

TESIS

**“INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE ERITROPOYETINA
RECOMBINANTE EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN UN MODELO
MURINO”**

Por

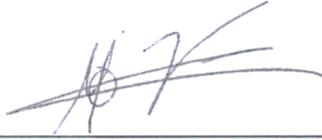
Q.B.P. PEDRO ALEJANDRO AVITIA RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2022

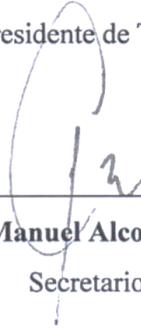
INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE
EN LA PROGRESION TUMORAL EN UN MODELO MURINO.

Comité de Tesis



Dr. José Alberto Valadez Lira

Presidente de Tesis



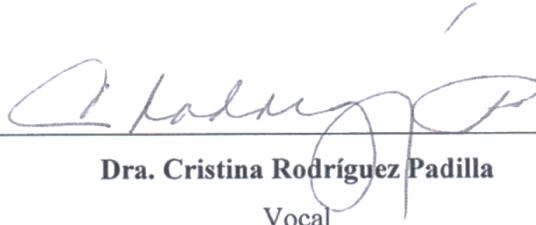
Dr. Juan Manuel Alcocer González

Secretario



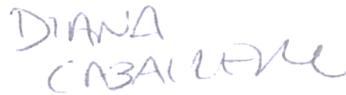
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Vocal



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



Dra. Diana Caballero Hernández

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE ERITROPOYETINA
RECOMBINANTE EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN UN MODELO MURINO**

Dirección de Tesis

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, positioned above a horizontal line.

Dr. José Alberto Valadez Lira

Director

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Inmunología molecular del Laboratorio de inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. José Alberto Valadez Lira.



AGRADECIMIENTOS

En primer instancia agradezco plenamente a todas las personas e instituciones que me apoyaron con la realización de este proyecto de investigación, a todos mis docentes para así poder obtener el grado académico de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

Agradezco de manera especial a mi tutor **Dr. José Alberto Valadez Lira** por permitir desarrollar este trabajo bajo su dirección. Gracias por su compromiso, paciencia y conocimientos que fueron puestos a mi disposición para crecimiento personal y profesional.

Gracias a la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, directora del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por el apoyo y el permiso de realizar mi tesis de maestría en este laboratorio.

Gracias a mi comité de tesis conformado por el **Dr. Juan Manuel Alcocer González**, la **Dra. Itza Eloisa Luna Cruz**, y a la **Dra. Diana Caballero Hernández** por su enriquecimiento profesional, consejos y sugerencias para el desarrollo del proyecto de tesis.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, **Daniel Terrazas, Azael Cavazos, Mónica Garza, Daniela Ríos, Yulissa Villanueva, Cecilia Rivas y Melissa Mellado** por su valioso apoyo en aspectos técnicos y estandarización de protocolos necesarios para el desarrollo del proyecto. Gracias por la compañía, la atención y los buenos momentos en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros de la maestría por valiosa compañía y consejos a lo largo del programa académico de posgrado. En especial, gracias a **Ana Luisa Rivera Lazarín, Paola García Coronado, Enrique Vásquez Cruz, Alejandra Reyes Ruiz y Juan Manuel Izaguirre** por todos los momentos que compartimos dentro y fuera de la institución haciendo memorable y grata la estancia.

Gracias a las personas que estuvieron cerca de mi, atentos siempre a mis necesidades emocionales y académicas, **Alondra Hernández Armendáriz** por ser una persona excepcional, integra, paciente e inspiradora, que siempre supo cómo orientarme a cada situación que se presentaba, **Tania Guadalupe Heredia Torres** por estar en momentos que pensé que nadie más podía aparecer y porque siempre supo dónde encontrar respuestas a preguntas que no tenían solución, **Edeer Iván Montoya Hinojosa** por ser un amigo incondicional y siempre tener los pies en la tierra, además de todos los momentos alegres y tristes que nos hicieron más cercanos. **Sergio Alonso Romo Marín** gracias por ser de mis amistades mas antiguasy estar disponible

con cualquier situación. Gracias infinitas para **Ricardo Romero** que siempre tenía el tiempo para ayudar en los procesos y los experimentos, por su habilidad para cuestionar los resultados y entender mejor los temas, por su amistad sincera y compañía; **Gabriel Cazarez Jaramillo** por inspirarme y ayudarme a tomar la decisión de salir de mi área de confort. Gracias a **Lucero Castro** y **Cristian Padilla** que son personas excepcionales que siempre están dispuestas a compartir su conocimiento y ayudar en lo que esté en su alcance. Gracias a **Rodolfo González Peña** por iniciar este proyecto conmigo y ser un gran amigo. Gracias a todos ustedes compañeros de facultad y compañeros de vida.

Gracias al pilar más grande, **mi familia**, por su apoyo, cariño y enseñanza incondicional. A mis abuelos, **Esperanza Rodríguez Castillo** y **Pedro Avitia Grado** por su amor, cariño confianza y sobre todo por creer siempre en mí, por los valores y principios inculcados. A mi madre, **Leticia Avitia Rodríguez** por brindarme todo lo necesario para llegar hasta este punto, por confiar y seguir impulsando y apoyando mi crecimiento personal y académico a pesar del tiempo y la distancia. A mis tías **Yolanda, Marina y Esperanza** que son como unas segundas madres, siempre atentas con sus consejos y su cariño. A mis primos que son como hermanos o incluso mejor.

Gracias al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para la realización y manutención de mis estudios de posgrado. Asimismo, agradezco al **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT)** por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, por ser aquellos quienes me han hecho florecer en este ecosistema llamado vida. En especial a mi mamá Esperanza, que es el ser más amable y amoroso que pude haber conocido, y que no pudo ver el final de esta historia.

ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA	III
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer y la importancia de estudio.....	3
2.2 Microambiente tumoral.....	4
2.3 Melanoma.....	4
2.4 Angiogénesis.....	5
2.5 Eritropoyetina (EPO).....	6
2.6 Receptor de eritropoyetina (EPOR).....	7
2.7 Eritropoyetinas recombinantes.....	9
2.8 Expresión de EPO y EPOR en células tumorales.....	10
2.9 Nanopartículas.....	10
2.10 Nanopartículas de Quitosán.....	11
2.11 Ensayo de herida para evaluar migración celular in vitro.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Caracterización de plásmido.....	16
6.4 Preparación de nanocomplejos de quitosano.....	17
6.5 Cultivo celular B16F10.....	17

6.6 Ensayo de viabilidad celular mediante el método del MTT.	18
6.7 Ensayo de herida para migración celular.	19
6.8 Evaluación <i>in vivo</i> de la influencia de EPO.....	19
6.9 Análisis de masa tumoral.	20
6.10 Determinación de ADN total Purificado.	20
6.11 Perfil de arreglo proteómico.	20
6.12 Análisis inmunológico.....	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Producción y caracterización de plásmido recombinante con gen y sin gen de EPO.	22
7.2 Establecimiento de melanoma murino B16F10 en ratón C57Bl/6	24
7.3 Análisis tumoral post-disección.	29
7.6 Ensayo de arreglo proteómico.	39
7.7 Análisis inmunológico por citometría de flujo.....	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	56
11 REFERENCIAS	57
12 ANEXO 1	65
RESUMEN BIOGRÁFICO	66
Pedro Alejandro Avitia Rodríguez.....	66
Candidato para el grado de:	66
Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología	66
Tesis:	66

Campo de estudio: Inmunobiología	66
Biografía:	66
Datos personales: Nacido en Chihuahua, Chihuahua, el 10 de Septiembre de 1993, hijo de Leticia Avitia Rodríguez.....	66
Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido: Licenciado Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2016.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Vías de señalización mediadas por eritropoyetina	8
2. Plásmido pcDNA3.1+P2A-eGFP.	22
3. Electroforesis del plásmido pcDNA3.1+P2A-eGFP con y sin gen de EPO en gel de agarosa al 0.8%.	23
4. Caracterización de plásmidos por enzimas de restricción en geles de agarosa al 0.8%. ...	24
5. Consumo de alimento diario por grupo de tratamiento establecido.	25
6. Peso registrado de los ratones.	26
7. Imágenes termográficas a lo largo del protocolo de intervención.	26
8. Tamaño tumoral antes del sacrificio.	27
9. Valores obtenidos de una biometría hemática.	28
10. Peso de tumor extirpado después del sacrificio.	29
11. Tumores extirpados.	30
12. Cortes histológicos de tumor de los diferentes ratones.	31
13. Comparación de radio tumoral entre tratamientos.	32
14. Inflamación de cada grupo de tratamiento.	33
15. Ensayo de herida pcDNA3.1c/EPO.	34
16. Ensayo de herida pcDNA3.1s/EPO.	35
17. Ensayo de herida rHuEPO.	36
18. Ensayo de herida quitosán.	37
19. Efecto citotóxico rHuEPO, pcDNA3.1c/EPO y s/EPO, quitosán y ConA ante la línea celular B16F10.	38
20. Mapa de proteínas por membrana del kit de arreglo proteómico de angiogénesis en ratón.	39
21. Analitos detectados en muestras de lisados tumorales.	40
22. Analisis comparativo y relativo de proteínas expresadas	41
23. Expresión de citocinas pro-inflamatorias en el suero de ratones C57BL/6.	42

Nomenclatura

°C Grados Celsius

cm² centímetros cuadrados

mm Milímetros

μL Microlitro

mL Mililitro

μg Microgramo

nm Nanómetro

min Minutos

v Voltios

mA MiliAmperes

UV Ultravioleta

INF Interferón

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

DMEM/F12 Medio Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO Dimetilfulfoxido

MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ConA Concavalina

EPO Eritropoyetina

EPOR Receptor de eritropoyetina

rHuEPO Eritropoyetina recombinante humana

SBS Suero fetal bovino

FDA Food Drug Administration

HIF-1 α Factor1-hipoinducible hipoxia

CO₂ Dióxido de carbono

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular

IL Interleucina

ADAMTS1 Desintegrina y metaloproteinasa con motivo de trombospondina 1

MCP-I Quimiocina atrayente de monocitos 1

MMP-9 Proteínas de la familia de metaloproteasas 9

IGFBP-1 Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1

IGFBP-2 Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 2

IGFBP-3 Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina

Resumen

El cáncer es un proceso multicausal y mutagénico, se desarrolla por acumulación de lesiones de un número limitado de genes, determinando un desbalance entre genes de proliferación y genes supresores de tumor. El cáncer es una enfermedad que afecta a diversos órganos y tiene un índice muy elevado de mortalidad. El inicio del cáncer se debe a varios tipos de mutagénesis genética espontánea e inducida, algunos de los cuales incluyen patrones de glicosilación alterados, ganancia o pérdida de cromosomas. Eritropoyetina EPO es una hormona glicoproteica, es uno de los factores estimulantes más importantes para la eritropoyesis, que promueve la proliferación y previene la apoptosis de los precursores eritroides que permiten la diferenciación en glóbulos rojos madurados. La eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) puede prevenir la anemia mediada por quimioterapia y radioterapia en pacientes con tumores y mejorar la calidad de vida, sin embargo, se ha visto una relación entre la eritropoyetina (EPO) y la angiogénesis, esto sugiere que puede ser un agente potencial para la progresión de cáncer o de células tumorales, además en este mismo tipo de células; (rHuEPO) puede estimular la proliferación celular, la supervivencia de estas células y la resistencia a cierto tipo de fármacos. Así mismo, la EPO también se ha relacionado con efectos anti apoptóticos, efecto que podría ayudar a reducir la progresión de algunos tumores. El receptor EPO (EPOR) pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas y ejerce sus efectos a través de la homodimerización del receptor, la posterior fosforilación de JAK2 y la activación de transductores de señales y activadores de la transcripción 3 y 5 (STAT3/5). El objetivo de esta investigación es conocer la influencia de la administración de la eritropoyetina recombinante murina integrada en un plásmido en un modelo murino (C57BL/6). Dichos Ratones serán implantados con un tumor de melanoma B16F10 y recibirán un tratamiento con Eritropoyetina recombinante para observar progresión o disminución del tumor, a su vez se evaluarán otros efectos secundarios como la inflamación y producción de citocinas. Los resultados ofrecerán un panorama más amplio sobre el uso de la rHuEPO en terapia génica y su participación en la activación de la respuesta inmunológica.

Abstract

Cancer is a multicausal and mutagenic process, it is developed by an accumulation of injuries in a number limited of genes determining an imbalance between proliferation and suppressor genes. Cancer affects different organs and has a very high mortality rate. Onset is due to various types of spontaneous and induced genetic mutagenesis, some of which include altered glycosylation patterns, chromosome gain or loss. Erythropoietin EPO is a glycoprotein hormone, it is one of the most important stimulating factors for erythropoiesis, which promotes proliferation and prevents apoptosis of erythroid precursors that allow differentiation into matured red blood cells. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) can prevent anemia mediated by chemotherapy and radiotherapy in patients with tumors and improve quality of life, however, a relationship between erythropoietin (EPO) and angiogenesis has been seen, this suggests that EPO may be a potential agent for the progression of cancer or tumor cells, also in this same type of cells; (rHuEPO) can stimulate cell proliferation, survival of these cells and resistance to certain types of drugs. Likewise, EPO has also been linked to anti-apoptotic effects, an effect that could help reduce the progression of some tumors. The objective of this research is to know the influence of the administration of recombinant human erythropoietin integrated into a plasmid in a murine model (C57BL / 6). These mice were implanted with a B16F10 melanoma tumor and received treatment with recombinant erythropoietin, plasmid with erythropoietin gene, and plasmid without gene to observe tumor progression or decrease, in turn, other side effects such as inflammation, histological sections and cytokine production will be evaluated. The results obtained demonstrate a direct relationship between tumor development and the purified protein, as well as the gene. The histological sections did not show clear results, but the cell line could be described, it is recommended to use a cell line that produces a more solid tumor.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso multicausal y mutagénico, se desarrolla por acumulación de lesiones de un número limitado de genes, determinando un desbalance entre genes de proliferación y genes supresores de tumor. Estas lesiones pueden ser causadas por factores exógenos o endógenos. El cáncer es un problema de salud pública en los estados unidos, actualmente una de cada 4 muertes en estados unidos es debido al cáncer. En México es la tercera causa de muerte con un 12 % en las defunciones totales. El inicio del cáncer se debe a varios tipos de mutagénesis genética espontánea e inducida, algunos de los cuales incluyen patrones de glicosilación alterados, ganancia o pérdida de cromosomas. La aparición del cáncer puede iniciarse por factores hereditarios, factores ambientales como la dieta, la exposición a ciertos químicos (carcinógenos) o la radiación, y las opciones de estilo de vida como fumar también son factores contribuyentes.

La síntesis de melanina es la función más importante y la característica de diferenciación de los melanocitos. La melanina protege la piel del daño de la radiación ultravioleta. El melanoma es un tipo de cáncer de piel, se origina a partir de la mutación del melanocito, las células productoras de pigmento en la piel.

Melanoma B16F10 es un melanoma murino que se ha utilizado como modelo de investigación para cánceres de piel en humanos.

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína producida en el hígado fetal y en el riñón adulto, es el principal regulador de la eritropoyesis. Fue aislada por primera vez en 1977 en orina humana y 4 años después fue aprobada por la FDA para su uso comercial. Dentro de sus principales funciones, destaca la regulación, la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores y la maduración de los precursores eritrocíticos, creyéndose anteriormente que esta era su única función biológica. La expresión del gen de la EPO humana está regulada principalmente por la hipoxia. Se ha reportado que la EPO induce a la fosforilación de los miembros de la familia de las proteínas-quinasas activadas por mitógenos como erk-1/2. Aunque se ha encontrado aumento en la fosforilación y de la activación de quinasas de señalización en células tumorales en respuesta a tratamientos con EPO aún no se ha llegado a un consenso sobre su papel en la proliferación de tumores.

La EPO también es conocida por su efecto angiogénico, antiinflamatorio, estabilizador de células endoteliales y efectos neuroprotectores. También participa en reparación de lesiones y regeneración de tejidos a través de su receptor de eritropoyetina (EPOR). La expresión, y en algunos casos la funcionalidad, de un eje EPO / EPOR extrahematopoyético se ha demostrado en muchas líneas de cáncer y se ha observado que tanto la EPO como la EPOR están relacionadas con el crecimiento, migración y la invasividad de células cancerosas en distintas neoplasias malignas humanas. El receptor EPO (EPOR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas y ejerce sus efectos a través de la homodimerización del receptor, la posterior fosforilación de JAK2 y la activación de transductores de señales y activadores de la transcripción 3 y 5.

Estudios han demostrado que el uso de la eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO), que se ha utilizado como tratamiento a la anemia inducida por quimioterapias ya que disminuye la necesidad de transfusiones sanguíneas, puede aumentar la progresión del tumor o disminuir la supervivencia del paciente, esto debido a que rHuEPO puede estimular la proliferación celular, la supervivencia de estas células y la resistencia a cierto tipo de fármacos. El objetivo de esta investigación es conocer la influencia de la administración de la eritropoyetina en un modelo murino. Ratones serán implantados con un tumor de melanoma B16F10 y recibirán un tratamiento con EPO para observar si hay un progresión o disminución del tumor, a su vez que se evalúan otros efectos secundarios como la inflamación y producción de citocinas.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Cáncer y la importancia de estudio.

El cáncer es un proceso multicausal y multigénico, se desarrolla por acumulación de lesiones de un número de genes, determinando un desbalance entre genes de proliferación y genes supresores de tumor. Estas lesiones pueden ser causadas por factores exógenos o endógenos (National cancer institute).

En comparación a nivel mundial, México tiene bajas tasas de mortalidad por cáncer si se considera toda la población (70 por 100 mil habitantes), siendo de las tasas más bajas del continente americano. Las transiciones y los estilos de vida conducirán al incremento de la mortalidad por neoplasias en los próximos años (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2017).

El inicio del cáncer se debe a varios tipos de mutagénesis genética espontánea e inducida, algunos de los cuales incluyen patrones de glicosilación alterados, ganancia o pérdida de cromosomas y translocación, los patrones de glicosilación alterados contribuyen a la heterogeneidad del cáncer al regular el crecimiento de las células cancerosas a través de la glicosilación de ciertos receptores del factor de crecimiento (Pinho y Reis, 2015). Alteraciones epigenéticas como la metilación del ADN también juegan un rol en la patogénesis del cáncer (Sharma *et al.*, 2010).

La aparición del cáncer puede iniciarse por factores hereditarios, factores ambientales como la dieta, la exposición a ciertos químicos (carcinógenos) o la radiación, y las opciones de estilo de vida como fumar también son factores contribuyentes. Si bien la causa subyacente de muchos de estos cánceres puede atribuirse a mutaciones genéticas heredadas o adquiridas, la patogénesis del cáncer varía mucho según el tejido u órgano afectado (Pandya *et al.*, 2016). El mecanismo por el cual se produce la metástasis implica que ciertas células transformadas puedan desprenderse del crecimiento del cáncer primario (neoplasma) y viajar a través de otros sitios mediante el flujo linfático o la circulación sanguínea (Lodish *et al.*, 2000) y utilice la quimiotaxis para permitirles migrar a otros lugares. Mientras que no todas las células cancerosas en circulación sobreviven, las que sí sobreviven pueden unirse al revestimiento de las células endoteliales de las vénulas capilares / vasos sanguíneos y migrar al tejido / órgano

secundario mediante señalización y estas células cancerosas pueden proliferar a través de mecanismos inductores de angiogénesis (Reymond *et al.*, 2013; Rundhaug, 2003). El ambiente hipóxico de los cánceres induce la expresión de proteínas tales como el factor 1-hipoinducible hipóxia (HIF-1 α) que puede regular la expresión de factores de crecimiento angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Nishida *et al.*, 2006).

El cáncer o el tumor pueden originarse en varios tipos de tejidos como el epitelio, el mesénquima (tejido conectivo / huesos) o las glándulas y, según su lugar de origen, se les conoce como carcinoma, sarcoma o adenocarcinoma (Blanpain, 2013). Debido a la naturaleza compleja y la heterogeneidad presente en la patogénesis del cáncer, el tratamiento para cualquier tipo particular de cáncer es difícil de desarrollar. Sin embargo, se han logrado grandes avances en el desarrollo de terapias que se dirigen a los seis sellos distintivos del cáncer: evadir los supresores del crecimiento, activar la invasión y metástasis, que permiten la inmortalidad replicativa, inducen angiogénesis, resisten la muerte celular y sostienen la señalización proliferativa (Hanahan y Weinberg, 2011); la vía más beneficiosa sería comprender y dirigirse a un jugador clave común que está presente en el cáncer en general (Pandya *et al.*, 2016).

2.2 Microambiente tumoral.

Es un ecosistema dentro del tumor, el cual se mantiene gracias a la presencia de diferentes estirpes celulares que interactúan en pro o contra del tumor. Está compuesto por células endoteliales, fibroblastos, células perivasculares y células inflamatorias que regulan el proceso tumorigénico: angiogénesis, desmoplasia e inflamación.

Está bien documentado que los tumores humanos son generalmente infiltrados por células inflamatorias (T. L. Whiteside, 2006). La capacidad de bloquear el escape del tumor depende de una mejor comprensión de las vías celulares y moleculares que operan en el microentorno del tumor (T. Whiteside, 2008).

2.3 Melanoma.

La síntesis de melanina es la función más importante y la característica de diferenciación de los melanocitos. La melanina protege la piel del daño de la radiación ultravioleta; Sin embargo, el exceso de expresión o la distribución desigual de la melanina puede causar cloasma, pecas

e hiperpigmentación postinflamatoria (de Fine Olivarius *et al.*, 1999; Mizusawa *et al.*, 2011). La vía de síntesis de la melanina es un proceso altamente complejo regulado por enzimas como la tirosinasa, la proteína relacionada con la tirosinasa 1 y la proteína relacionada con la tirosinasa 2 (J. H. Lee *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2010).

El melanoma es un tumor altamente vascularizado. Lo reportado sobre la importancia de la angiogénesis en el melanoma es controvertida. Aunque algunos estudios han informado que el área microvascular fue significativamente mayor en los melanomas que habían hecho metástasis en los ganglios linfáticos o en sitios distantes en comparación con sus contrapartes no metastásicas (Neitzel *et al.*, 1999), otros no han mostrado correlación entre la angiogénesis y ya sea recurrencia o metástasis en melanoma (Busam *et al.*, 1995). El grado de angiogénesis en el melanoma humano depende de la acción de varias moléculas angiogénicas y antiangiogénicas, incluido el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Meier *et al.*, 2000), interleucina 3 (IL-3) e interleucina 8 (IL-8) (Reed *et al.*, 1996), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bayer-Garner *et al.*, 1999) y triptasa (D Ribatti *et al.*, 2003).

Melanoma B16 es un melanoma murino que se ha utilizado como modelo de investigación para cánceres de piel en humanos (Ribatti *et al.*, 2010).

2.4 Angiogénesis.

El proceso de angiogénesis también denominado como “la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes” es un marcador de reparación celular, expansión y remodelación en procesos fisiológicos como cicatrización de heridas, ovulación y desarrollo embrionario, y en diversas patologías que incluyen cáncer, aterosclerosis e inflamación crónica. (Bikfalvi, 2017; Carmeliet y Jain, 2011).

Los vasos sanguíneos liberan oxígeno y nutrientes a cada parte del cuerpo, eliminan los desechos y proporcionan puertas de entrada para circular las células inmunes. Sin embargo, también nutren el cáncer y muchas otras enfermedades, incluida la degeneración macular relacionada con la edad, la principal causa de pérdida de visión en los ancianos. (Folkman, 2007). En la mayoría de los cánceres, el crecimiento de los vasos no sólo se estimula, sino que estos vasos también son anormales en casi todos los aspectos de su estructura y función. (Jain, 2001; Nagy *et al.*, 2010).

Los vasos tumorales anormales también pueden impedir la función de las células inmunitarias en los tumores, así como el transporte y/o distribución de quimioterapéuticos y oxígeno. Como resultado, la vasculatura tumoral anormal también puede conducir a una resistencia de las células tumorales a la radioterapia y a muchos quimioterapéuticos. Además, la hipoxia sobre expresa la producción de factores angiogénicos por el cáncer y las células estromales. Las estrategias tradicionales de "bloqueo de vasos" antiangiogénicos intentan inhibir la formación de nuevos vasos y/o destruir los vasos existentes para privar al tumor de sus nutrientes. (Crawford y Ferrara, 2009; Folkman, 1971).

2.5 Eritropoyetina (EPO).

El gen de Eritropoyetina (EPO) humano abarca mas de 3 kb y posee 5 exones codificantes para 193 aminoácidos (Debeljak *et al.*, 2014). Durante la modificación post-traducción, un péptido de señal de 27 aminoácidos se escinde dando como resultado una proteína de 165 aminoácidos (Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997).

La eritropoyetina fue aislada en orina humana en el año de 1977 (Miyake *et al.*, 1977). Cuando se descubrió, se creía que solo poseía una sola función biológica, regular la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores y la maduración de los precursores eritrocíticos (Arcasoy, 2008a).

En los adultos, la eritropoyetina es producida en la corteza renal (Bachmann *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1997), mientras que en el feto en desarrollo la producción es en el hígado (Juul *et al.*, 1998). La expresión del gen de la EPO humana está regulada principalmente por la hipoxia. La hipoxia produce la transactivación de múltiples genes que codifican proteínas involucradas en la eritropoyesis, así como en el metabolismo del hierro y la glucosa. EPO ejerce efectos antiinflamatorios y promueve la movilización de células progenitoras endoteliales y la angiogénesis. Además, se ha informado que la EPO modula la polarización de macrófagos (Wang *et al.*, 2017), es importante destacar que la gran mayoría de estos productos genéticos están sobreexpresados en células tumorales humanas (Semenza, 2000). En los tumores sólidos, como los cánceres de mama y cervical, tanto la EPO como la EPOR se expresan en los niveles más altos en las áreas más hipóxicas, lo que lleva a la especulación

de que la expresión de EPOR (tanto el mRNA como la proteína) también pueden aumentar con la hipoxia (Acs *et al.*, 2003; Acs *et al.*, 2002).

La EPO endógena (intracelular) puede tener acceso tanto a la EPOR de superficie como a la citoplásmica, aunque todavía falta evidencia directa de esto. Se cree que un bucle autocrino / paracrino EPO / EPOR funcional puede desencadenar vías de señalización que podrían modular potencialmente la sensibilidad a los medicamentos y la radiación al inicio del proceso de transformación maligna, mucho antes de un diagnóstico real de cáncer y / o una intervención terapéutica (Szenajch *et al.*, 2010).

2.6 Receptor de eritropoyetina (EPOR).

La eritropoyetina y su receptor (EPOR) se han identificado en distintas células y tejidos no hematopoyéticos como sistema nervioso central, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, tracto reproductivo, en el endotelio entre otros (Arcasoy, 2008b; Jelkmann y Wagner, 2004; Maiese *et al.*, 2005), se ha visto que un efecto de la EPO es proteger a estos tejidos de manera antiapoptótica o mitogénica.

La vía clásica de señalización de la EPO en la eritropoyesis una molécula de EPO se une a su receptor de EPOR llevando a cabo la cascada de señalización EPO-EPOR. La EPO tiene 2 sitios de unión no idénticos hacia los receptores de EPOR (Philo *et al.*, 1996). Principales vías de señalización activadas por la EPO son: JAK2/STAT5, fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), RAS/MAP cinasa y proteína cinasa C (PKC) (Debeljak *et al.*, 2014) (figura 1). STAT5 (o STAT3), una vez que se une a su sitio de acoplamiento en la región citoplasmática de EPOR (tirosina fosforilada), a su vez es fosforilada por JAK2, homodimeriza y transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción génica. La proteína G RAS, activada por varias proteínas adaptadoras unidas a la EPOR fosforilada en tirosina, actúa a su vez como un interruptor digital, estimulando las vías de transducción de señales RAF / MEK / ERK y PI3K / AKT (Chen y Sytkowski, 2001).

JAK2/STAT5 y RAS/MAP están asociadas con la acción mitogénica de la hormona mientras que PI3K está relacionada con actividades antiapoptóticas (Sytkowski, 2006). Se han sugerido más receptores de EPO para tejidos no hematopoyéticos como el receptor común beta (β R) y el receptor B4 de epinefrina (EPHB4) (Brines *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2012). También se

ha postulado un heterodímero EPOR-βcR para explicar los efectos protectores del tejido de la EPO en tumores (Sytkowski, 2007; Um *et al.*, 2007).

Resultados experimentales indican que la regulación negativa de la EPOR activa es disfuncional en las células tumorales o se altera en comparación con la de las células eritroides (Dunlop *et al.*, 2007).

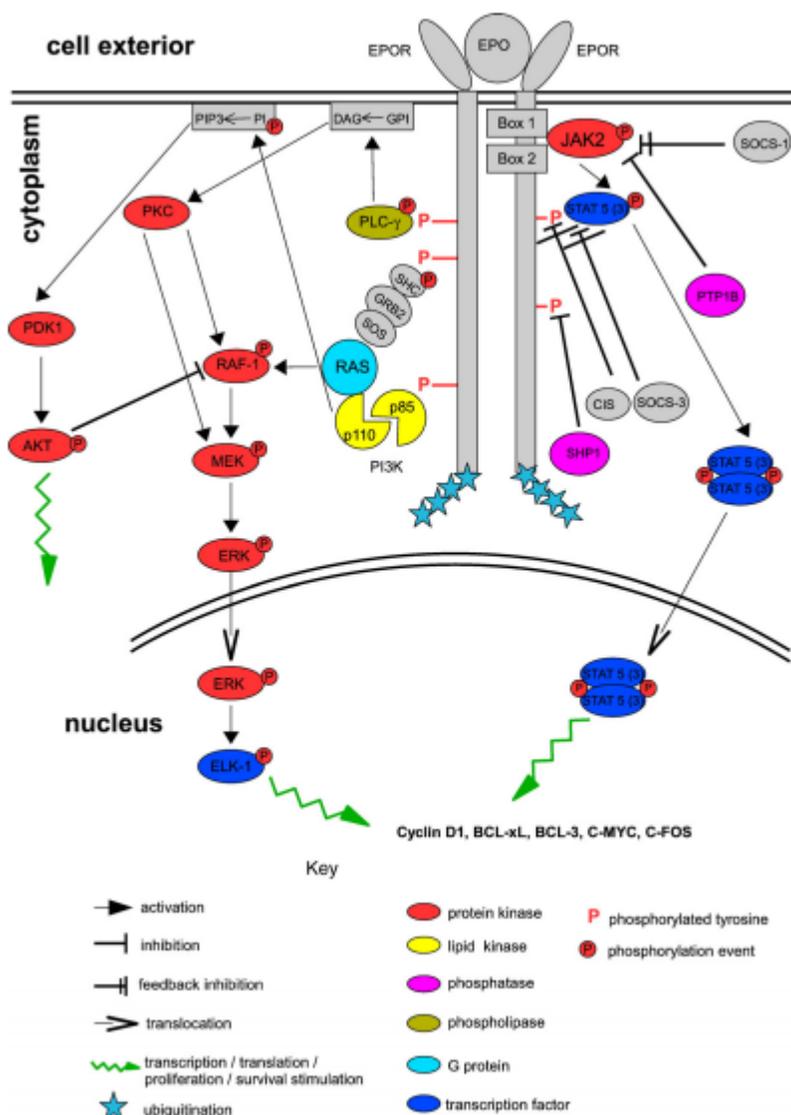


Figura 1. Vías de señalización mediadas por eritropoyetina (Szenajch *et al.*, 2010).

2.7 Eritropoyetinas recombinantes

En varios estudios pre-clínicos y clínicos se está explorando el uso potencial de la EPO recombinante (rHuEPO) para usarla como agente protector de tejido, y cicatrización de heridas en cerebro y corazón (Mastromarino *et al.*, 2013; Sorg *et al.*, 2013).

Además de estos efectos y estas localizaciones mencionadas, la EPO también se ha encontrado en algunos tipos de tumores y células malignas (Jeong *et al.*, 2008). Si bien el tratamiento con EPO ha reducido significativamente la necesidad de transfusiones y ha mejorado la calidad de vida en general para muchos pacientes con cáncer, los informes de varios ensayos clínicos recientes sugieren que las dosis terapéuticas de EPO pueden promover una metástasis tumoral posterior (Arcasoy, 2008a).

A pesar que se ha confirmado que el receptor de EPO está presente en muchas células tumorales, aun se debate sobre los efectos estimulantes de la EPO en estas células, por un lado hay artículos que señalan respuestas proliferativas de células cancerosas después de ser sometidas a un tratamiento con rHuEPO (Feldman *et al.*, 2006; Trošt *et al.*, 2013) y por otra parte, algunas células tumorales a pesar de esta evidencia en la funcionalidad de EPOR, no mostraron una respuesta de crecimiento (Jeong *et al.*, 2008; Shiozawa *et al.*, 2013). Aunque el eje de la vía EPO-EPOR no siempre conlleva a un aumento en la proliferación, puede aumentar la resistencia de las células cancerosas a diferentes terapias (Szenajch *et al.*, 2010).

Además, es sabido que la EPO induce un fenotipo proangiogénico en células endoteliales cultivadas y estimula la neovascularización en la membrana corioalantoidea del pollo (Ribatti *et al.*, 1999).

EPO induce la proliferación de células cancerosas en las vías de señalización JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5 pero no en JAK1 o STAT1 (Lopez *et al.*, 2011).

Existen 2 mecanismos diferentes en los cuales una terapia con rHuEPO promueve la progresión y reduce la supervivencia de algunos pacientes con cáncer. (McKinney y Arcasoy, 2011). (1) Terapias con rHuEPO pueden ejercer efectos locales en los tumores, esto actuando directamente sobre las células tumorales u otro tipo de células en el microentorno del tumor. (2) rHuEPO puede causar efectos sistémicos que afecten indirectamente la biología del tumor de una forma no favorable o dar lugar a toxicidades sistémicas que impidan la

supervivencia. Hemoglobina elevada, activación de plaquetas y efectos inmunomoduladores podrían desempeñar funciones inflamatorias (Debeljak *et al.*, 2014).

2.8 Expresión de EPO y EPOR en células tumorales.

El ARNm de EPOR se expresó en más del 90% de las 65 líneas celulares de melanoma que probaron (Kumar *et al.*, 2012b). La expresión, y en algunos casos la funcionalidad, de un eje EPO / EPOR extrahematopoyético se ha demostrado en líneas celulares de cáncer (Yasuda *et al.*, 2003) y en tumores de diferente origen como cáncer de pulmón en células no pequeñas (E. Dunlop *et al.*, 2006); carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Arcasoy, Amin, Chou, *et al.*, 2005); carcinoma de células renales (Papworth *et al.*, 2009) y carcinomas de mama, prostata y gástrico (Arcasoy *et al.*, 2002; Arcasoy, Amin, Vollmer, *et al.*, 2005; Domenico Ribatti *et al.*, 2003). Alteraciones en el eje EPO / EPOR pueden estar involucradas en el proceso de transformación maligna (Szenajch *et al.*, 2010).

Diferencias en las respuestas de crecimiento y / o supervivencia a la EPO exógena pueden ocurrir no solo por el órgano de origen de las células, sino también entre múltiples líneas celulares derivadas del mismo órgano. Por ejemplo, se demostró que la rhEPO estimula la proliferación de líneas celulares Caki-2 y 786-0 pero no las líneas celulares Caki-1 y ACHN, aunque las cuatro líneas se derivaron de RCC (W. M. Liu *et al.*, 2004; Westenfelder y Baranowski, 2000).

2.9 Nanopartículas.

Definidas como partículas que presentan un tamaño pequeño (1-100 nm), el cual es medido a una escala nanométrica, han sido implementadas en diferentes áreas de la investigación, debido que se caracterizan por tener distintas propiedades que las hacen adecuadas para una tarea en específico. El tamaño nanométrico les permite involucrarse en distintos procesos biológicos e interactuar con las moléculas, otra cualidad que es dependiente del tamaño de la nanopartícula es la determinación de ser partículas magnéticas, catalíticas, termodinámicas o electroquímicas, además, dependiendo del material con el que están elaboradas las nanopartículas también se determina las propiedades físicas y químicas específicas que presentarán. Una de las características que presentan las nanopartículas es el poder evadir el sistema retículo endotelial, debido a que es posible manipular la composición de su superficie así como el tamaño (Faraji y Wipf, 2009; Sanvicens y Marco, 2008).

2.10 Nanopartículas de Quitosán.

El quitosán es uno de los polímeros naturales mayormente utilizados en la industria farmacéutica para la administración de fármacos debido a las propiedades que presenta, se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina que forma parte de los principales componentes que conforman las conchas de los crustáceos (Amidi *et al.*, 2010).

Se utiliza como material de gelificación de nanopartículas ya que posee grandes expectativas en transportar el fármaco de interés, además, de mejorar la cinética, absorción y liberación del fármaco al ser un material biocompatible y biodegradable por acción de lisozimas o por quitinasas (Rodrigues *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012)

Así mismo, el quitosán de bajo peso molecular puede brindar un beneficio en el tratamiento contra el cáncer al tener una actividad para poder reducir el crecimiento del tumor, y se ha demostrado que es soluble en agua, no presenta toxicidad, es biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y contribuye a mejorar la absorción de fármacos (Fan *et al.*, 2012). Otra función es que puede ejercer el quitosán es como portador de genes, ya que posee cargas positivas altas, presenta una toxicidad baja para las células, es capaz de proteger al ADN y puede incrementar el periodo de expresión de genes. (M. Lee *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012). El sistema implicado del quitosán como administrador de plásmidos fue descrito por primera vez por Mumper y colaboradores en 1995. Se ha determinado que no provoca daño al acumularse en el cuerpo, sin embargo, a pesar de no presentar toxicidad, si este se degrada a una alta velocidad puede acumularse causando una respuesta inflamatoria. (Baldrick, 2010; Rodrigues *et al.*, 2012)

En el 2014, Alvizo y colaboradores desarrollaron nanopartículas magnéticas de quitosán para el envío de genes, demostrando que este sistema presenta una alta eficiencia para la administración de plásmidos en la transfección de la línea celular B16F10 y de manera *in vivo* en tejido de pulmón.

2.11 Ensayo de herida para evaluar migración celular in vitro.

El ensayo de rayado *in vitro* es sencillo y económico, es un método para estudiar la migración celular *in vitro*. Este método se basa en la observación de que, tras la creación de una nueva brecha artificial, la llamada "herida", en una monocapa de células confluyente, las celdas en el borde de la brecha recién creada se moverán hacia la abertura para cerrar la herida hasta

que se establezcan nuevamente los nuevos contactos de las células. Los pasos básicos incluyen la creación de un "rasguño" en las células adheridas, captura de imágenes al principio e intervalos regulares durante la celda migración para cerrar la herida y comparación de las imágenes y determinar la tasa de migración celular(Liang *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN.

La eritropoyetina es una de las principales hormonas utilizadas para el tratamiento de anemias causadas por diferentes tipos de cáncer como el de mama, colorrectal y melanomas. Los efectos angiogénicos de esta hormona pueden favorecer la progresión de masas tumorales y características pro-apoptóticas aumentando el grado de supervivencia en pacientes tratados con EPO. Citocinas expresadas a partir del uso de EPO son capaces de activar mecanismos importantes en la respuesta inmune. Por lo que es de gran importancia determinar el efecto de EPO recombinante humana como modelo en un sistema tumoral y observar sus efectos en la progresión y activación del sistema de angiogénesis.

4. HIPÓTESIS.

La administración de eritropoyetina recombinante humana promueve e influye en la progresión tumoral en un modelo murino.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO.

Objetivo general:

Determinar el efecto de la administración de eritropoyetina recombinante en la progresión tumoral de un modelo murino.

Objetivos específicos:

- 1.- Producir y caracterizar el plásmido recombinante con el gen EPO humano.
- 2.- Evaluar el efecto de la administración de rHuEPO en un modelo *in vitro* con células de melanoma B16F10.
- 3.- Analizar el efecto de los tratamientos en ensayo de herida (Wound Healing Assay) para ver asociación con la regeneración y proliferación *in vitro*.
- 4.- Analizar las variaciones en Biometrías e indicadores inmunológicos (IL-12p70, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β) por medio de citometría de flujo en respuesta a la administración de eritropoyetina recombinante en un modelo de melanoma murino.
- 5.- Evaluar el efecto de la administración de rHuEPO en un modelo de melanoma murino y asociar la administración con la progresión tumoral en ratones de 8-10 semanas con tratamientos comparados con controles.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Caracterización de plásmido

El plásmido utilizado en esta investigación fue pcDNA3.1+P2A-eGFP, de la marca GenScript®, y comercializado en México por BakterLab®. Con promotor de citomegalovirus, expresión en mamíferos y sistema de P2A policistrónico además de GFP, un gen reportero fluorescente.

Para la caracterización enzimática se utilizaron las enzimas XbaI y NheI (Promega, Madison, USA) las cuales generan un reconocimiento a una secuencia específica en el plásmido.

La reacción general de digestión se realizó agregando:

1 µl de Buffer MC
0.5 µl de enzima XbaI
0.5 µl de enzima NheI
0.5 µl de BSA
3 µl de plásmido [1 µg/mL]
4.5 de Agua PCR
<hr/>
10 µl de volumen final

6.2 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* por Miniprep.

Las colonias seleccionadas de la transformación se inocularon en 7 mL de caldo LB base con Ampicilina (100µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12-16 hrs. Cada cultivo procesado fue de la siguiente manera: se centrifugó a 8 000 rpm por 10 min, la pastilla celular se resuspendió en 200 µL de Solución I por agitación en vortex (S/P Vortex mixer), después se añadieron 400 µL de Solución II, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 min, se añadió 300 µL de Solución III, fueron mezcladas nuevamente por inversión e incubadas en hielo por 20 min. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, se recolectó el sobrenadante y se mezcló con un volumen igual de isopropanol, precipitándose el ADN plasmídico, y se incubó por 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, y la pastilla fue lavada con etanol al 70%, se secó a 60 °C y se resuspendió en 25 µL de H₂O MQ. Los plásmidos obtenidos fueron

almacenados a -20 °C. Posteriormente se analizó cada muestra por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, para comprobar la integridad del ADN extraído, así como la ausencia de ARN genómico; se empleó una fuente de poder ajustada para correr las muestras a 110v y 300mA por 50 min. Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio y fueron visualizados con luz UV en un transiluminador.

6.3 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* por Maxiprep.

Una vez caracterizado el plásmido se tomaron 100 µl del remanente bacteriano guardado en el refrigerador y se sembró en un litro de caldo LB con ampicilina [100 µg/mL]. Se creció a 37 °C en agitación de 200 rpm durante la noche. Al día siguiente, se inició el proceso de extracción mediante el kit comercial “PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit” (Invitrogen California EUA).

6.4 Preparación de nanocomplejos de quitosano.

Para elaborar los nanocomplejos se usó la metodología de gelación iónica descrita por Calvo y Cols (1997), en el cual, en presencia de un agente entrecruzante los complejos se formarán de manera espontánea por interacciones iónicas. La preparación de nanocomplejos de quitosano con el objetivo de encapsular un plásmido consiste en 2 tubos uno con carga negativa y uno de carga positiva donde se agregó quitosán. En el tubo negativo se adicionaron 3.75 µL de Ttp al 2% por cada 1 µg de plásmido y se aforó a un volumen final de 30 µL con PBS. En el tubo positivo se añadieron 15 µL de quitosano al 2% y se aforó a 30 µL con PBS. (Tabla1). En un termomixer a 900 rpm se agregó el tubo negativo al positivo por goteo y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente a 900 rpm y se midió tamaño en Z-sizer.

6.5 Cultivo celular B16F10.

El cultivo de células tumorales murinas derivadas de melanoma, línea celular B16F10, se realizó en frascos de 25 cm² y cuando la monocapa estaba confluyente, se realizó el subcultivo. En una campana de flujo laminar vertical previamente desinfectada, se retiró con una pipeta desechable de 5 mL el medio de cultivo. Posteriormente, se adicionó al frasco de cultivo, 2.5 mL de PBS para lavar las células. El PBS se retiró con una pipeta de 5 mL y se adicionaron 500 µL de tripsina al 0.25 %. Las células fueron monitoreadas en un microscopio invertido (Primovert marca ZEISS), hasta que éstas presentaran una forma morfológica

característica de la línea. Las células fueron desprendidas del frasco y la tripsina fue inactivada adicionando 2.5 mL de medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) suplementado con antibiótico-antimicótico al 1X. Las células se homogenizaron varias veces con una pipeta serológica para evitar la formación de aglomerados. Con movimientos suaves se distribuyeron las células en toda la superficie del frasco y se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ por 4 días.

6.6 Ensayo de viabilidad celular mediante el método del MTT.

Para cumplir con el objetivo 2, que es evaluar el efecto de la administración de rHuEPO *in vitro*, se seleccionó el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, que tiene un color amarillo pálido en solución, realizada por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa. De dicha reducción metabólica se genera un compuesto de color azul (sales de formazán), lo que permite visualizar por el cambio de color, la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto su viabilidad (Mosdam, 1983), ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sales de formazán producido. Para el ensayo MTT se realizó un subcultivo de células B16F10 en una placa de 96 pozos, donde se colocó una concentración de 3000 células por pozo en un volumen final de 200 µL con medio DMEM y se incubó por 24 h a 37 °C con 5 % CO₂. Una vez transcurridas las 24 h, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con solución salina; posteriormente, se agregó un volumen final 200 µL a cada pozo a diferentes concentraciones de rHuEPO, plásmido con y sin EPO, quitosano y concavalina. Se dejó incubando 12 h a 37 °C con 5% CO₂, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con solución salina; se agregaron 20 µL de MTT a 5 mg/mL a cada pozo y se dejó incubar por 3 h. Se retiró el MTT y se agregó 100 µL de DMSO por pozo hasta disolver los cristales de formazán a temperatura ambiente; se dejó incubando en agitación 5 min y se leyeron las densidades ópticas en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific), a una longitud de onda de 570 nm (GOMEZ-FLORES *et al.*, 2005).

Fórmula para determinar el % de viabilidad celular:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \left(\frac{DO_{Muestra}}{DO_{Control\ negativo}} \right) * 100$$

6.7 Ensayo de herida para migración celular.

Para el ensayo de herida se realizó un subcultivo de células B16F10 en una placa de 24 pozos (Corning), donde se colocó una concentración de 30,000 células por pozo en un volumen final de 500 µL con medio DMEM y se incubó por 24 h a 37 °C con 5 % CO₂. Se realizaron los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones de rHuEPO, plásmido con y sin EPO, quitosano y concavalina y al llegar a una confluencia del 90 % se realizó la herida con una puntilla para micropipeta amarilla estéril, se midió a diferentes horas 6, 12 y 24 posteriores a la herida.

6.8 Evaluación *in vivo* de la influencia de EPO.

Para determinar el efecto génico se realizaron evaluaciones *in vivo* con ratones hembra C57BL/6. Los objetos de estudio se les inocularon 500,000 Células B16F10 de melanoma murino resuspendidas en 100µl de agua inyectable, con jeringas de insulina (Ultra-fine 31G x 6mm, BD Becton, Dickinson and Company) de manera subcutánea en el muslo izquierdo del ratón. En otro grupo se trató con plásmido con gen y sin gen de EPO a una concentración de 20µg

Melanoma- hembras 8-10 semanas

Grupo de 3 ratones por tratamiento

1. Control.
2. Tumor con rHuEPO
3. Tumo con plásmido EPO.
4. Tumor con plásmido sin EPO.

En orden de evaluar el efecto de la EPO de manera directa, sabiendo su función principal como precursor eritrocítico, a cada grupo tratado se le realizaron biometrías hemáticas. El método fue por impedancia eléctrica en un equipo Sysmex XT-2000i (Mundelein, IL).

6.9 Análisis de masa tumoral.

Se analizó el tamaño y radio tumoral para observar el desarrollo de la progresión tumoral y el índice inflamatorio cualitativo. Se tomaron imágenes termográficas del modelo de estudio al término del tratamiento por medio de una cámara termográfica modelo (FLIR Systems Inc. modelo E-40, OR, USA). La cámara termográfica utilizada tiene una resolución integrada real de 80 x 60 píxeles, que tiene sensores que permiten medir temperaturas que oscilan entre -20 °C y + 250 °C. Esta cámara presenta sensibilidad térmica menor que 0.15°C y tiene una precisión de $\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura absoluta, de acuerdo con las directrices del fabricante.

6.10 Determinación de ADN total Purificado.

Para determinar la cantidad de ADN total purificado, las muestras se cuantificaron en un equipo NanoDrop™ Lite de la marca Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts) mediante absorbancia a 260nm, utilizando muestras que tenían un valor (calidad) entre 1.8 y 2 en la relación A260/280.

6.11 Perfil de arreglo proteómico.

Para el arreglo proteómico se utilizó el kit The Mouse angiogenesis Array de R&D Systems, Inc. donde se hizo un pool de tumores identificados como control, rHuEPO, pcDNA3.1 c/EPO y pcDNA3.1 s/EPO respectivamente. Estas membranas detectan la expresión de 53 proteínas relacionadas a la angiogénesis y los resultados obtenidos se compararon entre los grupos seleccionados. se utilizó para detectar la expresión de 53 proteínas relacionadas con la angiogénesis en los grupos experimentales. Estas matrices del perfil proteómico se manejaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, la extracción de la proteína fue hecha, y 100 mg de la proteína total fue mezclado con un pool de anticuerpos biotinylated de la detección y después incubado con una membrana de la nitrocelulosa manchada con los anticuerpos de la captura en duplicado. Los anticuerpos de detección de proteínas unidos al anticuerpo de captura se detectaron utilizando estreptavidina-HRP y reactivos de detección quimioluminiscentes. El sistema Gel Doc EZ (Bio-Rad) se utilizó para la obtención de imágenes.

6.12 Análisis inmunológico.

Para el análisis de citocinas de inflamación se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammatory Cytokines con las muestras recolectadas (50µl) de cada tiempo para la detección de las citocinas (IL-12p70, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β) utilizando estándares de referencia. Los datos arrojados por el citómetro fueron analizados con el software FCAP Array v3 para determinar la concentración en pg/mL.

7. RESULTADOS

7.1. Producción y caracterización de plásmido recombinante con gen y sin gen de EPO.

El plásmido que se utilizó en este proyecto fue el pcDNA3.1+P2A-eGFP obtenido de GenScript®, al cual se le insertó el gen de EPO humano en el sitio múltiple de clonación y fue modificado al remover el codón de termino en la secuencia (Figura 2).

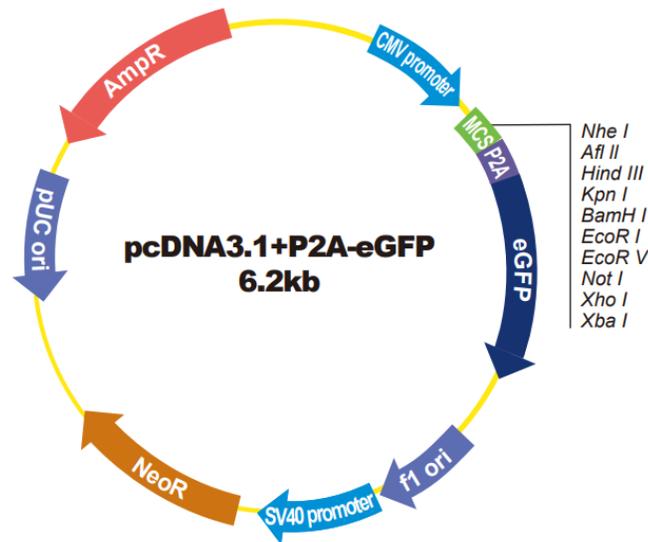


Figura 2. Plásmido pcDNA3.1+P2A-eGFP. El plásmido fue transformado en bacterias calcio-competentes de *E. coli* DH5- α , aislado por el método MiniPrep, cuantificado por espectrofotometría en Nanodrop y analizado mediante electroforesis en gels de agarosa al 0.8%.

En la figura 2A se muestra una clona positiva después de la extracción del plásmido pcDNA3.1+P2A-eGFP con el gen EPO donde se obtuvo el fragmento esperado de 6770 pb. Posteriormente, se realizó la extracción del gen con las enzimas de restricción Nhe I y Xba I, eliminando de esta manera todo el sitio múltiple de clonación. La digestión liberó los fragmentos esperados de 6110 pb y 580 pb correspondientes al plásmido y el gen respectivamente (Figura 3B). Después se realizó la purificación del plásmido sin el gen EPO a partir del gel de agarosa, así como una ligación para cerrar el plásmido abierto y obteniendo la banda de 6110 pb al realizar una electroforesis (Figura 3C). Este plásmido después de transformarse en bacterias calcio-competentes de *E. coli* DH5- α , y ser extraído por el método

Miniprep se analizó mediante electroforesis observando el fragmento de 6110 pb en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 3D).

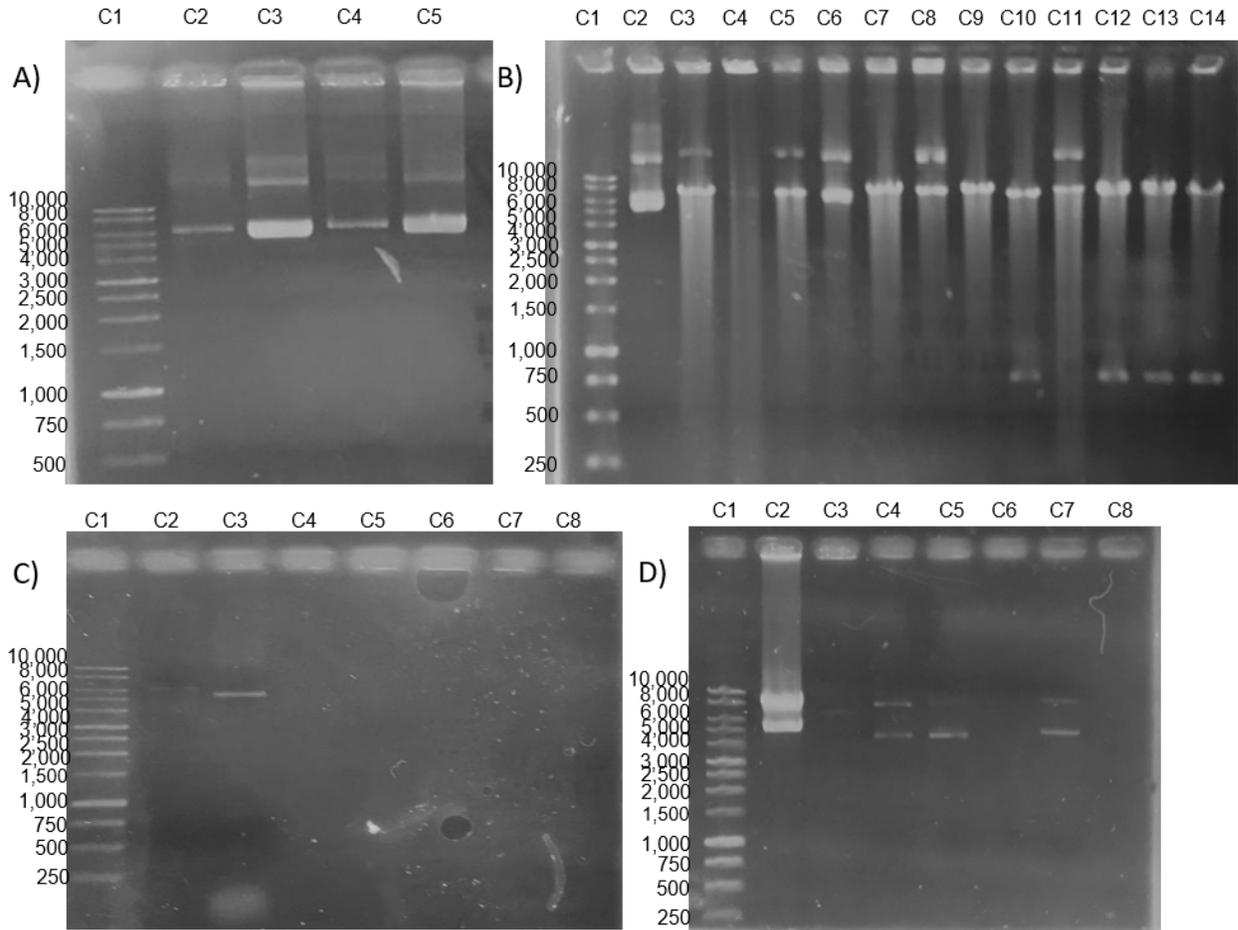


Figura 3. Electroforesis del plásmido pcDNA3.1+P2A-eGFP con y sin gen de EPO en gel de agarosa al 0.8%. A) El gel de agarosa muestra la banda esperada de 6770 pb correspondiente al plásmido con EPO (carriles del 2 al 5) y en el carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; **B)** Digestión del plásmido con enzimas de restricción Nhe I, Xba I y combinadas donde se observa la liberación del gen EPO con la banda de 580 pb y el plásmido de 6110 pb, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1kb; **C)** Gel de la ligación de plásmido sin gen de EPO con la banda de 6110 pb (carriles 2 y 3) y el carril 1 del marcador de peso molecular 1kb; **D)** Gel del plásmido sin EPO después de la extracción por miniprep, banda de 6110 pb en carriles del 4 al 7, el carril 1 del marcador de peso molecular 1kb y el carril 3 corresponde al control positivo (plásmido con EPO).

Para la caracterización de ambos plásmidos se buscaron sitios de corte específicos con distintas enzimas de restricción y comprobadas con el programa SnapGene, seleccionando finalmente las enzimas Xba I/Nhe I, Pst I y Dde I. Ambos plásmidos se cortaron con estas enzimas conforme a lo descrito por el proveedor. En la figura 4 se observa la caracterización

de los plásmidos con la digestión, mostrando los fragmentos de ADN esperados que fueron predichos de manera *in silico* para confirmar así la autenticidad del plásmido antes de continuar el ensayo.

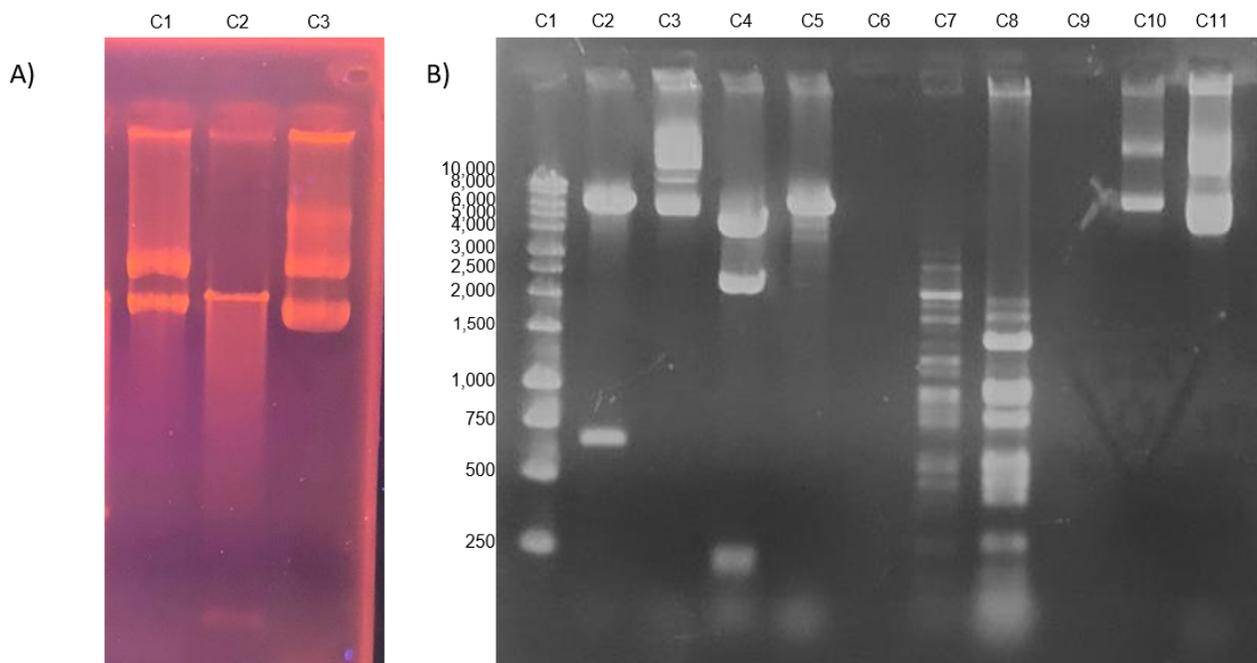


Figura 4. Caracterización de plásmidos por enzimas de restricción en geles de agarosa al 0.8%. A) Electroforesis del plásmido sin EPO (carril 1) y con EPO cortado con Kpn I (carril 2), y en el carril 3 el plásmido sin EPO y sin digerir; **B)** Electroforesis de ambos plásmidos con EPO y sin EPO cortados con Xba I/Nhe I, Pst I y Dde I en los carriles del 2 al 8 respectivamente, y últimos 2 carriles con EPO y sin EPO sin digerir, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder.

7.2 Establecimiento de melanoma murino B16F10 en ratón C57Bl/6

Se inyectaron vía intradérmica 500,000 células B16F10 de melanoma murino en los diferentes grupos de ratones. Cada día transcurrido se calculó el consumo de alimento de cada ratón de los distintos grupos (Figura 5) se observó diferencia significativa entre el consumo de alimento del grupo tratado con rHuEPO y el pcDNA3.1c/EPO.

Ingesta diaria (g)

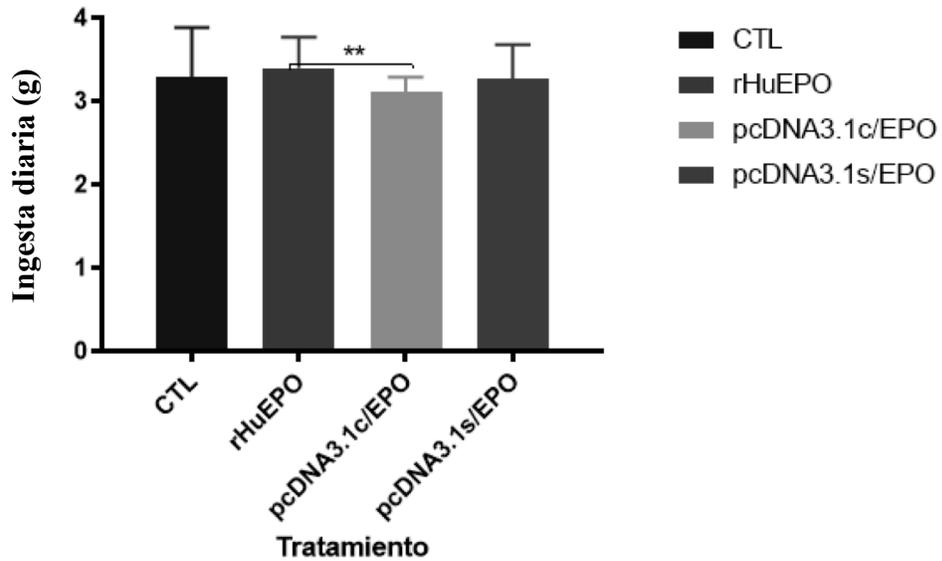


Figura 5. Consumo de alimento diario por grupo de tratamiento establecido. Se calculó la ingesta de alimento diario de cada ratón y se hizo un ANOVA de un factor para ver si existía diferencia significativa entre cada grupo y se observó diferencia significativa entre grupo rHuEPO y pcDNA3.1c/EPO ($p > 0.05$).

El tratamiento fue suministrado vía intramuscular a los días 3, 7 y 10 con agua inyectable, eritropoyetina recombinante humana, plásmido con gen de EPO envuelto en nanopartículas de quitosán y plásmido sin gen de EPO envuelto en partículas de quitosán, asimismo fue registrado el peso de los ratones (Figura 6). Se tomaron imágenes termográficas a los días 3, 6, 9 y 13 postratamiento para observar la inflamación inducida (figura 7) donde se observa aumento de temperatura en las áreas donde se encuentra mayor inflamación a través del protocolo de intervención, antes de cada toma fotográfica, se rasuró el área donde se tomó la foto para una mejor apreciación de la temperatura. Con base a las imágenes se puede ver una similitud en el control y el pcDNA3.1 sin EPO y también hay parecido en los grupos de rHuEPO con el pcDNA3.1 con EPO.

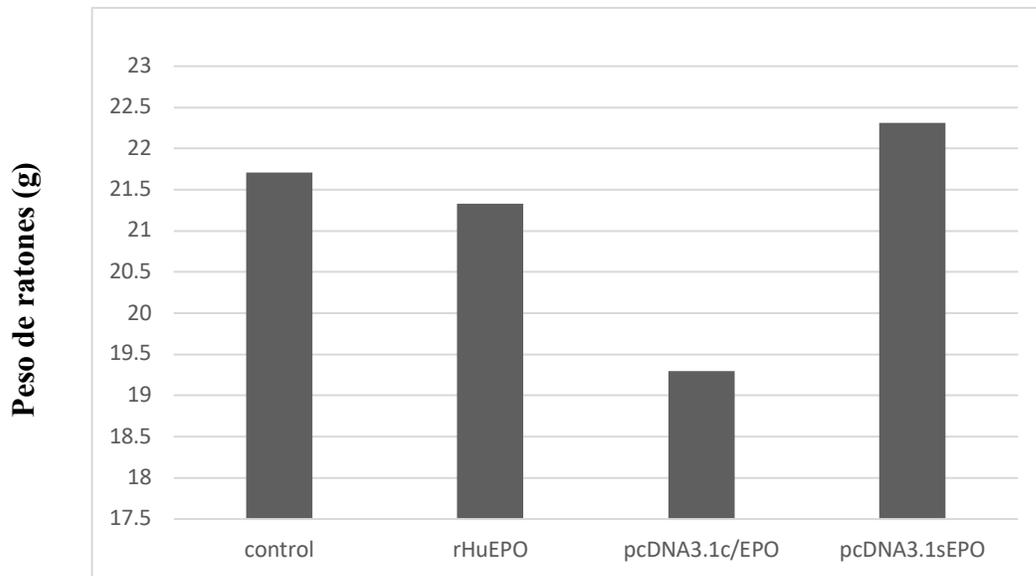


Figura 6. Peso registrado de los ratones. Se tomaron medidas de peso de cada ratón durante el tratamiento y no se encontró diferencia significativa entre cada grupo ($p < 0.05$).

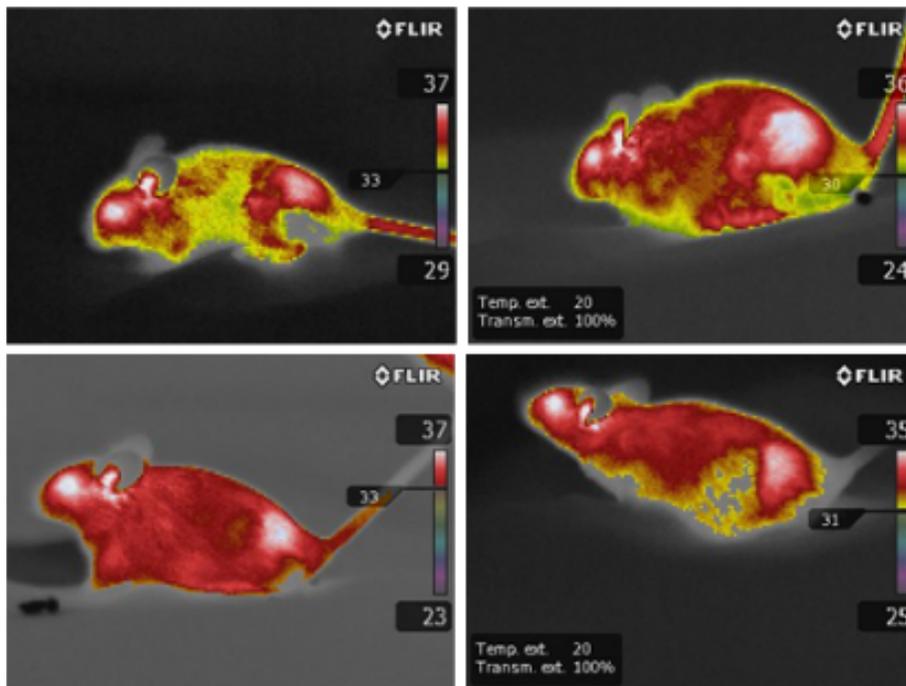


Figura 7. Imágenes termográficas a lo largo del protocolo de intervención. Representación de imágenes termográficas en ratones hembra C57 a los días 13 postratamiento de la implantación con B16F10 de los distintos tratamientos de cada grupo. Se muestran unas temperaturas más elevadas en la zona donde se inoculó el tumor y acumulación de inflamación en color blanco.

El final del protocolo de intervención se dio en el día 15 desde la inoculación de la línea celular. Se midió el radio tumoral al final del tratamiento para conocer el alcance de los distintos tratamientos (Figura 8) donde se observa preliminarmente que no hay desarrollo tumoral del ratón 8. Antes del sacrificio se anestesió a cada ratón con ketamina/xilacina y se realizó el sacrificio por punción cardíaca terminal donde se recuperó la mayor cantidad posible de sangre, ya con la muestra conseguida se separó en viales para las distintas pruebas a realizar entre ellas biometrías hemáticas (figura 9) donde se puede apreciar la hemoglobina y el hematocrito de cada ratón en el ratón 4 la muestra se coaguló y no se pudo realizar la biometría hemática pero los ratones que presentaron niveles más altos de hemoglobina fueron el 2 y el 5 ratones tratados con rHuEPO y con pcDNA3.1 con EPO respectivamente, mientras que la muestra con mayor hematocrito fue la del ratón 7 mismo que fue tratado con pcDNA3.1 sin gen de EPO.

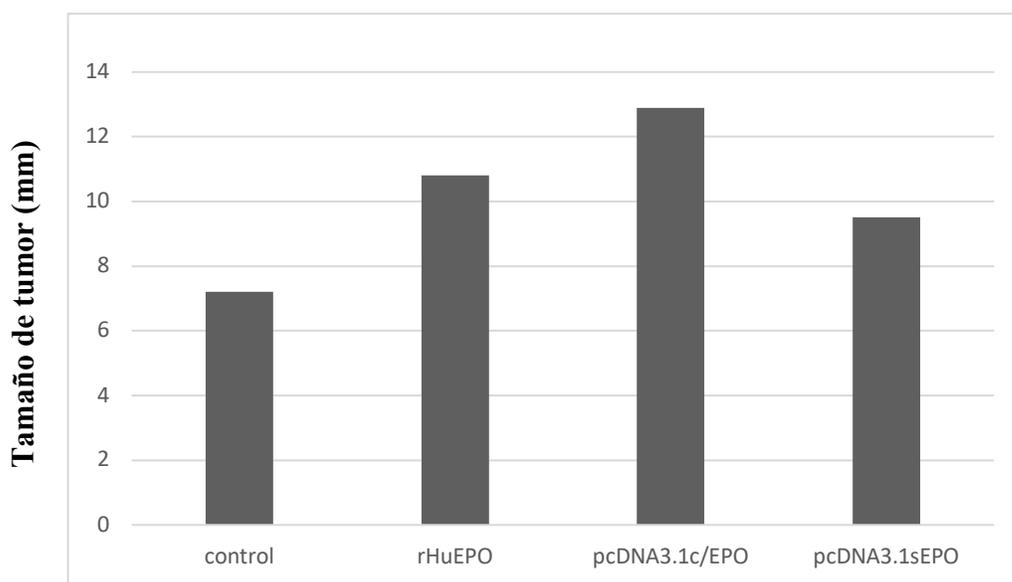


Figura 8. Tamaño tumoral antes del sacrificio. Se midió el tamaño tumoral de cada grupo de ratones donde el tumor de mayor tamaño se encontró en el plásmido tratado con pcDNA3.1c/EPO y el de menor tamaño en el grupo control.

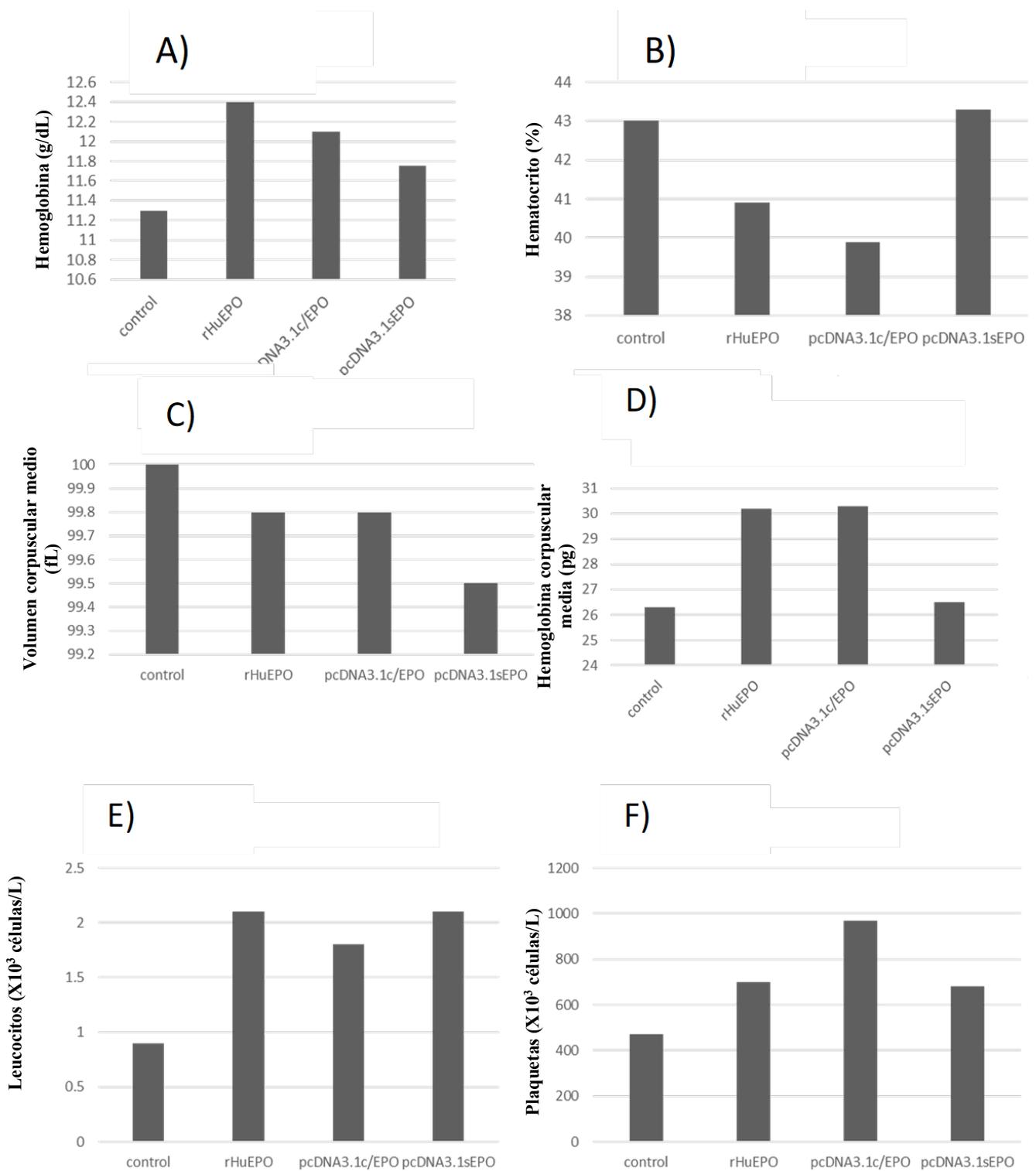


Figura 9. Valores obtenidos de una biometría hemática. Se hizo una biometría hemática para *Mus musculus* y se muestran los valores de cada ratón de A) Hemoglobina. B) Hematocrito. C) Volumen corpuscular medio. D) Hemoglobina corpuscular media. E) Leucocitos totales. F) Plaquetas.

7.3 Análisis tumoral post-disección.

Se extirpo y peso el tumor de cada ratón (Figura 10 y 11) donde se aprecia las diferencias en el tamaño del tumor habiendo pesado más el grupo de pcDNA3.1C/EPO y siendo el de menor peso el grupo control. Se midieron los tamaños de los tumores para cada grupo y se realizó un corte histológico para observar diferencias las características de la línea celular de melanoma B16F10 (Figura 12) donde debido a que el tumor se encontraba muy heterogéneo fue difícil diferenciar vasos sanguíneos, síntesis de melanina, eritrocitos, células en división, uniones intercelulares, núcleos de células de cada grupo por lo que se hizo de forma demostrativa para describir la línea celular. Como perspectiva se recomienda utilizar una línea celular con tumor más sólido para describir mejor el efecto de cada tratamiento.

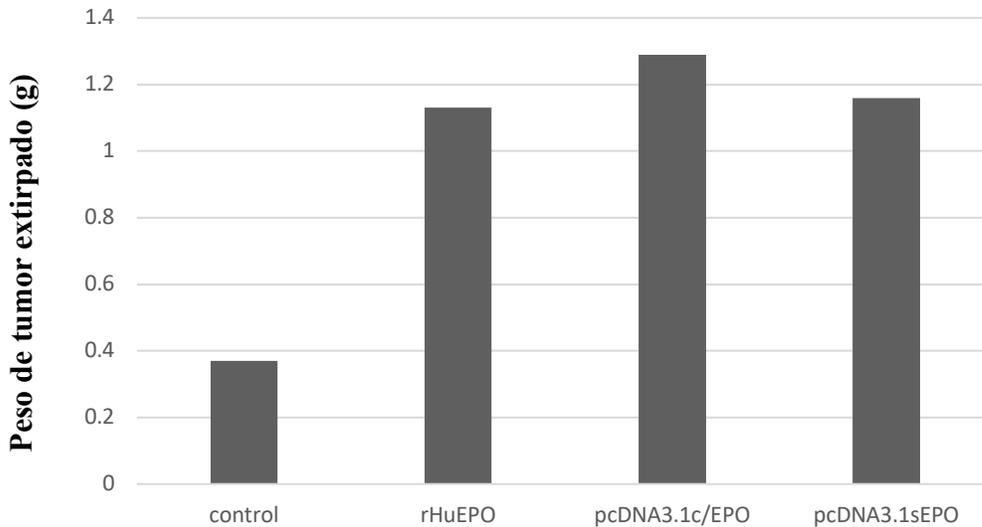


Figura 10. Peso de tumor extirpado después del sacrificio. Para cada ratón se pesó el tumor extirpado, se encontró mayor peso tumoral en el grupo tratado con pcDNA3.1c/EPO en comparación con los otros tratamientos, siendo en grupo control el de menor peso.

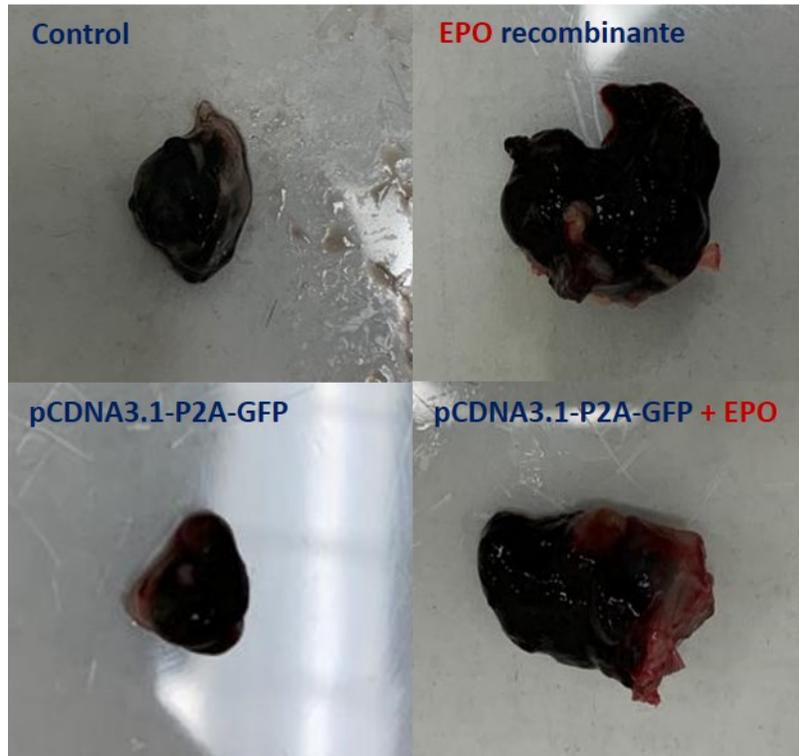


Figura 11. Tumores extirpados. Se extirparon los tumores de cada ratón y se midieron los tamaños y peso de cada uno de ellos. Visualmente el tumor más grande corresponde al pcDNA3.1c/EPO seguido de la rHuEPO.

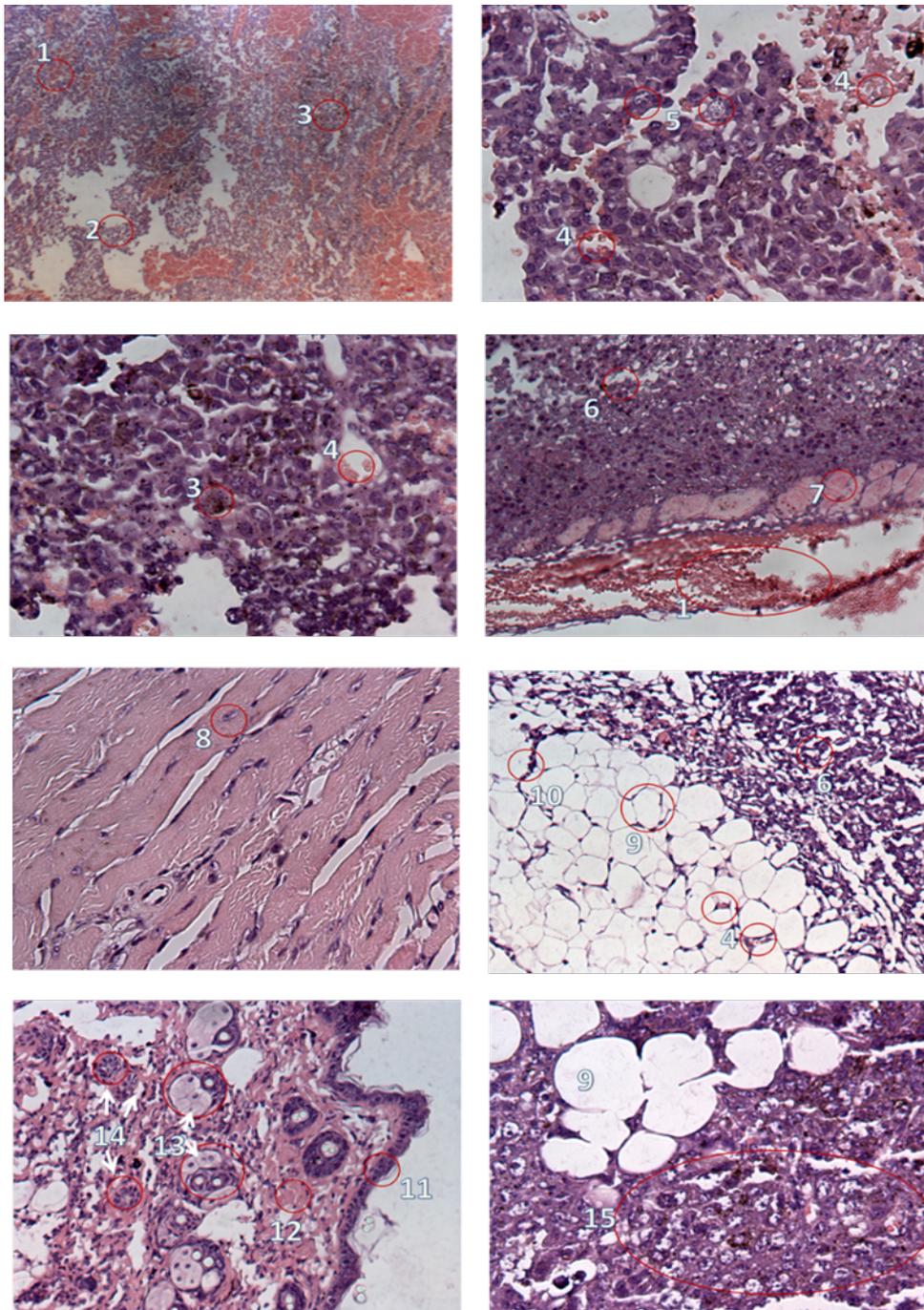


Figura 12. Cortes histológicos de tumor de los diferentes ratones. 1. Vasos sanguíneos. 2. B16F10 no productoras de melanina. 3. B16F10 productoras de melanina. 4. Eritrocitos. 5. B16F10 en división. 6. B16F10 con unión intercelular laxa. 7. Músculo esquelético. 8. Célula de músculo esquelético con núcleo en la periferia y citoplasma con estriaciones (sarcómeros). 9. Adipocito. 10. Posible diseminación de B16F10. 11. Epitelio plano estratificado queratinizado (piel). 12. Fibras de colágeno y núcleo de fibroblastos. 13. Glándulas sebáceas. 14. Conductos.

Se realizó la comparación del radio tumoral de los ratones más representativos y se observó una concordancia entre la inflamación a través de la emisión de calor con los valores

reportados con las biometrías hemáticas (Figura 13). Así mismo, se evaluó la inflamación de cada grupo de ratones y se comparó con los valores de leucocitos totales y entre más emisión de calor hay, más elevado se encuentra el valor de leucocitos totales (Figura 14).

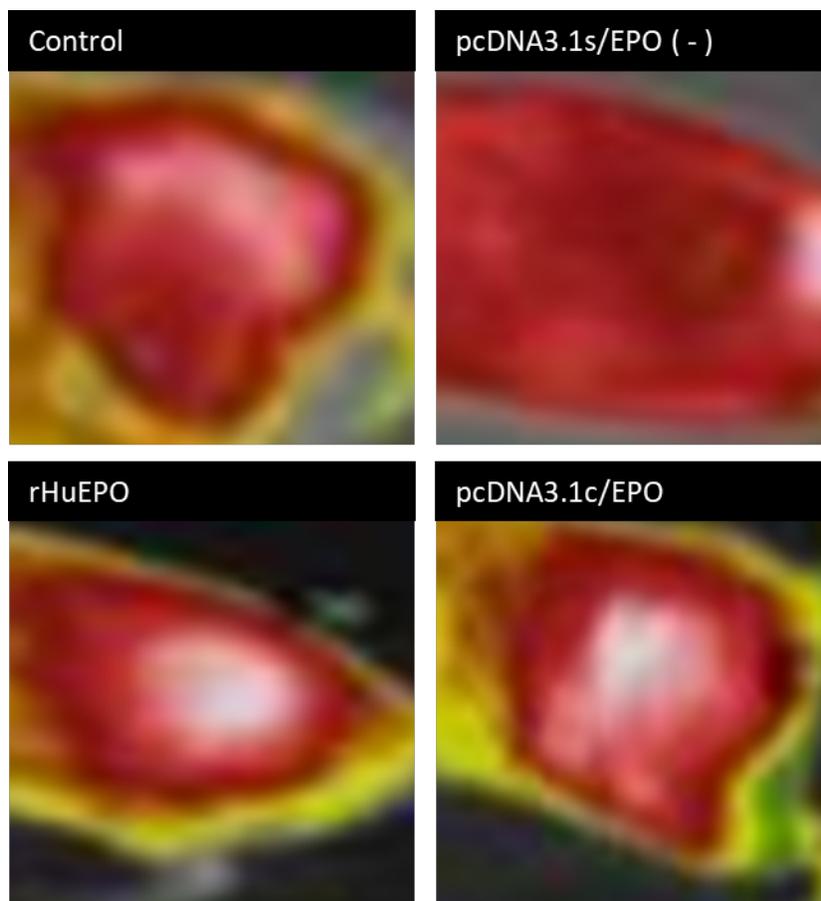


Figura 13. Comparación de radio tumoral entre tratamientos. El tumor más representativo de cada grupo se comparó con la cámara termográfica.

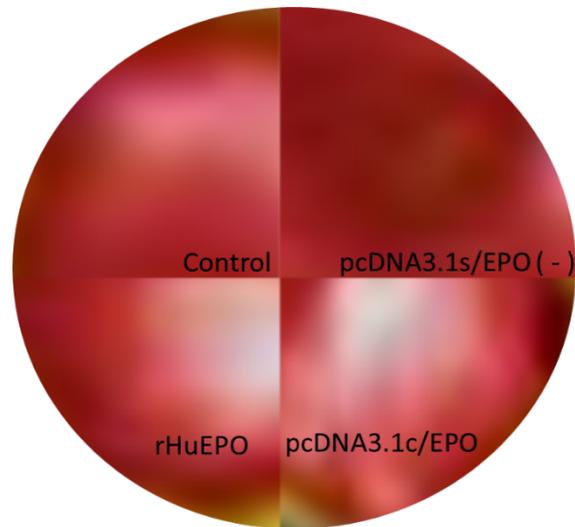


Figura 14. Inflamación de cada grupo de tratamiento. Por emisión de calor se observa el área más caliente en color blanco de cada área tumoral, se asocia la temperatura con los niveles de inflamación.

7.4 Ensayo de herida (Wound Healing Assay).

Se plaquearon 30,000 células de B16F10 en placa de 24 pozos. Al haber alcanzado una confluencia del 75% se realizó una herida con una puntilla de micropipeta amarilla estéril, la cual se observó a las 12 y a las 24 horas. Los tratamientos asignados fueron el control, plásmido con gen de EPO (Figura 15), plásmido sin gen de EPO (Figura 16), rHuEPO, (Figura 17), Quitosán (Figura 18). Como un control positivo se utilizó concavalina a una concentración de 2 μ g. Imágenes observadas en microscopio óptico invertido a 4X.

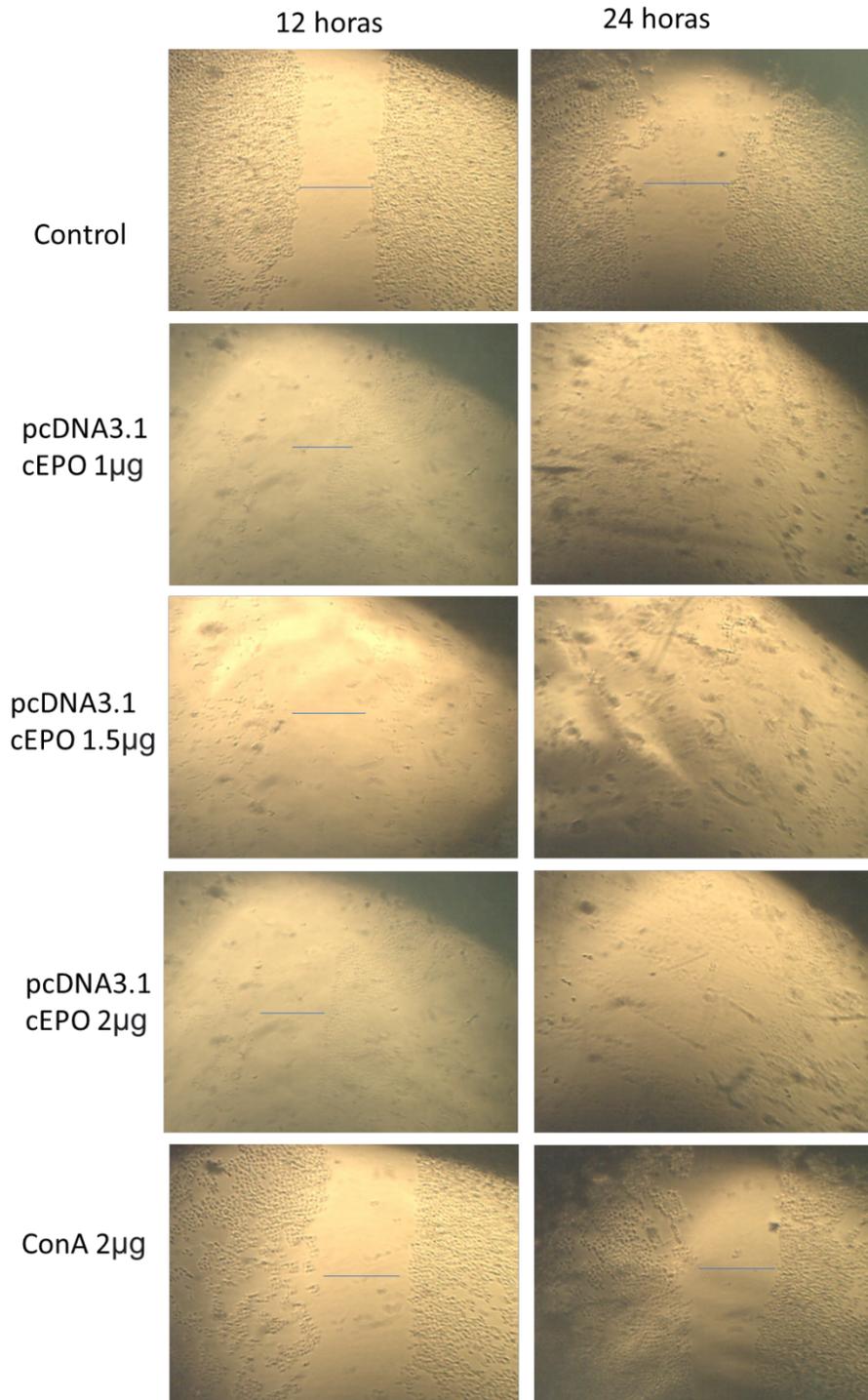


Figura 15. Ensayo de herida pcDNA3.1c/EPO. Células B16F10 con herida tratadas con plásmido con gen de EPO a distintas concentraciones, observadas en microscopio óptico invertido a 4x.

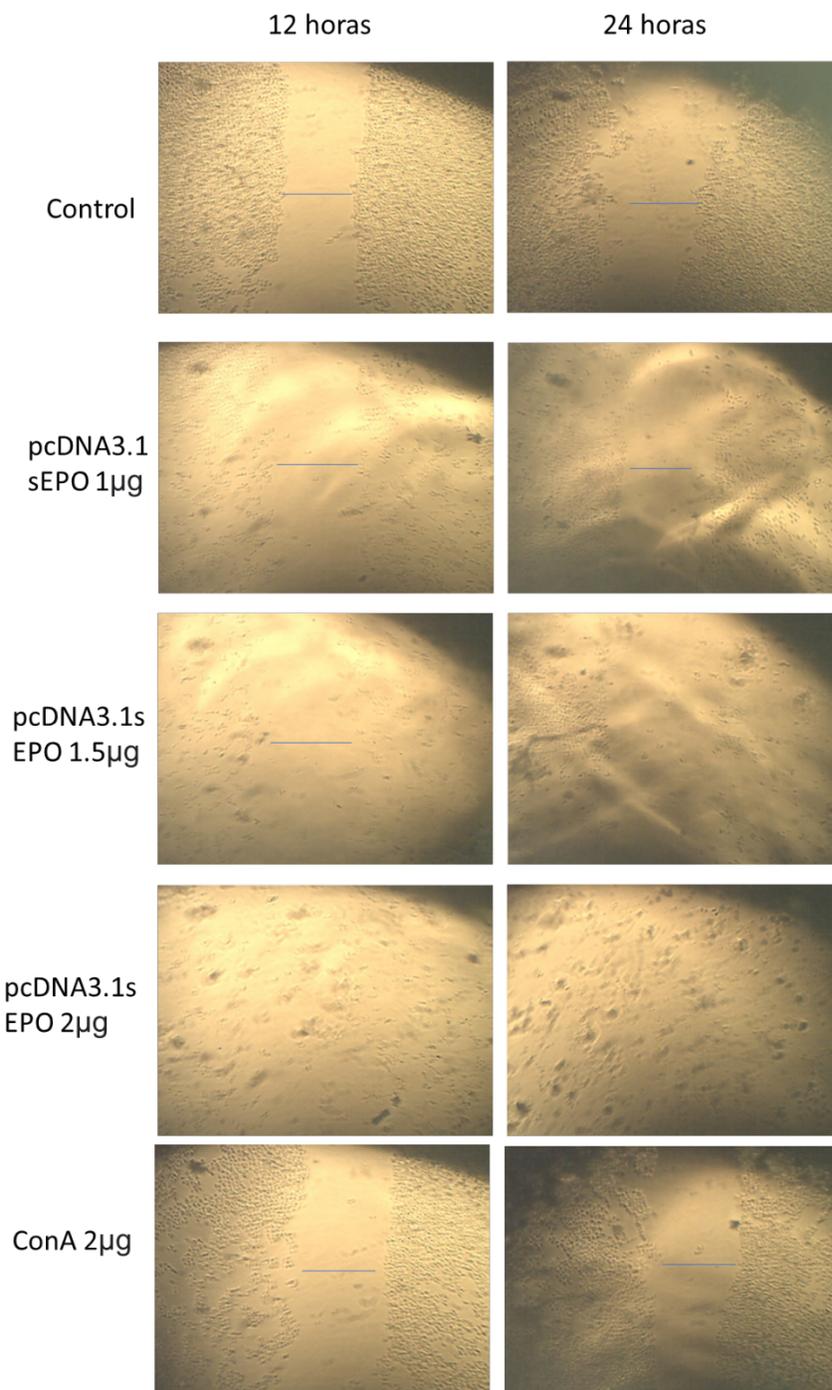


Figura 16. Ensayo de herida pcDNA3.1s/EPO. Células B16F10 con herida tratadas con plásmido sin gen de EPO a distintas concentraciones, observadas en microscopio óptico invertido a 4x.

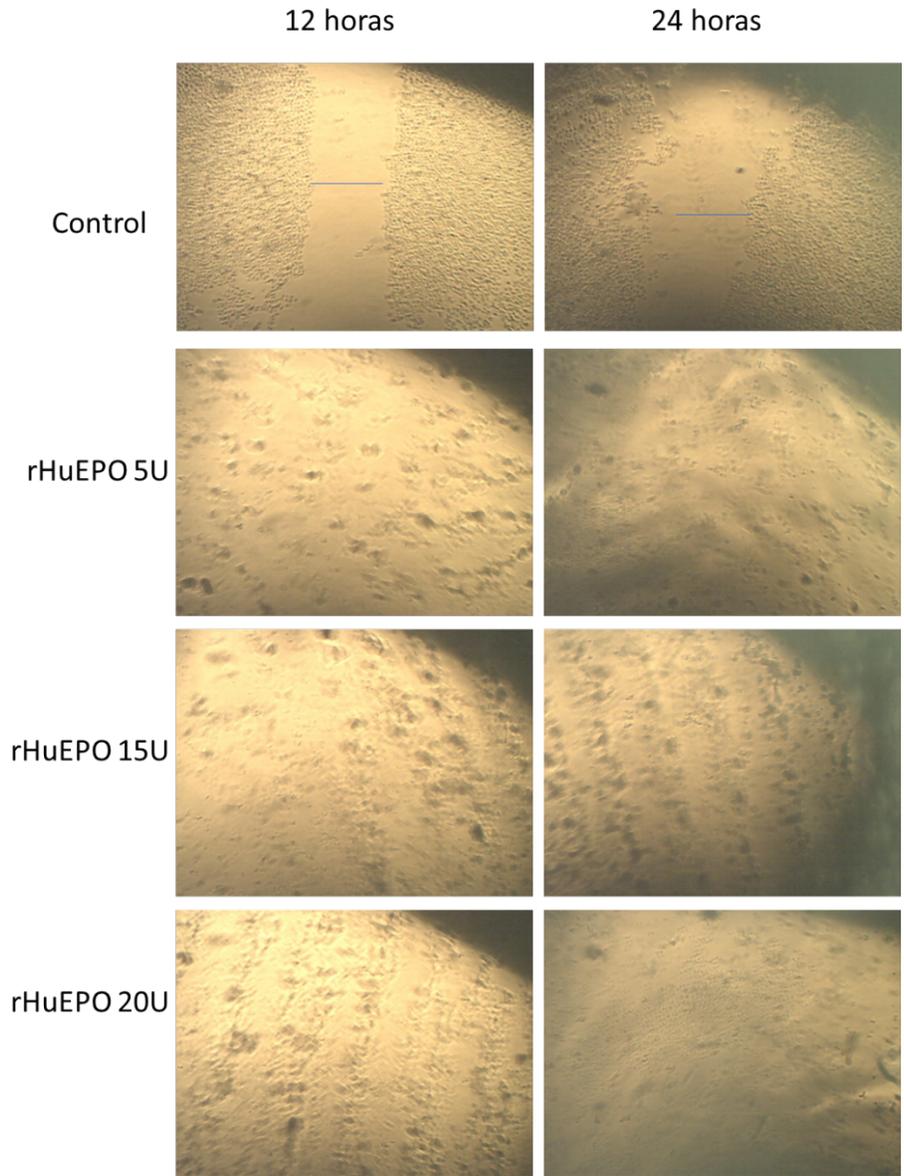


Figura 17. Ensayo de herida rHuEPO. Células B16F10 con herida tratadas con rHuEPO a distintas concentraciones, observadas en microscopio óptico invertido a 4x.

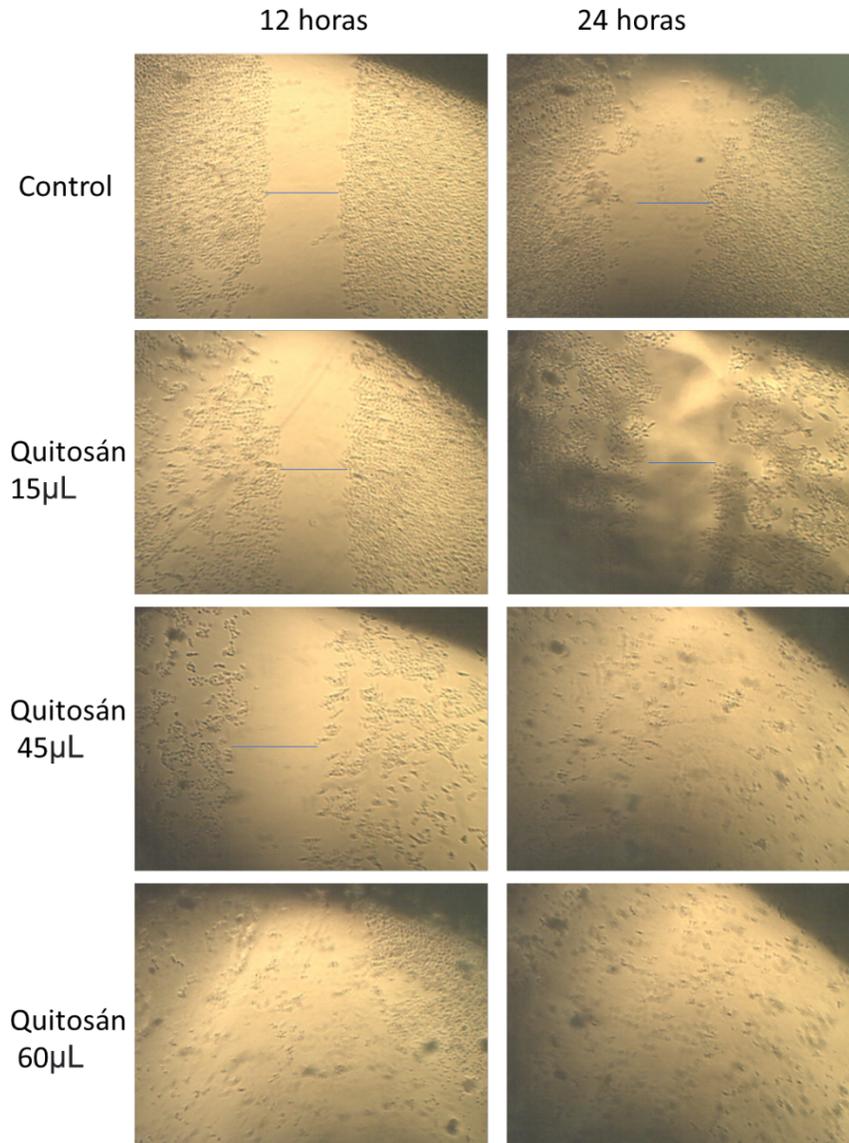


Figura 18. Ensayo de herida quitosán. Células B16F10 con herida tratadas con Quitosán a distintas concentraciones, observadas en microscopio óptico invertido a 4x.

7.5 Determinación de viabilidad celular en los diferentes tratamientos.

Para determinar la viabilidad celular y corroborar los efectos de la eritropoyetina recombinante y del gen en células B16F10 se realizó un ensayo de MTT a 3 concentraciones distintas evaluado a las 12 y 24 horas post-tratamiento además se usó ConA 2 µg/mL como control positivo de proliferación (Figura 19).

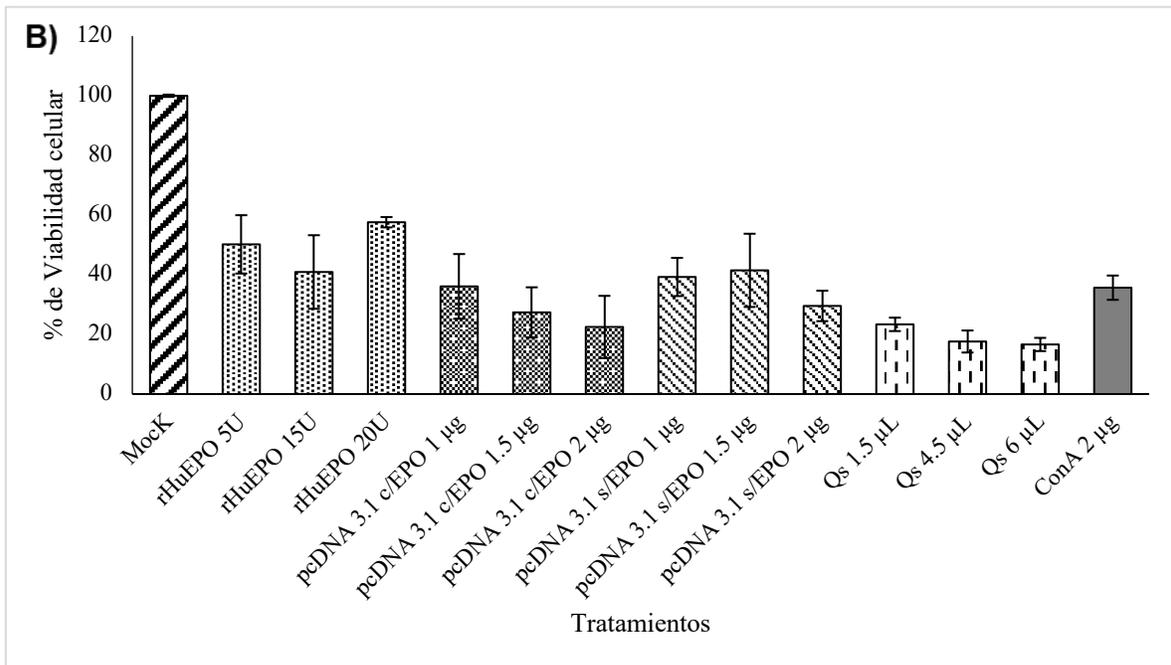
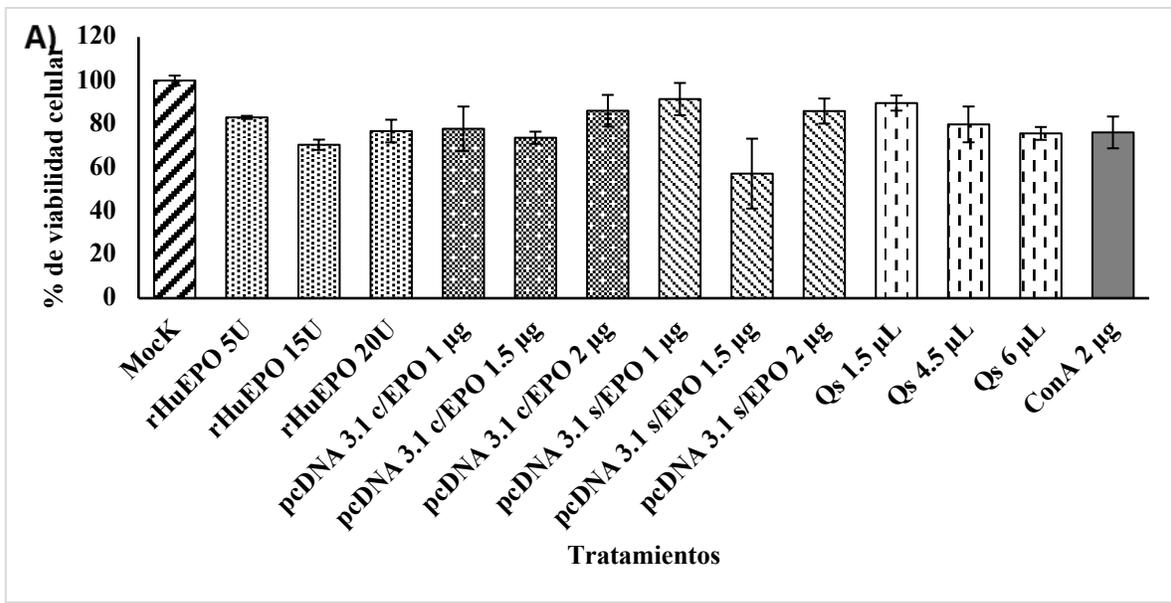


Figura 19. Efecto citotóxico rHuEPO, pcDNA3.1c/EPO y s/EPO, quitosán y ConA ante la línea celular B16F10. A) 12 h de tratamiento. B) 24 h de tratamiento. Las barras horizontales representan la Desviación estándar de 3 réplicas in vitro.

De los analitos detectados en el kit de perfil proteómico, se realizó un HeatMap para evaluar la intensidad de densitometría. Se compararon los grupos tratados con las proteínas expresadas en los distintos grupos tratados.

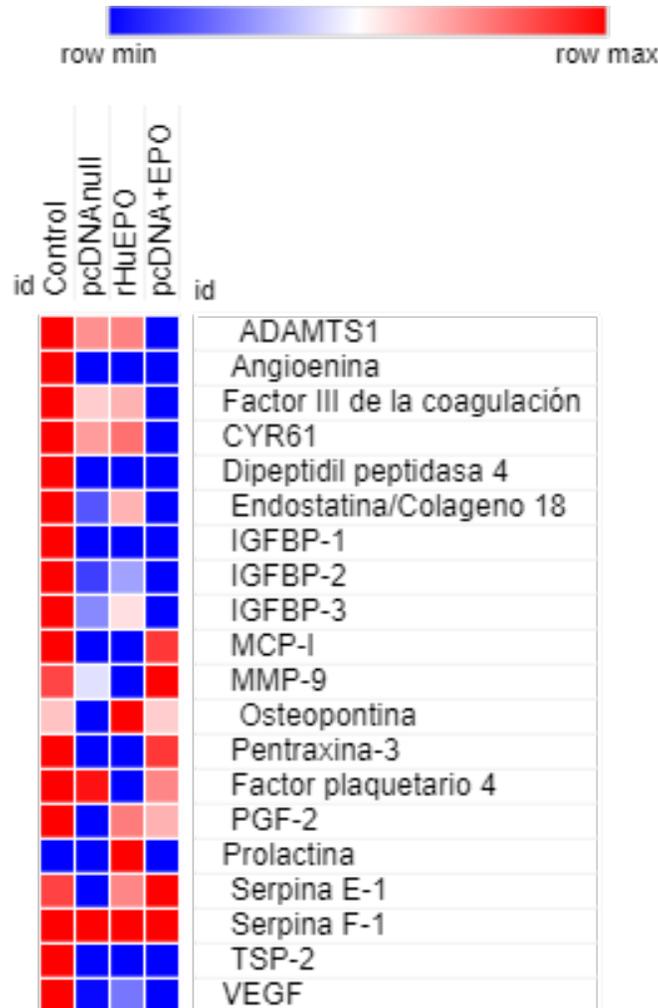


Figura 22. Análisis comparativo y relativo de proteínas expresadas y analizadas por el kit array proteome angiogenesis (R&D Systems) e interpretado los valores de densitometría en un Heatmap (Software Morpheus - Broad Institute).

7.7 Análisis inmunológico por citometría de flujo.

Se realizó una evaluación inmunológica por citometría de flujo para determinar el grado de inflamación y cuales citocinas se ven involucradas en este proceso. Según los resultados obtenidos, se pudo apreciar distintos valores de MCP-1; IL-10 e IL-6. Si hablamos específicamente de MCP-1 se observa que los grupos que alcanzaron mayor concentración de esta citocina fueron rHuEPO y pcDNA3.1c/EPO, mientras que pcDNA3.1s/EPO y el grupo

control alcanzaron un valor similar. Por otro lado, en IL-10 los 3 primeros grupos (control, rHuEPO y pcDNA3.1c/EPO) obtuvieron valores similares, 39.07, 38.32 y 38.29 pg/mL respectivamente, mientras que el grupo pcDNA3.1s/EPO obtuvo un valor de 35.82 pg/mL. La última de las citocinas involucradas fue la IL-6, el grupo control mostro los valores más disminuidos, 14.8 pg/mL así mismo el grupo más elevado respecto a los otros fue el de rHuEPO con un valor de 27.94 pg/mL. Por otro lado, los grupos tratados con plásmidos (pcDNA3.1c/EPO y s/EPO) alcanzaron una concentración similar de 16.89 y de 16.66 pg/mL respectivamente; el resto de las citocinas evaluadas por el kit mostraron valores en concentración de 0 pg/mL lo que sugiere que no hubo producción de estas mismas por efecto del tumor de melanoma B16F10. Como se puede observar en la figura 20, las concentraciones de estas distintas citocinas inflamatorias es un indicativo de una presente inflamación, la evaluación de estas y su análisis muestra la manera de actuar del tumor en etapa temprana antes de estar muy bien establecido.

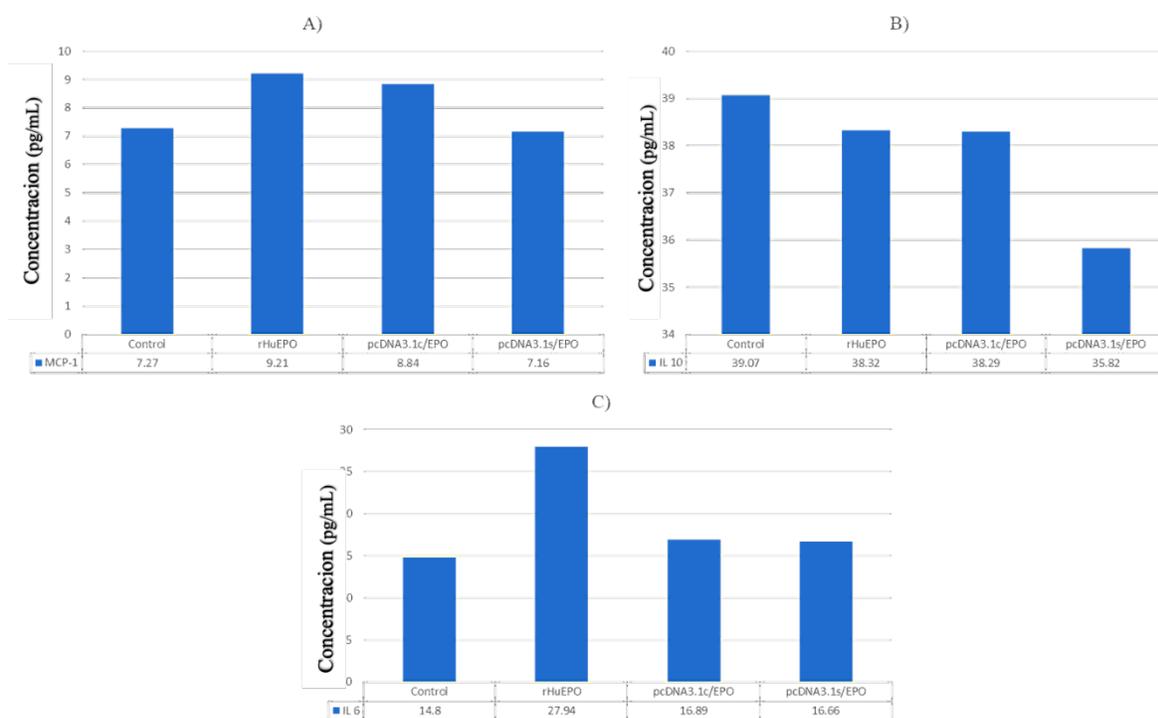


Figura 23. Expresión de citocinas pro-inflamatorias en el suero de ratones C57BL/6. Citocinas detectadas por citometría de flujo en ratones C57BL/6 los cuales se implantaron con melanoma B16F10. A) MCP-1. B) IL-10. C) IL-6.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la administración de eritropoyetina en un modelo murino con respecto a la progresión tumoral. Entre una de las terapias más convencionales para tratar anemias relacionadas al cáncer es con eritropoyetina recombinante.

Existen diversas líneas celulares ya probadas donde hay progresión tumoral con el uso de rHuEPO, tal es el caso de células HepG2 de cáncer de hígado y en MDA-MB-231 de cáncer de mama (Chan *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2017).

El Plásmido utilizado en este proyecto fue un pcDNA3.1+P2A-eGFP donde se insertó el gen de eritropoyetina humana en el sitio múltiple de clonación entre los sitios de restricción de BamHI y EcoRI y tiene 2 características muy particulares y adecuadas. La proteína P2A admite que el plásmido sea policistrónico permitiendo la expresión de 2 proteínas, la EPO y la eGFP que va a servir como un reportero por su capacidad de fluorescer verde (Z. Liu *et al.*, 2017).

Para la Caracterización del plásmido se emplearon diferentes enzimas de restricción. Primero se buscó en NEBcutter enzimas capaces de efectuar 1, 2 y 3 cortes en la secuencia del pcDNA3.1, de la P2A, de la e-GFP y del gen de EPO encontrando algunas que cortaban específicamente esa región y no cortaran en otra secuencia. Además, con el programa SnapGene® se realizaron simulaciones de corte y gel de agarosa para medir los fragmentos liberados por estas enzimas. Posteriormente se eligió a NheI y XbaI para liberar el gen de EPO, habiendo cortado todo el sitio múltiple de clonación. Una vez religado el plásmido sin

EPO se caracterizó con DdeI, KpnI y PstI con sitios de corte ya conocidos por NEBcutter y SnapGene®.

También se ha probado que la EPO ha tenido un efecto de progresión de factores angiogénicos como VEGF y se relaciona con su receptor activando la vía clásica de la señalización de la EPO (Greenwald *et al.*, 2019). Asimismo, el EPOR se ha encontrado en las áreas más hipóxicas de distintos cánceres como el cáncer de mama, cervicouterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas y en más de 65 líneas celulares de melanoma (E. A. Dunlop *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012a; Papworth *et al.*, 2009).

El consumo de alimento diario por ratón se vio diferencia altamente significativa entre los grupos tratados con rHuEPO y plásmido con EPO, se puede atribuir a diferentes factores como el tamaño de los ratones que, a pesar de ser de las mismas semanas de edad, el peso no era en todos igual. De primera instancia podría parecer que los ratones más oxigenados tendrían mayor energía y más movimiento, por ende, un metabolismo más acelerado y se reflejaría en un mayor consumo de alimento, sin embargo, se demostró por un ANOVA de un factor en GrapPad® que no existe diferencia significativa en los grupos control con respecto a los positivos a la proteína de EPO.

A lo largo de protocolo de intervención que duró 15 días se tomaron imágenes termográficas para visualizar el avance de la inflamación. Se vio mayor calor en el área donde se implantó el tumor, lo que sugiere un desarrollo del microambiente tumoral. Se pudo observar un tumor bien establecido al día 9 en los grupos tratados con rHuEPO y con pcDNA3.1 con EPO, no obstante, se vio un decremento en el área inflamada al pasar los días. En el grupo control y en pcDNA3.1 sin EPO no se vio establecimiento tumoral a través de la cámara termográfica. Se asocia también la imagen más representativa de cada grupo (Figura 13) donde podemos

compararlo con las biometrías hemáticas y asociar los distintos niveles como la inflamación en el número de leucocitos totales. Para visualizar mejor los niveles de leucocitos totales que se asocian a la inflamación se comparó con las imágenes termográficas los niveles de inflamación de cada uno de los grupos y comparándolos con los valores arrojados de la biometría, se puede confirmar que el tamaño del tumor, la emisión de calor que emiten y los resultados de la biometría concuerdan y están ligados entre ellos como se aprecia en la imagen. (Figura 14).

El ratón con mayor desarrollo de masa tumoral es del grupo pcDNA3.1c/EPO donde el plásmido de administrado vía intramuscular, sin embargo, se esperaba unos niveles más elevados de hemoglobina y hematocrito, ya que al ser la EPO un precursor eritrocítico promueve el aumento de estos valores. Mientras tanto, el ratón con menor desarrollo tumoral fue uno tratado con pcDNA3.1 con EPO y sus niveles de hemoglobina y hematocrito fueron más elevados con respecto a los demás ratones, esto siendo inverso al ratón con mayor desarrollo tumoral.

Por otro lado, se realizó un ensayo de herida a las 12 horas después de plaquear 30,000 células B16F10 de manera *in vitro* con el objetivo de ver cualitativamente la migración celular, se trabajaron 3 concentraciones diferentes para los grupos de tratamiento, 3 concentraciones de quitosán a la misma que se prepararon los nanocomplejos y una concentración de ConA como control positivo de proliferación celular y se observaron a las 12 y 24 horas después del corte y se observó en microscopio óptico invertido a 4X. El primer grupo observado fue el pcDNA3.1c/EPO donde se ve claramente la herida en el control a las 12 y 24 horas y se ve como se cierra gradualmente transcurrido el tiempo, sin embargo, hablando del pcDNA3.1 solo se puede apreciar la herida a las 12 horas después del corte a la primera concentración

1 µg mientras que a 1.5 µg y 2 µg se pierde completo la forma de la herida. Adicionalmente, después de transcurridas 24 horas se volvió a observar y en las 3 concentraciones no se logra ver claramente la herida y se forman concentrados o aglomeraciones que podrían tratarse de los nanocomplejos por sí mismos, la eritropoyetina o concentrados celulares adheridos. El segundo tratamiento observado fue pcDNA3.1s/EPO y a las 12 horas se aprecia la herida a las concentraciones de 1 µg y 1.5 µg y a las 24 horas solo se mantiene la herida en la primera concentración; a 2 µg se puede ver la formación de los mismos concentrados que pudieran ser nanocomplejos, comparando con el tratamiento anterior se ve que en ambos se puede observar la herida a 1 µg y en el pcDNAs/EPO se mantiene la herida a 1.5 µg a las 12 horas por lo que se sugiere que es el gen de EPO el responsable de que se pierda la herida. El tercer tratamiento comparado es la rHuEPO, la eritropoyetina ya purificada, sin nanopartículas de quitosán. En las 3 concentraciones de 5 15 y 20 unidades a 12 y 24 horas no se logró apreciar la herida formada y se vieron cúmulos de círculos alineados verticalmente por lo que se sugiere que los cúmulos o aglomeraciones son provocados por la expresión de la proteína. Como cuarto tratamiento se utilizó el quitosán solo, a la misma concentración con la que se preparó los nanocomplejos para ver su efecto en la proliferación celular; la herida se puede apreciar perfectamente con 1.5 µL de quitosán a las 12 y 24 hora y se observa una disminución entre un tiempo y otro, con 1 µL se ve la herida a las 12 horas, no siendo así para las 24 horas por lo que el quitosán provoca que se pierda, para el tercer volumen de quitosán de 2 µL la herida no es visible ni a las ni a las 24 horas por lo que se piensa que la combinación de las nanopartículas con el plásmido acelerar la formación de cúmulos o conglomerados haciendo uniforme la placa y perdiéndose la visibilidad de la herida. Concavalina fue utilizada como un control positivo a la proliferación ya que se ha reportado en diferentes líneas celulares esta particularidad (Fitzgerald *et al.*, 2001). Empleada a una

concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se observa claramente la herida y como se hace más pequeña entre las 12 y las 24 horas post-corte.

Se necesitan de uno a dos días para la formación de la monocapa de células y luego de 8 a 18 h para que la migración celular cierre la herida. 12 horas después del plaqueo la confluencia no era tan buena como lo esperado(Liang *et al.*, 2007).

De las membranas sensibilizadas del kit de arreglo proteómico, se pueden detectar 53 proteínas relacionadas a la angiogénesis, hay spots de referencia que dan fiabilidad a los resultados obtenidos, los cuales son los spots A1, A2, A21, A22, F1 y F2.

De acuerdo con los resultados de la figura 23 de los analitos detectados en el perfil proteómico, en las membranas se pudo observar la presencia de ADAMTS1, una desintegrina y metaloproteinasa con motivo de trombospondina. La expresión de este gen está relacionada a procesos inflamatorios como caquexia por cáncer, además de ser necesario para crecimiento normal, fertilidad y morfología y función de los órganos (Eissa *et al.*, 2019). Esta expresión se observó en los grupos control, rHuEPO y pcDNA3.1 s/EPO, no siendo expresada en pcDNA3.1 c/EPO. La angiogenina es una proteína de la superfamilia de ribonucleasas secretadas por vertebrados, a pesar de pertenecer a esta familia, tiene una ribonucleasa baja y es un factor angiogénico derivado de células de adenocarcinoma (Prehn y Jirström, 2020). Estimula la proliferación de células endoteliales y se ha demostrado que es necesaria para la actividad angiogénica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Kishimoto *et al.*, 2005). Estudios anteriores han demostrado firmemente el efecto de los andrógenos en la regulación de la biogénesis del ARNr durante el crecimiento celular dependiente de andrógenos en el desarrollo normal y

el estado patológico de la próstata, como la hiperplasia prostática benigna, el PIN y los cánceres de próstata (Vanli y Guo-Fu, 2015). Esta proteína solo se encontró presente en el grupo control.

El factor 3 de la coagulación además de su función descrita en la cascada de la coagulación, también se relaciona con actividad angiogénica con el factor tisular desencadenante (F3 / TF) y los receptores de trombina (F2R / PAR-1) pueden influir en el microambiente del tumor vascular y en la angiogénesis independientemente de la trombosis (D'Asti *et al.*, 2014). Este factor III esta expresado en los grupos control, rHuEPO y pcDNA3.1 s/EPO.

CYR61 es capaz de regular una amplia gama de actividades celulares, incluida la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia a través de la interacción con receptores de integrina de superficie celular, En la edad adulta, CYR61 juega un papel importante en la inflamación. Y reparación de tejidos, y se asocia con enfermedades relacionadas con la inflamación crónica, que incluyen artritis reumatoide, aterosclerosis , nefropatía y retinopatía relacionadas con la diabetes y muchas formas diferentes de cánceres (Banerjee *et al.*, 2019). Cyr61 se expresó en todos los grupos tratadas con excepción de pcDNA3.1 c/EPO. la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) inactiva las hormonas incretinas péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) (Ahrén, 2019). DPP-4 acelera la metástasis del cáncer de mama a través de la inducción de CXCL12 / CXCR4, que activa mTOR para promover la transición epitelio-mesenquimal (EMT). En células cultivadas, la caída de DPP-4 indujo EMT y migración celular. El tratamiento con el inhibidor de DPP-4 KR62436 (KR) promovió el crecimiento del tumor primario y la metástasis pulmonar en un modelo de ratón de aloinjerto de tumor 4T1 (Yang *et al.*, 2019). Solo se expresó en el grupo control. El

aumento de la expresión de endostatina/colageno XVIII se correlaciona con un nivel elevado de VEGF y mal pronóstico en carcinoma hepatocelular (Hu *et al.*, 2005). Este gen se expresó en todos los grupos trabajados en esta investigación. Las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) 1-6 se unen a los IGF, pero no a la insulina con alta afinidad. Inicialmente se identificaron como portadores de suero e inhibidores pasivos de las acciones de IGF. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que, aunque las IGFBP inhiben las acciones de IGF en muchas circunstancias, también pueden potenciar estas acciones. Los IGFBP se expresan ampliamente en la mayoría de los tejidos y son reguladores endocrinos y autocrinos (Clemmons, 1993; Mohan y Baylink, 2002). IGFBP1 solo se expresó en el grupo control mientras que IGFBP 2 e IGFBP3 se expresaron en todos los grupos. MCP-1 es una quimiocina atrayente de monocitos y por su efecto biológico podemos asegurar que existen monocitos, neutrófilos y macrófagos en el microambiente tumoral y su expresión, indica una respuesta inmune activa. La producción de MCP-1 es una consecuencia de la interacción entre las células del huésped y las células tumorales y que tanto las células tumorales como las células del estroma del huésped pueden contribuir a la producción de esta quimiocina. El TNF- α , un conocido promotor tumoral, es un mediador que se encuentra con frecuencia y que regula al alza la producción de MCP-1 por las células tumorales, mientras que los mediadores derivados de las células tumorales, como GM-CSF, actúan sobre las células huésped, como los macrófagos, para inducir la producción de MCP-1 y otras citocinas / quimiocinas (Yoshimura, 2018). MCP-1 se encontró en los grupos control y pcDNA3.1 c/EPO. Las proteínas de la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) participan en la degradación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación tisular, así como en procesos patológicos como la artritis y la metástasis. La mayoría de las MMP se secretan como

proteínas inactivas que se activan cuando se escinden mediante proteinasas extracelulares (Hua *et al.*, 2011). MMP9 se expresó en todos los grupos.

La osteopontina es secretada por mioblastos y macrófagos del músculo esquelético, y su expresión está regulada al alza en el músculo después de una lesión. La osteopontina está presente en muchas formas estructurales diferentes, que varían en sus patrones de expresión y efectos sobre las células (Wijesinghe *et al.*, 2019). La osteopontina se vio expresada en todos los grupos tratados. La pentraxina-3 desempeña un papel importante en la respuesta inmune humoral innata, la respuesta inflamatoria, la antiinfección, así como el daño y la reparación tisular (Garlanda *et al.*, 2016). Muchos estudios previos han demostrado que los niveles plasmáticos de pentraxina-3 se relacionaron positivamente con la gravedad de la sepsis, la pancreatitis aguda, la lesión aguda del miocardio y otras enfermedades, lo que indicó que la pentraxina-3 puede servir como un nuevo biomarcador para la inflamación, la infección y el tejido (Mauri *et al.*, 2010). Pentraxina 3 se expresó en grupo control y pcDNA3.1 c/EPO. El factor plaquetario 4 es producido predominantemente por megacariocitos y gránulos α de plaquetas y contribuye a la coagulación sanguínea (Kowalska *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el PF4 es angiostático mediante la inhibición de la proliferación y migración de células endoteliales (Maione *et al.*, 1990). La variante de PF4 CXCL4L1 también informó que muestra propiedades angiostáticas (Van Raemdonck *et al.*, 2014). Por lo tanto, se ha propuesto el PF4 recombinante como una opción alternativa para la terapia del cáncer (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, queda por dilucidar si el PF4 tiene un impacto en la metástasis tumoral (Jian *et al.*, 2017). El factor plaquetario 4 se expresó en 3 grupos, control, pcDNA3.1 s/EPO y pcDNA3.1 c/EPO. La PGF2 α que actúa a través de PTGFR también puede estimular la vía MAPK1 / 3, lo que da como resultado una expresión

elevada de factores angiogénicos en patologías endometriales (Kaczynski *et al.*, 2016). Pgf2 se expresó en grupo control, rHuEPO y pcDNA3.1 c/EPO. La prolactina la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario son miembros de una familia de hormonas polipeptídicas que comparten similitudes estructurales y actividades biológicas. Se han atribuido numerosas funciones a estas hormonas, entre las que destacan sus efectos recientemente descubiertos sobre la angiogénesis, pueden actuar como hormonas circulantes y como factores paracrinos / autocrinos para estimular o inhibir varias etapas de la formación y remodelación. de nuevos vasos sanguíneos, incluida la proliferación, migración, producción de proteasas y apoptosis de células endoteliales (Corbacho y Clapp, 2002). La prolactina puede transducir señales a través de múltiples vías, la activación de los miembros de la familia STAT, que se encuentran aguas abajo de la prolactina y otros factores de crecimiento, también se ha implicado en la tumorigénesis (Turkson, 2004). Solo se expresó en el grupo de rHuEPO el cual también es transducido por la vía JAK/STAT.

La función pro-tumorigénica de serpina E-1 en la progresión del cáncer y la metástasis ha sido objeto de una abundante literatura científica que ha apuntado a un papel pro-angiogénico, una función estimuladora del crecimiento y la migración. y una actividad anti-apoptótica, todos dirigidos a promover el crecimiento tumoral, la supervivencia de las células cancerosas y la metástasis. Serpina E-1 se expresó en todos los grupos tratados en la investigación, mientras que serpina F-1, codifica un miembro de la familia de las serpinas que no muestra la actividad inhibidora de la serina proteasa mostrada por muchas de las otras proteínas serpinas. La proteína codificada se secreta e inhibe fuertemente la angiogénesis. Además, esta proteína es un factor neurotrófico involucrado en la diferenciación neuronal en las células de la retinoblastoma. Se encontraron mutaciones en

este gen en individuos con osteogénesis imperfecta, tipo VI (Corbacho y Clapp, 2002). Serpina F-1 solo se observó en pcDNA3.1 c/EPO. TSP-1 y TSP-2 regulan la estructura y actividad de los ligandos antes mencionados interactuando directa o indirectamente con ellos, regulando así la actividad de diferentes tipos de células en respuesta a estímulos ambientales. Los procesos patológicos de numerosas ECV están asociados con la degradación y remodelación de los componentes de la ECM, y con la migración, disfunción y apoptosis celular (Zhang *et al.*, 2020). TSP2 solo se expresó en el grupo control.

Las proteínas detectadas en el arreglo se encuentra la expresión de VEGF, el cual como se ha descrito anteriormente, es el factor de crecimiento endotelial vascular y principal responsable, regulador y potenciador de la angiogénesis, se expresó en todos los grupos trabajados. Control; rHuEPO; pcDNA3.1 c/EPO y pcDNA3.1 s/EPO.

En el HeatMap de la Figura 24 se observan gráficamente las diferencias en densitometría de todas las proteínas expresadas en el arreglo proteómico siendo IGFBP-3 en el grupo control la más expresada y se puede apreciar la diferencia de los tratamientos. De las proteínas de mayor interés en el proyecto se habla de VEGF y los resultados de expresión demuestran ser mayores en grupos tratados con EPO con respecto al plásmido sin EPO, no obstante, en el grupo control existe una mayor expresión de VEGF lo que resulta contradictorio con la hipótesis planteada.

La expresión de prolactina exclusiva para el grupo de rHuEPO llama la atención ya que todos los ratones tratados son hembras y este es el único grupo donde se ve expresada esta proteína, asociando un efecto directo de la rHuEPO sobre esta proteína.

En la determinación de la viabilidad celular en la línea B16F10 se muestra como transcurridas 12 horas, el pcDNA3.1s/EPO 1.5 µg y el quitosan 6 µL presentan una mayor citotoxicidad en comparación con los demás tratamientos. A las 12 horas casi todos los tratamientos mantienen un 80% de viabilidad mientras que a las 24 horas se puede notar un cambio muy drástico donde el pcDNA3.1c/EPO 2 µg es el más citotóxico mientras que la rHuEPO presenta mayor viabilidad, pero no sobrepasa del 60%. El control de proliferación positiva, la ConA, es viable a las 12 horas, pero se reduce transcurridas las 24 horas hasta un 50%. Relacionando estos resultados con el ensayo de herida se sugiere que las células pueden estar despegadas o muertas ya que el resultado es solo visual mientras que el MTT evalúa la viabilidad a través de la formación de cristales de formazán. Como perspectiva es recomendable elaborar una curva de más concentraciones de rHuEPO y plásmidos para una valoración más específica de la viabilidad, así como esperar 18 a 24 horas para hacer la herida en el ensayo de herida.

En distintos ensayos de biomarcadores para citocinas se ha visto expresión elevada de citocinas como TNF- α y MCP-1, asociando estos resultados a los planteados por este estudio podemos atribuir que el melanoma B16f10 es un factor importante para la expresión de esta citocina (Pedersen *et al.*, 2020). MCP-1 es una quimiocina atrayente de monocitos y su efecto biológico podemos asegurar que existen monocitos, neutrófilos y macrófagos en el microambiente tumoral y su expresión, indica una respuesta inmune activa. El grupo con mayor expresión de esta quimiocina fue el de rHuEPO. Así mismo fue donde se bio una mayor inflamación en la cámara termográfica, esto coincide en la evaluación cualitativa y cuantitativa de la inflamación, así mismo en el grupo pcDNA3.1c/EPO hay una expresión similar respecto al rHuEPO por tanto que se puede decir que esa elevación corresponde al

tratamiento con EPO, no siendo así para el grupo control ni para el pcDNA3.1s/EPO, es decir, MCP-1 se ve expresada por acción del melanoma, además, se ve aumentada por acción de la EPO.

La expresión de monocitos activados puede producir altos niveles de IL-10 (de Waal Malefyt *et al.*, 1991), como se observa en este estudio, concentraciones elevadas de MCP-1 un quimio atrayente de monocitos puede ser el responsable de la producción de esta IL-10. Como se muestra en la figura 20 los grupos con EPO alcanzan valores más elevados de MCP-1 por lo que se relacionan directamente con la expresión, otro efecto de la IL-10 es que es capaz de inhibir la producción de otras citocinas inflamatorias y ayuda a un mejor pronóstico en cáncer por melanomas siendo utilizada como un marcador por su expresión, sin embargo este efecto de suprimir otras citocinas, promueve el desarrollo del melanoma e induce la proliferación y polarización de macrófagos, atraídos previamente por MCP-1 (Gordy *et al.*, 2018). La IL-6 es una citocina de respuesta inflamatoria, asociada al estrés, se ve elevada en condiciones de estrés crónico inducido. Se ha visto una gran adhesión en células de melanoma B16 a proteínas de la matriz estromal (fibronectina, laminina y vitronectina). Se han descrito respuestas no específicas antitumorales por mecanismos proinflamatorios mediados por la IL-6 (Gordy *et al.*, 2018). La IL-6 y la EPO pueden unirse al receptor común β por un dominio en común lo que al estar elevado la EPO permite asimismo la unión de IL-6, no siendo está producida exclusivamente por acción de la respuesta inmune asociada al tumor. Así mismo, se observa que en el grupo tratado con rHuEPO hay valores de concentración más elevados con respecto a los otros grupos, por lo que puede asociarse a que expresión elevada de EPO involucra más receptores entre ellos el común β , en el cual pueden unirse ambas proteínas (Bazan, 1989). Contrariamente a lo que se creía que la acción de la IL-6 disminuiría el

volumen tumoral y favorecería a una regresión se observó una mayor masa tumoral en el grupo donde se vio mayor concentración de IL-6, por esto podemos asociar la IL-6 a una respuesta de hipoxia inducida provocada por la EPO (Faquin *et al.*, 1992).

9. CONCLUSIONES

Se logró caracterizar el plásmido con y sin el gen de EPO. Las imágenes termográficas ofrecieron un panorama más gráfico del desarrollo de la inflamación localizada.

Los tratamientos con rHuEPO tuvieron niveles más altos de hemoglobina y hematocrito respecto al control y así mismo un mayor tamaño de masa tumoral.

La administración de eritropoyetina a través de pcDNA3.1c/EPO induce un mayor tamaño masa tumoral respecto al control.

La regeneración celular fue más evidente en células tratadas con plásmidos con y sin EPO.

MCP-1, IL-10 e IL-6 se sobre expresaron en los tratamientos con rHuEPO y pcDNA3.1c/EPO.

La administración de rHuEPO y pcDNA3.1c/EPO en ratones, promovieron el desarrollo de mayor volumen tumoral, inflamación y expresión de citocinas proinflamatorias.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la administración de eritropoyetina en otras líneas celulares de tumor más sólido para mejorar los cortes histológicos.
- Probar en ensayo de herida en diversas líneas celulares para comparar comportamiento en la proliferación.
- Realizar un ensayo de producción de melanina para células B16F10.
- Realizar ensayo de tyrosinasas en células B16F10.
- Realizar un ensayo de perfil proteómico dirigido a proteínas asociadas a angiogénesis
- Hacer qPCR dirigida al receptor de EPO y de VEGF para asociar los efectos de la administración de EPO con angiogénesis.

11 REFERENCIAS.

- Acs, G., Zhang, P. J., McGrath, C. M., Acs, P., McBroom, J., Mohyeldin, A., Liu, S., Lu, H., & Verma, A. (2003). Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *The American journal of pathology*, *162*(6), 1789-1806.
- Acs, G., Zhang, P. J., Rebbeck, T. R., Acs, P., & Verma, A. (2002). Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer*, *95*(5), 969-981.
- Ahrén, B. (2019). DPP-4 inhibition and the path to clinical proof. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 376.
- Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W., & Hennink, W. E. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced drug delivery reviews*, *62*(1), 59-82.
- Arcasoy, M. O. (2008a). Erythropoiesis-stimulating agent use in cancer: preclinical and clinical perspectives. *Clinical Cancer Research*, *14*(15), 4685-4690.
- Arcasoy, M. O. (2008b). The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *British journal of haematology*, *141*(1), 14-31.
- Arcasoy, M. O., Amin, K., Chou, S.-C., Haroon, Z. A., Varia, M., & Raleigh, J. A. (2005). Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clinical Cancer Research*, *11*(1), 20-27.
- Arcasoy, M. O., Amin, K., Karayal, A. F., Chou, S.-C., Raleigh, J. A., Varia, M. A., & Haroon, Z. A. (2002). Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Laboratory investigation*, *82*(7), 911.
- Arcasoy, M. O., Amin, K., Vollmer, R. T., Jiang, X., Demark-Wahnefried, W., & Haroon, Z. A. (2005). Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human prostate cancer. *Modern Pathology*, *18*(3), 421.
- Bachmann, S., Le Hir, M., & Eckardt, K. (1993). Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *41*(3), 335-341.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory toxicology and pharmacology*, *56*(3), 290-299.
- Banerjee, S., Ghosh, A., VonHoff, D. D., & Banerjee, S. K. (2019). Cyr61/CCN1 targets for chemosensitization in pancreatic cancer. *Oncotarget*, *10*(38), 3579.
- Bayer-Garner, I. B., Hough, J. A., & Smoller, B. R. (1999). Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *12*(8), 770-774.
- Bazan, J. F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β -chain. *Biochemical and biophysical research communications*, *164*(2), 788-795.
- Bikfalvi, A. (2017). History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis*, *20*(4), 463-478.
- Blanpain, C. (2013). Tracing the cellular origin of cancer. *Nature cell biology*, *15*(2), 126.

- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.-w., Smart, J., & Su-Rick, C.-j. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(41), 14907-14912.
- Busam, K. J., Berwick, M., Blessing, K., Fandrey, K., Kang, S., Karaoli, T., Fine, J., Cochran, A. J., White, W. L., & Rivers, J. (1995). Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *The American journal of pathology*, *147*(4), 1049.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews Drug discovery*, *10*(6), 417-427.
- Clemmons, D. R. (1993). IGF binding proteins and their functions. *Molecular reproduction and development*, *35*(4), 368-375.
- Corbacho, A., & Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *The Journal of endocrinology*, *173*(2), 219-238.
- Crawford, Y., & Ferrara, N. (2009). VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell and tissue research*, *335*(1), 261-269.
- Chan, K. K., Matchett, K. B., Coulter, J. A., Yuen, H.-F., McCrudden, C. M., Zhang, S.-D., Irwin, G. W., Davidson, M. A., Rüllicke, T., & Schober, S. (2017). Erythropoietin drives breast cancer progression by activation of its receptor EPOR. *Oncotarget*, *8*(24), 38251.
- Chen, C., & Sytkowski, A. J. (2001). Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38518-38526.
- D'Asti, E., Kool, M., Pfister, S. M., & Rak, J. (2014). Coagulation and angiogenic gene expression profiles are defined by molecular subgroups of medulloblastoma: evidence for growth factor-thrombin cross-talk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *12*(11), 1838-1849.
- de Fine Olivarius, F., Wulf, H., Crosby, J., & Norval, M. (1999). Isomerization of urocanic acid after ultraviolet radiation is influenced by skin pigmentation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *48*(1), 42-47.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., & De Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *174*(5), 1209-1220.
- Debeljak, N., Solár, P., & Sytkowski, A. J. (2014). Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Frontiers in immunology*, *5*, 563.
- Dunlop, E., Percy, M., Boland, M., Maxwell, A., & Lappin, T. (2006). Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. *Neurodegenerative Diseases*, *3*(1-2), 94-100.
- Dunlop, E. A., Maxwell, A. P., & Lappin, T. R. (2007). Impaired downregulation following erythropoietin receptor activation in non-small cell lung carcinoma. *Stem Cells*, *25*(2), 380-384.
- Dunlop, E. A., Percy, M., Boland, M., Maxwell, A., & Lappin, T. (2006). Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. *Neurodegenerative Diseases*, *3*(1-2), 94-100.

- Eissa, M. A., Lerner, L., Abdelfatah, E., Shankar, N., Canner, J. K., Hasan, N. M., Yaghoobi, V., Huang, B., Kerner, Z., & Takaesu, F. (2019). Promoter methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood. *Clinical epigenetics*, *11*(1), 1-10.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *95*, 258-265.
- Faquin, W. C., Schneider, T. J., & Goldberg, M. A. (1992). Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production.
- Faraji, A. H., & Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *17*(8), 2950-2962.
- Feldman, L., Wang, Y., Rhim, J. S., Bhattacharya, N., Loda, M., & Sytkowski, A. J. (2006). Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *The Prostate*, *66*(2), 135-145.
- Fitzgerald, A., Jordinson, M., Rhodes, J., Singh, R., Calam, J., & Goodlad, R. (2001). Comparison of the effects of concanavalin-A and epidermal growth factor on epithelial cell proliferation in the rat intestine. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *15*(7), 1077-1084.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*, *285*(21), 1182-1186.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery*, *6*(4), 273-286.
- Garlanda, C., Jaillon, S., Doni, A., Bottazzi, B., & Mantovani, A. (2016). PTX3, a humoral pattern recognition molecule at the interface between microbe and matrix recognition. *Current opinion in immunology*, *38*, 39-44.
- GOMEZ-FLORES, R., CABALLERO-HERNANDEZ, D., TAMEZ-GUERRA, R., RODRIGUEZ-PADILLA, C., TAMEZ-GUERRA, P., RICE, K. C., HICKS, M. E., & WEBER, R. J. (2005). Increased survival of tumor-bearing mice by the delta opioid SNC 80. *Anticancer research*, *25*(6C), 4563-4567.
- Gordy, J. T., Luo, K., Francica, B., Drake, C., & Markham, R. B. (2018). Anti-IL-10 mediated enhancement of anti-tumor efficacy of a dendritic-cell targeting MIP3 α -gp100 vaccine in the B16F10 mouse melanoma model is dependent on type I interferons. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *41*(4), 181.
- Greenwald, A. C., Licht, T., Kumar, S., Oladipupo, S. S., Iyer, S., Grunewald, M., & Keshet, E. (2019). VEGF expands erythropoiesis via hypoxia-independent induction of erythropoietin in noncanonical perivascular stromal cells. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(1), 215-230.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.
- Hu, T.-H., Huang, C.-C., Wu, C.-L., Lin, P.-R., Liu, S.-Y., Lin, J.-W., Chuang, J.-H., & Tai, M. H. (2005). Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Modern Pathology*, *18*(5), 663-672.
- Hua, H., Li, M., Luo, T., Yin, Y., & Jiang, Y. (2011). Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(23), 3853-3868.

- Jackson, D. B., Stein, M., Voss, H., Brock, S., Danes, C. G., & Sood, A. (2012). Novel tissue protective erythropoietin receptor (nepor) and methods of use: Google Patents.
- Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*, 7(9), 987-989.
- Jelkmann, W., & Wagner, K. (2004). Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Annals of hematology*, 83(11), 673-686.
- Jeong, J. Y., Feldman, L., Solar, P., Szenajch, J., & Sytkowski, A. J. (2008). Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *International journal of cancer*, 122(2), 274-280.
- Jian, J., Pang, Y., Yan, H. H., Min, Y., Achyut, B. R., Hollander, M. C., Lin, P. C., Liang, X., & Yang, L. (2017). Platelet factor 4 is produced by subsets of myeloid cells in premetastatic lung and inhibits tumor metastasis. *Oncotarget*, 8(17), 27725.
- Juul, S. E., Yachnis, A. T., & Christensen, R. D. (1998). Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early human development*, 52(3), 235-249.
- Kaczynski, P., Kowalewski, M. P., & Waclawik, A. (2016). Prostaglandin F2 α promotes angiogenesis and embryo–maternal interactions during implantation. *Reproduction*, 151(5), 539-552.
- Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A., & Hu, G.-f. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 24(3), 445-456.
- Kowalska, M. A., Rauova, L., & Poncz, M. (2010). Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis research*, 125(4), 292-296.
- Kumar, S. M., Zhang, G., Bastian, B. C., Arcasoy, M. O., Karande, P., Pushparajan, A., Acs, G., & Xu, X. (2012a). Erythropoietin receptor contributes to melanoma cell survival in vivo. *Oncogene*, 31(13), 1649-1660.
- Kumar, S. M., Zhang, G., Bastian, B. C., Arcasoy, M. O., Karande, P., Pushparajan, A., Acs, G., & Xu, X. (2012b). Erythropoietin receptor contributes to melanoma cell survival in vivo. *Oncogene*, 31(13), 1649.
- Lee, J. H., Cho, B., Jun, H.-j., Seo, W.-D., Kim, D.-W., Cho, K.-J., & Lee, S.-J. (2012). Momilactone B inhibits protein kinase A signaling and reduces tyrosinase-related proteins 1 and 2 expression in melanocytes. *Biotechnology letters*, 34(5), 805-812.
- Lee, M., Nah, J.-W., Kwon, Y., Koh, J. J., Ko, K. S., & Kim, S. W. (2001). Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical research*, 18(4), 427-431.
- Li, J., Liu, B., Yan, L.-n., & Lau, W.-y. (2015). The roles and potential therapeutic implications of CXCL4 and its variant CXCL4L1 in the pathogenesis of chronic liver allograft dysfunction. *Cytokine & growth factor reviews*, 26(1), 67-74.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329.
- Liu, W. M., Powles, T., Shamash, J., Propper, D., Oliver, T., & Joel, S. (2004). Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. *Oncogene*, 23(4), 981.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Vaseghi, H. R., Qian, L., & Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Tumor cells and the onset of cancer. *Molecular cell biology*.
- Lopez, T. V., Lappin, T. R., Maxwell, P., Shi, Z., Lopez-Marure, R., Aguilar, C., & Rocha-Zavaleta, L. (2011). Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *International journal of cancer*, *129*(11), 2566-2576.
- Maiese, K., Li, F., & Chong, Z. Z. (2005). New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama*, *293*(1), 90-95.
- Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., & Sharpe, R. J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science*, *247*(4938), 77-79.
- Mastromarino, V., Musumeci, M. B., Conti, E., Tocci, G., & Volpe, M. (2013). Erythropoietin in cardiac disease: effective or harmful? *Journal of Cardiovascular Medicine*, *14*(12), 870-878.
- Mauri, T., Bellani, G., Coppadoro, A., Peri, G., Cuccovillo, I., Cugno, M., Iapichino, G., Gattinoni, L., Pesenti, A., & Mantovani, A. (2010). Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive care medicine*, *36*(4), 621-629.
- Maxwell, P. H., Ferguson, D. J., Nicholls, L. G., Iredale, J. P., Pugh, C. W., Johnson, M. H., & Ratcliffe, P. J. (1997). Sites of erythropoietin production. *Kidney international*, *51*(2), 393-401.
- McKinney, M., & Arcasoy, M. O. (2011). Erythropoietin for oncology supportive care. *Experimental cell research*, *317*(9), 1246-1254.
- Meier, F., Nesbit, M., Hsu, M.-Y., Martin, B., Van Belle, P., Elder, D. E., Schaumburg-Lever, G., Garbe, C., Walz, T. M., & Donatien, P. (2000). Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. *The American journal of pathology*, *156*(1), 193-200.
- Miao, S., Wang, S.-M., Cheng, X., Li, Y.-F., Zhang, Q.-S., Li, G., He, S.-Q., Chen, X.-P., & Wu, P. (2017). Erythropoietin promoted the proliferation of hepatocellular carcinoma through hypoxia induced translocation of its specific receptor. *Cancer cell international*, *17*(1), 119.
- Miyake, T., Kung, C. K., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(15), 5558-5564.
- Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Sunuma, T., Asahida, T., Saito, Y., & Takahashi, A. (2011). Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. *General and comparative endocrinology*, *171*(1), 75-81.
- Mohan, S., & Baylink, D. (2002). IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and-independent mechanisms. *The Journal of endocrinology*, *175*(1), 19-31.
- Mosdam, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*, *65*, 55-63.
- Nagy, J. A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2010). *Heterogeneity of the tumor vasculature*. Paper presented at the Seminars in thrombosis and hemostasis.
- Neitzel, L. T., Neitzel, C. D., Magee, K. L., & Malafa, M. P. (1999). Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Ann Surg Oncol*, *6*(1), 70-74.

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213.
- Pandya, P. H., Murray, M. E., Pollok, K. E., & Renbarger, J. L. (2016). The immune system in cancer pathogenesis: potential therapeutic approaches. *Journal of immunology research*, 2016.
- Papworth, K., Bergh, A., Grankvist, K., Ljungberg, B., & Rasmuson, T. (2009). Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. *Tumor Biology*, 30(2), 86-92.
- Pedersen, J. G., Madsen, A. T., Gammelgaard, K. R., Aggerholm-Pedersen, N., Sørensen, B. S., Øllegaard, T. H., & Jakobsen, M. R. (2020). Inflammatory Cytokines and ctDNA Are Biomarkers for Progression in Advanced-Stage Melanoma Patients Receiving Checkpoint Inhibitors. *Cancers*, 12(6), 1414.
- Philo, J. S., Aoki, K. H., Arakawa, T., Narhi, L. O., & Wen, J. (1996). Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry*, 35(5), 1681-1691.
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540.
- Prehn, J. H., & Jirström, E. (2020). Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 442-446.
- Rahbek-Nielsen, H., Roepstorff, P., Reischl, H., Wozny, M., Koll, H., & Haselbeck, A. (1997). Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 32(9), 948-958.
- Reed, J. A., McNutt, N. S., Bogdany, J. K., & Albino, A. P. (1996). Expression of the mast cell growth factor interleukin-3 in melanocytic lesions correlates with an increased number of mast cells in the perilesional stroma: implications for melanoma progression. *Journal of cutaneous pathology*, 23(6), 495-505.
- Reymond, N., d'Agua, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 858.
- Ribatti, D., Marzullo, A., Nico, B., Crivellato, E., Ria, R., & Vacca, A. (2003). Erythropoietin as an angiogenic factor in gastric carcinoma. *Histopathology*, 42(3), 246-250.
- Ribatti, D., Nico, B., Perra, M. T., Longo, V., Maxia, C., Annese, T., Piras, F., Murtas, D., & Sirigu, P. (2010). Erythropoietin is involved in angiogenesis in human primary melanoma. *International journal of experimental pathology*, 91(6), 495-499.
- Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., Nico, B., Roncali, L., & Dammacco, F. (1999). Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 93(8), 2627-2636.
- Ribatti, D., Vacca, A., Ria, R., Marzullo, A., Nico, B., Filotico, R., Roncali, L., & Dammacco, F. (2003). Neovascularisation, expression of fibroblast growth factor-2, and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in human malignant melanoma. *European Journal of Cancer*, 39(5), 666-674.
- Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C. R., & Grenha, A. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of functional biomaterials*, 3(3), 615-641.

- Rundhaug, J. E. (2003). Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer: Commentary re: AC Lockhart et al., Reduction of Wound Angiogenesis in Patients Treated with BMS-275291, a Broad Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00–00, 2003. *Clinical Cancer Research*, 9(2), 551-554.
- Sanvicens, N., & Marco, M. P. (2008). Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology*, 26(8), 425-433.
- Semenza, G. L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(2), 71-103.
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Shen, J.-M., Guan, X.-M., Liu, X.-Y., Lan, J.-F., Cheng, T., & Zhang, H.-X. (2012). Luminescent/magnetic hybrid nanoparticles with folate-conjugated peptide composites for tumor-targeted drug delivery. *Bioconjugate chemistry*, 23(5), 1010-1021.
- Shiozawa, Y., McGee, S., Pienta, M. J., McGregor, N., Jung, Y., Yumoto, K., Wang, J., Berry, J. E., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2013). Erythropoietin supports the survival of prostate cancer, but not growth and bone metastasis. *Journal of cellular biochemistry*, 114(11), 2471-2478.
- Sorg, H., Harder, Y., Krueger, C., Reimers, K., & Vogt, P. M. (2013). The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use. *Medicinal research reviews*, 33(3), 637-664.
- Sytkowski, A. J. (2006). *Erythropoietin: blood, brain and beyond*: John Wiley & Sons.
- Sytkowski, A. J. (2007). Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. *Sci. Stake*, 2007(395), pe38-pe38.
- Szenajch, J., Wcislo, G., Jeong, J.-Y., Szczylik, C., & Feldman, L. (2010). The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells: from clinic to bench—a critical review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806(1), 82-95.
- Trošt, N., Hevir, N., Rižner, T. L., & Debeljak, N. (2013). Correlation between erythropoietin receptor (s) and estrogen and progesterone receptor expression in different breast cancer cell lines. *International journal of molecular medicine*, 31(3), 717-725.
- Turkson, J. (2004). STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets*, 8(5), 409-422.
- Um, M., Gross, A. W., & Lodish, H. F. (2007). A “classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cellular signalling*, 19(3), 634-645.
- Van Raemdonck, K., Berghmans, N., Vanheule, V., Bugatti, A., Proost, P., Opendakker, G., Presta, M., Van Damme, J., & Struyf, S. (2014). Angiostatic, tumor inflammatory and anti-tumor effects of CXCL447–70 and CXCL4L147–70 in an EGF-dependent breast cancer model. *Oncotarget*, 5(21), 10916.
- Vanli, N., & Guo-Fu, H. (2015). Mechanism and function of Angiogenin in prostate Cancer. *Zhongguo sheng wu hua xue yu fen zi sheng wu xue bao= Chinese journal of biochemistry and molecular biology*, 31(12), 1261.
- Wang, S., Zhang, C., Li, J., Niyazi, S., Zheng, L., Xu, M., Rong, R., Yang, C., & Zhu, T. (2017). Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. *Cell death & disease*, 8(4), e2725.

- Westenfelder, C., & Baranowski, R. L. (2000). Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney international*, 58(2), 647-657.
- Whiteside, T. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904.
- Whiteside, T. L. (2006). *Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Wijesinghe, D. K. W., Mackie, E. J., & Pagel, C. N. (2019). Normal inflammation and regeneration of muscle following injury require osteopontin from both muscle and non-muscle cells. *Skeletal muscle*, 9(1), 1-13.
- Yang, F., Takagaki, Y., Yoshitomi, Y., Ikeda, T., Li, J., Kitada, M., Kumagai, A., Kawakita, E., Shi, S., & Kanasaki, K. (2019). Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 accelerates epithelial–mesenchymal transition and breast cancer metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR axis. *Cancer research*, 79(4), 735-746.
- Yasuda, Y., Fujita, Y., Matsuo, T., Koinuma, S., Hara, S., Tazaki, A., Onozaki, M., Hashimoto, M., Musha, T., & Ogawa, K. (2003). Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis*, 24(6), 1021-1029.
- Ye, Y., Chu, J.-H., Wang, H., Xu, H., Chou, G.-X., Leung, A. K.-M., Fong, W.-f., & Yu, Z.-L. (2010). Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *Journal of ethnopharmacology*, 132(2), 533-535.
- Yoshimura, T. (2018). The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cellular & molecular immunology*, 15(4), 335-345.
- Zhang, K., Li, M., Yin, L., Fu, G., & Liu, Z. (2020). Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases. *International journal of molecular medicine*, 45(5), 1275-1293.

12 ANEXO 1.

Mapa de analitos detectados por el kit de angiogenesis.

1	ADAMTS1	12	IGFBP-2	23	PDGF-AA
2	Amphiregulin	13	IGFBP-3	24	PDGF-AB/PDGF-BB
3	Angiogenin	14	IL-1 α	25	Pentraxin 3
4	Angiopoietin-1	15	IP-10	26	PF4
5	CXCL16	16	KC	27	Serpin E1/PAI-1
6	Cyr61/CCN1	17	MCP-1	28	Serpin F1/PEDF
7	Endostatin	18	MIP-1 α	29	TIMP-1
8	Endothelin-1	19	MMP-3	30	VEGF
9	Fractalkine	20	MMP-9	31	VEGF-B
10	GM-CSF	21	NOV/CCN3		
11	IGFBP-1	22	Osteopontin		

RESUMEN BIOGRÁFICO

Pedro Alejandro Avitia Rodríguez

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis:

**INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE ERITROPOYETINA
RECOMBINANTE EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN UN MODELO MURINO**

Campo de estudio: Inmunobiología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Chihuahua, Chihuahua, el 10 de Septiembre de 1993, hijo de Leticia Avitia Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido: Licenciado Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2016.