

Trabajo Fin de Máster
Máster en Investigación Biomédica

**Consecuencias funcionales de la regulación de CEMIP
mediada por histamina y TGF- β en el contexto del
melanoma humano**

Autora:
Ainhoa Alonso Pardavila
Directoras:
Aintzane Asumendi Mallea
Aintzane Apraiz García

ÍNDICE

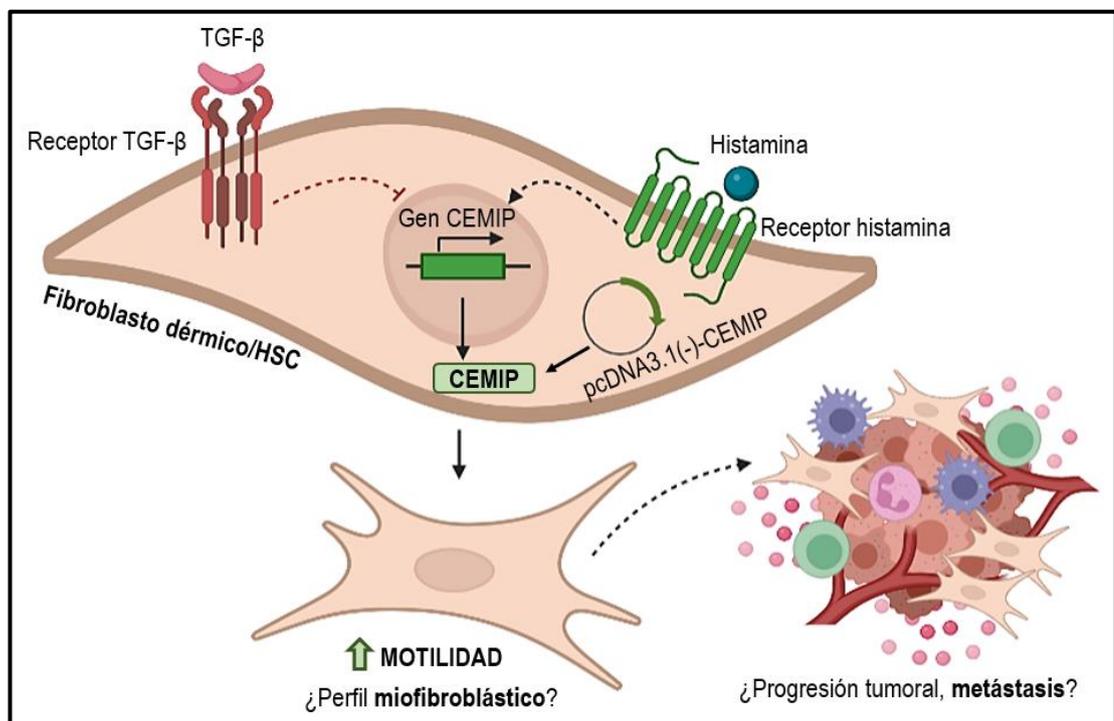
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer y metástasis	1
1.1.2. El melanoma cutáneo maligno.....	3
1.2. El microambiente y la progresión tumoral	3
1.3. Proteína inductora de migración celular y de unión a hialuronano (CEMIP) ...	5
1.3.1. Moduladores de los niveles celulares de CEMIP.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	8
3.2. Tratamiento con histamina y TGF- β	9
3.3. Ensayos de transfección	11
3.3.1. Transfección transitoria con siRNA.....	11
3.3.2. Transfección transitoria con plásmido de sobreexpresión	12
3.4. Análisis proteico por western blot.....	14
3.5. Ensayos de migración celular.....	16
3.6. Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Efecto de la histamina y el TGF- β sobre los niveles de CEMIP	18
4.2. Efecto del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles de CEMIP....	18
4.3. Papel de CEMIP en la capacidad migratoria de células estromales.....	20
4.4. Verificación del papel de CEMIP en la motilidad de HSC	21
4.5. Implicación de CEMIP en la adquisición de perfiles miofibroblásticos	23
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	28
7. AGRADECIMIENTOS	28
8. BIBLIOGRAFÍA.....	30
9. ANEXO. MATERIAL ADICIONAL	33

RESUMEN

La metástasis es la responsable del 90% de la mortalidad asociada al cáncer y es un proceso de especial relevancia en el melanoma cutáneo debido a su elevada tendencia metastásica. Este proceso se sustenta tanto en alteraciones a nivel de las células tumorales como en el microambiente que las rodea (TME). La adquisición de motilidad por parte de las células tumorales es un evento esencial, al igual que la activación de fibroblastos o células funcionalmente análogas de otros órganos como las estrelladas hepáticas (HSC). En consecuencia, es necesario, sobre todo en el melanoma, la identificación de proteínas clave relacionadas con la progresión tumoral maligna. La proteína inductora de migración celular y de unión a hialuronano (CEMIP) se ha relacionado con la migración de varios modelos tumorales y con la capacidad de desarrollar metástasis, si bien no existen datos en relación al melanoma. Así mismo, se desconoce su efecto sobre células estromales susceptibles de formar el TME. La histamina y el TGF- β son moléculas relacionadas con la inmunomodulación y la fibrosis, aspectos estrechamente relacionados con la modulación del TME en contextos tumorales. Además, se ha observado su capacidad para regular los niveles endógenos de CEMIP en fibroblastos dérmicos. Por ello, en este estudio, se han modulado los niveles de CEMIP con histamina y TGF- β y se ha analizado el papel de la proteína en la motilidad y la activación de células humanas de melanoma metastásico (A2058, Colo800) y de células del estroma de órganos íntimamente ligados al desarrollo del melanoma cutáneo (fibroblastos dérmicos Detroit551, HSC LX-2). Los tratamientos con histamina y TGF- β aumentaron y disminuyeron, respectivamente, los niveles endógenos de CEMIP en las líneas Detroit551 y LX-2. Las líneas de melanoma no respondieron a esta regulación. Por ello, se analizó la correlación entre dicha regulación y la motilidad de los modelos celulares que respondieron a la misma. La modulación indirecta de los niveles endógenos de CEMIP con histamina y TGF- β se correlacionó con la motilidad de las líneas Detroit551 y LX-2. La implicación de CEMIP en la motilidad de la línea LX-2 se corroboró mediante ensayos de sobreexpresión de dicha proteína. Dado que la activación de fibroblastos asociados al tumor (CAFs) implica la adquisición de un fenotipo miofibroblástico caracterizado por la adquisición de motilidad y la expresión de α -SMA, se analizó la interrelación entre niveles celulares de CEMIP y α -SMA. Ni la

modulación directa (sobreexpresión), ni la indirecta (histamina y TGF- β) de CEMIP se relacionaron con la expresión α -SMA en las líneas Detroit551 y LX-2, lo que sugiere que CEMIP podría inducir un perfil de activación diferente caracterizado por la adquisición de motilidad y por la expresión de otros marcadores diferentes de α -SMA. Quedan por determinar las consecuencias de lo observado sobre la propia progresión del melanoma cutáneo.

Palabras clave: metástasis, melanoma cutáneo, microambiente tumoral, motilidad, activación, CEMIP, histamina, TGF- β , fibroblastos asociados al tumor, α -SMA.



Resumen gráfico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER Y METÁSTASIS

El **cáncer** es un conjunto heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una **acumulación de mutaciones** en las células normales del organismo, y la consecuente **transformación** progresiva de dichas células en células malignas que proliferan sin control y adquieren la capacidad de migrar, invadir y metastatizar en otros tejidos (Bertram, 2000). Según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, la incidencia global y la tasa de mortalidad asociadas al cáncer ascenderán a 30,2 millones de casos nuevos y a 16,3 millones de muertes al año, respectivamente, en 2040 (*International Agency for Research on Cancer [IARC], 2020*). Si bien es cierto que en los últimos años el desarrollo de nuevas inmunoterapias y terapias dirigidas ha mejorado el pronóstico de los pacientes, los métodos empleados tradicionalmente para el diagnóstico y el seguimiento del cáncer son insuficientes y, a menudo, retrasan el inicio del tratamiento (Hirsch et al., 2022). En consecuencia, es necesario una mejora de dichos métodos para un abordaje óptimo de la enfermedad.

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología molecular y celular del cáncer, la **metástasis** sigue siendo la responsable del **90% de la mortalidad** asociada a dicha enfermedad (Chaffer y Weinberg, 2011). Este proceso consiste en la **diseminación de las células de un tumor maligno a tejidos distantes**, a través de los vasos sanguíneos y linfáticos. Dichas células se adaptan al microambiente del nuevo tejido y desarrollan un tumor secundario (Valastyan y Weinberg, 2011). La metástasis sucede a través de la denominada “**cascada metastásica**”, la cual engloba las siguientes etapas sucesivas representadas en la **Figura 1**: (1) adquisición de las células tumorales de un fenotipo invasivo, (2) invasión local a través de la matriz extracelular, (3) intravasación para ingresar en la circulación, (4) supervivencia de las células tumorales circulantes al flujo de la circulación, (5) detención en los capilares y extravasación, (6) invasión del microambiente (nicho pre-metastásico) del nuevo tejido, (7) evasión de la respuesta inmune innata del nuevo tejido y adaptación al nuevo microambiente (desarrollo de micrometástasis), y (8) formación del complejo macrometastásico activo (Chaffer y Weinberg, 2011; Valastyan y Weinberg, 2011).

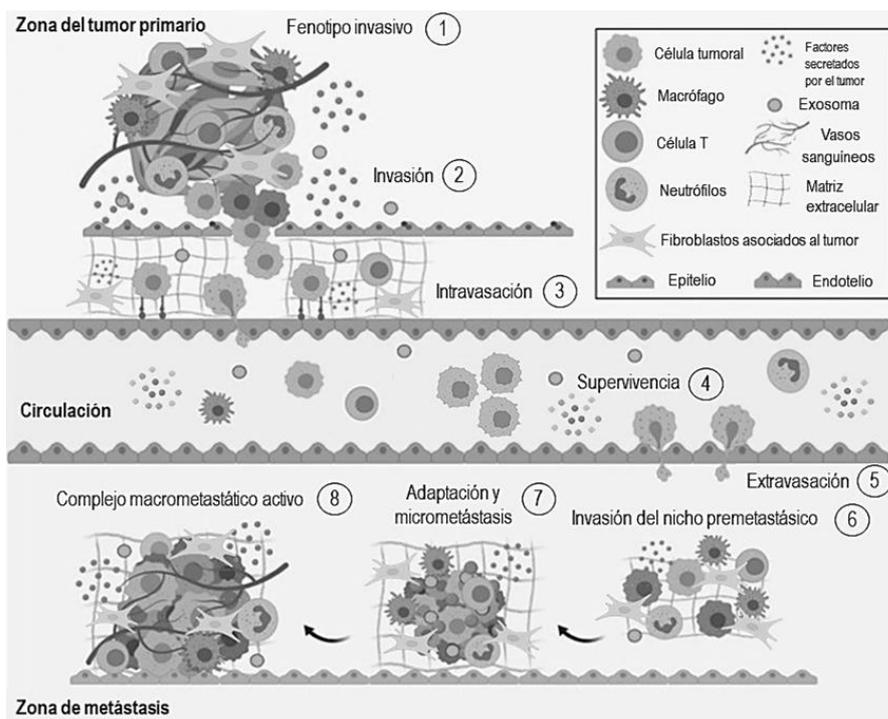


Figura 1. Representación de la cascada metastásica y papel del microambiente tumoral. El desarrollo de la metástasis requiere que las células tumorales adquieran un fenotipo invasivo (1) para invadir el tejido local a través de la matriz extracelular (2) e intravasarse (3). Las células tumorales circulantes sobreviven al flujo de la circulación (4) y se detienen en los capilares para extravasarse (5) e invadir el microambiente del nuevo tejido (6). Dichas células se adaptan al nuevo microambiente y dan lugar a una micrometástasis (7) que terminará formando el complejo macrometastático activo (8). El microambiente tumoral (TME) juega un papel importante en la diseminación de un tumor. El TME, formado por la matriz extracelular y las células estromales (células endoteliales, células inmunitarias infiltrantes y fibroblastos asociados al tumor), interactúa de forma bidireccional con las células tumorales. En consecuencia, las células del TME son reclutadas y activadas para sustentar el tumor primario y generar un microambiente adecuado en la zona de metástasis. Adaptada de (Fares et al., 2020).

En la progresión maligna de un tumor **hacia la metástasis**, es clave (y de hecho se considera uno de los *hallmarks* del cáncer) que las células tumorales adquieran **capacidades migratorias e invasivas**. El mecanismo principal que permite la adquisición de dichas capacidades, es el proceso denominado “transición epitelio-mesénquima” (EMT) (Hanahan y Weinberg, 2011). Este proceso, que en un contexto fisiológico ocurre durante la embriogénesis, es, de manera patológica, inducido principalmente por la acumulación de mutaciones en las células tumorales (Chaffer y Weinberg, 2011) y consiste en la pérdida de características epiteliales (e.g. uniones intercelulares estables y falta de motilidad) junto con la adquisición de características mesenquimales (e.g. ausencia de uniones intercelulares, mayor motilidad). (Ye y Weinberg, 2015). Si bien el proceso de EMT se describió en su origen para tumores de origen epitelial, también se ha observado un proceso similar en tumores cuyo origen

son células mesenquimales o derivadas de la cresta neural, como los sarcomas y los melanomas, entre otros (Kahlert et al., 2017; Pedri et al., 2021).

1.1.2. El melanoma cutáneo maligno

El **melanoma cutáneo** maligno es un tipo de cáncer de piel que se origina a partir de la **transformación maligna de los melanocitos**, unas células derivadas de la cresta neural y localizadas, principalmente, en la epidermis basal y en las superficies mucosas. Este tipo de cáncer es uno de los más comunes en la piel blanca, y, a nivel global, su incidencia ha ido aumentando anualmente a un ritmo más rápido que otros tipos de cáncer (Leonardi et al., 2018). Es, además, un **cáncer muy agresivo** y la principal causa de muerte por cáncer de piel, debido a su gran capacidad para desarrollar **metástasis, en pulmón, cerebro e hígado** (Damsky Jr, et al., 2011), entre otros. De hecho, se espera que la tasa de mortalidad global asociada al melanoma cutáneo ascienda de 57.000 muertes al año en 2020 a 84.600 muertes al año en 2040 (IARC, 2020).

La alta tasa de **diseminación** de este tipo de cáncer se basa en un proceso similar al de EMT descrito para tumores epiteliales (**EMT-like process**). Dicho proceso es inducido por diferentes estímulos (e.g. hipoxia, inflamación, ayuno), y provoca un cambio fenotípico hacia un fenotipo de tipo mesenquimal. Uno de los cambios celulares comunes entre el proceso EMT y el *EMT-like process* en melanoma es la adquisición de una mayor **motilidad** (Pedri et al., 2021), una característica que, en este tipo de cáncer, se ha relacionado con la vía de señalización WNT. Se ha demostrado que la vía WNT induce el *EMT-like process* y favorece la migración de las células de melanoma (Sinnberg et al., 2018).

A pesar de que actualmente la mayoría de los pacientes se diagnostican en estadios tempranos (estadios I y II), el **10% de estos pacientes diagnosticados en estadios tempranos muestran recidivas que derivan en una enfermedad metastásica** durante los 5 años posteriores al diagnóstico inicial (Von Schuckmann et al., 2019; Bajaj et al., 2020). Junto a ello, 10% de los casos de melanoma se diagnostican en estadios avanzados (estadio IV) (Leonardi et al., 2018). Aunque las nuevas inmunoterapias y terapias dirigidas han mejorado la supervivencia de los pacientes con melanoma metastásico (Michielin et al., 2019), la probabilidad de una respuesta

duradera al tratamiento por parte de los mismos es baja (Luke et al., 2017), y el riesgo de mortalidad es elevado. En este contexto y, dado que la metástasis es el proceso menos conocido del cáncer (Fares et al., 2020), es de gran importancia, sobre todo en melanoma, **profundizar en los mecanismos que sustentan dicho proceso y la búsqueda de proteínas clave relacionadas con la progresión tumoral.**

1.2. EL MICROAMBIENTE Y LA PROGRESIÓN TUMORAL

Tal y como se ha mencionado, el desarrollo del proceso **EMT o del EMT-like process** por parte de las células tumorales promueve la diseminación del tumor. Durante los últimos años se ha demostrado que este **proceso es regulado, en parte**, por células del microambiente tumoral (**TME**) (Huang y Blobel, 2016; Kahlert et al., 2017; Pedri et al., 2021).

El TME está formado por el **conjunto de la matriz extracelular (ECM) y células estromales** que se encuentran alrededor de un tumor. Dentro de las células estromales se distinguen las células endoteliales vasculares, las células inmunitarias infiltrantes y los **fibroblastos asociados al tumor (CAFs)** (Hanahan y Coussens, 2012; Dominiak et al., 2020). Estos componentes **interaccionan de forma bidireccional con las células tumorales** mediante interacciones celulares o célula-ECM, vesículas extracelulares, y factores de crecimiento y citocinas que generan un ambiente inflamatorio (Dominiak et al., 2020). Esto resulta en la activación y el reclutamiento de las células del TME para sustentar el tumor primario, generar un microambiente adecuado en la zona de metástasis (nicho pre-metastásico) y favorecer la progresión y la diseminación del tumor (Hanahan y Coussens, 2012; Fares et al., 2020) (**Figura 1**).

Los **CAFs** constituyen el mayor porcentaje de las células estromales en la mayoría de los cánceres. Estos secretan factores de crecimiento, moléculas inflamatorias y proteínas de la matriz extracelular que promueven la progresión del tumor. Concretamente, favorecen la proliferación tumoral, la angiogénesis, la remodelación de la ECM, la invasión, y la formación de metástasis. Además, proporcionan diferentes metabolitos al tumor para impulsar su crecimiento, entre otras cosas. Su **origen** es variable y específico del órgano, si bien a menudo derivan de **fibroblastos residentes** y, en el caso específico del hígado, también de las **células estrelladas hepáticas (HSC)** (Biffi y Tuveson, 2020). Estas últimas son células mesenquimales que se

encuentran en el espacio perisinusoidal del hígado, un órgano en el que metastatizan muchos tumores malignos como el melanoma y los sarcomas, entre otros (Kang et al., 2011). En un hígado sano las HSC se encuentran en estado quiescente. Cuando el hígado es dañado, estas células, al igual que los fibroblastos, pueden activarse y transdiferenciarse en células con funciones similares a miofibroblastos (e.g. aumento de la producción de matriz extracelular, contractibilidad) (Yin et al., 2013).

Durante la progresión tumoral, los **fibroblastos residentes y las HSC** pueden activarse y **transdiferenciarse** en miofibroblastos (CAFs) a partir de numerosos factores secretados por el tumor como el factor de crecimiento transformante β (**TGF- β**) (Kang et al., 2011; Huang et al., 2016; Biffi y Tuveson, 2020). Este proceso se caracteriza por cambios fenotípicos en dichas células, entre los que se incluye un **aumento de la motilidad inicial** y una expresión elevada de α -actina del músculo liso (**α -SMA**) (Kang et al., 2011; Biffi y Tuveson, 2020). Esta proteína, tradicionalmente considerada uno de los marcadores clásicos de activación de CAFs (Kang et al., 2011; Biffi y Tuveson, 2020), se ha asociado con un aumento de la **capacidad contráctil de los miofibroblastos** y con un **mal pronóstico** en pacientes de cáncer (Nurmik et al., 2019).

1.3. PROTEÍNA INDUCTORA DE MIGRACIÓN CELULAR Y DE UNIÓN A HIALURONANO (CEMIP)

La proteína inductora de migración celular y de unión a hialuronano (*Cell migration inducing hyaluronan binding protein*, **CEMIP** o KIAA1199) es una proteína con ubicación intracelular (citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático) (Li et al., 2017) y extracelular (asociado a la membrana plasmática, en exosomas) (Yoshida y Okada, 2019; Rodrigues et al., 2019). Entre sus funciones, se ha descrito que dicha proteína participa en la **despolimerización del hialuronano** (HA) de la ECM para su recambio fisiológico (Yoshida et al., 2013). También se ha observado que CEMIP **favorece la migración celular** en numerosos tipos de cáncer a través de la vía de señalización WNT, que **regula el proceso EMT** (Liu et al., 2021).

CEMIP se expresa en los tejidos en condiciones fisiológicas (Michishita et al., 2006); sin embargo, numerosos estudios en diferentes tipos de cáncer han demostrado un **incremento en su expresión en el tejido tumoral** y células tumorales. Esta

sobreexpresión se ha relacionado con la capacidad de desarrollar **metástasis**, la baja supervivencia y un **mal pronóstico** de los pacientes de cáncer (Liu et al., 2021). En lo que respecta al **melanoma cutáneo**, **apenas hay datos**. Estudios previos del grupo han identificado y validado que el contenido de CEMIP difiere sustancialmente, a nivel celular y exosomal, entre melanocitos y células de melanoma con diferente agresividad (Agüera-Lorente et al., 2018). Además, un primer estudio inmunohistoquímico en tejidos de pacientes ha demostrado una relación entre los niveles de expresión de CEMIP y la predisposición para desarrollar metástasis (Urquiola, 2021). Por tanto, se **requiere de un mayor estudio sobre el papel de CEMIP en la progresión del melanoma**.

Si bien se han descrito numerosas funciones de CEMIP en las células tumorales, **apenas se conoce su función en el TME**. Recientemente, algunos estudios han demostrado la implicación de esta proteína en la remodelación del TME, del tumor primario y del tejido metastásico, para favorecer la progresión tumoral. Se ha observado que, en cáncer de mama, esta proteína es secretada por las células tumorales mediante exosomas (vesículas extracelulares nanométricas que secretan las células y que contienen moléculas bioactivas). El **CEMIP exosomal** juega un papel importante en pre-acondicionar el **TME y favorecer la metástasis** en el cerebro (Rodrigues et al., 2019). Además, un estudio bioinformático ha sugerido una **correlación** entre la expresión de **CEMIP en el tumor y una infiltración de células inmunes y CAFs** en cáncer de mama (Dong et al., 2021), no obstante, se desconoce el mecanismo subyacente.

1.3.1. Moduladores de los niveles celulares de CEMIP

La **histamina** y el **TGF- β** son moléculas señalizadoras relacionadas con la inflamación y con relevantes funciones en contextos como el **desarrollo tumoral del melanoma y otros tumores** (Falus et al., 2001; Batlle y Massagué, 2020; Li et al., 2022). En concreto, recientemente se ha descrito la capacidad de la histamina (inductora de inflamación en contextos no tumorales) para actuar sobre macrófagos del TME y generar un entorno resistente a la inmunoterapia (Li et al., 2022). El TGF- β , por su parte, es una molécula pleiotrópica con actividad anti-inflamatoria en condiciones de

homeostasis y capacidad para favorecer un TME pro-tumorigénico en contextos tumorales (Batlle y Massagué, 2020).

Así mismo, se ha descrito que la **histamina** y el **TGF- β** actúan como **moduladores** de la expresión endógena de **CEMIP** en fibroblastos dérmicos humanos (Yoshida et al., 2013). En condiciones no tumorales como la exposición a la luz ultravioleta, los mastocitos liberan grandes cantidades de **histamina**. Esta se une al receptor de histamina H1 de los fibroblastos dérmicos, induce un **aumento en la expresión** de **CEMIP**, y provoca un aumento en la degradación de HA (Yoshida et al., 2020). Por otro lado, en condiciones fisiopatológicas como la cicatrización de heridas, los queratinocitos liberan grandes cantidades de **TGF- β** . Este se une a los receptores de TGF- β 1 y 2 de los fibroblastos dérmicos, **reduce la expresión de CEMIP**, y provoca una disminución en la degradación de HA contribuyendo a su acumulación (Yoshida et al., 2013; Nagaoka et al., 2015).

Si bien la alteración de los niveles celulares de **CEMIP** se ha relacionado con el **metabolismo del HA** en la dermis, a día de hoy se **desconoce** la implicación de CEMIP en la **motilidad** y **activación** de fibroblastos dérmicos o de células con funciones similares en otros órganos. Así mismo, se desconoce si el mecanismo de regulación mediado por la histamina y el TGF- β es exclusivo de los fibroblastos dérmicos o pudiera observarse también en otros tipos celulares.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a la bibliografía disponible y a los estudios previos del grupo, se planteó la siguiente **hipótesis**:

CEMIP podría estar relacionada con el avance del melanoma actuando sobre las propias células tumorales o sobre otras células del TME. La modulación de los niveles de CEMIP, a través de la histamina y el TGF- β , permitiría evaluar la implicación de esta proteína en la capacidad migratoria y en la activación de dichos tipos celulares.

El **objetivo general** de este estudio ha sido analizar el papel de CEMIP en la motilidad y la activación de células humanas de melanoma metastásico y del TME.

Los **objetivos concretos** planteados fueron los siguientes:

1. Determinar si la histamina y el TGF- β son capaces de regular los niveles endógenos de CEMIP de manera generalizada o únicamente en el modelo celular descrito en la literatura.
2. Analizar si la modificación de los niveles endógenos de CEMIP mediada por histamina y TGF- β se correlacionan con la activación y la motilidad en los modelos celulares que responden a dichas moléculas.
3. Estudiar, mediante el silenciamiento/sobreexpresión proteica, la implicación directa de CEMIP en la motilidad y activación celular en dichos modelos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

En este estudio se utilizaron dos líneas celulares A2058 (CRL-11147, ATCC) y Colo800 (ACC 193, Innoprot), derivadas de melanoma cutáneo metastásico humano. También se empleó una línea celular primaria de fibroblastos dérmicos humanos, Detroit 551 (CCL-110, ATCC); y una línea celular inmortalizada de HSC, LX-2 (SCC064, Sigma-Aldrich).

Las líneas A2058 y LX-2 se cultivaron con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, D5796, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, 10270-106, Thermo Fisher Scientific, Gibco). La línea Colo800 se cultivó con medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, 21875-034, Thermo Fisher Scientific, Gibco) al 10% SBF. La línea Detroit 551 se cultivó con medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, 30-2003, ATCC) al 10% SBF. Todas las líneas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad. Las células se cultivaron regularmente en frascos de 75 cm² hasta alcanzar una densidad del 80-90%, momento en el que se subcultivaron. El tiempo en el que se alcanza esta densidad depende de la tasa de duplicación de cada línea celular. Para el subcultivo, las células se lavaron con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), y se incubaron con tripsina-EDTA 0,05% (1x) (25300-062, Thermo Fisher Scientific, Gibco), durante 3 minutos a 37 °C y un 5% de CO₂, para despegarlas de los frascos. La tripsina se inactivó con SBF. Se realizó un segundo lavado con PBS para recoger las células

restantes de los frascos y se centrifugaron a 300 $\times g$ y 20 °C durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en el medio fresco correspondiente al 10% SBF.

Para los contajes celulares, las células resuspendidas se diluyeron 1:1 en Azul tripán 0,4% (15250061, Thermo Fisher Scientific, Gibco) y se cargaron 10 μ L de la mezcla en un portaobjetos de recuento celular. El portaobjetos se introdujo en un contador de células automático (TC20 Automated Cell Counter 1450102, Bio-Rad). Las células vivas presentan la membrana celular intacta, por lo que el Azul tripán no puede atravesarla. Por el contrario, el colorante sí que puede atravesar la membrana de las células muertas, las cuales adquieren un color azul. De esta forma, se pueden diferenciar las células vivas de las muertas. Los recuentos se realizaron dos veces por cada muestra para obtener un contaje más preciso.

3.2. TRATAMIENTO CON HISTAMINA Y TGF- β

Para tratar las líneas A2058, Colo800 y Detroit551 con histamina y TGF- β , se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos con el medio correspondiente al 10% SBF (A2058, Colo800) y al 0% SBF (Detroit551). Tras incubar las células 9 h a 37 °C y con un 5% de CO₂, se realizó un cambio de medio a las líneas de melanoma con el medio adecuado al 0% SBF. 1 h después estas células se trataron con histamina (stock 5 mM. H7125-1G, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 10 μ M, y con TGF- β (stock 1 μ g/mL. 100-21, Thermo Fisher Scientific, PeproTech) a una concentración final de 10 ng/mL. Los fibroblastos se trataron directamente, tras 9 h de incubación a 37 °C y con un 5% de CO₂, con las mismas concentraciones de histamina y TGF- β . Se estudió el efecto de ambos tratamientos tras 24 y 48 h (A2058 y Colo800) y tras 17 h (Detroit551) de incubación a 37 °C y con un 5% de CO₂ (**Figura 2A**, **Figura 2B**).

En cuanto a la línea LX-2, se sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos con el medio correspondiente al 10% SBF. A partir de este punto se siguieron dos protocolos. Por un lado, las células se incubaron *overnight* a 37 °C y con un 5% de CO₂, se realizó un cambio de medio con el medio correspondiente al 0% SBF, y 9h después las células se trataron con histamina (stock 5 mM) a una concentración final de 10 μ M, y con TGF- β (stock 1 μ g/mL) a una concentración final de 10 ng/mL. Se

estudió el efecto de ambos tratamientos tras 17 y 36 h de incubación a 37 °C y con un 5% de CO₂ (**Figura 2C**). Por otro lado, tras incubar las células sembradas durante 9 h a 37 °C y con un 5% de CO₂, se realizó un cambio de medio con el medio correspondiente al 2% SBF. 1 h después las células se trataron con histamina y con TGF- β en las concentraciones mencionadas. También se trataron con TGF- β a unas concentraciones finales de 2 y 4 ng/mL. Se estudió el efecto de los tratamientos tras 24 h de incubación a 37 °C y con un 5% de CO₂ (**Figura 2D**).

Pasado el tiempo necesario, se analizó el efecto de los tratamientos sobre la expresión endógena de CEMIP y α -SMA mediante Western Blot (apartado 3.4).

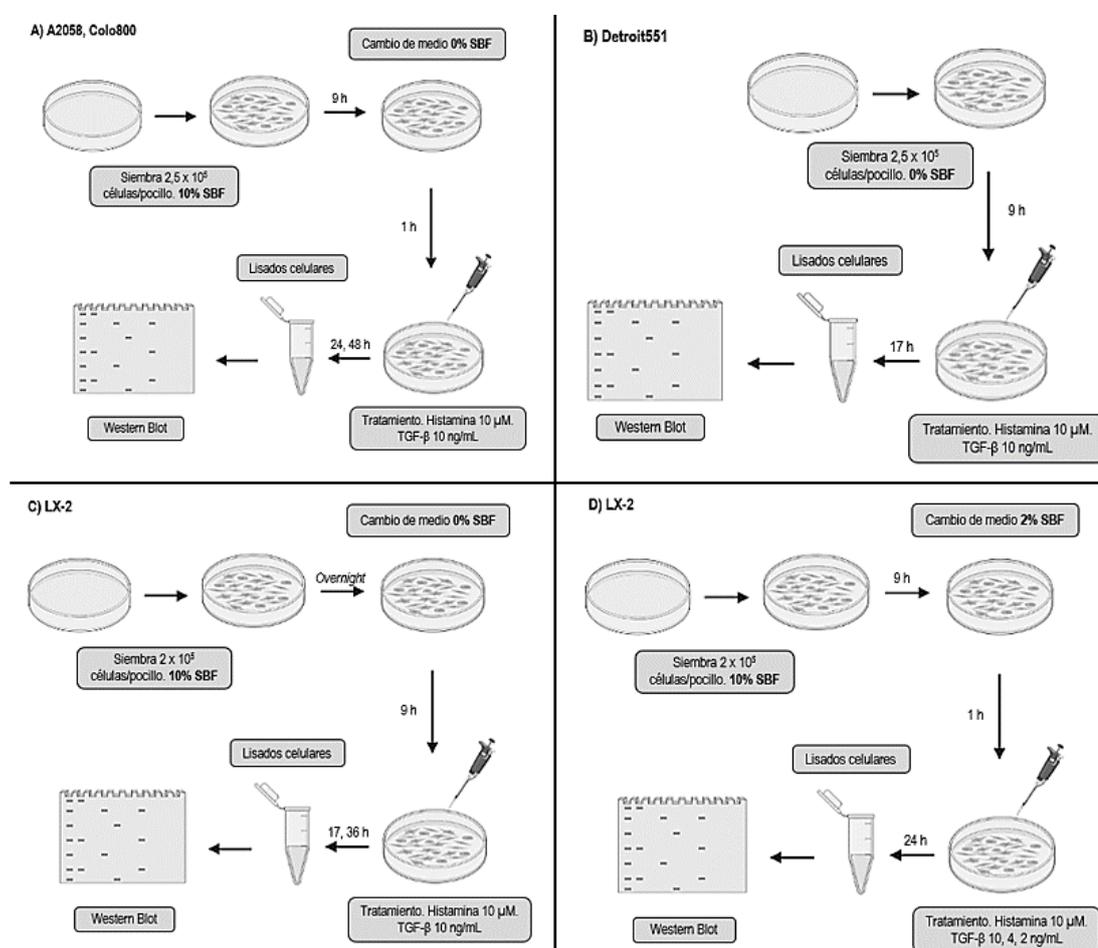


Figura 2. Estudio del efecto de la histamina y el TGF- β sobre la expresión endógena de CEMIP y α -SMA en líneas de melanoma metastático y estromales. Protocolos de tratamiento para las células (A) A2058 y Colo800, (B) Detroit551 y (C, D) LX-2. Se representa un pocillo de una placa de 6 pocillos.

3.3. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN

3.3.1. Transfección transitoria con siRNA

Se realizaron transfecciones transitorias con RNA pequeño de interferencia (siRNA) en la línea celular LX-2. Se empleó un siRNA dirigido específicamente contra una región del mRNA de CEMIP humano (NM_001293298.1) (si-CEMIP. Secuencia sentido: 5'-CAAUCGUCCCAUUGAUUAUAtt-3', secuencia antisentido: 5'-UAUAUCA AUGGGACGAUUGca-3') (Ambion™ Silencer™ Select Pre-Designed siRNA s32899, Thermo Fisher Scientific). Se empleó un siRNA no específico como control negativo (si-CONTROL) (Ambion™ Silencer™ Select Negative Control No.1 siRNA 4390843, Thermo Fisher Scientific).

Las transfecciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos con DMEM al 10% SBF y se incubaron *overnight* a 37 °C y con un 5% de CO₂ para alcanzar una densidad celular del 60-80%. Se diluyeron los siRNA (stock 50 μM) y los liposomas (Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 13778-150, Thermo Fisher Scientific) en medio de suero reducido Opti-Mem (31985-070, Thermo Fisher Scientific, Gibco). Se prepararon mezclas para transfectar las células con dos concentraciones diferentes de siRNA (0,2 y 0,4 μM). Las cantidades empleadas de cada reactivo para el silenciamiento de un pocillo de una placa de 6 pocillos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Componentes necesarios para la transfección transitoria de células LX-2 con siRNA. Se muestran las cantidades empleadas para la transfección de un pocillo de una placa de 6 pocillos (V = 2 mL).

Componente		Cantidad (μL)	
		Transfección 1	Transfección 2
Dilución liposomas	Opti-Mem	125	125
	Liposomas	3	6
Dilución siRNA	Opti-Mem	125	125
	si-CEMIP/si-Control	1	2

Posteriormente, se juntaron las diluciones de siRNA y de los liposomas (1:1) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que los siRNA se introdujeran en las vesículas lipídicas (liposomas). Pasado este tiempo, se añadieron 254 μL de la mezcla de siRNA y liposomas a cada pocillo de la placa de 6 pocillos (V = 2 mL). Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C y con un 5% de CO₂. En este

tiempo los liposomas se fusionan con la bicapa lipídica de las células, y el siRNA se introduce en el interior de las mismas (**Figura 3**). Finalmente, se analizó mediante Western Blot el efecto del siRNA sobre la expresión de la proteína (apartado 3.4).

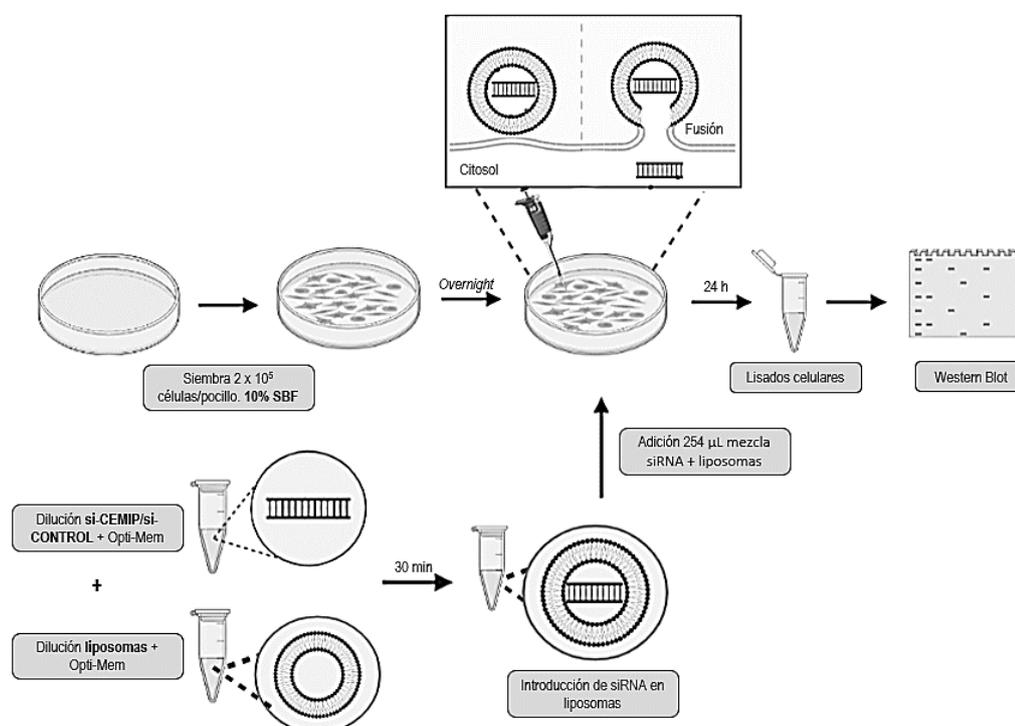


Figura 3. Estudio del efecto del siRNA sobre la expresión endógena de CEMIP en células LX-2. Protocolo para la transfección transitoria de células LX-2 con si-CEMIP y si-CONTROL. Se representa un pocillo de una placa de 6 pocillos.

3.3.2. Transfección transitoria con plásmido de sobreexpresión

Se realizaron transfecciones transitorias en la línea LX-2 con plásmido de sobreexpresión para la proteína CEMIP humana. Se empleó el plásmido pcDNA3.1(-) (V79520, Invitrogen) con el inserto del cDNA de CEMIP humano (NM_018689) (pcDNA3.1(-)-CEMIP) cedido por el grupo del Dr. Inoue (Yoshida et al., 2013). Se empleó el plásmido pcDNA3.1(-) (V79520, Invitrogen) vacío como control.

Las transfecciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Roche). Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos con DMEM al 10% SBF. En este punto se siguieron dos protocolos. Por un lado, las células se incubaron *overnight* a 37°C y con un 5% de CO_2 para alcanzar una densidad celular del 70-90%. Por otro lado, las células

se incubaron 9 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se realizó un cambio de medio con DMEM al 2% SBF y se incubaron las células a 37 °C y con un 5% de CO₂ durante 1 h. Pasados los tiempos necesarios, en ambos casos se añadieron 104 μL/pocillo (de una placa de 6 pocillos, V = 2 mL) de los plásmidos previamente preparados según las instrucciones del fabricante (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Roche). Los plásmidos (500 ng, stock 500 ng/μL) se mezclaron con liposomas (X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent 06366236001, Roche) en medio de suero reducido Opti-Mem (31985-070, Thermo Fisher Scientific, Gibco) en una proporción de 0,5μg:3μL:100μL/pocillo (de una placa de 6 pocillos), y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo, los plásmidos se introducen en las vesículas lipídicas de forma que quedan listos para la transfección.

Las células transfectadas se incubaron durante 24 h a 37 °C y con un 5% de CO₂. En este tiempo los liposomas se fusionan con la bicapa lipídica de las células de forma que los plásmidos se introducen en el interior de las mismas (**Figura 4**). Finalmente, se analizó el efecto del plásmido de sobreexpresión sobre la expresión de CEMIP y α-SMA mediante Western Blot (apartado 3.4).

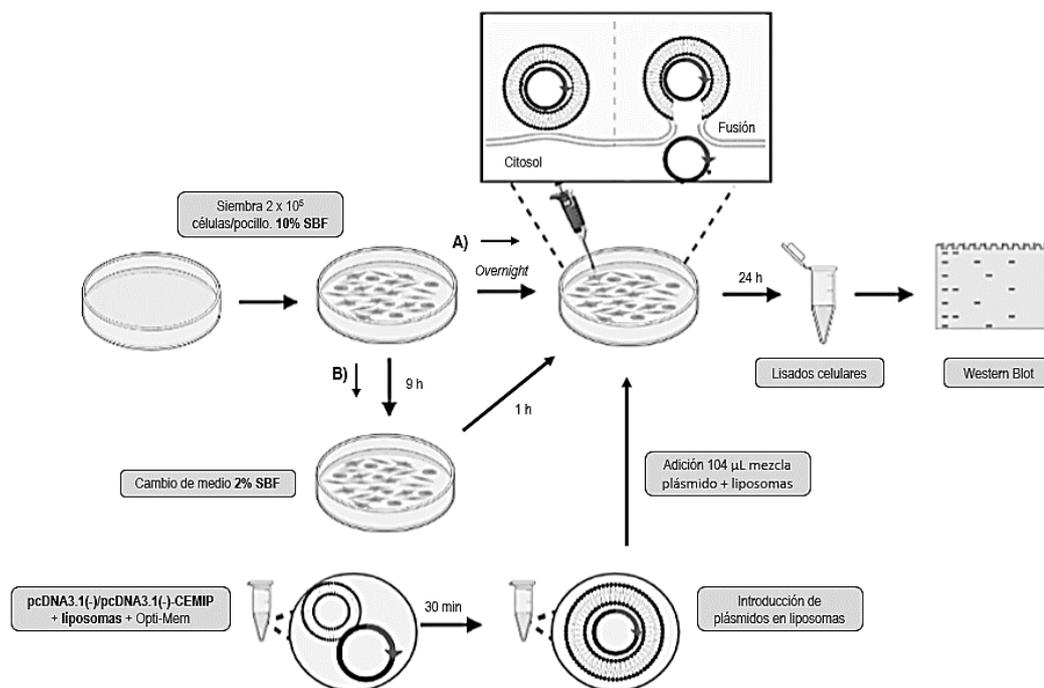


Figura 4. Estudio del efecto del plásmido de sobreexpresión sobre la expresión de CEMIP y α-SMA en células LX-2. Protocolos (A y B) empleados para la transfección transitoria de las células LX-2 con pcDNA3.1(-) y con pcDNA3.1(-)-CEMIP. Se representa un pocillo de una placa de 6 pocillos.

3.4. ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT

Esta técnica permitió analizar el efecto de los tratamientos y las transfecciones sobre la expresión de CEMIP en todas las líneas celulares estudiadas. También permitió analizar si la modificación directa o indirecta de los niveles de CEMIP afecta al estado de activación de la línea LX-2. Antes del análisis proteico, se extrajo la proteína de las células tratadas y transfectadas. Las células se lisaron con 65-150 μL de una mezcla de tampón RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*, R0278, Sigma-Aldrich), inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich) e inhibidores de fosfatasa (P0044, Sigma-Aldrich) en una proporción 100:1:1 (μL). Los lisados se procesaron con una jeringuilla con aguja (25G, 300600, BD Microlance) para romper el DNA y se centrifugaron a 13000 xg , 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante. Este proceso se realizó a 4 $^{\circ}\text{C}$ para evitar la degradación de las proteínas. Los lisados se almacenaron a -80 $^{\circ}\text{C}$ hasta cuantificarlos y analizarlos por Western Blot. La cuantificación proteica se llevó a cabo mediante el ensayo de BCA (ácido bicinconínico). Se preparó una recta de calibrado con diferentes concentraciones de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y se diluyeron 5 μL de cada muestra con 20 μL de agua destilada. Se cargaron 10 μL de las diluciones de BSA y de las muestras en una placa de 96 pocillos. Las diluciones de BSA se cargaron por duplicado. Se añadieron 200 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de una mezcla de BCA (B9643, Sigma-Aldrich) y CuSO_4 (4% p/v) (proporción 50:1 μL) y se incubó la placa a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 562 nm con un lector de microplacas (SynergyTM HT Multi-detection microplate reader, BioTek). Las concentraciones de proteína se obtuvieron interpolando las absorbancias en la recta de calibrado.

Los lisados celulares (15 μg) se mezclaron con tampón de carga Laemmli (5x) (**Tabla A2**), ditiotretol (10x) y RIPA hasta alcanzar el volumen deseado, y se calentaron a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para la desnaturalización proteica. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis*). Las proteínas se separaron en geles de acrilamida previamente preparados (gel concentrador 4%, gel separador 7%) según la **Tabla A1**. Estas se concentraron a 100V durante 10 minutos y se separaron a 120V durante 1h y 30 minutos en tampón de

electroforesis (1x) (**Tabla A2**). Se empleó el Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (1610374, Bio-Rad) como marcador de peso molecular (10-250 kDa). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0,2 μm (Protran™ Western blotting membranes, nitrocellulose 10600001, Amersham) a 85V durante 3 h en tampón de transferencia (1x) (**Tabla A2**). Se corroboró la transferencia mediante tinción con Rojo Ponceau y se bloquearon las membranas durante 1 h con solución salina tamponada con Tris (TBS, 1x) (**Tabla A2**) al 0,1% de Tween-20 (TBST, 1x) con un 5% de leche.

Se diluyeron los anticuerpos primarios contra las proteínas a identificar en TBST (1x) al 5% de leche y se incubaron con las membranas en agitación a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces (5 minutos cada una) con TBST (1x) y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en TBST (1x) al 5% de leche durante 1 h y 30 minutos a temperatura ambiente. La **Tabla 2** y la **Tabla 3** resumen los anticuerpos y la dilución con la que se emplearon. Las membranas se lavaron 3 veces nuevamente con TBST (1x). Las proteínas se revelaron con el sustrato SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34580, Thermo Fisher Scientific). Este es un sustrato de la peroxidasa de rábano picante que transforma dicho sustrato en un producto quimioluminiscente detectable. Las proteínas se visualizaron con el dispositivo G:BOX (Syngene) a través del programa GeneSnap (Syngene v 7.05.02). Las intensidades de banda se cuantificaron por densitometría con el programa ImageJ (Fiji v 1.53n) y se representaron como niveles de expresión proteica relativizados a la proteína constitutiva normalizadora, α -tubulina, y en tanto por uno respecto al control.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis por Western Blot. Se muestran las proteínas contra las que van dirigidas los anticuerpos, su peso molecular (kDa), el isotipo de los anticuerpos, la dilución con la que se emplearon y la fuente.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Isotipo	Dilución	Fuente	Referencia
CEMIP	150	Rabbit IgG	1:500	Proteintech	21129-1-AP
α -SMA	42	Mouse IgG	1:500	Bio-Rad	MCA5781GA
α -Tubulina	50	Mouse IgG	1:3000	Sigma-Aldrich	T9026

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en el análisis por Western Blot. Se muestran los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de las proteínas de interés, la dilución empleada y la fuente.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Referencia
Anti-Rabbit	1:5000	Abcam	102279
Anti-Mouse	1:3000	Southern Biotech	1032-05

3.5. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Se realizó el ensayo de cierre de herida (*Wound-healing assay*) para estudiar el efecto de la modulación directa (sobreexpresión) o indirecta (histamina y TGF- β) de los niveles de CEMIP sobre la migración de las líneas celulares Detroit551 y LX-2. Esta técnica *in vitro* permite evaluar la migración celular en dos dimensiones, y se basa en crear un área libre de células sobre una monocapa confluyente. La exposición al área libre de células induce a las mismas a migrar hacia el hueco (Jonkman et al., 2014).

En el caso de las células Detroit551 se sembraron 5×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se procesaron como se especifica en la **Figura 2B**. Las células se sembraron con el medio correspondiente al 0% SBF para detener la proliferación celular. Estas se trataron con histamina (stock 5 mM) a una concentración final de 10 μ M y con TGF- β (stock 1 μ g/mL) a una concentración final de 10 ng/mL. Para las células LX-2, se sembraron $6,5 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se procesaron como se especifica en la **Figura 2C**, **Figura 2D** y en la **Figura 4**. Se realizó un cambio de medio con el medio correspondiente al 0-2% SBF para detener la proliferación celular. Las células se trataron con histamina (stock 5 mM) a una concentración final de 10 μ M; con TGF- β (stock 1 μ g/mL) a una concentración final de 2, 4 y 10 ng/mL; y con 20,8 μ L/pocillo de pcDNA3.1(-) y pcDNA3.1(-)-CEMIP preparados a una proporción de 0,1 μ g plásmido:0,6 μ L liposomas:20 μ L Opti-Mem/pocillo (de una placa de 24 pocillos).

Tras 17 h (Detroit551) y 24-36 h (LX-2) de tratamiento se realizaron las heridas (**Figura 5**). Se retiró el medio de los pocillos, se hicieron las heridas con una punta de micropipeta estéril de 200 μ L, se lavaron 2 veces con PBS y se añadió el medio correspondiente al 0-2% de SBF. La migración de las células hacia las heridas se monitorizó mediante un microscopio de contraste de fases (Eclipse TS100, Nikon) y se fotografiaron con una cámara (ProgRes CT3 Digital Camera, Jenoptik) a través del programa ProgRes CapturePro (Jenoptik v 2.8.0) en el momento de herida inicial (0 h), tras 6, 8, 20 h (Detroit551) y tras 14, 17, 20, 24, 38, 40 y 62 h (LX-2). Se emplearon células sin tratar o tratadas con pcDNA3.1(-) (en sobreexpresión) como control. El área de las heridas se determinó mediante análisis de imagen con ImageJ (Fiji v 1.53n)

y se calculó el porcentaje de cierre de herida a cada tiempo con respecto al área a $t = 0$ h.

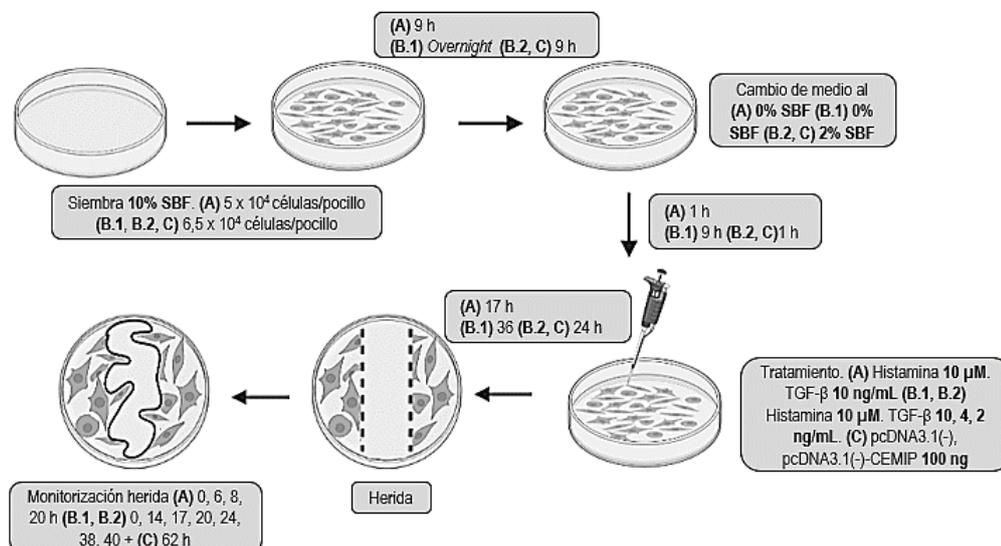


Figura 5. Estudio del efecto de la modulación directa (sobrexpresión) o indirecta (histamina y TGF- β) de los niveles de CEMIP sobre la capacidad migratoria en células estromales. Protocolo de ensayo de cierre de herida para las líneas (A) Detroit 551 y (B, C) LX-2. Las células se trataron en las mismas condiciones que para el análisis por Western Blot (apartado 3.2 y 3.3.2). Se representa un pocillo de una placa de 24 pocillos.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los porcentajes de cierre de herida resultantes de los análisis de migración se presentan como la media \pm la desviación estándar (SD). El número de experimentos y réplicas se especifican en los pies de figura correspondientes en el apartado “resultados” (apartado 4). Los valores n representan el número de experimentos independientes realizados. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad (Prism v 8.0.1). Se contrastó la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Para cada tiempo, se compararon las diferentes condiciones experimentales, normalizadas frente a la media control, entre sí y con el control para determinar su significancia estadística mediante el test One-way ANOVA. Se asumió que las varianzas son iguales y se empleó el test de Tukey como prueba *post hoc*. Se estableció un intervalo de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$), por lo que se asumió que los resultados son significativos cuando el p -valor $< 0,05$. Los diferentes grados de significación estadística se representan en las imágenes como ns ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE LA HISTAMINA Y EL TGF- β SOBRE LOS NIVELES DE CEMIP

En primer lugar, se evaluó, mediante Western Blot, si la histamina y el TGF- β regulan los niveles endógenos de CEMIP en el modelo celular descrito en la literatura (fibroblastos dérmicos, Detroit551) (Yoshida et al., 2013), en líneas celulares de melanoma metastásico humano (A2058, Colo800), y en una línea inmortalizada de HSC humanas (LX-2). Las células se trataron según los protocolos descritos en las **Figuras 2A, 2B y 2C**. La histamina (10 μ M) indujo un aumento en los niveles endógenos de CEMIP en las líneas celulares estromales Detroit551 y LX-2, mientras que el TGF- β (10 ng/mL) provocó un descenso en los niveles de la misma. Si bien dichas variaciones fueron evidentes en ambos tipos celulares a las 17h de tratamiento, una exposición más alargada a los tratamientos indujo mayores cambios en la línea LX-2 (véase el análisis de densitometría) (**Figuras 6A, 6B y 6C**). Sin embargo, los tratamientos con histamina (10 μ M) y TGF- β (10 ng/mL) no indujeron cambios importantes en los niveles endógenos de CEMIP en los modelos celulares de melanoma metastásico (**Figura 6D y 6E**), lo cual se corroboró por densitometría (datos no mostrados). Por tanto, se continuó el estudio únicamente con las líneas celulares que respondieron a la histamina y al TGF- β . Se seleccionaron las 36 h como el tiempo adecuado para que los tratamientos tuvieran un efecto óptimo en las variaciones de los niveles de CEMIP en la línea LX-2.

4.2. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO Y LA SOBREEXPRESIÓN SOBRE LOS NIVELES DE CEMIP

Se comprobó, mediante Western Blot, si el si-CEMIP y el pcDNA3.1(-)-CEMIP silencian y sobreexpresan, respectivamente, los niveles endógenos de CEMIP en la línea celular LX-2. Los resultados muestran que, en las condiciones de silenciamiento probadas (según el protocolo descrito en la **Figura 3**), no se consiguió disminuir los niveles de la proteína, en relación al control (si-CONTROL), ni siquiera doblando la concentración de si-CEMIP (0,2 y 0,4 μ M). Por otro lado, la sobreexpresión a través de pcDNA3.1(-)-CEMIP (según el protocolo descrito en la **Figura 4A**) provocó un

aumento de la expresión de la proteína (**Figura 7**). En consecuencia, se continuó con el estudio de las funciones de CEMIP en la línea LX-2 a través de la sobreexpresión, descartando el silenciamiento.

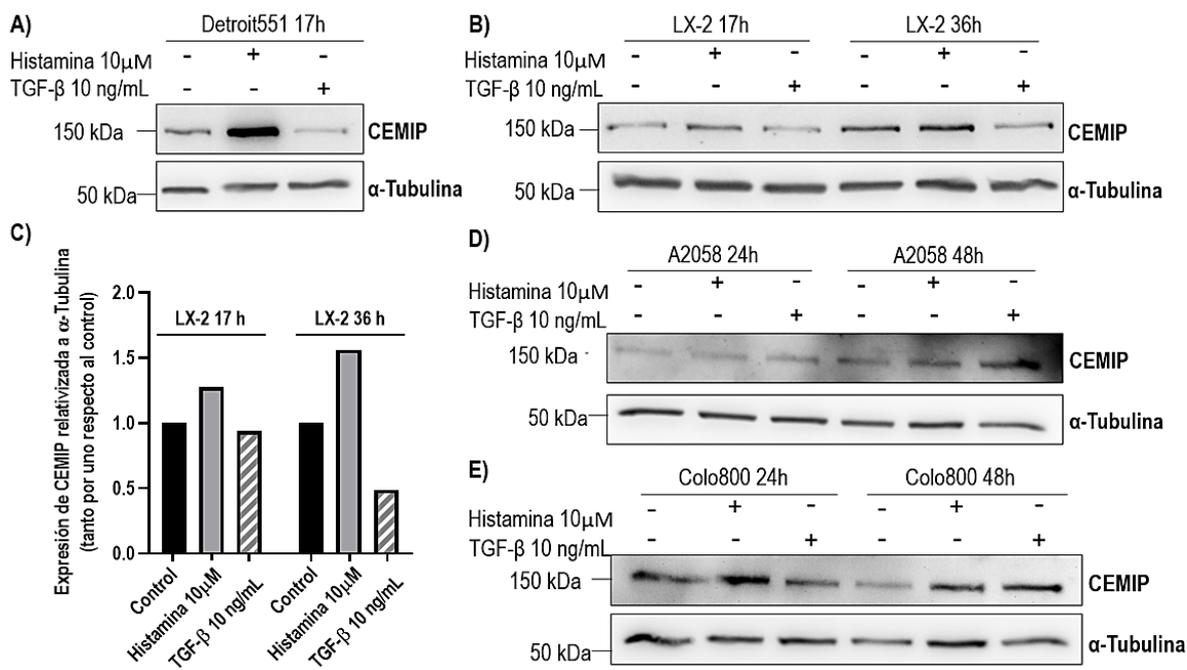


Figura 6. Análisis preliminar por Western Blot del efecto de la histamina y el TGF- β sobre los niveles endógenos de CEMIP en líneas celulares de melanoma metastásico y estromales. Se emplearon lisados celulares para detectar variaciones de CEMIP en (A) fibroblastos dérmicos (Detroit551) (B) HSC (LX-2) y en líneas de melanoma metastásico (D) A2058 y (E) Colo800 tras 17 h, 17 y 36 h, y 24 y 48 h de tratamiento con histamina (10 μ M) y TGF- β (10 ng/mL), respectivamente. Se emplearon células sin tratar como control. α -tubulina: proteína constitutiva normalizadora. (C) Cuantificación densitométrica representativa de los niveles endógenos de CEMIP en la línea LX-2 tras 17 y 36 h de tratamiento. Los datos relativizados a la cantidad de α -tubulina se muestran como los niveles de expresión de CEMIP en tanto por uno respecto al control. En todos los casos se realizó un experimento con una réplica por condición experimental (n = 1).

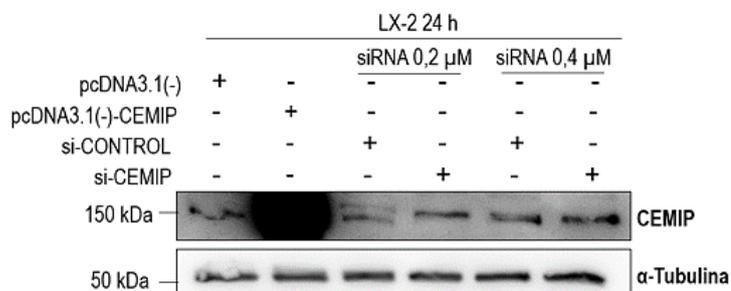


Figura 7. Análisis por Western Blot del silenciamiento y la sobreexpresión de CEMIP en la línea celular LX-2. Se emplearon lisados celulares para detectar variaciones de CEMIP tras 24 h de tratamiento con si-CONTROL y si-CEMIP (0,2 y 0,4 μ M) o con pcDNA3.1(-) y pcDNA3.1(-)-CEMIP (500 ng). Se emplearon células tratadas con si-CONTROL y pcDNA3.1(-) como control. α -tubulina: proteína constitutiva normalizadora. Se realizó un experimento con una réplica por condición experimental (n = 1).

4.3. PAPEL DE CEMIP EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS ESTROMALES

Se analizó, mediante ensayos de cierre de herida, la implicación de CEMIP en la motilidad de las células que respondieron a histamina y TGF- β (apartado 4.1). Los ensayos de cierre de herida con fibroblastos dérmicos Detroit551 tratados en las condiciones fijadas previamente (**Figura 5A**), mostraron una correlación entre el aumento de los niveles de CEMIP endógeno inducido por la histamina (10 μ M) y un aumento significativo de la motilidad celular. En la misma línea, se correlacionó la disminución de los niveles endógenos de CEMIP inducidos por el TGF- β (10 ng/mL) con una disminución significativa de la motilidad (**Figuras 6A y 8**).

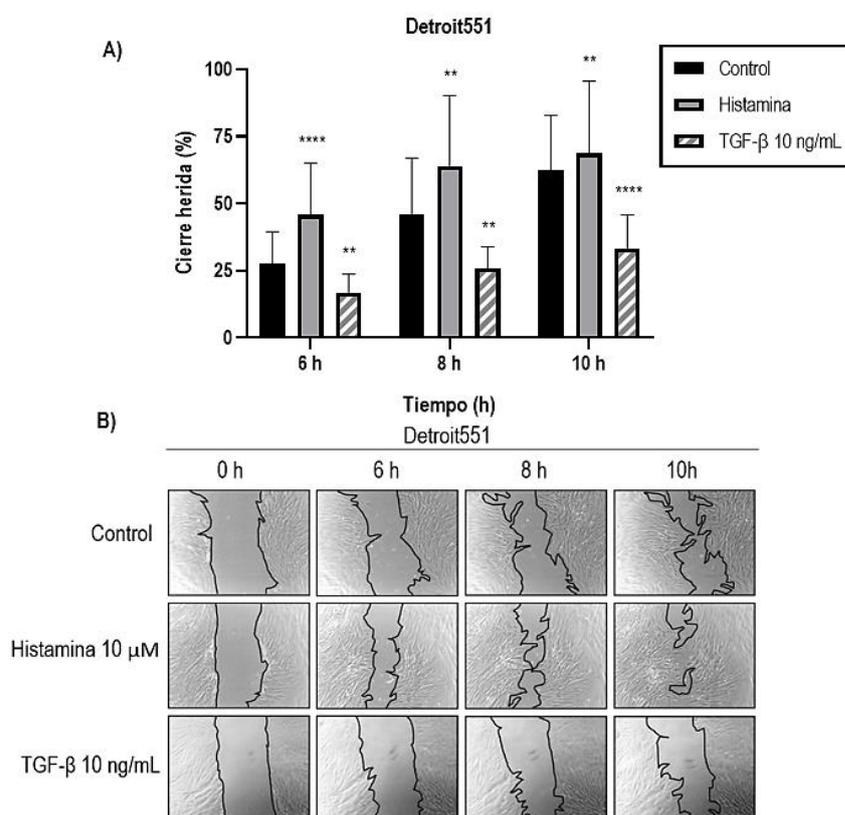


Figura 8. Análisis, por ensayo de cierre de herida, del efecto de la modulación de los niveles endógenos de CEMIP sobre la motilidad de células Detroit551. (A) Porcentaje de cierre de herida tras 6, 8 y 10 h de la herida inicial. Previo a la herida las células se trataron durante 17 h con histamina (10 μ M) y con TGF- β (10 ng/mL). Se emplearon células sin tratar como control. Se representa la media \pm SD de tres experimentos independientes con tres réplicas por condición experimental (n = 3). Se muestran las diferencias en cierre de herida entre las células tratadas y el control. ns p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. **(B)** Imágenes representativas de las heridas tras 0, 6, 8 y 10 h de la herida inicial.

Las células LX-2 se trataron según las condiciones fijadas en los ensayos anteriores (**Figura 2C** y **Figura 5B.1**). Se observó que esta línea celular migraba más lento que los fibroblastos dérmicos por lo que se ajustaron los tiempos de evaluación del cierre de herida. Además, a diferencia de las células Detroit551, la exposición a largos periodos de ayuno (0% SBF) y la exposición a TGF- β (10 ng/mL) resultó altamente dañina (datos no mostrados). Por tanto, se estableció un nuevo protocolo para el ensayo de migración con las células LX-2 (**Figura 5B.2**) en condiciones de ayuno parcial (2% SBF), con un espectro más amplio de concentraciones de TGF- β (2, 4, 10 ng/ml) y reduciendo el tiempo de tratamiento a 24h. Se comprobó mediante Western Blot que también, bajo estas condiciones (**Figura 2D**), la histamina y TGF- β ejercen su función moduladora sobre la expresión de CEMIP. La histamina (10 μ M) indujo un aumento en la expresión endógena de CEMIP. Curiosamente, las concentraciones menores de TGF- β utilizadas (2 y 4 ng/mL) provocaron un mayor efecto modulador sobre la expresión de la proteína (**Figuras 9A** y **9B**).

El ensayo de cierre de herida de las células LX-2 tratadas en estas condiciones mostró, al igual que en los fibroblastos dérmicos, una correlación entre el aumento de los niveles de CEMIP endógeno inducidos por la histamina (10 μ M) y un aumento significativo de la motilidad celular. De igual modo, la disminución de los niveles endógenos de CEMIP inducidos por el TGF- β (4 y 2 ng/mL) se correlacionó con una disminución significativa de la motilidad. No se observaron diferencias significativas en la migración entre las células tratadas con 2 ng/mL y 4 ng/mL de TGF- β . (**Figura 9C** y **9D**).

4.4. VERIFICACIÓN DEL PAPEL DE CEMIP EN LA MOTILIDAD DE HSC

Si bien los tratamientos con histamina y TGF- β mostraron una clara correlación entre los cambios en los niveles de CEMIP celular y la capacidad migratoria de las células, como siguiente paso se quiso verificar dicha correlación de una manera más directa, mediante ensayos de cierre de herida con sobreexpresión proteica. Se ajustaron las condiciones del ensayo de migración a las condiciones del ensayo realizado con histamina y TGF- β (**Figura 5C**). Las heridas se realizaron tras 24 h de tratamiento al 2% SBF con pcDNA3.1(-) y pcDNA3.1(-)-CEMIP (100 ng), y la variación en los niveles celulares de CEMIP se determinó mediante Western Blot (**Figura 4B**). El

pcDNA3.1(-)-CEMIP indujo un gran aumento en los niveles de expresión de CEMIP (**Figura 10A**). El ensayo de cierre de herida verificó la correlación entre el aumento de los niveles de CEMIP inducidos por el pcDNA3.1(-)-CEMIP y el aumento significativo de la motilidad celular. (**Figura 10B y 10C**).

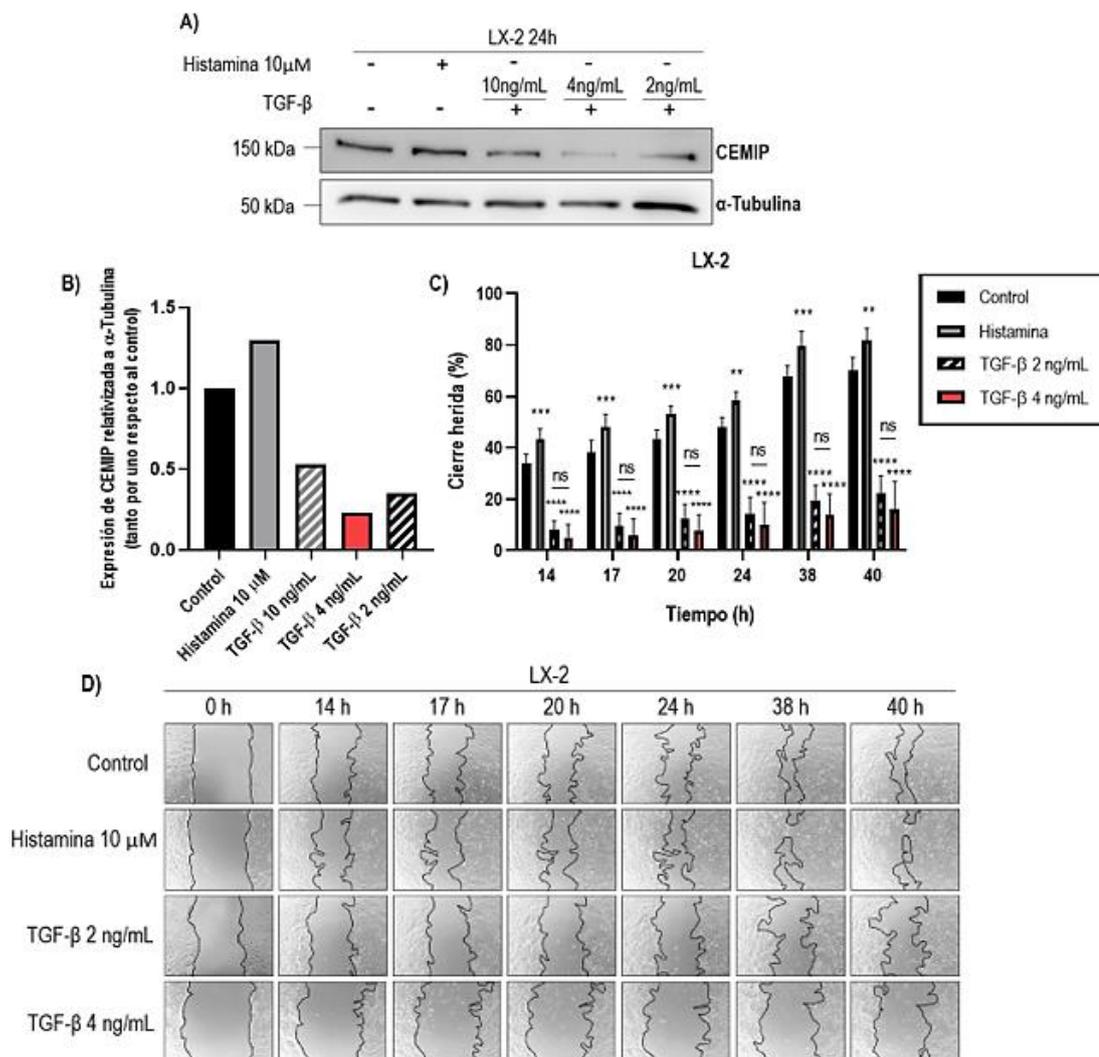


Figura 9. Efecto de la modulación de los niveles endógenos de CEMIP sobre la motilidad de células LX-2. (A) Western Blot representativo del efecto de la histamina (10 μ M) y el TGF- β (2, 4 y 10 ng/mL) sobre los niveles endógenos de CEMIP tras 24 h de tratamiento al 2% SBF. Se emplearon células sin tratar como control. α -tubulina: proteína constitutiva normalizadora. (B) Cuantificación densitométrica representativa de CEMIP endógeno tras 24 h de tratamiento. Los datos relativizados a la cantidad de α -tubulina se muestran como los niveles de expresión de CEMIP en tanto por uno respecto al control. Se realizaron dos experimentos independientes con una réplica por condición experimental (n = 2). (C) Ensayo de cierre de herida. Se representa el porcentaje de cierre tras 14, 17, 20, 24, 38 y 40 h de la herida inicial. Previamente, las células se trataron durante 24 h con histamina (10 μ M) y TGF- β (2, 4 y 10 ng/mL). Se emplearon células sin tratar como control. Se representa la media \pm SD de tres experimentos independientes con tres réplicas por condición experimental (n = 3). Se muestran las diferencias en cierre de herida entre las células tratadas y el control (sobre barras), y entre las concentraciones de TGF- β (sobre líneas). ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (D) Imágenes representativas de las heridas tras 0, 14, 17, 20, 24, 38 y 40 h de la herida inicial.

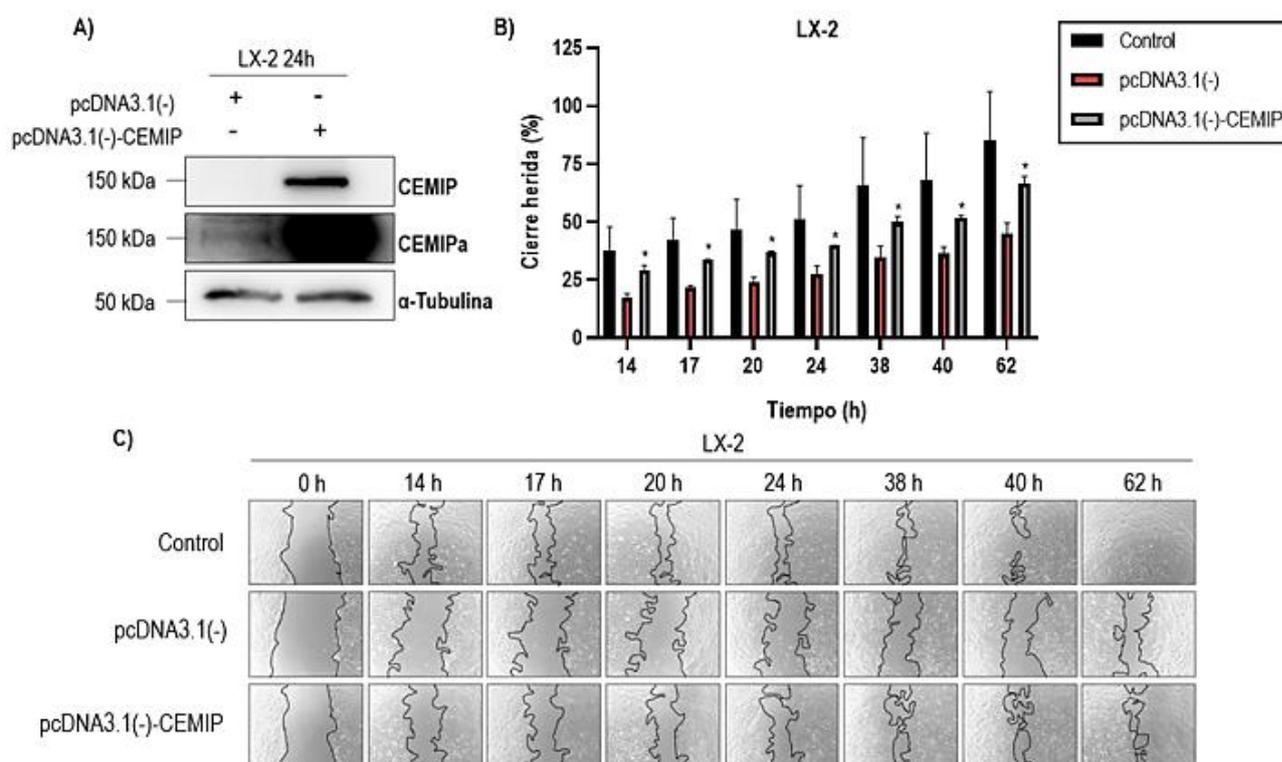


Figura 10. Sobreexpresión de CEMIP y verificación de su papel en la motilidad de células LX-2. (A) Western Blot representativo de la sobreexpresión CEMIP tras 24 h de transfección con pcDNA3.1(-)-CEMIP (100 ng) al 2% SBF. Se emplearon células transfectadas con pcDNA3.1(-) como control. α -tubulina: proteína constitutiva normalizadora. Se realizaron dos experimentos independientes con una réplica por condición experimental (n = 2). CEMIPa: imagen forzada para visualización de CEMIP endógeno (B) Ensayo de cierre de herida. Se representa el porcentaje de cierre de herida tras 14, 17, 20, 24, 38, 40 y 48 h de la herida inicial. Previamente, las células se transfectaron durante 24 h con pcDNA3.1(-)-CEMIP (100 ng). Se emplearon células sin transfectar o transfectadas con pcDNA3.1(-) como control. Se representa la media \pm SD de dos experimentos independientes con tres réplicas por condición experimental (n = 2). Se muestran las diferencias en cierre de herida entre las células transfectadas con pcDNA3.1(-) y con pcDNA3.1(-)-CEMIP. ns p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. (C) Imágenes representativas de las heridas tras 0, 14, 17, 20, 24, 38, 40 y 62 h de la herida inicial.

4.5. IMPLICACIÓN DE CEMIP EN LA ADQUISICIÓN DE PERFILES MIOFIBROBLÁSTICOS

Por último, se estudió el papel de CEMIP en la adquisición de características miofibroblásticas clásicas tales como la expresión de α -SMA por parte de las células Detroit551 y LX-2 (Figura 2B, 2D y 4B). En los fibroblastos dérmicos Detroit551, la histamina indujo un aumento de CEMIP, pero ningún cambio en los niveles endógenos de α -SMA. Por el contrario, el tratamiento con TGF- β provocó el aumento de los niveles celulares de α -SMA junto con la disminución de niveles celulares de CEMIP, según lo observado anteriormente (Figura 11A y 11D).

En las células LX-2 los niveles de expresión de CEMIP modulados por la histamina y el TGF- β no se relacionaron con la expresión endógena de α -SMA (**Figura 11B y 11D**). Junto a ello, tras la sobreexpresión de CEMIP con el plásmido, tampoco se apreciaron cambios asociados en la expresión de α -SMA (**Figura 11C y 11D**).

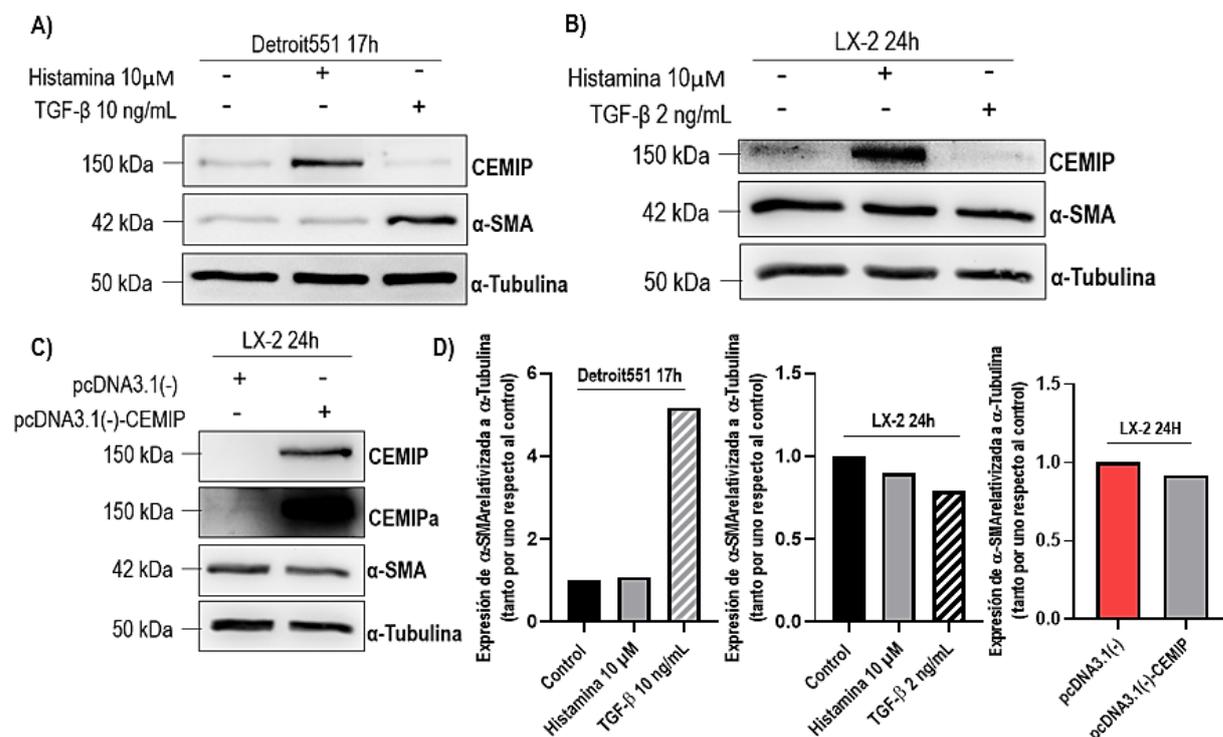


Figura 11. Análisis por Western Blot del efecto de los niveles de CEMIP sobre la inducción de α -SMA en células estromales. Se emplearon lisados celulares para detectar variaciones en los niveles de CEMIP y α -SMA en (A) fibroblastos dérmicos (Detroit551) tras 17 h de tratamiento con histamina (10 μ M) y TGF- β (10 ng/mL), (B) HSCs (LX-2) tras 24 h de tratamiento con histamina (10 μ M) y TGF- β (2 ng/mL), (C) LX-2 tras 24 h de transfección con pcDNA3.1(-)-CEMIP. Se emplearon células sin tratar y transfectadas con pcDNA3.1(-) como control. α -tubulina: proteína constitutiva normalizadora. (D) Cuantificaciones densitométricas representativas de los niveles de α -SMA en ambas líneas celulares. Los datos relativizados a la cantidad de α -tubulina se muestran como los niveles de expresión de CEMIP en tanto por uno respecto al control. En todos los casos se realizó un experimento con una réplica por condición experimental (n = 1). (A) Imagen cedida por María Larrinaga.

5. DISCUSIÓN

La metástasis, el proceso que permite la diseminación de las células de un tumor maligno a otros tejidos, es la responsable del 90% de la mortalidad asociada al cáncer (Chaffer y Weinberg, 2011). Para que esta ocurra es clave que las células tumorales adquieran una capacidad migratoria, entre otras características (Hanahan y Weinberg, 2011). Estudios de los últimos años han mostrado que la adquisición de características

prometastásicas (e.g. motilidad) por parte del tumor es, al menos en parte, sustentada por la acción de componentes del TME (Huang y Blobe, 2016; Kahlert et al., 2017; Pedri et al., 2021). No obstante, el control del proceso metastásico continúa siendo un reto, un hecho de especial relevancia en tumores como el melanoma cutáneo debido a su alta tendencia metastásica (Damsky Jr et al., 2011). En consecuencia, es necesario, sobre todo en este tipo de cáncer, profundizar en los mecanismos que sustentan la metástasis y la identificación de proteínas clave relacionadas con la progresión tumoral. En este sentido, CEMIP se ha relacionado con la migración de células tumorales y con la capacidad de desarrollar metástasis (Liu et al., 2021). Sin embargo, poco se conoce acerca de su función en el TME y en la progresión del melanoma cutáneo.

Se ha descrito que la histamina y el TGF- β actúan como moduladores de la expresión endógena de CEMIP en fibroblastos dérmicos humanos (Yoshida et al., 2013). Sin embargo, se desconoce si este mecanismo de regulación también ocurre en células estromales análogas de otros órganos o en las propias células de melanoma. Los resultados de este estudio mostraron que la histamina y el TGF- β aumentan y disminuyen, respectivamente, los niveles endógenos de CEMIP en fibroblastos dérmicos humanos (Detroit551), tal como se ha descrito previamente. Esta regulación también se observó en HSC humanas (LX-2). Estudios recientes sugieren que, en la piel, la histamina y el TGF- β modifican los niveles de CEMIP para regular el metabolismo de HA de la ECM, proceso llevado a cabo por los fibroblastos dérmicos (Yoshida et al., 2013; Nagaoka et al., 2015; Yoshida et al., 2020). En base a los resultados obtenidos en HSC, el efecto de la histamina y el TGF- β no se limita a la población celular previamente descrita, y podría representar un mecanismo generalizado en células relacionadas con la deposición y reestructuración de la ECM. Por el contrario, los tratamientos no ejercieron ningún efecto sobre la población de células de melanoma (A2058, Colo800). Se ha demostrado que las células tumorales de numerosos tipos de cáncer, incluido el melanoma, presentan receptores de histamina y TGF- β . Estos se han relacionado, sobre todo, con procesos clave de la progresión tumoral (e.g. proliferación, migración, invasión, angiogénesis) (Massari et al., 2020; Liu et al., 2018). Sin embargo, las células originarias del melanoma (melanocitos) están especializadas en la producción de melanina (Leonardi et al.,

2018) y no en la regulación de la ECM, por lo que la histamina y el TGF- β podrían activar otras rutas moleculares diferentes a la vía de CEMIP en dichos tipos celulares.

La activación y migración de fibroblastos o células con analogía funcional se asocia a procesos fisiopatológicos como la cicatrización de heridas (McAnulty, 2007; Yin et al., 2013) y patológicos como el desarrollo tumoral (Kang et al., 2011; Biffi y Tuveson, 2020). Por su parte, cabe recordar que, si bien CEMIP se ha ligado a menudo con la migración de células tumorales (Liu et al., 2021), se desconoce su efecto sobre las células del estroma, que, en un contexto tumoral, forman el TME (Hanahan y Coussens, 2012). Los resultados obtenidos tanto en fibroblastos dérmicos como en HSC, mostraron que los niveles celulares de CEMIP, tras la exposición a histamina o a TGF- β , se correlacionan con la motilidad celular. Más aún, la sobreexpresión directa de CEMIP imitó el efecto promigratorio de la histamina en HSC, lo que indica que CEMIP está no sólo relacionado con la regulación de la ECM (Yoshida et al., 2013; Nagaoka et al., 2015; Yoshida et al., 2020), sino también con la motilidad celular en estas poblaciones estromales. Desafortunadamente, en las condiciones probadas, no se consiguió disminuir los niveles de CEMIP en los ensayos de silenciamiento transitorio. Esto puede deberse a varios motivos, entre ellos, que la vida media de CEMIP en la línea LX-2 puede requerir de tiempos de incubación más prolongados que los utilizados para que el efecto del siRNA sea evidente, tal como ya han sugerido algunos autores para otras proteínas (Bartlett y Davis, 2006).

En cuanto a la capacidad migratoria de las poblaciones estromales testadas, cabe destacar que las células LX-2 (HSC) mostraron una tasa de migración menor que los fibroblastos dérmicos, y una mayor sensibilidad frente a condiciones de ayuno y exposición al TGF- β . La alta toxicidad en las células LX-2 derivada de la exposición a la máxima concentración de TGF- β (10 ng/mL) testada, concuerda con estudios de otros autores, donde se ha observado una viabilidad óptima a 2 ng/mL de TGF- β (Kang et al., 2013). Las nuevas condiciones establecidas para los ensayos de migración como la reducción de la concentración de TGF- β , entre otras, mantuvieron el efecto regulador de la histamina y el TGF- β sobre CEMIP. A diferencia de lo que cabría esperar, este efecto fue más evidente a menores concentraciones de TGF- β . Al resultar tóxicas para las células LX-2, las altas concentraciones de TGF- β podrían mostrar un efecto combinado en los niveles de CEMIP entre las células vivas (no responden al

TGF- β y los niveles de CEMIP permanecen inalterados) y las células muertas (responden al TGF- β y expresan menos CEMIP).

Los resultados obtenidos indican que CEMIP está implicada en la motilidad de células estromales (Detroit551 y LX-2), lo cual podría sustentar el avance tanto del melanoma como de otros tumores, especialmente si el incremento de motilidad estuviera ligado a la adquisición de otras características definidas para los CAFs. Algunos estudios han revelado que la presencia de niveles desregulados de histamina y TGF- β en el contexto del melanoma y otros tumores favorece el desarrollo del tumor (Falus et al., 2001; Batlle y Massagué, 2020; Li et al., 2022). Esta desregulación en un contexto tumoral real podría provocar una alteración en los niveles de CEMIP de las células estromales que formarían parte del TME y podrían favorecer la diseminación del tumor. Otros autores también han sugerido que los niveles de CEMIP en las células del TME pueden ser modificados por el tumor vía CEMIP exosomal para favorecer la metástasis (Rodrigues et al., 2019).

CEMIP se ha relacionado tanto con la motilidad celular como con la activación de condroblastos y adquisición de características miofibroblásticas (Deroyer et al., 2019). Estas células, al igual que los fibroblastos dérmicos y las HSC, son de origen mesenquimal. Por ello, se estudió si CEMIP también podría relacionarse con el proceso de conversión a CAFs, incluyendo la adquisición del fenotipo miofibroblástico en las líneas Detroit551 y LX-2. Entre los cambios fenotípicos que ocurren en este proceso se incluye la elevada expresión de α -SMA (Kang et al., 2011; Biffi y Tuveson, 2020), por lo que se analizó su expresión en ambas líneas celulares tras la modificación de los niveles endógenos de CEMIP con histamina y TGF- β . En la línea Detroit551, la histamina no indujo cambios en la expresión de α -SMA, pero el TGF- β aumentó los niveles de la proteína. El TGF- β es un activador clásico de fibroblastos a miofibroblastos (Huang et al., 2016; Biffi y Tuveson, 2020), lo cual explica la mayor expresión de α -SMA. Sin embargo, la modulación de los niveles de CEMIP en dicha línea celular no se relacionó con la expresión de α -SMA. Tampoco se observó ninguna correlación entre los niveles de CEMIP y la expresión de α -SMA en células HSC (LX-2). Más aún, en este caso, el TGF- β no indujo la expresión de α -SMA. Algunos autores han observado un aumento de α -SMA en la línea LX-2 en presencia de las concentraciones de TGF- β utilizadas (2 ng/mL) (Kang et al., 2013),

pero con tiempos de exposición al tratamiento mayores (48 h) que los empleados en este estudio (24 h). Esto podría explicar por qué el TGF- β no indujo la expresión de α -SMA en las células LX-2.

El proceso clásico de activación de fibroblastos y HSC a CAFs implica cambios fenotípicos como un aumento de la motilidad y la elevada expresión de α -SMA (Kang et al., 2011; Biffi y Tuveson, 2020). Los resultados obtenidos sugieren que, si bien en las condiciones analizadas CEMIP se encuentra implicada en la motilidad de dichas células, esta no se relaciona con la expresión de uno de los marcadores clásicos de activación como lo es α -SMA. Parece que, en ambos tipos celulares, la motilidad celular y la activación a miofibroblastos se encuentran reguladas por vías diferentes. De hecho, algunos estudios proponen que la activación de un fibroblasto es un proceso con dos etapas. En la primera, el fibroblasto se diferencia en un proto-miofibroblasto con fibras de estrés de actina que generan fuerzas de tracción para permitir su motilidad. En la segunda, el proto-miofibroblasto, en presencia de factores como el TGF- β , se transforma en un miofibroblasto y expresa α -SMA, proteína que aumenta la contractilidad celular, pero disminuye la motilidad (Tomasek et al., 2002). En este sentido, CEMIP podría inducir la primera etapa del proceso clásico de activación a miofibroblastos (proto-miofibroblasto con motilidad), pero no la segunda etapa del proceso (asociada con la expresión de α -SMA).

Por otro lado, trabajos recientes han sugerido la existencia de diferentes subpoblaciones de CAFs, cada una de las cuales presenta un fenotipo y un perfil de activación diferente. El perfil de activación caracterizado por la expresión de α -SMA, entre otros, se encuentra asociado con fenotipos de CAFs “contráctiles” y “agresivos” (Simon y Salhia, 2022). CEMIP podría inducir en fibroblastos dérmicos y HSC un perfil de activación diferente, caracterizado por la expresión de otros marcadores diferentes de α -SMA y asociado con un fenotipo de motilidad celular.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Según los resultados obtenidos, las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. El mecanismo de regulación ejercido por la histamina y el TGF- β sobre los niveles endógenos de CEMIP no es exclusivo de los fibroblastos dérmicos, sino

que también se da en células estromales con funciones similares en otros órganos como las HSC.

2. CEMIP está implicado en la motilidad de células estromales como los fibroblastos dérmicos y las HSC.
3. Tanto los resultados previos del grupo en fibroblastos dérmicos como los que se presentan en este trabajo en relación a las HSC indican que, en estos tipos celulares, a diferencia de otros modelos celulares descritos en la literatura, el aumento de los niveles celulares de CEMIP no se relaciona con la adquisición del fenotipo clásico de miofibroblasto, caracterizado por niveles elevados de α -SMA.

Este proyecto supone un punto de partida para la caracterización de las vías moleculares a las que se encuentra ligada el perfil de activación con motilidad celular inducido por CEMIP en las líneas Detroit551 y LX-2. Quedan por desgranar aspectos tales como las rutas moleculares mediadas por la histamina y el TGF- β encargadas de regular la transcripción de CEMIP o aquellas involucradas en la motilidad mediada por CEMIP en las poblaciones celulares analizadas en este estudio. Así mismo, sería interesante analizar otros perfiles de activación y/o transdiferenciación en miofibroblastos, distintos a aquellos ligados a la expresión de α -SMA, que pudieran estar relacionados con el aumento de motilidad ligado a CEMIP. También queda por estudiar si dicho perfil de activación es inducido por las células tumorales, y si está ligado a una actividad protumoral o antitumoral.

7. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido posible gracias a la financiación concedida por la UPV/EHU a grupos de investigación consolidados (GIU20/035). Un agradecimiento especial a mis directoras, Aintzane Asumendi y Aintzane Apraiz, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, y por su tiempo, dedicación y apoyo en el trabajo realizado. Gracias también a María Larrinaga por brindarme los conocimientos técnicos necesarios para realizar este proyecto y por su ayuda a lo largo de todo el proceso en el laboratorio.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agüera-Lorente, A., Asumendi, A., Boyano, M. D., Apraiz, A. (2018). Identification of human melanoma biomarkers by comparative exoproteoma analysis of melanocytes and melanoma cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7, 55-56. (Conference abstract).
- Bajaj, S., Donnelly, D., Call, M., Johannet, P., Moran, U., Polsky, D., Shapiro, R., Berman, R., Pavlick, A., Weber, J., Zhong, J., Osman, I. (2020). Melanoma prognosis: accuracy of the American Joint Committee on cancer staging manual eighth edition. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 112(9), 921-928.
- Bartlett, D. W., Davis, M. E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic acids research*, 34(1), 322-333.
- Battle, E., Massagué, J. (2020). Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer. *Immunity*, 50(4), 924-940.yoshida
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- Biffi, G., Tuveson, D. A. (2020). Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts. *Physiological reviews*, 101(1), 147-176.
- Chaffer, C. L., Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.
- Damsky Jr, W. E., Rosenbaum, L. E., Bosenberg, M. (2011). Decoding melanoma metastasis. *Cancers*, 3(1), 126-163.
- Deroyer, C., Charlier, E., Neuville, S., Malaise, O., Gillet, P., Kurth, W., Chariot, A., Malaise, M., de Seny, D. (2019). CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell death & disease*, 10(2), 1-17.
- Dominiak, A., Chełstowska, B., Olejarz, W., Nowicka, G. (2020). Communication in the cancer microenvironment as a target for therapeutic interventions. *Cancers*, 12(5), 1232.
- Dong, X., Yang, Y., Yuan, Q., Hou, J., Wu, G. (2021). High Expression of CEMIP Correlates Poor Prognosis and the Tumor Microenvironment in Breast Cancer as a Promisingly Prognostic Biomarker. *Frontiers in genetics*, 12, 768140-768140.
- Falus, A., Hegyesi, H., Lázár-Molnár, E., Pócs, Z., László, V., Darvas, Z. (2001). Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends in immunology*, 22(12), 648-652.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-17.

Hanahan, D., Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*, 21(3), 309-322.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hirsch, F. R., Walker, J., Higgs, B. W., Cooper, Z. A., Raja, R. G., Wistuba, I. I. (2022). The Combiome Hypothesis: Selecting Optimal Treatment for Cancer Patients. *Clinical Lung Cancer*, 23(1), 1-13.

Huang, J. J., Blobe, G. C. (2016). Dichotomous roles of TGF- β in human cancer. *Biochemical Society transactions*, 44(5), 1441-1454.

International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*. Recuperado el 29 de junio de 2022 de <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>

Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration*, 8(5), 440-451.

Kahlert, U. D., Joseph, J. V., Kruyt, F. A. (2017). EMT-and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. *Molecular oncology*, 11(7), 860-877.

Kang, K. H., Qian, Z. J., Ryu, B., Karadeniz, F., Kim, D., Kim, S. K. (2013). Hepatic fibrosis inhibitory effect of peptides isolated from *navicula incerta* on TGF- β 1 Induced activation of LX-2 human hepatic stellate cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18(2), 124.

Kang, N., Gores, G. J., Shah, V. H. (2011). Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology*, 54(2), 707-713.

Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., Saverio, C., Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. *International journal of oncology*, 52(4), 1071-1080.

Li, H., Xiao, Y., Li, Q., Yao, J., Yuan, X., Zhang, Y., Yin, X., Saito, Y., Fan, H., Li, P., Kuo, W.L., Halpin, A., Gibbons, D.L., Yagita, H., Zhao, Z., Pang, D., Ren, G., Yee, C., Lee, J.J., Yu, D. (2022). The allergy mediator histamine confers resistance to immunotherapy in cancer patients via activation of the macrophage histamine receptor H1. *Cancer cell*, 40(1), 36-52.

Li, L., Yan, L. H., Manoj, S., Li, Y., Lu, L. (2017). Central role of CEMIP in tumorigenesis and its potential as therapeutic target. *Journal of Cancer*, 8(12), 2238.

Liu, J., Yan, W., Han, P., Tian, D. (2021). The emerging role of KIAA1199 in cancer development and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (138), 111507.

Liu, S., Chen, S., Zeng, J. (2018). TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis. *Molecular medicine reports*, 17(1), 699-704.

- Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A., Long, G. V. (2017). Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(8), 463-482.
- Massari, N. A., Nicoud, M. B., Medina, V. A. (2020). Histamine receptors and cancer pharmacology: an update. *British journal of pharmacology*, 177(3), 516-538.
- McAnulty, R. J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 666-671.
- Michielin, O., Van Akkooi, A. C. J., Ascierto, P. A., Dummer, R., Keilholz, U. (2019). Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 30(12), 1884-1901.
- Michishita, E., Garcés, G., Barrett, J. C., Horikawa, I. (2006). Upregulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. *Cancer letters*, 239(1), 71-77.
- Nagaoka, A., Yoshida, H., Nakamura, S., Morikawa, T., Kawabata, K., Kobayashi, M., Sakai, S., Takahashi, Y., Okada, Y., Inoue, S. (2015). Regulation of hyaluronan (HA) metabolism mediated by HYBID (hyaluronan-binding protein involved in HA depolymerization, KIAA1199) and HA synthases in growth factor-stimulated fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52), 30910-30923.
- Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., Letellier, E. (2019). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International Journal of Cancer*, 146(4), 895-905.
- Pedri, D., Karras, P., Landeloos, E., Marine, J. C., Rambow, F. (2021). Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *The FEBS Journal*, 289(5), 1352-1368.
- Rodrigues, G., Hoshino, A., Kenific, C. M., Matei, I. R., Steiner, L., Freitas, D., Kim, H.S., Oxley, P.R., Scandariato, I., Casanova-Salas, I., Dai, J., Badwe, C.R., Gril, B., Mark, M.T., Dill, B.D., Molina, H., Zhang, H., Benito-Martin, A., Bojmar, L., Ararso, Y., Offer, K., LaPlant, Q., Buehring, W., Wang, H., Jiang, X., Lu, T.M., Liu, Y., Sabari, J.K., Shin, S.J., Narula, N., Ginter, P.S., Rajasekhar, V.K., Healey, J.H., Meylan, E., Costa-Silva, B., Wang, S.E., Rafii, S., Altorki, N.K., Rudin, C.M., Jones, D.R., Steeg, P.S., Peinado, H., Ghajar, C.M., Bromberg, J., de Sousa, M., Pisapia, D., Lyden, D. (2019). Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. *Nature cell biology*, 21(11), 1403-1412.
- Simon, T., Salhia, B. (2022). Cancer-Associated Fibroblast subpopulations with diverse and dynamic roles in the Tumor Microenvironment. *Molecular Cancer Research*, 20(2), 183-192.
- Sinnberg, T., Levesque, M. P., Krochmann, J., Cheng, P. F., Ikenberg, K., Meraz-Torres, F., Niessner, H., Garbe, C., Busch, C. (2018). Wnt-signaling enhances neural crest migration of melanoma cells and induces an invasive phenotype. *Molecular cancer*, 17(1), 1-19.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(5), 349-363.

Urquiola, L. (2021) CEMIP (KIAA1199) proteinaren azterketa melanomaren hedapenari lotutako balizko biomarkatzaile gisa. (Trabajo Fin de Grado, Universidad del País Vasco UPV/EHU).

Valastyan, S., Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.

Von Schuckmann, L. A., Hughes, M. C. B., Ghiasvand, R., Malt, M., Van Der Pols, J. C., Beesley, V. L., Khosrotehrani, K., Smithers, B.M., Green, A. C. (2019). Risk of melanoma recurrence after diagnosis of a high-risk primary tumor. *JAMA dermatology*, 155(6), 688-693.

Ye, X., Weinberg, R. A. (2015). Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in cell biology*, 25(11), 675-686.

Yin, C., Evason, K. J., Asahina, K., Stainier, D. Y. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(5), 1902-1910.

Yoshida, H., Aoki, M., Komiya, A., Endo, Y., Kawabata, K., Nakamura, T., Sakai, S., Sayo, T., Okada, Y., Takahashi, Y. (2020). HYBID (alias KIAA1199/CEMIP) and hyaluronan synthase coordinately regulate hyaluronan metabolism in histamine-stimulated skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2483-2494.

Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., Sakai, S., Sugiyama, Y., Enomoto, H., Okada, Y., Inoue, S. (2013). KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5612-5617.

Yoshida, H., Okada, Y. (2019). Role of HYBID (hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization), alias KIAA1199/CEMIP, in hyaluronan degradation in normal and photoaged skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5804.

9. ANEXO. MATERIAL ADICIONAL

Tabla A1. Receta para la elaboración de geles de acrilamida para Western Blot. Se muestran las cantidades empleadas para preparar un gel (gel concentrador 4%, gel separador 7%).

Componente	Gel concentrador (4%)	Gel separador (7%)
Agua destilada	4,50 mL	4,10 mL
Tris-HCl (1 M, pH = 8,8)	-	3,30 mL
Tris-HCl (0,5 M, pH = 6,8)	1,89 mL	-
Acrilamida 30%	1,00 mL	2,30 mL
SDS 10%	75,0 µL	100 µL
APS 10%	37,5 µL	100 µL
TEMED	7,50 µL	10,0 µL
Volumen final	7,50 mL	10,0 mL

SDS: Dodecilsulfato sódico; APS: Adenosina-5-fosfosulfato; TEMED: Tetrametiletildiamina.

Tabla A2. Composición de los tampones utilizados en Western Blot. Se muestra la composición del tampón de carga Laemmli y de 1L de tampón de electroforesis, de tampón de transferencia y de solución salina tamponada.

Tampón	Composición
Tampón de carga Laemmli (5%)	Tris-HCl (pH = 6,8) 375 mM, 12% SDS, 50% glicerol, 15% 2-mercaptoetanol, 0,06% azul de bromofenol, agua destilada hasta el volumen final.
Tampón de electroforesis (10x) ^a	30 g Tris, 144 g glicina, 10 g SDS, 1L agua destilada
Tampón de transferencia (10x) ^b	30 g Tris, 144 g glicina, 5 g SDS, 1L agua destilada. pH = 8,3
TBS (10x) ^c	24,2 g Tris, 80 g NaCl, 1L agua destilada. pH = 7,6

^{a,c}Las soluciones se emplearon al 1x. Se diluyeron 100 mL de dilución 10x con 900 mL de agua destilada.

^bEl tampón de transferencia se empleó al 1x. Se diluyeron 100 mL de tampón 10x con 100 mL de metanol y 800 mL de agua destilada.

SDS: Dodecilsulfato sódico; TBS: solución salina tamponada con Tris.