ZG, Wang BC, Gao JF. *Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma*. Med Oncol. 2011; 28:1447–1452.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol. 2008; CHAPTER: Unit–14.1.

Zhang Z, Hatori T, Nonaka H. *An experimental model of brain metastasis of lung carcinoma*. Neuropathology. 2008; 28:24–28.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature. 2015 26;527(7579):525-30.

