



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención en Ciencias Fisiológicas

“Mímica vasculogénica presenta una arquitectura interna diferente de vasos sanguíneos y requiere de la señalización de la matriz extracelular para su formación”

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Ciencias Fisiológicas

Por

ANDRES FELIPE VALDIVIA ROMAN

Tutor de Tesis : Dr. Gareth Owen
Co-tutor : Dr. Alejandro Corvalan
Comisión de Tesis : Dra. Eugenia Morselli
: Dr. Ricardo Moreno
: Dr. Jaime Pereira

Agosto 2019

Dedicatoria

Dedicada a Tata Guillermo, que sin su educación y cariño esta tesis no habría sido posible.

Que Descanse en Paz.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a los a todos los miembros actuales y pasados del laboratorio del Dr. Gareth Owen, así como también a todo el equipo del quinto piso de fisiología, que con su paciencia y dedicación me formaron desde mis tiempos de estudiante de pregrado: Bárbara Oliva, Pamela Gonzales, Carolina Ramírez, Claudio Correa, Maximiliano Arce, Felice Santoro, Miguel Córdova, Charlotte Hill y Camille Cabrolhier.

Me gustaría agradecer de forma especial a Rafaela Erices, Renan Orellana, Dusan Racordon, María Loreto Bravo, Ethel Velasquez, Sumie Kato y Mauricio Pinto por su constante ayuda y formación en el ámbito profesional, así como su apoyo emocional.

A todos los miembros actuales y pasados del equipo de Mímica Vasculogénica del laboratorio, equipo fundado por Dusan Racordon y yo, el cual creció más allá de lo que cualquiera de los dos esperábamos: Raúl Aravena, Gabriel Mingo, Varina Aldana, Alejandra Sandoval y Javiera Pradenas. Su apoyo y dedicación a este proyecto es invaluable y espero que nuestro grupo siga tan unido como ahora.

A los profesores Alejandro Corvalan, Francisco Nualart, Beatriz Sanchez, Alfonso Gonzales y al CORE de bioinformática de ACCDiS por su apoyo en el desarrollo de las metodologías presentadas en este trabajo y sus constantes retroalimentaciones para aumentar cada vez más la calidad de nuestro trabajo.

Al profeso Gareth Owen, por su infinita paciencia, dedicación y por creer en mí y motivarme para lograr finalizar esta empresa y no rendirme en el camino. Le estaré por siempre agradecido.

A mi profesor de wresling Cristian Gana y mi profesora de boxeo Brenda Lantano del gimnasio Santiago MMA, que me ayudaron a crecer, tanto en el ámbito físico como en el psicológico.

Finalmente, me gustaría agradecerle a mi familia, a mi madre Sandra Román, mi padre Julio Valdivia, mi hermana Aylin Valdivia y mi abuelo Guillermo Román. Este trabajo se los dedico a ustedes, los pilares fundamentales de mis creencias y convicciones. Gracias por creer en mi durante todo el proceso de mi doctorado, por darme ánimos y convicciones y mostrarme que no tenía que rendirme.

Índice de Materias

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I- | PORTADA | 1 |
| II- | DEDICATORIA | 2 |
| III- | AGRADECIMIENTOS..... | 3 |
| IV- | ÍNDICE DE MATERIAS | 4 |
| V- | ÍNDICE DE FIGURAS | 6 |
| VI- | ÍNDICE DE TABLAS | 8 |
| VII- | ÍNDICE FIGURAS, TABLAS Y VIDEOS SUPLEMENTARIOS | 9 |
| VIII- | LISTADO DE ABREVIATURAS | 10 |
| | | |
| 1- | RESUMEN | 12 |
| 1.1- | Abstract..... | 13 |
| 2- | INTRODUCCION | 14 |
| 2.1- | El cáncer de Ovario | 14 |
| 2.2- | Los canceres gastrointestinales | 15 |
| 2.3- | El desarrollo cancerígeno..... | 16 |
| 2.4- | La matriz extracelular y el cáncer..... | 17 |
| 2.5- | Irrigación Tumoral..... | 18 |
| 2.5.1- | El proceso de mímica vasculogénica | 21 |
| 2.5.2- | Vías de señalización de mímica vasculogénica..... | 26 |
| 2.5.3- | La controversia de mímica vasculogénica | 27 |
| 2.5.4- | Mímica vasculogénica y matriz extracelular..... | 28 |
| 3- | HIPÓTESIS | 30 |
| 4- | OBJETIVO GENERAL | 30 |
| 5- | OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 30 |
| 6- | MATERIALES | 34 |
| 7- | METODOS | 36 |
| 7.1- | Líneas celulares | 36 |
| 7.2- | Ensayo de mímicas vasculogénica <i>In vitro</i> | 37 |

| | |
|--|------------|
| 7.3- Ensayo de mímicas vasculogénica <i>In vitro</i> en matrices de proteína única y en presencia de inhibidores | 38 |
| 7.4- Tinción PAS | 38 |
| 7.5- Microinyección de colorantes | 39 |
| 7.6- Imágenes y videos confocal | 40 |
| 7.7- Reconstrucción por Micro CT | 41 |
| 7.8- Inmunofluorescencia de laminina y tinción con sirius red | 41 |
| 7.9- Extracción de RNA y RT-PCR | 42 |
| 7.10- Microarray | 43 |
| 7.11-Microscopia time-lapse | 44 |
| 8- RESULTADOS | 45 |
| 8.1- Establecer un modelo <i>in vitro</i> del proceso de mímica vasculogénica en células provenientes de cáncer gástrico y ovario | 45 |
| 8.2- Determinar si la estructura tubular y vías de señalización del proceso de mímica vasculogénica es distinta a la de angiogénesis..... | 64 |
| 8.3- Evaluar cambios en los niveles mRNA durante la formación del proceso de mímica vasculogénica | 76 |
| 8.4- Determinar si la matriz extracelular y sus componentes proteicos juegan un rol en la formación de estructuras tubulares | 81 |
| 8.5- Determinar si la señalización de la matriz extracelular es esencial en el proceso de formación de mímica vasculogénica <i>in vitro</i> | 88 |
| 9- DISCUSIÓN | 96 |
| 10- PROYECCIONES Y CONCLUSIONES | 107 |
| 11- ANEXOS | 108 |
| 12- PUBLICACIONES | 113 |
| 13- REFERENCIAS..... | 114 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representación esquemática de la estructura de vasos sanguíneos y vasos linfáticos | 20 |
| Figura 2: La presencia de VM se asocia con un mal pronóstico del paciente. | 24 |
| Figura 3: Reconstrucción por Micro-CT de estructuras formadas por la línea SKOV3 | 47 |
| Figura 4: Células HEY transfectadas con Zs-green (Hey-green) son capaces de formar estructuras tubulares. | 48 |
| Figura 5: Reconstrucción 3D por confocal de las estructuras tubulares formadas por la línea celular HEY | 50 |
| Figura 6: Las estructuras formadas por HEY a día 1 no presentan elevación y solo son conexiones intercelulares | 52 |
| Figura 7: Microinyección de colorante en las líneas celulares HEY y SKOV3 | 55 |
| Figura 8: Microinyección de distintas líneas celulares de cáncer de ovario | 57 |
| Figura 9: Caracterización del proceso de VM en cáncer gástrico..... | 60 |
| Figura 10: Las estructuras tubulares de VM de la línea celular AGS presentan un lumen en su interior | 61 |
| Figura 11: Células de cultivo primario son capaces formar estructuras tubulares..... | 63 |
| Figura 12: Caracterización del componente glicoproteico de las estructuras tubulares de la línea celular HEY | 66 |
| Figura 13: Caracterización del componente glicoproteico de las estructuras tubulares de la línea celular AGS..... | 68 |
| Figura 14: Las estructuras tubulares de la línea HEY-green no se tiñen con tinción sirius red | 70 |
| Figura 15: Las estructuras tubulares de la línea HEY-green son ricas en laminina..... | 72 |
| Figura 16: VEGF, PDGF y sus receptores no están involucrados en la formación de estructuras tubulares de VM..... | 74 |
| Figura 17: Vías de señalización involucradas con el proceso de angiogénesis no están involucradas en la formación de estructuras tubulares de VM..... | 75 |
| Figura 18: Estandarización del microarray de VM en línea celular de cáncer gástrico AGS | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19: Coatings de proteínas recombinantes no son suficientes para iniciar el proceso de VM | 82 |
| Figura 20: Geles formados a partir de laminina 1 son capaces de gatillar el proceso de formación de VM..... | 84 |
| Figura 21: Estructuras de VM generadas en geles de laminina 1 son funcionales | 86 |
| Figura 22: Cultivos primarios de cáncer de ovario son capaces de formar estructuras tubulares en laminina 1 y son funcionales | 87 |
| Figura 23: Análisis de la presencia de integrinas y su asociación con VM..... | 90 |
| Figura 24: Inhibidor de integrinas es capaz de bloquear parcialmente el proceso de VM..... | 93 |
| Figura 25: Inhibición farmacológica de distintas moléculas río abajo de la señalización por integrinas..... | 94 |
| Figura 26: Inhibición farmacológica de metaloproteasas es capaz de inhibir el proceso de VM | 95 |
| Figura 27: Representación esquemática mostrando las diferencias entre vasos sanguíneos, vasos linfáticos y estructuras de VM..... | 100 |
| Figura 28: Modelo preliminar de la formación de estructuras tubulares..... | 106 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla I: Top 10 genes up-regulated en análisis de microarray | 79 |
| Tabla II: Top 10 genes down-regulated en análisis de microarray | 80 |

Índice de Figuras, Tablas y Videos Suplementarios

| | |
|---|-----|
| Figura Suplementaria 1: Caracterización inicial del proceso de VM..... | 108 |
| Figura Suplementaria 2: VEGF y PDGF- β estimulan la formación de proyecciones en ensayo de angiogénesis | 109 |
| Figura Suplementaria 3: Inhibidores farmacológicos utilizados para inhibir vías de señalización de VM no afectan la viabilidad celular..... | 110 |
| Figura Suplementaria 4: Perfil de intensidad de una estructura tubular analizada por micro-CT | 111 |

Contenido en Línea

Tabla Suplementaria 1

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1ByaZF7bi11P1M0KN2P2r4uQHgJySvYjtgZ6vjGPbeB4/edit?usp=sharing>

Videos Suplementarios:

<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> (User: tesis; Password: valdivia)

Listado de abreviaturas

VM: Mímica Vasculogénica (*Vasculogenic Mimicry* or *Vascular Mimicry*)

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

PDGF: Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 Quinasa

PAS: Ácido Peryodico de Schiff (*Periodic Acid Schiff*)

RNA: Ácido Ribonucleico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

PBS: Tampón Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

TWEEN: Monolaurato de Polioxietilen- (20)- sorbito

cDNA: DNA complementario.

HCL: Ácido Clorhídrico

PCR: Reacción en Cadena Polimerasa

HIF-1 α : Factor Inducible por Hipoxia (*Hipoxia-Inducible Factor 1 Alfa*)

AKT: Proteína Quinasa B (*Protein Kinase B*)

FAK: Quinasa de Adhesión Focal (*Focal Adhesion Kinase*)

ECM: Matriz Extracelular (*Extracellular Matix*)

TFPI: Inhibidor de la Vía de Factor Tisular (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

VE-Cad: Cadherina de Endotelio Vascular (*Vascular Endothelial Cadherin*)

PKC: Proteína Quinasa C (*Protein Kinase C*)

EMT: Transición Epitelio-Mesénquima (*Epithelial Mesenchymal Transition*)

MMP: Metaloproteasas de Matriz: (*Matrix Metalloproteinases*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

ITG: Gen de Integrina (Integrin gen)

1- Resumen

La presencia de una vía de perfusión en ausencia de células endoteliales, conocida como mímica vasculogénica (VM), se correlaciona fuertemente con una baja supervivencia de pacientes. Se ha reportado que la VM no puede ocurrir en ausencia de matriz extracelular (ECM), sin embargo, los mecanismos por los cuales las células tumorales pueden crear estas estructuras en ausencia de células endoteliales siguen siendo desconocidos. Actualmente no existe ningún modelo *in vitro* estandarizado para el estudio de VM, y la mayoría de las publicaciones en la literatura reportan estructuras que no corresponden a VM. En esta tesis, utilizando un modelo *in vitro* estandarizado, buscamos comprender y diferenciar el proceso de VM de angiogénesis y estudiar si la señalización a través de la ECM es esencial para el proceso de iniciación de VM.

Utilizamos microscopía confocal y reconstrucción con IMARIS / ZEN 2012 para demostrar que las células cancerígenas pueden crear una red tubular en líneas celulares de cáncer y cultivos primarios de cáncer de ovario y gástrico. El uso de Matrigel y matrices 3D que contenían proteínas únicas, permitieron descifrar las proteínas de la matriz extracelular involucradas en la formación de VM. Las vías intercelulares se resolvieron utilizando inhibidores químicos.

Nuestros resultados indican que VM solo ocurre cuando las células se cultivan en cultivo 3D y solo el 23% de los cultivos primarios de cáncer son capaces de realizar este proceso. La presencia de laminina 1 es suficiente para desencadenar la formación de estructuras tubulares y esto puede implicar que la señalización por integrinas, así como las metaloproteasas (MMP) pueden tener un rol fundamental. Las vías de señalización de FAK y PI3K/AKT son necesarias para formar estructuras tubulares funcionales.

En resumen, demostramos que VM posee una estructura diferente a los vasos sanguíneos de angiogénesis. Laminina 1, un componente de la ECM, puede promover el proceso de VM, el cual además involucra la señalización de objetivos potenciales de la ruta PI3K. Como la VM se asocia con una reducción en la supervivencia del paciente, el esclarecimiento de los mecanismos de formación puede brindar nuevas terapias contra el cáncer.

1.1- Abstract

The presence of a perfusion pathway in absence of endothelial cells, known as vasculogenic mimic (VM), correlates with a poor patient survival. VM cannot occur in the absence of extracellular matrix (ECM), however, the mechanisms by which tumor cells can create these structures in the absence of endothelial cells remain unknown. Currently there is no standardized *in vitro* model for the study of VM, and most publications in the literature report structures that do not correspond to VM. Herein, using a standardized *in vitro* model, we sought to understand and differentiate the process of VM from angiogenesis and determine whether signaling through the ECM is essential for the initiation of the VM process.

We used confocal microscopy and reconstruction with IMARIS / ZEN 2012 to demonstrate that cancer cells can create a tubular network in both cancer cell lines and primary cultures of ovarian and gastric cancer. The use of Matrigel and 3D matrices containing unique proteins allowed the deciphering of the extracellular matrix proteins involved in VM formation. The intercellular pathways were resolved using chemical inhibitors.

Our results indicate that VM can only occurs when cells are grown in 3D culture. Only 30% of primary cancer cultures are able to undergo this process. We demonstrated that the presence of laminin 1 is sufficient to trigger the formation of tubular structures and this may imply that integrins and metalloproteases (MMP) play a fundamental role. The signaling pathways of FAK and PI3K / AKT are also necessary for the formation of functional tubular structures.

In summary, we demonstrate that VM possesses a different structure to blood vessels and that laminin 1, a component of the ECM, can promote the VM process. This process requires the PI3K pathway signaling. As VM is associated with a reduction in patient survival, the elucidation of the mechanisms of inhibition and formation of this process may provide new anti-cancer therapies.

2- Introducción

2.1- El cáncer de Ovario

Uno de los cánceres ginecológicos más mortales en el mundo corresponde al cáncer de ovario (1). Anualmente se diagnostican aproximadamente más de 200.000 nuevos casos de este cáncer a nivel mundial (1), mientras que en Estados Unidos, el cáncer de ovario epitelial es la quinta causa de muerte por cáncer entre las mujeres y la causa más común de muerte por cáncer ginecológico (2). Comúnmente, este cáncer es diagnosticado de forma tardía en estadio avanzado III/IV, donde los pacientes presentan una sobrevida inferior a 5 años en el 40% de los casos. Aproximadamente el 90% de los tumores de ovario primarios malignos son de origen epitelial (carcinomas), mientras que el otro 10% corresponde tumores originados de células germinales, estromales y de la granulosa (3,4). Además, dentro de las características clínicas el cáncer de ovario se presenta de forma frecuente como una masa quística compleja en la zona de la pelvis (3,5).

A diferencia de otros cánceres, el cáncer de ovario no se propaga comúnmente a través del torrente sanguíneo, sino que presenta crecimiento tumoral frecuentemente limitado a la cavidad abdominal (peritoneo) incluso en casos avanzados (5). Las células epiteliales que recubren el ovario están generalmente quiescentes y tienen un bajo índice proliferativo, posterior a la ruptura de los folículos maduros al liberar ovocitos, las células epiteliales están encargadas de proliferar para reparar el daño de la superficie del ovario (6).

Por un lado, los factores epidemiológicos que aumentan el número de ciclos ovulatorios son: el inicio de la menstruación temprana, menopausia tardía y la infertilidad, los que generan un aumento en el riesgo de padecer cáncer de ovario. Por otro lado, los factores que disminuyen la

ovulación como embarazos múltiples, lactancia prolongada y el uso de anticonceptivos orales, provocan una disminución de este riesgo (7).

La clasificación de tumores de ovario epiteliales que utilizan los anatomopatólogos se basa en la morfología de la célula tumoral. Dentro de esta clasificación se encuentran cuatro tipos principales de tumores epiteliales: seroso, endometriode, mucinoso y de célula clara, los cuales tienen mucha similitud a las células normales del epitelio de la trompa de Falopio, endometrio, endocérvix, y células del interior de la vagina respectivamente (8,9).

2.2- Los cánceres gastrointestinales

Los tumores gastrointestinales (GI) comprenden una familia de tumores que se originan a lo largo del tubo digestivo y pueden tener distintos orígenes dependiendo de su lugar de generación. Sus variantes van desde el cáncer de estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), colon y recto. Por un lado, los tumores de este tracto causan más muertes que los de cualquier otro sistema a lo largo del cuerpo, siendo el cáncer colon-rectal el tercero más común en occidente, comprendiendo el 9% de la carga de cáncer en ambos sexos. Por otro lado, el cáncer gástrico sigue manteniéndose como el quinto cáncer con mayor mortalidad en el mundo (1) con 952.000 muertes reportadas en el 2012. Además, el cáncer gástrico presenta variaciones en la incidencia y mortalidad dependiendo del área geográfica donde se presente, sugiriendo que esta enfermedad estaría fuertemente influenciada por el entorno (10).

Existen varias clasificaciones para el cáncer gástrico, siendo actualmente utilizada la creada por Lauren (11). En esta clasificación, basada en la histología del tejido, se consideran dos tipos de cáncer gástrico: el intestinal o expansivo y el difuso o infiltrativo. El de tipo intestinal es el predominante en las poblaciones de alto riesgo y es antecedido por un proceso pre-cancerígeno

(12) que comienza con la transformación de la mucosa normal en gastritis superficial, siguiendo con gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y finalmente displasia. Estas etapas de transformación secuencial son la base del modelo de carcinogénesis en cáncer gástrico (13). El tipo difuso es relativamente más frecuente en poblaciones de bajo riesgo y no es precedido de lesiones pre-cancerosas bien definidas o transformaciones (14).

Como se mencionó anteriormente, la etiología del cáncer gástrico tiene un fuerte componente medioambiental, variando su incidencia según la distribución geográfica (15). Entre los distintos factores que aumentan la incidencia de esta enfermedad se pueden mencionar: comida con alto contenido de sal y nitrato, consumo de cigarrillos e infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (16).

2.3-El desarrollo cancerígeno.

En el desarrollo de los distintos tipos de cáncer normalmente es posible distinguir varios pasos claramente identificables; entre ellos podemos nombrar el exceso de proliferación celular de un tejido debido a la aparición de células iniciadoras de tumores (o cáncer stem cells), procesos de des-diferenciación, pérdida y adquisición de distintos marcadores celulares, el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), procesos de migración e invasión celular, vascularización, y metástasis (17,18).

El proceso de EMT es un proceso fundamental en el desarrollo y en la progresión de enfermedades como el cáncer (19). Este está compuesto de distintos cambios biológicos que le permiten a la célula perder su diferenciación y cambiar su fenotipo de epitelial a uno mesenquimal (20). Las células epiteliales pueden ser identificadas por sus uniones intercelulares que permiten el mantenimiento de la integridad de los tejidos, mientras que las células

mesenquimales pueden identificarse por medio de su capacidad de migración e invasión y su falta de cohesión con otras células (21).

A nivel molecular, los cambios que permiten diferenciar los estados de las células son, en el caso de las células epiteliales, la presencia de E-Cadherina y conexiones estrechas (tight junctions) (19,22–25). Mientras que en el caso de las células mesenquimales, estas presentan ausencia de estos marcadores mencionados anteriormente, presentando además los marcadores N-Cadherina, Slug, Snail y metaloproteasas (MMPs) (26–28).

En el caso del cáncer, el EMT está descontrolado y es altamente agresivo, esto es esencial para el escape y migración de las células tumorales a la circulación y posterior generación de focos metastásicos en órganos distantes. Una vez en el órgano, las células cancerígenas que migraron revierten el proceso y vuelven a adquirir su fenotipo epitelial original (22,29).

2.4-La matriz extracelular y el cáncer.

La matriz extracelular (ECM) constituye una parte fundamental del microambiente celular. Está compuesta de una compleja y dinámica mezcla de glicoproteínas, proteoglicanos, colágeno y glicosaminoglicanos siendo su principal función la de proveer masa, forma y fuerza a los tejidos. Además, la ECM juega roles fundamentales en la señalización celular, regulación del comportamiento, polaridad, migración, proliferación y supervivencia celular. Por lo tanto, es posible observar que de forma *in vitro*, la mayoría de las células animales solo se pueden diferenciar a estructuras observadas *in vivo*, cuando éstas se siembran en superficies ricas en ECM (30,31). Además, se ha reportado en la literatura una familia de receptores heterodiméricos de transmembrana, conocidos como integrinas, los cuales tienen como función la conexión entre la ECM y el citoesqueleto, y las vías de señalización celular (30,32).

Entre los componentes de la ECM que tienen impacto en la señalización celular se encuentra la fibronectina, la cual puede estimular la diferenciación de las células endoteliales y la vascularización de cuerpos embrionarios. Por otro lado, la laminina puede incrementar la diferenciación de células troncales embrionales a cardiomiocitos funcionales (33). Estas proteínas señalizan a través del receptor de integrina $\beta 4$, para el caso de la laminina, y por el receptor de integrina $\beta 5$, en el caso de la fibronectina. Ambos receptores señalizan posteriormente al interior de la célula mediante la vía MEK-ERK (34).

Otro componente común de la ECM son los colágenos. Estos se clasifican del tipo I al XI y su función es proveer un soporte estructural a las demás proteínas de la ECM, sin embargo, también parecen jugar un rol importante en la señalización intracelular (35,36). Las integrinas no son los únicos receptores para las proteínas de ECM (37–39), ya que se conoce que algunas isoformas de laminina son capaces de unirse y señalizar por medio del complejo del receptor de dystroglicano (40). En el cáncer uno de los procesos esenciales en el desarrollo tumoral y metástasis, son el remodelamiento de la ECM y la degradación de la membrana basal por MMPs.

2.5- Irrigación Tumoral

Todas las células dentro de nuestro cuerpo requieren un suministro continuo de sangre que contenga oxígeno y nutrientes para que puedan prosperar. Para garantizar esto, un subconjunto de células puede sintetizar y segregar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en respuesta a ciertas condiciones, como niveles bajos de oxígeno (hipoxia). El VEGF secretado moviliza y activa las células endoteliales preexistentes, quienes forman nuevos vasos sanguíneos en un proceso llamado angiogénesis (41). En los tejidos normales, la angiogénesis juega un papel clave en el desarrollo fetal y la reparación de tejidos (42), como consecuencia,

este proceso está altamente conservado entre los mamíferos (43). Por otro lado las células cancerígenas son capaces de utilizar procesos fisiológicos normales como la angiogénesis para potenciar su supervivencia y propagación. De hecho, la “angiogénesis tumoral” se describió hace ochenta años y se ha confirmado ampliamente en una variedad de modelos experimentales, lo que demuestra que el crecimiento del tumor se acompaña de la formación de nuevos vasos sanguíneos (41,44).

Estos vasos están compuestos en su lado luminal por células endoteliales, estas a su vez están recubiertas por la membrana basal, y posteriormente los pericitos dan soporte estructural al vaso completo (45–47). Una representación esquemática de estos vasos puede ser observada en la figura 1.

Para identificar la presencia de vasos sanguíneos al interior de los tumores los marcadores más utilizados son los marcadores moleculares como el CD-31, CD-34, VE-Cadherina (VE-Cad) o el factor de von willebrand (48–52).

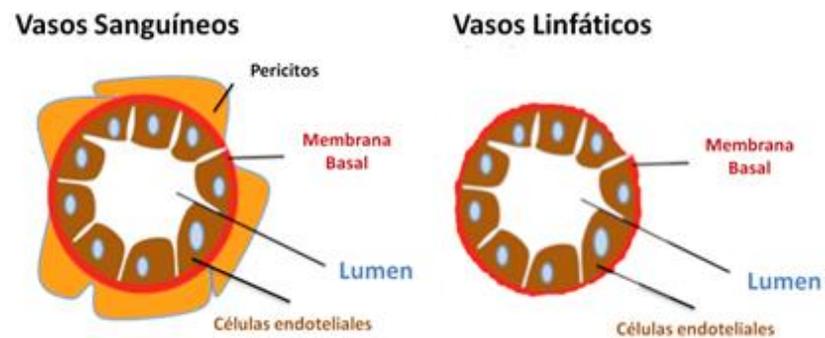


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Representación esquemática mostrando la composición de los vasos sanguíneos normales (panel izquierdo) y un vaso linfático (panel derecho). Los que poseen una complejidad más grande son los vasos sanguíneos, presentando pericitos, la membrana basal y finalmente el endotelio en lado luminal; por otro lado, los vasos linfáticos también están formados por endotelio, pero carecen de pericitos y presentan una membrana basal discontinua.

Esta nueva red de microvasos juega un rol fundamental en la progresión tumoral ya que aporta el oxígeno y nutrientes para la supervivencia de las células tumorales y proporciona una vía de diseminación hacia otros órganos y tejidos. En 1939, Ide y colaboradores postularon la idea de que debía existir un factor estimulante de angiogénesis proveniente del tumor, pero no fue hasta 1989 que los grupos de Ferrara y Connolly, en paralelo, descubrieron que esta molécula era el VEGF (53–55). En 1971, Folkman postuló la idea de la terapia anti-angiogénica, que consiste en evitar que este factor estimulante (VEGF) pueda actuar en los vasos sanguíneos, inhibiendo la angiogénesis y de esta forma impedir que el tumor pueda seguir creciendo y esparcirse hacia el resto del cuerpo (terapia anticancerígena) (56). Dentro de los inhibidores de angiogénesis aprobados por la FDA que se utilizan hoy en día tenemos Sunitinib, el cual inhibe la actividad de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y VEGF, y Bevacizumab (Avastin), el cual es un anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF evitando su señalización a través de los receptores de VEGFR-1 y 2 (57,58).

Si bien el modelo de angiogénesis y los factores que rigen su formación en cáncer están bien estudiados, existen otros modelos de perfusión tumoral como vasculogénesis y el proceso de mímica vasculogénica.

2.5.1- El proceso de mímica vasculogénica.

El término Vasculogenic Mimicry (también reportado como Vascular Mimicry) (VM) se usó originalmente para describir el proceso mediante el cual las células tumorales formaban una red de estructuras tubulares con la capacidad de conducir fluidos, por lo que "imitan" el proceso vasculogénico de las células endoteliales durante la angiogénesis. Varios estudios han reportado VM tanto *in vivo* como *in vitro* (ver tabla suplementaria I). Entre las funciones propuestas de

VM se encuentran: el suministro de oxígeno, el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos celulares, estas son todas funciones críticas requeridas en las primeras etapas de la tumorigénesis invasiva, que pueden no ser totalmente cubiertas por la angiogénesis convencional. A pesar de esto, el término VM se ha ampliado recientemente para incorporar cualquier estructura conductora de fluidos libre de células endoteliales (es decir, no un vaso sanguíneo). Esto debido a que un estudio reciente en ratones demostró que los macrófagos pueden sufrir un cambio fenotípico y adquirir la capacidad de formar estructuras conductoras de fluidos (59). Además, durante la formación de la placenta, las células trofoblásticas se infiltran en las paredes uterinas y forman estructuras tubulares libres de células endoteliales que se asemejan a VM (60), lo que sugiere que VM puede ser responsable del suministro de sangre y nutrientes en las primeras etapas del embarazo.

En 1999, Maniotis y colaboradores describieron en el melanoma uveal, un proceso de formación de estructuras tubulares conformadas por células cancerígenas y no por células endoteliales, las cuales eran capaces de conectarse a la circulación sanguínea e irrigar el tumor. Estas estructuras además tenían la característica de ser ricas en glicoproteínas de matriz como laminina y colágeno, lo que permitía identificarlas en cortes histológicos con tinción de Periodic Acid Schiff (PAS) en ausencia de marcadores endoteliales como CD-31 o CD-34. Además, la presencia de estas estructuras se correlacionó con una menor sobrevida de los pacientes en comparación a pacientes que solo poseen vasos sanguíneos conformados por endotelio (61).

Uno de los trabajos más completos en cuanto a la caracterización del fenómeno, es el de Sood y colaboradores en el que muestran en líneas celulares de cáncer de ovario la presencia de

estructuras tubulares con lumen. En este trabajo además muestran que existe una correlación entre la presencia de VM y una menor sobrevida general de los pacientes (62,63).

En el caso del cáncer gástrico, por otro lado, no existe ningún trabajo que describa o caracterice estructuras tubulares con lumen generadas *in vitro*. Sin embargo, el trabajo de Li Man y colaboradores mostró que existe también una correlación entre la presencia de estructuras tubulares y una menor sobrevida general de los pacientes con carcinoma gástrico (62).

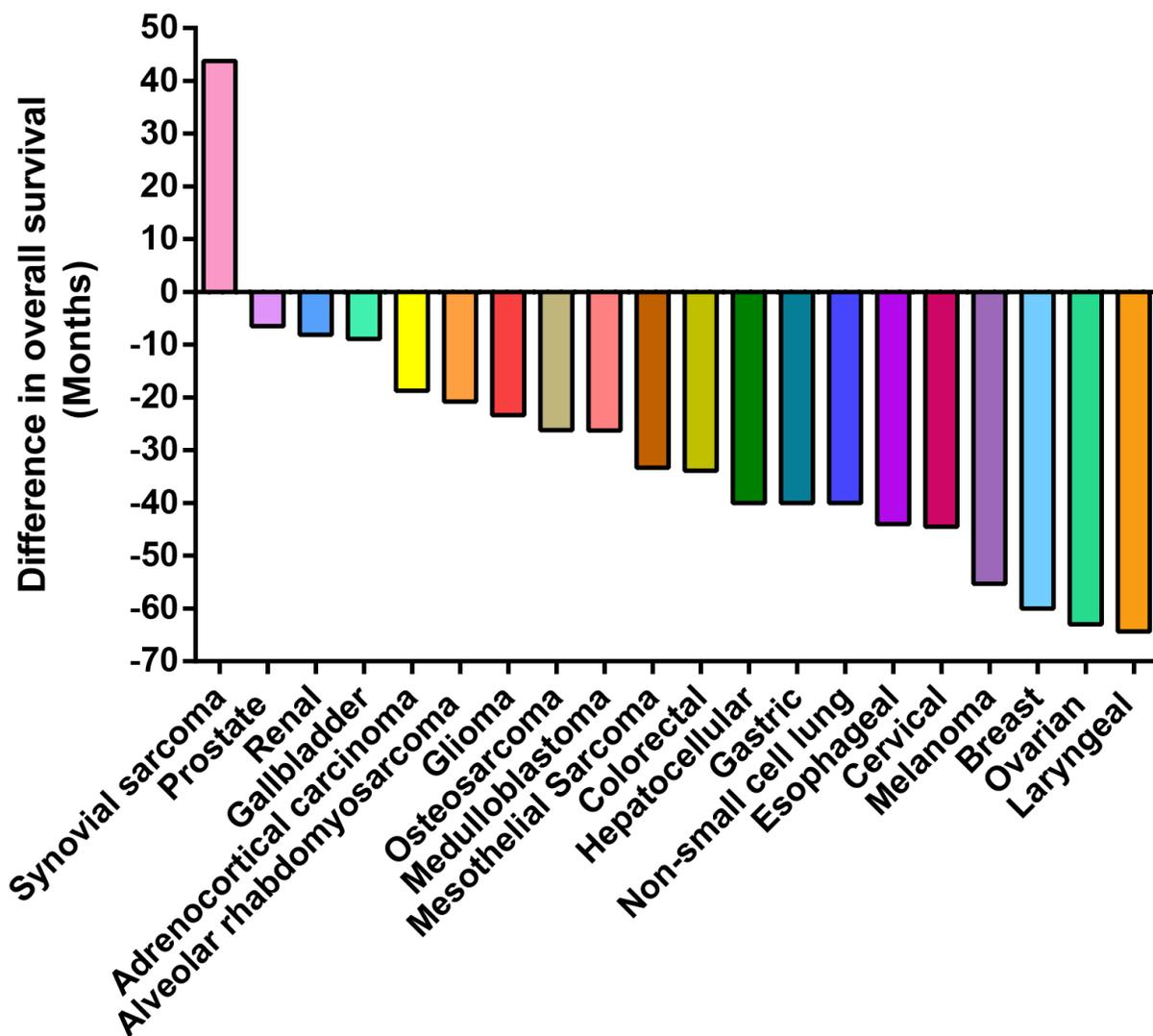


Figura 2: La presencia de VM se asocia con un mal pronóstico del paciente. Diagrama de cascada que presenta la diferencia en el tiempo de supervivencia (años) de los pacientes que presentan estructuras de VM en sus tumores. El valor cero representa la supervivencia del paciente en ausencia de VM. En los reportes hasta la fecha, VM tiene un impacto negativo en la supervivencia general de los pacientes en todos los tipos de cáncer, excepto uno (sarcoma sinovial).

Una gran cantidad de estudios indican que VM+ está asociado a una disminución en la supervivencia del paciente con cáncer, midiéndose como la sobrevida general (OS) o como supervivencia libre de progresión (PFS) (61). La Figura 2 compara los niveles de OS en VM+ versus VM- en 20 tipos de cáncer. En general, 19 de los 20 informes confirman que VM+ se asocia con una disminución en la OS; con la excepción del sarcoma sinovial (64).

Así mismo, los informes en cánceres de ovario y colorrectales clasificados como VM+ mostraron un tiempo de sobrevida menor en comparación con los tumores VM- (65,66). Se observaron diferencias similares en el rhabdomyosarcoma orbitario y en los carcinomas adrenocorticoideos (67,68). Los pacientes con cáncer gástrico con estructuras PAS+ eran propensos a presentar un mayor grado histológico, metástasis, recurrencia a distancia y 12 meses menos de OS acumulativo (69). De manera similar, los pacientes con cáncer de próstata VM+ se correlacionaron con una puntuación de Gleason más alta, niveles altos de antígeno prostático específico (PSA) preoperatorio y metástasis a distancia. Los estudios hasta la fecha provienen principalmente de la población china, aunque se han publicado informes aislados de poblaciones europeas, japonesas, norteamericanas y tailandesas. Sin embargo, como se observa en la incidencia de cáncer, las frecuencias del tipo de cáncer y la carga mutacional dentro de cada clasificación varían según la región y es necesario realizar más estudios para obtener una imagen más clara del valor pronóstico de la presencia de VM en una población específica. En resumen, el abrumador consenso en la literatura sugiere que la VM se observa con frecuencia en tumores altamente agresivos y se correlaciona con un pronóstico desfavorable. Por lo tanto, la explicación de los tratamientos específicos dirigidos a este subconjunto de células agresivas puede ofrecer un beneficio para los pacientes con cáncer en términos de supervivencia, esto hace

imperativo el establecimiento de modelos estandarizados para el estudio de VM tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.5.2- Vías de señalización de mímica vasculogénica.

En el área molecular, el proceso de VM aparenta tener una homogeneidad en las moléculas que rigen este fenómeno independiente del tipo de cáncer (62). Diversos autores han especulado sobre los componentes clave para la formación de VM. Por ejemplo, la presencia de VM y el mal pronóstico de los pacientes se ha correlacionado con la presencia en los tumores de TFPI-1 y TFPI-2. Experimentos con anticuerpos de inhibición revelaron que TFPI-2 era necesario para VM *in vitro*, y que el bloqueo de TFPI-2 suprimía la activación de MMP2 (70). Esto sugiere que la cascada de coagulación podría estar involucrada en VM.

Dada la presencia de estructuras tubulares conductoras de fluidos, VE-Cad también se ha asociado comúnmente a VM (71). VE-Cad es una proteína transmembrana de adhesión celular expresada clásicamente en células endoteliales (72). Hendrix y sus colegas describieron la presencia de VE-Cad en células de melanoma capaces de formar VM (73). Además, en este mismo tipo de cáncer se ha informado que VE-Cad promueve la señalización a través de VEGFR-1, que a su vez promueve la señalización de la ruta PI3K / PKC, que es crítica para VM (74,75). Sin embargo, a pesar de informes aislados, este campo todavía está abierto para más investigación con el fin de determinar si el proceso de VM está utilizando vías similares a la de angiogénesis o vasculogénesis.

La vía de señalización de Wnt y EMT, comúnmente implicadas en el cáncer, la angiogénesis y su desarrollo, también se han implicado en la formación de VM (76,77). Se ha demostrado que Wnt3a y β -catenina aumentan la formación de estructuras tubulares en el cáncer de colon (78),

mientras que las proteínas esenciales de EMT Slug, Snail y Twist se han correlacionado con la presencia de estructuras tubulares (79,80). Si bien puede parecer lógico que las vías de señalización involucradas en el desarrollo, y el proceso de migración e invasión estén involucradas en el proceso de formación de VM, las publicaciones mencionadas anteriormente, junto con muchas otras, demuestran que el verdadero mecanismo de la formación de VM aún está por definirse.

Finalmente, una de las moléculas que también se ha postulado como partícipe del proceso de VM son el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y los factores proangiogénicos VEGF y PDGF. En el trabajo de Serwe y colaboradores se muestra que la inhibición de la señal de TGF- β es capaz de inhibir el proceso de formación de estructuras tubulares (81). Sin embargo, este trabajo sigue siendo controversial puesto que no presenta ninguna caracterización ni demostración de lumen en las estructuras presentadas. Por otro lado, trabajos de Shirakawa (2002) y Scully (2012) asocian estos factores de crecimiento con el proceso de angiogénesis, sin embargo, sus resultados siguen siendo controversiales debido al modelo que estos autores utilizan (82,83).

2.5.3-La controversia de mímica vasculogénica.

Desde su reporte inicial en 1999, VM ha provocado un amplio debate en la comunidad científica (84–86). En biopsias de tumores de pacientes VM ha sido inequívocamente confirmado a través del uso de tinción PAS, en donde se han encontrado estructuras huecas, con glóbulos rojos en su interior, que marcan positivas para PAS; pero a diferencia de los vasos sanguíneos, no marcan positivas para marcadores típicos endoteliales (CD-31, CD-34, factor de von willebrand, etc) (84–86).

De esta forma, VM ha sido descrito en multitud de tumores, entre ellos se encuentra: melanoma, ovario, mama, gástrico entre otros (61,63,66,87,88). Desafortunadamente hasta hace poco, existían bastantes discrepancias sobre un modelo *in vitro* de VM. Esto debido a que la mayoría de las publicaciones *in vitro* de este fenómeno representan VM como interconexiones celulares, asimilando la presencia de éstas a las formadas por los típicos ensayos de angiogénesis con células endoteliales. Sin embargo, otros grupos, entre ellos nuestro laboratorio, muestran que este tipo de estructuras no solo son incorrectamente llamadas VM, sino que además no tienen profundidad y no poseen la capacidad de conducir fluidos en su interior (75,89–94). Esta disimilitud en el campo *in vitro* del estudio VM, nos lleva a plantear y establecer un modelo *in vitro* para el estudio de este proceso mediante este trabajo.

2.5.4- Mímica vasculogénica y matriz extracelular.

Se conoce que el proceso de VM solo puede ocurrir en presencia de ECM; en la literatura, todas las publicaciones que reportan este fenómeno *in vitro* lo hacen utilizando matrigel o geles de colágeno (61,63,95). Matrigel es un compuesto extraído de sarcoma de ratón el cual contiene proteínas de matriz como laminina 1, colágeno I, colágeno IV y fibronectina entre otros (96,97).

Dentro de las glicoproteínas reportadas, está laminina 1 (anteriormente conocida como LM1), la cual es reconocida como un blanco importante de MMP9 (98). Anteriormente se ha reportado que laminina 4 y laminina 5 son las formas más comunes que se encuentran expresadas en la membrana basal de los vasos sanguíneos, y ambas isoformas son críticas para la maduración y diferenciación de estos mismos (37,99). Así mismo, la laminina más común que se presenta en los epitelios, tanto gástricos como ovárico, es la laminina 1 (37,100,101). Los componentes de la laminina han sido demostrados como moléculas capaces de alterar la localización de PI3K y

capaces de promover la activación de la vía de señalización PI3K-Rac1. Se ha demostrado en nuestro laboratorio que el bloqueo de PI3K por medio de un inhibidor farmacológico (LY294002), provoca un bloqueo en la formación de estructuras tubulares de forma *in vitro* (95). Otra de las proteínas que podrían tener un efecto sobre el proceso de VM es colágeno I; y se ha reportado que TGF- β es capaz de señalar a través de Smad para inhibir la producción de colágeno I y III (102). Por otro lado, en el proceso de VM la presencia de colágeno se ha relacionado con la capacidad de realizar estructuras tubulares (63,103,104). Además, se ha especulado que las MMPs podrían estar jugando un rol importante en la formación de VM (65). Finalmente, en este trabajo buscamos demostrar que el proceso de VM y angiogénesis son diferentes entre sí, y que el primero requiere de las proteínas del ECM para su iniciación.

3- Hipótesis

La morfología y el proceso de formación de mímica vasculogénica son distintos a la de angiogénesis y requiere de proteínas de la matriz extracelular para gatillar su iniciación.

4-Objetivo General

Caracterizar el proceso de mímica vasculogénica en células de cáncer de ovario y gástrico y determinar el rol de la matriz extracelular y sus componentes proteicos en el proceso de mímica vasculogénica *in vitro*.

5-Objetivos Específicos

I-Establecer un modelo *in vitro* del proceso de mímica vasculogénica en células provenientes de cáncer gástrico y ovario.

- I.1-Characterizar la formación de estructuras tubulares en líneas celulares de cáncer gástrico AGS y Hs-746T y cáncer de ovario SKOV3 y HEY por medio de microscopía óptica y confocal.
- I.2-Evaluar la funcionalidad de las estructuras tubulares por medio de la inyección de colorantes fluorescentes.
- I.3-Analizar si el fenómeno de mímica vasculogénica puede ser encontrado en cultivos primarios de cáncer gastrointestinal y ovario.

II- Determinar si la estructura tubular y vías de señalización del proceso de mímica vasculogénica es distinta a la de angiogénesis.

- II.1-Determinar si hay una matriz de glicoproteínas presente en las estructuras tubulares del proceso de mímica vasculogénica *in vitro* en líneas celulares de cáncer de ovario y gástrico.
- II.2-Determinar la localización de la matriz de glicoproteínas presente en las estructuras tubulares del proceso de mímica vasculogénica *in vitro* en líneas celulares de cáncer de ovario.
- II.3-Evaluar por medio de proteínas recombinantes e inhibidores farmacológicos si las vías de señalización pro angiogénicas tiene un efecto en mímica vasculogénica.

III-Evaluar cambios en los niveles RNA durante la formación del proceso de mímica vasculogénica.

- III.1- Determinar cambios en los niveles de RNA durante la formación de estructuras tubulares de mímica vasculogénica en células de cáncer gástrico por medio de un micro-array.

IV- Determinar si la matriz extracelular y sus componentes proteicos juegan un rol en la formación de estructuras tubulares.

- IV.1-Elucidar si la matriz juega un rol fundamental en la formación de estructuras tubulares modificando la matriz completa.
- IV.2-Determinar por medio de la utilización de matrices simples qué o cuáles componentes de la matriz específicos, son necesarios para la formación de mímica vasculogénica *in vitro*.
- IV.3-Demostrar que las estructuras formadas en matrices simples corresponden a estructuras tubulares funcionales.
- IV.4-Determinar si cultivos primarios de cáncer de ovario y gástrico son capaces de formar mímica vasculogénica en matrices de proteínas únicas.

V-Determinar si la señalización de la matriz extracelular es esencial en el proceso de formación de mímica vasculogénica *in vitro*.

- V.1-Elucidar mediante un análisis *in silico* las integrinas expresadas en las líneas celulares SKOV3, HEY y AGS utilizando la base de datos del CCLE.
- V.2-Corroborar por medio de qPCR que estas líneas celulares expresen las integrinas requeridas para la señalización con la matriz extracelular.

- V.3-Determinar, por medio de anticuerpos de bloqueo y/o péptidos miméticos, el aporte de distintas integrinas en el proceso de formación de mímica vasculogénica.
- V.4-Determinar mediante el uso de inhibidores farmacológicos, la vía de señalización río abajo de las integrinas involucradas en el proceso de formación de mímica vasculogénica para así determinar un modelo de señalización.

6-Materiales

- Líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3, HEY-A8 (ATCC, USA)
- Líneas celulares de cáncer gástrico AGS, Hs746-T (ATCC, USA)
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA)
- Suero fetal bovino (Biowest, South America)
- Penicilina/estreptomicina (Invitrogen, USA)
- Zs-green Clontech (Becton Dickinson, USA)
- Medio de cultivo DMEM-F12 (Invitrogen, USA)
- Matrigel growth factor reduce, phenol red free (Corning, USA)
- Multiplaca de 6 pocillos (Nunc, ThermoScientific, Dinamarca)
- Etanol 75% (Merck, Alemania)
- PDGF (Gibco, Invitrogen, USA)
- VEGF (Gibco, Invitrogen, USA)
- AG1295 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Avastin (Roche, Alemania)
- PP2 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- U0126 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- TCI-15 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- LY294002 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- AKT inhibitor IV (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- PF573228 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- BB94 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

- Tween 20 (Winkler, Chile)
- Ácido peryódico (Merck, Alemania)
- Reactivo de Schiff (Merck, Alemania)
- Aquatex (Merck, Alemania)
- Azul de Tripán 0,4% (Gibco BRL, Life Technologies, USA)
- Emerald (Cell marque. USA)
- Fluoromont (Sigma, USA)
- miRCURY (Exiqon, 300110)
- iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad, USA)
- Trizol (Thermo Fisher Scientific, Dinamarca)
- Software InfinityAnalyze versión 6.5.2 (Lumenera Corporation, Canadá)
- Software Zen 2012 (Zeiss Company, Alemania)
- Software IMARIS 8.4 (Bitplane's core scientific software, Suiza)
- Software LAS-AF Leica (Leica Microsystems, Alemania)
- Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA)

7-Metodos

7.1- Líneas celulares

Las líneas celulares de carcinoma ovárico y gástrico utilizadas en este trabajo: SKOV-3 y HEY-A8 en el caso de cáncer de ovario, y AGS y Hs-746T en el caso de cáncer gástrico, fueron obtenidas de la compañía ATCC. Su origen y sus características han sido reportadas anteriormente (ATCC). Cada línea celular fue mantenida *in vitro* en condiciones adherentes, en el caso de las líneas SKOV-3 y HEY-A8 fueron sembradas en medio DMEM-F12 (Gibco BRL, Life Technologies, USA) al 10% suero bovino fetal y 10mL/L de penicilina/estreptomicina. Las células de carcinoma gástrico AGS y Hs-746T fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA) al 10% suero bovino fetal y 10mL/L de penicilina/estreptomicina. En el caso de la línea HEY-A8 con fluorescencia verde fueron generadas por transducción viral con el vector de expresión de Zs-green utilizando el sistema retroviral de Clontech (Becton Dickinson, USA) siguiendo metodología descrita anteriormente (105).

Todos los procedimientos que involucraron el uso muestras clínicas fueron aprobados por el servicio de salud metropolitano central y por las comisiones de ética de las facultades de ciencias biológicas y de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los cultivos primarios fueron obtenidos desde liquido ascitis o lavados peritoneal de pacientes afectados con cáncer de ovario, gástrico o colon siguiendo una metodología previamente descrita (106), previa firma de un consentimiento informado por parte del paciente. Cada muestra fue obtenida por parte del cirujano durante la operación y trasladada al laboratorio del Dr. Gareth Owen. Una vez en el laboratorio las muestras de ascitis son centrifugadas a 2.500 rpm por tres minutos. El

sobrenadante se separó y las células fueron resuspendidas en una mezcla de 50% de medio DMEM-F12 suplementado con suero y antibiótico y 50% ascitis apartado del sobrenadante. Al alcanzar una confluencia del 70%-80%, se realizó el pasaje con tripsina convencional utilizando para líneas celulares. La mantención de estas células de cultivo primario se realizó con una mezcla de 80% medio y 20% ascitis.

7.2- Ensayo de mímicas vasculogénica *In vitro*

En una multiplaca de 6 pocillos se colocan covers de vidrios de 18x18mm. Estos covers posteriormente se cubrieron con 25uL de matrigel (Corning, USA). La placa ya con los covers y el matrigel se deja polimerizar por 1 hora en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Mientras polimeriza el matrigel se procede a tripsinizar las células con las que se trabajará, ya sean estas cultivos primarios o líneas celulares como se describió anteriormente. Una vez polimerizada la matriz se procede a sembrar las células sobre esta misma en distinto número dependiendo del tipo celular. Para tipos celulares nunca probados se realiza una curva celular desde 15.000 hasta 750.000 células para determinar el número óptimo con el cual se forman estructuras tubulares. Posteriormente se coloca la placa con las células dentro de la incubadora durante 1 hora para permitir su adhesión a la matriz. Una vez adheridas las células se procede a colocarles el medio, en este caso RMPI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA) suplementado al 15% con suero bovino fetal. Finalmente, los ensayos vuelven a la incubadora y son observados todos los días para obtención de fotografías. Al día 4 o cuando se observa la presencia de estructuras maduras los ensayos son fijados con paraformaldehído al 4% para su posterior análisis.

7.3- Ensayo de mímicas vasculogénica *In vitro* en matrices de proteína única y en presencia de inhibidores

Células AGS y HEY fueron procesadas y sembradas utilizando los mismos procedimientos descritos anteriormente. Esta vez en lugar de sembrar las células en matrigel estas fueron sembradas en matrices y geles simples o en coatings de proteínas recombinantes de matrices. En el caso de las matrices y geles se utilizó un gel de laminina 1 y colágeno I (Trevigen. USA) y un hidrogel de polisacáridos sin elementos proteicos (The Well, USA), en ambos casos 25ul de cada gel fueron colocados sobre un cover de vidrio como se describió previamente. En el caso del coating de proteínas de matrices recombinantes, 25ug/mL de laminina 1, colágeno I, colágeno IV o fibronectina fueron disueltos en PBS 1X y colocados sobre un cover overnight. Posteriormente se eliminó el PBS para sembrar la célula sobre los covers. Los ensayos de VM también fueron crecidos en presencia de inhibidores, para esto distintos inhibidores de distintas vías de señalización fueron utilizados en conjunto con las células para observar su efecto sobre el proceso de VM.

7.4-Tinción PAS

En cualquier momento durante el desarrollo del proceso de VM el ensayo puede ser fijado para observar los patrones de expresión de glicoproteínas por medio de tinción PAS. Para esto el ensayo primeramente deber ser fijado con paraformaldehído al 4% overnight a 4°C. Posteriormente cada ensayo es lavado una vez con PBS 1X y luego tres veces con una solución de TWEEN al 0,1% en TBS 1X durante cinco minutos cada lavado. Una vez hecho esto los ensayos son tratados con una solución de ácido periódico al 0.5% durante diez minutos. Una

vez transcurrido este tiempo, cada ensayo es lavado una vez más tres veces con PBS 1X y luego incubado con reactivo de Schiff (Merck, Alemania) en oscuridad por 25 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se desecha el reactivo y se efectuaron tres lavados de cinco minutos cada uno con agua destilada. Finalmente, los ensayos son montados con aquatex (Merck, Alemania) en un portaobjeto de vidrio para microscopia y observados bajo microscopio para obtención de fotografías.

7.5-Microinyeccion de colorantes

Dos tipos de microinyecciones de colorante se realizaron durante esta tesis. La primera se realizó en un microscopio con un microinyector acoplado a bomba de flujo. Para esta microinyección células fijadas anteriormente con paraformaldehído al 4% fueron microinyectadas con azul de tripán (Gibco BRL, Life Technologies, USA) a presión constante de 200hPa con una bomba Femtojet microinyector (Eppendorf, Germany) por veinte minutos con una pipeta de vidrio de borosilicato (A-M System, USA) la cual se fabricó mediante un puller. Posterior a la inyección las células fueron observadas con un microscopio de fluorescencia DMI6000 B Leica para obtener las fotografías. El otro tipo de microinyección se realizó con un sistema de inyección de electroforesis según una metodología previamente descrita (107). En este caso se utilizan células vivas las cuales se microinyectan utilizando puntas de vidrio generadas como se describió anteriormente, sin embargo, en este caso se usa el colorante amarillo lucifer (Sigma, USA) y las inyecciones se realizaron a tiempo real. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido acoplado a una lámpara de xenón fluorescente (longitud de onda de excitación: 450-490nm; longitud de onda de emisión: mayor a 250nm).

7.6-Imágenes y videos confocal

Ensayos de VM fueron fijados en el tiempo deseados utilizando formaldehído al 4% en PBS como se describió anteriormente. En el caso de células que no presentaban marca fluorescente por medio de Zs-green (Células AGS y cultivos primarios) se marcaron las células antes de fijarlas utilizando un cell tracker (Thermo, USA) un día antes de finalizar el ensayo. Posteriormente las muestras fueron enviadas al Centro de Microscopia Avanzada de la Universidad de Concepción, donde gracias a la colaboración del Dr. Francisco Nualart fueron analizadas con un microscopio confocal laser Zeiss LSM780. Las muestras fueron escaneadas con un objetivo ApoChromat NA 1.3 usando un láser de argón con una exposición de 488 nm, EM. 490–560, los cortes de Z-stack fueron generados entre 80–130 μm . Para la reconstrucción 3D se utilizaron los programas Zen 2012 (Zeiss company) y IMARIS 8.4 (Bitplane's core scientific software). También se analizaron muestras teñidas previamente con PAS con el mismo microscopio confocal. Para ello la fluorescencia de la tinción PAS fue obtenida excitando la muestra con un láser de argón con excitación de 560 nm, EM. 560–630, las secciones de Z-stack fueron de 80–130 μm . Para la reconstrucción 3D se utilizaron los mismos programas descritos anteriormente.

7.7-Reconstrucción por Micro CT

Para la reconstrucción por micro-tomografía por rayos X, 7.500 células de la línea celular SKOV3 se sembraron en un $\frac{1}{4}$ (5,5 × 5,5 mm) de cover plástico. (TED PELLA INC., USA) con matrigel como se describió anteriormente. Después de 4 días las estructuras de VM se fijaron utilizando paraformaldehído al 4% en PBS 1X y posteriormente deshidratadas con etanol (en concentración ascendente de 70 a 100% por una hora cada uno) y secado overnight. Las muestras posteriormente fueron colocadas en un Micro-CT (Skyscan 1272, Bruker micro-CT, Kontich, Belgium), gracias a la colaboración de la Dra. Beatriz Sánchez de la Facultad de Física de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras fueron escaneadas utilizando la siguiente configuración: Resolución de cámara: 4032 × 2688, distancia del objeto a la fuente: Fuente de rayos X: 57.43 mm, 35KV @ 231 microAmps (sin filtro), Tamaño del pixel: 2.999986 μ m, Exposición: 1000 ms, Fase de rotación: 0.15°, Rotación total: 360°, Corrección de campo plano. Tiempo de escaneo: 121 minutos. Las Imágenes fueron procesadas usando el programa CT Vox 64-bits v.3.1.1 (Bruker, Belgium).

7.8-Inmunofluorescencia de laminina y tinción con sirius red

Ensayos maduros de 4 días fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS 1X como se describió previamente. Posteriormente se lavaron los cover con los ensayos 3 veces con PBS 1X por 5 minutos cada lavado. Luego los ensayos se permeabilizan con PBS-Tritón al 0.1% por 5 minutos para posteriormente lavar una vez más con PBS 1X por 5 minutos 3 veces. Una vez terminado los lavados se procedió a bloquear utilizando PBS/BSA al 2% por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El anticuerpo primario de laminina 1 (Thermo Scientific,

Denmarck) se preparó utilizando la solución Emerald (Cell Marque, California, USA) 1:500. Los covers se incubaron en humedad y oscuridad con el anticuerpo primario durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo los covers se lavaron 3 veces más con PBS 1X por 5 minutos para posteriormente incubarlos con anticuerpo secundario anti-rabbit (Invitrogen Alexa fluor 488) 1:1000 en solución Emerald por 1 hora en oscuridad y humedad. Transcurrido el tiempo se volvieron a lavar los covers con PBS 1X para retirar exceso de anticuerpo secundario y se procedió a realizar la tinción con DAPI 1:50.000 por 30 segundos. Finalmente, las muestras se montaron en un portaobjeto de vidrio utilizando 15 uL de Fluoromount (Sigma, USA) y se dejaron secar por 20 minutos a 65°C en oscuridad para posteriormente mirarlas en un microscopio de epifluorescencia. Para el caso de la tinción de sirius red los covers se lavaron primeramente 4 veces con agua destilada por 3 minutos, para entonces agregar PMA por 2 minutos. Posteriormente se procedió a lavar la muestra con agua destilada una vez por 3 minutos. Una vez hecho esto se adiciono picrosirius red durante 30 a 45 minutos, para luego agregar sirius red HCl 0,01N durante 2 minutos. Finalmente, las muestras se colocan en una solución más diluidas de sirius red 70°C y 100°C por 5 minutos cada uno y fueron sumergidas en xilol durante 5 minutos para montarlas con entellan en un portaobjetos de vidrio para su visualización en un microscopio.

7.9- Extracción de RNA y RT-PCR

Par la extracción de RNA total de las células utilizadas en este trabajo las líneas celulares HEY y AGS fueron cultivadas en matrigel para formar estructuras tubulares como se describió anteriormente. Posteriormente los ensayos se fijaron a día 1, 2, 3 y 4 para realizar extracción de

RNA. La extracción se realizó utilizando Trizol en el caso de las células HEY y en caso de las líneas AGS se utilizó el kit miRCURY (Exiqon, 300110). En ambos casos se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Las mediciones de la concentración de RNA obtenido se realizó utilizando un espectrofotómetro según la densidad óptica medida a 260 nm. Se consideraron óptimas todas aquellas muestras que presentaron una razón 260nm/280nm de entre 1,8 y 1,9. Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2 ug de RNA total los cuales fueron tratados con el kit iScript (Bio-Rad). Después, se realizó el mix con SYBR Green y los partidores seleccionados. Luego, se cargó una placa de 96 pocillos con 1 µl de muestra y 9 de mix correspondiente para cada gen a analizar en dos condiciones (cultivo celular normal y ensayo de VM). Finalmente, la placa fue cargada en el equipo Applied Biosystems 7500 fast y se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos mediante el Software GraphPad Prism 6.

7.10- Microarray

Para evaluar cambios en los niveles de RNA en la formación del proceso VM se realizó un Microarray (Exiqon, NGS Services) lo que permitió obtener datos de RNA totales relacionados con el proceso de formación de VM.

Para este Microarray se realizó un ensayo de VM tal como se describió anteriormente con la línea celular de cáncer gástrico AGS. Las condiciones de este experimento requieren que el matrigel sea desnaturado una vez gelificado en el cover de vidrio para evitar que las células formen estructuras tubulares. Una vez se obtuvieron las condiciones, se procedió a la extracción de RNA de las células por medio del kit miRCURY (Exiqon, 300110) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente fueron enviadas al centro SickKids en Toronto

Canadá para ser analizadas mediante el chip Affymetrix Human Gene 2.0 ST. Una vez llegados los resultados los análisis bioinformáticos fueron realizados por el CORE de bioinformática de ACCDiS.

7.11- Microscopia time-lapse

Para la generación del video de time-lapse las células HEY fueron sembradas sobre matrigel en un cover de vidrio circular de 40mm de diámetro, luego este cover se montó en una cámara de regulación de temperatura y CO₂ en un microscopio Zeiss Cell-Observer SD cortesía del Dr. Steffen Härtel y el Dr. Jorge Toledo de la Universidad de Chile. Las imágenes fueron obtenidas cada 10 minutos en un stack de +200 a -200 μm partiendo desde el punto de inicio del cover de vidrio. Los saltos entre imagen de stack se realizaron de 10 μm cada uno. El periodo completo del experimento fue de 4 días. Una vez obtenidas todas las imágenes estas fueron montadas en formato de video con el software Image-J utilizando el plano focal de los ensayos en punto de termino como referencia.

8-Resultados

8.1- Establecer un modelo *in vitro* del proceso de mímica vasculogénica en células provenientes de cáncer gástrico y ovario.

Para el establecimiento del modelo de estudio de VM se utilizaron resultados de una tesis previa de nuestro laboratorio. En ella se estableció el número de células y las características de las estructuras tubulares en cáncer de ovario. En la figura suplementaria 1 se pueden observar los resultados obtenidos en 4 líneas células de cáncer de ovario (SKOV3, HEY, A2780 y UCI101) sembradas en distintas confluencias sobre matrigel a día 1 y día 4. Se observa que solamente en el caso de SKOV3 y HEY existe formación de estructuras tubulares. Por otro lado, también se determinó que estas estructuras eran PAS+, como se ve en la misma figura.

Sin embargo, estos resultados no son concluyentes para determinar si las estructura observadas eran efectivamente tubulares. Para determinar esto, procedimos inicialmente a realizar una reconstrucción en 3D de las estructuras utilizando un micro-tomógrafo de rayos X. Para ello, un cultivo maduro de la línea celular SKOV3 se procesó de acuerdo a como aparece en la sección materiales y métodos y posteriormente se escaneó utilizando el micro-tomógrafo. En la figura 3 se puede observar la reconstrucción 3D de las estructuras tubulares formadas por la línea celular SKOV3. En el panel “a” se observa toda el área del ensayo, y se puede notar como las estructuras tubulares (flecha roja) aparecen elevadas sobre el plano de agregados celulares (flecha azul). Además, pudimos ver que estas estructuras podrían corresponder a estructuras vacías o con lumen. En el panel “b” se observa una magnificación de una posible estructura tubular y se aprecia que dentro de ella presenta un color blanco (flecha negra). Este color indica una baja resistencia al paso de los rayos X y, por lo tanto, una estructura de baja densidad o aire. (Ver

anexo 3). Este fue nuestro primer indicio de que efectivamente estas estructuras formadas por esta línea celular presentaban un lumen.

En este mismo experimento se puede observar que no todas las estructuras presentes sobre el cover parecen corresponder a tubos. Tal como se observa en el panel “c” de la figura 3, algunas estructuras presentan una densidad mayor en su interior, pudiendo corresponder a agregados celulares o concentración de glicoproteínas. De esta reconstrucción 3D también se obtuvo un video en el cual se aprecia todo lo contenido en la figura 3. Para acceder a este, utilizar el siguiente vínculo (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&Video 1>).

Posteriormente a esta reconstrucción, procedimos a transfectar la línea celular HEY con Zs-green como se ha reportado previamente (105). Esta línea celular transfectada fue probada para determinar si era capaz de formar estructuras tubulares sobre matrigel. Como se observa en la figura 4, esta línea celular es capaz de formar estructuras elevadas sobre el plano de células, las cuales son efectivamente fluorescentes.

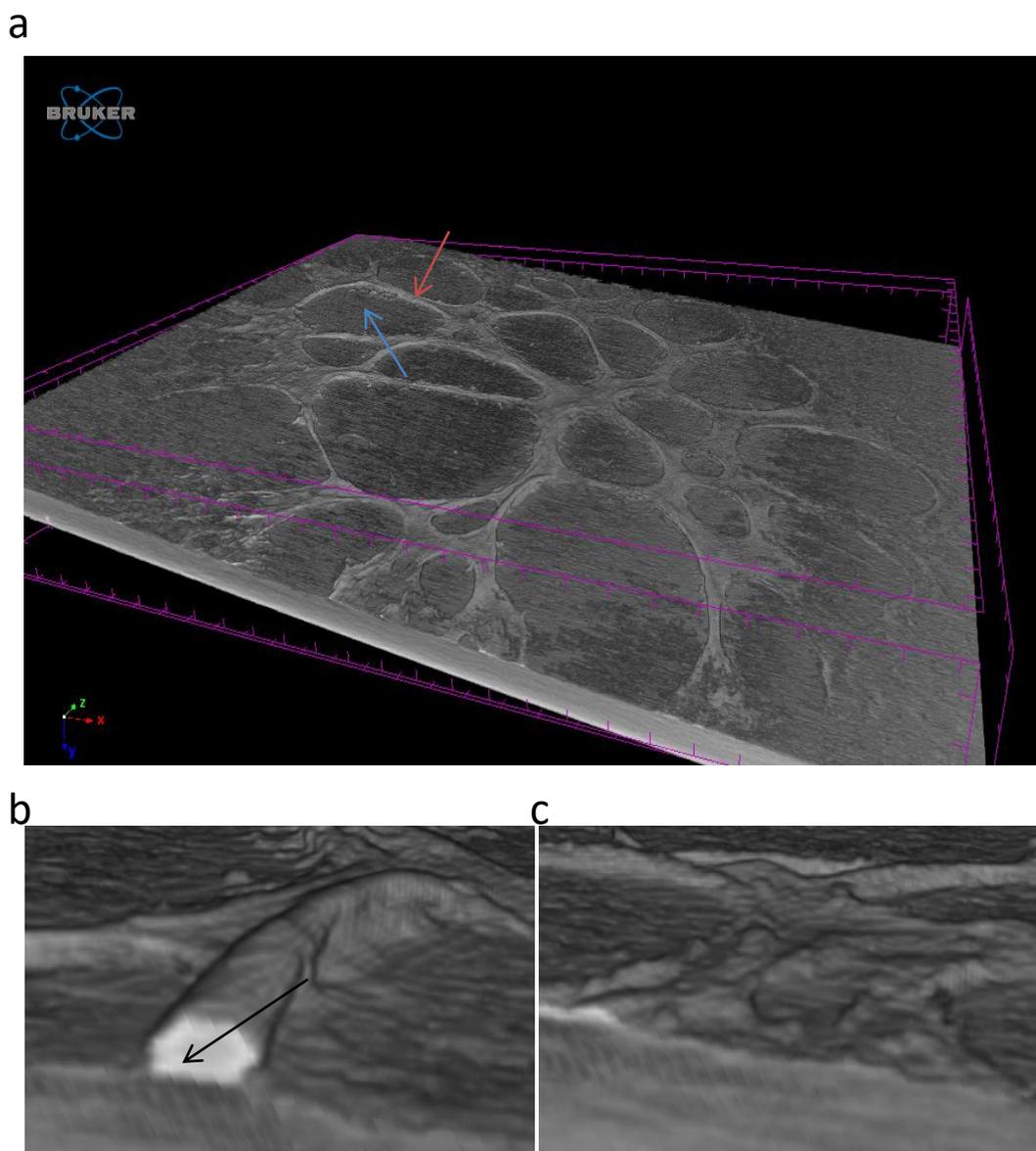


Figura 3: Reconstrucción por Micro-CT de estructuras formadas por la línea SKOV3. Estructuras tubulares de 4 días formadas por la línea celular SKOV3 fueron reconstruidas en 3D utilizando un Micro-CT. En (a) se aprecia el campo completo de la reconstrucción. Notar como las estructuras tubulares (flecha roja) se aprecian elevadas en comparación a la monocapa (flecha azul). En (b) acercamiento y corte transversal de una estructura tubular. Notar el espacio interior blanco (flecha negra) consistente con un lumen. En (c) acercamiento y corte transversal de otra área del mismo cultivo, notar como esta área no presenta espacio blanco o lumen.

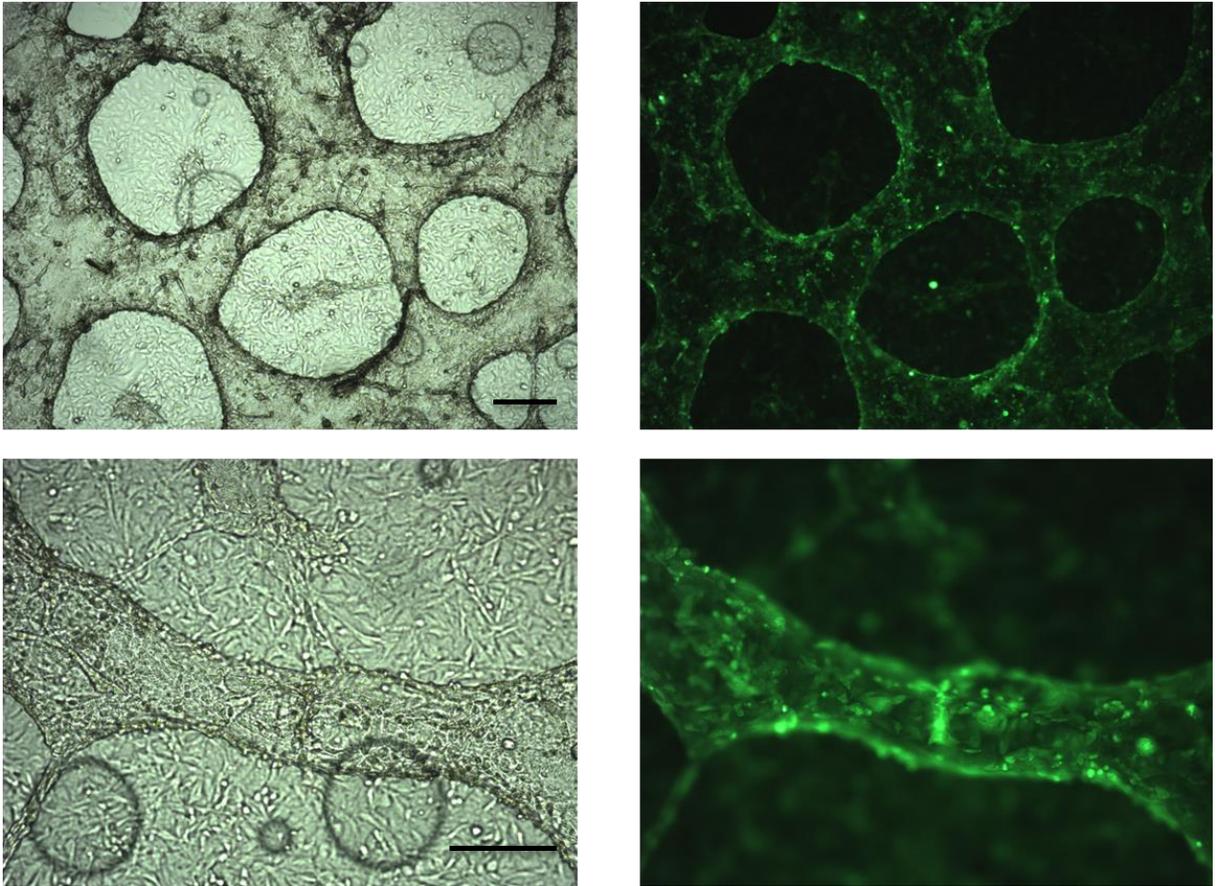


Figura 4: Células HEY transfectadas con Zs-green (Hey-green) son capaces de formar estructuras tubulares. En el panel superior se presenta una imagen con aumento 4X de las células HEY transfectadas con Zs-green, a la izquierda se aprecia el campo claro de la imagen mientras que a la derecha la fluorescencia. Las células transfectadas no perdieron su capacidad de estructuras tubulares. En el panel inferior se presentan imágenes con aumento 10X de las estructuras tubulares, una vez más a la izquierda se presenta el campo claro y a la derecha la fluorescencia, notar como las estructuras se presentan elevadas sobre una monocapa de células. Barra de escala 100 μ m.

Con esta nueva línea celular fluorescente fuimos capaces de profundizar aún más el estudio de las estructuras tubulares. Con ellas pudimos evaluar estas estructuras por medio de microscopia confocal. Las células fueron sembradas sobre matrigel tal como se describe en la sección materiales y métodos, y los ensayos se dejaron proseguir hasta día 4. Posteriormente, se fijaron y se montaron para microscopia confocal de tal forma que el cover en donde se encuentran las células no quedara aplastado por el portaobjeto. De esta manera, pudimos mantener la estructura 3D de los tubos durante el análisis. Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal laser Zeiss LSM780, como se describe en la sección materiales y métodos. Los primeros análisis realizados fueron cortes ortogonales en el plano Z, en los cuales se obtuvo la composición de la estructura tubular. En la figura 5 se aprecia una representación esquemática de una estructura tubular diseccionada. En “1” se aprecia la parte superior de la estructura tubular. En “2” se aprecia el lumen interno de la estructura solo con las paredes de estas mismas en los costados. En “3” se aprecia la base de la estructura tubular como una monocapa de células. En “b” se aprecia el corte ortogonal de las estructuras tubulares, en donde se aprecia claramente el lumen en el centro de esta misma. Finalmente, en “c” se aprecia la reconstrucción total del ensayo, en la que se resaltan dos aéreas, A1 y A2. Estas dos áreas fueron reconstruidas con el programa Zen 2012. En ambos casos se puede observar que las estructuras tubulares están elevadas sobre el plano y presentan un lumen en su interior.

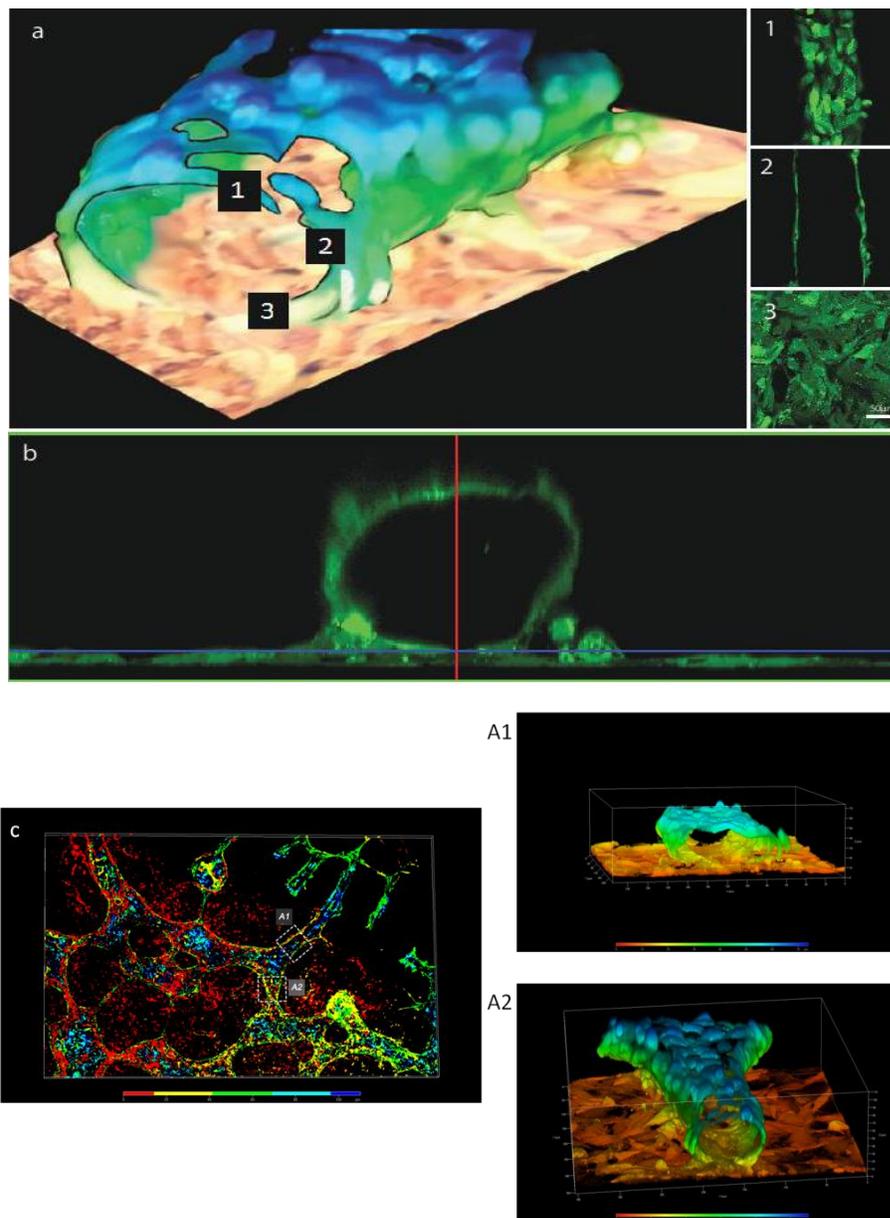


Figura 5: Reconstrucción 3D por confocal de las estructuras tubulares formadas por la línea celular HEY.

En (a) representación esquemática de una estructura tubular reconstruida mostrando los distintos planos obtenidos para completar la representación; en 1 se aprecia la capa superior de células de la estructura tubular, en 2 las paredes de la estructura tubular y en 3 la monocapa celular. En (b) reconstrucción ortogonal utilizando todos los cortes obtenidos en el eje Z (notar el lumen en el centro de la estructura). En (c) reconstrucción del campo completo de un cultivo, en este caso el color representa un código de altura (rojo más bajo en plano, azul más alto), se procedió a reconstruir en detalle dos estructuras, A1 y A2, las que se aprecian a la izquierda (notar en ambos casos la presencia del lumen de las estructuras).

Para confirmar de forma todavía más definitiva que las estructuras formadas por la línea celular HEY correspondían efectivamente a estructuras tubulares con un lumen en su interior, se realizó una segunda reconstrucción, esta vez con el programa de reconstrucción IMARIS 3D. Para ello, se tomaron las imágenes de la reconstrucción de la zona A2 (ver figura 5) y se volvieron a reconstruir utilizando este programa. Un video de la reconstrucción (video suplementario 2) puede ser visto en el siguiente vinculo (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> Video 2). Es interesante notar en este video que las células cancerígenas que están formando la pared del tubo parecen estar flotando en el aire, lo que nos sugiere que existe un soporte estructural para los tubos. Esta hipótesis la comprobamos posteriormente en el objetivo n°2 de esta tesis. Nos propusimos comprobar si las supuestas estructuras tubulares presentadas en la literatura presentaban un lumen, por medio de microscopía confocal. En la figura 6 se puede apreciar la reconstrucción en 3D con el programa Zen 2012 de las estructuras formadas por la línea celular HEY a 1 y 4 días, usando microscopía óptica y microscopía confocal. Como se puede apreciar, las estructuras a días 1 casi no presentan elevación al ser observadas con el microscopio confocal y aparentan ser solo proyecciones e interconexiones celulares. Por otro lado, las estructuras a día 4 presentan elevación y un lumen en su interior, como se mostró previamente en la figura 5.

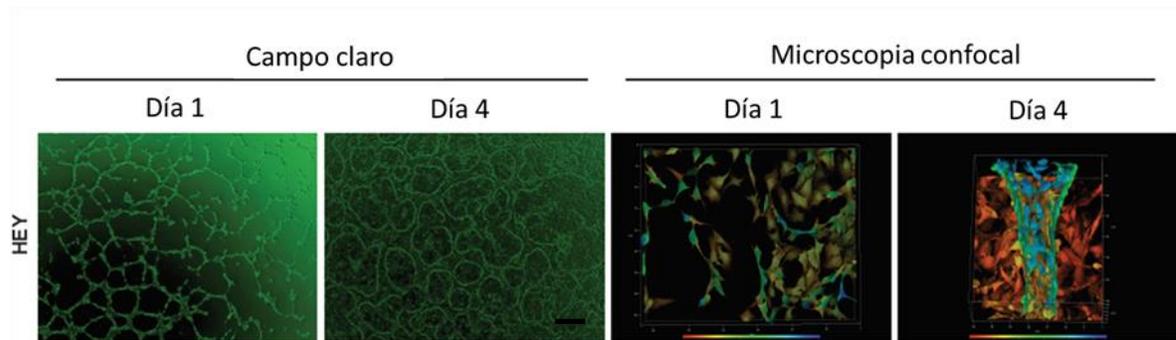


Figura 6: Las estructuras formadas por HEY a día 1 no presentan elevación y solo son conexiones intercelulares. Imágenes de campo claro (panel de la izquierda) y de reconstrucción confocal (panel de la derecha) de células HEY a día 1 y día 4. Notar como en el día 1 las células HEY forman proyecciones e interconexiones celulares muy similares a las presentadas en la literatura como estructuras tubulares. Notar como estas no presentan elevación al ser vistas por microscopía confocal. En el caso de día 4 las células aparecen elevadas sobre una monocapa de células, notar que es posible apreciar el lumen en la reconstrucción 3D de las estructuras a día 4. Barra de escala panel izquierdo 200 μ m.

Posteriormente, nos propusimos analizar el proceso de formación de las estructuras tubulares durante el tiempo. Para ello, se realizó un time-lapse de la formación de las estructuras partiendo desde el momento de la siembra hasta la aparición de las estructuras ya maduras. En el video suplementario 3 (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&video=3>) se puede apreciar claramente la formación de las estructuras tubulares. Para la generación del video, se utilizó un microscopio montado a una cámara de CO₂ que mantiene la temperatura. Se tomaron fotografías de forma automática cada 10 minutos durante la totalidad del ensayo (4 días).

Durante los primeros segundos del video se aprecia claramente como las células comienzan a generar proyecciones, las cuales se van engrosando con el paso del tiempo. Posteriormente, estas proyecciones se engrosan y comienzan a ganar volumen (en esta etapa también comienzan a migrar células desde las proyecciones para formar la monocapa celular). El ensayo finalmente se aprecia maduro al final del video con la presencia de estructuras 3D elevadas del plano y la monocapa celular cubriendo los espacios vacíos.

Una vez que determinamos como se forman las estructuras tubulares, nos propusimos a comprobar si las estructuras formadas por las líneas celulares de cáncer de ovario eran capaces de conducir fluidos en su interior, para lo cual realizamos una microinyección de colorante fluorescente por dos métodos. El primer método fue utilizando un microinyector acoplado a una bomba de vacío Eppendorff, la cual es capaz de generar una diferencia de presión constante y mover el colorante dentro de una aguja generada con un capilar de boro-silicato. En la figura 7a se observa la microinyección de las estructuras formadas por la línea celular HEY-green, en el primer panel se observa la imagen en contraste de fase, la punta de flecha muestra la zona de

inyección; en los siguientes paneles se muestra la fluorescencia de las células mismas (verde) y el azul de tripán (Rojo). En el último panel se aprecia el merge de los canales, mostrando que efectivamente el colorante fue capaz de fluir por dentro de las estructuras después de 10 minutos de inyección constante. En b nos propusimos a comprobar que la línea celular SKOV3 y la línea parental HEY fueran capaces de formar estructuras que permitieran el movimiento de fluidos. Para ello, volvimos a realizar una microinyección de azul de tripán, pero esta vez en dos días diferentes, esto para determinar si las estructuras formadas en la etapa inicial del proceso de VM contenían un lumen en su interior. En el primer panel se muestran inyecciones de ambas líneas celulares a día 1 y día 4. Se observa que a día 1 no existe movimiento del colorante (detectado por fluorescencia) durante estos días, descartando la presencia de un lumen funcional en etapas iniciales, mientras que en el siguiente panel se muestran inyecciones a día 4, en este caso se confirma que existe movimiento de colorante dentro de las estructuras maduras.

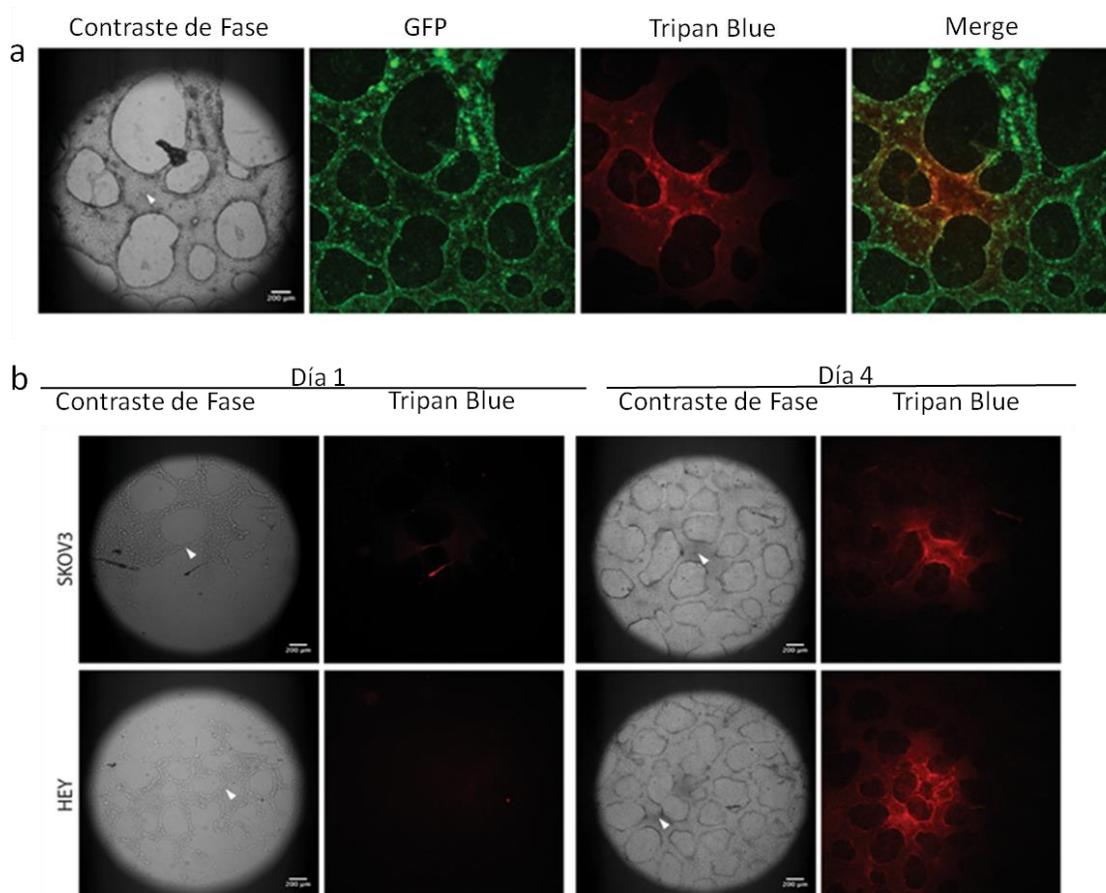


Figura 7: Microinyección de colorante en las líneas celulares HEY y SKOV3. Células HEY-green fueron microinyectadas con una bomba de flujo constante luego de 4 días en cultivo. En (a) se observa la microinyección de las estructuras, en el primer panel se observa el campo claro, la punta de flecha indica la zona de la microinyección, seguido de la fluorescencia de las células, y la fluorescencia del azul de tripán. El panel final muestra el merge de ambas imágenes anteriores mostrando la zona por donde fluyo el colorante. En (b) se aprecia la microinyección de la línea SKOV3 y la línea parental HEY luego de 1 y 4 días en cultivo, respectivamente. Notar como no existe movimiento de colorante en el día 1, mientras que en el día 4 el colorante fue capaz de moverse dentro de las estructuras tubulares en una amplia zona del cultivo. Una vez más la punta de flecha indica la zona de la inyección. Barra escala 200 μ m.

A continuación, nos propusimos a realizar una segunda microinyección, esta vez con un microinyector de fluidos por medio de electroforesis (diferencia de cargas). Esta inyección nos permite descartar que el movimiento del colorante observado antes fuera efectivamente por medio del lumen de las estructuras y no por conexiones célula-célula. Como se observa en la figura 8, la microinyección de las estructuras tubulares a día 1 mostró que no existía movimiento de fluidos dentro de ellas, confirmando que estas no contienen un lumen en su interior. Mientras que a día 4, el colorante, en este caso amarillo de Lucifer, fue capaz de moverse a través de las estructuras formadas por las líneas celulares SKOV3 y HEY. Por otro lado, potenciales estructuras tubulares de las líneas celulares A2780 y UCI101, no fueron capaces de mover colorante tanto a día 1 como a día 4. Además, cuando microinyectamos células únicas (puntas de flecha) el colorante se mantuvo dentro de las células y no difundió a las cercanas, descartando que el movimiento del colorante sea por medio de conexiones célula-célula.

Adicionalmente a estas inyecciones, realizamos un video suplementario en el que se muestran la inyección de estructuras a día 1 y día 4 de la línea celular U87, y la inyección a día 4 de la línea celular HEY. Como se aprecia en el siguiente video (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> Video 4), solo al inyectar el colorante, en este caso azul de tripán, a estructuras de la línea celular HEY en día 4, existe movimiento de colorante dentro de las estructuras (notar como estas parecieran inflarse cuando se les aplica presión).

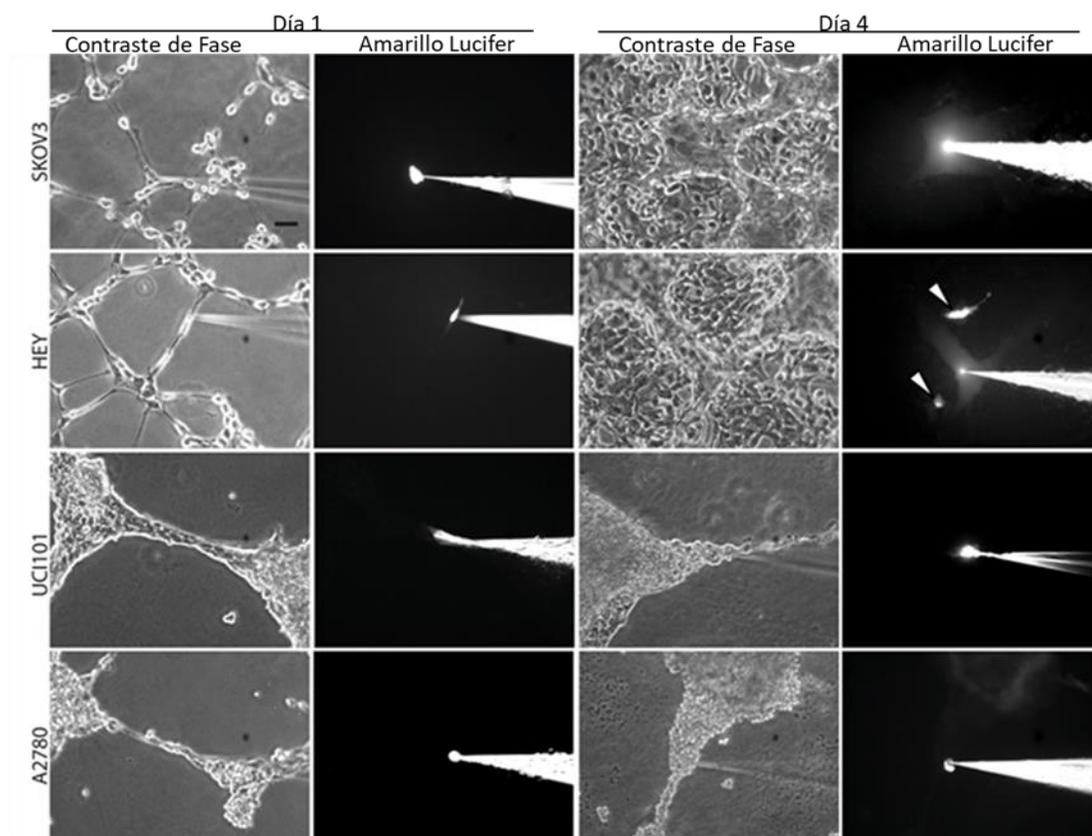


Figura 8: Microinyección de distintas líneas celulares de cáncer de ovario. Microinyección de colorante realizada por medio del sistema de electroforesis en las líneas de cáncer de ovario SKOV3, HEY, UCI101 y A2780. En el panel de la derecha se aprecia la inyección de colorante (Amarillo Lucifer) en estructuras formadas a día 1, notar como el colorante solo se mantiene dentro de las células y no existe movimiento fuera de estas descartando la presencia de un lumen en este estadio de las estructuras. En el panel de la izquierda se aprecia una inyección de colorante a estructuras a día 4 de las mismas líneas celulares, en este caso existió movimiento de colorante en las estructuras formadas por la línea celular SKOV3 y HEY, no así en las estructuras formadas por las líneas UCI101 y A2780. Las puntas de flecha representan inyecciones control para descartar movimiento de colorante célula-célula. Barra de escala 100 μ m.

Una vez comprobado que nuestro modelo de VM efectivamente generaba estructuras tubulares y funcionales en cáncer de ovario, quisimos comprobar si este también era reproducible en otros tipos de cáncer y cultivos primarios obtenidos de pacientes.

Utilizamos dos líneas celulares de cáncer gástrico, la línea AGS y la línea Hs-746T, para confirmar si estas eran capaces de formar estructuras tubulares, sembramos ambas sobre matrigel a distintas confluencias. Como se aprecia en la figura 9a, solo la línea celular AGS fue capaz de formar estructuras elevadas del plano a 300.000 y 750.000 células a día 3. Estas estructuras eran PAS positivas, de acuerdo con observaciones anteriores en nuestro laboratorio (figura 9b).

Seguidamente comprobamos si las estructuras formadas por la línea celular AGS podían mover colorante por su interior al igual que las formadas por las líneas celulares de cáncer de ovario. Sembramos 300.000 células AGS y realizamos las microinyecciones de colorante previamente descritas. Como se aprecia en la figura 9c, las estructuras formadas por esta línea celular fueron capaces de mover colorante por su interior, tanto cuando este se inyectó con presión constante (Panel superior) como con el método de electroforesis (Panel inferior). Además, cuando se microinyectó una estructura potencial de la línea Hs-746T, esta no movió colorante en su interior y el colorante solo se mantuvo dentro de la célula inyectada. Finalmente, para corroborar que efectivamente estas estructuras eran tubulares realizamos una reconstrucción 3D de ensayos de AGS con 300.000 a día 3 teñidos esta vez con un cell-tracker rojo que les da fluorescencia a las células y, posteriormente, fijadas para mantener la marca de fluorescencia.

Para finalizar la caracterización de esta línea celular, se procedió a realizar una reconstrucción en 3D por medio de microcopia confocal como se describió anteriormente. Como se aprecia en

la figura 10, al realizar la reconstrucción 3D con el programa ZEN 2012 de estas estructuras, podemos apreciar una vez más que estas se encuentran elevadas sobre una monocapa celular y que presentan un lumen en su interior, de la misma manera en que se presentan en células de cáncer de ovario.

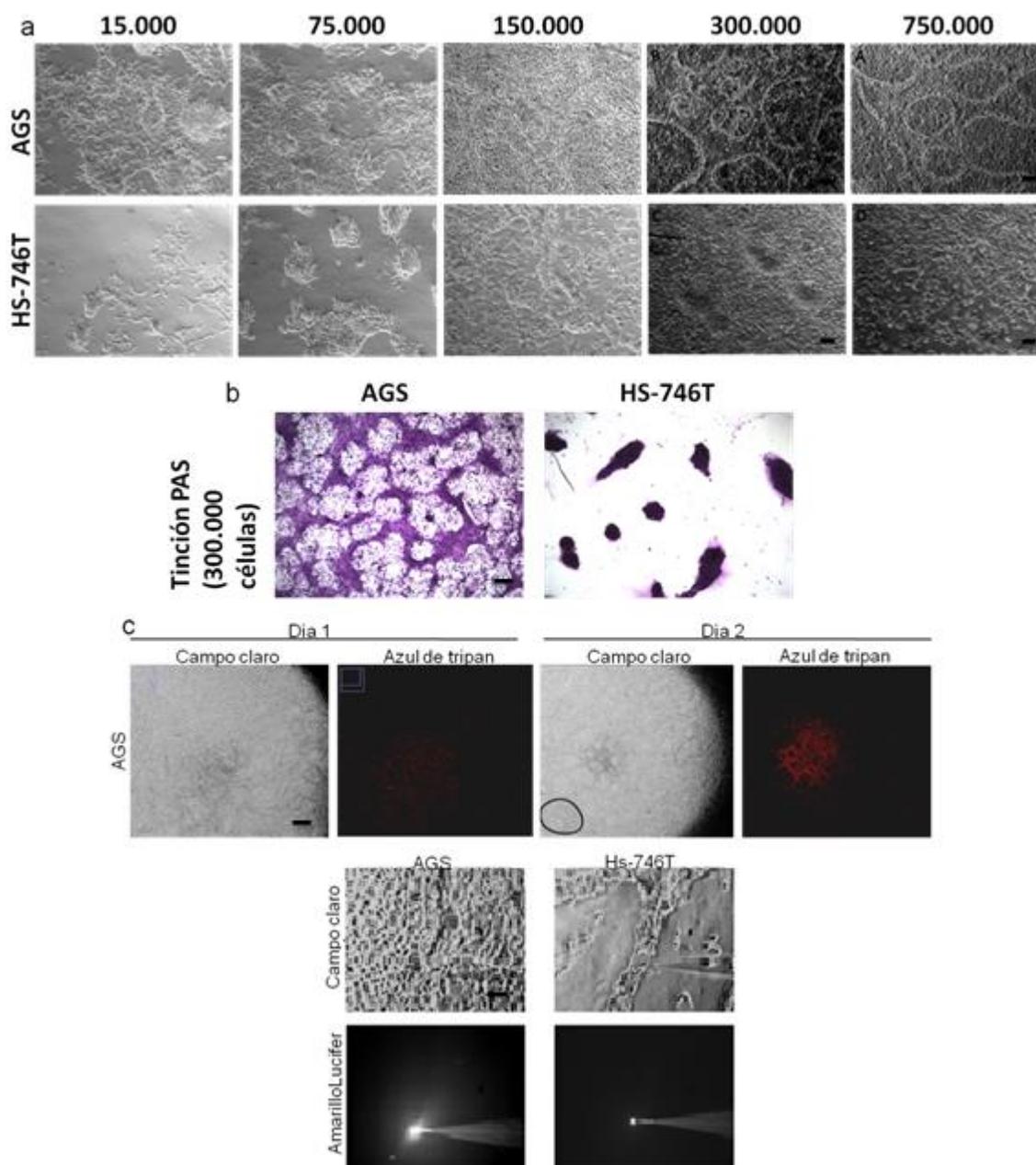


Figura 9: Caracterización del proceso de VM en cáncer gástrico. Caracterización del proceso de VM en dos líneas cáncer gástrico. En (a), estandarización del número de células requerido para formar estructuras tubulares en las líneas AGS y Hs-746T, notar como en la línea celular AGS con 300.000 y 750.000 aparecen estructuras elevadas sobre una monocapa celular. Barra de escala 100µm. En (b) tinción PAS de las estructuras, notar que las estructuras en AGS sobre la monocapa se tiñen más que las células a su alrededor, lo que concuerda con observaciones previas de nuestro laboratorio. Barra de escala 200µm. En (c) inyección de colorante de las estructuras formadas por AGS, en panel superior inyecciones con bomba de presión a día 1 y día 2, notar como el colorante es capaz de fluir dentro de las estructuras en ambos días. En el panel inferior, inyección por electroforesis de estructura de AGS y estructura sospechosa de la línea Hs-746T. Notar como solo existe movimiento en la estructura de AGS. Barra de escala 200µm.

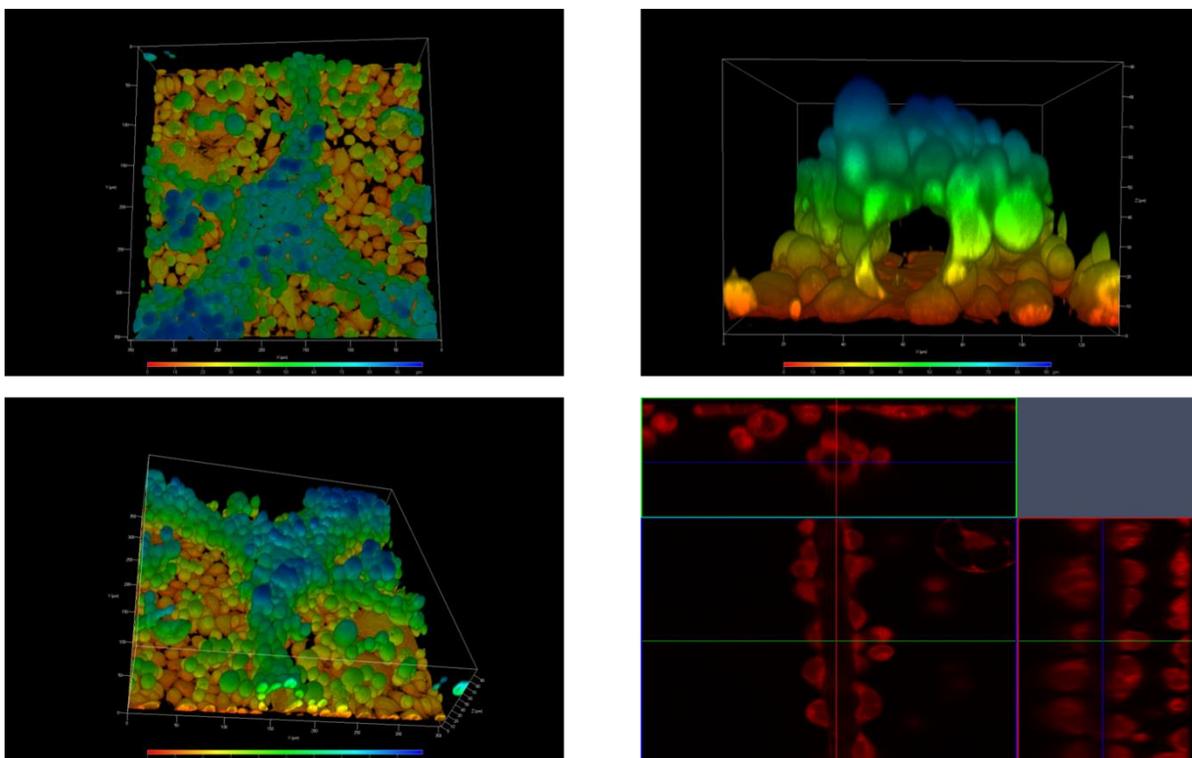


Figura 10: Las estructuras tubulares de VM de la línea celular AGS presentan un lumen en su interior. Reconstrucción 3D utilizando microscopía confocal y el programa ZEN 2012. Las células AGS se tiñeron previamente con cell tracker para dejar las células fluorescentes para el ensayo. Se observa la reconstrucción de una estructura con distintos ángulos en los paneles de la izquierda. En el panel superior derecho se observa el lumen de la estructura, mientras que en el panel inferior derecho se observa el corte ortogonal en el eje Z de las estructuras, mostrando como estas están formadas por células a su alrededor.

Para finalizar la comprobación de reproducibilidad de nuestro modelo utilizamos cultivos primarios de cáncer ovario y cáncer gastrointestinal. Obtuvimos muestras de pacientes de distintas redes de hospitales en la región metropolitana y los crecimos en cultivos *in vitro*. Una vez crecidas las células procedimos a sembrar estas sobre matrigel y observamos la formación de estructuras entre 4 a 7 días. Como se aprecia en la figura 11a, solo algunos de los cultivos primarios analizados fueron capaces de formar estructuras tubulares cuando se sembraron en matrigel, en la figura 11b se puede apreciar dos gráficos resumen en los cuales aparecen cuantos cultivos fueron capaces de formar estructuras tubulares. En el caso de cáncer ovario, de un total de 27 muestras analizadas, solo 6 (22,2%) fueron capaces de formar estructuras tubulares en matrigel, en el caso de los cánceres gastrointestinales, de un total de 6 muestras, 4 (66,6%) fueron capaces de formar estructuras tubulares.

Por otro lado, para caracterizar la morfología de las estructuras, estas fueron reconstruidas en 3D utilizando la misma metodología explicada anteriormente. En este caso se reconstruyó un cultivo primario formado por células de cáncer ovárico, en la figura 11c se observa la reconstrucción por microscopía confocal utilizando el programa ZEN 2012. Se aprecia una vez más que estas estructuras están elevadas sobre el plano en comparación a la monocapa celular.

De esta reconstrucción además obtuvimos un video, el cual puede ser observado en el siguiente link (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> Video 5). En este se observa una vez más la estructura en su totalidad, se pueden ver las células que componen la pared del tubo y como estas se encuentran elevadas en comparación a la de la monocapa, además se le realiza un corte transversal a esta estructura, permitiendo ver el lumen de la estructura en su interior.

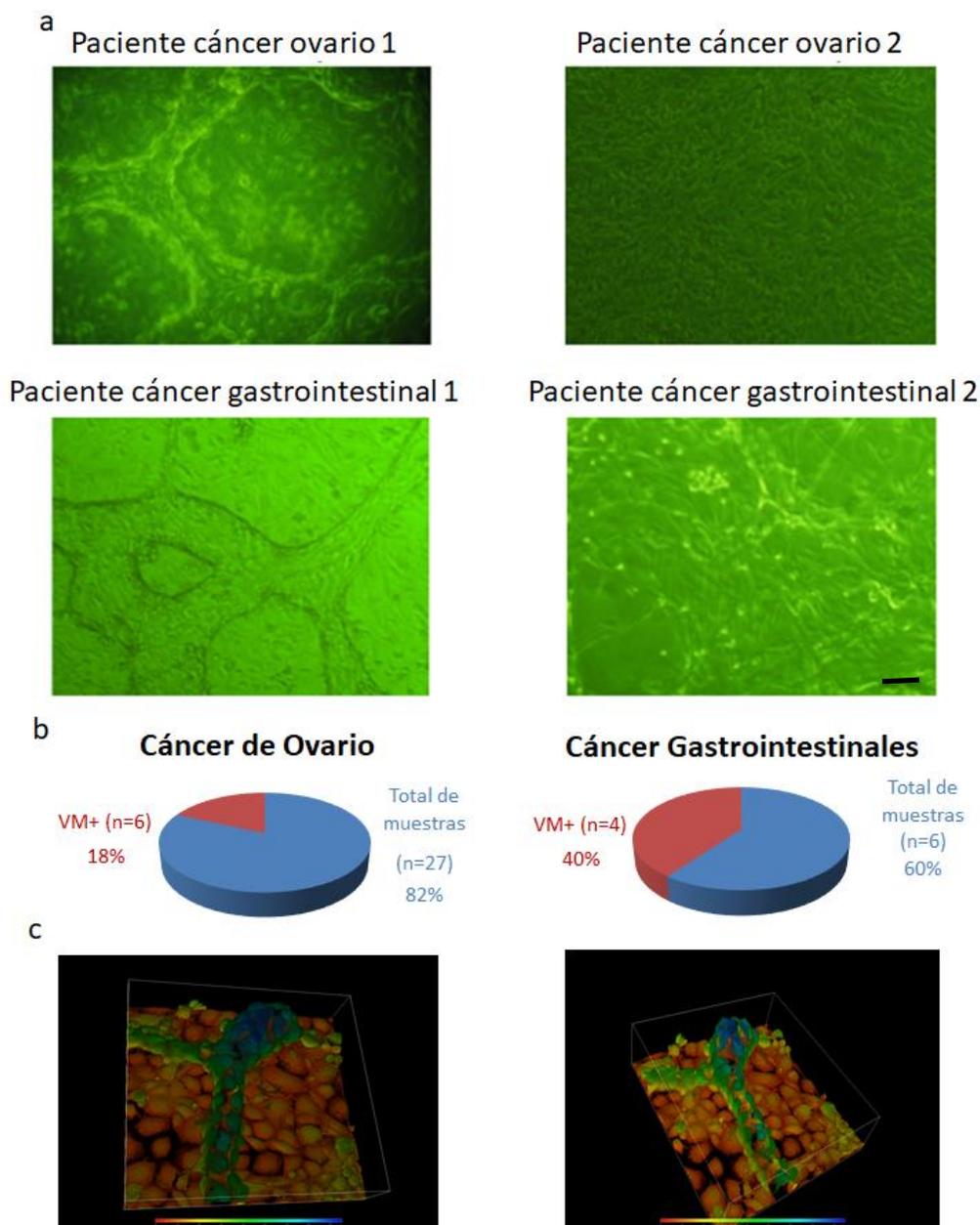


Figura 11: Células de cultivo primario son capaces formar estructuras tubulares. Cultivos primarios de cáncer de ovario y gastrointestinales fueron sembrados sobre matrigel y observados durante 4 a 7 días. En (a) se aprecia 4 cultivos, dos de ovario y dos de cáncer gastrointestinal, en los cuales se observa que uno de cada uno es capaz de formar estructuras tubulares. Barra de escala 100 μ m. En (b), se presentan dos gráficos resumen en los cuales se aparecía que solo un porcentaje de las muestras total analizadas son capaces de formar estructuras tubulares. En (c) se presentan una reconstrucción en 3D por confocal con el programa ZEN 2012 de un cultivo primario de cáncer de ovario. Se observa que las estructuras se presentan elevadas sobre el plano y presentan un lumen en su interior.

8.2- Determinar si la estructura tubular y vías de señalización del proceso de mímica vasculogénica es distinta a la de angiogénesis.

Una vez caracterizado el modelo de VM, tanto en cáncer gástrico y cáncer de ovario, nos interesó determinar si existía alguna diferencia morfológica y estructural entre este tipo de estructuras generadas por células de cáncer en comparación a vasos sanguíneos formados por células endoteliales. Como se mostró anteriormente, las estructuras tubulares de VM tienen la propiedad de teñirse positivas para PAS, lo que indica que existe un componente glicoproteico que les proporciona soporte a las estructuras tubulares. Gracias a esto, logramos reconstruir este componente utilizando microscopía confocal. Para ello, ensayos maduros de 4 días de la línea celular HEY-Green se fijaron y, posteriormente, tiñeron utilizando tinción PAS como se había descrito en la sección de materiales y métodos. Una vez teñidos los ensayos, se montaron para ser analizados mediante microscopía confocal. La tinción PAS es capaz emitir fluorescencia cuando se excita con un láser de argón a 560nm emitiendo en el espectro rojo (95). Esto, junto con las células HEY-Green nos permitió visualizar las glicoproteínas y las células por separado en las estructuras tubulares y reconstruirlas en 3D utilizando el programa ZEN 2012.

En la figura 12a se aprecia la reconstrucción de la tinción PAS desde una perspectiva superior, se puede observar que el color rojo de esta última co-localiza con el color verde del Zs-green solo en las estructuras tubulares. En la figura 12b se aprecia la reconstrucción del componente glicoproteico de una de las estructuras tubulares (notar la presencia del lumen en el centro de esta y como parece completa y sin espacios, a diferencia de los observado en las reconstrucciones del objetivo 1).

En la figura 12c se aprecia la reconstrucción en 3D con el programa IMARIS de una estructura tubular a 40X observando el centro del lumen. Notar la estructura cavernosa de esta misma y la presencia de “pilares” de glicoproteínas en el centro del lumen. En 12d se observa una vez más el componente glicoproteico de esta estructura, en 12e las células observadas por medio de la proteína fluorescente verde Zs-green y finalmente en la figura 12f un merge de ambos canales. En esta figura el componente glicoproteico se observa en el interior de las estructuras, hacia el lado luminal, a diferencia de cómo se organizan en vasos sanguíneos, en los cuales la membrana basal se ubica hacia el interior de los vasos, dándole soporte a las células endoteliales. Un video de esta reconstrucción en 3D puede ser visto en el siguiente link (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> Video 6). En este video se aprecia como las estructuras tubulares ahora parecen completas sin poros, ni espacios como en el video anterior. Esto es debido a que en este caso solo se está reconstruyendo el componente glicoproteico de los tubos y no solo las células.

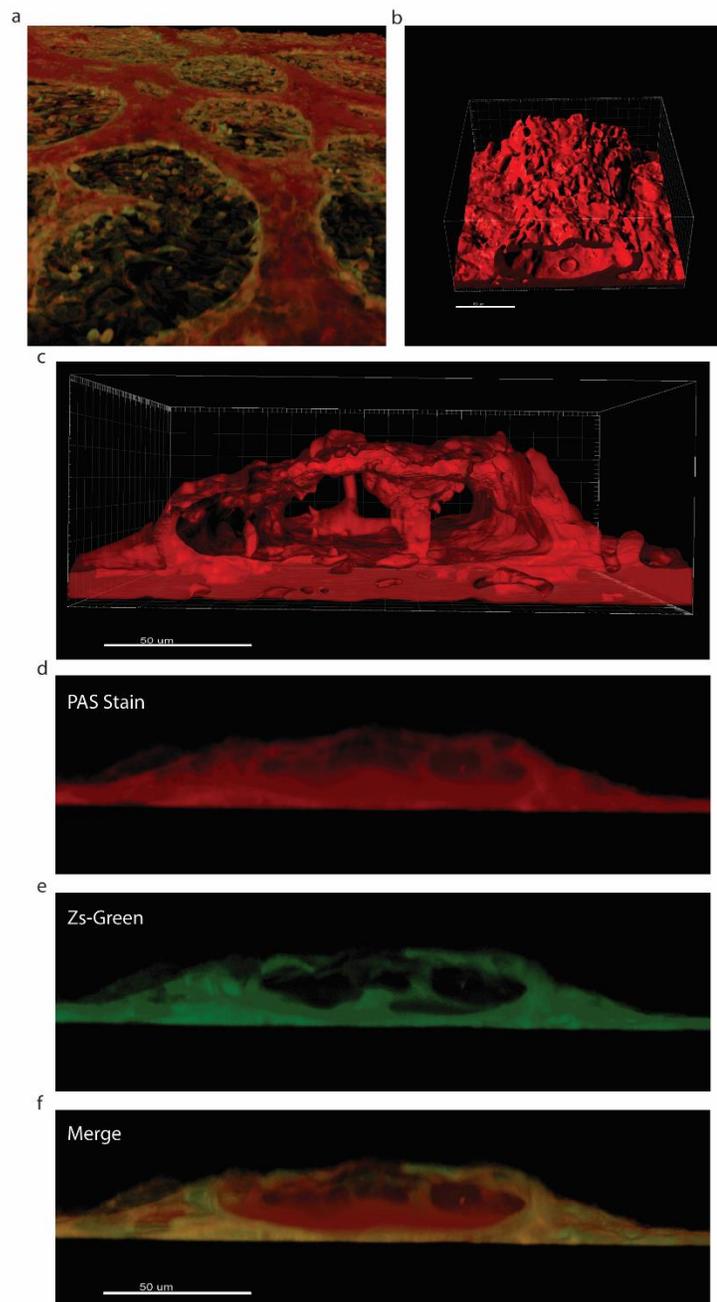


Figura 12: Caracterización del componente glicoproteico de las estructuras tubulares de la línea celular HEY: Caracterización utilizando tinción PAS y microscopía confocal del componente glicoproteico de las estructuras tubulares formadas por la línea celular HEY-green. En (a) se presenta reconstrucción en 3D del cultivo, en (b) reconstrucción en 3D de una estructura tubular mostrando sus glicoproteínas, en (c) misma estructura mostrando el lumen de esta misma. En (d), (e) y (f) reconstrucción mostrando la ubicación interna de las glicoproteínas.

El mismo tipo de reconstrucción lo realizamos en la línea celular de cáncer gástrico AGS, en este caso también se realizó una tinción PAS, para posteriormente reconstruir el componente glicoproteico utilizando el programa ZEN 2012 e IMARIS.

En la figura 13a se observa la reconstrucción en 3D de una estructura generada por la línea celular AGS por medio de la tinción con cell tracker, notar que esta se presenta elevada sobre el plano de las células al igual que en la línea celular HEY-green. En la figura 13b se muestra la reconstrucción en este caso del componente glicoproteico de las estructuras tubulares, teñidas previamente con PAS. Las estructuras tubulares se aprecian más oscuras en comparación a las células de la monocapa. Finalmente, en la figura 13 paneles c-f se aprecia la reconstrucción de una sola estructura tubular en distintos planos mostrándose la presencia de un lumen en los paneles d, e y f. Estos resultados indican que la presencia de una pared de glicoproteínas interna no es exclusiva de cultivos de cáncer de ovario, sino que también se puede encontrar en cáncer gástrico.

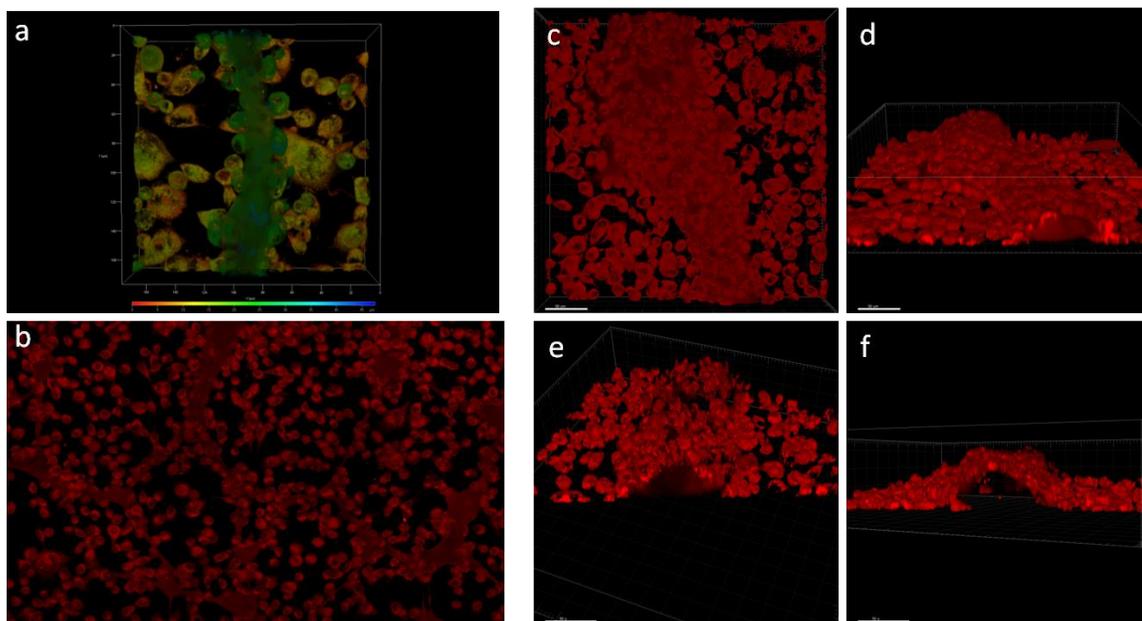


Figura 13: Caracterización del componente glicoproteico de las estructuras tubulares de la línea celular AGS: Caracterización utilizando tinción PAS y microscopia confocal del componente glicoproteico de las estructuras tubulares formadas por la línea celular AGS. En **a** una reconstrucción en 3D de la estructura tubular con el programa ZEN 2012, notar la diferencia de altura presente en las estructuras tubulares y la monocapa celular. En **b** se presenta reconstrucción completa del cultivo analizado mostrando las estructuras tubulares en un color rojo más intenso. En **c a f** se muestra la reconstrucción de una estructura tubular en distintos ángulos mostrando la presencia de un lumen en **d, e y f**.

Hasta ahora determinamos que existe un componente glicoproteico asociado a la formación de estructuras tubulares y que este se presenta en el interior de las mismas, sin embargo, necesitamos determinar que proteína específica está conformando la pared glicoproteica de las estructuras tubulares, para lo cual utilizamos dos aproximaciones experimentales. La primera fue realizar una tinción de sirius red para marcar colágeno de forma específica, y la segunda una inmunofluorescencia contra laminina, utilizando un anticuerpo con mayor especificidad contra laminina humana. Esto debido a que en nuestro modelo utilizamos líneas celulares y cultivos primarios de cáncer humano y la matriz en la cual se forma VM es de origen murino, más específicamente, sarcoma de ratón. Por lo tanto, al utilizar un anticuerpo específico para humano evitamos marcar la laminina presente en el matrigel. Ambas aproximaciones fueron realizadas en ensayos maduros de 4 días de la línea celular HEY-green.

En la tinción de sirius red, la marca de color rosado indica la presencia de pan-colágeno (todos los tipos de colágeno); en la figura 14a se muestran la tinción de sirius red a 10X, en la cual se aprecia una estructura tubular madura de 4 días en cultivo (notar que la estructura tubular aparece de color amarillo descartando que está este compuesta principalmente de colágeno). Lo mismo se puede apreciar en la figura 14b en otra estructura tubular. En la figura 14c se puede apreciar una magnificación a 40X de otra estructura tubular, una vez más, se aprecia que no existe tinción rosada y por ende no existe la presencia de colágeno en la estructura tubular. En la figura 14d finalmente se aprecia la tinción del matrigel como control. Este contiene aproximadamente 18% de colágeno I y IV por lo que se tiñe de forma positiva.

Pan-Colageno Rojo: Colageno

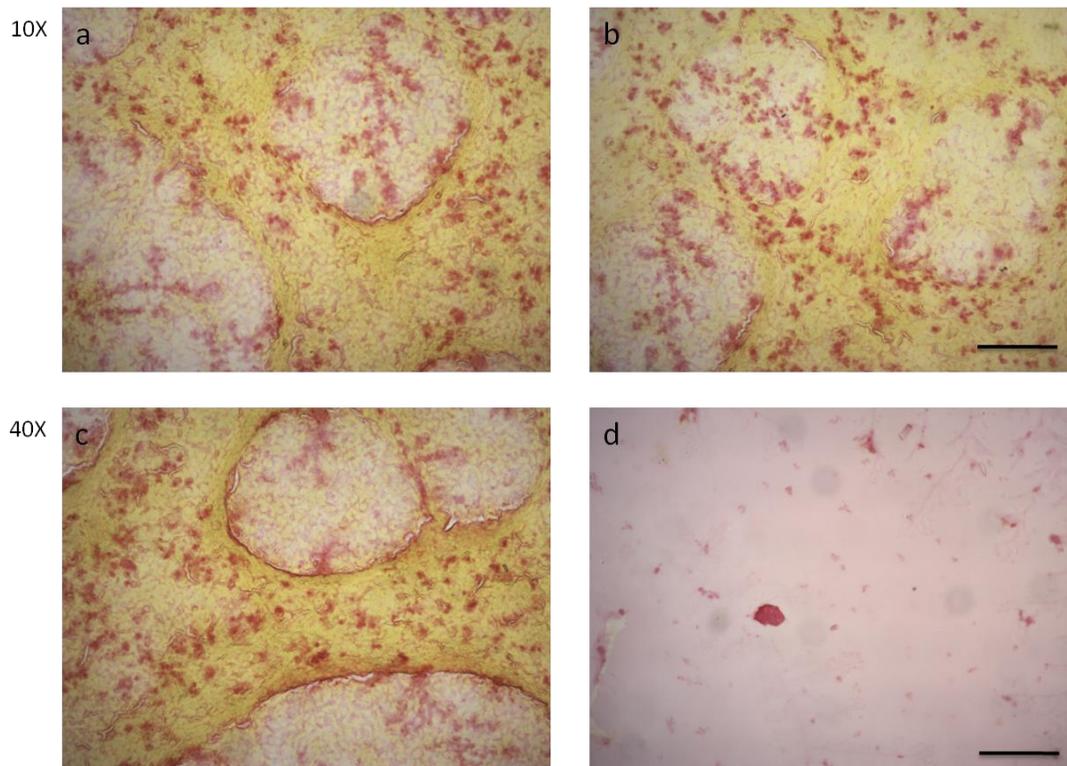


Figura 14: Las estructuras tubulares de la línea HEY-green no se tiñen con tinción sirius red. Cultivos de la línea celular HEY-green fueron teñidos con sirius red, tinción que marca la presencia de colágeno. En (a) y (b) se aprecian dos aéreas distintas del mismo cultivo, en ambos casos se aprecia que no existe tinción de sirius red en las estructuras tubulares. En “c” se aprecia una magnificación al 40X de las mismas estructuras mostrando que efectivamente no existe presencia de colágeno en estas. En (d) se aprecia el control de la tinción, en este caso solo se tiñó el matrigel mostrando que efectivamente la tinción está funcionando. Barra de escala en ambos casos 100µm.

Luego de descartar la presencia de colágeno en la pared de las estructuras tubulares procedimos a verificar la presencia de laminina en estructuras tubulares por medio de inmunofluorescencia contra pan-laminina humana. Para ello, utilizamos una vez más cultivos maduros de 4 días de la línea celular HEY-green. En la figura 15a se aprecia la inmunofluorescencia de las células mostrando inicialmente los núcleos teñidos con DAPI, posteriormente, la fluorescencia de las células en verde, luego la marca del anticuerpo contra laminina en rojo y, finalmente, el merge de los 3 canales posteriores. Se aprecia que la marca del anticuerpo contra laminina solo co-localiza con las células en las estructuras tubulares. En la figura 15b se presenta el control negativo de esta inmunofluorescencia mostrando que la marca en el panel “a” es específica. Finalmente, en la figura 15c se observa una magnificación al 40X de una de las estructuras mostrando con detalle la presencia de la marca de laminina dentro de las estructuras tubulares, bajo las células de cáncer. En la misma figura se aprecia un inserto mostrando una representación esquemática de cómo se ubicaría la laminina en el interior de la estructura tubular.

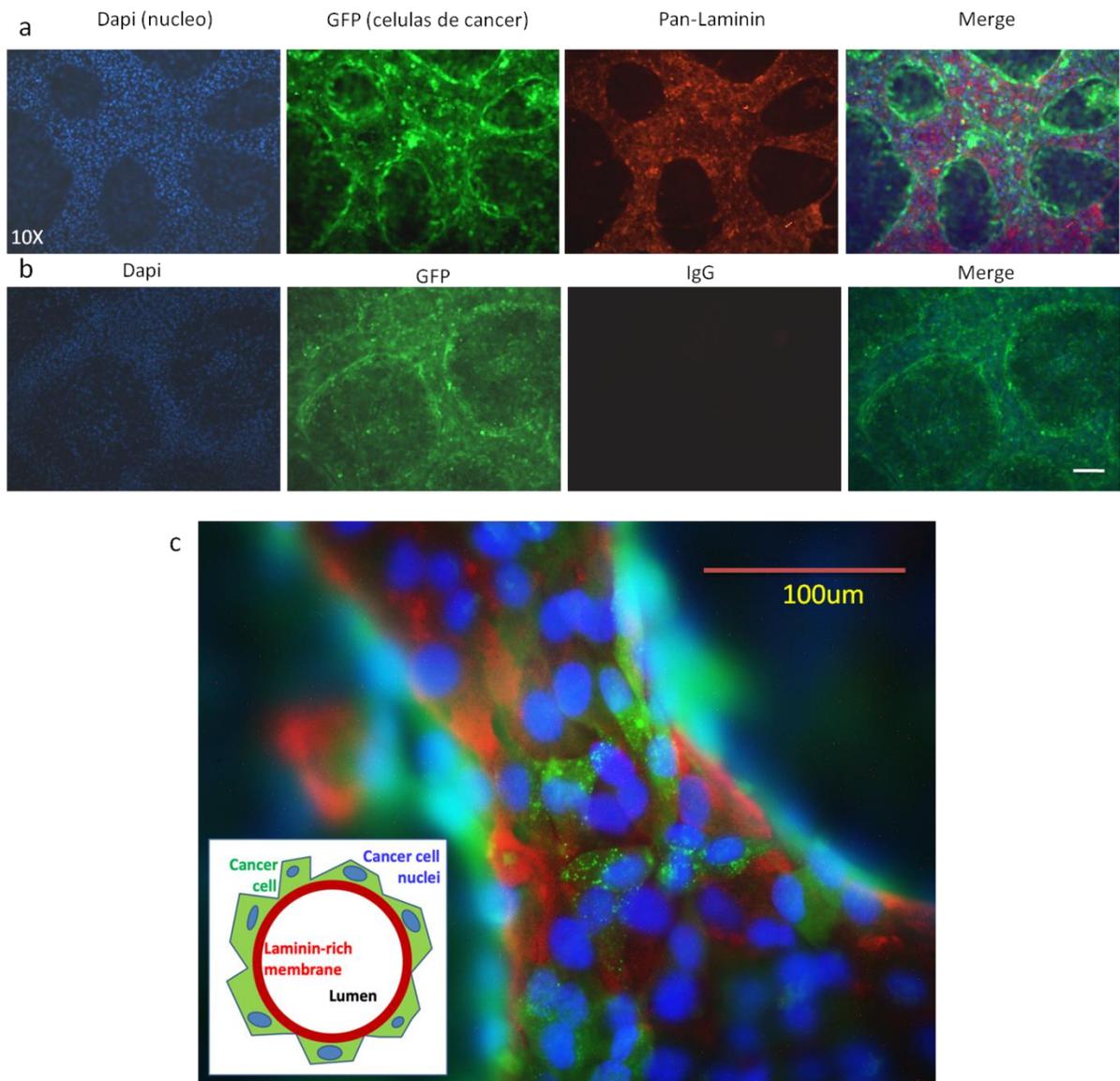


Figura 15: Las estructuras tubulares de la línea HEY-green son ricas en laminina. Inmunofluorescencia de cultivos de la línea celular HEY-green, en azul tinción de núcleo, en verde fluorescencia del Zs-green de las células y en rojo la señal del anticuerpo contra pan-laminina. En (a) inmunofluorescencia de las células HEY-green contra laminina, se aprecia que la presencia de laminina coincide con las estructuras tubulares. En (b) se presenta el control de este ensayo. Barras de escala 100µm. En (c) magnificación al 40X de una estructura tubular mostrando la presencia de la marca de laminina en la estructura tubular. En el inserto se aprecia forma esquemática la localización de la laminina. Barra de escala 100µm.

También deseamos determinar si las vías de señalización relacionadas con angiogénesis (ver figura suplementaria 2) tenían algún rol en la formación de VM, utilizando factores de crecimiento e inhibidores farmacológicos.

Inicialmente, utilizando ensayos de HEY-green procedimos a utilizar los factores de crecimiento VEGF y PDGF para determinar si estos estimulan el proceso de VM. Como se aprecia en la figura 16a, ambos factores utilizados en distintas concentraciones no tienen efecto en el proceso de formación de estructuras tubulares a día 4. En el resto de los días (1-3) tampoco se observan cambios (resultados no mostrados). Por otro lado, en la figura 16b se utilizaron inhibidores de los receptores de VEGF y PDGF. Los inhibidores utilizados fueron Avastin (secuestrador de VEGF-A) y AG1295 (inhibidor de PDGFR2) a 20 μ g/ml y 10 μ M, respectivamente (108). Como se aprecia en esta figura, la inhibición de estos receptores no afecta el proceso de VM a día 4. En el resto de los días (1-3) tampoco se observan cambios (resultados no mostrados).

Finalmente, nos propusimos a realizar otra inhibición química de moléculas río abajo de los receptores de PDGF y VEGF, como son Src y MERK1/2. Para ello, utilizamos inhibidores farmacológicos, en este caso PP2 y U0126, para inhibir Src y MERK1/2, respectivamente. Estos fueron usados a una concentración de 3,01 μ g/ml y 4,03 μ g/ml, respectivamente.

En la figura 17 se muestra los resultados de ensayos con las células HEY-green sembradas en matrigel durante 4 días en cultivos. Como se ve, con los inhibidores PP2 y U0126 no hay un efecto sobre la formación de estructuras tubulares de VM.

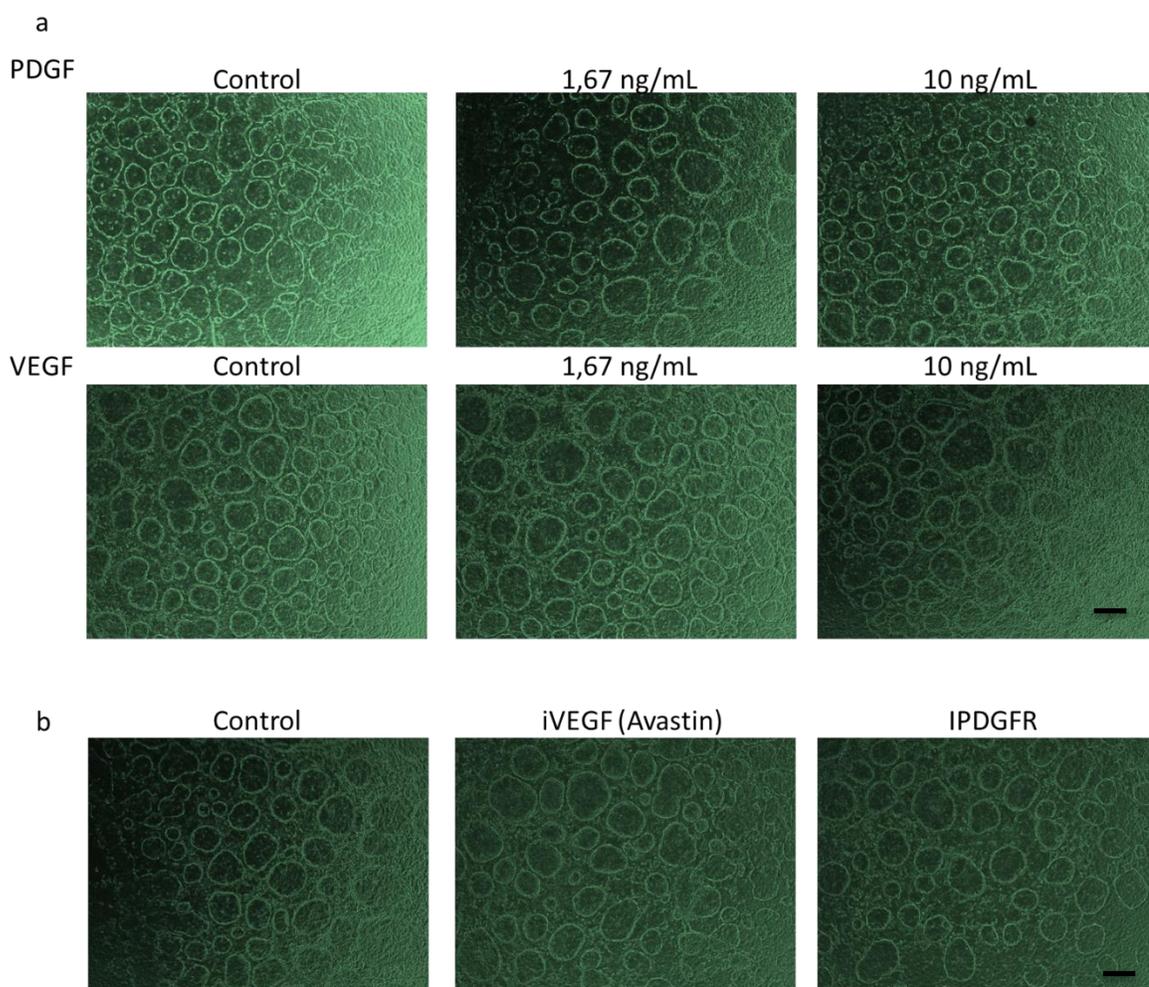


Figura 16: VEGF, PDGF y sus receptores no están involucrados en la formación de estructuras tubulares de VM. Ensayos de la línea celular HEY-green fueron realizados en un cover de vidrio y seguidos durante 4 días para monitorear la formación de estructuras tubulares. A día 0 y día 3 se les aplicó ya sea PDGF, VEGF o los inhibidores de la vía de señalización. En (a) se aprecian imágenes a día 4 utilizando distintas concentraciones de PDGF y VEGF. En ambos casos y en ambas concentraciones no existe diferencia en el proceso de formación de estructuras tubulares. En (b) se muestra el uso de inhibidores, en este caso Avastin (secuestrador de VEGF-A) y AG1295 (inhibidor del receptor PDGFR-2) utilizados a 20 μ g/ml y 10 μ M, respectivamente. En ambos casos se aprecia que no existe diferencia entre la presencia de los inhibidores y la condición control. Barra de escala 100 μ m.

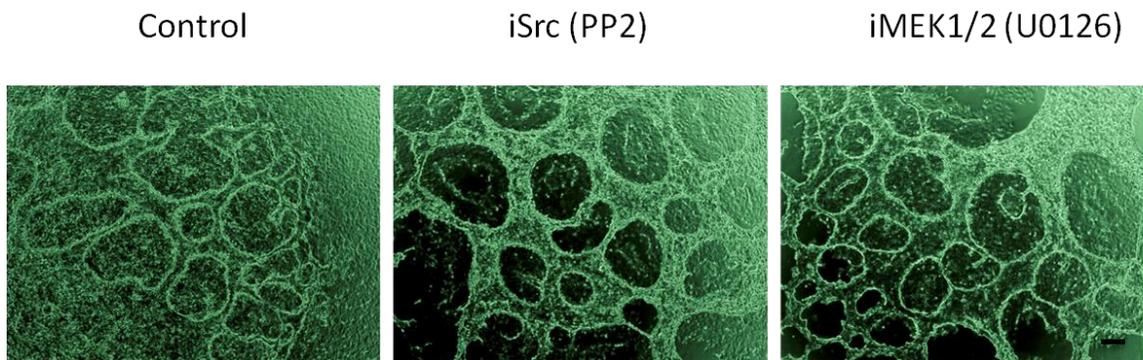


Figura 17: Vías de señalización involucradas con el proceso de angiogénesis no están involucradas en la formación de estructuras tubulares de VM. Ensayos de la línea celular HEY-green fueron realizados en un cover de vidrio y seguidos durante 4 días para monitorear la formación de estructuras tubulares. A día 0 y día 3 se les aplicaron los inhibidores PP2 (Src) y U0126 (MEK1/2). Como se puede apreciar, no existe diferencia después de 4 días en cultivo entre la condición control y la aplicación de los inhibidores. Barra de escala 100 μ m.

8.3- Evaluar cambios en los niveles mRNA durante la formación del proceso de mímica vasculogénica.

Con el fin de evaluar los cambios en la expresión genética ocurridos durante el proceso de formación de VM procedimos a realizar un microarray de células de cáncer gástrico en condiciones en que formen y no formen estructuras tubulares.

Inicialmente, para descartar el efecto tanto de los días en cultivo como también de la matriz extracelular, se sembraron células AGS sobre matrigel normal y denaturado a 60°C, lo que impide la formación de estructuras tubulares. En la figura 18a se puede observar cultivos de AGS a día 1 y 2 en los que se muestra la diferencia entre matrigel normal y denaturado. En el caso del normal a día 1 ya se aprecia formación de estructuras tubulares, madurando estas a día 2. En el caso del matrigel denaturado se aprecia que no existe formación de estructuras tubulares en ninguno de los dos días.

Posteriormente, se procedió a extraer RNA utilizando el kit mencionado en la sección de materiales, tanto en día 1 como en día 2. El RNA extraído poseía una concentración e integridad óptima para este experimento como se muestra en la figura 18b.

El RNA fue enviado a Toronto, al departamento de bioinformática de la empresa Sickkids, para su análisis por microarray. En la tabla I y II se listan los genes up y down regulated que aparecieron posterior al análisis de microarray. Lamentablemente los resultados de este microarray no fueron los esperados, esto debido a que no fuimos capaces de reproducir los resultados obtenidos por qPCR en ninguna línea celular, incluida la línea AGS en la que se realizaron los experimentos. Una explicación para este problema de reproducibilidad puede deberse a la gran variabilidad que presenta la línea AGS entre pasajes, otro problema también

fueron los tiempos escogidos para el análisis, los cuales fueron día 1 y día 2 de formación, los cuales no podrían explicar el proceso de formación de estructuras tubulares desde su inicio.

Actualmente un nuevo ensayo, en este caso un RNAseq se está realizando en nuestro laboratorio, en este caso se utiliza la línea celular HEY, la cual es más estable entre pasajes en relación con el proceso de formación de VM, por otro lado, se escogieron tiempos más cortos de formación los cuales son: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 y 48 Hrs. Con este nuevo RNAseq esperamos entender el proceso de formación de VM desde su inicio pasando por su maduración y termino.

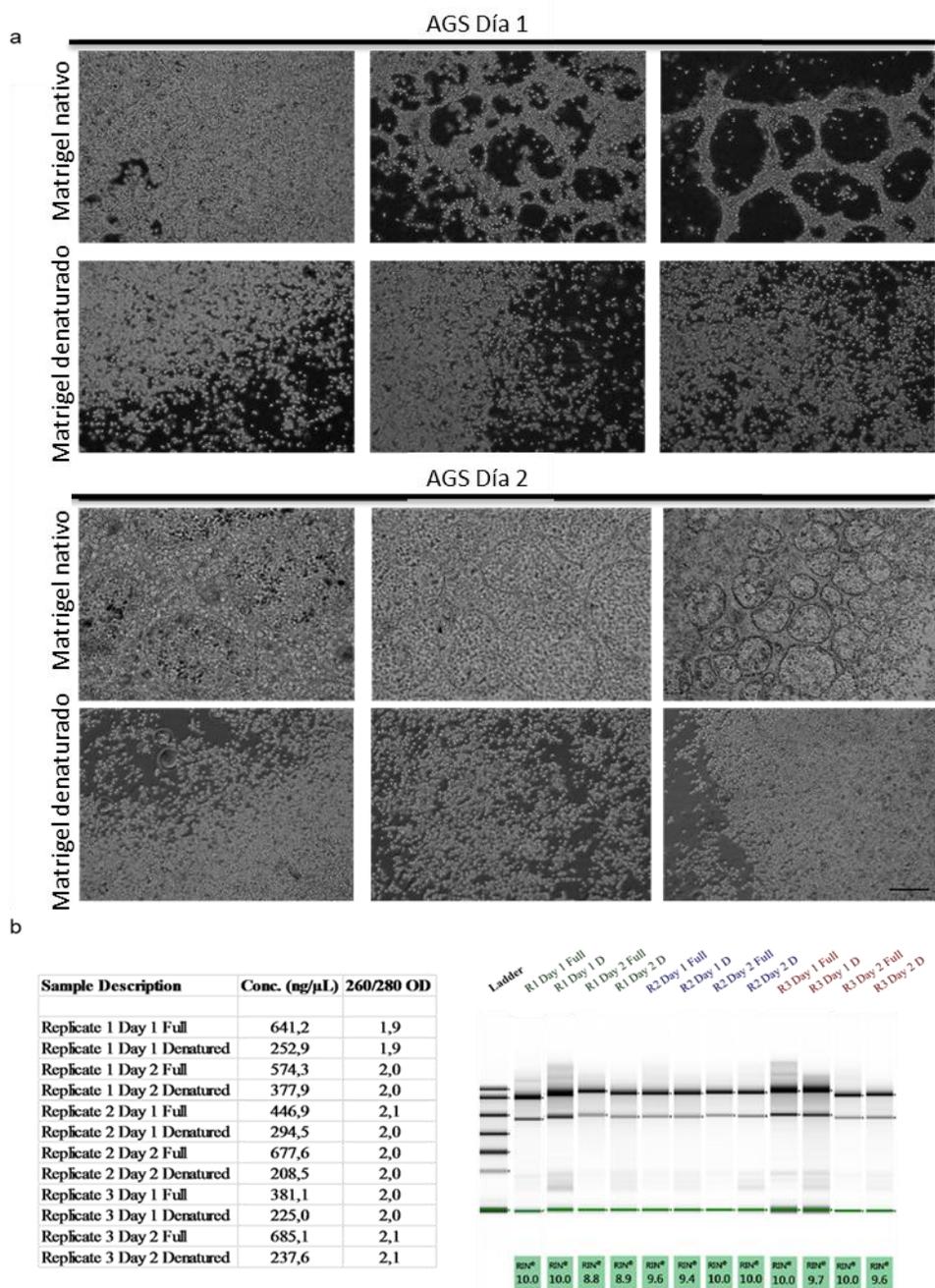


Figura 18: Estandarización del microarray de VM en línea celular de cáncer gástrico AGS. Para poder realizar el microarray de la forma más correcta posible, la línea celular AGS se sembró sobre matrigel donde es capaz de formar estructuras tubulares y sobre matrigel denaturado donde solo crece como una monocapa. Se aprecia en (a) en el panel superior que a día 1 las células AGS no son capaces de formar estructuras tubulares en matrigel denaturado, fenómeno que se repite en el panel inferior a día 2. En (b) se aprecia un resumen de los parámetros del RNA extraído, se muestra en el panel de la izquierda las concentraciones de RNA extraídas y su relación 260/280. En el panel de la derecha se muestra la integridad del RNA. En todos los casos la integridad mostro un RIN igual o superior 8.8 considerado óptimo. Barra de escala 200 μ m.

Tabla I: Top 10 genes upregulated en análisis de microarray

| Up Regulated | Símbolo | Valor de P | Función |
|--------------|----------|------------|--|
| 17518 | ZNF253 | 0,00120983 | Puede funcionar como un factor de transcripción. Parece tener una actividad de represión transcripcional. |
| 17527 | ZNF267 | 0,00227344 | Represor de la expresión del gen MMP10, confirmada por ensayo del gen reportero |
| 13478 | SCEL | 0,00344601 | Diferenciación terminal del marcador de epidermis. |
| 9815 | NBPF12 | 1,859E-06 | Implicado en varias enfermedades del desarrollo y neurogenéticas, como microcefalia, macrocefalia, autismo, esquizofrenia, discapacidad cognitiva, cardiopatía congénita, neuroblastoma y anomalías congénitas del riñón y del tracto urinario |
| 17750 | ZNF615 | 0,00030609 | Desconocido |
| 9299 | MORC3 | 0,00074319 | Este gen codifica una proteína que se localiza en la matriz nuclear y forma cuerpos nucleares a través de un mecanismo dependiente de ATP |
| 2781 | CENPC | 0,0008651 | La proteína C 1 de centrómero es un autoantígeno centrómero y un componente de la placa kinetochore interna. La proteína es necesaria para mantener el tamaño adecuado del cinetocoro y una transición oportuna a la anafase |
| 17540 | ZNF283 | 0,00030429 | Desconocido |
| 14064 | SLC25A40 | 5,6033E-05 | SLC25A40 pertenece a la familia SLC25 de proteínas portadoras mitocondriales |
| 15579 | TIGD2 | 0,00025559 | La proteína pertenece a la subfamilia tigger de la superfamilia pogo de transposones mediados por ADN en humanos. Estas proteínas están relacionadas con los transposones de ADN que se encuentran en los hongos y nematodos, y más a distancia de las transposasas Tc1 y mariner. |

Tabla II: Top 10 genes downregulated en análisis de microarray

| Down Regulated | Símbolo | Valor de P | Función |
|----------------|------------|------------|--|
| 7133 | IFNA14 | 5,64E-05 | Producido por macrófagos, el IFN-alfa tiene actividades antivirales. El interferón estimula la producción de dos enzimas: una proteína quinasa y una oligoadenilato sintetasa. |
| 16172 | TRBV6-5 | 0,00085303 | Desconocido |
| 8150 | KRTAP5-7 | 0,00042253 | En la corteza del cabello, los filamentos intermedios de queratina del cabello están incrustados en una matriz interfilamentosa, esencial para la formación de un tallo capilar rígido y resistente. |
| 8080 | KRTAP10-12 | 4,4055E-05 | En la corteza del cabello, los filamentos intermedios de queratina del cabello están incrustados en una matriz interfilamentosa, esencial para la formación de un tallo capilar rígido y resistente. |
| 7214 | IGLL5 | 0,00094403 | es un gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con IGLL5 incluyen el plasmocitoma ósea solitaria |
| 93 | ABHD8 | 4,8494E-06 | Desconocido |
| 4319 | DPM3 | 0,00253408 | DPM3 (Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase Subunit 3) is a Protein Coding gene, iseases associated with DPM3 include Congenital Disorder Of Glycosylation, Type Io and Walker-Warburg Syndrome |
| 2897 | CGB3 | 6,956E-05 | CGB3 (Chorionic Gonadotropin Beta Subunit 3) es un gen codificante de proteínas. Las enfermedades asociadas con este gen incluyen el síndrome de Walker-Warburg. |
| 6242 | GPIHBP1 | 0,00076414 | Las enfermedades asociadas con GPIHBP1 incluyen hiperlipoproteinemia, tipo 1D y pancreatitis aguda recurrente |
| 10980 | OXT | 0,00209742 | OXT (Oxytocin/Neurophysin I Prepropeptide) es un gen que codifica proteínas. Las enfermedades asociadas con OXT incluyen endometritis y corioamnionitis. |

8.4- Determinar si la matriz extracelular y sus componentes proteicos juegan un rol en la formación de estructuras tubulares.

La ECM juega un rol fundamental para la generación de estructuras tubulares en el proceso de VM. Tanto en la literatura como en nuestro laboratorio se requiere sembrar las células sobre matrigel, un reconstituyente de la ECM para lograr generar estructuras tubulares.

Conocemos gracias al fabricante (Corning) que el matrigel está compuesto por un 60% de laminina 1, un 38% de colágeno IV y el 2% restante de colágeno I, fibronectina y proteoglicanos. Conociendo estos componentes, nos propusimos determinar cuál de ellos de forma específica son capaces de iniciar el proceso de formación de VM *in vitro*. Para ello, utilizamos coatings de proteínas recombinante de laminina 1, colágeno IV, colágeno I, fibronectina y el componente acuoso del matrigel, llamado hidrogel.

Los coatings fueron realizados colocando proteínas recombinantes en medio de cultivo a la misma concentración del matrigel. Posteriormente, este medio de cultivo fue colocado sobre un cover de vidrio y se dejó reposar sobre él por dos horas en una incubadora a 37° para permitir a las proteínas decantar sobre el cover.

Como se observa en la figura 19, solo cuando las células se sembraron sobre el matrigel nativo, se generaron las estructuras tubulares, el coating de las proteínas individuales sobre un cover de vidrio no fue suficiente para iniciar el proceso de formación de VM. Esto fue observado tanto en la línea Hey-green de cáncer ovario (figura 19a) y en la línea celular AGS de cáncer gástrico (figura 19b).

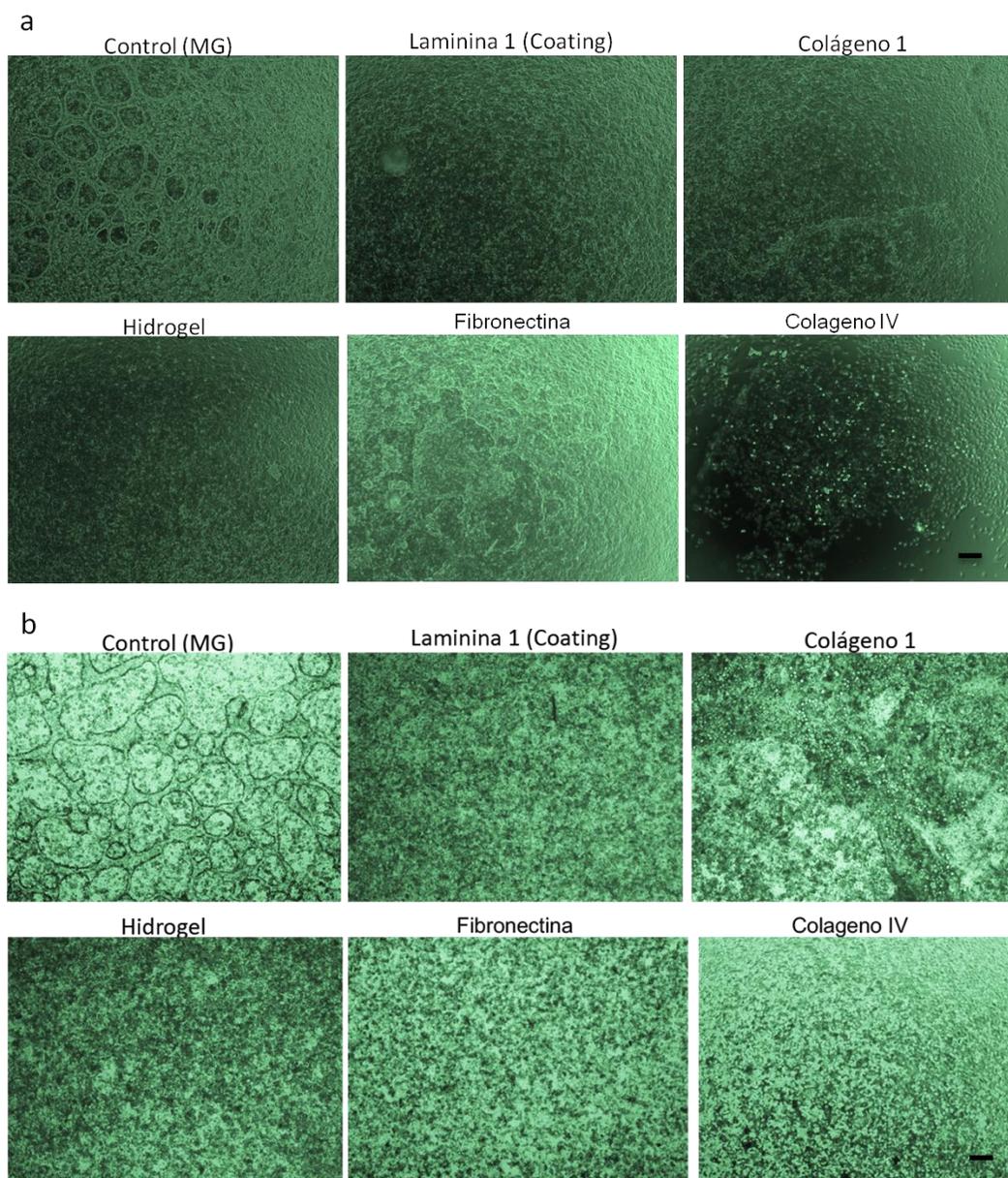


Figura 19: Coatings de proteínas recombinantes no son suficientes para iniciar el proceso de VM. Coatings de las distintas proteínas que componen el matrigel fue realizado sobre covers de vidrio, las proteínas analizadas fueron laminina 1, colágeno I, colágeno IV, fibronectina y el componente acuoso del matrigel (hidrogel). Posteriormente, células HEY-green y AGS fueron sembradas sobre los covers y monitoreadas por 4 días en cultivo. Como se aprecia en los paneles (a) y (b), solo existió formación de estructuras tubulares con el matrigel completo, tanto en la línea celular HEY-green (a) y AGS (b). Barra de escala 100 μ m.

Posteriormente, analizamos si geles ricos en proteínas individuales, las cuales a su vez están presentes en el matrigel, eran capaces de gatillar el proceso de formación de estructuras tubulares. Para ello, adquirimos geles de la compañía Trevigen que contenían solo laminina 1 y colágeno I, respectivamente. Estos geles fueron utilizados para realizar los ensayos de la misma forma en que se utiliza el matrigel sobre covers de vidrio para después sembrar células sobre ellos.

En línea con resultados anteriores, en la figura 20a, tanto la línea celular HEY-green de cáncer de ovario como la línea celular AGS de cáncer gástrico, fueron capaces de formar estructuras tubulares tanto en matrigel como en el gel rico en laminina 1. Las estructuras de la línea celular HEY-green generadas en el gel de laminina 1 fueron a la vez reconstruidas en 3D utilizando microscopía confocal y el programa IMARIS para confirmar que estas poseían un lumen en su interior. Como se puede apreciar en la figura 20b, estas estructuras estaban efectivamente elevadas sobre el plano y poseían un lumen en su interior.

Tal como en las reconstrucciones anteriores, un video suplementario de esta reconstrucción en 3D puede ser visto en siguiente vinculo (<http://www.labowen.cl/cgi-bin/Website/Pages/Internal.html.pl?PagId=52&> Video 7). En él se puede apreciar la reconstrucción de una estructura por el programa IMARIS y su corte transversal mostrando como esta se encuentra elevada sobre el plano y el interior del lumen.

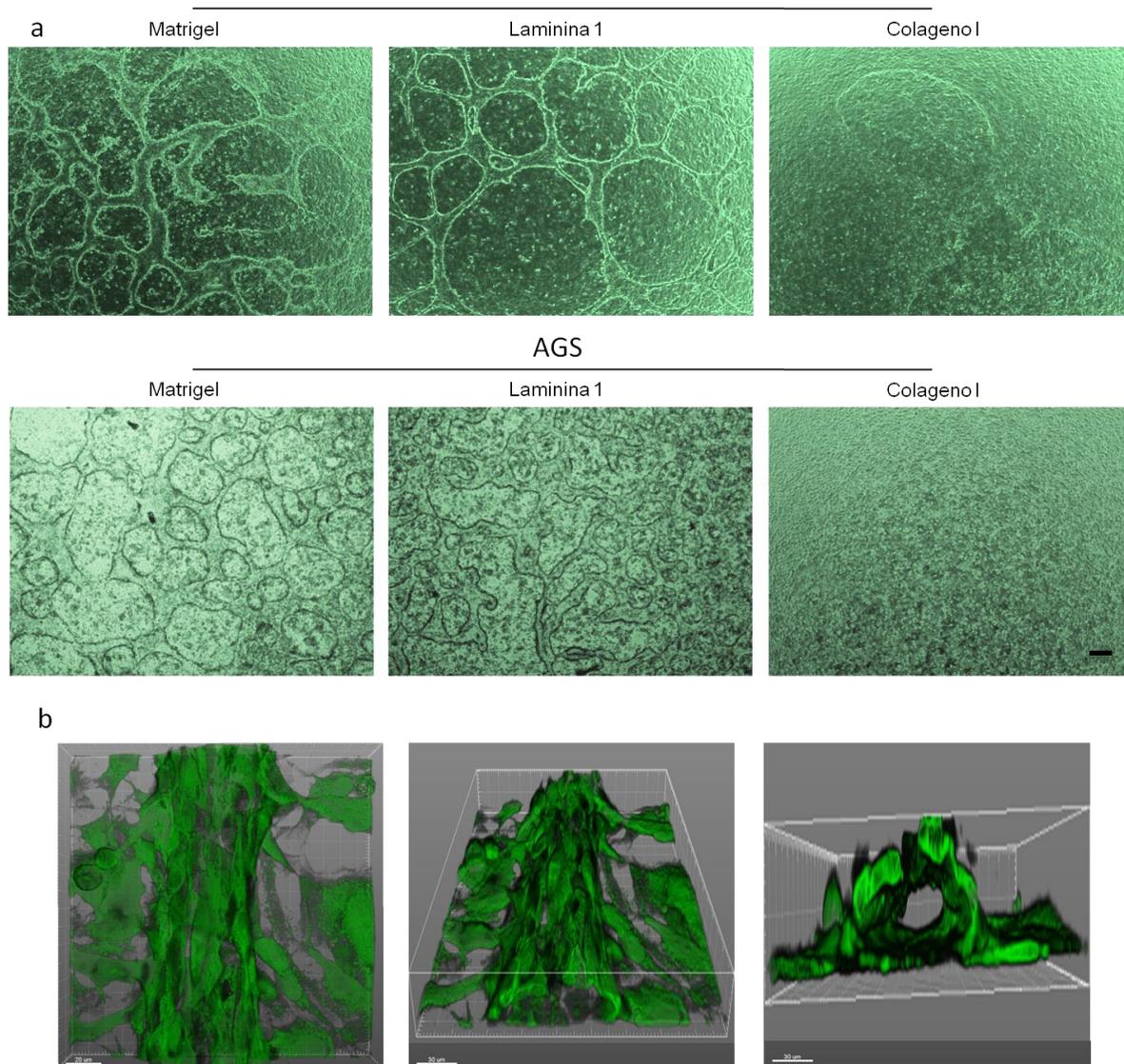


Figura 20: Geles formados a partir de laminina 1 son capaces de gatillar el proceso de formación de VM. Células de cáncer de ovario HEY-green y de cáncer gástrico AGS fueron sembradas sobre matrigel, un gel de laminina 1 y un gel de colágeno 1, y fueron observadas durante 4 días en cultivo. Como se aprecia en (a) las células fueron capaces de formar tubos solo en matrigel y laminina 1, no así sobre colágeno 1. Barra de escala 100 μm. En (b) se puede apreciar que estas estructuras tubulares que se generan en geles de laminina son efectivamente elevadas sobre el plano y presentan un lumen en su interior. Barra de escala 30 μm.

Una vez confirmado que la sola presencia de laminina era suficiente para generar estructuras tubulares y que estas efectivamente contenían un lumen en su interior, procedimos a comprobar si estas eran funcionales. Para ello, microinyectamos las estructuras tubulares generadas en geles de laminina de la línea celular HEY-green y AGS para confirmar si estas eran capaces de mover un colorante fluorescente en su interior a presión constante, como se describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 21 a y b, tanto las estructuras formadas por la línea celular HEY-green y la línea AGS fueron capaces de mover un colorante, en este caso azul de tripán, en su interior cuando se inyectó a presión constante.

Finalmente, nos propusimos determinar si la laminina podía iniciar el proceso de formación de estructuras tubulares en cultivos primarios de pacientes. Para ello, tomamos células de un cultivo primario que fue capaz de formar estructuras tubulares y se sembró sobre matrigel, un gel único de laminina 1 y uno de colágeno I.

Como se muestra en la figura 22a, el cultivo en cuestión fue capaz de formar estructuras tubulares luego de 4 días en cultivo, tanto en matrigel como en el gel rico en laminina 1. En el caso del gel rico en colágeno I, solo existió la formación de una monocapa de células.

En la figura 22b se aprecia una microinyección de colorante azul de tripán en el cultivo generado sobre el gel de laminina 1. Como se aprecia en esta imagen, el colorante fue capaz de fluir dentro de las estructuras cuando se inyectó con presión constante mostrando la funcionalidad de estas.

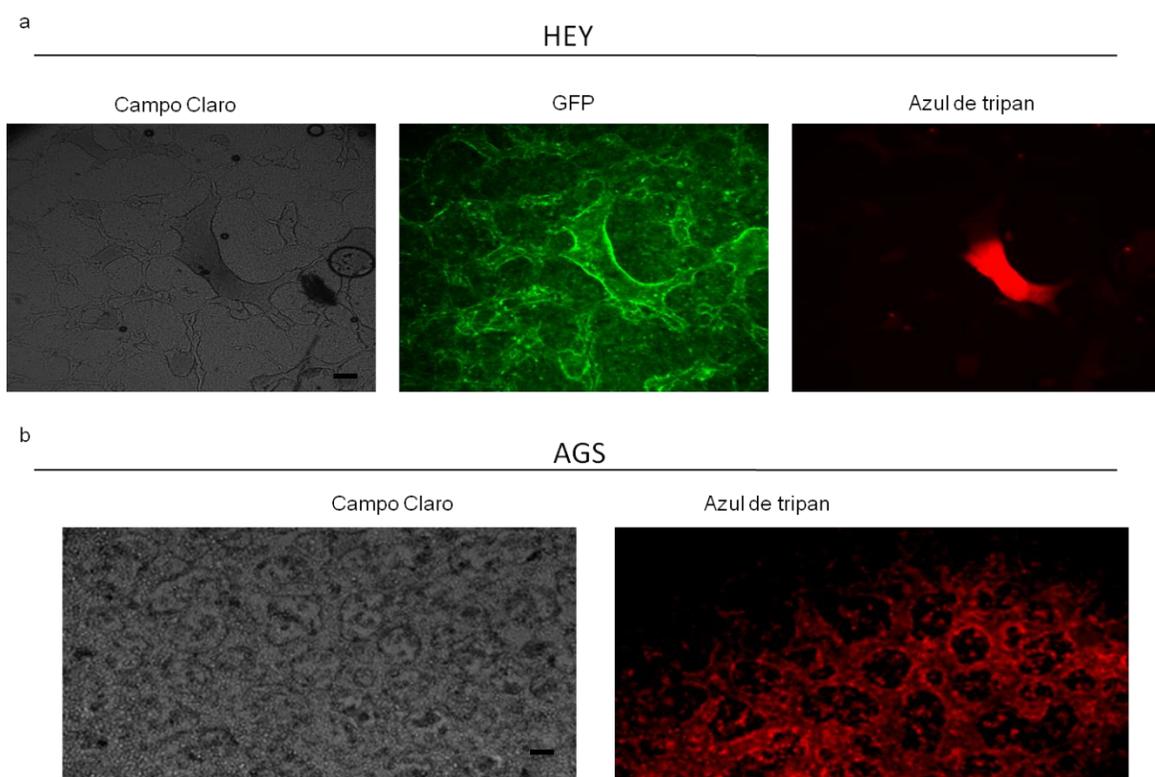


Figura 21: Estructuras de VM generadas en geles de laminina 1 son funcionales. Células HEY-green y AGS fueron sembradas sobre geles que contenían solo laminina 1, al cabo de 4 días los ensayos se fijaron y se microinyectaron con azul de tripan. En (a) microinyección de la línea celular HEY-green, en el panel de la izquierda imagen del contraste de fase de la zona de inyección, en el panel central señal del Zs-green de las células, en el panel de la derecha señal del colorante fluorescente (notar como este se mantuvo en el interior de las estructuras tubulares). En (b) microinyección de la línea celular AGS, en el panel de la izquierda imagen de campo claro de la zona de inyección y a la derecha la señal del colorante. Una vez más, la señal de este último se limitó principalmente al interior de las estructuras tubulares. Barra de escala 200 μ m.

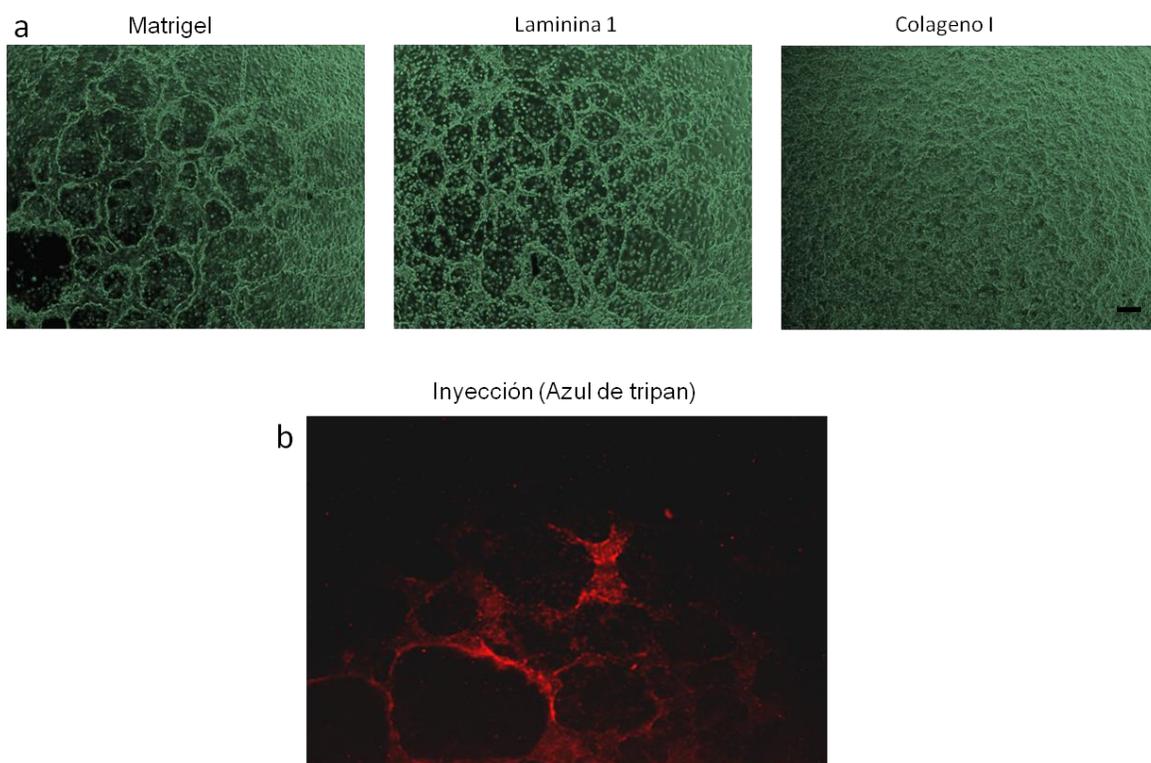


Figura 22: Cultivos primarios de cáncer de ovario son capaces de formar estructuras tubulares en laminina 1 y son funcionales. Células de cultivo primarios de cáncer de ovario fueron sembradas sobre matrigel y geles que contenían solo laminina 1 o colágeno I. En (a) fotos de cultivo primario a día 4, notar como solo en la condición matrigel y laminina existe presencia de estructuras tubulares. En (b) microinyección de las estructuras formadas en gel de laminina 1 (notar el movimiento del colorante fluorescente al interior de las estructuras). Barra de escala 100 μ m.

8.5- Determinar si la señalización de la matriz extracelular es esencial en el proceso de formación de mímica vasculogénica *in vitro*.

Una vez confirmado que la ECM era requerida para la formación de estructuras tubulares, se procedió a determinar que vías de señalización está usando esta proteína de matriz para gatillar el proceso de VM. Para ello, procedimos a utilizar inhibidores farmacológicos de distintas vías de señalización relacionadas con la adhesión de las células a la ECM, específicamente la señalización con integrinas.

Una posible vía de señalización que sospechamos debería estar involucrada en el proceso de formación VM, es la señalización mediada por integrinas. Esto debido a que la presencia de laminina en la ECM era una condición requerida para la generación de estructuras tubulares.

Para determinar que integrinas están involucradas en el proceso de formación de VM, se realizó inicialmente un análisis en el Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) usando 11 líneas celulares: 6 que forman VM (SKOV3, HEYA8 y AGS, OVCAR3, PC3, y MD-MB-231) y 5 que no son capaces de formar (ZR-751, ZR-753, U87, A2780 y KATO III). Las integrinas asociadas con el proceso de adhesión a la ECM pueden ser observadas en la figura 23a.

De estas integrinas y sabiendo cuales de estas señalizan a través de la unión a laminina (recordemos que lamina 1 es el componente de la matriz que gatilla VM, (ver figura 20)) se procedió a analizar las integrinas expresadas en la línea celular HEY-green por medio de RT-PCR. Como se aprecia en la figura 23b, el gen ITGA2 que corresponde a la integrina $\alpha 2$ presenta un aumento significativo cuando se comparan día 1 con día 2 de formación de VM. (Anova, $p < 0.05$).

Se conoce que las integrinas forman heterodímeros para señalizar, por lo que una sub-unidad β es requerida para la señalización por lamina. Del análisis del CCLE podemos ver que el gen ITGB1, que corresponde a la subunidad $\beta 1$, está aumentado en las células capaces de formar VM.

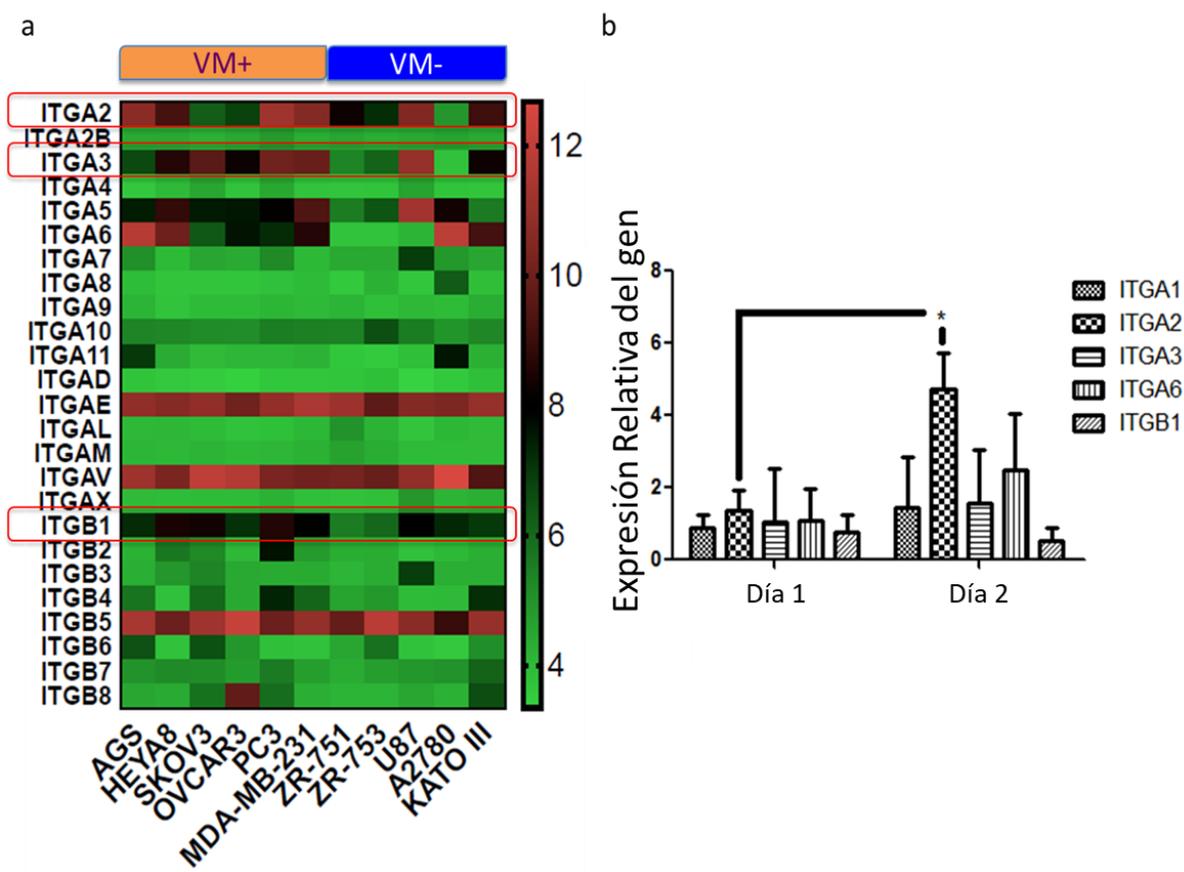


Figura 23: Análisis de la presencia de integrinas y su asociación con VM. (a) Análisis de CCL en 3 líneas celulares capaces de formar VM: SKOV3, AGS y HEYA8, y una que no es capaz: UCI101. Se observa un aumento en la expresión del gen de la integrina en particular con escala de colores, siendo el rojo un aumento en la expresión y el verde una disminución. (b) Análisis de la línea celular HEY-green por medio de RT-PCR. Como se aprecia, el gen ITGA2, que corresponde a la integrina $\alpha 2$, presenta un aumento significativo cuando se comparan día 1 con día 2 de formación de VM. (Anova, $p < 0.05$).

Conociendo estas dos sub-unidades decidimos realizar una inhibición farmacológica para determinar si la integrina $\alpha_2\beta_1$ está involucrada en el proceso de formación de VM. Se utilizó un inhibidor selectivo denominado TCI-15, el cual es específico para esta última hasta concentraciones de 1 a 10 μM , sin embargo, a concentraciones mayores de 10 hasta 50 μM , este inhibidor bloquea además las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$, según se ha reportado previamente en la literatura (109,110).

En la figura 24 se pueden apreciar ensayos de VM utilizando la línea celular HEY-green después de 4 días en cultivo. Se puede observar que la presencia de este inhibidor es capaz de bloquear parcialmente la formación de estructuras tubulares. Esto indica que la integrina $\alpha_2\beta_1$ juega un rol en la formación inicial del proceso de VM, pero no es la única responsable, pudiendo además estar involucradas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Las integrinas son capaces de señalizar al interior de la célula por el eje de PI3K/AKT y FAK, para comprobar si esta vía de señalización es esencial para la formación de VM, utilizamos inhibidores de FAK, PI3K y AKT. Estos inhibidores se utilizaron a distintas concentraciones. El inhibidor de FAK (PF573228) fue utilizado a la concentración de su IC50, previamente reportada (111); el inhibidor de AKT (AKT inhibidor IV) se utilizó a 625nM, concentración reportada como no tóxica en la literatura (112). Por otro lado, utilizamos el inhibidor de PI3K (LY29002) a distintas concentraciones, en este caso a 10 y 20 μM . A estas concentraciones se ha reportado previamente que el compuesto no es tóxico para las células, tanto en la literatura (113) como en la tesis de un estudiante anterior de nuestro laboratorio (Tesis Dusan Racordon).

Como se aprecia en la figura 25a, los inhibidores de FAK y AKT presentan una inhibición parcial en la formación de VM en comparación a control en ensayos a 4 días, mientras que el

inhibidor de PI3K (LY29002) (figura 25b) presenta una inhibición parcial del proceso de formación a 10 μ M y una inhibición completa del proceso a 20 μ M. Paralelamente, se probó otros inhibidores, como el inhibidor de la señalización por medio de MMPs (BB94). Este inhibidor se utilizó a dos concentraciones diferentes, 10 y 20 μ M, ambas concentraciones han sido reportadas anteriormente como válidas para el estudio de los efectos de este fármaco en la literatura (114). En la figura 26 este inhibidor también generó una inhibición parcial y total de VM a las concentraciones de 10 y 20 μ M, respectivamente, en cultivos maduros de 4 días de la línea celular HEY-green.

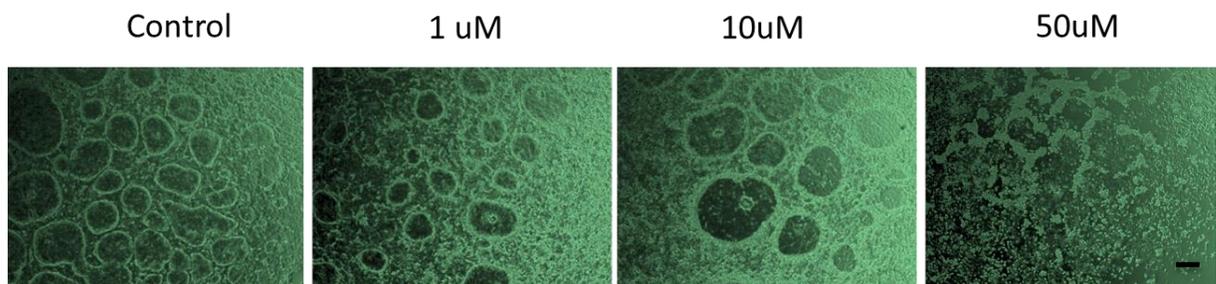


Figura 24: Inhibidor de integrinas es capaz de bloquear parcialmente el proceso de VM. Inhibidor de integrinas TCI-15 fue utilizado a distintas concentraciones para bloquear integrina $\alpha_2\beta_1$ (Rango entre 1 y 10 μM) o integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ (sobre 10 μM). Como se observa en la figura, concentraciones específicas para integrina $\alpha_2\beta_1$ no fueron capaces de inhibir el proceso de formación de VM, sin embargo, a la concentración de 50 μM , el proceso de formación de estructuras tubulares se detuvo en su etapa inicial. Este inhibidor no afecta la viabilidad celular (ver figura suplementaria 3). Barra de escala 100 μm .

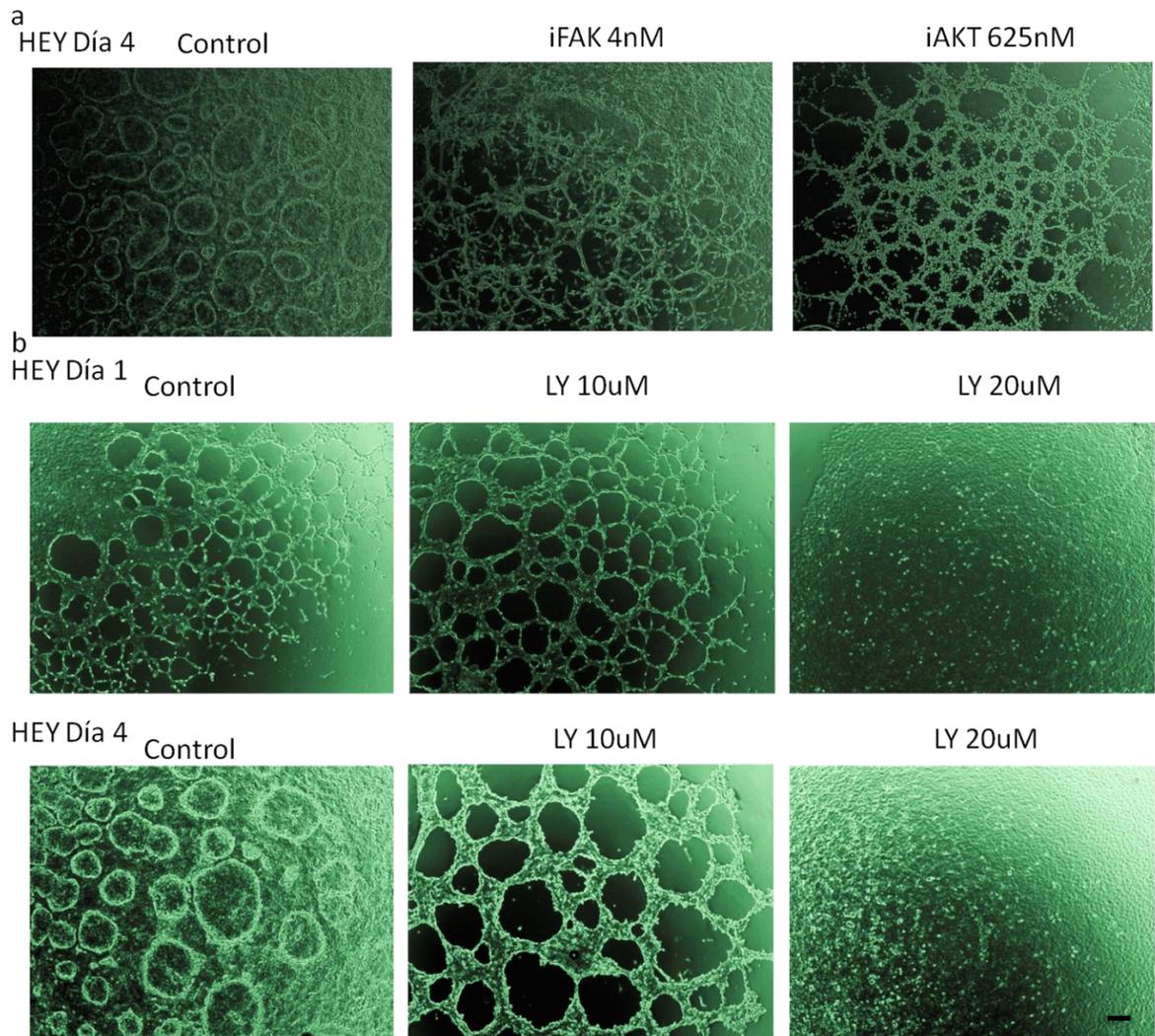


Figura 25: Inhibición farmacológica de distintas moléculas río abajo de la señalización por integrinas. Distintos inhibidores farmacológicos fueron utilizados para bloquear la formación de estructuras tubulares. En (a) se presenta la inhibición de ensayos a día 4 de la línea celular HEY-green utilizando inhibidores de las vías de FAK y AKT. Como se puede apreciar solo en el caso de AKT existió una inhibición parcial del proceso de formación de estructuras tubulares. En (b) se aprecia el uso del inhibidor contra PI3K, usado a 10 y 20 μ M a día 1 y 4 en cultivo. Como se puede apreciar en ambos días a 20 μ M existió una inhibición absoluta del proceso de formación de VM. Barra de escala 100 μ m.

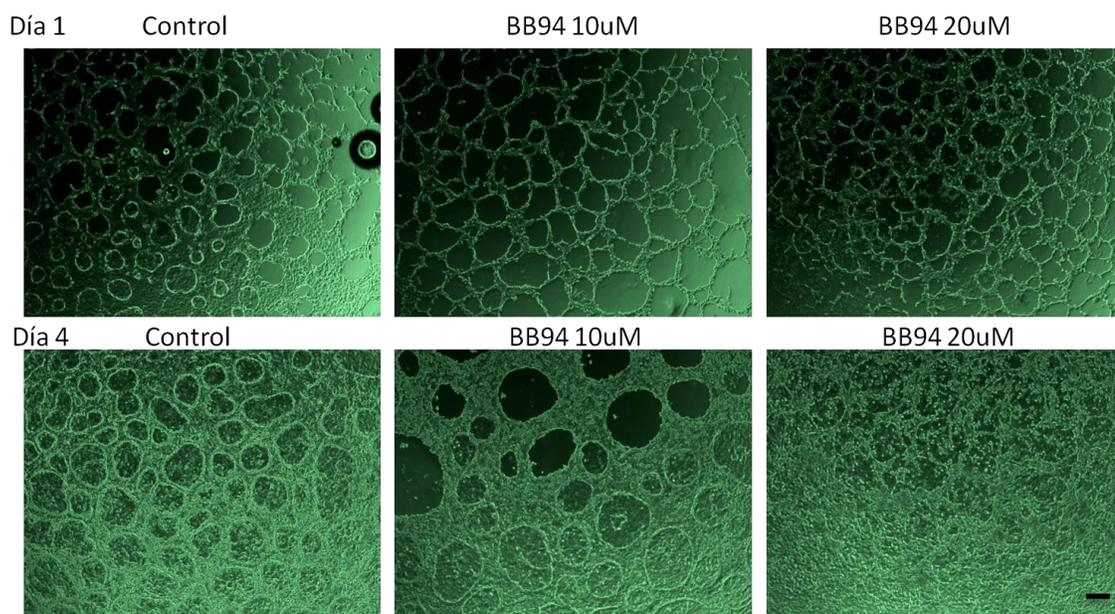


Figura 26: Inhibición farmacológica de metaloproteasas es capaz de inhibir el proceso de VM. El inhibidor de metaloproteasas BB94 fue utilizado a concentraciones de 10 y 20 μM sobre células HEY-green. Se obtuvieron fotos a día 1 y día 4 mostrando el efecto de este fármaco sobre las células. Como se puede apreciar, BB94 tiene un efecto de inhibición total cuando se aplica a concentraciones de 20 μM después de 4 días en cultivo. No pareciera que hay efecto a día 1 en esta misma concentración. A concentraciones de 10 μM el inhibidor no tiene efecto sobre la formación de VM. Barra de escala 100 μm .

9-Discusion

9.1 Controversia: El modelo *in vitro* de mímica vasculogénica.

La existencia de un modelo *in vitro* es potencialmente el aspecto más controversial del fenómeno de VM. A continuación, examinamos el origen del modelo *in vitro* y especularemos sobre cómo la mayoría de los artículos en la literatura pueden presentar conclusiones erróneas basados en un ensayo que no representa VM.

Durante el período 2001-2002, el grupo de Mary Hendrix publicó varios artículos que brindaban la primera evidencia que sugería que las estructuras de VM contenían un lumen, revestido por una membrana rica en glicoproteínas (63,115–121). Este proceso solo ocurría en una matriz 3D (Matrigel) y después de varios días de cultivo. Más tarde, otros grupos de investigación también afirmaron que las estructuras *in vitro* formadas en matrigel, un sustituto de ECM rico en laminina, eran representaciones de VM. Un estudio realizado por Sanz y colaboradores (2003) fue el primero en utilizar ensayos *in vitro* en los cuales se reportaba que las conexiones intercelulares formadas dentro de un día de cultivo representaban VM. Estas estructuras inicialmente eran más gruesas que las observadas en los ensayos clásicos de formación de tubos que utilizan células endoteliales (el ensayo clásico de angiogénesis utilizando HUVECs o líneas celulares endoteliales), sin embargo, este estudio no pudo probar que estas estructuras tuvieran un lumen funcional (es decir, la capacidad de conducir fluidos). Además, el estudio propuso un método de cuantificación basado en conexiones celulares, similar al aplicado en ensayos de angiogénesis (122). Este podría considerarse el punto de inflexión en la investigación de VM, ya que estas estructuras (y estructuras que eran ligeramente más delgadas y similares a las

observadas en los ensayos de angiogénesis) se adoptaron como una representación *in vitro* aceptada de VM.

En 2011, Francescone y colaboradores publicaron un artículo titulado “*A Matrigel-based tube formation assay to assess the vasculogenic activity of tumour cells*” el cual se ha citado como una referencia que valida el concepto de que las conexiones intercelulares representan VM (123). Por otro lado, se agregó más confusión al campo con imágenes de células cancerígenas cultivadas en matrigel en las cuales se denomina a el espacio dentro de las conexiones celulares (y no las conexiones celulares en sí mismas) estructuras de VM (124,125). Aunque existen excepciones, la mayor parte de la investigación de VM *in vitro* ha utilizado conexiones intercelulares formadas entre células cancerosas cultivadas en matrigel para informar la presencia y los mecanismos moleculares de este fenómeno. Por lo tanto, el campo de VM, al menos *in vitro*, ha continuado envuelto en controversia y, por lo tanto, dividiendo opiniones en la comunidad científica.

Debido a esta controversia, es que en este trabajo nos propusimos a estandarizar un modelo *in vitro* del proceso de VM. Para ello, proponemos que una identificación morfológica temprana de las proyecciones celulares generadas por células cancerígenas no es suficiente para identificar este fenómeno. Esto queda patente al observar las figuras 5, 6, 7 y 8 en que se muestra inicialmente que estas proyecciones no poseen lumen en su interior y que además no son capaces de conducir fluidos. Por otro lado, muchas estructuras que presentan elevación sobre el plano son de hecho macizas y no presenta lumen en su interior como se aprecia en la figura 3, haciendo difícil la identificación morfológica de estructuras tubulares reales.

Estos resultados sugieren que la mayoría de las estructuras presentadas como VM en la literatura pueden, de hecho, no contener un lumen y, por lo tanto, son incapaces de conducir fluidos en su interior. Aunque se podría argumentar que algunas de las estructuras intercelulares publicadas mostradas en el día 1 pueden convertirse en estructuras tubulares de VM a tiempos posteriores, los autores no pueden asegurar esta afirmación y, por lo tanto, sugerimos que el modelo presentado en literatura no es válido a la luz de los hallazgos de nuestro trabajo. Por otro lado, en nuestro trabajo con cultivos primarios, a menudo observamos conexiones intercelulares iniciales durante los primeros días de cultivo las cuales posteriormente desaparecen al cabo de varios días (95). En la Tabla suplementaria I, hemos dividido las publicaciones en el campo de VM en aquellas que demuestran o no muestran la presencia de un lumen y/o la conducción de fluido. Este análisis revela que de los 325 artículos publicados que informan VM *in vitro*, solo 43 (13.2%) presentan evidencias convincentes de una estructura tubular. Si bien, esto no significa que todos los informes de estructuras tubulares dentro de las primeras 24 horas (conexiones intercelulares) no formarán estructuras de VM a días posteriores, es imposible, basándose en este ensayo, distinguir entre conexiones meramente intercelulares o el proceso de VM con la presencia de tubos conductores de fluidos. Para que la investigación en este campo avance, se requiere un modelo de VM aceptado universalmente que demuestre una conducción de fluidos en el lumen. Además, las conclusiones basadas en ensayos que cumplen con estos criterios deben interpretarse de forma escéptica.

9.3- Diferencias entre VM y angiogénesis.

Una de las formas clásicas de identificar VM en cortes de tumores de pacientes es la ausencia de marcadores endoteliales y la marca positiva para tinción PAS de las estructuras tubulares. Estas, como se mencionó anteriormente, son ricas en glicoproteínas y la posición de esta matriz difiere de los vasos sanguíneos formados por células endoteliales como se aprecia en la figura 12. Más aún, logramos determinar que la composición principal de esta matriz de glicoproteínas es principalmente laminina (figura 15), la cual se secreta o se remodela desde la matriz extracelular.

Aunque la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), la formación de vasos linfáticos, y VM comparten el mismo objetivo de establecer estructuras conductoras de fluidos dentro de un tejido, existen diferencias notorias entre ellas. En este estudio pudimos determinar que existen diferencias notorias entre VM y las estructuras generadas por células endoteliales como puede apreciarse en la figura 27, donde se muestra un diagrama comparativo de los vasos sanguíneos tradicionales (formados por vasculogénesis o angiogénesis), vasos linfáticos y vasos VM. En los vasos sanguíneos tradicionales (izquierda), una sola capa de células endoteliales está ubicada hacia el lado luminal: una membrana basal externa rodea a las células endoteliales en estos vasos. De manera similar, los vasos linfáticos tienen una capa interna central de células endoteliales; sin embargo, su membrana basal no es continua (figura 27, centro) (126). Nuestra comprensión actual de los vasos de VM sugiere que las células cancerosas se sientan encima de una matriz rica en glicoproteínas que rodean un lumen central (figura 27, panel de la derecha). Estas diferencias estructurales y de composición son la base para identificar y distinguir los vasos VM de los vasos sanguíneos tradicionales en muestras de pacientes con cáncer.

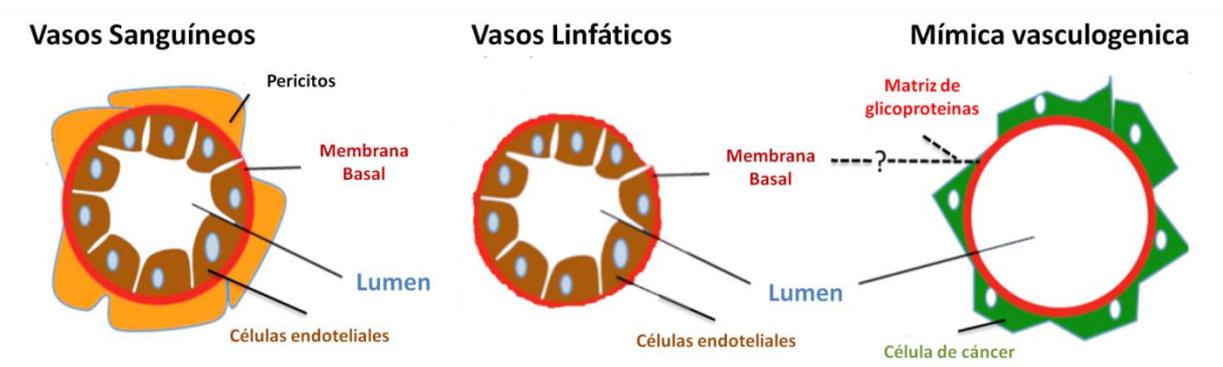


Figura 27: Representación esquemática mostrando las diferencias entre vasos sanguíneos, vasos linfáticos y estructuras de VM. Representación esquemática mostrando las diferencias entre los vasos sanguíneos normales (panel izquierdo), un vaso linfático (panel central) y estructuras de VM (panel derecho). Los que presentan una complejidad más grande son los vasos sanguíneos presentando pericitos, la membrana basal y finalmente el endotelio en lado luminal, posteriormente, los vasos linfáticos también están formados por endotelio, pero carecen de pericitos y presentan una membrana basal discontinua, finalmente, las estructuras de VM están formadas por células cancerígenas que generan una estructura de glicoproteínas PAS positivas hacia el lado luminal.

Es interesante preguntarse, ¿cómo puede explicarse este "cambio fenotípico" que permite la formación de estructuras vasculares en ausencia de células endoteliales? Y más aún, ¿de dónde proviene la estructura particular de los tubos de VM? Una respuesta a esta pregunta puede estar en la estructura del vaso de los *Amphioxus* (*Branchiostoma lanceolatum*), un cefalocordado invertebrado con un plano corporal similar al de los vertebrados. En un estudio publicado por Kučera y colaboradores (127) se mostró la composición de los vasos sanguíneos de estos animales. Al igual que los vertebrados, los vasos de los *Amphioxus* están recubiertos por una ECM, sin embargo, esta se ubica al interior del lumen, de forma similar a las estructuras de VM y posee una estructura molecular diferente a los vertebrados. Este estudio no solo sugiere los orígenes evolutivos de VM, sino que también demuestran que la vasculatura libre de células endoteliales no son exclusivas de malignidades. De hecho, este podría ser otro ejemplo de una vía fisiológica existente o antigua que ha sido secuestrada por la célula de cáncer para satisfacer sus necesidades.

Finalmente, cuando se analizaron las vías de señalización involucradas con angiogénesis, pudimos observar que ni VEGF ni PFGF estaban involucrados en la formación de estructuras tubulares. Sin embargo, la relación entre VM y angiogénesis sigue siendo un tema controversial. De hecho, a pesar de la ausencia de células endoteliales en VM y de las diferencias estructurales mencionadas anteriormente (ver figura 27), muchos autores han informado que la vía de señalización del VEGF desempeña un papel en VM. Un estudio realizado por Shirakawa y colegas (2002) informó una correlación entre VM+ y VEGF en muestras de tumores de cáncer de mama (82). Un segundo estudio informó que VEGF-C desempeña un papel en la formación de estructuras tubulares en el melanoma (120). Otra vía pro-angiogénica asociada a la VM es la

vía del Factor de Crecimiento Derivado de la Plaqueta (PDGF), un estudio de Scully y sus colegas (2012) encontró que VM estaba asociada a la expresión de PDGFR β en secciones de tumores (83). En contraste, algunos informes demuestran que las terapias anti-angiogénicas, como los tratamientos contra VEGF o sus receptores, no tienen impacto en VM, lo que demuestra las inconsistencias en la literatura sobre este tema (92,128,129). De hecho, varios estudios especulan que VM es un proceso clave que permite la irrigación y el crecimiento de tumores incluso en presencia de terapia anti-angiogénica (130–132). Otro factor asociado a VM es el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), su presencia también está ampliamente vinculada a la estimulación de las vías pro-angiogénicas (133–137). Evidentemente, la falta de un consenso sobre los criterios para informar la presencia de VM puede explicar por qué el papel de los factores pro-angiogénicos en VM no está claro.

9.4- La matriz extracelular y las vías de señalización en VM.

Como ya se ha dicho anteriormente el proceso de VM no puede ocurrir en ausencia de matriz extracelular, de hecho, todas las publicaciones presentes en la literatura muestran la formación de estructuras tubulares ya sea en matrigel o en geles formados por colágeno I (63). Sin embargo, la única publicación a la fecha que le ha dado relevancia a este hecho, es un reporte de Demou y colaboradores en 2008 en el que se informó que VM+ estaba asociado a la presencia de la subunidad $\alpha 3$ de integrina (91). Sin embargo, no ha investigado en profundidad las vías de señalización específicas relacionadas con la interacción entre la matriz extracelular y la célula de cáncer.

Mostramos en este trabajo que la ECM y, específicamente la laminina 1 presente en el matrigel, cumple un rol fundamental en la formación de estructuras tubulares. En nuestro caso, la presencia de colágeno I no es suficiente para gatillar la formación de estructuras tubulares, a diferencia de lo reportado en la literatura (63,103,104). Esto puede deberse a que en estos casos el colágeno es extraído directamente de cola de rata y no es purificado, utilizándose de forma directa. En este estudio, se utilizó colágeno purificado extraído de sarcoma de ratón, lo cual certifica que, efectivamente, este no presenta contaminación de otros componentes de la ECM como lamininas.

Cuando las células se siembran sobre la matriz, estas interactúan con ella por medio de la señalización de integrinas, proteínas de adhesión transmembrana que forman heterodímeros que, posteriormente, son capaces de transducir señales externas al interior de la célula. En nuestro estudio, logramos determinar que las integrinas juegan un rol en el proceso de maduración de las estructuras tubulares, ya que al inhibir un sub-grupo de estas con el inhibidor farmacológico TCI-15, se frenó el proceso de formación de estructuras tubulares a día 1. A pesar de que estos resultados son promisorios, otros análisis más profundos, como el knock-out genético de integrinas particulares, son requeridos para determinar de forma específica qué integrina es la responsable de la señalización con laminina para la formación de estructuras tubulares, aunque es probable que se requiere más de una, ya que como se dijo anteriormente, estas son capaces de formar heterodímeros, y, además, son capaces de suplir sus funciones las unas con las otras.

Se logró también determinar que las MMPs juegan un rol fundamental en el proceso de formación de VM. Varios reportes han sugerido una función de las MMPs en VM. Sood y

colaboradores (2001) fueron los primeros en demostrar una correlación entre VM+ y la expresión de MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en muestras de cáncer de ovario (63). Estos estudios también informaron una asociación con la laminina-5 γ -2. Estos reportes sugieren un reordenamiento de ECM y la secreción o incorporación de subunidades de laminina. Un reporte posterior mostró que las MMP y la laminina-5 γ -2 eran necesarias para la formación de VM en melanoma (117). Por otro lado, en el cáncer de próstata, la presencia de VM+ se correlacionó con laminina y la presencia de integrina $\alpha_6\beta_1$ (118), y en sarcomas mesoteliales y rhabdomiosarcomas alveolares con la presencia de fibras de colágeno IV (64).

En el ámbito de señalización intracelular una de las vías de señalización estudiadas en este trabajo es la de fosfoinositido-3 quinasa (PI3K), la cual desempeña un papel fundamental en la progresión de varios tipos de cáncer (138,139). Un estudio de Hess y colaboradores (2003) fue el primero en implicar la ruta PI3K-AKT en VM (130). Posteriormente, el mismo grupo de investigación presentó evidencia de la función de la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual es un componente río arriba de la vía PI3K e importante en la vía de señalización de las integrinas (140). Dos estudios relacionados demostraron que las estructuras de VM estaban asociadas a AKT (141) o correlacionadas con MMP, PI3K y FAK (130) en melanoma y el cáncer de vesícula biliar, respectivamente, lo que aumenta la posibilidad de que las vías de señalización de integrina-FAK y PI3K-AKT también estén involucradas. En nuestro trabajo pudimos determinar que en efecto todos estos componentes anteriormente mencionados juegan un rol en mayor o menor medida en la formación de VM, siendo el más importante de todos el de PI3K, ya que el bloqueo farmacológico de esta molécula inhibe en un 100% la formación de VM *in vitro*.

Finalmente, con todos los resultados de este trabajo, en la figura 28 presentamos un modelo propuesto, obtenido de los resultados de la inhibición farmacológica presentada en este trabajo. En este modelo se puede apreciar que el proceso de formación de VM comienza con la interacción de una integrina ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_{11b}\beta_3$) con la laminina presente la ECM. Posteriormente, esta integrina es capaz de señalar a través de FAK o talina hacia PI3K, eje fundamental para la formación de estructuras tubulares (142,143). PI3K, posteriormente provocaría, mediante una forma que desconocemos, la secreción de MMPs al medio, las cuales a su vez cortarían la matriz extracelular. Por otra parte, PI3K procedería a activar AKT, que, a su vez, por un mecanismo que aún desconocemos, sería capaz de activar el proceso de formación de estructuras tubulares.

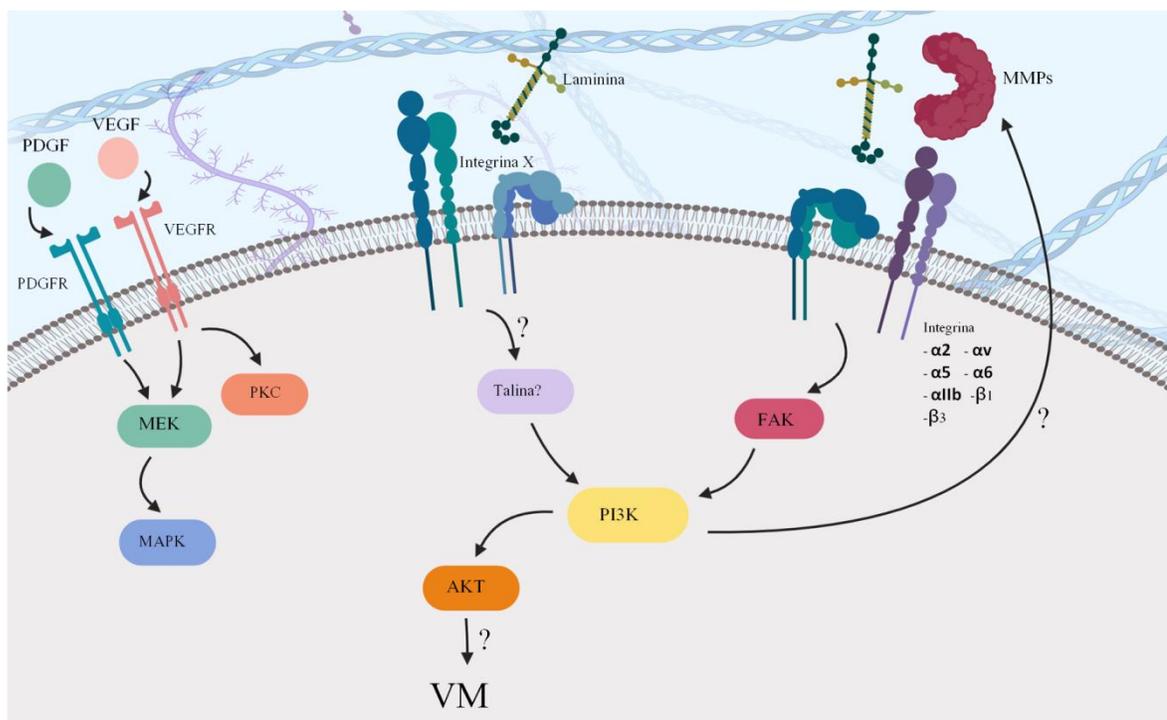


Figura 28: Modelo preliminar de la formación de estructuras tubulares. Se muestra modelo generado en esta tesis con los datos de las matrices e inhibidores farmacológicos.

10-Conclusiones y proyecciones

El presente trabajo mostró por primera vez la aplicación de nuestro modelo estandarizado de estudio de VM en distintos tipos de cáncer, más aún, logramos caracterizar de forma detallada el proceso y la morfología de las estructuras tubulares estableciendo un gold estándar para su reporte en futuras publicaciones. Además, volvimos a poner sobre la mesa y tratamos de responder a la controversia que aún existe sobre la existencia de estructuras tubulares. Todo esto permitirá tener herramientas de estudio reproducibles que permitan la caracterización futura del proceso de VM en otros tipos de cánceres.

Por otro lado, el estudio de la composición morfológica y los componentes estructurales de las estructuras tubulares de VM nos permitirá desarrollar nuevos biomarcadores para la identificación de estas estructuras en cortes de pacientes de forma más precisa que la que actualmente se maneja. Por otro lado, el estudio de las vías de señalización relacionadas con VM, más específicamente, la interacción de este proceso con la ECM nos permitirá abordar por primera vez la búsqueda de inhibidores farmacológicos que permitan detener el proceso de formación en pacientes con cáncer.

11-Anexos

Figuras suplementarias

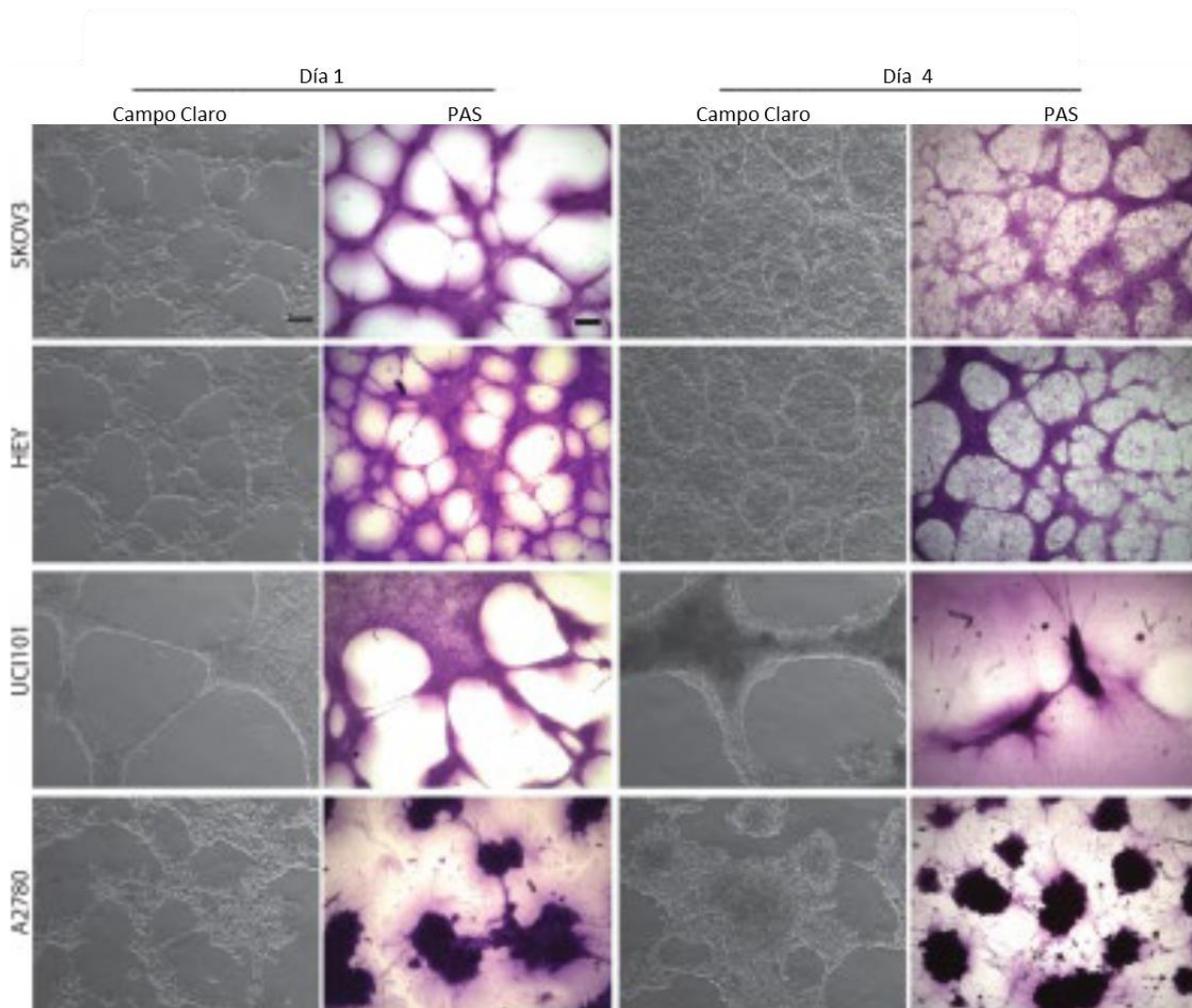


Figura Suplementaria 1: Caracterización inicial del proceso de VM. 4 líneas celulares de cáncer de ovario fueron sembradas sobre matrigel como se describió anteriormente, luego de 1 o 4 días en cultivo las células fueron fijadas y teñidas con tinción PAS. Las 4 líneas celulares son capaces de formar proyecciones celulares PAS positivas a día 1, sin embargo solo la línea celular SKOV3 y HEY son capaces de formar estructuras tubulares a día 4.

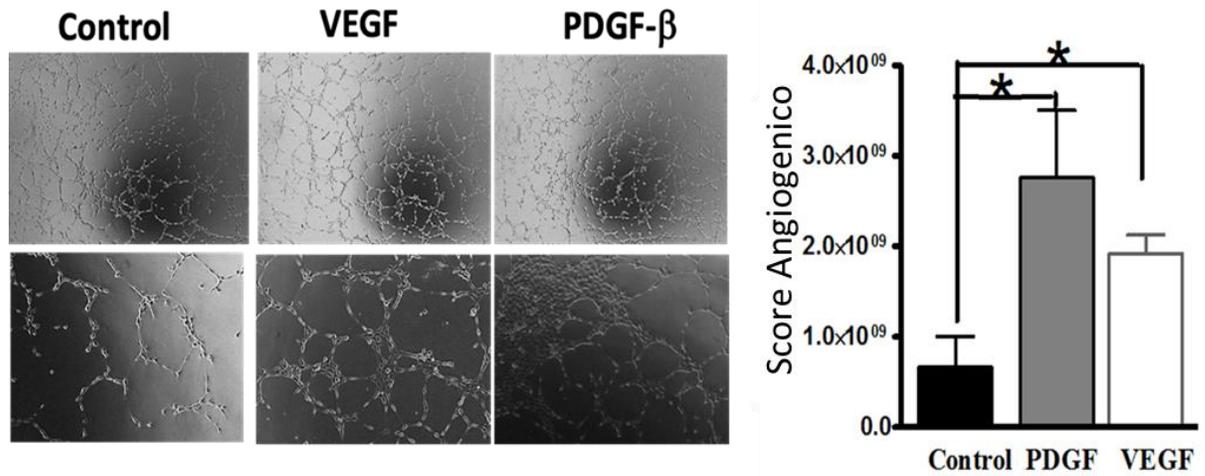


Figura Suplementaria 2: VEGF y PDGF- β estimulan la formación de proyecciones en ensayo de angiogénesis. Factores de crecimiento VEGF y PDGF- β fueron utilizados a 10ng/ μ L al inicio del experimento, luego de 12 hrs los ensayos se fijaron y se cuantificaron utilizando el plugin angiogenic analyzer de Image-J. Como se aprecia en el segundo panel, el uso de VEGF y PDGF- β estimula la formación de estructuras tipo capilar de angiogénesis. Resultados adaptados de Erices et al, 2017.

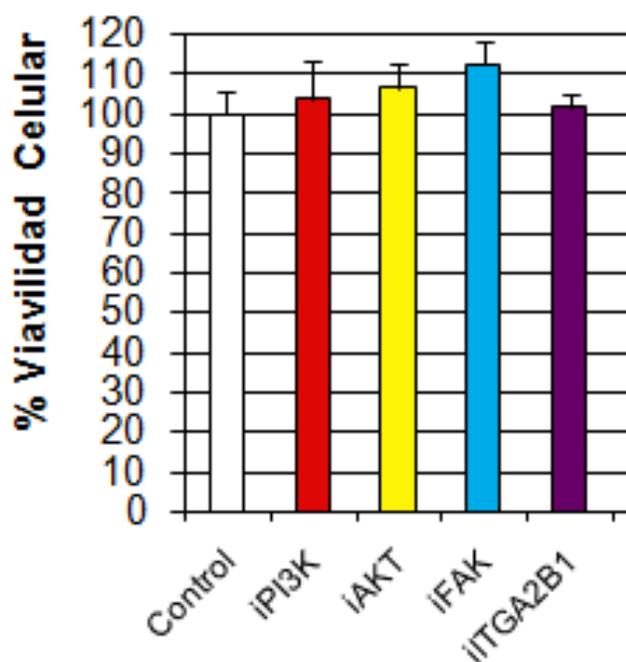


Figura Suplementaria 3: Inhibidores farmacológicos utilizados para inhibir vías de señalización de VM no afectan la viabilidad celular. Inhibidores farmacológicos para PI3K, AKT, FAK y la integrina $\alpha 2\beta 1$ fueron utilizados a concentraciones de $20\mu\text{M}$, 625nM , 4nM y $50\mu\text{M}$, respectivamente, en un ensayo de MTS. Como se aprecia en la figura, a estas concentraciones la viabilidad de las células no se ve afectada.

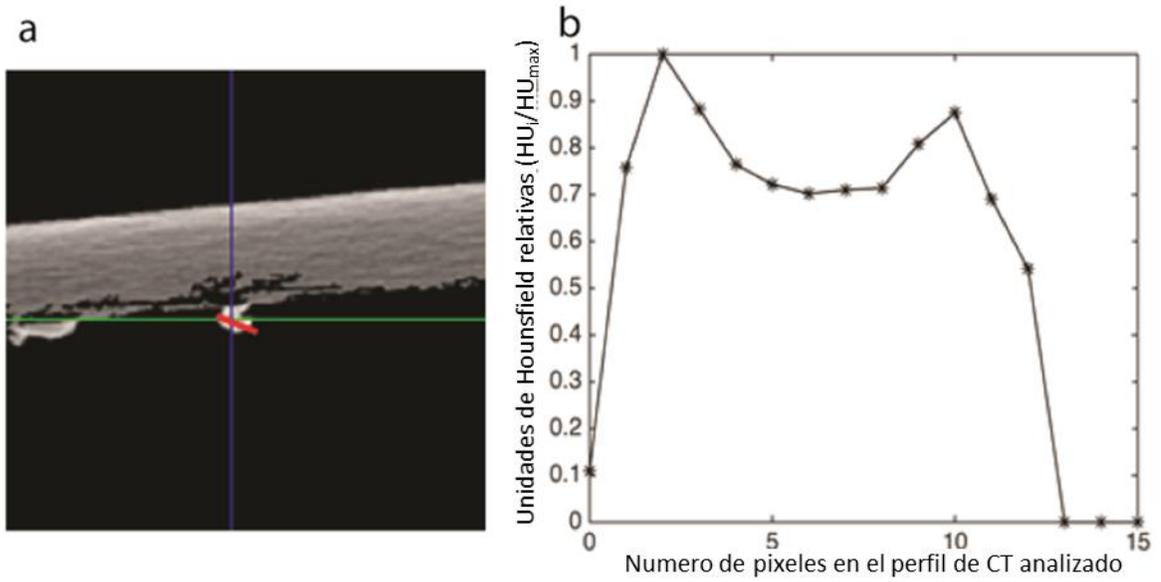


Figura Suplementaria 4: Perfil de intensidad de una estructura tubular analizada por micro-CT. En (a) sección representativa de una estructura tubular analizada con una zona de baja densidad en el centro (espacio blanco). En (b) perfil de intensidad de unidades de Hounsfield de la estructura tubular analizada por micro-CT. Área de baja intensidad en el centro indican la presencia de un lumen.

Tabla Suplementaria I: Tabla resumen de la literatura del proceso de VM

Puede ser vista en el siguiente link:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1ByaZF7bi1P1M0KN2P2r4uQHgJySvYjtgZ6vjGPbeB4/edit?usp=sharing>

12-Publicaciones

1- Renan Orellana, Sumie Kato, Rafaela Erices, María Loreto Bravo, Pamela Gonzalez, Bárbara Oliva, Sofía Cubillos, **Andrés Valdivia**, Carolina Ibañez, Jorge Brañes, María Isabel Barriga, Erasmo Bravo, Catalina Alonso, Eva Bustamente, Enrique Castellon, Patricia Hidalgo, Cesar Trigo, Olga Panes, Jaime Pereira, Diego Mezzano, Mauricio A Cuello, Gareth I Owen, "**Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemo attractants increasing the migration of ovarian cancer cells**", BioMed Central, 15, 290, 2015, DOI/URL: 10.1186/s12885-015-1304-z

2- Dusan Racordon*, **Andrés Valdivia***, Gabriel Mingo, Rafaela Erices, Raul Aravena, Felice Santoro, Maria Loreto Bravo, Carolina Ramirez, Pamela Gonzalez, Alejandra Sandoval, Alfonso González , Claudio Retamal, Marcelo Kogan, SumieKato, Mauricio Cuello, German Osorio, Francisco Nualart , PedroAlvares, Araceli Gago-Arias, Daniela Fabri, Ignacio Espinoza, Beatiz Sanchez, Alejandro Corvalán, Mauricio Pinto, GarethOwen, **Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro** , Scientific Reports, Aug 1;7(1), 6985, Editorial: Nature, 2017, DOI/URL: 10.1038/s41598-017-07622-w (*Ambos autores comparten autoría principal)

3- **Andrés Valdivia**, Gabriel Mingo, Varina Aldana, Mauricio P. Pinto, Marco Ramirez, Claudio Retamal, Alfonso Gonzalez, Francisco Nualart, Alejandro H. Corvalan, Gareth I. Owen. **Fact or fiction, it is time for a verdict on Vasculogenic Mimicry?**. Frontiers in Oncology, August 2019. DOI/URL: 10.3389/fonc.2019.0.680

Financiamiento

Esta tesis fue financiada gracias a los proyectos CONICYT-FONDAP 15130011 y FONDECYT 1180241.

13-Referencias

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin* (2015) **65**:87–108. doi:10.3322/caac.21262.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* (2011) **61**:69–90. doi:10.3322/caac.20107. Available
3. Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: New opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**:415–428. doi:10.1038/nrc2644
4. Gubbels JAA, Claussen N, Kapur AK, Connor JP, Patankar MS. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* (2010) **3**:8. doi:10.1186/1757-2215-3-8
5. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* (2005) **18**:S19–S32. doi:10.1038/modpathol.3800306
6. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: Does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol* (1999) doi:10.1006/gyno.1998.5275
7. Cho KR, Shih I-M. Ovarian Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* (2009) **4**:287–313. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246
8. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: A review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* (2000) doi:10.1097/00004347-200001000-00003
9. Köbel M. [Ovarian carcinoma. Do the subtypes reflect different diseases?]. *Pathologe* (2008) doi:10.1007/s00292-008-1028-9
10. Shikata K, Doi Y, Yonemoto K, Arima H, Ninomiya T, Kubo M, Tanizaki Y, Matsumoto T, Iida M, Kiyohara Y. Population-based prospective study of the combined influence of cigarette smoking and Helicobacter pylori infection on gastric cancer incidence: The Hisayama study. *Am J Epidemiol* (2008) doi:10.1093/aje/kwn276
11. LAUREN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1965)
12. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A MODEL FOR GASTRIC CANCER EPIDEMIOLOGY. *Lancet* (1975) doi:10.1016/S0140-6736(75)90498-5
13. Correa P. A Human Model of Gastric Carcinogenesis. *Cancer Res* (1986)
14. Ming S -C. Gastric carcinoma: A pathobiological classification. *Cancer* (1977) doi:10.1002/1097-0142(197706)39:6<2475::AID-CNCR2820390626>3.0.CO;2-L

15. Crew KD, Alfred I Neugu. Epidemiology of gastric cancer. *Phys Status Solidi* (2006) **12**:354–62. doi:10.378/wjg.v12.i3.354
16. Herrera V, Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* (2009) doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03031.x
17. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med* (2015) **2**:11. doi:10.3389/fmed.2015.00011
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) **144**:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
19. Nakaya Y, Sheng G. EMT in developmental morphogenesis. *Cancer Lett* (2013) **341**:9–15. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.037
20. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* (2005) **233**:706–720. doi:10.1002/dvdy.20345
21. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* (2003) **120**:1351–1383. doi:10.1016/j.mod.2003.06.005
22. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* (2006) **172**:973–981. doi:10.1083/jcb.200601018
23. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. “Cell-cell adhesion and communication,” in *Molecular Cell Biology*. 4th edition (WH Freeman).
24. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* (2009) **139**:871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
25. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* (2009) **28**:15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
26. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* (2003) **116**:499–511. doi:10.1242/jcs.00224
27. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* (2000) **2**:76–83. doi:10.1038/35000025
28. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) **15**:178–196. doi:10.1038/nrm3758
29. Kalluri R, Weinberg R a. Review series The basics o epithelial-mesenchymal transition.

- J Clin Invest* (2009) **119**:1420–1428. doi:10.1172/JCI39104.1420
30. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* (2011) **209**:139–151. doi:10.1530/JOE-10-0377
 31. Xu R, Spencer VA, Groesser DL, Bissell MJ. Laminin regulates PI3K basal localization and activation to sustain STAT5 activation. *Cell Cycle* (2010) **9**:4315–4322. doi:10.4161/cc.9.21.13578
 32. Sottile J. Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions. *Mol Biol Cell* (2002) doi:10.1091/mbc.E02-01-0048
 33. Batalov I, Feinberg AW. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. (2015) **10**:71–76. doi:10.4137/BMI.S20050.Received
 34. Sa S, Wong L, McCloskey KE. Combinatorial Fibronectin and Laminin Signaling Promote Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Biores Open Access* (2014) **3**:150–161. doi:10.1089/biores.2014.0018
 35. Hulmes DJS. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *J Struct Biol* (2002) **137**:2–10. doi:10.1006/jsbi.2002.4450
 36. Vogel WF. Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatology* (2001)
 37. Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res* (2010) **339**:259–268. doi:10.1007/s00441-009-0838-2
 38. Suzuki N, Yokoyama F, Nomizu M. Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. *Connect Tissue Res* (2005) **46**:142–152. doi:10.1080/03008200591008527
 39. Schéele S, Nyström A, Durbeej M, Talts JF, Ekblom M, Ekblom P. Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med* (2007) **85**:825–836. doi:10.1007/s00109-007-0182-5
 40. Driss A, Charrier L, Yan Y, Nduati V, Sitaraman S, Merlin D. Dystroglycan receptor is involved in integrin activation in intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2006) **290**:G1228-42. doi:10.1152/ajpgi.00378.2005
 41. Viillard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* (2017) doi:10.1007/s10456-017-9562-9
 42. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm* (2019) **2019**:1–15. doi:10.1155/2019/3706315
 43. Muñoz-Chápuli R. Evolution of angiogenesis. *Int J Dev Biol* (2011) **55**:345–351. doi:10.1387/ijdb.103212rm

44. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* (2011) **473**:298–307. doi:10.1038/nature10144
45. Kelly-Goss MR, Sweat RS, Stapor PC, Peirce SM, Murfee WL. Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation* (2014) **21**:345–357. doi:10.1111/micc.12107
46. Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL. Pericyte dynamics during angiogenesis: New insights from new identities. *J Vasc Res* (2014) **51**:163–174. doi:10.1159/000362276
47. Tennant M, McGeachie JK. Blood vessel structure and function: a brief update and recent advances. *Aust N Z J Surg* (1990) **60**:747–753.
48. Kleinhans H, Kaifi JT, Mann O, Reinknecht F, Freitag M, Hansen B, Schurr PG, Izbicki JR, Strate TG. The role of vascular adhesion molecules PECAM-1 (CD 31), VCAM-1 (CD 106), E-Selectin (CD62E) and P-Selectin (CD62P) in severe porcine pancreatitis. *Histol Histopathol* (2009)
49. Bohra H, Rathi KR, Dudani S, Bohra A, Vishwakarma S, Sahai K. The study of MIB-1 LI and CD 34 as a marker of proliferative activity and angiogenesis in different grades of meningioma. *J Clin Diagnostic Res* (2016) doi:10.7860/JCDR/2016/12690.8328
50. Heimburg S, Oehler MK, Kristen P, Papadopoulos T, Caffier H. The endothelial marker CD 34 in the assessment of tumour vascularisation in ovarian cancer. in *Anticancer Research*
51. Brown N, Khan F, Alshaikh B, Berka N, Liacini A, Alawad E, Yusuf K. CD-34 + and VE-cadherin + endothelial progenitor cells in preeclampsia and normotensive pregnancies. *Pregnancy Hypertens* (2019) doi:10.1016/j.preghy.2019.02.007
52. Paolo V Di, Colletti M, Ferruzzi V, Russo I, Galardi A, Alessi I, Milano GM, Giannatale A Di. Circulating Biomarkers for Tumor Angiogenesis: Where Are We? *Curr Med Chem* (2019)
53. IDE, G. A. Vascularization of the brown-pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentg* (1939) **42**:891. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10007691422/en/> [Accessed May 6, 2019]
54. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) doi:10.1016/0006-291X(89)92678-8
55. Connolly DT, Olander J V, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* (1989) **264**:20017–24. Available at: <http://www.jbc.org/content/264/33/20017.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2584205>
56. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* (1971)

285:1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108

57. Cabebe E, Wakelee H. Sunitinib: A newly approved small-molecule inhibitor of angiogenesis. *Drugs of Today* (2006) doi:10.1358/dot.2006.42.6.985633
58. Chellappan DK, Leng KH, Jia LJ, Aziz NABA, Hoong WC, Qian YC, Ling FY, Wei GS, Ying T, Chellian J, et al. The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. *Biomed Pharmacother* (2018) doi:10.1016/j.biopha.2018.03.061
59. Barnett FH, Rosenfeld M, Wood M, Kiosses WB, Usui Y, Marchetti V, Aguilar E, Friedlander M. Macrophages form functional vascular mimicry channels in vivo. *Sci Rep* (2016) **6**:36659. doi:10.1038/srep36659
60. Kertschanska S, Štulcová B, Kaufmann P, Štulc J. Distensible transtrophoblastic channels in the rat placenta. *Placenta* (2000) **21**:670–677. doi:10.1053/plac.2000.0558
61. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* (1999) **155**:739–52. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5
62. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor REB, Chao JT, Chien DS, Chu YW. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther* (2016) **159**:83–92. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.006
63. Sood a K, Seftor E a, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* (2001) **158**:1279–88. doi:10.1016/S0002-9440(10)64079-5
64. Sun B, Zhang S, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* (2004) **25**:1609–1614.
65. Sood AK, Fletcher MS, Zahn CM, Gruman LM, Coffin JE, Seftor EA, Hendrix MJC. The clinical significance of tumor cell-lined vasculature in ovarian carcinoma: Implications for anti-vasculogenic therapy. *Cancer Biol Ther* (2002) **1**:661–664. doi:316 [pii]
66. Baeten CIM, Hillen F, Pauwels P, De Bruine AP, Baeten CGMI. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* (2009) **52**:2028–2035. doi:10.1007/DCR.0b013e3181beb4ff
67. Chen L, He Y, Sun S, Sun B, Tang X. Vasculogenic mimicry is a major feature and novel predictor of poor prognosis in patients with orbital rhabdomyosarcoma. *Oncol Lett* (2015) **10**:1635–1641. doi:10.3892/ol.2015.3469
68. Zhang F, Lin H, Cao K, Wang H, Pan J, Zhuang J, Chen X, Huang B, Wang D, Qiu S. Vasculogenic mimicry plays an important role in adrenocortical carcinoma. *Int J Urol*

(2016) doi:10.1111/iju.13070

69. Lv J, Sun B, Sun H, Zhang Y, Sun J, Zhao X, Gu Q, Dong X, Che N. Significance of Vasculogenic Mimicry Formation in Gastric Carcinoma. *Oncol Res Treat* (2017) **40**:35–41. doi:10.1159/000455144
70. Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM, Margaryan N V., Seftor REB, Miyagi Y, Hendrix MJC. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* (2003) **63**:5381–5389.
71. Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer* (2017) **16**:65. doi:10.1186/s12943-017-0631-x
72. Breier G, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res* (2014) **355**:523–527. doi:10.1007/s00441-014-1851-7
73. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* (2003) **3**:411–21. doi:10.1038/nrc1092
74. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor REB, Hendrix MJC. Molecular pathways: Vasculogenic mimicry in tumor cells: Diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* (2012) **18**:2726–2732. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3237
75. Seftor REB, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan N V., Hendrix MJC. Tumor cell vasculogenic mimicry: From controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol* (2012) **181**:1115–1125. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.013
76. Reis M, Liebner S. Wnt signaling in the vasculature. *Exp Cell Res* (2013) **319**:1317–1323. doi:10.1016/j.yexcr.2012.12.023
77. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* (2010) doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x
78. Qi L, Song W, Liu Z, Zhao X, Cao W, Baocun Sun BS. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -Catenin signaling. *Int J Mol Sci* (2015) **16**:18564–18579. doi:10.3390/ijms160818564
79. Sun D, Sun B, Liu T, Zhao X, Che N, Gu Q, Dong X, Yao Z, Li R, Li J, et al. Slug promoted vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* (2013) **17**:1038–1047. doi:10.1111/jcmm.12087
80. Meng J, Sun B, Zhao X, Zhang D, Zhao X, Gu Q, Dong X, Zhao N, Liu P, Liu Y. Doxycycline as an Inhibitor of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Vasculogenic Mimicry in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer Ther* (2014) doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-1060

81. Serwe A, Rudolph K, Anke T, Erkel G. Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. *Invest New Drugs* (2012) **30**:898–915. doi:10.1007/s10637-011-9643-3
82. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* (2002) **62**:560–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809710>
83. Scully S, Francescone R, Faibish M, Bentley B, Taylor SL, Oh D, Schapiro R, Moral L, Yan W, Shao R. Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *J Neurosci* (2012) doi:10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012
84. Lin AY, Maniotis AJ, Valyi-Nagy K, Majumdar D, Setty S, Kadkol S, Leach L, Pe'er J, Folberg R. Distinguishing fibrovascular septa from vasculogenic mimicry patterns. *Arch Pathol Lab Med* (2005) doi:10.1043/1543-2165(2005)129[884:DFSFVM]2.0.CO;2
85. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic Mimicry: How Convincing, How Novel, and How Significant? *Am J Pathol* (2000) doi:10.1016/S0002-9440(10)64740-2
86. Fausto N. Vasculogenic Mimicry in Tumors. *Am J Pathol* (2000) **156**:359. doi:10.1016/S0002-9440(10)64738-4
87. Wu S, Yu L, Wang D, Zhou L, Cheng Z, Chai D, Ma L, Tao Y. Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* (2012) **12**:535. doi:10.1186/1471-2407-12-535
88. Li M, Gu Y, Zhang Z, Zhang S, Zhang D, Saleem AF, Zhao X, Sun B. Vasculogenic mimicry: A new prognostic sign of gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* (2010) **16**:259–266. doi:10.1007/s12253-009-9220-7
89. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol* (2012) **124**:763–775. doi:10.1007/s00401-012-1066-5
90. Hess AR, Margaryan N V., Seftor E a., Hendrix MJC. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: Role of the Eph receptors. *Dev Dyn* (2007) **236**:3283–3296. doi:10.1002/dvdy.21190
91. Demou ZN. Time-lapse analysis and microdissection of living 3D melanoma cell cultures for genomics and proteomics. *Biotechnol Bioeng* (2008) **101**:307–316. doi:10.1002/bit.21899
92. Hess AR, Postovit LM, Margaryan N V., Seftor EA, Schneider GB, Seftor REB, Nickoloff BJ, Hendrix MJC. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* (2005) **65**:9851–9860. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2172

93. Hess AR, Seftor EA, Seftor REB, Hendrix MJC. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* (2003) **63**:4757–4762.
94. Wagenblast E, Soto M, Gutiérrez-Ángel S, Hartl CA, Gable AL, Maceli AR, Erard N, Williams AM, Kim SY, Dickopf S, et al. A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. *Nature* (2015) **520**:358–362. doi:10.1038/nature14403
95. Racordon D, Valdivia A, Mingo G, Erices R, Aravena R, Santoro F, Bravo ML, Ramirez C, Gonzalez P, Sandoval A, et al. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro. *Sci Rep* (2017) **7**: doi:10.1038/s41598-017-07622-w
96. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* (2014) **79**:3–18. doi:10.1016/j.addr.2014.06.005
97. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* (2005) **15**:378–386. doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.004
98. Beliveau A, Mott JD, Lo A, Chen EI, Koller AA, Yaswen P, Muschler J, Bissell MJ. growth in vivo Raf-induced MMP9 disrupts tissue architecture of human breast cells in three-dimensional culture and is necessary for tumor growth in vivo. *Genes Dev* (2010) **24**:2800–2811. doi:10.1101/gad.1990410
99. Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes Migr* (2013) **7**:101–110. doi:10.4161/cam.22680
100. Ekblom P, Lonai P, Talts JF. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* (2003) **22**:35–47. doi:S0945053X03000155 [pii]
101. Le Bellego F, Pisselet C, Huet C, Monget P, Monniaux D. Laminin- $\alpha 6\beta 1$ integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *J Endocrinol* (2002) **172**:45–59. doi:10.1677/joe.0.1720045
102. Liu JC, Wang F, Xie ML, Cheng ZQ, Qin Q, Chen L, Chen R. Osthole inhibits the expressions of collagen I and III through Smad signaling pathway after treatment with TGF- $\beta 1$ in mouse cardiac fibroblasts. *Int J Cardiol* (2017) doi:10.1016/j.ijcard.2016.11.202
103. Biondani G, Zeeberg K, Greco MR, Cannone S, Dando I, Dalla Pozza E, Mastrodonato M, Forciniti S, Casavola V, Palmieri M, et al. Extracellular matrix composition modulates PDAC parenchymal and stem cell plasticity and behavior through the secretome. *FEBS J* (2018) doi:10.1111/febs.14471
104. Mei J, Gao Y, Zhang L, Cai X, Qian Z, Huang H, Huang W. VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro. *Exp Oncol* (2008)

105. Pinto MP, Badtke MM, Dudevoir ML, Chuck Harrell J, Jacobsen BM, Horwitz KB. Vascular endothelial growth factor secreted by activated stroma enhances angiogenesis and hormone-independent growth of estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res* (2010) doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4373
106. Kato S, Espinoza N, Lange S, Villalón M, Cuello M, Owen GI. Characterization and phenotypic variation with passage number of cultured human endometrial adenocarcinoma cells. *Tissue Cell* (2008) doi:10.1016/j.tice.2007.09.007
107. Elgueta R, Tobar JA, Shoji KF, De Calisto J, Kalergis AM, Bono MR, Roseblatt M, Saez JC. Gap Junctions at the Dendritic Cell-T Cell Interface Are Key Elements for Antigen-Dependent T Cell Activation. *J Immunol* (2009) doi:10.4049/jimmunol.0801854
108. Erices R, Cubillos S, Aravena R, Santoro F, Marquez M, Orellana R, Ramírez C, González P, Fuenzalida P, Loreto Bravo M, et al. Diabetic concentrations of metformin inhibit platelet-mediated ovarian cancer cell progression. *Oncotarget* (2017) **8**:20865–20880. doi:10.18632/oncotarget.15348
109. Borza CM, Su Y, Chen X, Yu L, Mont S, Chetyrkin S, Voziyan P, Hudson BG, Billings PC, Jo H, et al. Inhibition of Integrin $\alpha 2 \beta 1$ Ameliorates Glomerular Injury. *J Am Soc Nephrol* (2012) **23**:1027–1038. doi:10.1681/asn.2011040367
110. Miller MW, Basra S, Kulp DW, Billings PC, Choi S, Beavers MP, McCarty OJT, Zou Z, Kahn ML, Bennett JS, et al. Small-molecule inhibitors of integrin $\alpha 2 \beta 1$ that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci* (2009) **106**:719–724. doi:10.1073/pnas.0811622106
111. Zhang W, Xu C, Tu H, Wang Y, Sun Q, Hu P, Hu Y, Rondard P, Liu J. GABA B receptor upregulates fragile X mental retardation protein expression in neurons. *Sci Rep* (2015) **5**:1–13. doi:10.1038/srep10468
112. Wang J, Li F, Yang M, Wu J, Zhao J, Gong W, Liu W, Bi W, Dong L. FIZZ1 promotes airway remodeling through the PI3K/Akt signaling pathway in asthma. *Exp Ther Med* (2014) **7**:1265–1270. doi:10.3892/etm.2014.1580
113. Masuda Y, Yazawa J, Makino Y, Takada K. PI3-Kinase Inhibitor LY294002 Repressed the Expression of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Biol Pharm Bull Pharm Bull* (2015) **38**:1529–1535. doi:10.1248/bpb.b15-00295
114. Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* (2006) **12**:441–445. doi:10.1038/nm1387
115. Hess AR, Seftor EA, Gardner LMG, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor REB, Kinch MS, Hendrix MJC. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: Role of epithelial cell kinase (eck/epha2). *Cancer Res* (2001) **61**:3250–3255. doi:11309274

116. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess EA, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**:8018–8023. doi:10.1073/pnas.131209798
117. Seftor REB, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LMG, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJC. Cooperative interactions of laminin 5 γ 2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* (2001) **61**:6322–6327.
118. Sharma N, Seftor REB, Seftor EA, Gruman LM, Heidger PM, Cohen MB, Lubaroff DM, Hendrix MJC. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: Role in vasculogenic mimicry. *Prostate* (2002) **50**:189–201. doi:10.1002/pros.10048
119. Seftor REB, Seftor EA, Kirschmann DA, Hendrix MJC. Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5 γ 2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry. *Mol Cancer Ther* (2002) **1**:1173–9. doi:10.1007/s13238-011-1041-2
120. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, Folberg R, Hendrix MJC. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* (2002) doi:10.1023/A:1015591624171
121. Hendrix MJC, Seftor REB, Seftor EA, Gruman LM, Lee LML, Sheriff DD, Schatteman GC, Seftor REB, Seftor EA, Hendrix MJC, et al. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: Role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res* (2002) **62**:665–668.
122. Sanz L, Feijóo M, Blanco B, Serrano A, Álvarez-Vallina L. Generation of non-permissive basement membranes by anti-laminin antibody fragments produced by matrix-embedded gene-modified cells. *Cancer Immunol Immunother* (2003) **52**:643–647. doi:10.1007/s00262-003-0400-0
123. Francescone III RA, Faibish M, Shao R. A Matrigel-Based Tube Formation Assay to Assess the Vasculogenic Activity of Tumor Cells. *J Vis Exp* (2011)2–5. doi:10.3791/3040
124. Sun W, Fan YZ, Zhang WZ, Ge CY. A pilot histomorphology and hemodynamic of vasculogenic mimicry in gallbladder carcinomas in vivo and in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* (2011) **30**:1–12. doi:10.1186/1756-9966-30-46
125. Ren K, Zhang J, Gu X, Wu S, Shi X, Ni Y, Chen Y, Lu J, Gao Z, Wang C, et al. Migration-inducing gene-7 independently predicts poor prognosis of human osteosarcoma and is associated with vasculogenic mimicry. *Exp Cell Res* (2018) **369**:80–89. doi:10.1016/j.yexcr.2018.05.008

126. Langheinrich MC, Schellerer V, Perrakis A, Lohmüller C, Schildberg C, Naschberger E, Stürzl M, Hohenberger W, Croner RS. Molecular mechanisms of lymphatic metastasis in solid tumors of the gastrointestinal tract. *Int J Clin Exp Pathol* (2012) **5**:614–623.
127. Kučera T, Strilić B, Regener K, Schubert M, Laudet V, Lammert E. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One* (2009) **4**: doi:10.1371/journal.pone.0004132
128. Angara K, Borin TF, Arbab AS. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol* (2017) **10**:650–660. doi:10.1016/j.tranon.2017.04.007
129. Lissitzky JC, Parriaux D, Ristorcelli E, Vérine A, Lombardo D, Verrando P. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* (2009) **69**:802–809. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2391
130. Hess AR, Seftor EA, Seftor REB, Hendrix MJC. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* (2003) **63**:4757–4762.
131. Lu XS, Sun W, Ge CY, Zhang WZ, Fan YZ. Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5 γ 2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas. *Int J Oncol* (2013) doi:10.3892/ijo.2013.1897
132. Serova M, Tijeras-Raballand A, Santos C Dos, Martinet M, Neuzillet C, Lopez A, Mitchell DC, Bryan BA, Gapihan G, Janin A, et al. Everolimus affects vasculogenic mimicry in renal carcinoma resistant to sunitinib. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/ONCOTARGET.9542
133. Sun W, Shen ZY, Zhang H, Fan YZ, Zhang WZ, Zhang JT, Lu XS, Ye C. Overexpression of HIF-1 α in primary gallbladder carcinoma and its relation to vasculogenic mimicry and unfavourable prognosis. *Oncol Rep* (2012) **27**:1990–2002. doi:10.3892/or.2012.1746
134. Dong X, Sun B, Zhao X, Liu Z, Gu Q, Zhang D, Zhao N, Wang J, Chi J. Expression of relative-protein of hypoxia-inducible factor-1 α in vasculogenesis of mouse embryo. *J Biol Res* (2014) **21**:1–9. doi:10.1186/2241-5793-21-4
135. Sun H, Zhang D, Yao Z, Lin X, Liu J, Gu Q, Dong X, Liu F, Wang Y, Yao N, et al. Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* (2017) **18**:205–213. doi:10.1080/15384047.2017.1294288
136. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* (2014) **17**:471–494. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
137. Pinto MP, Sotomayor P, Carrasco-Avino G, Corvalan AH, Owen GI. Escaping Antiangiogenic Therapy: Strategies Employed by Cancer Cells. *Int J Mol Sci* (2016) **17**:1–20. doi:10.3390/ijms17091489

138. Meng J, Chen S, Lei Y yang, Han J xia, Zhong W long, Wang X rui, Liu Y rong, Gao W feng, Zhang Q, Tan Q, et al. Hsp90 β promotes aggressive vasculogenic mimicry via epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* (2019) doi:10.1038/s41388-018-0428-4
139. Liang X, Sun R, Zhao X, Zhang Y, Gu Q, Dong X, Zhang D, Sun J, Sun B. Rictor regulates the vasculogenic mimicry of melanoma via the AKT-MMP-2/9 pathway. *J Cell Mol Med* (2017) **21**:3579–3591. doi:10.1111/jcmm.13268
140. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* (2002) doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6
141. Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, Sadreddini S, Baradaran B. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene* (2019) **698**:120–128. doi:10.1016/j.gene.2019.02.076
142. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* (2010) **10**:890–890. doi:10.1038/nrc2965
143. Klapholz B, Brown NH. Talin – the master of integrin adhesions. *J Cell Sci* (2017) doi:10.1242/jcs.190991