



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Estudio del efecto del boro y su transportador en células de
cáncer de colon.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Talamanca Buitrago, Blanca

Tutor/a: Gallego Ferrer, Gloria

Cotutor/a externo: RICO TORTOSA, PATRICIA MARIA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo y cariño incondicional, mi mayor tesoro.

A mis amigos por acompañarme todos estos años y crecer juntos.

A mis tutoras por guiarme y darme esta gran oportunidad.

A ti, que formamos el mejor equipo del mundo.

RESUMEN

El cáncer de colon es la neoplasia maligna más frecuente que se puede presentar en el tubo digestivo y, a pesar de la incesante investigación, una de las patologías con mayor prevalencia en la población mundial. El riesgo de desarrollarlo está influenciado por una serie de factores que incluyen edad y dieta, pero principalmente es una enfermedad genética que resulta de la sobreexpresión de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores.

La reincidencia tumoral y metástasis, así como la falta de agentes altamente efectivos, destacan la necesidad de nuevas terapias con enfoques específicos para combatir la enfermedad. La terapia dirigida como modalidad de tratamiento está cada vez más presente en la prevención y tratamiento de la carcinogénesis, por lo que comprender los procesos celulares que originan el desarrollo del cáncer y los mecanismos implicados en su propagación, pueden permitir el estudio de nuevas opciones terapéuticas.

En el presente Trabajo de Fin de Grado, se ha evaluado el papel del boro y de su transportador (NaBC1) en dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal SW480 (adherente y metastásica). Utilizando diversas concentraciones de boro diluido en el medio de cultivo, se han realizado estudios de viabilidad celular a diferentes tiempos para la evaluación de los posibles efectos citotóxicos del boro en estas líneas celulares cancerígenas.

Posteriormente se han empleado unas plataformas biomateriales 2D capaces de presentar en la fase sólida el boro anclado covalentemente. De esta manera se ha estudiado el papel del transportador de boro en el comportamiento de las células de cáncer de colon, y su implicación en los fenómenos de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) así como su relación con otras proteínas de membrana como las integrinas de unión a fibronectina y receptores de factores de crecimiento (GFR) tras su activación permanente. Para ello, se han realizado ensayos de inmunofluorescencia de marcadores típicos de la EMT, de integrinas y del NaBC1 para evaluar su expresión en ausencia/presencia de boro, así como su colocalización con integrinas y GFR.

Estos estudios permitirán aportar conocimientos para descifrar el papel del transportador del boro en este tipo de neoplasias. Los resultados obtenidos permitirán plantear nuevas dianas terapéuticas para este tipo de cáncer epitelial.

Palabras clave: Cáncer de colon, boro, fibronectina, NaBC1, EMT

RESUM

El càncer de colon és la neoplàsia maligna més freqüent que es pot presentar en el tub digestiu i és, a pesar de les incessants investigacions, una de les patologies amb major prevalença en la població mundial. El risc de desenvolupar-lo està influït per una sèrie de factors que inclouen la edat i dieta, però principalment és una malaltia genètica que resulta de la sobreexpressió d'oncogens e inactivació de gens supressors de tumors.

La reincidència tumoral i metastasis, així com la falta d'agents altament efectius, destaquen la necessitat de noves teràpies amb enfocaments específics per combatre l'enfermetat. La teràpia dirigida com a modalitat de tractament està cada vegada més present en la prevenció i tractament de la carcinogènesi, per lo que comprendre els processos cel·lulars que originen el desenvolupament del càncer i els mecanismes implicats en la seua propagació poden permetre l'estudi de noves opcions terapèutiques.

En el present Treball de Fi de Grau s'ha evaluat el paper del bor i del seu transportador (NaBC1) en dues línies cel·lulars d'adenocarcinoma colorrectal SW480 (adherent i metastàsica). Emprant diverses concentracions de bor diluït en el medi de cultiu, s'han realitzat estudis de viabilitat cel·lular a temps diferents per a la evaluació dels possibles efectes citotòxics del bor en aquestes línies cel·lulars cancerígenes.

Posteriorment s'han emprat unes plataformes biomaterials 2D capaces de presentar en la fase sòlida bor anclat covalentment. D'aquesta manera s'ha estudiat el paper del transportador de bor en el comportament de les cèl·lules de càncer de colon i la seua implicació en els fenòmens de la transició epitelio-mesenquimal (EMT), així com la seua relació amb altres proteïnes de membrana com les integrines d'unió a fibronectina i els receptors de factors de creiximent (GFR) després de la seua activació permanent. Per fer-ho, s'han realitzat assajos d'immunifluorescència de marcadors típics de la EMT, d'integrines i del NaBC1 per a evaluar la seua expressió en ausència/presència de bor, així com la seua colocalització amb integrines i GFR.

Aquests estudis permetran aportar coneiximents per desxifrar el paper del transportador del bor en aquest tipus de neoplàsies. Els resultats obtinguts permetran plantejar noves dianes terapèutiques per aquest tipus de càncer epitelial.

Paraules clau: Càncer de colon, bor, fibronectina, NaBC1, EMT

ABSTRACT

Colon cancer is the most common malignant neoplasm to be present in the digestive tube and, despite the unceasing research, one of the most prevalent diseases worldwide. The risk of developing it depends on a series of factors such as age and diet, but it is usually a genetic disease that results from oncogene overexpression and inactivity of tumor suppressor genes.

Tumor recurrence and metastasis, along with a lack of highly active agents, mark the need for new therapies with specific focuses to fight the illness. Therapy seen as a treatment method is more and more present in treating and preventing carcinogenesis. This is the reason why understanding the cellular processes that lead to cancer development and the mechanisms involved in its dissemination can allow the study of new therapeutic options.

In this Final Degree Project, the role of boron and its transporter (NaBC1) in two cell lines of colorectal adenocarcinoma SW480 (adherent and metastatic) has been evaluated. Using different concentrations of diluted boron in the culture medium, cell viability studies have been performed at different times for the evaluation of the possible cytotoxic effects of boron on these cancer cell lines.

Subsequently, 2D biomaterial platforms capable of presenting covalently anchored boron in the solid phase were used. In this way, we have studied the role of the boron transporter in the behavior of colon cancer cells, and its involvement in the phenomena of epithelial-mesenchymal transition (EMT) as well as its relationship with other membrane proteins such as fibronectin-binding integrins and growth factor receptors (GFR) after their permanent activation. For this purpose, immunofluorescence assays of typical EMT markers, integrins and NaBC1 have been performed to evaluate their expression in the absence/presence of boron, as well as their colocalization with integrins and GFRs.

These studies will provide some knowledge to decipher the role of boron's transporter in these types of neoplasia. The obtained results will allow us to contemplate new therapeutic objectives for this type of epithelial cancer.

Keywords: Colon cancer, boron, fibronectin, NaBC1, EMT

ÍNDICE GENERAL

Documentos contenidos en el TFG

- Memoria
- Presupuesto

ÍNDICE DEL DOCUMENTO I: MEMORIA

MOTIVACIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Transición epitelio-mesenquimal	5
2. Ambiente metastásico y transducción celular en cáncer	6
3. Receptores y factores de crecimiento en cáncer	7
4. Integrinas y fibronectina.....	9
4.1. Fibronectina.....	9
4.2. Fibronectina en el entorno tumoral	11
4.3. Integrinas.....	13
5. Transportador del boro	14
JUSTIFICACIÓN	17
NORMATIVA	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
6. Materiales para el cultivo celular	19
7. Técnicas generales de cultivo celular	20
7.1. Cultivo celular y subcultivos.....	20
7.2. Conservación de los cultivos celulares.....	20
8. Estudio de caracterización celular.....	20
8.1. Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i>	20
8.2. Cultivo sobre plataformas materiales	21

8.3. Ensayo de inmunofluorescencia.....	22
8.4. Ensayo de colocalización	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
9. Resultados de viabilidad celular.....	26
10. Efecto de las plataformas sobre el comportamiento <i>in vitro</i> de las células SW480.....	32
10. 1. Inmunofluorescencia doble E-cadherina/N-cadherina	33
10. 2. Inmunofluorescencia para detección del NaBC1	36
10. 3. Ensayos de colocalización.....	38
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DEL DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

INTRODUCCIÓN AL PRESUPUESTO.....	2
CUADRO DE MANO DE OBRA	2
CUADRO DE MATERIALES	2
CUADRO DE MAQUINARIA	4
CUADRO PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	4
CUADRO PRESUPUESTOS PARCIALES	11
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN	12

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo de las etapas neoplásicas del CRC	5
Figura 2. Esquema simplificado de los principales marcadores epiteliales y mesenquimales implicados en cada etapa del proceso EMT	6
Figura 3. Esquema ilustrativo de la estructura modular de la fibronectina	10
Figura 4. Esquema ilustrativo del microambiente tumoral	12
Figura 5. Esquema ilustrativo de los cambios conformacionales de las integrinas.....	13
Figura 6. Descripción general de la expresión diferencial de NaBC1.	15
Figura 7. Imagen esquemática de eventos que representan el papel del boro y de su transportador NaBC1, así como de otros receptores de membrana e integrinas	16
Figura 8. Ilustración esquemática del proceso de inmunofluorescencia	22
Figura 9. Esquema del ensayo de ligamiento por proximidad	24
Figura 10. Efecto del boro en la proliferación celular de SW480-ADH.....	27
Figura 11. Resultados morfológicos del efecto del boro a distintas concentraciones en SW480-ADH.....	29
Figura 12. Efecto del boro en la proliferación celular de SW480-R.....	30
Figura 13. Resultados morfológicos del efecto del boro a distintas concentraciones en SW480-R.	32
Figura 14. Adhesión de SW480-ADH y SW480-R en sustratos recubiertos con FN	33
Figura 15. Influencia de la activación permanente del NaBC1 con las plataformas 2D en la expresión de E-cadherina y N-cadherina.....	35
Figura 16. Influencia de las plataformas en NaBC1	37
Figura 17. Colocalización de NaBC1/ α 5 y NaBC1/ α v	39
Figura 18. Colocalización de NaBC1/EGFR y NaBC1/FGFR	40
Figura 17. Colocalización de NaBC1/uPAR y NaBC1/VEGFR.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

DOCUMENTO I

Tabla 1. Tabla general de los principales factores de crecimiento y proteínas afectadas por mutaciones en cáncer.	8
Tabla 2. Concentraciones de bórax utilizados para MTS.....	21
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en IF.	23
Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en IF.....	23
Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de colocalización.....	25
Tabla 6. Tabla de clasificación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos (adaptada de la norma ISO 109935).....	26

DOCUMENTO II

Tabla 7. Cuadro de mano de obra	2
Tabla 8. Cuadro de materiales.....	2
Tabla 9. Cuadro de maquinaria	4
Tabla 10. Tabla de precios descompuestos	4
Tabla 11. Tabla de presupuestos parciales	11
Tabla 12. Presupuesto de ejecución material.	12
Tabla 13. Presupuesto de ejecución por contrata	13
Tabla 14. Presupuesto de base de licitación	13

**DOCUMENTO I:
MEMORIA**

MOTIVACIÓN

La motivación principal para la realización del presente Trabajo Final de Grado (TFG) de manera experimental y en el campo de la investigación surge de una ilusión por formar parte de un proyecto centrado en la mejora y el cuidado de la salud de las personas. Desde que empecé con la biología en bachillerato descubrí que me apasionaba el funcionamiento y la organización del cuerpo humano. Cuando en plena adolescencia te ves obligada a entender cómo funciona tu cuerpo, la insulina, a regularla, a comprenderla, te das cuenta de que existen todo tipo de casos, todo tipo de enfermedades. Muchas de ellas vigiladas y estudiadas, pero muchísimas otras a las que no se les ha dado la oportunidad.

Durante estos años de estudio, he tenido la oportunidad de aprender acerca de lo relacionado con la tecnología y la innovación en el campo de la medicina y la biología. He podido aprender tanto, de los materiales de aplicación médica y su interacción en el entorno biológico, como de los principios básicos de estrategias de terapia regenerativa. He tenido la suerte de poder acercarme a los laboratorios y a varios hospitales gracias a las diferentes asignaturas del grado. Hoy, tengo la gran suerte de culminar con todo lo aprendido en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), en un grupo de trabajo que no solo encaja con mis objetivos académicos, sino que comparten una gran inclinación hacia la innovación y el desarrollo de métodos que mejoren la vida de las personas.

Gracias a la realización de este Trabajo Final de Grado, se han aplicado y reforzado los siguientes conocimientos y aptitudes:

- Cultivos celulares
- Técnicas de inmunofluorescencia
- Análisis y cuantificación de imágenes de inmunofluorescencia
- Ensayos de colocalización.
- Evaluación de la viabilidad celular

HIPÓTESIS

En el presente TFG, se ha utilizado tetraborato de sodio decahidratado (bórax), un metaloide utilizado como ion bioactivo para estimular como ligando a su transportador específico el NaBC1. En estudios previos del grupo, queda demostrado que la combinación simultánea de la fibronectina (FN) y concentraciones bajas de bórax (0.59 y 1.47 mM) soluble o liberado desde un sistema biomaterial promueve la diferenciación miogénica en mioblastos de ratón (C2C12) (Rico et al., 2015), induce la vascularización en células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVEC) (Rico et al., 2019) e impulsa la osteogénesis en células madre mesenquimales (MSC) (Rico et al., 2020).

Así, con el objetivo de demostrar el efecto del boro en cáncer, se parte de la hipótesis de la actividad biológica producida por la combinación de la FN, como proteína de matriz extracelular (ECM) que activa las integrinas de unión a FN, y el bórax que a su vez estimula a su transportador específico (NaBC1). Se pretende estudiar cómo la estimulación simultánea de NaBC1-integrinas afecta a las células tumorales, en concreto dos líneas celulares de cáncer de colon: SW480-ADH (con propiedades adherentes) y SW480-R (no adherentes, metastásicas). Mediante análisis bioinformáticos de secuencias depositadas en diferentes bases de datos como “The human Protein Atlas” se ha observado que existe una expresión génica diferencial del NaBC1 en tejidos procedentes de biopsias de pacientes sanos o enfermos de diferentes tipos de cáncer. En concreto, el NaBC1 se expresa en muy poca cantidad en casi todos los tejidos sanos, pero se ve sobreexpresado en biopsias de pacientes con diferentes tipos de cáncer y, específicamente, en pacientes con cáncer de colon.

Por otro lado, para poder demostrar si el efecto observado con el bórax se debe a este elemento o, sin embargo, a la activación de su transportador, se han utilizado unas plataformas biomateriales 2D modificadas químicamente de forma superficial y con el boro anclado covalentemente a unas cadenas de polímero (Tetraetilenglicol - TEG). Con estas plataformas se pretende producir una activación permanente del NaBC1 y, a partir de aquí, evaluar los efectos del bórax soluble que producirán una activación temporal del transportador y compararlos con los efectos del boro anclado a las plataformas que producirán una activación permanente del mismo. Sugerimos y partimos de la base de que el NaBC1 podría ser una nueva diana terapéutica para el cáncer de colon.

OBJETIVOS

Un requerimiento básico en la formación del organismo es el anclaje de las células a la matriz extracelular a través de la formación de complejos de adhesión celular, compuestos por integrinas y otras muchas proteínas citoplasmáticas. En cáncer, la matriz extracelular y sus proteínas se ven modificadas, provocando una transducción de señales anómala que desemboca en un descontrol celular promoviendo la progresión y la metástasis. El objetivo principal de este estudio consiste en estudiar el transportador del boro (NaBC1), componente de la membrana celular, y su relación con otras proteínas de la membrana en los procesos cancerígenos.

En el presente Trabajo Final de Grado se analizarán los efectos del boro en dos variantes de la línea celular SW480 de adenocarcinoma colorrectal; SW480-ADH adherente y SW480-R metastásica. El objetivo final del trabajo consiste en determinar el papel del boro y su transportador en este tipo de neoplasias.

Para ello, se abordan los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la viabilidad celular tanto de la línea SW480-ADH como la SW480-R en presencia de diferentes concentraciones de boro soluble en el medio de cultivo. Se realizarán estudios de viabilidad celular y se evaluarán los posibles efectos citotóxicos del boro en este tipo de líneas celulares cancerígenas.
2. Determinar la bioactividad del transportador del boro y su relación con los fenómenos que ocurren durante la transición epitelio-mesenquimal.
3. Demostrar la relación entre el NaBC1 y otros receptores de la membrana celular como integrinas y receptores de factores de crecimiento (GFR) en el modelo de cáncer de colon SW480.

INTRODUCCIÓN

Se denomina cáncer colorrectal (CCR) a la neoplasia maligna más frecuente que se puede presentar en el tubo digestivo. En 2020, el CCR representó el 10 % de la incidencia mundial de cáncer (de un total de 19.29M de casos nuevos) y el 9,4 % de muertes por cáncer, justo por debajo del de pulmón. (Yue et al., 2021) Actualmente es la tercera causa principal de muerte por cáncer en ambos sexos y, aunque la perspectiva de terapia es generalmente buena, el número de casos sigue creciendo y aumentando su incidencia entre los más jóvenes. Además de por factores genéticos, existen factores derivados de los hábitos de vida y alimenticios, que pueden favorecer que se desarrolle de forma más frecuente el CCR. Al ser generalmente asintomático, cuando aparecen los síntomas la mayoría de los casos ya están en la etapa avanzada dando lugar a tumores agresivos, malignos y metastásicos.

Existen cuatro tipos de cáncer que pueden aparecer en el colon y recto según su origen y las células que afectan en las diferentes capas de tejido. La variación en las células productoras de moco del intestino crea adenocarcinomas, el tipo más común de CCR, siendo el responsable del 90-95% de los casos. Pueden darse otros tipos de cáncer menos comunes como sarcomas, si se originan en la capa muscular de la mucosa intestinal, linfomas, si aparecen en células de defensa del aparato digestivo y tumores carcinoides, si se dan en las glándulas secretoras de hormonas digestivas.

En el presente TFG se utiliza la línea celular SW480, células de adenocarcinoma colorrectal de morfología epitelial humanas que derivan de tumor primario de paciente enfermo. Se trata de una de las líneas celulares cancerígenas mejor caracterizadas en el desarrollo de la neoplasia, por lo que representa un sistema ideal para el análisis de las variaciones asociadas al proceso metastásico.

La quimioterapia, es la terapia más habitual utilizada durante las últimas décadas para el tratamiento del CCR. Se trata de un procedimiento en el que se hace uso de fármacos para erradicar las células del tumor. Su inconveniente radica en la no-especificidad, pues también afecta a células sanas además de las cancerosas produciendo múltiples efectos secundarios no deseados para el paciente. No obstante, actualmente se están desarrollando nuevas terapias dirigidas, medicamentos para combatir las mutaciones de manera específica que, a diferencia de la quimioterapia, buscan actuar sobre dianas moleculares concretas, ya sean proteínas, genes o algunos receptores implicados en las vías de señalización intracelulares tumorales, y que no se centran exclusivamente en el bloqueo de la división celular.

En este apartado se presentan los conceptos básicos relacionados con el objeto de estudio y aplicación del presente TFG, incluyendo una breve introducción de los principales elementos implicados en el desarrollo de este tipo de carcinoma.

1. Transición epitelio-mesenquimal

La transformación de las células epiteliales sanas hacia un estado mesenquimal se conoce como transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés). Aunque esta transición es esencial en procesos de regeneración como el desarrollo embrionario, la remodelación tisular y la cicatrización, también se trata de un proceso implicado en la progresión del cáncer hacia un fenotipo invasivo (Trimboli et al., 2008). La EMT contribuye a la progresión del tumor de formas diferentes, destacando que provoca el aumento de su potencial metastásico, ayudando a la expansión de las células tumorales, favoreciendo su resistencia a tratamientos de quimioterapia y facilitando la recurrencia de la enfermedad. (Frisch et al., 2013) De esta forma, otorga a las células tumorales una ventaja de supervivencia en el recorrido desarrollado por las células desde el tumor primario hacia los sitios de metástasis.

En el CCR, la primera etapa del tumor comienza, al igual que en el resto de las neoplasias, por una displasia celular, lesión irreversible que causa la alteración tanto de la morfología de las células como de su función. A menudo la displasia comienza siendo una protuberancia denominada pólipo, visible macroscópicamente, y dispuesta en la superficie de la capa mucosa. En este primer estadio, sería posible prevenir el desarrollo del CCR si se detectase y extirpase, ya que el adenocarcinoma, en ausencia de metástasis, generalmente es tratable. Sin embargo, cuando el tumor adquiere la capacidad de atravesar la membrana basal, logra diseminarse y pasa a ser mucho más agresivo e invasivo.

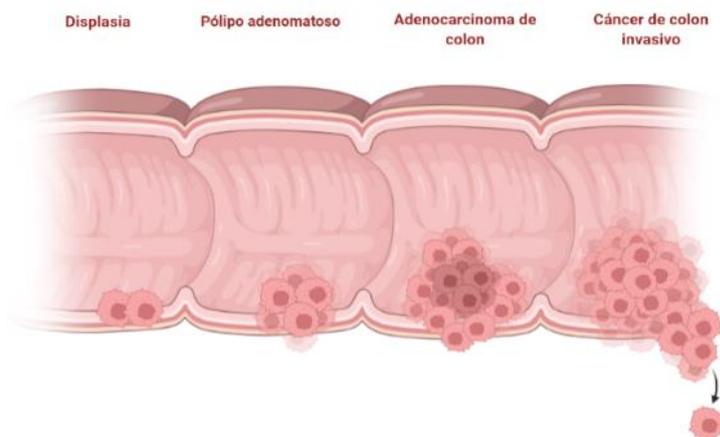


Figura 1. Esquema ilustrativo de las etapas neoplásicas del CCR. En la primera etapa de displasia, se causa una alteración morfológica y funcional. Segunda etapa se crea una protuberancia en la superficie del tejido. Tercera y cuarta etapa, el pólipo atraviesa la membrana basal y comienza a diseminarse. Imagen de creación propia.

Esta cascada metastásica se compone de diferentes etapas reguladas por distintos genes y vías de señalización donde: 1) las células cancerígenas se desprenden del tumor primario y migran; 2) invaden los tejidos vecinos y penetran a través de la membrana basal; 3) entran a los vasos sanguíneos y/o linfáticos; 4) sobreviven en la circulación; 5) salen de los vasos sanguíneos y/o linfáticos hacia órganos o tejidos distantes; 6) forman nódulos micrometastásicos; 7) se adaptan y reprograman formando macrometástasis. (Yao et al., 2011)

El prototipo de epitelio monocapa se caracteriza por tres regiones de membrana plasmática: apical, lateral y basal. La región lateral es morfológicamente distinta y está marcada por diferentes estructuras de unión, como son las uniones estrechas, adherentes, tipo GAP y desmosomas. (Nelson, 2009) Por otro lado, en la base de la membrana residen células epiteliales altamente

polarizadas que, junto a otros componentes, comprenden una red de matriz extracelular (ECM). Estas se conectan a la membrana basal a través de integrinas. Todo ello contribuye a la conservación de la polaridad.

En la etapa inicial de la EMT, cuando las células cancerígenas se desprenden del tumor primario, sucede una reprogramación de la expresión génica, dando lugar a la pérdida de la organización celular, provocando múltiples cambios bioquímicos que capacitan a las células epiteliales para obtener un fenotipo mesenquimal. Estas reorganizan el citoesqueleto y pierden sus uniones intercelulares, permitiendo que se entremezclen los componentes de las membranas apical y basolateral provocando la pérdida de la polaridad apical-basal y favoreciendo la adquisición de una morfología fusiforme. (Trimboli et al., 2008)

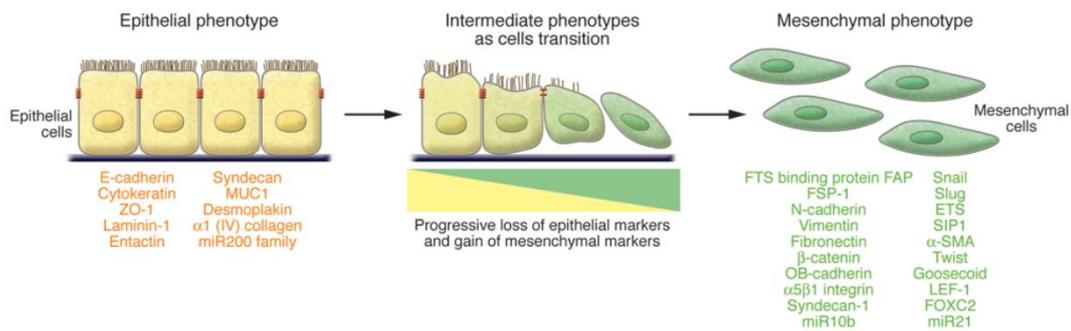


Figura 2. Esquema simplificado de los principales marcadores epiteliales y mesenquimales implicados en cada etapa del proceso EMT. El cambio de fenotipo implica una transición funcional de células epiteliales polarizadas a células mesenquimales. La colocalización de los dos conjuntos de marcadores distintos define un fenotipo intermedio de EMT. Recuperado de Kalluri et al., 2009.

Más detalladamente, las uniones adherentes comienzan a desensamblarse, la E-cadherina, proteína de superficie celular que media la conexión entre células vecinas, se libera de la membrana y se degradada. Además, esta proteína se ve reemplazada por N-cadherina, a la vez que las integrinas, proteínas que median la conexión con la membrana basal, son reemplazadas por uniones transitorias, lo que induce el cambio a células de fenotipo mesenquimal. Así mismo, se separan los desmosomas, se debilitan las uniones tipo gap y se reprime la expresión de marcadores epiteliales como las proteínas de las uniones estrechas, claudinas y ocludinas, las proteínas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto, citoqueratinas y las que forman parte de las propias uniones adherentes como la α y β -catenina. Todo ello contribuye a la degradación de la membrana basal. (Huang et al., 2012; Tiwari et al., 2012) El fenotipo mesenquimal resultante hace que las células afectadas tengan una forma alargada parecida a la de los fibroblastos con sobreexpresión de marcadores mesenquimales como son la N-cadherina, vimentina, fibronectina, actina de músculo liso, etc (Figura 2) y componentes de la matriz extracelular como colágeno α_1 y α_2 . (Tiwari et al., 2012)

2. Ambiente metastásico y transducción celular en cáncer

En tejidos sanos, el control de la producción y liberación de señales está determinado por el correcto funcionamiento del ciclo de crecimiento y división celular. De esta forma, se asegura una homeostasis del número de células y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura normal del tejido y su función. A medida que las células normales evolucionan progresivamente a un estado neoplásico, adquieren características que favorecen la creación de un "microambiente

tumoral". En células cancerosas se desregulan, entre otras, las señales encargadas de la señalización proliferativa, de la evasión de genes supresores de tumores y de la resistencia a la muerte celular, lo que induce a la angiogénesis, permitiendo una inmortalidad replicativa, y activando la invasión y la metástasis. En las células cancerosas, los componentes clave de estas vías pueden estar alterados por oncogenes debido a sobreexpresión o mutación, lo que conduce a una señalización celular desregulada. (Adjei, 2005)

Las células requieren señales generalmente emitidas por ligandos para estimular su crecimiento y desarrollo, así como para su inhibición. Estas señales o ligandos se expresan en forma de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. (Adjei, 2005) Las señales generadas se transmiten a la célula a través de proteínas situadas en la superficie celular llamadas receptores, que actúan de manera específica. La unión de un ligando al dominio extracelular activa un receptor, por lo general tirosina quinasa transmembrana que, a su vez, activa una cascada de reacción en otras proteínas. Cuando un ligando se une al receptor, activa una vía de transducción de señales que crea una cadena compleja de eventos en el citoplasma o el espacio intracelular, que conduce al núcleo celular a estimular o inhibir la transcripción de genes. (Hanahan et al., 2011)

En células sanas, la producción de receptores de superficie celular está limitada por restricciones celulares que dicta la expresión génica y la traducción de proteínas. Sin embargo, en células tumorales, las mutaciones en estos genes interrumpen su regulación y producen demasiadas copias del gen conduciendo, a su vez, a una transcripción y producción excesivas tanto de receptores como de factores de crecimiento. La elevación de los niveles de proteínas receptoras que se muestran en la superficie de las células cancerosas hace que las células sean hipersensibles a cantidades del ligando del factor de crecimiento que de otro modo serían limitantes. (Hanahan et al., 2011)

Además, tienen la capacidad de estimular a las células sanas que se encuentran alrededor del estroma tumoral para que les suministren y apoyen cubriendo las necesidades básicas del tumor facilitando factores de crecimiento y otros factores tróficos. Todo ello hace que se cree un microambiente tumoral específico que favorece a proliferación de las células malignas y su diseminación.

3. Receptores y factores de crecimiento en cáncer

Actualmente, la investigación en neoplasias como el CCR ha empezado a dejar atrás las terapias donde se hace uso de fármacos inespecíficos como la quimioterapia, para centrarse concretamente en los distintos elementos involucrados en la señalización y desarrollo del tumor. Como en las células tumorales los receptores de factores de crecimiento están sobreexpresados, las terapias actuales se centran en combatir los cambios genéticos y en frenar su descontrol, ya que la función de los factores de crecimiento en la señalización del cáncer es primordial y de ellos depende la posterior cascada de transducción.

Depende del tipo de cáncer y la zona en la que se origine, predomina la sobreexpresión de uno u otro factor de crecimiento (Growth Factor, GF) y de sus receptores (GFR). Por ejemplo, en el glioblastoma, cáncer agresivo cerebral y de médula espinal, predomina la sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). (Cantanhede, 2017) En los sarcomas y carcinomas predomina la sobreexpresión del factor de crecimiento tumoral beta (TGFb). (Chen et al., 2019) Sin embargo, además de los casos puntuales de sobreexpresión anómala de cada cáncer en específico, generalmente sucede una proliferación irregular de los principales factores y proteínas asociadas al cáncer (Tabla 1). Entre ellos, el presente TFG se centra en la relación que mantiene el transportador del boro con el receptor de factor de crecimiento epidérmico

(EGFR) y el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), asociados a invasión y EMT, con las integrinas, en concreto α_5 y α_v , con el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR) y el activador del plasminógeno urocinasa (uPAR), asociados con la angiogénesis y la migración, respectivamente.

Tabla 1. Tabla general de los principales factores de crecimiento y proteínas afectadas por mutaciones en cáncer.

Función	Factor de crecimiento /Proteína	Fuente celular	Actividad	Ref.
Proliferación	EGF	Plaquetas Monocitos Fibroblastos Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la proliferación de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares. • Mejora la producción de fibronectina. 	(Gainza et al., 2015) (Tiaka et al, 2012)
	FGF	Fibroblastos Macrófagos Células endoteliales	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la angiogénesis. • Estimula la formación de tejido de granulación, la remodelación de la matriz, y reepitelización. 	(Zhang et al., 2006) (Mansukhani, 1992)
Invasión	PDGF-B	Plaquetas Fibroblastos Macrófagos Células endoteliales vasculares Células musculares lisas vasculares	<ul style="list-style-type: none"> • Activa los macrófagos para liberar factores de crecimiento. • Promueve la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. 	(Kitadai et al., 2006)
Adherencia	Trombina	-	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la activación de la coagulación. 	(Marco et al., 2015)
	Integrinas	-	<ul style="list-style-type: none"> • Promueven la migración celular, la supervivencia y la proliferación celular. 	(Humphries et al., 2006)
EMT	IGF	Fibroblastos Macrófagos Neutrófilos Hepatocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la reepitelización. • Estimula la proliferación de fibroblastos. 	(Provenzano et al., 2007)
	E-cadherinas	-	<ul style="list-style-type: none"> • Morfogénesis, estabilización, diferenciación de los tejidos, polaridad en los tejidos y adhesión. 	(Huang et al., 2012)
Apoptosis	TNF	Monocitos Macrófagos Linfocitos T y B Células NK Leucocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la inducción de apoptosis, citotoxicidad, activación y diferenciación. • Induce expresión de moléculas de adhesión. 	(Alvarado et al., 2012)

Migración	TGF-B	Plaquetas Fibroblastos Macrófagos Queratinocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula e inhibe la proliferación de varias células. • Favorece la angiogénesis, diferenciación, migración. 	(Gainza et al., 2015)
	uPA	-	<ul style="list-style-type: none"> • Induce señalización intracelular. • Modula la migración celular y las interacciones célula-matriz extracelular. 	(Lund et al., 2011)
Angiogénesis	VEGF	Células de la mesénquima y del estroma	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la permeabilidad vascular y la inflamación. • Induce migración celular y estimula su proliferación y diferenciación. 	(Underiner et al., 2004)

En tejidos sanos, los ligandos que se unen a los GFR están estrictamente regulados para garantizar que la cinética de la proliferación celular coincida con precisión con los requisitos de homeostasis de los tejidos. En cáncer, estos receptores se encuentran en estimulación continua debido a la sobreexpresión de los ligandos en el microambiente del tumor, o como resultado de una mutación en los propios receptores, provocando un bloqueo de su función regular y estimulando la activación continua. (Sasaki et al., 2013) La expresión anómala de los receptores generalmente confiere un fenotipo más agresivo y, por lo tanto, a menudo predice un mal pronóstico.

4. Integrinas y fibronectina

4.1. Fibronectina

La adhesión celular tiene lugar a través de interacciones entre proteínas de la membrana celular (principalmente integrinas) y uno o más componentes proteicos que componen la denominada matriz extracelular (ECM). Entre las diferentes proteínas que componen la ECM se encuentran la fibronectina (FN), vitronectina y fibrinógeno. (Llopis-Hernández et al., 2013) La función de la ECM es estructural ya que actúa de soporte para la formación de tejidos y órganos. Además, también actúa como reservorio de factores de crecimiento, por ejemplo, VEGF, EGF, PDGF o el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Martino et al., 2010) y otras moléculas esenciales para la señalización intracelular. La conformación de las proteínas de la ECM también es muy importante, ya que la correcta interacción de los sitios de unión que presentan en sus secuencias con las integrinas determina la activación de las diferentes cascadas de señalización.

De todas las proteínas de la matriz, el presente TFG se centra en la fibronectina. La FN está implicada en una amplia variedad de fenómenos celulares, particularmente en aquellos que involucran las interacciones entre las células con la ECM. (Hynes et al., 1982)

Es una glucoproteína de tipo fibroso de aproximadamente 2500 aminoácidos. Está formada por varios dominios proteicos que contienen zonas de asociación a otras proteínas como el colágeno u otras moléculas de FN, dominios de unión celular, dominios de unión a glicosoaminoglicanos presentes en la ECM y dominios de unión a factores de crecimiento. Posee una región amino-terminal que interactúa principalmente con componentes de la matriz, y un extremo carboxilo terminal que es el responsable de la interacción con las células. Esta estructura flexible ensamblada por dos dominios unidos por puentes de sulfuro, permite que la FN pueda adaptarse a las diferentes formas tridimensionales requeridas en la conformación de la ECM. (Paolella et

al. 1993) De todas sus isoformas, únicamente una, la fibronectina plasmática, es soluble y circula por la sangre. El resto (FN celular) se organiza en fibrillas multiméricas insolubles en la superficie celular. La formación de estas fibrillas está mediada por las propias células y depende de las interacciones FN-FN y FN-integrinas dando lugar a la fibrilogénesis de la FN originando una malla densa de fibrillas interconectadas que proporcionan un entorno dinámico para las células. (Wierzbicka et al., 2003)

Generalmente las dos cadenas que forman la proteína no son idénticas a pesar de provenir del mismo gen y ARNm, lo que da lugar a veinte isoformas de las distintas combinaciones. Sin embargo y lo que caracteriza a la FN, entre sus muchas funciones, es la conocida secuencia RGD (Arg-Gly-Asp). Esta secuencia peptídica de aminoácidos está presente tanto en la FN como en muchas otras proteínas de la ECM, y es reconocida por proteínas de la membrana celular, en concreto por las integrinas. Estas señales son las que permitirán a las células adherirse a la matriz, así como crear caminos por donde pueden las células migrar en procesos como la cicatrización. La variedad de isoformas derivadas del mismo gen viene caracterizada por tres regiones susceptibles de sufrir un procesamiento alternativo, EIIIA, EIIIB y EIIC. Su expresión modifica la función de la FN que se sintetiza. Por ejemplo, la expresión de EIIIA es mayor en células tumorales, y la presencia de ambos segmentos, EIIIA y EIIIB, están presentes en la FN celular y no están presentes en la FN plasmática. (Hynes, 1990) Sus modificaciones, junto con la expresión o no del segmento EIIC, confieren a la FN propiedades diferentes, ya sea alterando la glicosilación o solubilidad, sensibilidad o incluso creando nuevos centros de unión celular.

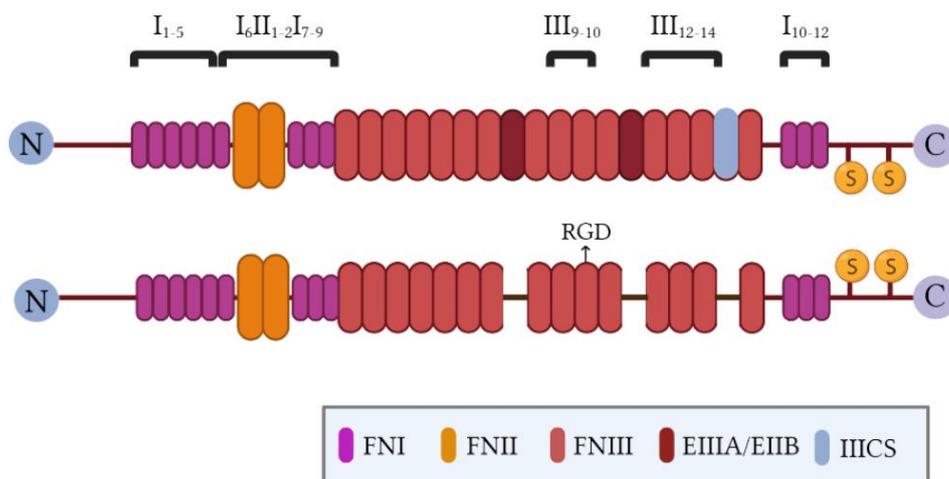


Figura 3. Esquema ilustrativo de la estructura modular de la fibronectina; organización de dominios estructurales y funcionales. En cada cadena polipeptídica existen tres tipos de repeticiones estructurales (tipo 1, II y III). 12 repeticiones de FN tipo 1 (FNI), 2 repeticiones de FN tipo II (FNII) y 15 repeticiones de FN tipo III (FNIII). En la figura se muestra una molécula de fibronectina hipotética, con una cadena donde aparecen todos los módulos (incluyendo las regiones susceptibles a procesamiento alternativo: EIIIA, EIIIB y EIIC) y otra sin ellos. Imagen de creación propia adaptada de To et al., 2011.

Respecto a su organización, las repeticiones FNI₁-FNI₅ interactúan específicamente con heparina, fibroblastos y fibrina (Sottile et al., 1991; Potts et al., 1994), bacterias (Mosher et al., 1980), estructuras de ensamblaje de ECM y con la propia cadena para el autoensamblaje en FNIII. La región de los módulos FNI₁-FNI₅, que consta de los dominios FNI₆FNII₁₋₂FNI₇₋₉, es necesaria para unir colágeno. La fibronectina se une a la superficie de la célula con integrinas a través de los módulos FNIII₉₋₁₀. Los módulos FNIII₁₂-FNIII₁₄ son necesarios para la unión a heparina. Un

segundo sitio de unión a fibrina se encuentra en los módulos C-terminal FNI₁₀-FNI₁₂. La secuencia RGD, reconocida por las células, se encuentra en la décima repetición de tipo III. (Tamkun et al., 1986).

Entre las funciones principales de la FN, destaca su papel en varios procesos biológicos como la trombosis, hemostasis, mantenimiento de la morfología celular, migración e incluso la adhesión celular y la transformación oncogénica. (Hynes et al., 1982) La interacción y conexión de los componentes de la ECM, GF, receptores, las proteínas transmembrana e integrinas, logran que la ECM se autorregule y ensamble controlando tanto la proliferación celular, como su supervivencia, diferenciación y apoptosis.

Numerosos estudios evidencian la posibilidad de uso de la FN en terapias dirigidas contra el cáncer. Actualmente, la FN se utiliza junto a diferentes materiales en distintas superficies de estudio como puede ser en hidrogeles o andamios celulares o “scaffolds” para aplicaciones de biomateriales en medicina regenerativa. Dependiendo de las propiedades de la superficie material, la adsorción de la proteína conducirá a diferentes conformaciones, promoviendo mejores propiedades de adhesión, fibrillogénesis o la unión a integrinas. (Trujillo et al., 2020)

4.2. Fibronectina en el entorno tumoral

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) incluye tanto los componentes celulares que rodean la masa tumoral, células inmunitarias, fibroblastos y células epiteliales, como los componentes acelulares, incluida la matriz extracelular y los vasos sanguíneos. Las células cancerosas liberan estímulos que modulan el TME y contribuyen al crecimiento del cáncer a través de la evasión inmunitaria, la formación de nichos metastásicos y la neoangiogénesis, entre otros. Esto les permite mantenerse y dividirse sin una estimulación de crecimiento externa. Este repertorio de células aparentemente normales, contribuyen a crear un ambiente seguro en el que el tumor puede crecer. (Rick et al., 2019)

Entre las proteínas de la ECM, la FN destaca por su función en el desarrollo del tumor. Numerosos estudios determinan su papel en las neoplasias. En Erdogan et al. 2017, se analiza cómo los fibroblastos asociados al cáncer organizan la FN para establecer tractos que favorecen la invasión del cáncer, lo que demuestra que la FN tiene un papel directo con la invasión de las células cancerosas. En Nicosia et al. 1993, se sugiere que el desarrollo de los vasos se ve favorecido en respuesta a la FN, argumentando que esta proteína ayuda a formar nuevos vasos sanguíneos, atribuyéndole un papel fundamental en la angiogénesis tumoral. En los estudios de Gopal et al., 2017 y Missirlis et al., 2017 se estudia, por un lado, cómo las redes de FN en células tumorales junto con algunas familias de integrinas son un componente esencial en la migración del cáncer y, por otro lado, cómo eliminando la FN celular cesa la motilidad por completo. Todo ello sugiere que la FN, según los receptores en los que actúe, repercutirá de diferente manera en su comportamiento.

La transformación y progresión tumoral involucra una serie de cambios en los que participa la FN. En una primera etapa, las células epiteliales que expresan FN entran primero en un estado de senescencia bajo estímulos oncogénicos (incluida la pérdida de genes supresores de tumores), generando una alta expresión de FN endógena y de fenotipos asociados a la senescencia para reclutar fibroblastos y macrófagos fribrolíticos, células T citotóxicas, células dendríticas y células *natural killer* (NK) para degradar y remodelar la ECM (incluyendo el depósito de fibronectina de la membrana extracelular) y eliminar las células dañadas o senescentes. (Tsong-Cheng et al., 2019)

Posteriormente, las células que han sobrevivido al estímulo senescente evolucionan lentamente a células tumorales tratando de evitar la respuesta inmune de los tejidos primarios, durante los cuales la FN endógena disminuye drásticamente, mientras que el depósito de FN impulsado por células tumorales en el microambiente tumoral se eleva. (Tsung-Cheng et al., 2019) Como resultado, las células tumorales aumentan su actividad migratoria e invasiva, desencadenan la angiogénesis, crecen en los tejidos primarios, y se intravasan en los vasos sanguíneos siendo células tumorales circulantes con una baja cantidad de fibronectina.

En esta última etapa, las células tumorales proliferan rápidamente en los tejidos primarios y secretan estímulos que reclutan e impulsan a las células de la zona a establecer un nicho pre-metastásico, donde los macrófagos y los fibroblastos asociados al cáncer son los principales responsables de, en primer lugar, promover la deposición de FN, proteoglicanos, colágeno y glucosaminoglicanos en la ECM para preparar un microambiente tumoral adecuado para la formación y diseminación de las células tumorales y, en segundo lugar, reclutar células del sistema inmune para liberar mediadores inflamatorios que favorezcan a la formación del TME (Figura 4). (Tsung-Cheng et al., 2019)

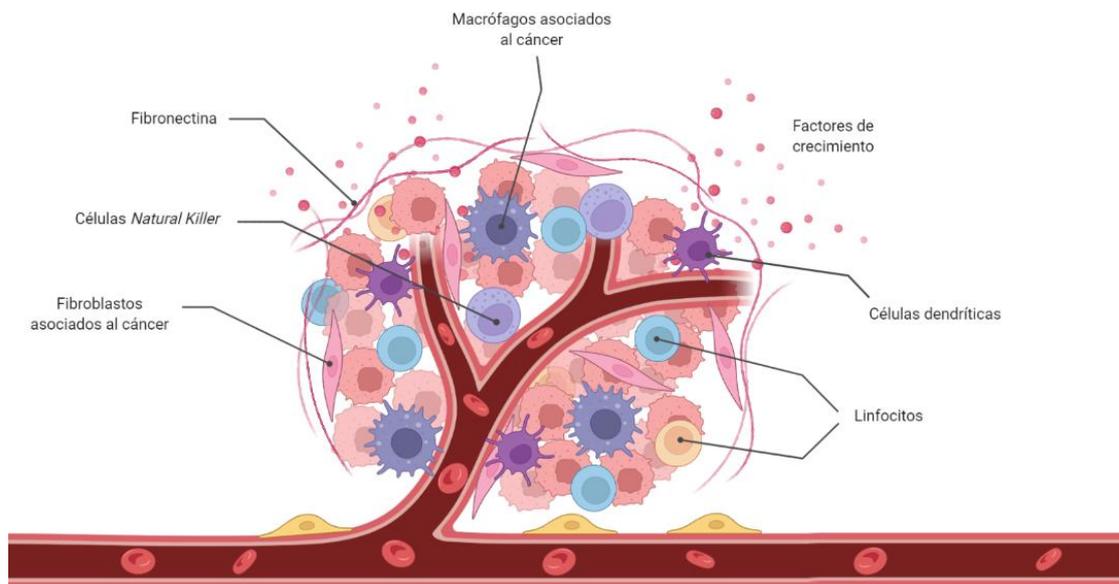


Figura 4. Esquema ilustrativo del microambiente tumoral. Se incluyen componentes celulares como las células dendríticas, Natural Killer y linfocitos T y B, pertenecientes al sistema inmune, células altamente citotóxicas en el TME encargadas de expresar receptores activadores e inhibidores, secretar citoquinas y promover una respuesta inmune adaptativa protumoral, y macrófagos y fibroblastos asociados al cáncer, encargados del reclutamiento del resto de células y de la deposición de sustancias en el TME. Como parte del componente acelular, destacan los factores de crecimiento y la fibronectina como proteína del ECM. Imagen de creación propia.

Cabe destacar que existe una notable diferencia entre la FN producida por las células tumorales, aquella secretada por macrófagos y fibroblastos para acondicionar el microambiente tumoral, y la FN plasmática que se encuentra normalmente en el ECM en una condición sana. En la fase experimental del proyecto, se utiliza esta última de manera que pueda activar a las integrinas de unión a FN.

4.3. Integrinas

Los principales receptores de adhesión celular para los componentes de la matriz extracelular (ECM), son las integrinas. Son una familia de 24 heterodímeros transmembrana compuestos por una combinación de dos subunidades asociadas de manera no covalente, α y β , que intervienen en las interacciones célula-célula y célula-ECM. Se expresan en muchos tipos de células, incluyendo células tumorales, pericitos, fibroblastos, células del sistema inmune y endoteliales. (Sökeland et al., 2019) Las integrinas reconocen la combinación peptídica Arg-Gly-Asp (RGD), son receptores de FN, colágeno y de laminina entre otros ligandos fisiológicos. (Hamidi et al., 2018) Depende de la familia y subunidad, las integrinas pueden unirse tanto a ligandos específicos de la ECM, por ejemplo, integrina $\alpha_5\beta_1$ que solo une FN, como a otros múltiples ligandos como la integrina $\alpha_v\beta_3$ que puede unir FN, vitronectina, fibrinógeno y trombospondina. (Humphries et al., 2006). De esta forma son capaces de reconocer el ambiente en el que se encuentran y actuar como mecanoreceptores que pueden transmitir y detectar cambios en la fuerza mecánica que actúa sobre la matriz extracelular.

Las integrinas cambian su estado conformacional desde una posición inactiva (conformación replegada) a una activa (conformación extendida) donde se despliegan ofreciendo sitios de adhesión tanto a la ECM como en la región citosólica (Figura 5). Al formar una conexión física entre el interior y el exterior de la célula, se permite la transducción bidireccional de señales indicando, entre otros, los cambios de tensión en la ECM o los movimientos de tracción en el citoesqueleto. Estos cambios de conformación son fundamentales para controlar la adhesión, migración, proliferación, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular, entre otras. (Hamidi et al., 2018)

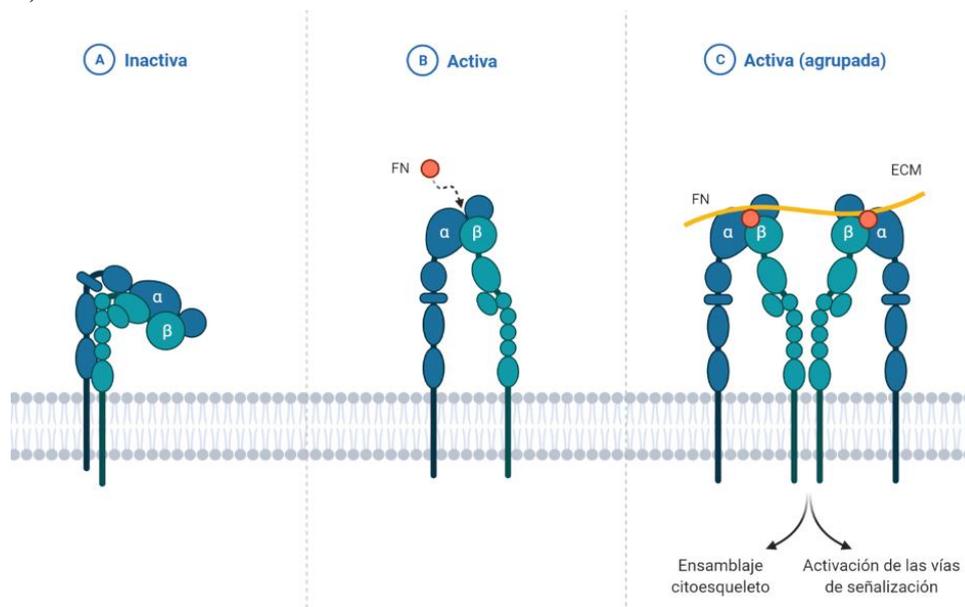


Figura 5. Esquema ilustrativo de los cambios conformacionales de las integrinas. A) Posición inactiva, ambas subunidades se encuentran replegadas. B) Posición activa, son capaces de reconocer ligandos específicos como la FN. C) Grupo de integrinas activas agrupadas. Imagen de creación propia.

En cáncer, el papel de las integrinas es de vital importancia ya que no solo están implicadas en la progresión tumoral, sino que también forman parte del mecanismo metastásico. Son capaces de inhibir la apoptosis, inducir la angiogénesis y favorecer la proliferación, migración e invasión celular. (Desgrosellier et al., 2010) Como consecuencia, los actuales estudios se centran en la

correlación entre los niveles de expresión de integrinas en células tumorales y sus resultados patológicos, identificándose varias familias de integrinas que juegan un papel importante en la progresión del cáncer. Las integrinas que están principalmente involucradas en la unión proteína-matriz son $\alpha_1\beta_1$ (laminina/colágeno), $\alpha_2\beta_1$ (laminina/colágeno), $\alpha_3\beta_1$ (laminina/colágeno/fibronectina/entactina), $\alpha_4\beta_1$ (fibronectina), $\alpha_5\beta_1$ (fibronectina), $\alpha_6\beta_1$ (laminina), $\alpha_6\beta_4$ (laminina), $\alpha_v\beta_1$ (fibronectina), $\alpha_v\beta_3$ (vitronectina) y $\alpha_v\beta_5$ (vitronectina). (Koretz et al., 1994) Algunos de estos receptores se expresan ampliamente en varios tejidos y algunos de estos receptores reconocen la secuencia de arginina-glicina-asparagina (RGD) en sus ligandos. En el estudio de Nieberler et al. se afirma que la expresión de $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$ está relacionada con metástasis y mala prognosis del paciente. En cáncer de colon, entre las integrinas de unión a RGD involucradas en el desarrollo de la neoplasia destacan $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_5\beta_1$. (Schittenhelm et al., 2013)

Debe enfatizarse que las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ trabajan en conjunto con factores de crecimiento y sus receptores, influyendo en los procesos de diferenciación celular de células madre cancerosas. Estudios demuestran como el papel que desempeñan en la potenciación de la actividad de los receptores de tirosina quinasas, y de otros receptores de factores de crecimiento como VEGFR, FGFR o EGFR, es de vital importancia para el desarrollo del cáncer (Huang et al., 2012; Goel et al., 2012; Hood et al., 2003; Guo et al., 2004).

5. Transportador del boro

El boro es un oligoelemento natural en la dieta humana. Aunque su esencialidad ha sido demostrada principalmente en plantas, existen algunos estudios que describen al boro como elemento esencial también en mamíferos. Cada vez más y debido a su importante papel en los procesos celulares, la investigación actual se centra en el boro para el desarrollo de nuevos fármacos candidatos contra el cáncer. El *bortezomib*, por ejemplo, es un ácido dipeptidil borónico, se utiliza actualmente como quimioterapia en el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma de células del manto por su capacidad y especificidad en la inhibición de la proteasoma. (Tan et al., 2018) La homeostasis de este elemento esencial en el metabolismo humano, está regulada por su transportador, el NaBC1, codificado por el gen BTR1 o SLC4A11 y presente tanto en células vegetales como animales.

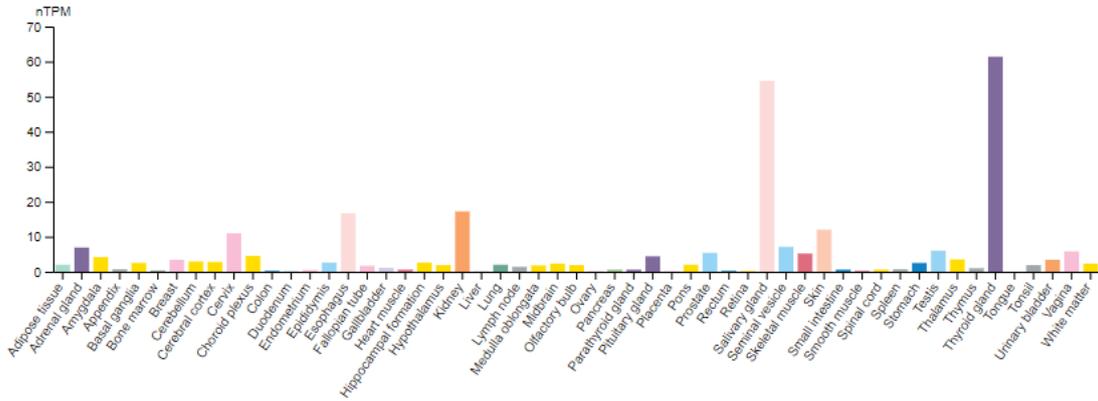
En animales, NaBC1 juega un papel central mediando los efectos tóxicos y estimulantes en la proliferación y crecimiento celular. Es específico y funciona como un cotransportador de boro acoplado a Na^+ . En ausencia de boro, NaBC1 transporta bicarbonato (Na^+ y OH^- (H^+)), mientras que, en presencia de boro, funciona como un cotransportador electrogénico regulado por voltaje, que co-transporta boro junto con Na^+ . (Park et al., 2004)

Las mutaciones en el gen que codifica el NaBC1 causan distrofias endoteliales corneales (Vithana et al., 2006), y se encuentra sobreexpresado en múltiples tipos de cáncer. (Figura 6) (Park et al., 2004) Además, en el oído interno participa en el transporte de potasio a través de la capa de fibrocitos hasta la estría vascular, y es esencial para la generación del potencial endococlear. En el riñón, es esencial para la concentración urinaria, mediando el flujo de sodio en el asa de Henle. (Human Protein Atlas)

La expresión del gen del transportador del boro en tejidos glandulares como en las glándulas salivares o las glándulas tiroideas es mayor que en cualquier otro tejido ya que predomina en los tejidos cuya función principal es el intercambio de fluidos. Aunque la expresión de NaBC1 sea baja en el tejido gastrointestinal, su expresión se ve aumentada en cáncer de colon (Figura 6-b). Se puede observar cómo la expresión del gen SLC4A11 en adenocarcinoma de colon (COAD,

por sus siglas en inglés) es mucho mayor en la población con tumor primario de CRC que en la de pacientes sanos donde es casi despreciable. De esta manera podría afirmarse que la sobreexpresión del gen que expresa el transportador del boro está asociada con un pronóstico desfavorable en cáncer colorrectal.

a)



b)

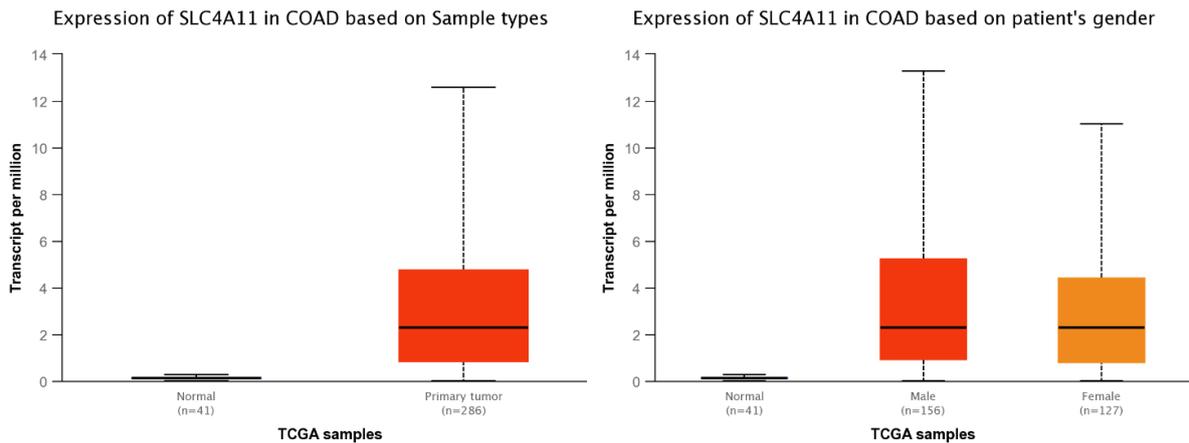


Figura 6. Descripción general de la expresión diferencial de NaBC1. a) Expresión de ARN del NaBC1 específica de cada tejido. Expresado en transcripciones por millón medido en niveles de expresión normalizados (nTPM), el conjunto de datos de consenso se realiza para 55 tipos de tejidos sanos, mediante la combinación de los conjuntos de datos de transcriptómica HPA y GTEx. La codificación por colores se basa en grupos de tejidos, cada uno de los cuales consta de tejidos con características funcionales en común. (Human Protein Atlas) b) Expresión del gen que codifica el transportador del boro, SLC4A11. Se realiza en base a dos poblaciones diferentes, tejido sano y tejido con tumor primario de adenocarcinoma de colon (COAD) en base al Cancer Genome Atlas (TCGA). Datos proporcionados por la base de datos UALCAN.

Por otra parte, recientes investigaciones desarrolladas en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este TFG dirigido por la Dra Rico, desvelan una nueva función para el NaBC1 además del control de la homeostasis del boro. Se ha descubierto que la estimulación simultanea

del NaBC1 e integrinas de unión a FN, inducen de forma sinérgica la señalización intracelular mediada además mediante la cooperación con otros receptores de membrana como son los receptores de factores de crecimiento (GFR) (Figura 7).

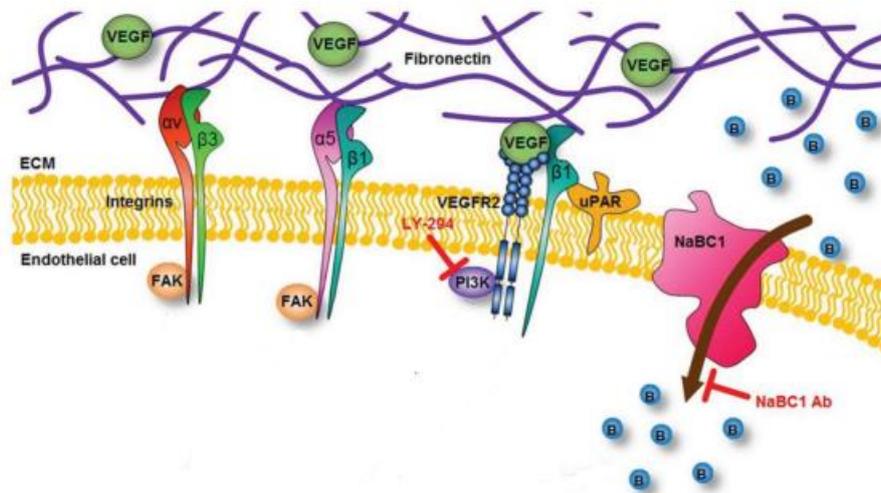


Figura 7. Imagen esquemática de eventos que representan el papel del boro y de su transportador NaBC1, así como de otros receptores de membrana e integrinas. Recuperado de Rico et al. 2019

En diversas publicaciones se ha demostrado que la activación simultánea del NaBC1 e integrinas induce la diferenciación miogénica en células musculares de ratón (Rico et al., 2015), e induce y acelera la reparación muscular después de una lesión con cardio toxina en un modelo *in vivo* de ratón. (Ciriza et al., 2021). Además, induce y potencia la vascularización en cooperación con el VEGFR (Rico et al., 2019) y la osteogénesis en cooperación con el BMPR1A (Rico et al., 2020).

JUSTIFICACIÓN

A lo largo de las últimas décadas, los avances tecnológicos han aportado un profundo conocimiento del genoma humano, permitiendo determinar las bases genéticas y moleculares de muchas enfermedades. En este nuevo panorama, la medicina clásica queda desbancada por una medicina de precisión, donde las enfermedades son tratadas teniendo en cuenta la biología, el entorno y los antecedentes del paciente, para poder establecer un diagnóstico y tratamiento de forma lo más precisa y personalizada posible. En el campo del cáncer, es de vital importancia la actividad e interacción de las células del entorno tumoral con otras sustancias o materiales exógenos a la hora de estudiar sus posibles aplicaciones biotecnológicas y sus funcionalidades. De esta forma, las terapias involucradas en el campo de la ingeniería tisular y medicina regenerativa en cuestión de cáncer se centran cada vez más en actuar sobre dianas moleculares involucradas en el entorno tumoral.

El propósito de este trabajo es avanzar con la línea de investigación del grupo de laboratorio de la autora del presente TFG, dirigido por la Dra Patricia Rico, basada en el estudio del transportador del boro en los diferentes tejidos, ya que el uso de boro como molécula involucrada en procesos de regeneración celular ha dado buenos resultados en la diferenciación de mioblastos y la vascularización de tejidos tanto en modelos celulares como animales, en anteriores proyectos.

El uso de boro y el estudio de su efecto en las interacciones célula-proteína-material, pretende dar solución a las limitaciones de la terapia actual basada en la quimioterapia. Para ello se estudia su viabilidad celular en la línea de adenocarcinoma colorrectal SW480, así como su efecto citotóxico. Además, se pretende definir el rol del transportador del boro en este tipo de neoplasias y determinar su función en la transición epitelio-mesenquimal.

En un futuro se pretende evaluar la capacidad del transportador del boro en cooperación con integrinas y GFR para combatir este tipo de cánceres epiteliales en un modelo in vivo de ratón.

NORMATIVA

Dada su naturaleza, la normativa en la que se ampara la parte experimental del presente Trabajo de Fin de Grado, se extrae del Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). Los experimentos realizados se rigen por los Reales Decretos y leyes que muestran relación con la manipulación y almacenamiento de sustancias y residuos biológicos y químicos.

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual. (BOE nº 140 12-06-1997).
- Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (Artículos 5.2.c, 7.4.c).
- Real Decreto 485/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo (Anexo I.2; II.1; III.3).
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (BOE 124, 24 de mayo de 1997, págs. 16100-16115)
- Orden MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- Real Decreto 656/2017, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente TFG se utilizan dos variantes de la línea celular SW480, células de adenocarcinoma colorrectal de morfología epitelial humanas que derivan de tumor primario, designadas como ADH (células adherentes) y R (no adherentes, metastásicas). Si comparamos ambas variantes de forma aislada, las células ADH predominan. Tienen forma plana y poligonal y tienden a formar grupos típicos de las colonias epiteliales. Poseen fuertes uniones de membrana que refuerzan su función adherente, a diferencia de las células de tipo R. Estas son de morfología redonda, muestran una disminución del tiempo de duplicación y tienden a formar grupos acumulándose unas encima de otras, lo que hace que se pierda parte de la inhibición por contacto y tengan menos adhesividad. Estudios sugieren que las SW480-R representan una variante más maligna ya que producen tumores mucho más grandes y menos diferenciados que los formados por las SW480-ADH en el mismo periodo de tiempo. (Tomita et al., 1992)

Todas las operaciones que se describen a continuación se realizan en condiciones estériles, en la cabina de seguridad microbiológica de Clase II Bio II Advance Plus (Telstar), empleando materiales y productos estériles, y con ambas variantes de la línea celular, a no ser que se exprese lo contrario.

6. Materiales para el cultivo celular

Las células de adenocarcinoma colorrectal SW480 (ATCC) crecen en un medio basal compuesto por Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con alto contenido de glucosa, suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino (FBS, Invitrogen) y 1% antibióticos (P/S) (1 mL de una mezcla de 10.000 unidades mL^{-1} de penicilina y 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomina por 100 mL de medio, Thermofisher) en atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO_2 en una incubadora de CO_2 de alta capacidad Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S. Las células se subcultivaron antes de llegar a la confluencia (aproximadamente cada 2 días).

Para la siembra y el cultivo celular se requieren diferentes reactivos, medios de cultivo, y otros complementos empleados en el proceso. Se emplean solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (DPBS) (Sigma-Aldrich), Tripsina-EDTA (Gibco), etanol 98 % (Scharlab), placas de cultivo de 24 pocillos (p24) y de 96 pocillos (p96) (VWR), y frascos de cultivo de 25 cm^2 y 75 cm^2 (T25 y T75), para cultivar las células SW480. Se emplean cubreobjetos de vidrio limpio como sustratos 2D, además de unas plataformas materiales con modificaciones superficiales que llevan ancladas pequeñas cadenas poliméricas de tetraetilenglicol (TEG) y TEG con moléculas de boro unido covalentemente (en adelante 'TEG-B'). Después de esterilizar los materiales con radiación ultravioleta (UV) durante 30 min, los sustratos 2D son funcionalizados con fibronectina de plasma humano (Sigma-Aldrich) en tampón de DPBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

7. Técnicas generales de cultivo celular

7.1. Cultivo celular y subcultivos

Para realizar los subcultivos, primero se lavan las células con DPBS sin calcio ni magnesio (DPBS^{-/-}), debilitando las uniones celulares para posteriormente suspenderlas desde la superficie de crecimiento al medio de cultivo mediante tripsina. El cultivo se mantiene a 37°C durante cinco minutos, hasta añadir medio de cultivo completo con el fin de inactivar la tripsina, evitando la sobreexposición y los posibles daños que podría causar la enzima.

La suspensión que se obtiene se centrifuga a 1000 rpm durante cinco minutos en una centrifugadora Eppendorf, modelo 5804R. El sedimento se suspende con medio de cultivo, se cuenta manualmente con una cámara Neubauer y se calcula mediante las conversiones pertinentes el número de células por mililitro de nuestra disolución inicial. Bien se siembran de nuevo en nuevos frascos de cultivo para que proliferen o bien se siembran para realizar los diferentes ensayos.

7.2. Conservación de los cultivos celulares

Para la conservación del cultivo celular, las células se tripsinizan, centrifugan y resuspenden de la misma manera que al realizar un subcultivo. Esta vez, la suspensión celular se transfiere a viales estériles, criotubos, y se les añade un medio de congelación compuesto por 5% dimetilsulfóxido (DMSO) y 95% FBS. Las muestras se congelan disminuyendo la temperatura paulatinamente, de forma adecuada y gradual. Para ello se introducen los criotubos en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermofisher), el cual se mantendrá dentro de un congelador a -80°C por un mínimo de cuatro horas. En este recipiente la temperatura disminuye con una velocidad de refrigeración próxima a -1°C/min. Tras el tiempo pertinente, se trasladan a un recipiente de almacenamiento criogénico con nitrógeno líquido a aproximadamente -200°C.

El proceso de descongelación se realiza sumergiendo parcialmente los criotubos en un baño termostatzado a 37°C durante el tiempo necesario para posteriormente resuspenderse en medio de cultivo basal.

8. Estudio de caracterización celular

8.1. Ensayo de viabilidad celular *in vitro*

Para evaluar la citocompatibilidad del bórax con las células SW480 y para establecer el rango de concentraciones máximo con las que poder trabajar con esta línea en particular, se opta por el ensayo MTS.

El ensayo de proliferación celular MTS (bioNOVA) es un método colorímetro que permite determinar, según la actividad metabólica del cultivo o tejido, el número de células viables. Para ello se utiliza sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] como sustrato de reacción. La sal es reducida por las células viables y

expresada como un compuesto coloreado, soluble en el medio de cultivo, llamado formazán. (Berridge et al., 2005).

Empleando una densidad de siembra de 20.000 células/cm², se siembran las células en una placa p-24 y se mide la actividad metabólica después de 48 h y 6 d de incubación con diferentes cantidades de bórax en el medio (1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM y 6 mM), según se especifica en la Tabla 2, junto a DMEM suplementado con 1% P/S y 20% FBS. En los cultivos a 6 d se realiza un cambio de medio de cultivo suplementado con las concentraciones de boro correspondientes a las 48 h de la siembra. A partir del protocolo del fabricante se prepara la disolución MTS empleando una proporción 1:10, con tritón se destruyen las células que servirán de control positivo de citotoxicidad y tras 3 h de incubación a 37°C, y 5% de CO₂, se toman 3 réplicas técnicas de 100 ul cada una de cada réplica biológica en una placa de p-96 para medir la absorbancia a 490 nm en un espectofotómetro para microplacas (Victor Multilabel Plate Reader).

Para calcular las cantidades de bórax que se añaden en cada pocillo, teniendo en cuenta el peso molecular del compuesto, en este caso 381,37 g/mol, y la concentración de este, 90 µg/µL, se retira en un eppendorf 0,9 g de bórax y se le añade 1 mL de agua miliQ estéril. Calculando los volúmenes para las diferentes concentraciones se obtiene la cantidad de B equivalente para los 500 µL de medio de cultivo a añadir en cada cm².

Tabla 2. Concentraciones de bórax utilizados para MTS

Concentración de bórax	Cantidad en 500µL de medio de cultivo
1 mM	2,12 µL
2 mM	4,24 µL
3 mM	6,26 µL
4 mM	8,48 µL
5 mM	10,6 µL
6 mM	12,72 µL

Todas las medidas se realizan una vez por variante, SW480-ADH y SW480-R. El ensayo MTS también se realiza siguiendo el mismo procedimiento para probar la citotoxicidad del bórax de los mismos cultivos en presencia de recubrimiento de FN.

8.2. Cultivo sobre plataformas materiales

Con el fin de estudiar la influencia de la activación permanente del NaBC1, se han utilizado plataformas biomateriales 2D funcionalizadas, TEG y TEG-B. se realizan varias siembras en los distintos materiales, GLASS (vidrio sin tratar), TEG (cadenas de polímero) y TEG-B (boro anclado en las cadenas de polímero TEG), para posteriormente fijarlas y analizarlas, tanto en ensayos de inmunofluorescencia como colocalización. Se realizan la siembra con una densidad de 5.000 células/cm² con recubrimiento de FN 20 µg/mL incubado una hora a condiciones de ambiente.

Para preservar la estructura biológica de las células y la interacción entre ellas y el biomaterial de soporte, se fijan las células con formaldehído previo a los ensayos de inmunofluorescencia. Tras un periodo de treinta minutos de incubación, se retira, se añade DPBS con calcio y magnesio (DPBS^{+/+}) y se mantienen a 4 °C hasta su uso.

Por otro lado, se analiza el área y la longitud de los núcleos de las células sembradas en cada material mediante la tinción de los núcleos con Vectashield + DAPI y examinando las muestras al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) a una amplificación de cuarenta aumentos. Se capturan imágenes con una cámara digital acoplada al microscopio a los grupos de células para cada condición. Se analiza la relación de aspecto entre los núcleos de cada material, siendo esta la división del eje mayor entre el eje menor de cada núcleo. Para cuantificar los datos se utiliza el programa ImageJ, facilitando el promedio de la relación de aspecto de cada núcleo en cada material. Se realiza el post-procesado de aproximadamente un total de 500 núcleos por cada familia, se representa de forma gráfica y se estudia mediante el análisis estadístico de ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

8.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Se realizan diferentes ensayos de inmunofluorescencia (IF), técnica de inmunomarcaje que permite la detección y localización de una amplia variedad de antígenos en diferentes tipos de tejidos y cultivos celulares, a través de combinaciones de anticuerpos específicos unidos a fluoróforos. Según el resultado que se desee obtener, se pueden utilizar diferentes métodos. El método que se utiliza en el estudio del presente trabajo implica un proceso de incubación de dos pasos donde en primer lugar, un anticuerpo primario se une al epítipo, para que posteriormente un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo reconozca y se una de manera específica al anticuerpo primario. (Figura 8) Para evitar que el anticuerpo secundario reaccione de forma cruzada en la muestra, el anticuerpo primario debe derivarse de una especie diferente a la de la muestra. En consecuencia, el anticuerpo secundario debe ser contra la especie huésped del anticuerpo primario.

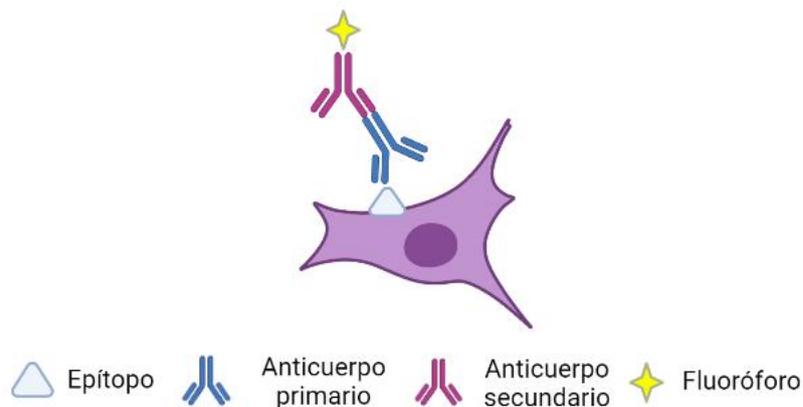


Figura 8. Ilustración esquemática del proceso de inmunofluorescencia. Un anticuerpo primario se une al epítipo diana que es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con fluoróforo. Imagen de creación propia.

En el presente TFG, se busca analizar la expresión de las diferentes proteínas transmembrana en los sustratos vidrio, TEG, TEG-B. Para ello se realizan dos inmunofluorescencias, una doble de e-cadherina y n-cadherina, y una simple de NaBC1, con las muestras fijadas anteriormente de ambas variantes de la línea celular SW480, funcionalizados a seis días con recubrimiento de FN.

El ensayo se divide en cuatro etapas, permeabilización, bloqueo, incubación y montaje. Para ello, en un primer instante se preparan los buffers que usaremos en el ensayo, buffer de permeabilización formado por DPBS y Tritón x-100 al 0,5%, buffer de bloqueo formado por DPBS y Horse Serum al 5%, y buffer de lavado formado por DPBS y tritón x-100 al 0,1%.

En la etapa de permeabilización, se tratan las muestras con el buffer de permeabilización durante cinco minutos a temperatura ambiente. Esto implica el tratamiento con un detergente (en este caso Triton x-100 disuelto en PBS), que abrirá los poros de la membrana celular para que el bloqueo sea más eficaz. Posteriormente se realiza el bloqueo con su buffer correspondiente, a 37°C durante treinta minutos. Esta solución se une a lugares de unión que no son específicos dentro del tejido con el fin de prevenir la unión no específica de los anticuerpos primarios. Tras el bloqueo de las muestras, se deben incubar los anticuerpos a utilizar (Tabla 3) Se realiza una solución de anticuerpo y buffer de bloqueo con las cantidades pertinentes según la dilución del anticuerpo. En el caso de inmunofluorescencia doble de E-cadherina y N-cadherina, primero se deja actuar uno de los anticuerpos primarios durante dos horas y se realiza el mismo procedimiento con el segundo anticuerpo primario tras este periodo de tiempo. En el caso de ser simple como la del transportador del boro, solo se realiza el primer paso.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en IF.

Abreviatura	Anticuerpo	Huésped	Casa comercial	Dilución
E-CAD	E-cadherina	Conejo	Abcam	1:500
N-CAD	N-cadherina	Ratón	Abcam	1:200
NaBC1	NaBC1	Conejo	Abcam	1:200

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en IF.

Abreviatura	Anticuerpo	Huésped	Casa comercial	Dilución
α -Rb Alexa 488	Anti-Rabbit Alexa 488	Cabra	Invitrogen	1:700
α -Mouse Alexa 555	Anti-Mouse Alexa 555	Cabra	Invitrogen	1:700

Tras el periodo de incubación, se lavan las muestras varias veces con el tampón de lavado a temperatura ambiente durante cinco minutos y se realizan los mismos pasos que con los anticuerpos primarios, esta vez con los secundarios (Tabla 4) durante una hora. Serán α -Rb Alexa 488 y α -Mouse Alexa 555 para la inmunofluorescencia de E-cadherina y N-cadherina y α -Rb Alexa 488 para NaBC1. Se deja incubar cada anticuerpo una hora a 37°C. Tras este tiempo, se lavan las muestras con el buffer de lavado durante cinco minutos a temperatura ambiente y se montan las muestras para poder ser observadas. Para ello se montan en portaobjetos, se vierte en forma de gota la tinción nuclear Vectashield + DAPI y se tapa con un cubreobjetos.

Para el análisis de las diferentes preparaciones se examinan al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i) a una amplificación de cuarenta aumentos. Se capturan imágenes con una cámara digital acoplada al microscopio a los grupos de células para cada condición y se procesan mediante el programa ImageJ. Para ello se realiza el post-procesado de aproximadamente 300 células por cada material, analizando la intensidad de fluorescencia y se estudia mediante el análisis estadístico de ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

8.4. Ensayo de colocalización

Se realiza el ensayo de ligamiento por proximidad DUOLINK. Esta herramienta de detección in situ de proteínas endógenas, modificaciones de proteínas e interacciones proteicas, se utiliza frecuentemente para detectar dianas proteicas con resolución de una sola molécula en células y tejidos no modificados. Para ello se utiliza, en un primer instante, dos anticuerpos primarios producidos en diferentes especies para detectar dos dianas proteicas únicas. En segundo lugar, se utiliza un par de anticuerpos secundarios marcados con oligonucleótidos, sondas de *Proximity Ligation Assays* por sus siglas en inglés PLA, que se unen a los anticuerpos primarios (A). De esta forma, los oligonucleótidos conectores de hibridación se unen a las sondas de PLA si están lo suficientemente cerca entre sí. Si se da esta condición, la ligasa forma una plantilla de ADN de círculo cerrado que se requiere para la amplificación del círculo rodante (RCA) (B). La sonda PLA actúa como cebador para una ADN polimerasa que genera una molécula de ADN con múltiples copias de la misma secuencia de nucleótidos durante la RCA. Todo ello permite una señal amplificada atada a la sonda PLA, lo que permite su localización. En un último instante, los oligonucleótidos marcados se hibridan con las secuencias complementarias, pudiendo ser localizadas como puntos discretos (señales PLA) mediante el análisis de imágenes de microscopía. (C) (Sigma-Aldrich)

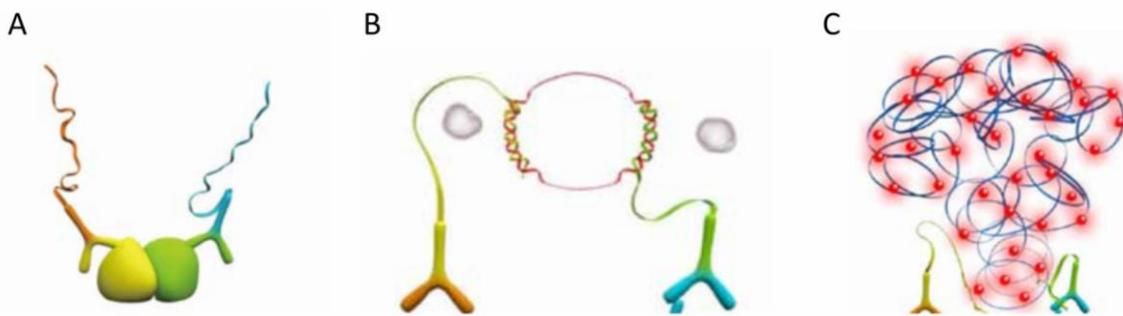


Figura 9. Esquema del ensayo de ligamiento por proximidad. (A) Sondas PLA creadas mediante la conjugación de oligonucleótidos PLA y anticuerpos monoclonales para las proteínas en cuestión. (B) Los oligonucleótidos conectados se hibridan y crean múltiples moléculas circulares de ADN. (C) Detección marcada con fluorescencia de oligonucleótidos que se hibridan con el círculo de ADN. (Imágenes recuperadas de Duolink™ In situ User Guide)

En el presente Trabajo de Fin de Grado, se realizan dos ensayos de colocalización de transportador del boro junto a cuatro proteínas transmembrana y dos integrinas. Se efectúa el ensayo en ambas variantes de la línea celular SW480 sobre los materiales GLASS, TEG y TEG-B para determinar y explicar la sinergia entre el conjunto proteico y su relación con el cáncer. Así, se realiza el ensayo de ligamiento por proximidad con el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), receptor del activador de plasminógeno tipo uro-quinasa (uPAR) y con las integrinas α_5 y α_v .

Para ello, se sigue el procedimiento proporcionado por Sigma-Aldrich. De la misma forma que en el ensayo de inmunofluorescencia, se permeabilizan las muestras con DPBS +/+ y tritón x-100 al 0,5%. Se realiza el bloqueo con la solución de bloqueo proporcionada en el kit y se deja incubando una hora a 37°C. Para la incubación de anticuerpos primarios se realizan seis disoluciones, una para cada anticuerpo teniendo en cuenta su dilución, junto con el diluyente de

anticuerpos Duolink. Se agrega en forma de gota la solución de anticuerpo primario (Tabla 5) a cada muestra, situadas previamente en una cámara húmeda, y se deja incubar una hora a 37°C.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de colocalización.

Abreviatura	Anticuerpo	Huésped	Casa comercial	Dilución
NaBC1	NaBC1	Cabra	Abcam	1:200
VEGFR	anti-VEGFR	Conejo	Abcam	1:400
EGFR	anti-EGFR	Conejo	Abcam	1:250
FGFR	anti-FGFR	Conejo	Abcam	1:200
uPAR	anti-uPAR	Conejo	Abcam	1:400
α_5	anti- α_5	Conejo	Abcam	1:500
α_v	anti- α_v	Conejo	Abcam	1:500

Para la incubación de la sonda, se retira la solución de anticuerpos y se lava con un tampón de lavado especial incluida en el kit Duolink. Se diluyen las sondas PLUS y MINUS PLA en el diluyente de anticuerpos Duolink. De la misma manera que para el anticuerpo primario, se añade en forma de gota la solución que se incubará durante una hora a 37°C.

Para ligar ambas sondas se lava con el tampón de lavado proporcionado por el kit para posteriormente agregar una solución del tampón Duolink de ligamiento y agua de alta pureza junto con ligasa. Se deja incubar en la cámara húmeda durante treinta minutos a 37°C.

Finalmente, para la amplificación de la señal, después de lavar la muestra con el mismo tampón de lavado, se diluye en tampón de amplificación y agua de alta pureza la polimerasa. Se deja incubar durante cien minutos a 37°C.

Para poder visualizar la amplificación de la sonda, se realizan diferentes lavados con un nuevo tampón de lavado proporcionado por el kit Duolink. Tras ellos, se montan las muestras en portaobjetos utilizando un volumen mínimo de medio de montaje in situ Duolink con DAPI.

Para la cuantificación de las imágenes de fluorescencia de colocalización, se tomaron imágenes de grupos de células para cada condición bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i) a sesenta aumentos. Se capturan imágenes con una cámara digital acoplada al microscopio a grupos aislados de células para cada condición, para posteriormente cuantificar los datos mediante el programa ImageJ. Se realiza el post-procesado de aproximadamente un total de 300 células por cada muestra, se representa para que se pueda analizar a simple vista y se estudia mediante el análisis estadístico de ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, una vez llevado a cabo el ensayo de viabilidad celular (descrito en el punto 8.1), se procede a analizar el porcentaje de proliferación celular con cada concentración de bórax. En segundo lugar, tras estudiar cómo afectan morfológicamente los materiales a las células, se realizan los procesos de inmunofluorescencia y colocalización descritos en los apartados 8.5 y 8.6. Tras ello se procede a evaluar el efecto en la activación permanente del NaBC1 mediante el uso de las plataformas TEG (control) y TEG-B y la posible activación sinérgica con los receptores de factores de crecimiento seleccionados.

9. Resultados de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular MTS se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.1. Para conocer la medida de la absorbancia y por ende la actividad celular, se tratan los datos obtenidos para todas las concentraciones de bórax calculando la viabilidad celular como:

$$Viabilidad (\%) = \frac{DO\ test}{DO\ control} * 100$$

Donde *DO test* es el promedio de la densidad óptica de la muestra en cuestión y *DO control* el promedio de la densidad óptica del control negativo.

En las Figuras 10 y 12, se muestra los resultados de citotoxicidad después de 24 h y seis días de exposición a bórax soluble en el medio de cultivo, con y sin recubrimiento de fibronectina. Según la norma ISO 109935, los materiales se consideran citotóxicos cuando la viabilidad celular muestra valores inferiores al 70% respecto del control negativo (100% viabilidad). Cabe destacar que en la norma ISO 109935 se recoge las condiciones que deben cumplir los cultivos respecto a morfología según su nivel de citotoxicidad, tal y como se expresa en la Tabla 6.

Tabla 6. Tabla de clasificación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos (adaptada de la norma ISO 109935)

Grado	Reactividad	Condiciones de los cultivos
0	Nula	Gránulos intracitoplasmáticos discretos, sin lisis celular, sin reducción del crecimiento celular
1	Leve	No más del 20 % de las células son redondas, sueltas y sin gránulos intracitoplasmáticos, o muestran cambios en la morfología; células lisadas presentes; sólo se observa una ligera inhibición del crecimiento.
2	Media	No más del 50 % de las células son redondas, desprovistas de gránulos intracitoplasmático, sin lisis celular extensa; no más del 50 % de inhibición del crecimiento observable.
3	Moderada	No más del 70 % de las capas celulares contienen células redondeadas o están lisadas; la capa celular no está

		completamente destruida, pero hay más del 50 % de inhibición del crecimiento observable.
4	Severa	Destrucción casi completa o completa de las capas celulares.

En primer lugar, respecto a la variante adherente SW480-ADH, se aprecia un cambio significativo en la morfología celular y en su actividad metabólica, representados en la Figura 10. Cabe destacar cómo una segunda adición de medio con bórax en los ensayos a 6 d supone un factor determinante en la viabilidad celular de las células SW480 adherentes.

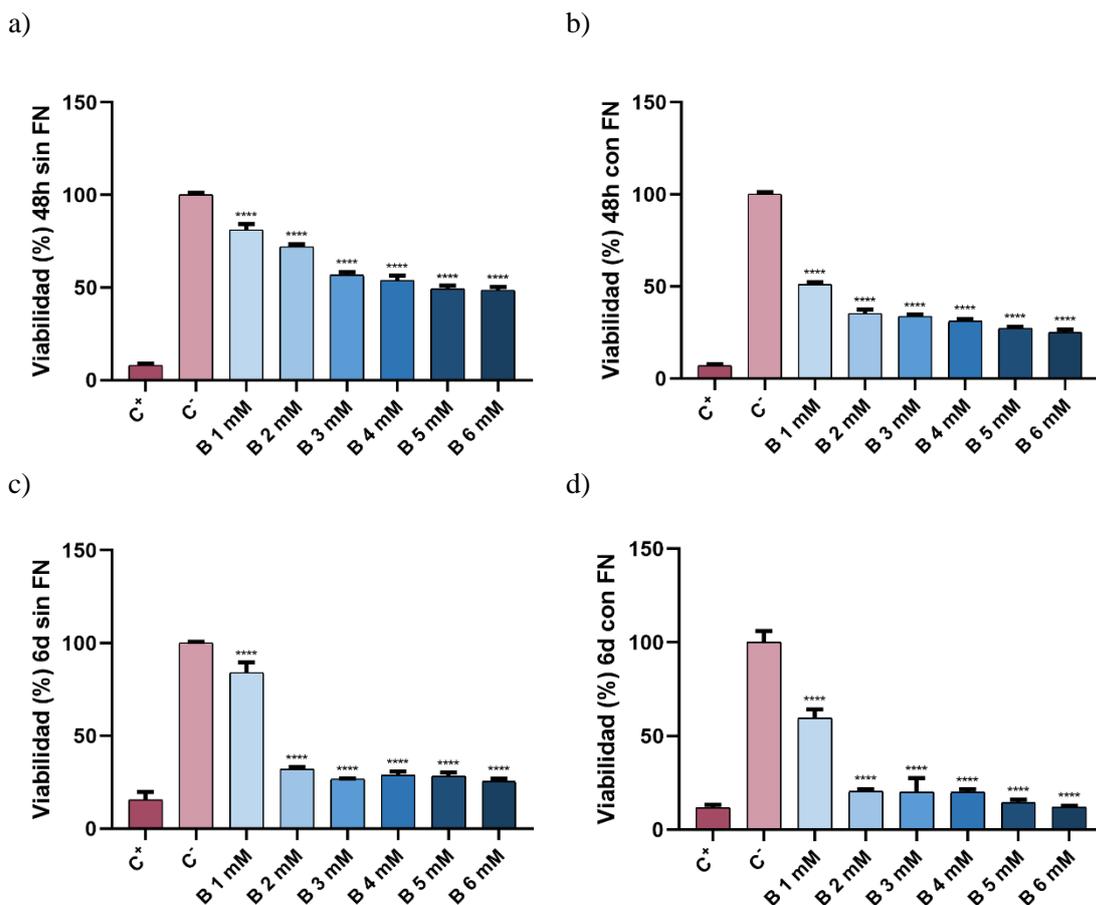


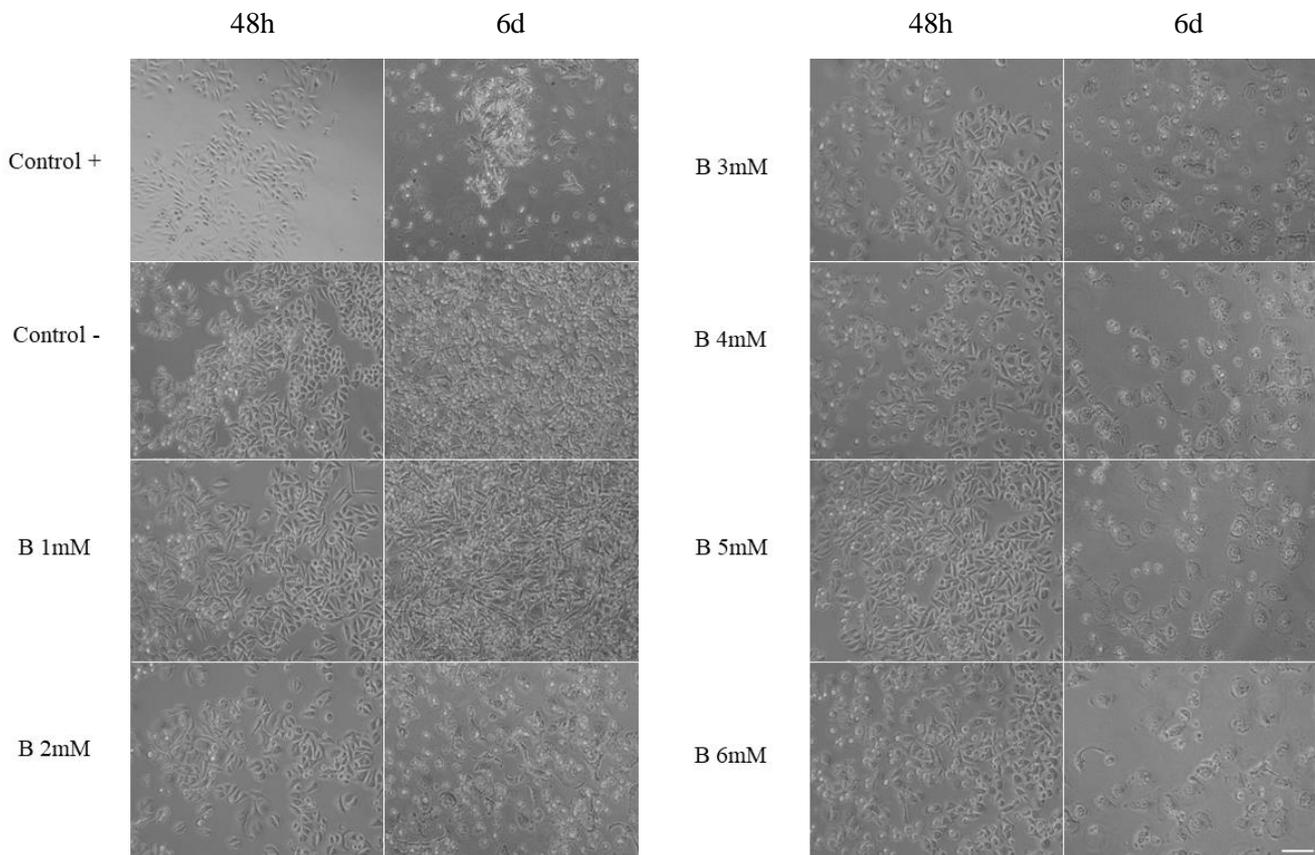
Figura 10. Efecto del boro en la proliferación celular de SW480-ADH. Se representa el efecto del boro a concentraciones de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4mM, 5mM, 6mM según la Tabla 2.

Control positivo (muerte): extracto de látex, control negativo (vida): medio basal de crecimiento. a) Viabilidad celular del cultivo a 48h sin FN. b) Viabilidad celular del cultivo a 48h con FN. c) Viabilidad celular del cultivo a 6d sin FN. d) Viabilidad celular del cultivo a 6d con FN. Las estadísticas se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Comparando los resultados de actividad metabólica obtenidos para cada concentración con el control vida (100% de viabilidad celular), todos ellos obtienen un resultado significativo en la prueba ANOVA. Si se comparan los resultados de los ensayos sin FN (Fig.10-a y 10-c) y con FN (Fig.10-b y 10-d), se observa cómo en su ausencia los niveles de viabilidad son más altos, mientras que con recubrimiento de FN la actividad metabólica disminuye notablemente. Según la norma ISO 109935, el bórax tiene una reactividad media en el ensayo a), moderada en los ensayos b) y c), y severa en el ensayo d).

Los cambios en la morfología celular se corroboran atendiendo a las condiciones que marca la norma ISO (Tabla 6). Si se analiza la Figura 11, puede apreciarse en el apartado a) como en un periodo de 48 horas se observan tanto células morfológicamente redondas como adheridas, desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos y sin lisis celular muy extensa. Sin embargo, a seis días es apreciable como, conforme aumenta la concentración, la capa celular se ve afectada, con más del 50 % de inhibición del crecimiento observable.

a)



b)

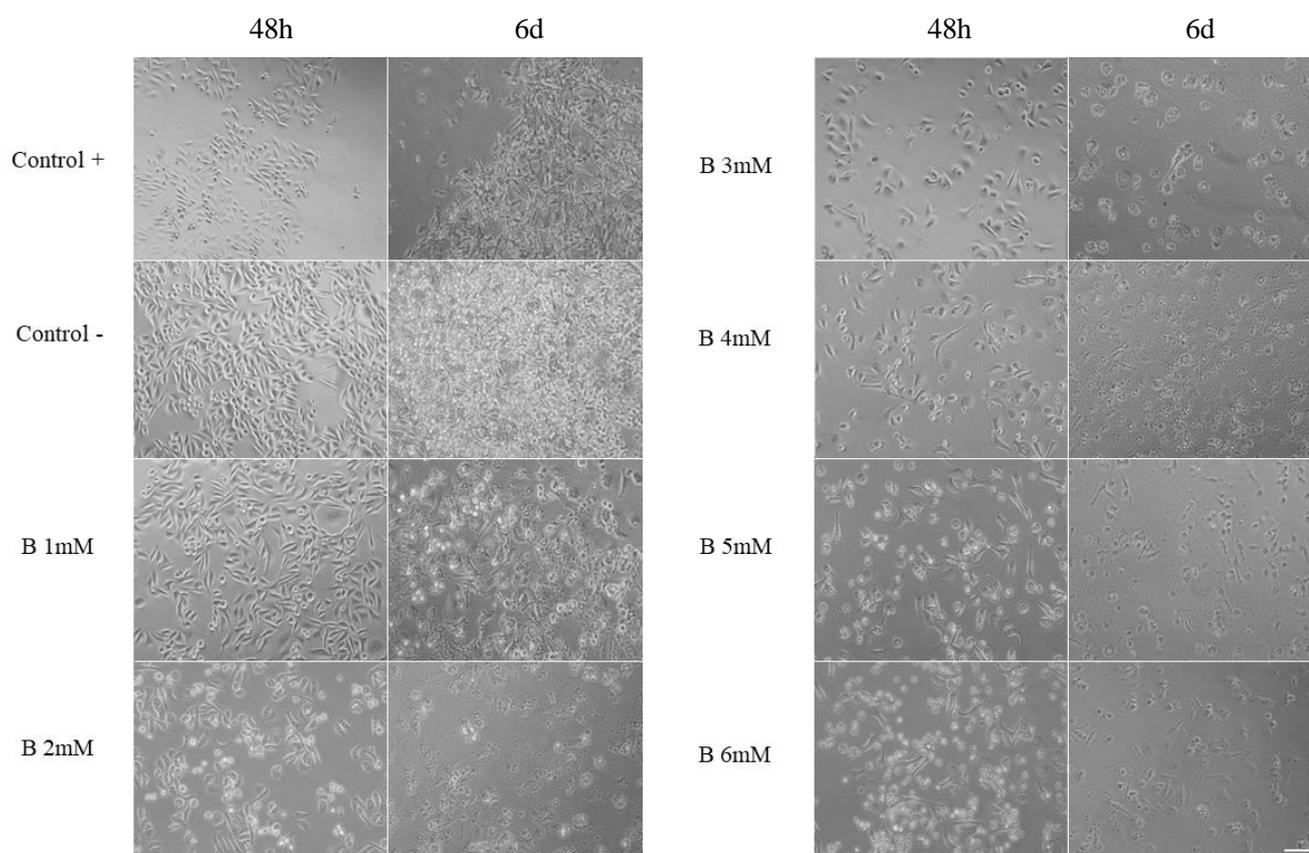


Figura 11. Resultados morfológicos del efecto del boro a distintas concentraciones en SW480-ADH. Fotos tomadas en microscopio óptico a 48h y 6d de las distintas concentraciones de bórax en el medio utilizadas en el ensayo de MTS. a) Comparación cultivo SW480-ADH a 48h y 6d sin FN. b) Comparación cultivo SW480-ADH a 48h y 6d con FN.

Barra de escala: 100 μ m

Respecto a los ensayos realizados con recubrimiento de FN representados en la Figura 11-b, se observa como a 48 h existe muerte celular y una inhibición del crecimiento notable, destacable por la cantidad de células redondas que flotan en el medio. A seis días, existe una destrucción casi completa de la capa celular provocado por la reactividad severa del bórax. Esto es debido al tiempo que permanecen las células en contacto con el compuesto que reduce su actividad metabólica, el bórax, cuya dosis se ha ido manteniendo estable a lo largo del tiempo y no se ha consumido gracias a los cambios de medio.

Puede concluirse como, para la variante adherente de la línea celular SW480, el uso de bórax junto a la presencia de FN hace que disminuya su actividad metabólica. Además, una segunda adición de medio de cultivo suplementado con las concentraciones de bórax pertinentes resulta factor determinante en la disminución de la proliferación celular.

Analizando los resultados de actividad metabólica para cada concentración de la variante SW480-R (Figura 12) y comparados con el control vida (100% de viabilidad celular), se obtiene un resultado significativo en la prueba ANOVA. Además, se aprecia cómo un cambio de medio de cultivo suplementado con boro adicional en los ensayos a 6 d genera una diferencia significativa al disminuir la actividad metabólica celular.

En este caso, según la norma ISO 109935, el bórax tiene una reactividad leve/media en los ensayos a) y b), y media moderada en los ensayos c) y d).

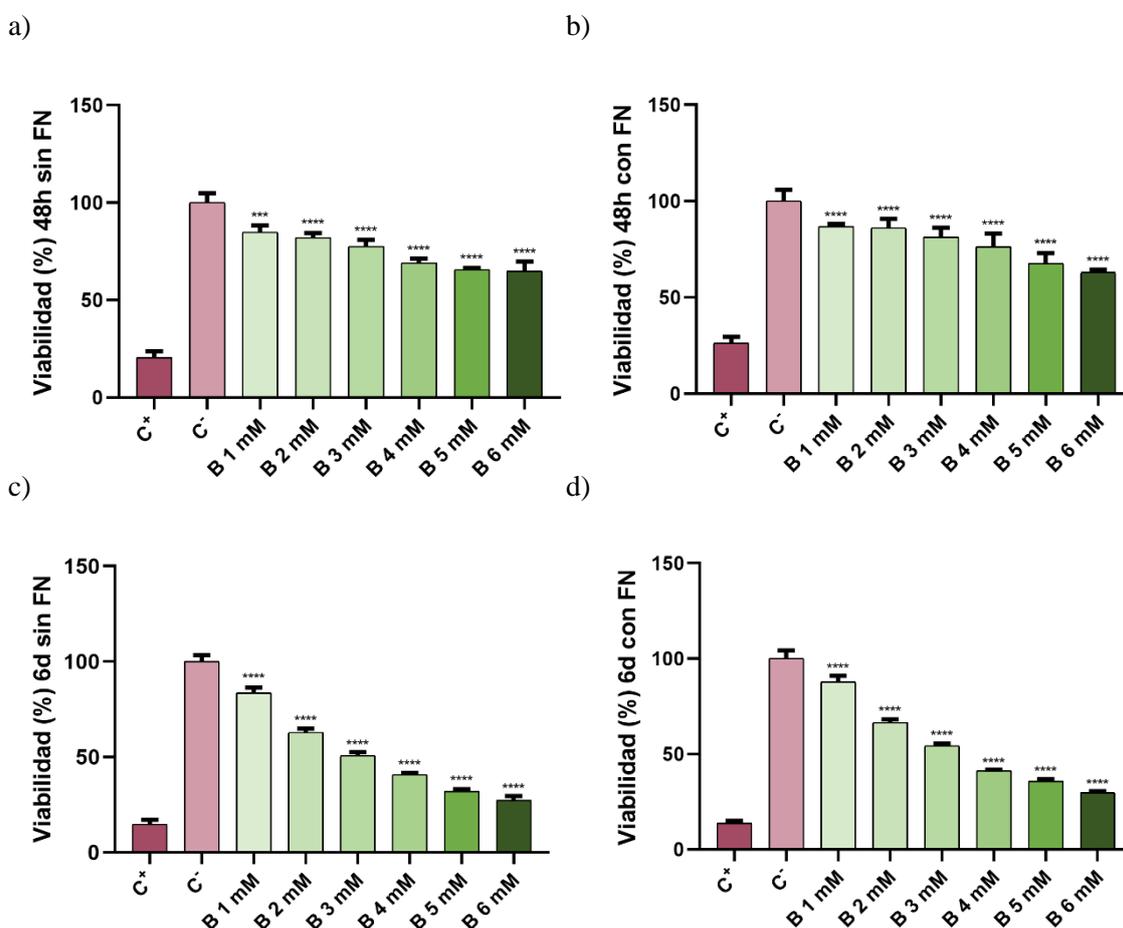
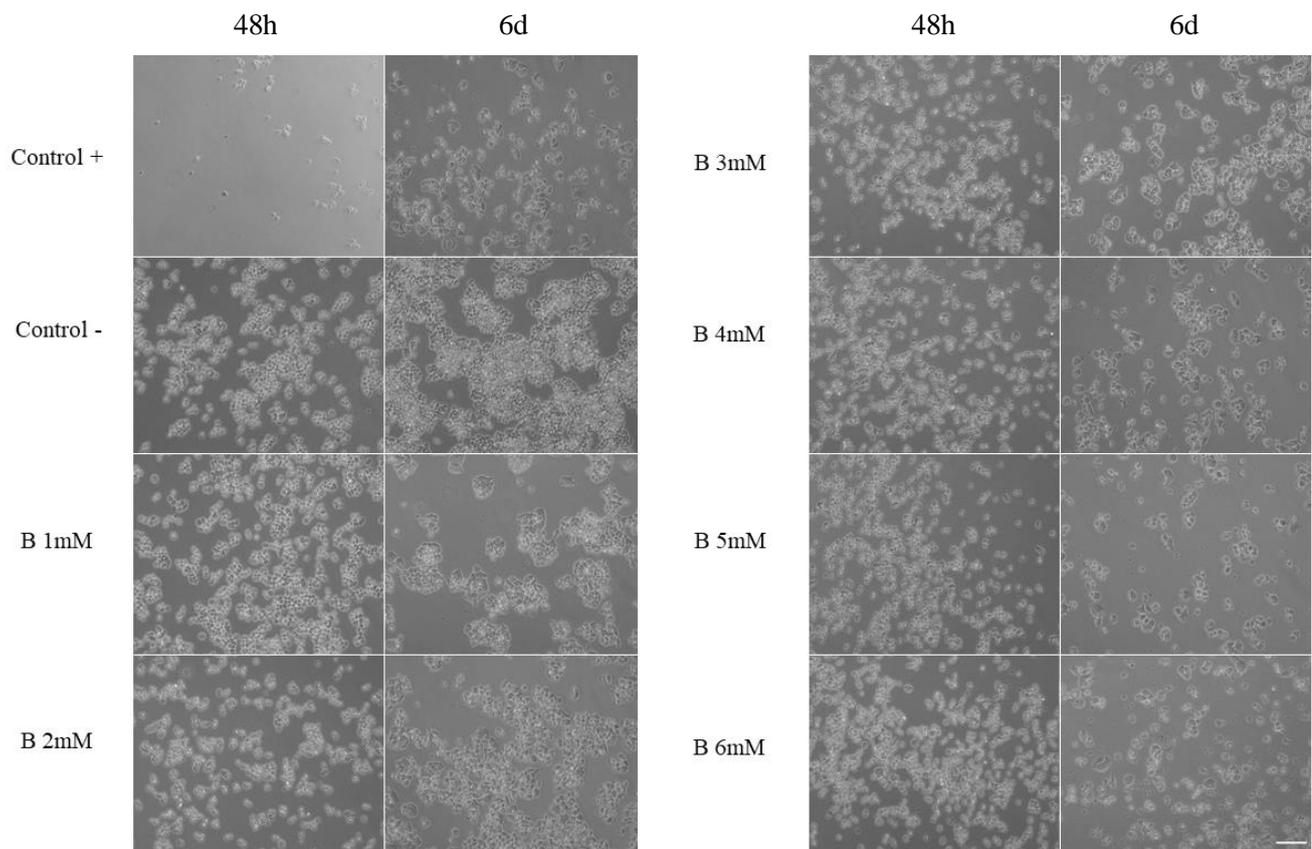


Figura 12. Efecto del boro en la proliferación celular de SW480-R. Se representa el efecto del boro a concentraciones de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4mM, 5mM, 6mM según la Tabla 2.

Control positivo (muerte): extracto de látex, control negativo (vida): medio basal de crecimiento. a) Viabilidad celular del cultivo a 48h sin FN. b) Viabilidad celular del cultivo a 48h con FN. c) Viabilidad celular del cultivo a 6d sin FN. d) Viabilidad celular del cultivo a 6d con FN. Las estadísticas se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$.

Analizando la Figura 13, puede apreciarse como a 48h en ambos casos las células se observan formando grupos pequeños, sin gránulos intracitoplasmáticos y sin células lisadas. A seis días en cambio, se observa mayor cantidad de células redondas sueltas, sin lisis celular extensa con mayor inhibición del crecimiento según aumenta la concentración de bórax. Cabe destacar como en los ensayos realizados con recubrimiento de FN representados en la Figura 13-b, se observa un cambio de conformación, donde las células que antes apenas se adherían ahora forman grupos grandes que adoptan una morfología más adherente.

a)



b)

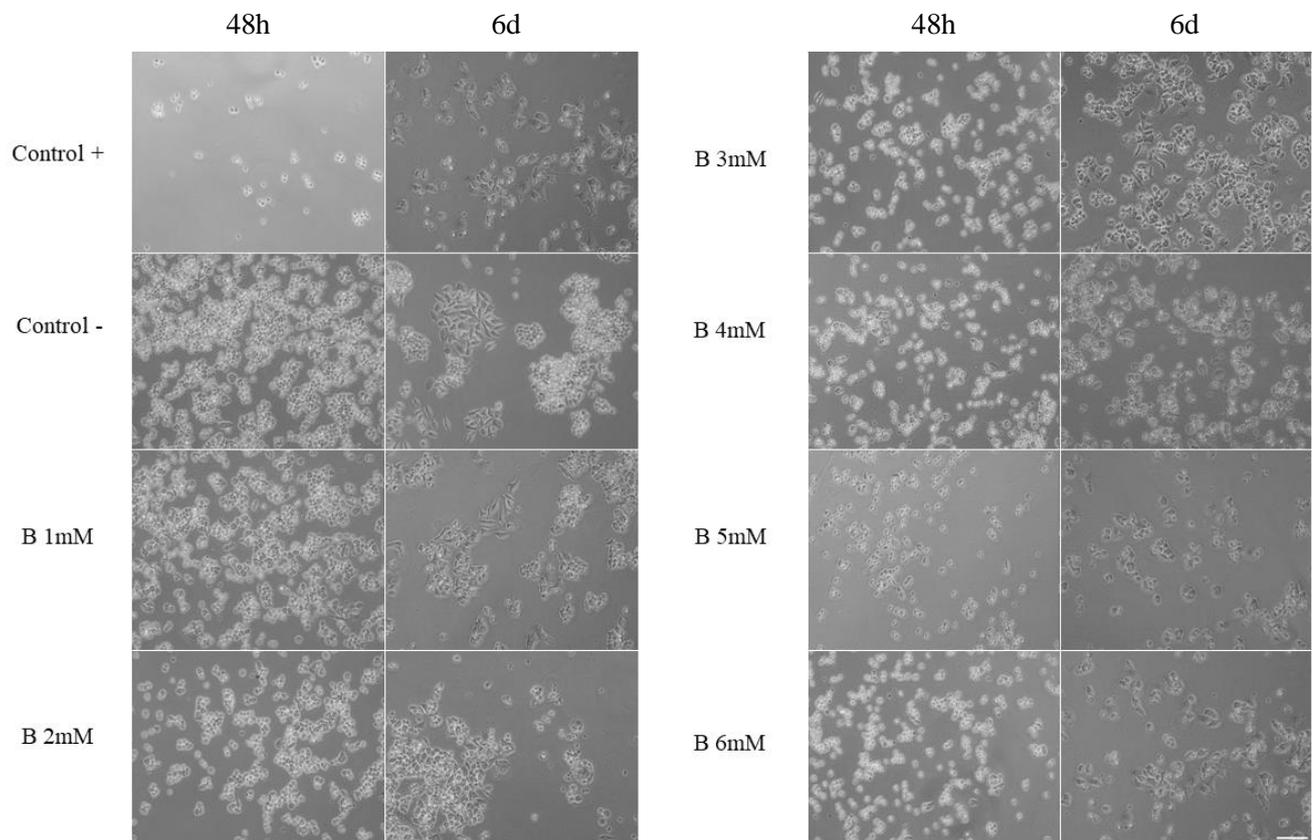


Figura 13. Resultados morfológicos del efecto del boro a distintas concentraciones en SW480-R. Fotos tomadas en microscopio óptico a 48h y 6d con y sin recubrimiento de FN de las distintas concentraciones utilizadas en el ensayo de MTS. a) Comparación cultivo SW480-R a 48h y 6d sin FN. b) Comparación cultivo SW480-R a 48h y 6d con FN. Barra de escala: 100 μ m.

Puede concluirse como, para la variante SW480-R, el uso de bórax junto a la presencia de FN no hace que disminuya su actividad metabólica. Sin embargo, una segunda adición de medio de cultivo suplementado con las concentraciones de bórax pertinentes resulta factor determinante en la disminución de la proliferación celular.

10. Efecto de las plataformas sobre el comportamiento *in vitro* de las células SW480

Se pretende estudiar el efecto de las plataformas sobre el comportamiento de las células SW480. Para ello, siguiendo el protocolo del apartado 8.2, se fijan cultivos sobre los materiales (vidrio, TEG y TEG-B) para posteriormente realizar ensayos de inmunofluorescencia y colocalización.

En primer lugar, se analiza morfológicamente la conducta que desarrollan ambas variantes según el material donde se ha sembrado. Se aprecia a simple vista en la Fig.14 a) como en la siembra en vidrio las células se encuentran apelotonadas y sueltas, no forman grupos marcados. En presencia de las plataformas TEG, las células comienzan a formar grupos más marcados y aquellos grupos formados por la variante metastásica de la línea celular comienzan a adherirse. Es con las plataformas TEG-B donde se aprecia un cambio mayor. Las células SW480-ADH se hacen algo más grandes, tienen un comportamiento similar al que tienen con las plataformas TEG ya que tienden a formar grupos. Sin embargo, la variante SW480-R destaca por un cambio de morfología. Las células que en un principio son redondas y pequeñas, comienzan a alargarse y adherirse.

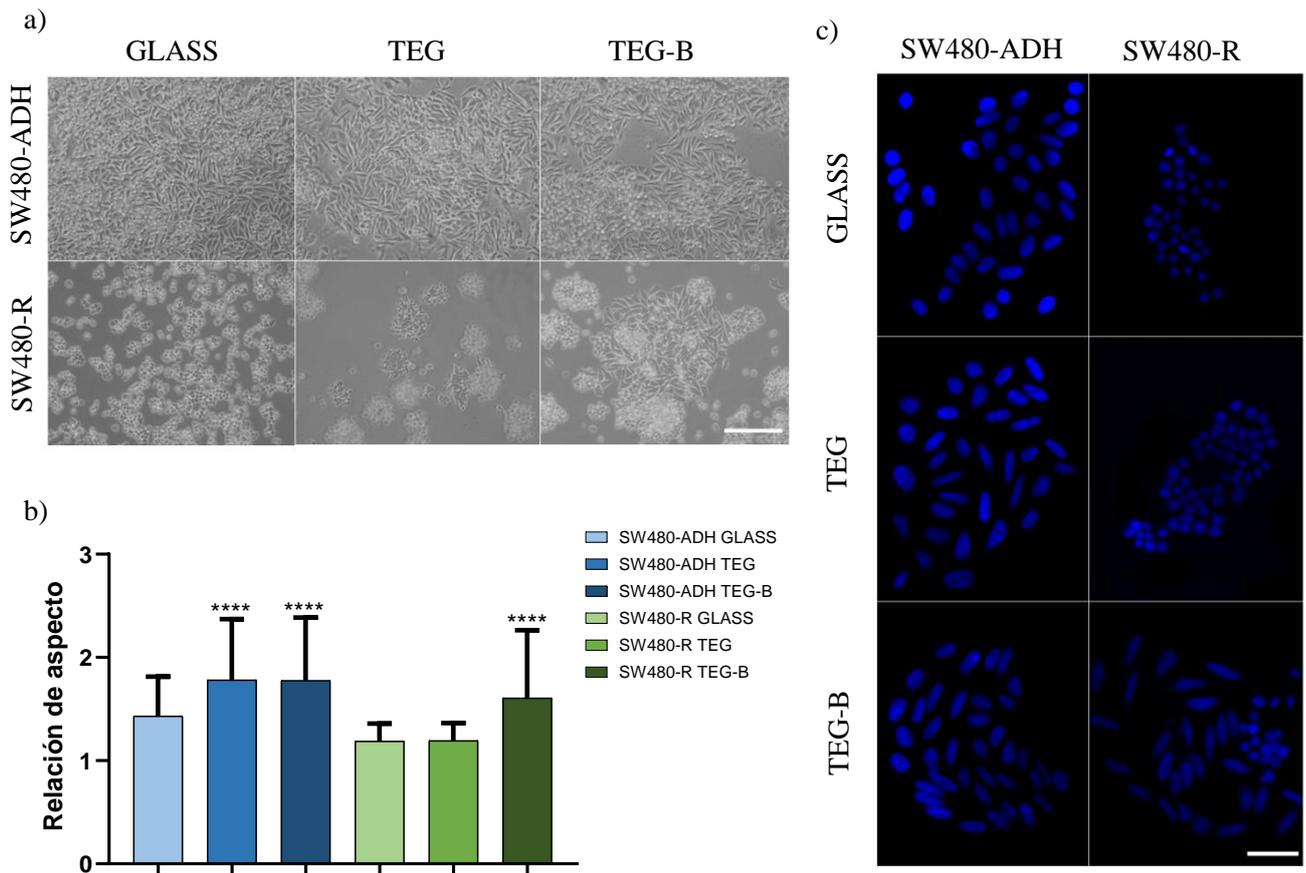


Figura 14. Adhesión de SW480-ADH y SW480-R en sustratos recubiertos con FN. a) Imágenes de microscopía óptica en los diferentes materiales, GLASS (control), TEG y TEG-B. Barra de escala: 100 μm . b) Representación gráfica del efecto de NaBC1 activo en la relación de aspecto nuclear de SW480 en cada sustrato. Los datos representados en los gráficos corresponden a imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia con $n \geq 300$. Las estadísticas se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$. c) Imágenes de microscopía de fluorescencia de los núcleos (azul) de cada sustrato, teñidos con Vectashield + DAPI. Barra de escala: 50 μm .

Con el objetivo de probar si las células SW480 responden bajo la estimulación de NaBC1 aumentando la tensión intracelular y contractilidad, de la misma manera que en los estudios de Rico et al., 2020, se estudia el posible cambio de forma de los núcleos celulares. Para ello se representa la relación de aspecto entre los núcleos de cada material (división del eje mayor entre el eje menor de cada núcleo), relacionado con la adhesión celular y la tensión intracelular. En la Figura 14-c se puede observar cómo los núcleos de TEG-B de la variante metastásica se aproximan a los de la variante adherente, lo que evidencia un cambio morfológico hacia una forma menos metastásica al manifestar complejos de uniones que hacen que las células se agrupen formando conjuntos sólidos adheridos. Todo ello se corrobora representando el promedio de la relación de aspecto de cada grupo. En la Figura 14-b se aprecia, como se ha mencionado anteriormente, que la relación de aspecto nuclear en SW480-R se asemeja bastante a la presente en SW480-ADH con TEG y TEG-B.

Tras el análisis de los datos podría concluirse que en células ADH, ambos materiales tienen morfológicamente un resultado similar, mayor si es comparado con el cultivo en el material control. Sin embargo, es necesario destacar como en la variante más metastásica, el material TEG favorece las uniones intercelulares, causando agrupamientos celulares. Los resultados sugieren que la activación de NaBC1 en presencia de las plataformas TEG-B induce tensión intracelular y estrés nuclear, lo que altera morfología nuclear de las células sembradas sobre TEG-B aumentando el tamaño de sus núcleos y por ende su superficie celular, y revirtiendo el fenotipo mesenquimal de las células hacia uno epitelial.

10. 1. Inmunofluorescencia doble E-cadherina/N-cadherina

La diferencia de morfología en ambas variantes de la línea celular SW480, así como su malignidad, hace que surja la necesidad de estudiar la expresión de las moléculas de adhesión E-cadherina y N-cadherina, involucradas en el mecanismo de la transición epitelio-mesenquimal.

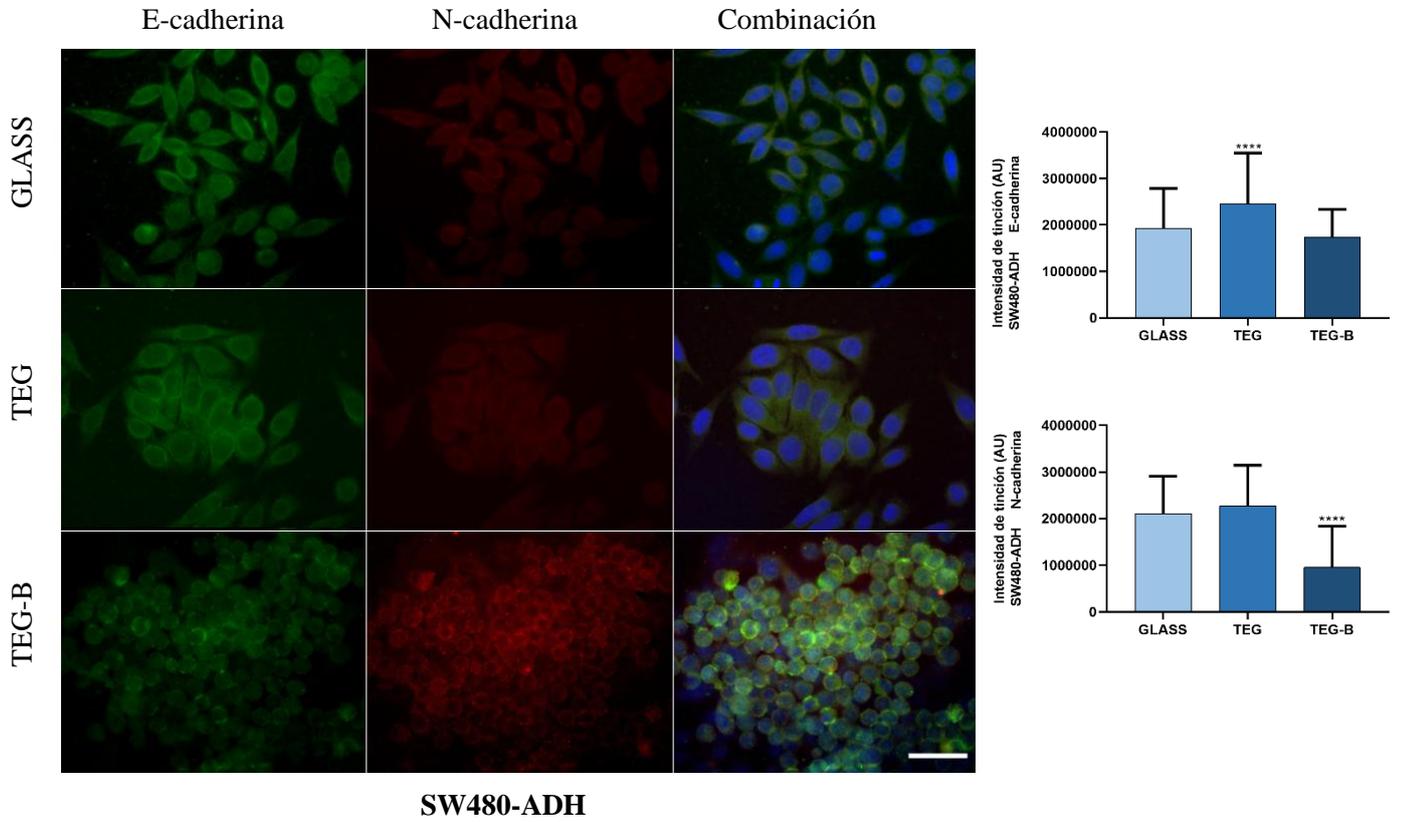
Como se ha descrito anteriormente en el presente TFG, tanto la E-cadherina como la N-cadherina son moléculas de adhesión que forman parte de las uniones adherentes entre células. La E-cadherina predomina en células epiteliales, mientras que la N-cadherina se encuentra inicialmente en tejido neural y fibroblastos. En la transición epitelio-mesenquimal, la E-cadherina que forja las uniones intercelulares, se ve sustituida en gran medida por N-cadherina, mediando una adhesión celular más dinámica y menos estable. Por ello, surge la necesidad de estudiar su expresión sobre las células cultivadas en los diferentes materiales.

En el apartado 10, se evidencia un cambio notable en la morfología de las células SW480-R en presencia de las plataformas TEG y TEG-B. Esto se debe a que pasan de ser células redondas sin apenas complejos de unión (al ser metastásicas) a formar grupos grandes que demuestran la presencia de complejos de unión similares a los que ofrecen la variante más adherente.

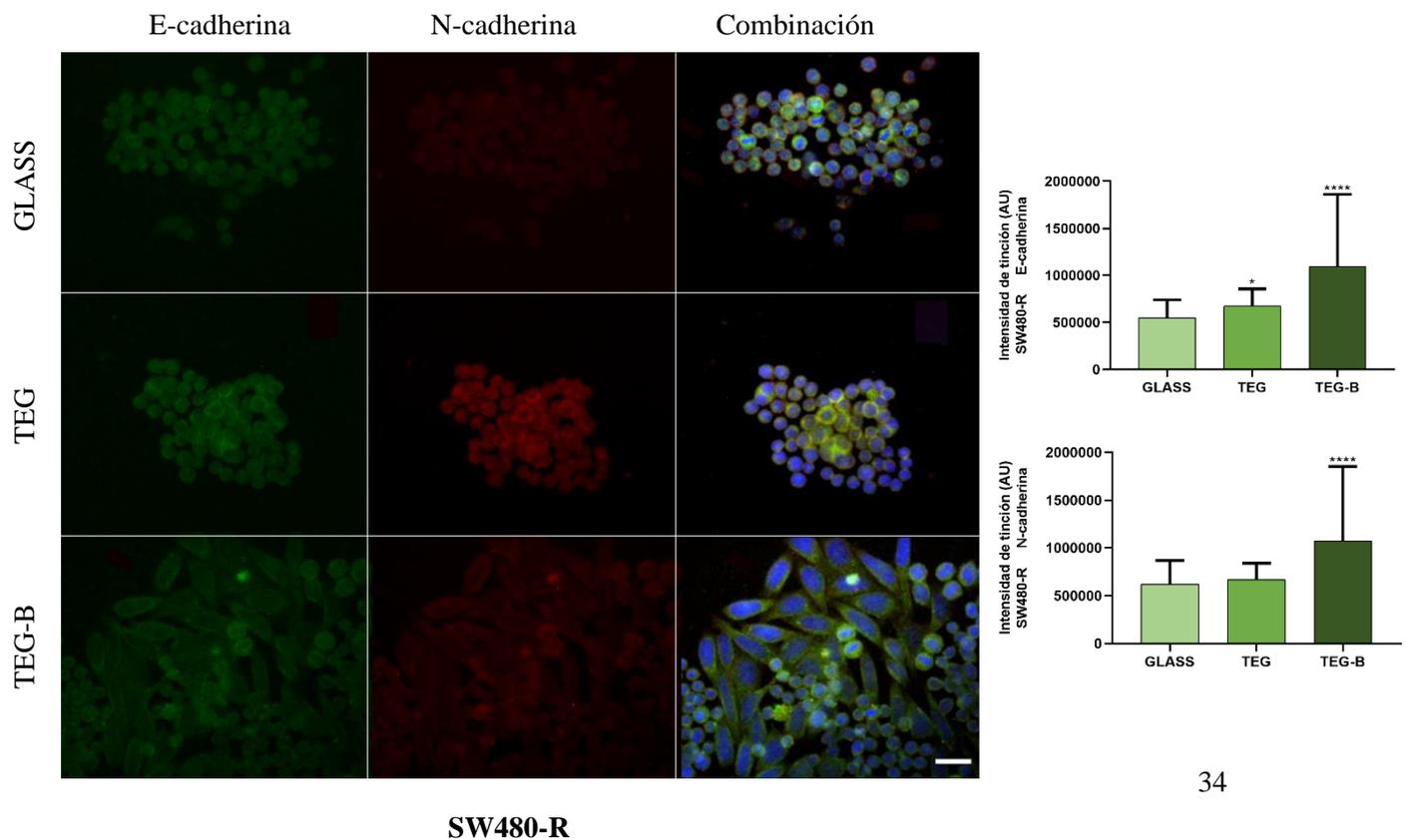
Todo ello puede corroborarse mediante el estudio estadístico de la cuantificación de la expresión de esta molécula en los diferentes sustratos (Figura 15).

1)

a)



b)



2)

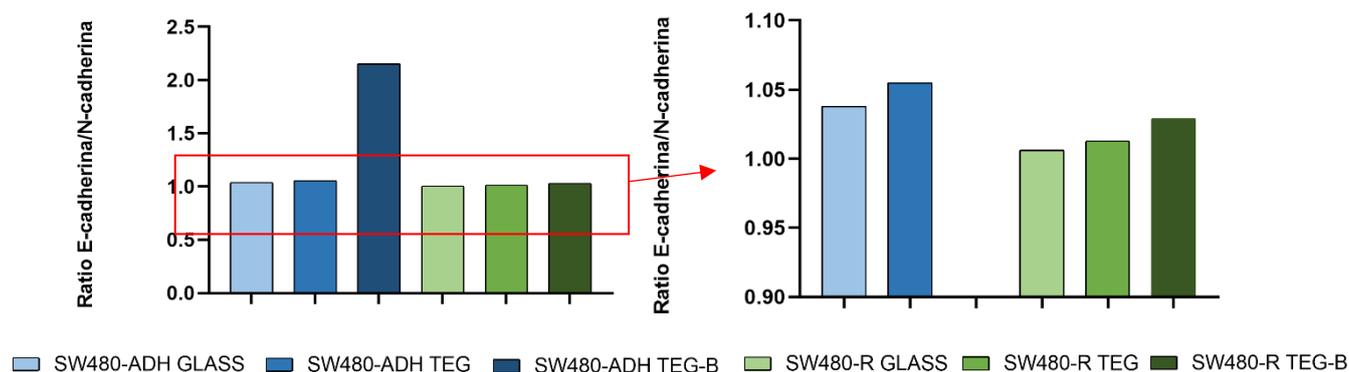


Figura 15. Influencia de la activación permanente del NaBC1 con las plataformas 2D en la expresión de E-cadherina y N-cadherina. 1) Imágenes de inmunofluorescencia de E-cadherina (verde), núcleos (azul) y N-cadherina (rojo), como marcadores de adhesión intercelular involucrados en la EMT. Las SW480 se cultivaron durante seis días y fueron sembradas en los sustratos GLASS (vidrio control), TEG y TEG-B, funcionalizados con FN. Barra de escala: 50 μ m. a) Corresponde a la variante SW480-ADH. b) Corresponde a la variante SW480-R. 2) Representación gráfica de la expresión de cada proteína en cada sustrato. Los datos representados en los gráficos corresponden a imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia con $n \geq 100$. Las estadísticas se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En primer lugar y respecto a la variante SW480-ADH, puede observarse en la Figura 15-1-a como destaca la presencia de E-cadherina en todos los sustratos, principalmente en las plataformas TEG-B. La N-cadherina, en cambio, tiene niveles similares tanto en las muestras control como en las muestras TEG, reduciéndose notablemente en TEG-B. Todo ello puede deberse al cambio conformacional de la morfología celular, ya que las plataformas TEG-B otorgan a las células propiedades características de las colonias epiteliales, formando grandes complejos de unión simulando al tejido epitelial.

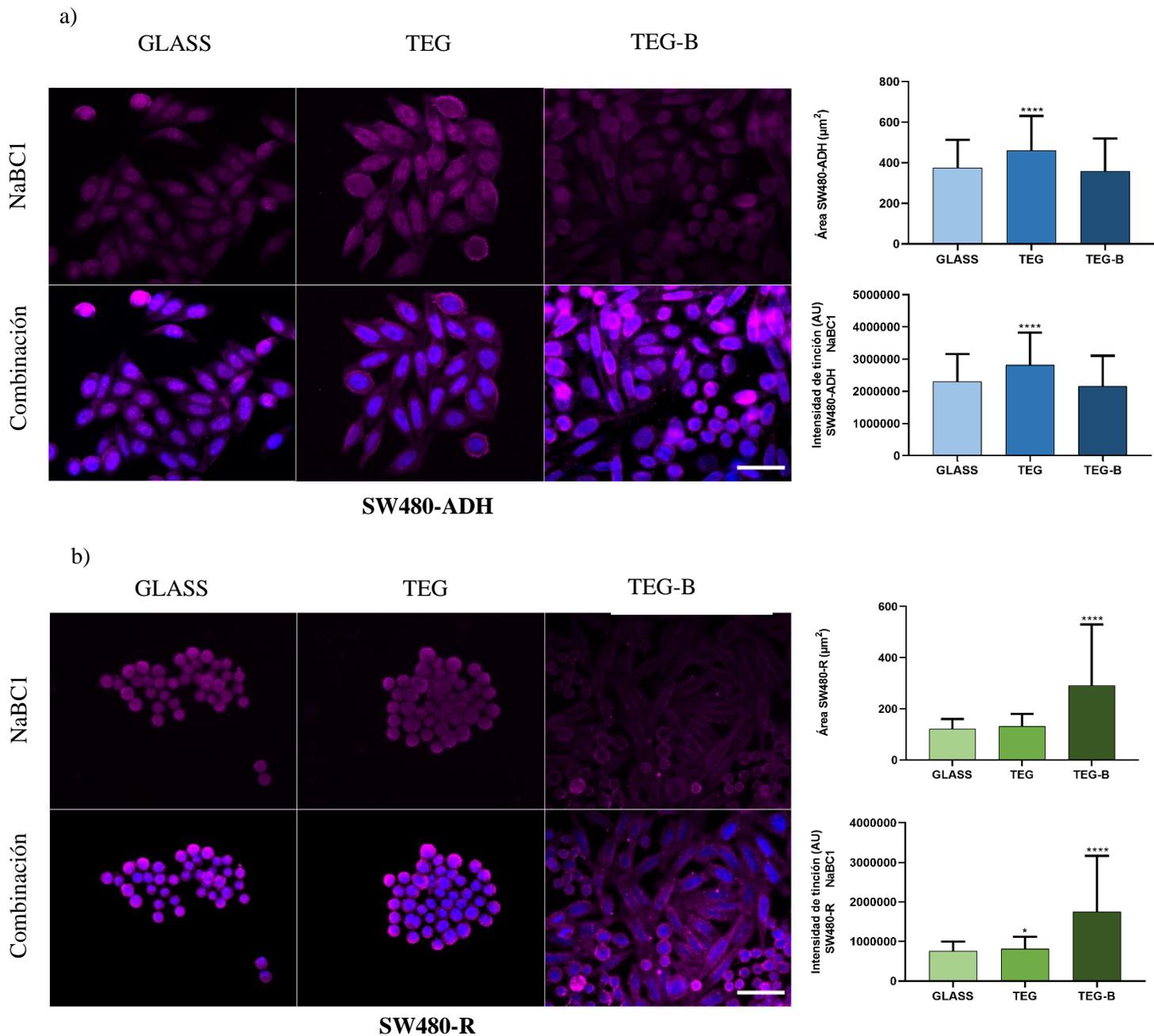
Por otra parte, en la variante SW480-R, destaca el mencionado cambio de conformación de las células en presencia de las plataformas TEG-B donde, atendiendo a los valores de E-cadherina y N-cadherina de la Figura 15-1-b, se observa cómo es considerablemente mayor que en los otros dos sustratos. A simple vista se advierte como la presencia de N-cadherina (característico de las células metastásicas) es mayor que en la variante adherente de la misma línea celular.

De forma que puedan compararse ambas moléculas, se representa el ratio E-cadherina/N-cadherina (Figura 15-2), donde destaca la presencia de E-cadherina en TEG-B de la variante adherente por encima de cualquier otro sustrato. Otro aspecto que destacar es el valor que adopta la presencia de E-cadherina en TEG-B de las células SW480-R, donde puede apreciarse como adquiere un valor casi similar al de las células adherentes, debido al cambio morfológico provocado por el efecto de las plataformas.

10. 2. Inmunofluorescencia para detección del NaBC1

Las diferentes características de la línea celular SW480, hacen que surja la necesidad de estudiar si la expresión de los componentes celulares como NaBC1 es la misma para ambas variantes o, por el contrario, cambia. Para ello, se realiza una inmunofluorescencia simple donde puede comprobarse la manifestación del transportador a simple vista.

Como se ha descrito anteriormente, estudios del grupo de investigación de la Dra. Rico evidencian una relación sinérgica entre el NaBC1, integrinas y otras proteínas de ECM en tejidos sanos. Se sospecha que en cáncer la actividad del NaBC1 repercute de manera diferente en tejidos enfermos, por lo que se pretende estudiar el efecto de los diferentes sustratos en el transportador.



c)

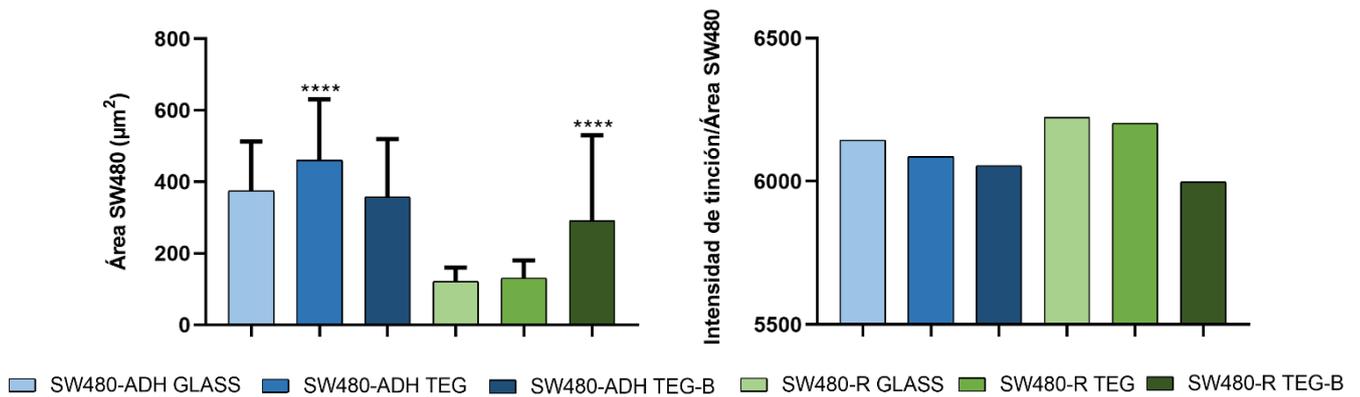


Figura 16. Influencia de las plataformas en NaBC1. Imágenes de inmunofluorescencia de NaBC1 (magenta) y núcleos (azul). Las SW480 se cultivaron durante seis días y fueron sembrados en los sustratos GLASS (vidrio control), TEG y TEG-B, funcionalizados con FN. Barra de escala: 50 μm. a) Corresponde a la variante SW480-ADH. b) Corresponde a la variante SW480-R. c) Representación gráfica del área celular de SW480 en μm² y de la intensidad de tinción normalizado por el área celular. Toda representación gráfica de la influencia de los sustratos en NaBC1 corresponde a imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia con $n \geq 100$. Las estadísticas se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA unidireccional ordinaria y se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el análisis de Tukey ($P = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$.

Atendiendo a la cuantificación de los datos, debe tenerse en cuenta el área celular para poder comparar ambas variantes. De forma que sea posible comparar ambas variantes, se representa el área celular y la intensidad de tinción por área de las SW480 en la Figura 16-c. Tal y como se ha corroborado anteriormente, el área celular de la variante metastásica en presencia de las plataformas TEG-B aumenta hasta llegar a niveles similares a los de la variante adherente. Estos resultados se ven reflejados al representar la división entre el promedio de la intensidad de tinción y el promedio del área celular, donde se observa como la concentración de NaBC1 es mayor en SW480-R al estar sobreexpresado en tumores primarios. Es necesario enfatizar cómo el efecto de las plataformas TEG-B sobre la variante metastásica hace que disminuya considerable la presencia de NaBC1 al revertirse el fenómeno EMT.

10. 3. Ensayos de colocalización

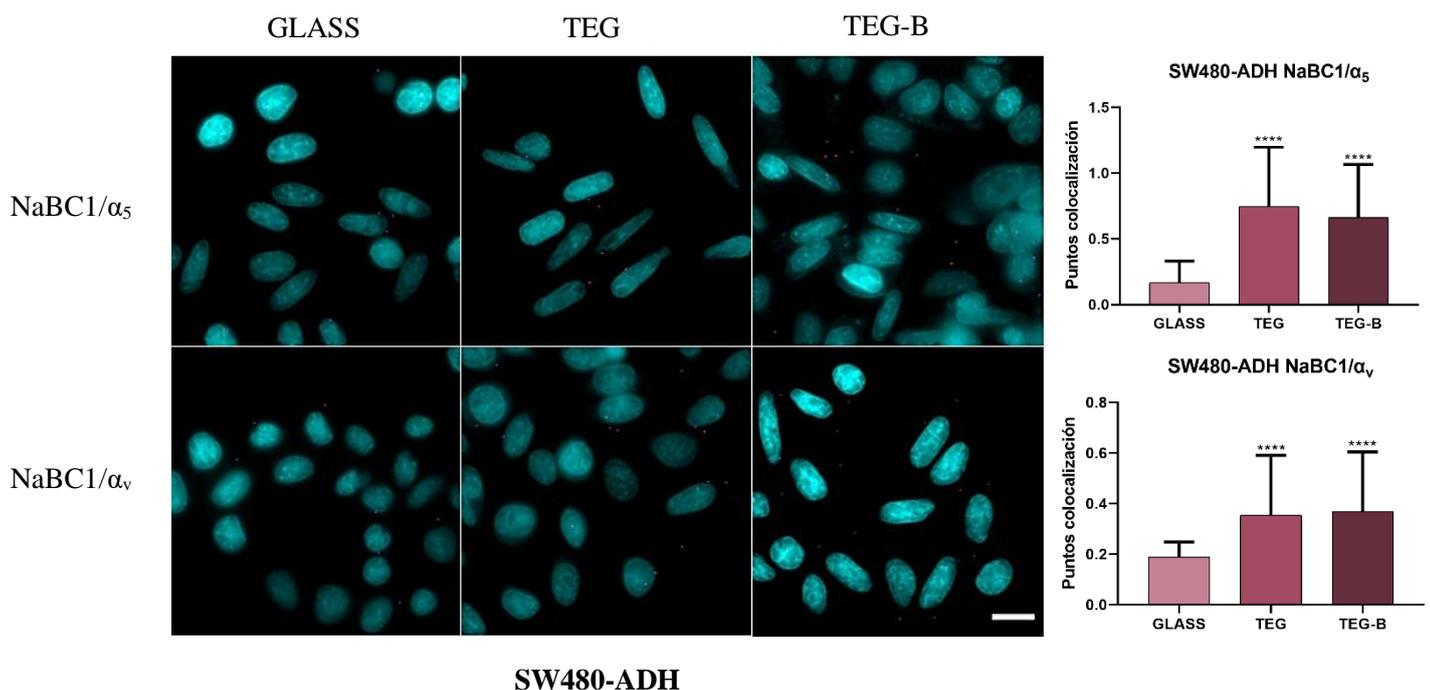
Se pretende determinar la proximidad entre NaBC1, los GFR y su relación con el cáncer en las células SW480. Para ello se cuantifican los puntos de colocalización obtenidos tras los ensayos realizados (descritos en el apartado 8.6) en presencia de las plataformas TEG y TEG-B donde, en estas últimas, se produce una activación permanente del NaBC1.

A la hora de comparar el efecto de las plataformas en ambas variantes celulares, debe tenerse en cuenta que en SW480-R, la presencia de NaBC1 es mayor (como se ha demostrado en otros apartados). Por ello, también es superior la probabilidad de que existan más puntos de colocalización entre NaBC1/integrinas y NaBC1/GFR en esta variante.

En primer lugar, se analiza la colocalización entre NaBC1 y las integrinas α_5 y α_v . Las integrinas participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque también lo hacen en la unión célula-célula, y cuya expresión varía considerablemente en los tejidos normales y los tumorales. En tejidos epiteliales de adulto sano, las principales familias de integrinas se encuentran en niveles casi indetectables, mientras que en tejidos tumorales se encuentran sobreexpresadas. En cáncer, como las integrinas funcionan como receptores de tracción que pueden transmitir y detectar cambios en la fuerza mecánica que actúa sobre la matriz extracelular, la adhesión de estas al ECM determina la tracción requerida para que se produzca la invasión tumoral, por lo que el papel de las integrinas está íntimamente relacionado con las células metastásicas y el proceso EMT. (Desgrosellier et al., 2010)

El cambio generado por el TME en α_5 y α_v , permite a las células migrar y atravesar la membrana basal e invadir la matriz extracelular circundante (este proceso está íntimamente relacionado con la EMT). En la Figura 17 se representa los puntos de colocalización entre NaBC1 y las integrinas α_5 y α_v en ambas variantes de la línea celular SW480.

A simple vista, se aprecia como varía la cantidad de puntos de colocalización según el sustrato. En la variante adherente, los puntos fluorescentes escasean, factor comprensible al tratarse de tejido no metastásico cuyas integrinas no han cambiado a una conformación maligna.



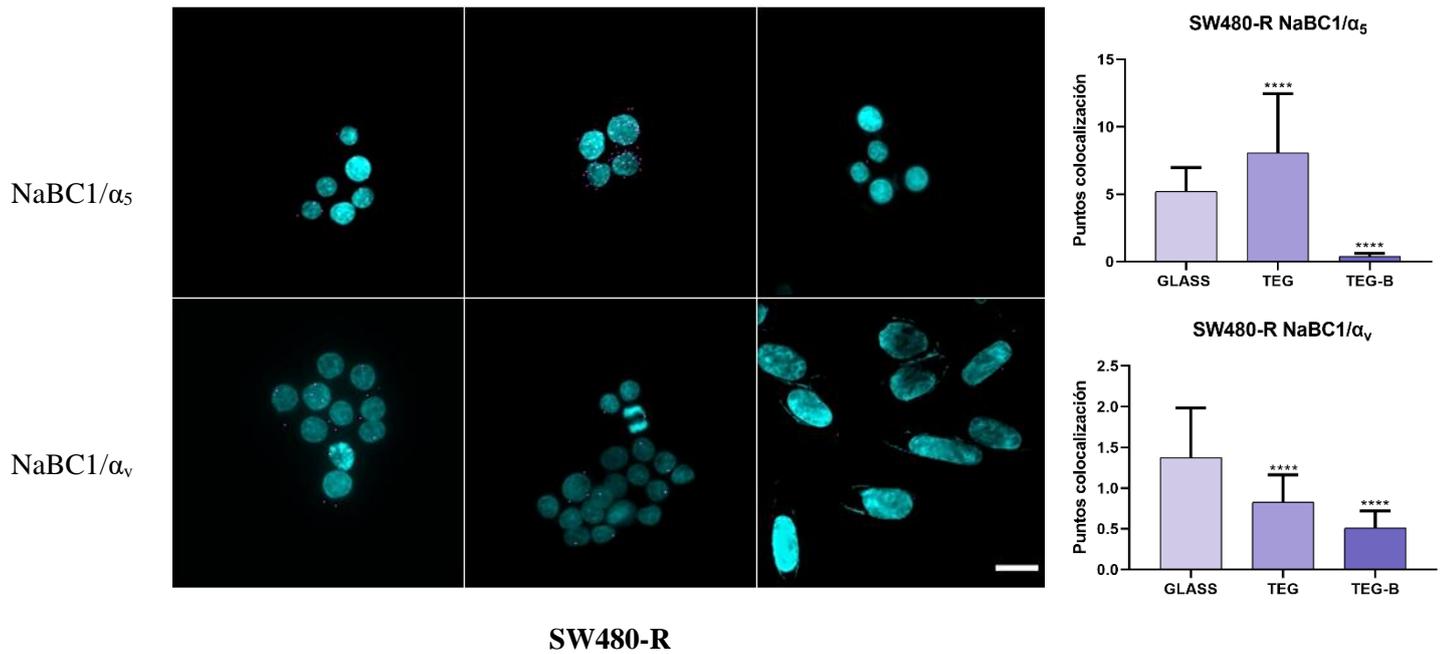


Figura 17. Colocalización de NaBC1/α₅ y NaBC1/α_v. Imágenes de núcleos (cian) y puntos de colocalización (magenta) de SW480 cultivadas durante 6d en sustratos funcionalizados con FN junto con cuantificación del análisis del número de puntos de colocalización de NaBC1/α₅, NaBC1/α_v. Barra de escala: 20 μm. Se analizaron treinta imágenes por condición. Los datos representados en gráficos corresponden a n ≥ 250. Las estadísticas se muestran como media ± la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA ordinaria de una vía y se corrigieron para comparaciones múltiples utilizando Análisis de Tukey (P = 0,05). **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Sin embargo, en SW480-R, se identifica un mayor número de puntos de colocalización, ya que al tratarse de células malignas cuya finalidad es migrar, atravesar la membrana basal e invadir la matriz extracelular circundante, una gran cantidad de integrinas se encuentran activas. Cabe destacar como con las plataformas TEG-B, tras la reversión de la EMT, los puntos de fluorescencia disminuyen drásticamente, obteniendo valores similares a los de la variante SW480-ADH.

Por otro lado, en la Figura 18 se muestra la colocalización entre NaBC1 y los GFR involucrados en proliferación, EGFR y FGFR. El receptor EGFR, reconoce específicamente al factor de crecimiento epidérmico, proteína transmembrana celular asociada a la señalización intracelular. (Krishnan et al., 2011) Específicamente, EGF interactúa con su receptor a través de toda la epidermis, promoviendo el crecimiento epitelial a través de la activación de varias vías. (Acosta et al., 2006)

El receptor FGFR reconoce específicamente el factor de crecimiento de fibroblastos. La red de señalización FGF/FGFR participa en la progresión de diferentes tumores humanos actuando sobre el compartimento de las células tumorales y del estroma, afectando a la oncogénesis a través de diferentes mecanismos incluida la desregulación de la señalización celular, la angiogénesis y la resistencia a la terapia contra el cáncer. (Ghedini et al., 2018)

Ambas proteínas participan en la multiplicación y maduración celular. En tejidos sanos, la cantidad de ambos GFR es estable, mientras que en cáncer pueden mutar y verse afectados. El descontrol de EGFR y FGFR afecta favoreciendo el nicho metastásico provocando un cúmulo de señales celulares desorganizadas que culminan con la proliferación celular anómala.

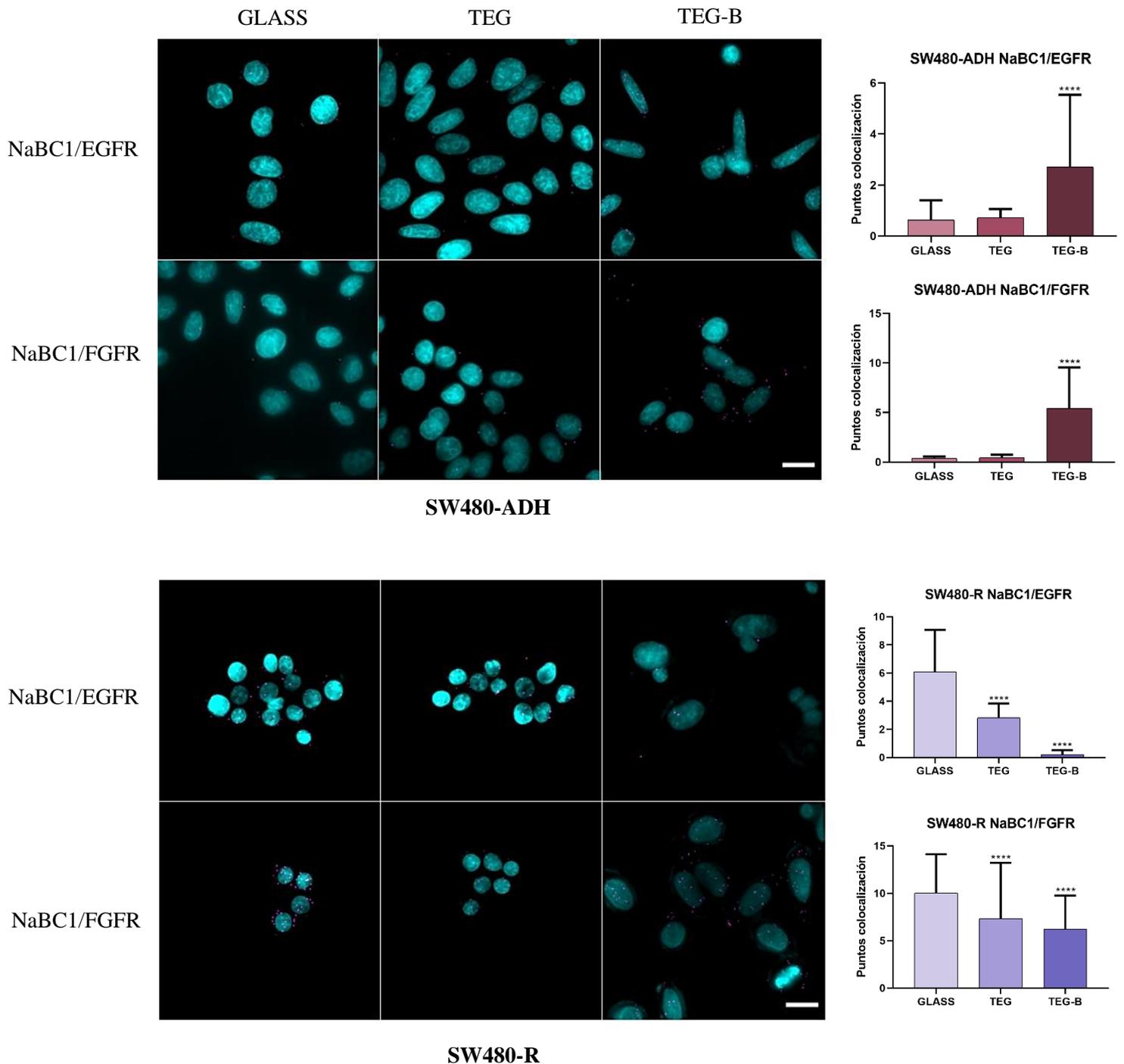


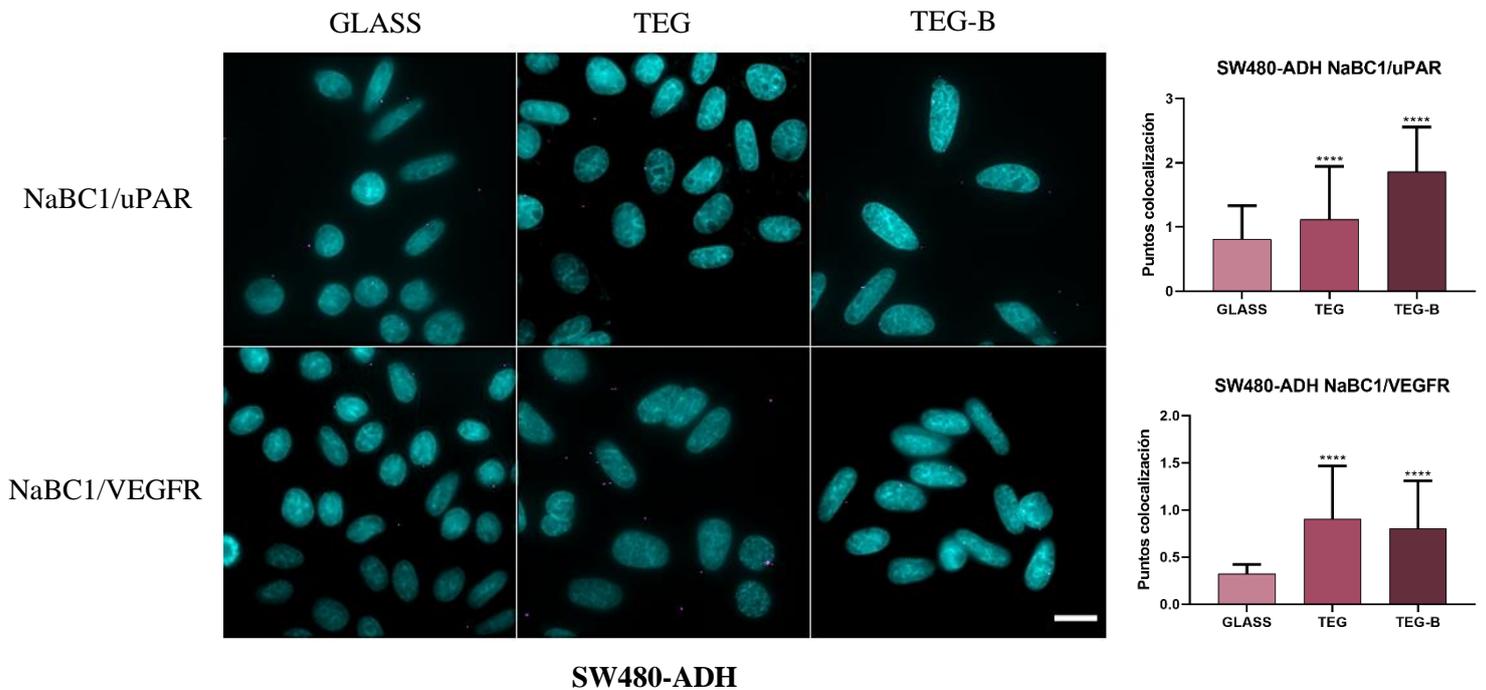
Figura 18. Colocalización de NaBC1/EGFR y NaBC1/FGFR. Imágenes de núcleos (cian) y puntos de colocalización (magenta) de SW480 cultivadas durante 6d en sustratos funcionalizados con FN junto con cuantificación del análisis del número de puntos de colocalización de NaBC1/EGFR, NaBC1/FGFR. Barra de escala: 20 μ m. Se analizaron treinta imágenes por condición. Los datos representados en gráficos corresponden a $n \geq 250$. Las

estadísticas se muestran como media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA ordinaria de una vía y se corrigieron para comparaciones múltiples utilizando Análisis de Tukey ($P = 0,05$). $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

En la Figura 18 se observa cómo en SW480-ADH, para ambos GFR, apenas tiene puntos de fluorescencia en los sustratos control y TEG. Sin embargo, aumenta en presencia de las plataformas TEG-B. Esto puede deberse a que, al estimularse la formación de grandes colonias epiteliales, se estimula la activación de un mayor número de EGFR y FGFR.

En cuanto a las SW480-R, destaca como la presencia de EGFR y FGFR es superior, acentuándose en el sustrato control y en presencia de las plataformas TEG. En presencia de las plataformas TEG-B, los valores son similares a los de SW480-ADH. Como se ha mencionado anteriormente, todo ello se debe al descontrol de EGFR y FGFR que existe en los tejidos tumorales y en las células metastásicas.

Respecto a los resultados de los GFR relacionados con migración y angiogénesis, se representan en la Figura 19 los resultados obtenidos para la colocalización entre NaBC1 y uPAR y VEGFR.



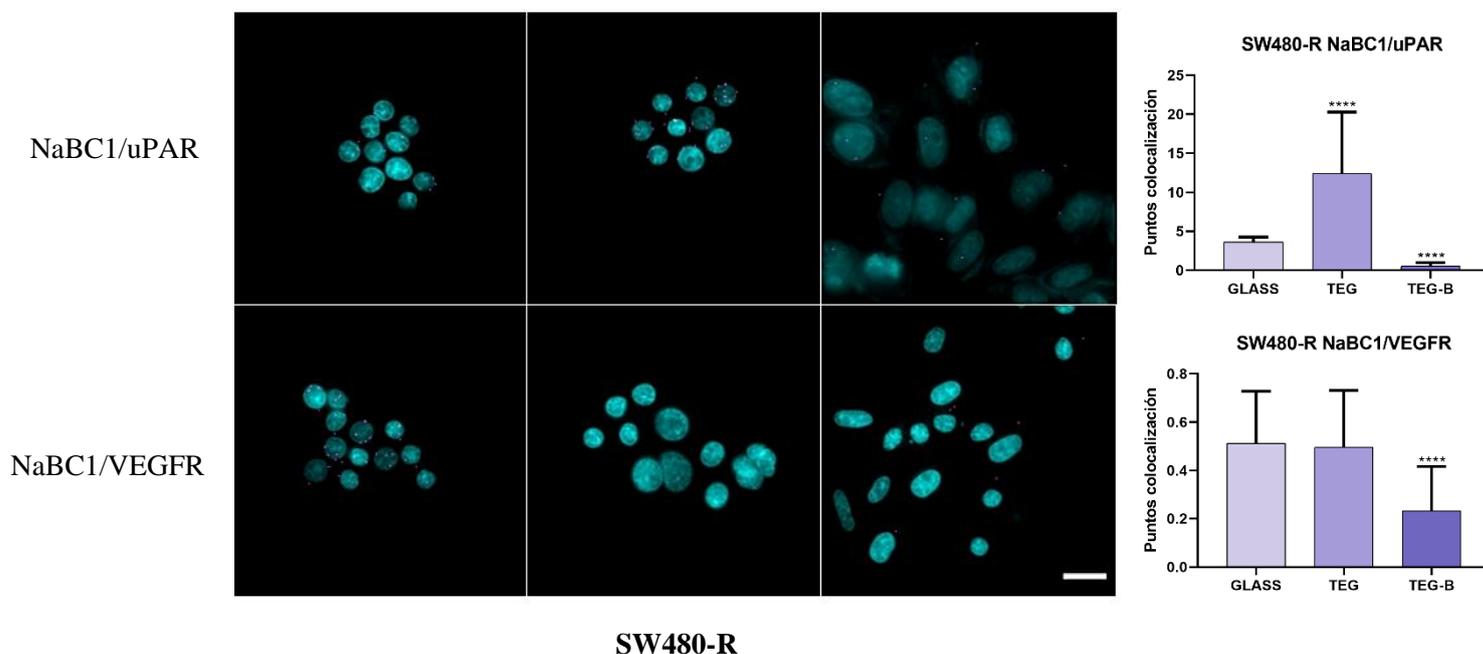


Figura 17. Colocalización de NaBC1/uPAR y NaBC1/VEGFR. Imágenes de núcleos (cian) y puntos de colocalización (magenta) de SW480 cultivadas durante 6d en sustratos funcionalizados con FN junto con cuantificación del análisis del número de puntos de colocalización de NaBC1/uPAR, NaBC1/VEGFR. Barra de escala: 20 μ m. Se analizaron treinta imágenes por condición. Los datos representados en gráficos corresponden a $n \geq 250$. Las estadísticas se muestran como media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante una prueba ANOVA ordinaria de una vía y se corrigieron para comparaciones múltiples utilizando Análisis de Tukey ($P = 0,05$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

El receptor activador del plasminógeno de tipo uroquinasa humana (UPAR), se expresa en gran medida en células tumorales. Parte de las señales reguladas por uPAR juegan un papel importante en la proliferación y metástasis de células tumorales, la glucólisis relacionada con tumores, el microambiente tumoral y la angiogénesis. Sin embargo, también se expresa en células sanas al estar en relación directa con la vitronectina, componente del ECM involucrado en la adhesión celular. (Lund et al., 2011)

El receptor VEGFR, por otro lado, es una molécula presente tanto en tejidos sanos como tumorales, clave en la regulación de la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. En cáncer, VEGFR favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos en la zona tumoral, especialmente durante la formación del TME.

En la Figura 18, se expresan los resultados obtenidos en los ensayos de colocalización en relación con NaBC1 y uPAR y VEGFR. A simple vista se reconoce como en la variante SW480-ADH, los valores de ambos receptores son similares, siendo algo mayores en el sustrato con TEG-B para uPAR y con TEG para VEGFR.

Respecto a la colocalización NaBC1/uPAR de la variante adherente, se observa como los puntos de colocalización aumentan en presencia de TEG-B donde NaBC1 se encuentra permanentemente activo. En la variante metastásica se aprecian valores más altos en presencia de las plataformas TEG, siendo más bajos los resultados para el sustrato control y las plataformas TEG-B. Ello puede

deberse a que además de encontrarse activo como parte de la proliferación y migración celular, también es expresado como componente de adhesión celular. El cambio de conformación en presencia de TEG, donde las células comienzan a formar grupos marcados adheridos al sustrato, puede ser clave a la hora de expresión del uPAR.

Respecto al análisis de proximidad de NaBC1/VEGFR se observa cómo los valores son bajos, y para la línea adherente la presencia de TEG-B es significativa ya que aumentan los puntos de colocalización si comparamos con el sustrato control, mientras que para la variante metastásica estos disminuyen.

Tras el análisis de los datos puede concluirse como en conjunto, los resultados obtenidos en células SW480 demuestran que en la variante SW480-ADH, la estimulación permanente de NaBC1 con las plataformas TEG-B en combinación con la activación de integrinas de unión a fibronectina potencia la adhesión celular y describe una colocalización entre NaBC1 y $\alpha 5/\alpha v$, EGFR/FGFR y uPAR/VGFR mayor que en el sustrato control. Por otro lado, los resultados obtenidos en las células SW480-R demuestran que por lo general los resultados obtenidos en presencia de TEG-B son similares al sustrato control de las SW480-ADH al revertirse la EMT y obtener una conformación más adherente.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han realizado ensayos con dos variantes de la línea celular SW480 (adherente y metastásica). En primer lugar, se ha logrado determinar una concentración clave a partir de la cual, el boro diluido en el medio de cultivo comienza a tener un efecto perjudicial. En concreto, se ha demostrado como a partir de concentraciones de bórax de 1 mM el medio se hace citotóxico progresivamente, perjudicando la proliferación celular y desencadenando la muerte de ambas variantes conforme aumenta la concentración. Se ha comprobado que el efecto del boro soluble en el medio de cultivo es dependiente de la concentración, ya que en cultivos largos de 6 d en donde se ha realizado una adición de bórax continuada con los cambios del medio de cultivo, el efecto de este es más perjudicial en células adherentes y se agrava en presencia de FN.

En segundo lugar, y con el fin de demostrar si el efecto observado en la viabilidad celular se debe al propio bórax o a la activación de su transportador, se han realizado ensayos de inmunofluorescencia y colocalización empleando unas plataformas biomateriales 2D capaces de presentar en la fase sólida el boro anclado covalentemente. De esta forma se ha logrado determinar como la activación permanente de NaBC1 causada por las plataformas TEG-B otorgan a las células una mayor adhesión al estimularlas a establecer nuevos complejos de unión. Además, se ha demostrado como la activación permanente de NaBC1 causa en la variante metastásica SW480-R una reversión de los fenómenos de la transición epitelio-mesenquimal, ya que se ha observado no solo un cambio en su morfología hacia una más adherente, sino que también cambia el tamaño de sus núcleos, la expresión del NaBC1 y la colocalización con receptores de factores de crecimiento.

En definitiva, este trabajo propone una nueva diana terapéutica para abordar futuras terapias en cáncer de colon usando la interacción entre receptores específicos de la membrana celular. Los datos demuestran que la estimulación simultánea de NaBC1, GFR y las integrinas de unión a fibronectina generan un estado impulsado por la adhesión, induciendo la formación de adhesiones focales y la deformación nuclear de la variante metastásica de las SW480.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J. B., Savigne, W., Valdez, C., Franco, N., Alba, J. S., del Rio, A., López-Saura, P., Guillén, G., Lopez, E., Herrera, L., & Fernández-Montequín, J. (2006). Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *International wound journal*, 3(3), 232–239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00237.x>
- Adjei, A. A. (2005). Intracellular Signal Transduction Pathway Proteins As Targets for Cancer Therapy. *JouARNI of Clinical Oncology*, 23(23), 5386–5403. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.23.648>
- Alvarado, M. M.; Roitz, S.C. (2012) El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6004>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Campbell, P. M., & Der, C. J. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(2), 105–114. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2003.09.015>
- Cantanhede, I., de Oliveira, J. R. M. (2017). PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Scientific Reports*, 7(1), 15271–. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15045-w>
- Carlyn Rose, C.T., Saif, A-M., Brittany, C., Stefan, K.B., (2018). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clinical Pharmacokinetics*, -. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0679-9>
- Chen, J, Gingold, J.A., Su, X. (2019). Immunomodulatory TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Trenas in Molecular Medicine*, S1471491419301698. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.007>
- Ciriza, J., Rodríguez-Romano, A., Nogueroles, I., Gallego-Ferrer, G., Cabezuelo, R. M., Pedraz, J. L., & Rico, P. (2021). Borax-loaded injectable alginate hydrogels promote muscle regeneration in vivo after an injury. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 112003. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.112003>
- Delhalle, S., Duvoix, A., Schnekenburger, M., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M., (2003). An Introduction to the Molecular Mechanisms of Apoptosis, 1010 1–8. <https://doi.org/10.1196/annals.1299.001>
- Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. (2010) <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
- Erdogan B., Ao M., White L.M., et al. (2018), Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol* 2017; 216:3799–816. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704053>
- Frisch, S. M., Schaller, M., Cieply, B., (2013). Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *JouARNI of Cell Science*, 126(1), 21–29. <https://doi.org/10.1242/jcs.120907>

- Gainza, G.; Villullas, S., Pedraz, J.L., HeARNdez, R.M., Igartua, M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine* 2015, 11, 1551–1573. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.002>
- Gartner, M.H.; Benson, J.D., Caldwell, M.D. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *J. Surg. Res.* 1992, 52, 389–394. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(92\)90121-f](https://doi.org/10.1016/0022-4804(92)90121-f)
- Goel, H.L., Mercurio, A.M., Enhancing integrin function by VEGF/neuropilin signaling: implications for tumor biology. *Cell adhesion & migration.* 2012; 6:554–560. <https://doi.org/10.4161/cam.22419>
- Gopal S, Veracini L, Grall D, et al. Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 2017; 8:14105. <https://doi.org/10.1038/ncomms14105>
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2004; 5:816–826. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>
- Hamidi, H., Ivaska, J., (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, (), –. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Holgerson, E. M., Gandhi, S., Zhou, Y., Kim, J., Vaz, B., Bogojeski, J., Bugno, M., Shalev, Z., Cheung-Ong, K., Gonçalves, J., O'Hara, M., Kron, K., Verby, M., Sun, M., Kakaradov, B., Delong, A., Merico, D., & Deshwar, A. G. (2021). Transcriptome-Wide Off-Target Effects of Steric-Blocking Oligonucleotides. *Nucleic acid therapeutics*, 31(6), 392–403. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0921>
- Hood J.D, et al. Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *The JouARNl of cell biology.* 2003; 162:933–943. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304105>
- Huang M, et al. EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. *Oncogene.* 2012; 31:2783–2793.
- Huang, R. Y.-J., Guilford, P., Thiery, J. P., (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *JouARNl of Cell Science*, 125(19), 4417–4422. <https://doi.org/10.1242/jcs.099697>
- Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903 (2006). <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>
- Hynes, R.O., Yamada, K.M. (1982). Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The JouARNl of Cell Biology*, 95(2), 369–377.
- Hynes, R. O., (1990) “Fibronectins” Springer- Verag NY, 546 Pp
- Kalluri, R., Weinberg, R. A., (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *JouARNl of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
- Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C. D., Hamilton, S. R. and Fidler, I. J. (2006) Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *Int. J. Cancer* 119, 2567–2574 <https://doi.org/10.1002/ijc.22229>

- Koretz, K., Brüderlein, S., Henne, C., Fietz, T., Laqué, M., & Möller, P. (1994). Comparative evaluation of integrin alpha- and beta-chain expression in colorectal carcinoma cell lines and in their tumours of origin. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 425(3), 229–236. <https://doi.org/10.1007/BF00196144>
- Krishnan, K., Arnone, B., & Buchman, A. (2011). Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflammatory bowel diseases*, 17(1), 410–422. <https://doi.org/10.1002/ibd.21316>
- Llopis-Hernández, V., Rico, P., Moratal, D., Altankov, G., Salmerón-Sánchez, M., (2013). Role of Material-Driven Fibronectin Fibrillogenesis in Protein Remodeling. *BioResearch Open Access*, 2(5), 364–373. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0017>
- Lund, I. K., Illemann, M., Thurison, T., Christensen, I. J., Gunilla, H-H., (2011). uPAR as Anti-Cancer Target: Evaluation of Biomarker Potential, Histological Localization, and Antibody-Based Therapy. *Current Drug Targets*, 12(12), 1744–1760. <https://doi.org/10.2174/138945011797635902>
- Mansukhani, A., Dell’Era, P., Moscatelli, D., Kornbluth, S., Hanafusa, H., Basilico, C. Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: Activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 3305–3309. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3305>
- Marco, P., & Marco, A. (2015). Marcadores biomoleculares en la tromboembolia asociada al cáncer. *Medicina Clínica*, 144(S1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(15\)30014-2](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(15)30014-2)
- Martino, M. M.; Hubbell, J. A. (2010). The 12th-14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain. *The FASEB Journal*, 24(12), 4711–4721. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151282>
- Missirlis D, Haraszi T, Kessler H, Spatz JP. Fibronectin promotes directional persistence in fibroblast migration through interactions with both its cell-binding and heparin-binding domains. *Sci Rep* 2017; 7:3711. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03701-0>.
- Mosher, D. F., and Proctor, R. A. (1980). Binding and factor XIIIa-mediated crosslinking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* 209, 927–929. <https://doi.org/10.1126/science.7403857>
- Nelson, W. J. (2009). Remodeling Epithelial Cell Organization: Transitions Between Front-Rear and Apical-Basal Polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(1), a000513–a000513. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000513>
- Nicosia, R. F., Bonanno, E., Smith, M., (1993) Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis *in vitro*. *J Cell Physiol* 1993; 154:654–61. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041540325>.
- Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ, Schwaiger M. Exploring the role of RGD-Recognizing integrins in cancer *Cancer basels* (2017). 9 (9): 116. <https://doi.org/10.3390/cancers9090116>
- Paoella, G., Barone, M., Baralle, F., 1993, M. Zern and L. Reid, eds., *Extracellular Matrix*, Marcel Dekker, pp. 3-24
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W., & Muallem, S. (2004). NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and

- cell growth and proliferation. *Molecular cell*, 16(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.030>
- Potts, J. R., and Campbell, I. D. (1994). Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 648–655. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90090-6)
- Provenzano, P.P., Alejandro-Osorio, A.L., Grorud, K.W., Martinez, D.A.; Vailas, A.C.; Grindeland, R.E.; Vanderby, R., Jr. Systemic administration of IGF-I enhances healing in collagenous extracellular matrices: Evaluation of loaded and unloaded ligaments. *BMC Physiol.* 2007, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-7-2>
- Rick, J.W., Chandra, J., Dalle Ore, C., Nguyen, A.T., Yagnik, G., Aghi, M.K., (2019) Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.08.002>
- Rico, P., Rodrigo-Navarro, A., Salmerón-Sánchez, M., (2015). Borax-loaded PLLA for Promotion of Myogenic Differentiation. *Tissue Engineering Part A*, (), 150803215853000–. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0044>
- Rico, P., Mnatsakanyan, H., Dalby, M. J., Salmerón-Sánchez, M., (2016). Material-Driven Fibronectin Assembly Promotes Maintenance of Mesenchymal Stem Cell Phenotypes. *Advanced Functional Materials*, (), –. <https://doi.org/10.1002/adfm.201602333>
- Rico, P., Rodrigo-Navarro, A., de la Peña, M., Moulisová, V., Costell, M., Salmerón-Sánchez, M., (2019). Simultaneous Boron Ion-Channel/Growth Factor Receptor Activation for Enhanced Vascularization. *Advanced Biosystems*, 3(1), 1800220–. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800220>
- Rico, P., Rodrigo-Navarro, A., Sánchez Pérez, L., Salmeron-Sanchez, M., (2020). Borax induces osteogenesis by stimulating NaBC1 transporter via activation of BMP pathway. *Communications Biology*, 3(1), 717–. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01449-4>
- Sasaki, T., Hiroki, K., & Yamashita, Y. (2013). The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *BioMed research international*, 2013, 546318. <https://doi.org/10.1155/2013/546318>
- Schittenhelm, J., Klein, A., Tatagiba, M. S., Meyermann, R., Fend, F., Goodman, S. L., & Sipos, B. (2013). Comparing the expression of integrins $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 8$, fibronectin and fibrinogen in human brain metastases and their corresponding primary tumors. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(12), 2719–2732.
- Sigma-Aldrich, How Proximity Ligation Assays (PLA) Work, Duolink™ In situ User Guide.
- Sökeland, G., Schumacher, U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer* 18, 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0937-3>
- Sottile, J., Schwarzbauer, J., Selegue, J., and Mosher, D. F. (1991). Five type I modules of fibronectin form a functional unit that binds to fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 266, 12840–12843. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98769-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98769-7)
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F., et al. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271–282. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90744-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90744-0)

- Tan, C.R.C., Abdul-Majeed, S., Cael, B., Barta, S.K. (2018). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clinical Pharmacokinetics*, (), –. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0679-9>
- Tiaka, E.K., Papanas, N., Manolakis, A.C., Georgiadis, G.S. Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: An update. *Perspect. Vasc. Surg. Endovasc. Ther.* 2012, 24, 37–44. <https://doi.org/10.1177/1531003512442093>
- Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., Christofori, G., (2012). EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *22*(3), 0–0. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.02.013>
- To, W.S., Midwood, K.S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 21 (2011). <https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-21>
- Tomita, N., Jiang, W., Hibshoosh, H., Warburton, D., Kahn, S. M., & Weinstein, I. B. (1992). Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer research*, 52(24), 6840–6847.
- Trimboli, A. J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S. M., Creasap, N., Rosol, T. J., Robinson, M. L., Eng, C., Ostrowski, M. C., Leone, G. (2008). Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer. *Cancer Research*, 68(3), 937–945. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2148>
- Trujillo, S., Gonzalez-Garcia, C., Rico, P., Reid, A., Windmill, J., Dalby, M. J., Salmeron-Sanchez, M., (2020). Engineered 3D hydrogels with full-length fibronectin that sequester and present growth factors. *Biomaterials*, 252(), 120104–. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120104>
- Tsung-Cheng, L., Cheng-Han, Y., Li-Hsin, C., Wen-Tsan, C., Yuh-Rong, L., Hung-Chi, C., (2019). Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells*, 9(1), 27– <https://doi.org/10.3390/cells9010027>
- Underiner, T.L., Ruggeri, B., Gingrich, D.E., Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Curr Med Chem*, 2004, 11(6), 731-745.
- Vithana, E. N., Morgan, P., Sundaresan, P., Ebenezer, N. D., Tan, D. T., Mohamed, M. D., Anand, S., Khine, K. O., Venkataraman, D., Yong, V. H., Salto-Tellez, M., Venkatraman, A., Guo, K., Hemadevi, B., Srinivasan, M., Prajna, V., Khine, M., Casey, J. R., Inglehearn, C. F. & Aung, T. Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). (2006). *Nat. Genet.* 38, 755–757 <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm337>
- Wierzbicka-Patynowski, I. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *JouARNI of Cell Science*, 116(16), 3269–3276. <https://doi.org/10.1242/jcs.00670>
- Yao, D., Dai, C., Peng, S., (2011). Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation., 9(12), 1608–1620. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0568>
- Yoon, H., Tang, C. M., Banerjee, S, Delgado, A. L., Yebra, M., Davis, J., Sicklick, J. K. (2021). TGF-β1-mediated transition of resident fibroblasts to cancer-associated fibroblasts promotes cancer metastasis in gastrointestinal stromal tumor. *Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00302-5>

- Yue, X., Pengfei, X., (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, (), –. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tranon.2021.101174>
- Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 15694–15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601252200>

**DOCUMENTO II:
PRESUPUESTO**

INTRODUCCIÓN AL PRESUPUESTO

En este Documento II se muestra el cálculo llevado a cabo para obtener el presupuesto del proyecto con tal de estudiar la viabilidad económica del mismo. La cuantificación económica se ha realizado sobre los conceptos de equipos de mano de obra (MO), materiales (MAT), maquinaria (MAQ) y protección individual (EPI) empleados. De acuerdo con ello, se obtuvo en primer lugar el cuadro de precios descompuestos y, en segundo lugar, el presupuesto parcial. Posteriormente, se obtuvo el presupuesto de ejecución material, por contrata y, finalmente, el presupuesto general.

CUADRO DE MANO DE OBRA

En primer lugar, se muestra en la Tabla 7 el cuadro de mano de obra (MO), considerando a la autora del presente TFG en calidad de ingeniera biomédica. No obstante, no se ha recibido ningún tipo de retribución al respecto.

Tabla 7. Cuadro de mano de obra.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio	Cantidad	Precio total
1	MO.1	h	Graduado/a en Ingeniería Biomédica	12,00 €	285,00	3.420,00 €
2	MO.2	h	Tutor/a responsable del proyecto	45,00 €	45,00	2.025,00 €
3	MO.3	h	Cotutor/a responsable del proyecto	20,00 €	79,00	1.580,00 €
				Precio total de MO		7.025,00 €

CUADRO DE MATERIALES

En segundo lugar, en la Tabla 8 se muestra el presupuesto asociado a todo el material requerido para la realización del proyecto, incluyendo equipos de protección individual (EPI), materiales para el cultivo celular, reactivos y otros materiales de uso genérico en el laboratorio, descritos anteriormente en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS del Documento I.

Tabla 8. Cuadro de materiales.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio	Cantidad	Precio total
1	EPI.01	ud	Bata de laboratorio	23,90 €	2,00	47,80 €
2	EPI.02	ud	Caja guantes de latex (100 uds)	5,85 €	2,00	11,70 €
3	EPI.03	ud	Caja guantes de nitrilo (100 uds)	41,10 €	1,00	41,10 €
5	MAT.01	ud	Bolsas zip	0,12 €	12,00	1,44 €
6	MAT.02	m	Papel de aluminio	2,30 €	1,00	2,30 €
8	MAT.04	ud	Pinzas laboratorio	8,99 €	1,00	8,99 €
9	MAT.05	ud	Tubos falcon 50mL	0,12 €	80,00	9,60 €
10	MAT.06	ud	Tubos falcon 15 mL	0,10 €	80,00	8,00 €
11	MAT.07	ud	Puntas de micropipeta 100-1000µL	0,03 €	300,00	9,00 €
12	MAT.08	ud	Puntas de micropipeta 2-200µL	0,04 €	200,00	8,00 €
13	MAT.09	ud	Puntas de micropipeta 5-20µL	0,01 €	200,00	2,60 €

14	MAT.10	μL	Anticuerpo anti- E-cadherina (rabbit anti-human)	5,50 €	5,20	28,60 €
15	MAT.11	μL	Anticuerpo anti- N-cadherina (mouse anti-human)	5,50 €	12,00	66,00 €
16	MAT.12	μL	Anticuerpo Alexa fluor 488 (goat anti-rabbit)	5,55 €	6,00	33,30 €
17	MAT.13	μL	Anticuerpo Alexa fluor 555 (goat anti-mouse)	5,50 €	4,00	22,00 €
18	MAT.14	μL	Anticuerpo anti-NaBC1 (rabbit anti-human)	4,55 €	38,00	172,90 €
19	MAT.15	μL	Anticuerpo anti-VEGFR (rabbit anti-human)	5,00 €	3,00	15,00 €
20	MAT.16	μL	Anticuerpo anti-FGFR (rabbit anti-human)	5,80 €	6,00	34,80 €
21	MAT.17	μL	Anticuerpo anti-EGFR (rabbit anti-human)	5,80 €	4,80	27,84 €
22	MAT.18	μL	Anticuerpo anti-α5 (rabbit anti-human)	6,15 €	2,40	14,76 €
23	MAT.19	μL	Anticuerpo anti-αv (rabbit anti-human)	5,85 €	2,40	14,04 €
24	MAT.20	μL	Anticuerpo anti-uPAR (rabbit anti-human)	5,50 €	3,00	16,50 €
25	MAT.21		Fibronectina	202,00 €	1,00	202,00 €
26	MAT.22	μL	Vectashield + DAPI	12,75 €	12,00	153,00 €
27	MAT.23	ud	Flascon cultivo T75	1,45 €	10,00	14,50 €
28	MAT.24	ud	Eppendorf 1mL	0,07 €	20,00	1,40 €
29	MAT.25	ud	Micropipeta 100-1000μL	75,00 €	1,00	75,00 €
30	MAT.26	ud	Micropipeta 2-200μL	75,00 €	1,00	75,00 €
31	MAT.27	ud	Micropipeta 5-20μL	75,00 €	1,00	75,00 €
32	MAT.28	L	Agua miliQ (agua ultra pura)	0,20 €	0,20	0,04 €
33	MAT.29	mL	Penicilina/estreptomicina (P/S)	0,36 €	3,20	1,15 €
34	MAT.30	mL	Dulbecco's phosphated buffered saline (DPBS)	0,08 €	180,00	13,68 €
35	MAT.31	mL	Trypsina/EDTA	0,09 €	50,00	4,30 €
36	MAT.32	mL	Dimetilsulfóxido	17,90 €	0,20	3,58 €
37	MAT.33	L	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-high glucose (Biowest)	40,00 €	0,16	6,40 €
38	MAT.34	mL	Reactivo MTS	16,85 €	8,00	134,80 €
39	MAT.35	mL	Horse Serum	0,29 €	5,00	1,45 €
40	MAT.36	mL	Suero fetal bovino (FBS)	1,43 €	200,00	286,00 €
41	MAT.37	mL	Tritón X-100	1,05 €	4,00	4,20 €
42	MAT.38	L	Etanol (ET0002025)	9,88 €	0,28	2,77 €
43	MAT.39	L	Agua destilada (H2Od)	0,20 €	6,40	1,28 €
44	MAT.40	ud	Punta pipeta 25 mL	0,47 €	16,00	7,52 €
45	MAT.41	ud	Punta pipeta 5 mL	0,19 €	20,00	3,80 €
46	MAT.42	ud	Puntas pipeta 10 mL	0,21 €	20,00	4,12 €
47	MAT.43	ud	Plataformas TEG	5,00 €	48,00	240,00 €
48	MAT.44	ud	Plataformas TEG-B	5,00 €	48,00	240,00 €
49	MAT.45	Criotubo	Células SW480	125,00 €	5,00	625,00 €
Precio total de MAT						2.772,26 €

CUADRO DE MAQUINARIA

En tercer lugar, se estiman los costes de la maquinaria empleada en el proyecto (Tabla 9) mediante la amortización (A) de los equipos, según la Ecuación I,

$$A = \frac{C_{equipo} * t_{uso}}{P_{am}} \quad (I)$$

Donde consta el coste del equipo (C_{equipo}), el tiempo total de uso del equipo en cuestión (t_{uso}) y, por último, el periodo amortizado (P_{am}) en función de la adquisición de cada maquinaria.

Tabla 9. Cuadro de maquinaria.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio	Cantidad	Precio total
1	MAQ.01	h	Baño termostatzado	0,05 €	15,00	0,75 €
2	MAQ.02	h	Servicio de microscopia	11,00 €	10,00	110,00 €
3	MAQ.03	h	Cámara Neubauer	0,01 €	0,40	0,00 €
4	MAQ.04	h	Microscopio óptico invertido con cámara integrada	3,44 €	0,40	1,38 €
5	MAQ.05	h	Centrifugadora Eppendorf, modelo 5804R	3,63 €	0,40	1,45 €
6	MAQ.06	h	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	4,00 €	2,49	9,96 €
8	MAQ.08	h	Incubadora Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S	2,12 €	960,00	2.035,20 €
9	MAQ.09	h	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	0,17 €	120,00	20,40 €
10	MAQ.10	h	Nevera 4°C	0,63 €	192,00	120,96 €
Precio total de MAQ						2.300,10 €

CUADRO PRECIOS DESCOMPUESTOS

En el cuadro de precios descompuestos (Tabla 10) se recogen por capítulos y subcapítulos los procedimientos llevados a cabo en la realización del TFG.

Tabla 10. Tabla de precios descompuestos.

Código	Descripción capítulo				
	1. Preparación medios de cultivo				
1.1	Medio basal	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
50mL	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	0,50	h	0,17 €	0,09 €
	FBS	5,00	mL	0,38 €	1,90 €
	DMEM high glucose	0,01	L	54,60 €	0,27 €
	Penicilina estreptomycin	5,00	mL	0,29 €	1,45 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	0,50	h	12,00 €	6,00 €
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	19,71 €	0,59 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	20,30 €	0,61 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 1.1'					20,91 €

1.2	Medio congelación	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
1mL	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	0,30	h	0,17 €	0,05 €
	FBS	5,00	mL	0,38 €	1,90 €
	DMSO	1,90	mL	0,20 €	0,38 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	0,50	h	12,00 €	6,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	8,33 €	0,25 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	8,58 €	0,26 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 1.2'					8,84 €
1.3	Medio con bórax	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
1mL	Borax decahydrated	0,09	g	0,10 €	0,01 €
	Agitador magnético	0,10	h	0,20 €	0,02 €
	Agua miliQ (agua ultra pura)	0,001	L	0,20 €	0,00 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	0,50	h	12,00 €	6,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	6,03 €	0,18 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	6,21 €	0,19 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 1.3'					6,40 €
1.4	Medio MTS	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
10mL	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	1,00	h	0,17 €	0,17 €
	DMEM sin rojo fenol	9,00	mL	0,08 €	0,72 €
	Reactivo MTS	1,00	mL	16,85 €	16,85 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	1,00	h	12,00 €	12,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	39,74 €	1,19 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	40,93 €	1,23 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 1.3'					42,16 €
2. Cultivo celular y análisis resultados					
2.1	Subcultivo SW480	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	2,50	h	0,17 €	0,43 €
	Incubadora Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S	48,00	h	2,12 €	101,76 €
	Centrifugadora Eppendorf	0,10	h	3,63 €	0,36 €
	Baño termostatzado	2,50	h	0,05 €	0,13 €
	Microscopio óptico invertido con cámara fotográfica	0,30	h	3,44 €	1,03 €
	Cámara Neubauer	0,30	h	0,01 €	0,00 €
	Try/EDTA	3,00	mL	0,15 €	0,45 €
	DPBS	10,00	mL	0,11 €	1,10 €
	Medio basal	1,00	ud	20,91 €	20,91 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	2,50	h	12,00 €	30,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	0,98 €	0,49 €
	Costes indirectos	3,00	%	156,66 €	4,70 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	161,36 €	4,84 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 2.1'					166,20 €

2.2	Siembra en plataformas	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	3,00	h	0,17 €	0,51 €
	Incubadora Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S	48,00	h	2,12 €	101,76 €
	Centrifugadora Eppendorf	0,10	h	3,63 €	0,36 €
	Baño termostatzado	3,00	h	0,05 €	0,15 €
	Microscopio óptico invertido con cámara fotográfica	0,30	h	3,44 €	1,03 €
	Cámara Neubauer	0,30	h	0,01 €	0,00 €
	Fibronectina	0,17	mL	202,00 €	34,74 €
	Try/EDTA	3,00	mL	0,15 €	0,45 €
	DPBS	10,00	mL	0,11 €	1,10 €
	Medio basal	2,00	ud	20,91 €	41,82 €
	Plataformas TEG	24,00	ud	5,00 €	120,00 €
	Plataformas TEG-B	24,00	ud	5,00 €	120,00 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	3,00	h	12,00 €	36,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	467,93 €	14,04 €
Recursos auxiliares	3,00	%	481,97 €	14,46 €	
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 2.2'					496,43 €
2.3	Siembra para MTS	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	3,00	h	0,17 €	0,51 €
	Incubadora Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S	48,00	h	2,12 €	101,76 €
	Centrifugadora Eppendorf	0,10	h	3,63 €	0,36 €
	Baño termostatzado	3,00	h	0,05 €	0,15 €
	Microscopio óptico invertido con cámara fotográfica	0,30	h	3,44 €	1,03 €
	Cámara Neubauer	0,30	h	0,01 €	0,00 €
	Try/EDTA	3,00	mL	0,15 €	0,45 €
	DPBS	10,00	mL	0,11 €	1,10 €
	Medio basal	2,00	ud	20,91 €	41,82 €
	Medio con bórax	1,00	ud	6,40 €	6,40 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	3,00	h	12,00 €	36,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	199,58 €	5,99 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	205,57 €	6,17 €
	Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 2.3'				
2.4	Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	0,50	h	2,49 €	1,25 €
	Incubadora Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S	2,00	h	2,12 €	4,24 €
	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	1,90	h	0,17 €	0,32 €
	Medio MTS	1,00	ud	42,16 €	42,16 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	5,00	h	12,00 €	60,00 €

	Cotutor/a responsable del proyecto	3,00	h	20,00 €	60,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	167,97 €	5,04 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	173,01 €	5,19 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 2.4'					178,20 €
3. Ensayos de inmunofluorescencia					
3.1	Preparación buffers para inmunofluorescencia	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	0,50	h	0,17 €	0,09 €
	DPBS	150,00	mL	0,11 €	16,50 €
	Tritón	1,00	mL	1,05 €	1,05 €
	Horse Serum	2,50	mL	0,29 €	0,73 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	0,50	h	12,00 €	6,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,20	h	20,00 €	4,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	28,36 €	0,85 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	29,21 €	0,88 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 3.1'					30,09 €
3.2	Ensayo de inmunofluorescencia doble E-cadherina/N-cadherina	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	6,00	h	0,17 €	1,02 €
	Buffers para inmunofluorescencia	1,00	ud	30,09 €	30,09 €
	Anticuerpo anti- E-cadherina (rabbit anti-human)	2,60	µL	5,50 €	14,30 €
	Anticuerpo anti- N-cadherina (mouse anti-human)	6,00	µL	5,50 €	33,00 €
	Anticuerpo Alexa fluor 488 (goat anti-rabbit)	2,00	µL	5,55 €	11,10 €
	Anticuerpo Alexa fluor 555 (goat anti-mouse)	2,00	µL	5,50 €	11,00 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	6,00	h	12,00 €	72,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	4,00	h	20,00 €	80,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	252,51 €	7,58 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	260,08 €	7,80 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 3.2'					267,88 €
3.3	Ensayo de inmunofluorescencia NaBC1	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	4,00	h	0,17 €	0,68 €
	Buffers para inmunofluorescencia	1,00	ud	30,09 €	30,09 €
	Anticuerpo anti-NaBC1 (rabbit anti-human)	1,00	µL	4,55 €	4,55 €
	Anticuerpo Alexa fluor 488 (goat anti-rabbit)	1,00	µL	5,55 €	5,55 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	4,00	h	12,00 €	48,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	98,87 €	2,97 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	101,83 €	3,05 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 3.3'					104,89 €

3.4	Observación del ensayo de inmunofluorescencia	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Servicio de microscopía	6,00	h	15,00 €	90,00 €
	Aceite de inmersión	1,90	mL	0,90 €	1,71 €
	Microscope slides VWR frosted	3,00	ud	0,65 €	1,95 €
	Cubreobjetos dotalab 100 uds	3,00	ud	0,42 €	1,26 €
	Vectashield + DAPI	3,00	mL	12,75 €	38,25 €
	Cámara digital para inmunofluorescencia	6,00	h	3,44 €	20,64 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	6,00	h	12,00 €	72,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	225,81 €	6,77 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	232,58 €	6,98 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 3.4'					239,56 €
4. Ensayos de colocalización					
4.1	Preparación buffers para colocalización	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	0,50	h	0,17 €	0,09 €
	DPBS	150,00	mL	0,11 €	16,50 €
	Tritón	1,00	mL	1,05 €	1,05 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	0,50	h	12,00 €	6,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	0,50	h	20,00 €	10,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	33,64 €	1,01 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	34,64 €	1,04 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 4.1'					35,68 €
4.2	Ensayo de colocalización	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Cabina Clase II Bio II Advance Plus (Telstar)	6,00	h	0,17 €	1,02 €
	Buffers para co-localización	1,00	ud	35,68 €	35,68 €
	DUOLINK Proximity Ligation Assay	0,50	ud	275,00 €	137,50 €
	Anticuerpo anti-NaBC1 (rabbit anti-human)	18,00	µL	4,55 €	81,90 €
	Anticuerpo anti-VEGFR (rabbit anti-human)	1,50	µL	5,00 €	7,50 €
	Anticuerpo anti-EGFR (rabbit anti-human)	2,40	µL	5,80 €	13,92 €
	Anticuerpo anti-FGFR (rabbit anti-human)	3,00	µL	5,80 €	17,40 €
	Anticuerpo anti-α5 (rabbit anti-human)	1,20	µL	6,15 €	7,38 €
	Anticuerpo anti-αv (rabbit anti-human)	1,20	µL	5,85 €	7,02 €
	Anticuerpo anti-uPAR (rabbit anti-human)	1,50	µL	5,50 €	8,25 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	6,00	h	12,00 €	72,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	6,00	h	20,00 €	120,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	509,57 €	15,29 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	524,86 €	15,75 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 4.2'					540,61 €
4.3	Observación del ensayo de colocalización	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial

ud	Servicio de microscopía	6,00	h	15,00 €	90,00 €
	Aceite de inmersión	1,90	mL	0,90 €	1,71 €
	Microscope slides VWR frosted	3,00	ud	0,65 €	1,95 €
	Cubreobjetos deltalab 100 uds	3,00	ud	0,42 €	1,26 €
	Vectashield + DAPI	3,00	mL	12,75 €	38,25 €
	Cámara digital para inmunofluorescencia	6,00	h	3,44 €	20,64 €
	Graduado/a en ing. Biomédica	6,00	h	12,00 €	72,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	6,00	h	20,00 €	120,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	345,81 €	10,37 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	356,18 €	10,69 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 4.3'					366,87 €
5. Costes informática					
5.1	Software	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Graph Pad Prism 9	3,00	Licencia	13,50 €	40,50 €
	Microsoft Office 365 Personal	1,00	Licencia	69,00 €	69,00 €
	Fiji ImageJ	1,00	Licencia	- €	- €
	Costes indirectos	3,00	%	109,50 €	3,29 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	112,79 €	3,38 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 5.1'					116,17 €
6. Equipos de protección individual y seguridad					
6.1	EPIs (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Bata de laboratorio	2,00	ud	23,90 €	47,80 €
	Caja de guantes de látex (100 uds)	2,00	ud	5,85 €	11,70 €
	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	1,00	ud	41,10 €	41,10 €
	Costes indirectos	3,00	%	100,60 €	3,02 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 6.1'					103,62 €
7. Material inventariable/fungible					
7.1	Material inventariable/fungible	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
ud	Micropipeta 100-1000µL	1,00	ud	75,00 €	75,00 €
	Micropipeta 2-200µL	1,00	ud	75,00 €	75,00 €
	Micropipeta 5-20µL	1,00	ud	75,00 €	75,00 €
	Puntas de micropipeta 100-1000µL	300,00	ud	0,03 €	9,00 €
	Puntas de micropipeta 2-200µL	200,00	ud	0,04 €	8,00 €
	Puntas de micropipeta 5-20µL	200,00	ud	0,01 €	2,00 €
	Punta pipeta 25 mL	16,00	ud	0,47 €	7,52 €
	Punta pipeta 5 mL	20,00	ud	0,19 €	3,80 €
	Puntas pipeta 10 mL	20,00	ud	0,21 €	4,20 €
	Pinzas laboratorio	1,00	ud	8,99 €	8,99 €
	Tubo falcon 50 mL	80,00	ud	0,12 €	9,60 €
	Tubo falcon 15 mL	80,00	ud	0,10 €	8,00 €
	Eppendorf 1 mL	20,00	ud	0,07 €	1,40 €
	Placa cultivo p-24 estéril	30,00	ud	1,95 €	58,50 €
	Placa cultivo p-96 estéril	2,00	ud	2,00 €	4,00 €
	Papel de aluminio	1,00	ud	2,30 €	2,30 €

	Flascon cultivo T25	4,00	ud	0,12 €	0,48 €
	Flascon cultivo T75	12,00	ud	1,45 €	17,40 €
	Costes indirectos	3,00	%	370,19 €	11,11 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 7.1'					381,30 €
8. Reuniones del proyecto					
8.1	Reuniones de planificación	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
h	Graduado/a en ing. Biomédica	25,00	h	12,00 €	300,00 €
	Tutor/a responsable del proyecto	20,00	h	45,00 €	900,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	25,00	h	20,00 €	500,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	1.700,00 €	51,00 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.751,00 €	52,53 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 8.1'					1.803,53 €
8.2	Reuniones de resultados	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
h	Graduado/a en ing. Biomédica	25,00	h	12,00 €	300,00 €
	Tutor/a responsable del proyecto	15,00	h	45,00 €	675,00 €
	Cotutor/a responsable del proyecto	25,00	h	20,00 €	500,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	1.475,00 €	44,25 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.519,25 €	45,58 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 8.2'					1.564,83 €
8.3	Redacción y correcciones	Cantidad	Unidad	Precio unitario	Precio parcial
h	Graduado/a en ing. Biomédica	95,00	h	12,00 €	1.080,00 €
	Costes indirectos	3,00	%	1.080,00 €	32,40 €
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.112,40 €	33,37 €
Precio descompuesto total del 'Subcapítulo 8.3'					1.145,77 €

CUADRO PRESUPUESTOS PARCIALES

En el cuadro de presupuestos parciales (Tabla 11) se recoge el presupuesto agrupado por cada capítulo.

Tabla 11. Tabla de presupuestos parciales.

Código	Descripción capítulo				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio	Precio total
Capítulo 1	Preparación medios de cultivo				
1.1	Medio basal	ud	25	20,91 €	522,71 €
1.2	Medio congelación	ud	5	8,84 €	44,19 €
1.3	Medio con bórax	ud	10	6,40 €	63,96 €
1.4	Medio MTS	ud	8	42,16 €	337,28 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 1'					968,14 €
Capítulo 2	Cultivo celular y análisis resultados				
2.1	Subcultivo SW480	ud	10	166,20 €	1.661,97 €
2.2	Siembra en plataformas	ud	4	496,43 €	1.985,70 €
2.3	Siembra para MTS	ud	8	211,74 €	1.693,88 €
2.4	Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS	ud	8	178,20 €	1.425,58 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 2'					6.767,13 €
Capítulo 3	Ensayos de inmunofluorescencia				
3.1	Preparación buffers para inmunofluorescencia	ud	4	30,09 €	120,35 €
3.2	Ensayo de inmunofluorescencia doble E-cadherina/N-cadherina	ud	2	267,88 €	535,77 €
3.3	Ensayo de inmunofluorescencia NaBC1	ud	2	104,89 €	209,78 €
3.4	Observación del ensayo de inmunofluorescencia	ud	2	239,56 €	479,12 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 3'					1.345,02 €
Capítulo 4	Ensayos de colocalización				
4.1	Preparación buffers para colocalización	ud	2	35,68 €	71,37 €
	Ensayo de colocalización	ud	2	540,61 €	1.081,21 €
	Observación del ensayo de colocalización	ud	2	366,87 €	733,74 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 4'					1.886,32 €

Capítulo 5	Costes informática				
5.1	Software	ud	1	116,17 €	116,17 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 5'					116,17 €
Capítulo 6	Equipos de protección individual y seguridad				
6.1	EPIs	ud	1	103,62 €	103,62 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 6'					103,62 €
Capítulo 7	Material inventariable/fungible				
7.1	Material inventariable/fun-gible	ud	1	381,30 €	381,30 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 7'					381,30 €
Capítulo 8	Reuniones del proyecto				
8.1	Reuniones de planificación	ud	1	1.803,53 €	1.803,53 €
8.2	Reuniones de resultados	ud	1	1.564,83 €	1.564,83 €
8.3	Redacción y correcciones	ud	1	1.145,77 €	1.145,77 €
Presupuesto parcial 'Capítulo 8'					4.514,13 €

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN

Tabla 12. Presupuesto de ejecución material.

1. Preparación medios de cultivo	968,14 €
2. Cultivo celular y análisis de resultados	6.767,13 €
3. Ensayos de inmunofluorescencia	1.345,02€
4. Ensayos de colocalización	1.886,32 €
5. Costes informática	116,17 €
6. Equipos de protección individual y seguridad	103,62 €
7. Material inventariable/Fungible	381,30 €
8. Reuniones de proyecto	4.514,13 €

Presupuesto de ejecución material: **16.081,82 €**

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **DIECISÉIS MIL OCHENTA Y UN EUROS CON OCHENTA Y DOS CÉNTIMOS.**

Tabla 13. Presupuesto de ejecución por contrata.

Presupuesto de ejecución material	16.081,82 €
Gastos generales (13%)	2.090,64 €
Beneficio industrial (0%)	0,00 €
	<hr/>

Presupuesto de ejecución por contrata: **18.172,45 €**

El presupuesto de ejecución por contrata asciende a la cantidad de **DIECIOCHO MIL CIENTO SETENTA Y DOS CON CUARENTA Y CINCO CÉNTIMOS.**

Tabla 14. Presupuesto de base de licitación.

Presupuesto de ejecución por contrata	18.172,45 €
IVA (21%)	3.816,22 €
	<hr/>

Presupuesto base de licitación: **21.988,67 €**

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **VEINTIUN MIL NOVECIENTOS OCHENTA Y OCHO CON SESENTA Y SIETE CÉNTIMOS.**