



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto de la sobreexpresión de *GAS1* en cáncer de
mama”**

TESIS

Que presenta

M. en C. ADRIANA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. José Víctor Segovia Vila

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca de doctorado con el número de registro 215640, el cual me sirvió de sustento durante el periodo de la realización de este proyecto.

Además agradezco la paciencia y el apoyo brindados por el Dr. José Víctor Segovia Vila para asesorarme en la realización de este proyecto de doctorado. También quiero agradecer a Paula Vergara y Rubén Sánchez por su asistencia técnica en el laboratorio, y a la Dra. Lorenza González Mariscal, a la Dra. Mónica Díaz Coránguez y a la auxiliar Dolores Martín Tapia por su asistencia con el ensayo de migración de células endoteliales.

Finalmente agradezco el apoyo y las sugerencias por parte de mi familia y compañeros de laboratorio.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Antecedentes	1
1.1 Cáncer de mama.....	1
Epidemiología	1
Clasificación.....	1
Factores de riesgo	4
Diagnóstico y tratamiento	5
1.2 Angiogénesis y cáncer	6
1.3 Terapia génica.....	8
1.4 GAS1 (Growth arrest specific 1).....	10
Señalización.....	10
GAS1 y cáncer.....	15
GAS1, cáncer de mama.....	17
1.5 Artemina (ARTN).....	20
ARTN y cáncer.....	21
1.6 ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)	23
ERK1/2 y cáncer	23
2. Justificación	26
3. Hipótesis	26
4. Objetivo.....	27
4.1 Objetivos específicos	27
5. Metodología	28
5.1 Sistema de expresión.....	28
5.2 Construcción de los vectores de expresión.....	28
5.3 Producción de los lentivirus.....	30
5.4 Obtención de las clonas MDA de expresión regulable	31
5.5 Ensayo de viabilidad celular.....	32

5.6 Efecto de tGAS1 en el medio condicionado	32
5.7 Inmunoprecipitación de tGAS1 del medio condicionado	33
5.8 Activación de ERK1/2 por el co-tratamiento con tGAS1 y ARTN	34
5.9 RT-PCR.....	34
5.10 Western blot	35
5.11 Análisis del ciclo celular	35
5.12 Inmunofluorescencia	36
5.13 Migración de células endoteliales <i>in vitro</i>	37
5.14 Modelos in vivo de tumores de mama.....	37
5.15 Análisis estadístico.....	39
6. Resultados	40
6.1 Construcciones lentivirales.....	40
6.2 GAS1 y tGAS1 disminuyen el número de células viables por detención del ciclo celular	40
6.3 El medio condicionado con tGAS1 disminuye el número de células viables	45
6.4 tGAS1 disminuye la activación de ERK al bloquear la señalización de la ARTN	46
6.5 tGAS1 inhibe el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	47
6.6 tGAS1 disminuye la activación de ERK <i>in vivo</i>	49
6.7 tGAS1 disminuye la vascularización de los tumores de mama	52
6.8 tGAS1 disminuye la migración de células endoteliales microvasculares	52
7. Discusión	57
8. Conclusión	62
9. Perspectivas	62
Referencias.....	63
Anexo1.....	69

ABREVIATURAS

- ARTN: Artemina
- BRCA: gen breast cancer
- CK: Citoqueratina
- CMV: promotor citomegalovirus
- DCIS: Carcinoma ductal *in situ*
- EGFP: Proteína verde fluorescente
- EGFR: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
- ER: Receptor a estrógenos
- ER+: Expresión positiva para el receptor a estrógenos
- ER-: Expresión negativa para el receptor a estrógenos
- ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares
- GAS1: Growth Arrest specific 1
- GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía
- GFL: ligando de la familia de GDNF
- GFR α : Receptor α para los ligandos de GDNF
- GPI: Glicosil fosfatidil inositol
- HER2: Receptor para el factor de crecimiento epidérmico 2
- ILC: Carcinoma lobulillar invasivo
- LCIS: Carcinoma lobulillar *in situ*
- LvEGFP: lentivirus EGFP
- LvGAS1: lentivirus GAS1
- LvtGAS1: lentivirus tGAS1
- MAPK: cinasa activada por mitogenos
- MDA-EGFP: Células MDA MB 231 estables para la expresión regulable de EGFP
- MDA-GAS1: Células MDA MB 231 estables para la expresión regulable de GAS1
- MDA-tGAS1: Células MDA MB 231 estables para la expresión regulable de tGAS1

- MDA-TR: Células MDA MB 231 estables para la expresión de TR
- MDA-WT: Células MDA MB 231 silvestres
- NCAM: Molécula de adhesión celular neuronal
- NRTN: Neurturina
- PI3K: Cinasa de fosfstidil inositol
- PR: Receptor a progesterona
- PSPN: persefina
- PTEN: Homologo de la tensina eliminado en el cromosoma 10
- pv: partículas virales
- Rb: gen retinoblastoma
- RB: proteína retinoblastoma
- RET: Re-arreglo durante la transfección
- Shh: Sonic hedgehog
- tetO: Secuencia reguladora del operador de tetraciclina
- tGAS1: forma soluble de GAS1
- TR: Elemento represor del operador de tetraciclina
- VE-Cadherina: Cadherina del endotelio vascular
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VEGF-R: Receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

El gen *GAS1* (*Growth Arrest Specific 1*) codifica una proteína involucrada en la detención del ciclo celular y la apoptosis. En trabajos previos, se ha demostrado la capacidad de *GAS1* para inhibir el crecimiento de gliomas por el bloqueo de la vía de señalización de GDNF-RET. En este trabajo, mostramos que una forma soluble de *GAS1* (t*GAS1*), disminuye el número de células viables MDA MB 231 de cáncer de mama humano, actuando tanto en forma endocrina como paracrina, cuando es secretado por las células que producen t*GAS1*. Más aún, t*GAS1* inhibe el crecimiento de tumores de mama implantados en ratones hembra inmunosuprimidos nu/nu, a través de un mecanismo independiente de RET, el cual involucra el bloqueo de la señalización Artemina (ARTN)-GFR α 3-(GDNF Family Receptor alpha 3) y la inactivación de ERK1/2. Adicionalmente, observamos que la presencia de t*GAS1* reduce la vascularización de los tumores de mama al prevenir la migración de células endoteliales microvasculares. Estos resultados apoyan el potencial de t*GAS1* como una terapia co-adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama por inhibición del crecimiento tumoral y la angiogénesis.

ABSTRACT

The *GAS1* (*Growth Arrest Specific 1*) gene codes for a protein involved in cell cycle arrest and apoptosis. In previous works, it has been demonstrated the capacity of GAS1 to inhibit the growth of gliomas by blocking the GDNF-RET signaling pathway. Here, we show that a soluble form of GAS1 (tGAS1), decreases the number of viable MDA MB 231 human breast cancer cells, acting in both autocrine and paracrine manners when secreted from producing cells. Moreover, tGAS1 inhibits the growth of tumors implanted in female nu/nu mice through a RET-independent mechanism which involves interfering with the Artemin (ARTN)-GFR α 3-(GDNF Family Receptor alpha 3) mediated intracellular signaling and the activation of ERK1/2. In addition, we observed that the presence of tGAS1 reduces the vascularization of implanted tumors, by preventing the migration of endothelial cells. The present results support a potential adjuvant role for tGAS1 in the treatment of breast cancer, by detaining tumor growth and inhibiting angiogenesis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer de mama

Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en el 2012 se registraron 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes. En las mujeres, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuentemente diagnosticado, 1.67 millones de nuevos casos (25% de todos los cánceres), con 522,000 muertes (GLOBOCAN 2012).

El cáncer de mama se presenta con frecuencia tanto en países desarrollados (27%) como en desarrollo (19%), sin embargo la mortalidad por este es ligeramente mayor en los países en desarrollo (55%) (Gómez Dantés et al 2009). En México el cáncer de mama ha pasado a ser un problema de salud pública (Brandan et al 2006). De acuerdo a las estadísticas del INEGI en el 2012, la tercera causa de mortalidad en el sexo femenino son los tumores malignos, de los cuales el principal fue el de mama siendo responsable de 5,613 defunciones (INEGI 2012).

Clasificación

El cáncer de mama está conformado de muchos tipos celulares que incluyen epitelio normal, y células tumorales de estroma, tejido adiposo y endoteliales que poseen diferentes características morfológicas y genéticas. El cáncer de mama se clasifica de acuerdo con sus características histológicas en dos grupos principales, el ductal y el lobulillar (Turashvili et al 2007).

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo y corresponde a una proliferación de células neoplásicas dentro de los ductos mamarios, los cuales normalmente son rodeados por células mioepiteliales y una membrana basal intacta. El DCIS no invade más allá de los ductos, pero factores como el tamaño de la lesión, grado de atipia nuclear y presencia de necrosis pueden afectar el riesgo de recurrencia. Además el microambiente intraductal, el estrés metabólico y la hipoxia pueden promover la inestabilidad genética, inducir mutagénesis y la selección de células neoplásicas (Espina et al 2011).

Por otro lado, el carcinoma lobulillar comienza en los lobulillos que son las glándulas productoras de leche, su forma *in situ* (LCIS) no crece a través de las paredes de los lobulillos, y el invasivo (ILC) puede propagarse a otras partes del cuerpo (ACS Detailed Guide: Breast Cancer 2009).

Para un mejor entendimiento y tratamiento, el cáncer de mama ha sido clasificado en distintos subtipos moleculares como se describe a continuación (Eroles et al 2011):

Luminal A. Es el más común, representa del 50-60% del total de los cánceres de mama y expresa genes activados por el receptor a estrógenos (ER) comúnmente presentes en el epitelio luminal que delimita los ductos en el tejido mamario. Se caracteriza por la expresión de ER, el receptor a progesterona (PR), citoqueratinas CK8/18 y el marcador GATA3. Las pacientes que presentan este subtipo tienen buen pronóstico, pero pueden desarrollar metástasis a hueso.

Luminal B. Abarcan del 10-20% de los cánceres de mama, tienen un fenotipo más agresivo que el luminal A, al presentar alto índice de proliferación y mal pronóstico, además tiene alta frecuencia de metástasis a hueso y a hígado. Tiene un incremento en la expresión de genes de proliferación celular como Ki67 y ciclina B1, con frecuencia expresan los receptores para el factor de crecimiento epidérmico 1 y 2 (EGFR y HER2), y es positivo para ER.

HER2+. Representan del 15-20% del total, tienen alta expresión del receptor HER2 y otros genes asociados con su vía de señalización y muestran baja expresión de los genes característicos de los subgrupos luminales. Los cánceres de mama que sobreexpresan HER2 son muy proliferativos y alrededor del 75% son de alto grado histológico y cerca del 40% tienen mutaciones en p53.

Basal. Abarcan del 10-20% del total, expresan genes usualmente presentes en tejido de mama normal como citoqueratinas CK5 y CK17, p-cadherina, caveolina1 y 2, nestina, CD44 y EGFR, también expresan CK8/18 pero en menor nivel que en los carcinomas luminales. Se caracterizan por su aparición a edad temprana, tienen alta frecuencia de diseminación a los nodos linfáticos. Estos tienden a ser carcinomas ductales invasivos con alto índice mitótico y necrosis. Presentan metástasis a pulmones, sistema nervioso central y nódulos linfáticos. No expresan ER, PR ni HER2, por lo que este subgrupo incluye a los denominados cánceres triple negativo. Muestran peor pronóstico que los luminales y alta frecuencia de recurrencia. Se ha encontrado que albergan mutaciones en p53 y BRCA1.

Tipo normal. Corresponden al 5-10%, están poco caracterizados pero expresan genes de tejido adiposo, no expresan ER, PR ni HER2 por lo que pueden ser clasificados como triple negativo, y se diferencia de los basales por la falta de expresión de EGFR y CK5.

Claudinas bajas. Es un subgrupo que presenta baja expresión de genes que participan en las uniones estrechas y adhesión celular como claudinas 3, 4 y 7, cingulina, ocludina y E-cadherina, es parecido al subtipo basal pero en este se sobreexpresan genes relacionados a la respuesta inmune. Es un subgrupo raro que presenta mal pronóstico y corresponden a carcinoma ductal invasivo de alto grado, alrededor del 20% de estos son ER+.

Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama. Se ha observado que la incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad duplicándose cada 10 años hasta llegar a la menopausia y después de esta empieza a disminuir (McPherson et al 2000, Benson et al 2009), en México, el 46% de los casos se presenta antes de los 50 años (Brandan et al 2006).

Por otro lado, una menarca temprana y una menopausia tardía se asocian con un periodo de exposición a estrógenos más prolongado. Las mujeres con menopausia después de los 55 años son dos veces más propensas a desarrollar cáncer de mama, que las que presentan la menopausia antes de los 45 años. También se ha relacionado el embarazo con el cáncer de mama al encontrarse que las mujeres que no tienen hijos o que tienen su primer hijo después de los 30 años tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer, en comparación con las que tuvieron su primer hijo antes de los 20 años (McPherson et al 2000, Brandan et al 2006).

Otros factores incluyen a la dieta. Se ha observado una relación entre la ingesta de grasa y el desarrollo del cáncer de mama; el consumo de anticonceptivos orales y la terapia hormonal de reemplazo incrementan el riesgo alrededor del 35% después de los 10 años de uso (McPherson et al 2000, Brandan et al 2006, Moulder et al 2008).

Los antecedentes familiares como las mutaciones recesivas en los genes BRCA1 y BRCA2 pueden determinar la prevalencia del cáncer de mama en una población. Por ejemplo alrededor del 2% de la mujeres judías Ashkenazi tiene mutaciones en BRCA1 (McPherson et al 2000). Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 se presentan en el 75% de los cánceres de mama hereditarios y del 5 al 10% de todos los cánceres de mama (Benson et al 2009). Mutaciones heredadas en otros genes como p53 y PTEN están asociadas con síndromes familiares que incluyen el desarrollo de cáncer de mama como el síndrome de Cowden (McPherson et al 2000).

Por otro lado, se ha encontrado que los tumores negativos a RE son más comunes en las mujeres jóvenes y los positivos a RE son más comunes en las mujeres mayores (Benson et al 2009).

Diagnóstico y tratamiento

Cuando el cáncer de mama se encuentra en etapas tempranas con frecuencia no se manifiestan síntomas, sin embargo, cuando los tumores ya han alcanzado un volumen mayor pueden ser detectados como bultos que generalmente no provocan dolor. Otros síntomas menos comunes que pueden presentarse son el engrosamiento, hinchazón e irritación de la piel, o anomalías en el pezón como ulceración retracción o descarga espontánea (Cancer facts and figures 2014).

Las variables de los tumores de mama como el grado, el tipo histológico, el tamaño y el estado de los receptores de estrógenos y HER2 pueden influenciar el pronóstico y la respuesta a las terapias sistémicas (Andre et al 2006).

El tratamiento con frecuencia involucra la extirpación quirúrgica del tumor conservando la mama (lumpectomía) o la extirpación quirúrgica de la mama (mastectomía), la radioterapia y quimioterapia posteriores a la cirugía. Se ha observado que las mujeres con estados tempranos de la enfermedad a las cuales se realizó la lumpectomía seguida radioterapia mostraron una supervivencia similar a las tratadas con mastectomía, además se recomienda la remoción de nódulos linfáticos para determinar si el tumor ha comenzado a diseminarse (Cancer Facts and Figures 2014).

En el caso del cáncer que expresa el ER se utiliza la terapia hormonal con moduladores del ER como el tamoxifeno y raloxifeno, o inhibidores de la enzima aromatasa encargada de la producción de estrógenos a través de andrógenos como son letrazol y anastrozol (Cancer Facts and Figures 2014).

Aunque el tamoxifeno disminuye la recurrencia y mortalidad en un tercio de las mujeres tratadas durante 5 años, se dice que presentaran recurrencia dentro de unos 15 años. Existen mecanismos de resistencia al tamoxifeno como la inactivación del citocromo CYP2D6 en aproximadamente el 8% de las mujeres caucásicas impidiendo la conversión del tamoxifeno a su metabolito activo endoxifeno.

La pérdida de la expresión de ER o mutaciones en este que son mecanismos de resistencia adquirida. Por ejemplo la expresión de una variante truncada ER α 36 se asociada con una respuesta reducida. Por otro lado, el receptor relacionado a ER (ERR γ) cuando se sobreexpresa en modelos de cáncer lobular, promueve la resistencia a tamoxifeno. También, la sobreexpresión y el incremento en la fosforilación de coactivadores de ER como NCOA3 llevan a la transcripción constitutiva mediada por ER, lo que se ha visto que provoca resistencia *in vitro* y en modelos de xenotransplantes, además de asociarse con la reducción a la sensibilidad a tamoxifeno en las pacientes. Aunado a esto, el coactivador PEPL1 puede conferir resistencia al tamoxifeno al modular la interacción de ER con c-Src provocando la activación de esta última y llevando a la activación de PI3K (Musgrove et al 2009).

HER2 es otro blanco de la terapia contra el cáncer de mama, el trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de HER2, y se ha demostrado que disminuye la recurrencia en un 50%. También se han desarrollado moléculas pequeñas inhibidoras como el lapatinib (Tykerb) dirigida contra HER2 y EGFR (Benson et al 2009).

1.2 Angiogénesis y cáncer.

La angiogénesis tumoral se refiere a la proliferación de una red de vasos sanguíneos que penetra en el tumor aportándole nutrientes, oxígeno y un medio para eliminar desechos.

Cuando el tumor se excede en tamaño, presenta hipoxia y privación de nutrientes las células tumorales se lisan liberando citocinas y factores de crecimiento que activan células normales en el tejido que las rodea activando señales que estimulan el crecimiento de nuevos vasos.

Como se ha reportado anteriormente, el proceso angiogénico es regulado por moléculas activadoras e inhibitoras entre los principales activadores se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que estimula la proliferación de células endoteliales y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); mientras que entre los inhibidores más importantes están angiostatina, endostatina y trombospondina (Weis et al 2011, NCI Web site).

A grandes rasgos, una vez que las moléculas como VEGF y metaloproteinasas (MMPs) secretadas por el tumor han llegado al tejido vascular, las células perivasculares se desprenden de los vasos sanguíneos maduros adquiriendo un fenotipo activado. Esto conduce a la alteración de la barrera vascular por la presencia de proteínas también procedentes del tumor como ANGPT2, que incrementan la degradación de la membrana basal para facilitar la formación de las ramificaciones vasculares que llegaran al tumor. Al alterarse la integridad de la barrera vascular, diversas células son expuestas al estímulo angiogénico, las plaquetas son atraídas a sitios donde la membrana basal está expuesta, para ser activadas y liberar factores estimulatorios, también son atraídas las células progenitoras endoteliales (EPCs) y las células mieloides procedentes de la medula ósea (Weis et al 2011, Folkman et al 2007).

La participación de integrinas es importante para mantener la viabilidad de las células endoteliales ya que estas necesitan estar unidas a la membrana extracelular, lo cual es facilitado por las integrinas, para que puedan responder a las señales que están induciendo la ramificación de los nuevos vasos sanguíneos (Folkman et al 2007).

1.3 Terapia génica

La terapia génica se refiere a la introducción de material genético a un organismo con fines terapéuticos. La terapia génica puede ser dividida en dos clases, *in vivo*, en la cual la transferencia del gen ocurre dentro del paciente, y *ex vivo*, donde la transferencia del gen ocurre fuera del paciente, es decir, células con el gen transferido son después implantadas en un paciente. Los métodos para la transferencia de genes tanto *in vivo* como *ex vivo* pueden ser clasificados en dos grupos principales, los no virales y los virales (Kelley et al 2000).

En los métodos no virales se encuentra el uso de liposomas, ADN desnudo, biobalística, microinyección, lipoplex y últimamente como una estrategia más novedosa el uso de células troncales como acarreadores de genes terapéuticos (Rochlitz et al 2001, Kullberg et al 2013). Por otra parte, se ha observado que las células troncales mesenquimales tienden a acumularse en tejido tumoral. Por lo tanto, se ha sugerido que estas pueden ser utilizadas como vehículo para direccionar selectivamente la entrega de proteínas terapéuticas a una zona tumoral. Dicha aplicación de células troncales ha sido probada en gliomas, melanoma y cáncer de mama para la entrega de genes como la IL-12 e INF- β (Kullberg et al 2013).

Entre los vectores virales más comúnmente usados se encuentran los retrovirus, adenovirus, lentivirus, virus adeno-asociados y los herpes virus (Benítez et al 2008). El uso de los lentivirus en la investigación ha sido más frecuente en los últimos años, estos han sido aplicados en aproximadamente 1.4% de los ensayos clínicos. Estos vectores pertenecen a la familia de los retrovirus pero presentan características ventajosas como la capacidad de infectar células que no se encuentran en división, por lo que se pueden usar para la entrega de genes terapéuticos en células postmitóticas y altamente diferenciadas.

Los vectores lentivirales son divididos en generaciones de acuerdo a los vectores plasmídicos utilizados para su empaquetamiento. En los sistemas de última generación las partículas lentivirales son generadas por co-transfección de una mezcla de plásmidos que codifican para los genes de empaquetamiento, el gen de transferencia, y la envoltura, y un cuarto plásmido que codifica para el gen rev, para incrementar el nivel de seguridad de estos vectores (Escors et al 2010).

Las estrategias aplicadas en la terapia génica incluyen la potenciación del sistema inmune, entrega de genes suicidas, la inactivación de oncogenes y la activación de genes supresores de tumores. En relación al tratamiento de cáncer de mama se ha estudiado la activación de supresores de tumores como *p53*, *Rb*, *mda7*, *BRCA1/2*, *p27*, entre otros.

El efecto antitumoral de p53 ha sido mostrado en experimentos *in vivo* como el tratamiento de xenotransplantes de cáncer de mama en ratones encontrándose una reducción significativa del crecimiento tumoral, lo mismo se ha observado al restaurar la expresión de Rb. Por otro lado, está el uso de ARN interferente como herramienta para silenciar oncogenes involucrados en el desarrollo de cáncer de mama y también se ha propuesto la modulación de proteínas involucradas en la apoptosis como BCL2 y TRAIL (Stoff-Khalili et al 2006).

Un proceso importante que influye en el crecimiento tumoral y agresividad del cáncer es la angiogénesis. La terapia génica antiangiogénica ha mostrado ser prometedora en el tratamiento contra el cáncer, cuya intención es inhibir el crecimiento tumoral impidiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos por el tumor al modular la expresión de genes involucrados en este proceso como el VEGF y su receptor VEGF-R (Liu et al 2012).

1.4 GAS1 (Growth arrest specific 1)

El gen *gas1* fue aislado de una librería diferencial en las células NIH3T3 en detención del ciclo celular por privación de suero (Schneider et al 1988), y regula el ciclo celular de manera negativa previniendo la síntesis de ADN y la entrada a la fase S del ciclo celular (Del Sal et al 1992).

Este gen codifica para la proteína Gas1 de 37 kDa insertada en la cara externa de la membrana celular a través de un ancla de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en su extremo carboxilo terminal. El extremo N-terminal de Gas1 representa un péptido señal requerido para dirigir la proteína al retículo endoplásmico donde es cortada, N-glicosilada y se inserta el ancla glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en el extremo C-terminal para su posterior localización en la membrana celular (Stebel et al 2000). Se ha demostrado que el ancla GPI no es necesaria para el efecto de Gas1 en la supresión del crecimiento (Ruaro et al 2000), por lo que ya se ha investigado el efecto paracrino de la proteína humana GAS1 soluble, es decir, sin el ancla GPI en glioblastomas (López-Ornelas et al 2011).

Durante la embriogénesis, el gen *gas1* es diferencialmente expresado, como es en el caso del tejido interdigital donde se sobreexpresa y se asocia con la muerte de dicho tejido (Lee et al 2001), sin embargo, en el cerebelo se ha propuesto como un regulador positivo del crecimiento del mismo (Liu et al 2001), por lo que Gas1 es una proteína pleiotrópica cuyo efecto depende del contexto celular en que se encuentre.

Señalización

Inicialmente, se reportó que Gas1 antagonizaba la señalización de Sonic hedgehog (Shh), un morfógeno involucrado en el desarrollo embrionario, ya que se encontró que la expresión ectópica de Gas1 en células presomíticas atenuaba su respuesta a Shh (Lee et al 2001b), y en los dientes disminuía la expresión del receptor para Shh, Patched1 (Ptch1) (Cobourne et al 2004).

Estudios recientes han demostrado lo contrario, que Gas1 regula positivamente la señalización de Shh. Se ha observado que Gas1 actúa de manera conjunta con Ptch1, lo que lleva a la desinhibición de la proteína de membrana Smo y a la consecuente activación del factor de transcripción Gli y la regulación de genes río abajo involucrados en el desarrollo embrionario (Martinelli et al 2007).

Los niveles de Shh en la membrana son controlados por la regulación a nivel transcripcional de los componentes de retroalimentación negativa como Ptch1, Hip1, y regulación positiva como Cdo y Boc. Gas1, en cooperación con Cdo se une con alta afinidad a Shh, y promueve la señalización de Shh durante la embriogénesis en una manera dependiente de la dosis, esto indica que Gas1 es requerido para proliferación celular inducida por Shh (Fig. 1.1; Allen et al 2007, Izzi et al 2011).

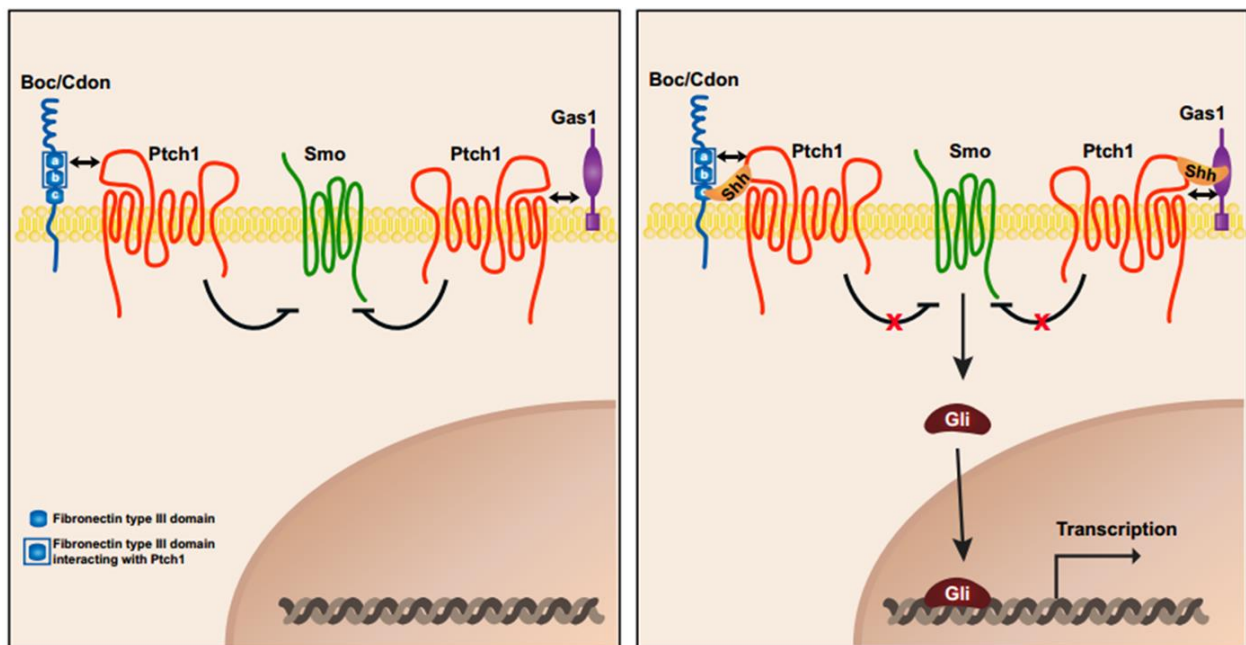


Figura 1.1: La señalización de Shh requiere de los correceptores Boc, Cdo y Gas1. A la izquierda se muestra que Smo no puede liberarse de la inhibición por Ptch1 en ausencia de Shh. A la derecha se muestra como Shh es presentado a Ptch1 a través de Boc, Cdo o Gas1 y esto resulta en la desinhibición de Smo y la consecuente activación de factor de transcripción Gli (Tomado de Izzi et al 2011).

Por otro lado, Gas1 muestra una alta similitud estructural con los $GFR\alpha$, los receptores de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), GFLs (Schueler-Furman et al 2006). Los GFLs pertenecen a la familia de $TGF-\beta$ e incluyen a GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) y estos interactúan con los receptores $GFR\alpha1$, $GFR\alpha2$, $GFR\alpha3$ y $GFR\alpha4$, respectivamente, pero pueden interactuar con otros receptores con menor afinidad. GDNF puede interactuar con $GFR\alpha2$ y $GFR\alpha3$, y NRTN y ARTN con $GFR\alpha1$. Los $GFR\alpha$, generalmente, están unidos a la membrana por un ancla GPI pero pueden producirse formas solubles por el corte de una fosfolipasa o proteasa poco conocida (Airaksinen et al 2002).

A través del programa ProtoNet 4.0 se encontró que Gas1 muestra una similitud significativa con $GFR\alpha1-4$ en aves, roedores y primates. Presentan una similitud del 20 al 25% que corresponde a unos 120 a 150 aminoácidos. La estructura secundaria de Gas1 está conformada por α -hélices y una extensa región carboxilo terminal. Así mismo, se encontró que Gas1 muestra el mismo plegamiento que el dominio D3 de $GFR\alpha1$ de rata (Fig. 1.2; Schueler-Furman et al 2006).

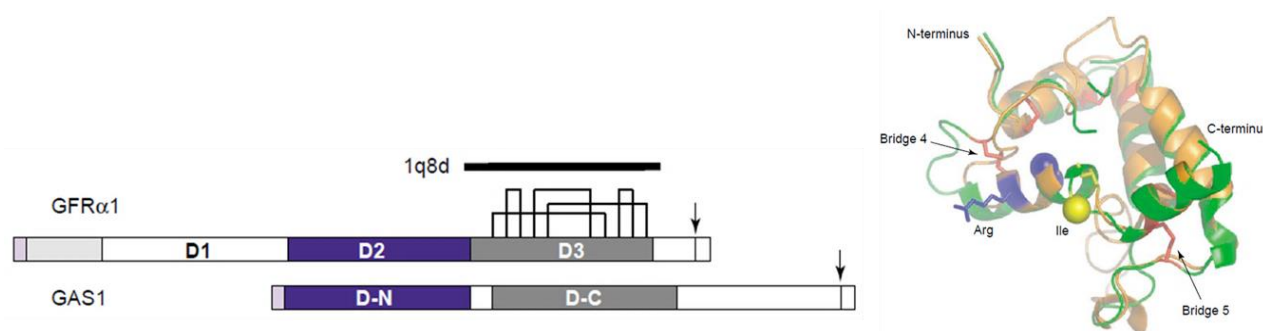


Figura 1.2: Gas1 tiene similitud estructural con los $GFR\alpha$ s. A la izquierda se muestra un esquema en donde se indica la homología de los dominios D-N y D-C de Gas1 con los dominios D2 y D3 de $GFR\alpha1$ en la cual se observa la presencia de 5 puentes disulfuro en ambas proteínas. A la derecha se muestra la sobreposición entre el dominio D-N (en verde) y D3 (en naranja) de Gas1 y $GFR\alpha1$, respectivamente (Tomado de Schueler-Furman et al 2006).

La unión de los GFLs a $GFR\alpha$ activa la señalización del receptor tirosina cinasa RET. RET es una proteína transmembranal que contiene 4 repeticiones parecidas a E-cadherina en el dominio extracelular y tiene un dominio tirosina cinasa intracelular. GDNF se dimeriza y los dímeros se unen a $GFR\alpha1$ en monómeros o dímeros, el complejo GFL- $GFR\alpha$ se une al dominio extracelular de RET induciendo su homodimerización y autofosforilación (Airaksinen et al 2002). La activación de RET enciende las vías de señalización que promueven la proliferación (MAPK) y la sobrevivencia (PI3K/AKT) celular (Fig. 1.3; Airaksinen et al 2002, Saavedra et al 2008).

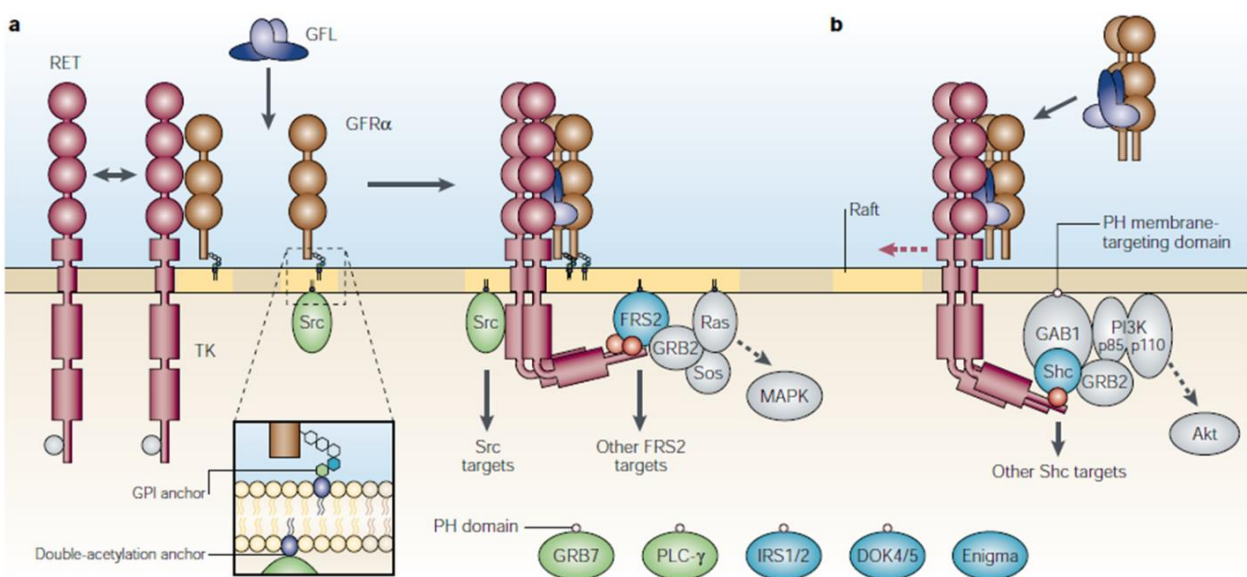


Figura 1.3: La unión de los GFLs a $GFR\alpha$ activa a RET. El complejo GFL- $GFR\alpha$ ya sea unido a la membrana (a) o en su forma soluble (b) puede activar al receptor tirosina cinasa RET provocando proliferación y sobrevivencia celular, a través de la activación de la señalización de las MAPK y AKT, respectivamente (Tomado de Airaksinen et al 2002).

En otros estudios, se ha sugerido que Gas1 puede unir a RET de una manera dependiente del ligando y secuestrarlo en las balsas lipídicas alterando la señalización río abajo (Cabrera et al 2006).

En las células de glioblastoma C6 y neuroblastoma SH-SY5Y se ha demostrado que la expresión de *GAS1* humano induce apoptosis. Este efecto está relacionado con la reducción de la fosforilación en la tirosina 1062 de RET, importante en la activación de AKT, lo que conduce a una disminución en la actividad de AKT, a la translocación de Bad a la mitocondria, a la liberación del citocromo-c al citosol, y a la activación de las caspasas 3 y 9, provocando apoptosis (Fig. 1.4; Zamorano et al 2003, López-Ramírez et al 2008, Zarco et al 2012).

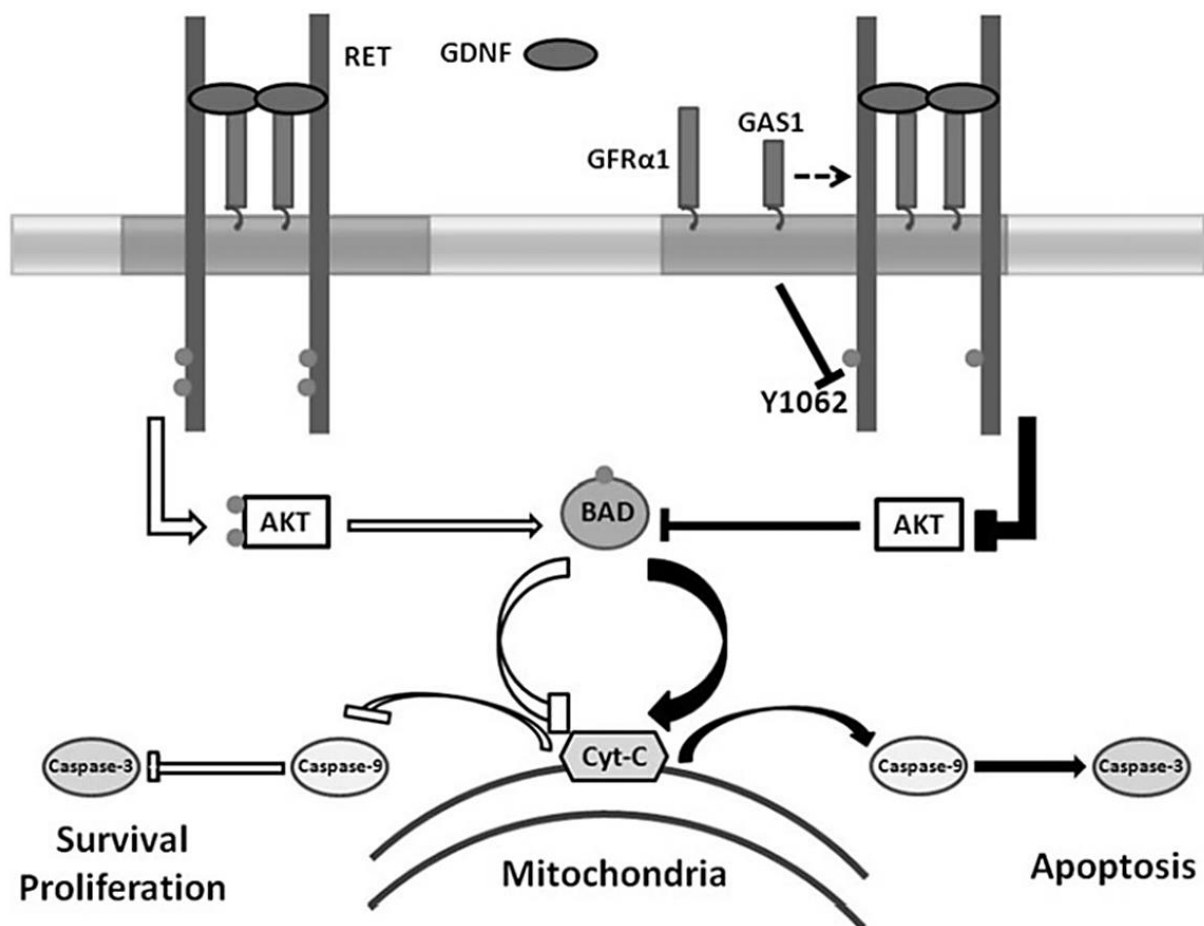


Figura 1.4: GAS1 está involucrando en la inhibición de la vía se señalización de GDNF, a través de la reducción de la activación de RET y AKT, e induciendo la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas 9 y 3, provocando apoptosis (Tomado de Zarco et al 2012).

GAS1 y cáncer.

Las alteraciones en la expresión de GAS1 han sido relacionadas con el desarrollo de cáncer. Se ha encontrado que el *locus* cromosomal de GAS1 humano (9q21.3-q22) es una región frecuentemente eliminada en la leucemia mieloide aguda y el tumor de vejiga (Evdokiou et al 1993). La sobreexpresión de GAS1 suprime la proliferación celular en las líneas celulares T24 del cáncer de vejiga y A549 del cáncer de pulmón y HT1080 del fibrosarcoma (Evdokiou et al 1998).

Como se mencionó antes, GAS1 provoca apoptosis en células de glioblastoma C6 y neuroblastoma SH-SY5Y y además se ha demostrado que la expresión de GAS1 reduce el crecimiento e induce la apoptosis en gliomas *in vivo* inducidos por inoculación de células C6 y también en tumores primarios de gliomas humanos (Benítez et al 2007, Domínguez-Monzón et al 2009).

Por otro lado, *GAS1* ha sido propuesto como un gen supresor de metástasis. La expresión de *GAS1* se regula a la baja en los tumores metastásicos en comparación con los tumores primarios, en varios tipos de cáncer. Además el “knockdown” de *GAS1* promueve la metástasis al pulmón de las células de melanoma, y por el contrario, la expresión de *GAS1* suprime la metástasis induciendo la apoptosis en las células seguido de su diseminación a sitios secundarios, a través de la activación de las caspasas (Gobeil et al 2008).

Últimamente, se ha mostrado que *GAS1* puede actuar como un gene supresor de tumores en células del cáncer gástrico. La baja expresión de *GAS1* en estas células puede mediar parcialmente el incremento en la expresión de los transportadores ABC, como la glicoproteína-P y BCRP, que inducen la resistencia a los fármacos, ya que *GAS1* en las células del cáncer gástrico induce la resistencia al tratamiento con epirubicina (Zhao et al 2009).

Considerando que los receptores $GFR\alpha_s$ que mantienen relación estructural con Gas1 pueden presentarse en forma soluble al ser liberadores del ancla GPI mediante una proteasa, se ha planteado el estudio de una forma soluble de Gas1. Esto se ha realizado truncando la secuencia de GAS1 humano a partir de la arginina 315 para impedir la unión al ancla GPI. El efecto de la forma soluble o truncada de GAS1 (tGAS1) se evaluó en células de glioblastoma murino C6, encontrándose la reducción de la viabilidad de dichas células cuando recibieron el medio de cultivo conteniendo tGAS1. Indicando así, que tGAS1 puede ejercer un efecto paracrino en las células C6 de glioblastoma (Fig. 1.5; López-Ornelas et al 2011 y 2014).

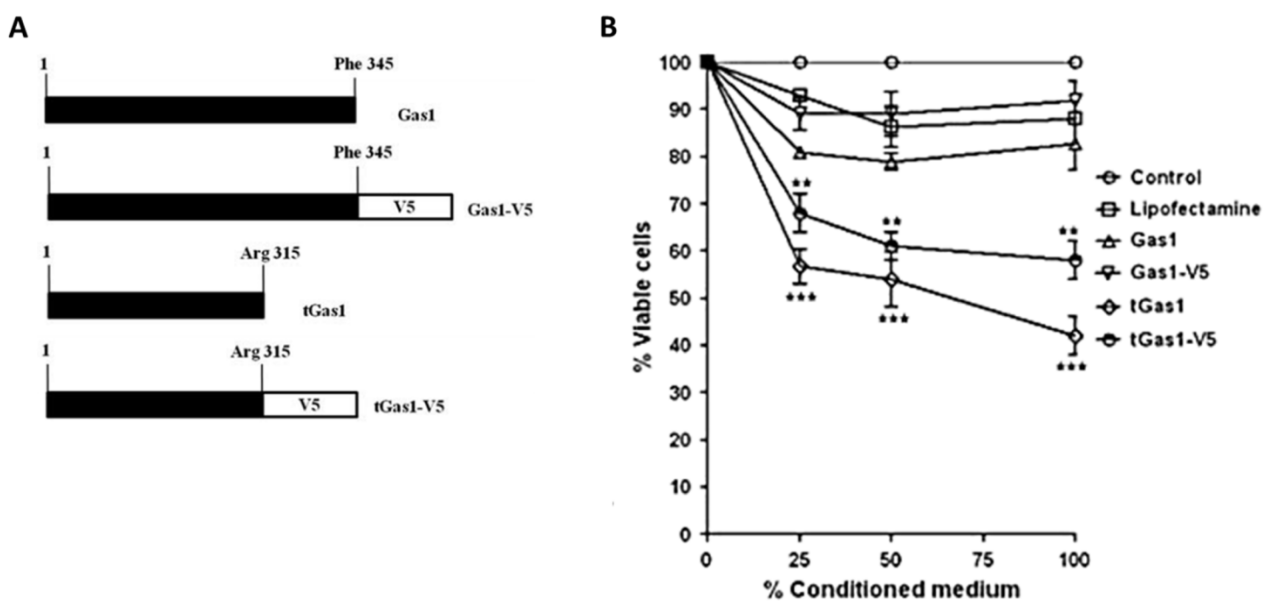


Figura 1.5: Efecto paracrino de tGas1 en células C6 de glioblastoma murino. A) Representación esquemática de las formas completa y truncada de Gas. La proteína completa abarca hasta la fenilalanina 345 (Gas1); la forma truncada llega solo hasta la Arginina 315 (tGas1), en el experimento se incluyeron dos proteínas de fusión con el epítipo V5 (Gas1-V5 y tGas1-V5). B) El tratamiento de las células C6 con distintos volúmenes de medio de cultivo condicionado conteniendo tGas1, (25%, 50%, 75% y 100%) reduce la viabilidad celular en comparación con el control. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Tomado de López-Ornelas et al 2011).

GAS1, cáncer de mama.

La participación de Gas1 en tejido mamario ha sido descrita en procesos fisiológicos, como es, su expresión en las células secretoras de la mamas que entran en apoptosis durante el proceso de la involución de la glándula mamaria, durante el cual la expresión de Gas1 aumenta alrededor de 3 veces en las células apoptóticas (Jaggi et al 1996, Bielke et al 1998, Seol et al 2005).

Por otro lado, alteraciones en la expresión de Gas1, así como en los componentes de la vía de señalización de RET, también han sido observadas en cáncer de mama. Se ha encontrado que GAS1 es regulado a la baja en las metástasis del cáncer de próstata y mama, y además el "knockdown" de Gas1 incrementa la habilidad metastásica de las células del cáncer de mama de ratón para colonizar el pulmón, después de su inyección en la cola del ratón (Gobeil et al., 2008).

En otros estudios, mediante un ensayo de tirosina cinasas, RET fue detectado en el cáncer de mama (Meric et al 2002). También, a través de microarreglos realizados en tumores de mama invasivos, se detectó la sobreexpresión de RET y GFR α 1 en un subgrupo de tumores positivos a estrógenos, y se observó que la estimulación con GDNF de la línea celular del cáncer de mama positiva a RE, MCF-7, aumentó la proliferación celular y promovió la cicatrización (Esseghir et al 2007). En otros experimentos realizados también en las líneas celulares de cáncer de mama positivas a ER, MCF-7 y T47D, GDNF incrementó la proliferación independiente del anclaje en una manera dependiente de RET, mostrando que la señalización de RET es funcional en las células del tumor de mama positivas ER (Boulay et al 2009).

Más recientemente Morandi y colaboradores han considerado a RET como un importante blanco terapéutico en el tratamiento de los tumores de mama, ya que se ha observado que es capaz de promover el desarrollo tumoral *in vivo* utilizando variantes oncogénicas de RET, además de que estas disminuyen la sensibilidad al tratamiento con tamoxifen (Morandi et al 2011).

De acuerdo con estos datos se encontró que RET podía activar a ER por fosforilación en S118/167 a través de la activación de mTOR en células MCF7 y T47D. Observándose que GDNF incrementa la proliferación, la sobrevivencia, la fosforilación de ER en S118/167, y además que el estradiol puede aumentar la expresión de RET en dichas células (Stine et al 2011).

Estudios recientes han destacado la participación ARTN de forma muy importante en el cáncer de mama. Por mencionar algunas observaciones, se ha demostrado que la expresión forzada de ARTN en las células del cáncer de mama induce el incremento en el crecimiento, la migración y la invasión. Así mismo, ARTN induce resistencia al tamoxifen en modelos de cáncer de mama positivos para la expresión de ER. Por otro lado, en modelos de cáncer de mama triple negativo promueve la angiogénesis (Kang et al 2009, 2010, Banerjee et al 2012). Se tratara más afondo sobre este ligado en la siguiente sección.

Tomando en cuenta los datos antes mencionados, en nuestro grupo de trabajo examinamos si la sobreexpresión de *GAS1* en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 Y MDA MB 231 conducía a algún efecto en estas. A través de vectores plasmídicos conteniendo el gen de *GAS1* tanto en su forma completa como sin la secuencia de unión al ancla GPI, es decir, su forma secretable al medio de cultivo (t*GAS1*) se evaluó la expresión forzada de *GAS1* sobre la viabilidad y proliferación de las líneas celulares antes mencionadas.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de las líneas celulares tumorales con estos vectores mostraron que *GAS1* es capaz de reducir el número de células viables en ambas líneas celulares. Tanto la forma completa como truncada de *GAS1* (*GAS1* y t*GAS1*, respectivamente), disminuyeron significativamente la viabilidad celular a partir de las 72 h del inicio del tratamiento en comparación con los controles (Fig. 1.6; Jiménez Hernández, 2009).

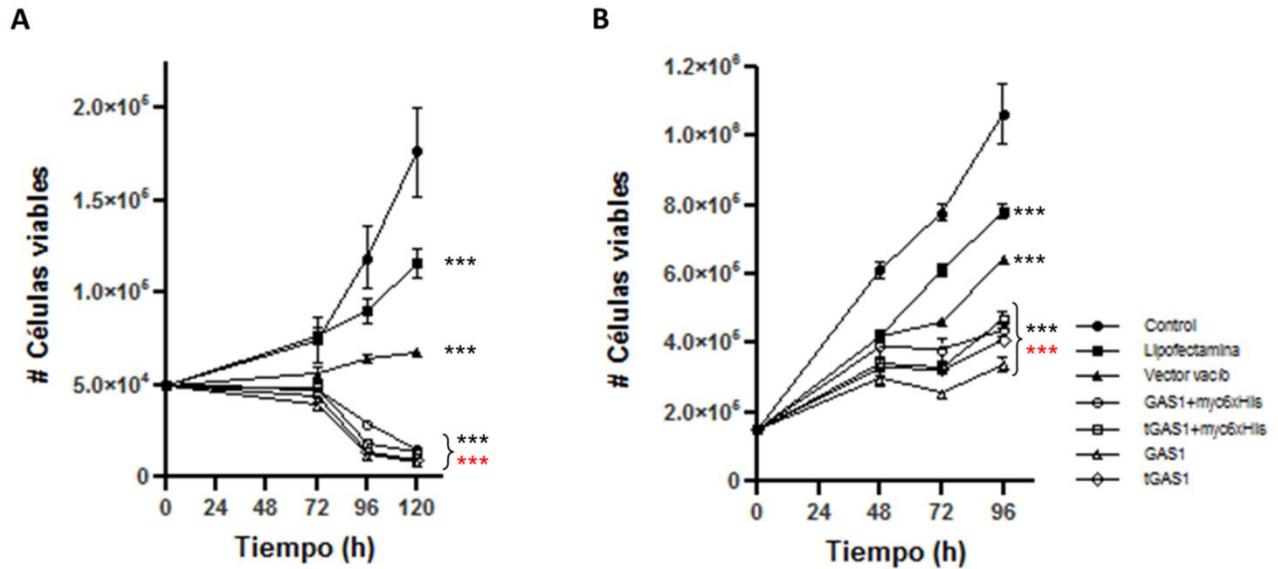


Figura 1.6: La sobre expresión de GAS1 reduce la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer de mama. A) Las células MDA MB 231 se transfectaron con vectores plasmídicos conteniendo GAS1 o tGAS1 fusionados o no a un epítipo myc y a una secuencia de polihistidinas. B) Las células MCF7 se transfectaron con vectores plasmídicos conteniendo GAS1 o tGAS1 fusionados o no a un epítipo myc y a una secuencia de polihistidinas (Tomado de Jiménez Hernández, 2009). *** $P < 0.001$ vs el control, *** $P < 0.001$ vs el vector vacío.

También nos preguntamos si GAS1 podía alterar la proliferación de estas dos líneas celulares, así que se cuantificó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). Con esto se encontró que GAS1 fue capaz de disminuir la incorporación de BrdU en ambas líneas celulares, teniendo el mayor efecto las formas completa y truncada de Gas1 sin los epítipos que se adicionaron a la secuencia para la identificación de la proteína exógena (Fig. 1.7; Jiménez Hernández, 2009).

Los resultados anteriores junto con lo descrito en la literatura destacan que GAS1 puede tener un papel importante en el tratamiento de los tumores mama, por lo que es relevante ampliar la investigación sobre la participación de esta proteína en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y así conocer sus alcances terapéuticos.

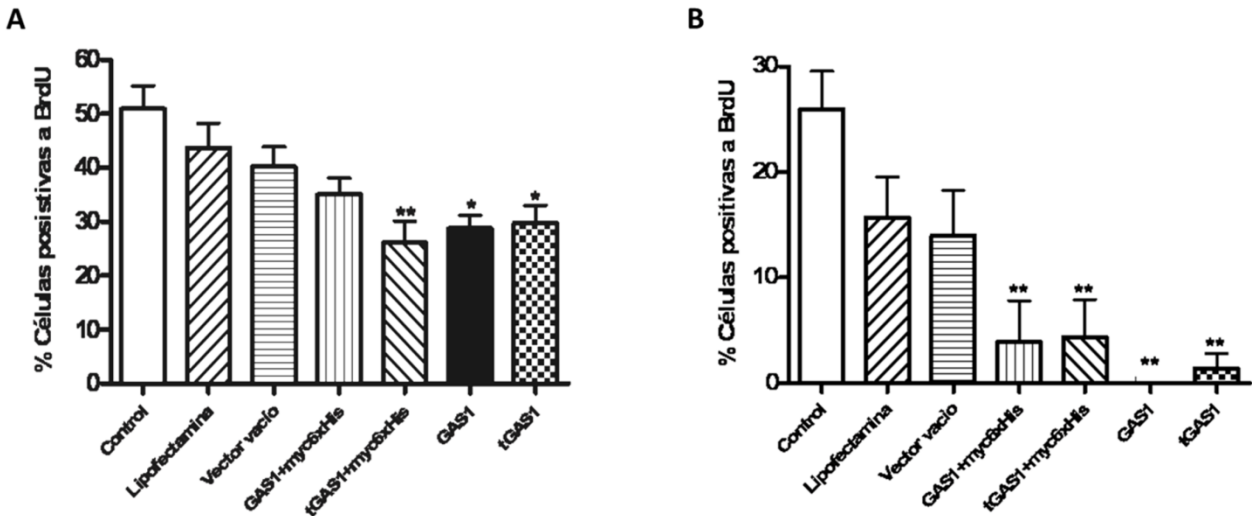


Figura 1.7: La sobre expresión de GAS1 reduce la incorporación de BrdU en las líneas celulares de cáncer de mama. A) Las células MDA MB 231 se transfectaron con vectores plasmídicos conteniendo GAS1 o tGAS1 fusionados o no a un epítipo myc y a una secuencia de polihistidinas. B) Las células MCF7 se transfectaron con vectores plasmídicos conteniendo GAS1 o tGAS1 fusionados o no a un epítipo myc y a una secuencia de polihistidinas (Tomado de la tesis de maestría de Adriana Jiménez Hernández). *P<0.05, **P<0.01 vs el control.

1.5 Artemina (ARTN)

La Artemina (ARTN) es un miembro de los ligandos de la familia de GDNF (GFLs) que se ha relacionado con la sobrevivencia de neuronas periféricas y dopaminérgicas. La ARTN se une al co-receptor $GFR\alpha3$ conduciendo a la activación de RET, pero alternativamente puede interactuar con $GFR\alpha1$ aunque con menor afinidad (Baloh et al 1998, Sariola et al 2003).

La activación de RET por estos ligandos conlleva a proliferación y sobrevivencia, y este es el papel más descrito de los GFLs. Sin embargo, estos también pueden señalar de forma independiente de RET. Se ha reportado la interacción de GDNF, NRTN y ARTN con el proteoglicano sindecan-3 induciendo la activación de Src y el crecimiento de neuritas (Bespalov et al 2011). También, se ha reportado la capacidad de unión de los GFLs y $GFR\alpha$ s a la molécula de adhesión NCAM, cuya unión permite la activación de otra cinasa de la familia de Src, Fyn (Sariola et al 2003).

Con referencia a la ARTN, se ha demostrado que puede señalar tanto de forma dependiente como independiente de RET (a través de NCAM) en neuronas periféricas sensoriales, en las cuales induce la activación de ERK, PI3K y Fyn (Schmutzler et al 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la ARTN se involucra preferentemente con las vía se señalización MEK/ERK y no con PI3K para promover la sobrevivencia celular durante la preimplantación en el desarrollo embrionario (Li et al 2009).

ARTN y cáncer

Recientemente la participación de la ARTN en la progresión de distintos tipos de cáncer ha sido descrita. Tanto la ARTN como GFR α 3 y RET son expresados en adenocarcinoma ductal de páncreas y se ha relacionado con la invasión neuronal de este tipo de cáncer (Ceyhan et al 2006).

En otros estudios realizados en cáncer de endometrio se determinó un incremento en la expresión de ARTN en tejido canceroso en comparación con endometrio normal. Además la expresión forzada de ARTN en células derivadas de este cáncer indujo crecimiento tumoral, migración e invasión y por el contrario la eliminación de la ARTN redujo algunas de sus características oncogénicas (Pandey et al 2010).

En diversos tipos de cáncer de pulmón también se detectó un incremento en la expresión tanto de la ARTN como de GFR α 3. Al igual que en los experimentos realizados en cáncer de endometrio, la sobreexpresión de la ARTN en células de cáncer de pulmón indujo incremento en el volumen tumoral, invasión y metástasis asociadas a un incremento en la expresión de TGFB1 y BCL2 (Tang et al 2010). Así mismo se encontró una mayor expresión de ARTN en líneas celulares de cáncer de esófago, en las cuales la reducción de los niveles de expresión mediante un siRNA contra la ARTN redujo la migración e invasión (Li et al 2011).

La participación de la ARTN en la progresión de cáncer de mama ha sido más ampliamente estudiada. En un estudio realizado con muestras de carcinoma mamario se detectó la presencia de la proteína en alrededor del 65% de estas, lo que se relacionó con una disminución en la supervivencia de las pacientes. En el mismo estudio, también se demostró la expresión de ARTN en varias líneas celulares de cáncer de mama. La sobreexpresión de ARTN aumenta la proliferación, migración e invasión tanto *in vitro* como *in vivo*; características que se ven reducidas cuando se interfiere la expresión de ARTN (Kang et al 2009).

Posteriormente, se reportó el incremento en la expresión de ER debido a ARTN en células de cáncer de mama positivas para la expresión a ER, induciendo de esta forma la resistencia a tamoxifen y fulvestrant mediada por un aumento en la expresión de BCL2 (Kang et al 2010).

El papel de la ARTN en cáncer de mama negativo para la expresión de ER también ha sido estudiado. La expresión de ARTN en células de cáncer de mama negativas a ER aumenta su proliferación y promueve la transmigración de estas a través de una barrera de célula endoteliales indicando un papel importante para ARTN en el proceso metastásico en este tipo de cáncer (Banerjee et al 2011).

La participación de la ARTN en el desarrollo de metástasis se ha relacionado con la inducción de la angiogénesis en los tumores. Se ha demostrado que la ARTN ejerce de forma paracrina proliferación, migración y formación de estructuras tubulares que asemejan el desarrollo de vasos sanguíneos en células endoteliales microvasculares cuando es secretada por células de cáncer de mama negativas para ER. Este proceso se relaciona con un aumento en la activación de AKT y la consecuente expresión del factor de transcripción TWIST1 y de VEGF-A, relacionados directamente en el desarrollo de angiogénesis (Benerjee et al 2012).

1.6 ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)

Las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) forman parte de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). ERK1 y ERK2 presentan un 84% de identidad y comparten muchas funciones, por lo que generalmente se refiere a estas como ERK1/2. Estas cinasas modulan la transcripción, progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación, muerte celular, adhesión celular y migración entre otros procesos (Ramos et al 2008).

Las MAPKs son activadas por diversos estímulos a través de receptores para factores de crecimiento, integrinas y receptores acoplados a proteínas G. La cascada de señalización más comúnmente descrita para las MAPKs, es iniciada por factores de crecimiento que al interaccionar con sus receptores tirosina cinasa en la membrana celular inducen su activación, y el subsecuente reclutamiento de proteínas de andamiaje como Grb2 que a su vez recluta en la membrana al factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS, que a su vez induce la activación de la GTPasa Ras para permitir la activación secuencial de las cinasas Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y ERK (MAPK), esta última conduce a la activación de factores de transcripción como c-Jun, c-Myc y HIF1 α (Fig. 1.8; Ramos et al 2008, Chetram et al 2012, Neuzillet et al 2013).

ERK1/2 y cáncer

Como se mencionó antes, ERK1/2 induce la activación de factores de transcripción como c-Myc, que regulan la transcripción de genes que promueven el desarrollo del cáncer. Por otra parte, la constante activación de proteínas río arriba de la señalización de ERK1/2 como EGFR, (Epidermal Growth Factor Receptor), o mutaciones activadoras en oncogenes como B-Raf llevan a la activación constitutiva de ERK y ocasionan la generación de tumores (Chetram et al 2012).

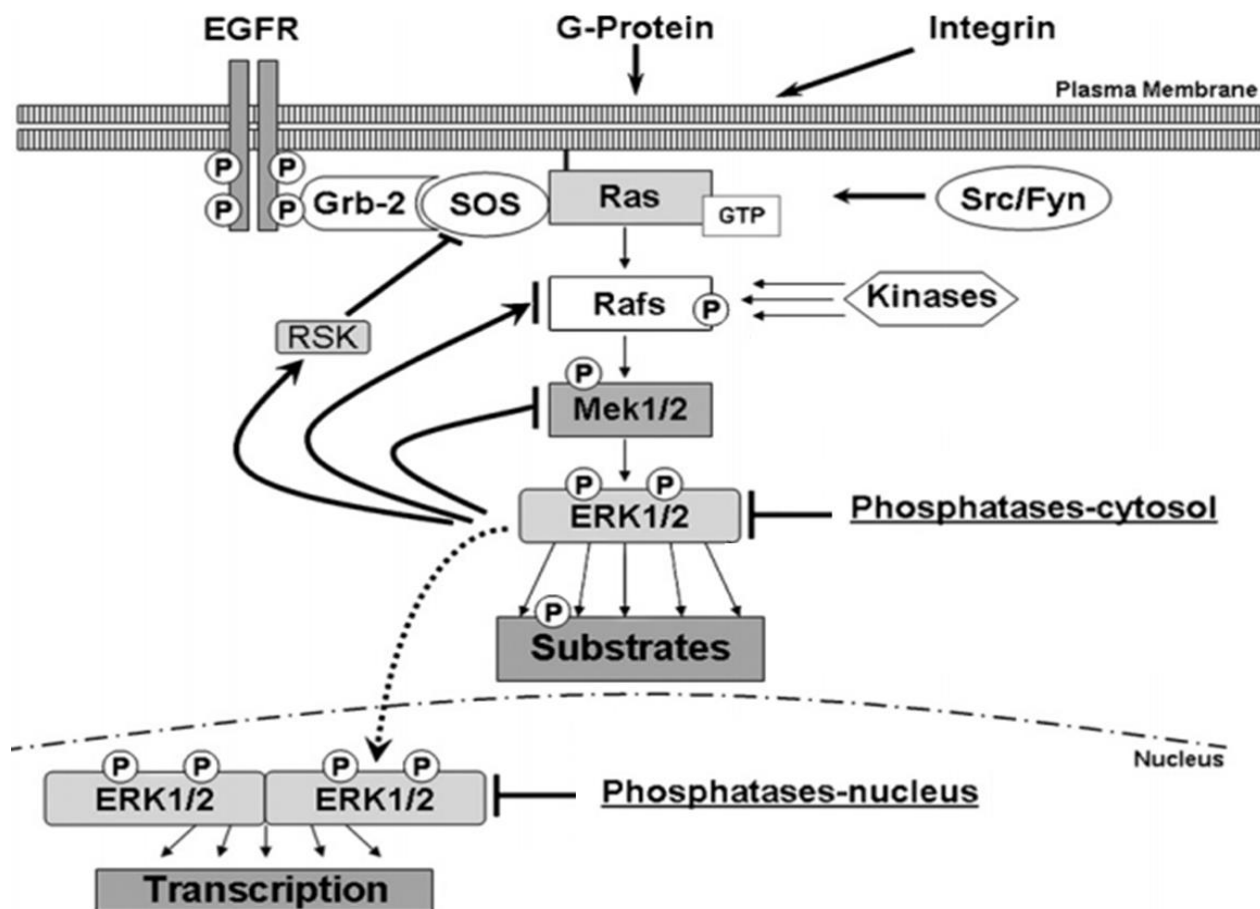


Figura 1.8: Cascada de señalización de las MAPK a través de la activación de receptores tirosina cinasa como EGFR. Ras también puede ser activada por cinasas de la familia de Src. ERK puede activar la cinasa RSK la cual funciona como asa de regulación negativa por inhibición de SOS. Fosfatasas presentes en el citosol y el núcleo celular puede regular negativamente la activación de ERK. Alternativamente las MAPKs pueden ser activadas por receptores acoplados a proteínas G e integrinas (Modificado de Ramos et al 2008).

En el cáncer de páncreas se han encontrado mutaciones en Ras, que conducen a su activación y por lo tanto la sobre-activación de la vía Ras/ERK, induciendo cambios en la expresión de genes asociados con la regulación del ciclo celular, proliferación, sobrevivencia, migración y angiogénesis determinantes en desarrollo y progresión del cáncer (Neuzillet et al 2012).

Por otro lado, se han propuesto nuevos mecanismos a través de los cuales la señalización de ERK induce tumorigénesis, como es la activación de BCL2, cuya inhibición mediante el bloqueo de MEK induce apoptosis en cáncer pancreático (Balmano et al 2009).

Adicionalmente, se ha observado que tanto en diversos tipos de cáncer de mama como en modelos experimentales está implicada la señalización de ERK1/2. Por ejemplo, en alrededor del 30% de los cánceres de mama se encuentran mutaciones en esta vía de señalización. También, se ha observado que la sobreexpresión de blanco arriba de ERK como MEK1 provocan la transformación neoplásica de células de epitelio normal de mama (Whyte et al 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres y con frecuencia se diagnostica en un estado avanzado de la enfermedad, de lo que surge la importancia en el mejoramiento de las terapias usadas para combatirlo.

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de GAS1 para inhibir el crecimiento de gliomas, y también que su ausencia incrementa la habilidad metastásica del cáncer de mama. Adicionalmente se ha descrito que la presencia de ARTN y ERK tienen un fuerte papel en la progresión del cáncer de mama.

Lo anterior sugiere que la capacidad de GAS1 para detener el crecimiento tumoral puede mantenerse también en el cáncer de mama, y que esto puede darse a través de la interferencia con la señalización de ARTN y la activación de ERK.

3. HIPÓTESIS

- 1) Si GAS1 es una proteína involucrada en el arresto del ciclo celular y la apoptosis, la transferencia génica de células de cáncer de mama y tumores derivados a partir de estas con *GAS1* y *tGAS1* provocará la reducción de la viabilidad celular y del crecimiento tumoral.
- 2) Si GAS1 interfiere con la señalización de los GFLs y además ARTN se expresa en cáncer de mama, *tGAS1* podría bloquear la señalización de ARTN, lo que conllevaría a la disminución en la activación de blancos río debajo de la señalización, como lo es ERK.
- 3) Ya que se ha propuesto que ARTN participa en el desarrollo de angiogénesis en cáncer de mama ER-, el tratamiento con *tGAS1* en los tumores de mama bloqueará el efecto de ARTN, provocando la disminución de la angiogénesis tumoral.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la sobreexpresión de *GAS1* y *tGAS1* en la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA MB 231, así como en modelos *in vivo* derivados de la misma.

4.1 Objetivos específicos:

1. Sobreexpresar a través de un sistema regulable a *GAS1* y a su forma soluble (*tGAS1*) en las células MDA MB 231.
2. Evaluar el efecto de la sobreexpresión regulable de *GAS1* y *tGAS1* en la viabilidad de cultivos independientes de las células MDA MB 231.
3. Evaluar el efecto del medio condicionado conteniendo *tGAS1* en la viabilidad de las células MDA MB 231.
4. Determinar si *GAS1* y *tGAS1* pueden inducir arresto del ciclo celular y apoptosis en la línea celular MDA MB 231.
5. Determinar el efecto de *tGAS1* sobre la activación de ERK1/2 en presencia y ausencia de ARTN *in vitro* e *in vivo*.
6. Evaluar el efecto de *tGAS1* sobre el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de mama obtenido a partir de la células MDA MB 231.
7. Evaluar el efecto de *tGAS1* sobre la angiogénesis en un modelo *in vivo* de cáncer de mama obtenido a partir de la células MDA MB 231 e *in vitro* en células endoteliales.

5. METODOLOGÍA

5.1 Sistema de expresión

Para sobreexpresar a *GAS1* y *tGAS1* de forma regulable se utilizó el sistema TetOn ViraPower HiPerform Gateway Expression T-Rex System (Invitrogen). Este sistema consta de los siguientes plásmidos, uno de transferencia que albergará al transgén de interés, controlado a través de un promotor CMV fusionado a un elemento regulador del operador de tetraciclina (tetO), y un segundo plásmido que codifica a un elemento represor del operador de tetraciclina (TR). Estos vectores plasmídicos son transfectados en células empaquetadoras para la obtención de los virus que acarrearan el transgén y el elemento represor respectivamente. Para que el sistema funcione de forma regulable es necesario infectar las células con ambos virus, ya que estas producirán el TR que se unirá a la secuencia tetO reprimiendo la expresión del transgén. Para inducir la expresión del transgén se requiere de la adición o administración de tetraciclina, la cual tiene afinidad por TR uniéndose a él y liberando la secuencia tetO, de esta forma, quedando activa la transcripción del transgén (Fig. 5.1).

5.2 Construcción de los vectores de expresión

La secuencia codificante de *GAS1* se amplificó por PCR utilizando los iniciadores 5' CACCGCGATGGTGGCCGC 3' conteniendo la secuencia CACC para la clonación dirigida en el vector pENTRTOPO y 5'GACGAACCCGGCGAGAAAATT 3'. El producto de PCR se purificó y clonó en el vector pENTR/DTOPO (Invitrogen) para obtener la clona de entrada pENTR/DTOPO-*GAS1* que se seleccionó y purificó mediante miniprep. Posteriormente, en una reacción catalizada por la enzima LR Clonase II (Invitrogen), la clona pENTR/DTOPO-*GAS1* se recombinó con el vector pLenti6.3/TO/V5-DEST (ViraPower HiPerform Gateway Expression T-Rex System, Invitrogen) para obtener el vector pLenti6.3/TO/V5-*GAS1*.

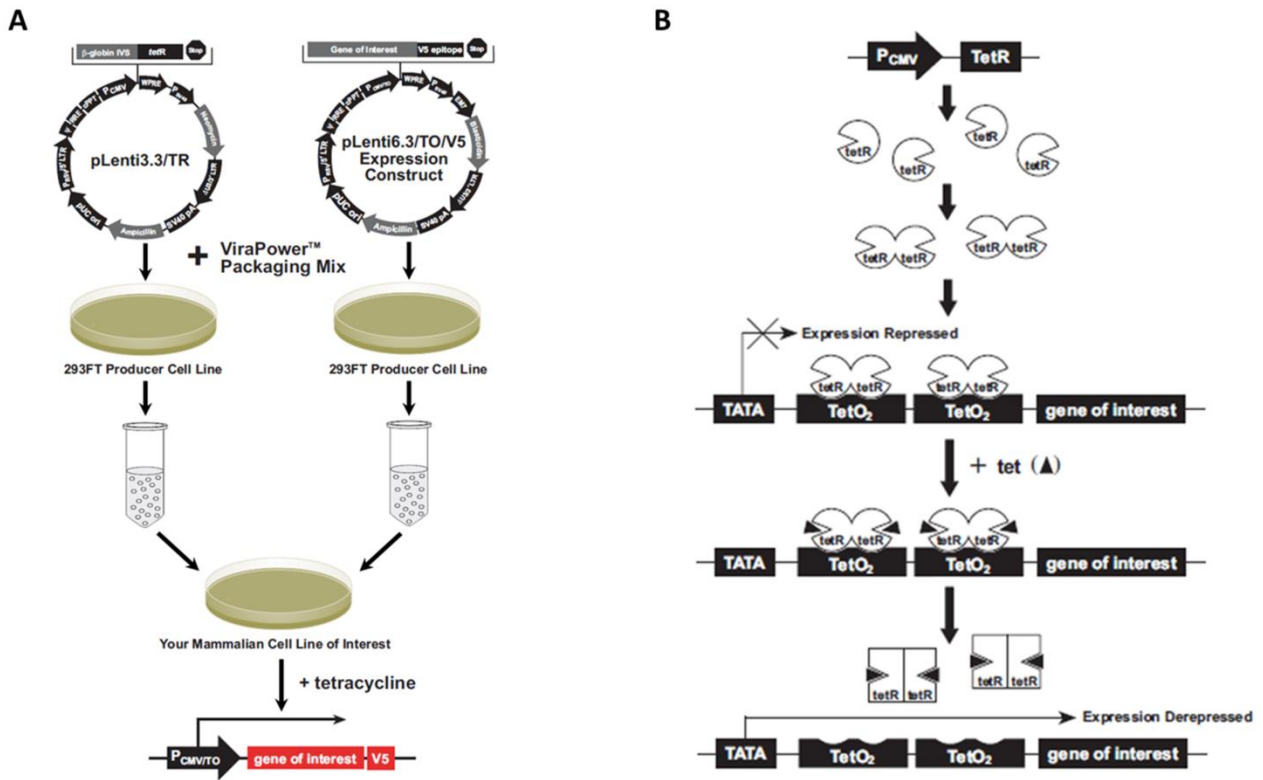


Figura 5.1: Sistema de expresión regulable TetOn. A) A través de los vectores pLenti3.3/TR y pLenti6.3/TO/V5-DEST se obtienen los virus para el elemento represor y el transgén de interés respectivamente, con los que al co-infectar las células de estudio se establece el sistema regulable TetOn. B) El elemento represor codificado por los virus TR mantiene la represión del transgén, la cual es activada por adición de tetraciclina (Tomado de ViraPower HiPerform Gateway Expression T-Rex System, Invitrogen).

Para obtener el vector pENTR/DTOPO-tGAS1, la secuencia codificante de GAS1 se amplificó por PCR hasta la arginina 315, antes del anclaje GPI (López-Ornelas 2011), utilizando el mismo iniciador sentido y el siguiente iniciador antisentido 5' CCCGGACCCGCGTCCATT 3', obteniendo la clona de entrada pENTR/DTOPO-tGAS1 que se recombinó con el vector pLenti6.3/TO/V5-DEST para obtener el vector pLenti6.3/TO/V5-tGAS1. De la misma forma usando los iniciadores 5' CACCATGGT GAGCAAGGGC 3' y 5' TTA CTTGTACAGCTCGTCCA 3' para amplificar la secuencia codificante para la proteína EGFP (enhanced green fluorescent protein) se construyó el vector pLenti6.3/TO/V5-EGFP que fue utilizado como control (Fig. 5.2).

Los lentivirus fueron titulados infectando las células MDA MB 231 con diluciones seriadas de estos y seleccionado las colonias infectadas a través de la resistencia adquirida al antibiótico específico, 5 μ g/mL de blasticidina (Invitrogen) para los lentivirus GAS1, tGAS1 y EGFP, y 500 μ g/mL de geneticina (GIBCO) para los lentivirus TR. Las colonias resistentes al antibiótico fueron teñidas con cristal violeta y contadas, tomando en cuenta que cada colonia resistente representaba su infección con una partícula viral y las diluciones de los lentivirus fueron realizadas en un volumen de 1 mL, el título viral fue expresado como el número de partículas virales por mililitro (pv/mL).

5.4 Obtención de las clonas MDA de expresión regulable

Como ya se ha mencionado, se ha reportado que la ausencia de GAS1 incrementa la habilidad metastásica en cáncer de mama de ratón y que además la ARTN tiene un papel importante en el desarrollo de angiogénesis en cáncer de mama ER-. Esto, nos llevó a utilizar como modelo *in vitro* de cáncer de mama a la línea celular MDA MB 231, ya que no expresa a ER y presenta características metastásicas.

Para obtener las clonas estables de expresión regulable para GAS1, tGAS1 y EGFP, las células MDA MB 231 fueron infectadas con los lentivirus elemento represor (TR) obtenidos de la transfección en las células HEK293FT con el vector pLenti3.3/TR, y seleccionadas usando 500 μ g/mL de geneticina. Una vez obtenida la línea celular estable para TR, MDA-TR, se procedió a una segunda infección con los lentivirus GAS1, tGAS1 o EGFP, obtenidos de la transfección de las células HEK293FT con los vectores pLenti6.3/TO/V5-GAS1, pLenti6.3/TO/V5-tGAS1 y pLenti6.3/TO/V5-EGFP respectivamente. Las células que incorporaron los lentivirus correspondientes fueron seleccionadas con 5 μ g/mL de blasticidina para obtener las clonas MDA-GAS1, MDA-tGAS1 y MDA-EGFP respectivamente. La expresión regulable de GAS1, tGAS1 y EGFP fue determinada por RT-PCR, *western blot* e inmunocitoquímica.

Para obtener la clona MDA-EGFP de expresión constitutiva, las células MDA MB 231 sin expresión del elemento represor, fueron infectadas con los lentivirus pLenti6.3/TO/V5-EGFP y seleccionadas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de blasticidina. La expresión constitutiva de EGFP se determinó por inmunofluorescencia.

5.5 Ensayo de viabilidad celular

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de GAS1 y tGAS1 en la viabilidad celular, se sembraron 30,000 células MDA MB 231 silvestres (MDA-WT) y de las clonas MDA-GAS1, MDA-tGAS1 y MDA-EGFP en cajas de cultivo de 24 pozos. Al día siguiente las células fueron tratadas con medio de cultivo conteniendo o no 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina (Invitrogen). Después de 72 h de incubación, las células fueron levantadas de los platos utilizando tripsina y resuspendidas para cuantificar la viabilidad celular mediante la técnica de azul de tripano. Se contaron tanto las células vivas (refringentes) como las muertas (permeables al azul de tripano) en cada condición.

5.6 Efecto de tGAS1 en el medio condicionado

Estudios previos han demostrado la capacidad de tGAS1 para disminuir la viabilidad celular de forma paracrina en gliomas (López-Ornelas et al 2011), por lo que se decidió probar si esto también podía ocurrir en las células de cáncer de mama. Para probar el efecto paracrino de tGAS1, se sembraron células MDA-WT y MDA-tGAS1 en platos de cultivo p60 y al día siguiente fueron expuestas a medio de cultivo con o sin 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina. 72 h después, el medio de cultivo de cada condición fue cosechado, centrifugado y filtrado, para ser adicionado a cultivos independientes de células MDA-WT sembrados en cajas de cultivo de 24 pozos. Después de 72 h de incubación con el medio condicionado, la viabilidad celular fue determinada usando la técnica de azul de tripano.

Como control adicional, tGAS1 en el medio de cultivo de células MDA-tGAS1 fue inmunoprecipitado para eliminar esta proteína del medio y corroborar que esta es la responsable del efecto en la viabilidad celular.

5.7 Inmunoprecipitación de tGAS1 del medio condicionado

Se recolectó el medio de cultivo de las células MDA-tGAS1 en ausencia o presencia de tetraciclina durante 72 h. Posteriormente el medio fue centrifugado, filtrado e incubado por 3 h con 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de proteína A agarosa (Roche) a temperatura de 2 a 8 °C para su clarificación. Luego, el medio de cultivo fue centrifugado durante 1 min a 12,000xg a 4 °C, y transferido a tubos limpios para adicionar 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo primario contra GAS1 humano (ProScience, Poway, CA) o del anticuerpo primario contra NMDA ϵ 1 (Santa Cruz), este último como control de proteína no relacionada. Después de 1 h de incubación se adicionaron 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de proteína A agarosa y el medio se incubó durante toda la noche a temperatura de 2 a 8 °C. Posteriormente, el medio fue centrifugado 1 min a 12,000xg a 4 °C para retirar la proteína A agarosa.

La proteína A agarosa recuperada en el último paso fue resuspendida en *buffer* de corrida y desnaturalizada a 100 °C durante 5 min, esto para permitir la separación de la proteína de estudio del complejo con la proteína A agarosa y el anticuerpo correspondiente. Las proteínas obtenidas del medio condicionado fueron separadas en un gel SDS-PAGE para su identificación por *western blot*.

Finalmente el medio del cual se inmunoprecipitó tGAS1 se filtró en condiciones de esterilidad para ser agregado como medio condicionado a los cultivos de las células MDA-WT y determinar la viabilidad celular como se describe en el ensayo de medio condicionado.

5.8 Activación de ERK1/2 por el tratamiento con tGAS1 y ARTN

Para conocer si tGAS1 podía afectar la activación de ERK a través de ARTN, se midió la fosforilación de ERK1/2 en las células MDA-tGAS1 en cuatro condiciones: 1) en ausencia de tGAS1 (control), 2) en presencia de tGAS1 (tGAS1), 3) en ausencia de tGAS1 y presencia de ARTN (ARTN) y 4) en presencia de tGAS1 y presencia de ARTN (tGAS1+ARTN). Para esto, las células MDA-tGAS1 fueron incubadas con medio de cultivo con o sin 2 μ g/mL de tetraciclina para inducir la expresión de tGAS1 o mantenerla reprimida, respectivamente. Después de 24 h de incubación, las células sembradas para las condiciones 3 y 4 recibieron 10 ng/mL de ARTN humana recombinante (450-17, PEPROTECH). Tras 24 h más de incubación, las células de las cuatro condiciones fueron cosechadas para extraer proteína y analizar la fosforilación de ERK1/2 por *western blot*.

5.9 RT-PCR

La extracción del ARN total se realizó utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente 5 μ g de ARN total fueron tratados con una unidad de DNAsa (New England BioLabs) a 37 °C durante 10 min, y convertidos a ADNc usando la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) para luego realizar la PCR. Para amplificar GAS1 se usaron los iniciadores 5' ACGCAGGCCTCGAGCAGCTTG 3' y 5' CTGTGCCTGCTGCTGGCGATGC 3' con una temperatura de alineamiento de 63 °C. Para amplificar β -actina se usaron los iniciadores 5' TGGCACCACACCTTCTACA 3' y 5' TCACGCACGATTTCCC 3', con una temperatura de alineamiento de 55 °C. Para determinar la expresión RET se usaron los iniciadores 5'CTGGTGAGGCG GTACACAA 3' y 5' CAGGTGGAGAAGTTCCTGGTC 3', con una temperatura de alineamiento de 58 °C. Finalmente, para determinar la expresión ARTN y GFR α 3 se usaron los iniciadores y las temperaturas de alineamiento previamente reportados por Kang en 2009.

5.10 Western blot

La extracción de proteínas se realizó utilizando *buffer* de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. Para las determinaciones, 25 μg de proteína por condición fueron corridos en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bisacrilamida, y transferidos a membranas de PVDF (BioRad), las cuales fueron incubadas durante 1 h con solución de bloqueo conteniendo 5% de leche descremada y 1% de BSA en TBS con 0.1% de Tween-20 (Merk). Las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios contra GAS1 humano (1:2000, ProScience, Poway, CA), actina (1:5000, García-Tovar et al 2001), GFP (1:1000 Millipore), ERK1/2 y pERK1/2 (1:2000 Cell Signaling), AKT (1:1000, Santa Cruz) y pAKT (1:2000, Santa Cruz) diluidos en la solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron lavados con TBS/Tween-20 0.1% y las membranas fueron incubadas durante 1 h con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (1:5000, Invitrogen) diluidos en solución de bloqueo, seguido de lavados con TBS/Tween-20 0.1%. La presencia de las proteínas se reveló por quimioluminiscencia (Perkin Elmer). Las imágenes fueron capturadas usando el sistema UVP BioImaging y el *software* LabWorks Image Acquisition and Analysis (UVP, Inc. Upland, CA).

5.11 Análisis del ciclo celular

Las células MDA-WT, MDA-EGFP, MDA-GAS1 y MDA-tGAS1 fueron incubadas con medio de cultivo en presencia o ausencia de tetraciclina durante 72 h. Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS frío y fijadas con etanol al 70% a 4 °C durante toda la noche. Después, las muestras fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas en una solución con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (SIGMA) y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa (Sigma) en PBS con 0.1% de Triton X-100 (SIGMA), e incubadas por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. La fluorescencia a 570 nm se midió usando un equipo FACS Calibur (Becton Dickinson).

5.12 Inmunofluorescencia

Para determinar la presencia de GAS1, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (PFA), lavadas con PBS, permeabilizadas con PBS/Triton X-100 0.2% por 10 min y bloqueadas con PBS/BSA 1% durante 1 h. Posteriormente fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo anti-GAS1 humano (1:500, ProScience, Poway, CA), seguido de lavados con PBS e incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen) durante 2 h. De nuevo se realizaron lavados con PBS y las células fueron contrateñidas con DAPI (Vector). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 acoplado a una cámara CoolSNAP-Procf Color y con el programa Image-Pro PLUS (Media Cybernetics, Inc.).

Para determinar la presencia de VEGF, las células fueron incubadas con solución de bloqueo PBS/Tween-20 0.01% conteniendo BSA 3% y SNC 2% por 30 min, y luego incubadas toda la noche con el anticuerpo anti-VEGF (1:50, Santa Cruz) diluido en la solución de bloqueo. Posteriormente, las células recibieron lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo TRITC (1:200, Vector) durante 2 h. De nuevo se realizaron lavados con PBS y las células se contrateñieron con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 acoplado a una cámara CoolSNAP-Procf Color y con el programa Image-Pro PLUS.

Para realizar la inmunohistoquímica de los tumores de mama MDA MB 231, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos con solución salina isotónica y posteriormente con PFA 4%, para proceder a extraer los tumores. Los tumores fueron cortados en rebanadas de 30 μm y estas fueron permeabilizadas con PBS/Triton X-100 0.2% por 10 min, bloqueadas con PBS/BSA 1% durante 1 h, e incubadas toda la noche con el anticuerpo anti-VE-cadherina (1:50, Santa Cruz). Luego recibieron lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo TRITC (1:100, Vector), seguido de lavados con PBS para ser contrateñidas con DAPI.

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica SP8 y el programa Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Microsystems). Para cuantificar el número de áreas positivas para VE-cadherina, los campos completos de 10-12 rebanadas por tumor fueron analizados, y cada vez que se encontró una marca de VE-cadherina esta fue considerada como un área positiva. Los resultados se expresaron como el porcentaje de áreas positivas/tumor.

5.13 Migración de células endoteliales *in vitro*

Para probar la capacidad de tGAS1 para reducir la migración de células endoteliales *in vitro* se emplearon cultivos primarios de endotelio de rata (Díaz-Coránguez et al 2013). Estos fueron sembrados a confluencia en cámaras de Boyden y expuestos a medio condicionado de células MDA-tGAS1 con o sin 2 µg/mL de tetraciclina, previamente centrifugado y filtrado. Después de 24 h de incubación, las células endoteliales adheridas en la membrana de las cámaras de Boyden se fijaron con PFA 4%, permeabilizaron con saponina 0.03% y tiñeron con azul de toluidina 1%. Para tomar en cuenta solo las células que migraron a la cara basal de la membrana, las células adheridas a la membrana por el lado en el cual se realizó el cultivo fueron retiradas usando un hisopo. Las células que migraron al lado basal de la membrana en cada condición se contaron usando microscopía de luz. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara CoolSNAP-Procf Color y usando el programa Image-Pro PLUS.

5.14 Modelos *in vivo* de tumores de mama

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la norma vigente NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y en concordancia con la Guía para el uso y cuidado de los animales de experimentación de The National Institutes of Health (NIH, EUA) y la normativa interna (CINVESTAV).

Los xenotransplantes heterotópicos se llevaron a cabo inoculando subcutáneamente 2×10^6 células MDA MB 231 en los flancos de los miembros inferiores de ratones hembra nu/nu de 6-8 semanas de edad. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 50 mm^3 , los animales fueron tratados intratumoralmente por 3 días (día 0, 2 y 4) con 2×10^6 pv (partículas virales) de los lentivirus tGAS1 o EGFP, o con medio sin suero. El crecimiento tumoral fue monitoreado continuamente y se calculó el volumen tumoral utilizando la fórmula $V = (D_{\text{max}})(D_{\text{min}})^2/(2)$; donde D_{max} y D_{min} representan los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. Finalmente, 15 días después del inicio del tratamiento los animales fueron sacrificados, y los tumores disecados, homogenizados y procesados para la extracción de ARN y proteína.

Los xenotransplantes ortotópicos se realizaron inoculando 2×10^6 células MDA MB 231 constitutivamente expresando la EGFP en las glándulas mamarias 4T y 5T de ratones hembra nu/nu de 6–8 semanas de edad. Se realizaron dos condiciones experimentales, una en la cual el tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 30 mm^3 simulando una etapa temprana de la enfermedad, y la otra en la cual se inició el tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 50 mm^3 simulando un estado más avanzado de la enfermedad. Los animales fueron tratados intratumoralmente por 3 días (día 0, 2 and 4) con 2×10^6 pv de los lentivirus tGAS1 o con medio de cultivo sin suero. El crecimiento tumoral fue monitoreado continuamente y 28 días después del inicio del tratamiento los animales fueron sacrificados y los tumores disecados para determinar la presencia de VE-cadherina.

5.15 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos de viabilidad celular, exposición al medio condicionado, fosforilación de ERK y migración de células endoteliales fueron analizados usando ANOVA de un factor y la prueba post hoc de Duncan. Los resultados de ciclo celular, expression de VE-cadherina y fosforilación de AKT fueron analizados usando la prueba de t de Student. Una $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Las pruebas fueron ejecutadas usando el programa SPSS.

Para analizar los resultados de crecimiento tumoral *in vivo*, los datos fueron considerados como series de tiempo con observaciones independientes, y fueron analizados usando un método de parcelas divididas que separa los datos en dos grupos, un grupo principal (el tratamiento) y un grupo secundario (tiempo). Un modelo anidado fue empleado de acuerdo a la siguiente ecuación: $Vol = A + B(A) + C + AC$, donde A es el factor tratamiento, B es la unidad experimental (ratón) y C es el tiempo, A y C son considerados como factores constantes y B es el factor anidado. Las pruebas de ANOVA y Duncan siguientes fueron ejecutadas con la variación del volumen tumoral en las subunidades (Error II). Una $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Las pruebas fueron ejecutadas usando el programa NCSS.

6. RESULTADOS

6.1 Construcciones lentivirales

Para obtener los vectores lentivirales primero se amplificaron por PCR las secuencias para GAS1, tGAS1 y EGFP, las cuales fueron purificadas y clonadas en el vector pENTR/DTOPO para obtener las clonas de entrada pENTR/DTOPO-GAS1, pENTR/DTOPO-tGAS1 y pENTR/DTOPO-EGFP. Mediante una reacción de recombinación entre las clonas de entrada y el vector pLenti6.3/TO/V5-DEST se obtuvieron los vectores lentivirales pLenti6.3/TO/V5-GAS1, pLenti6.3/TO/V5-tGAS1 y pLenti6.3/TO/V5-EGFP.

Estos vectores se analizaron mediante restricción para corroborar la integridad y orientación de los transgenes específicos. Para pLenti6.3/TO/V5-GAS1 y pLenti6.3/TO/V5-tGAS1 se utilizó la enzima *XhoI* que corta en los sitios 3258-3687 y 3259-3600, obteniéndose los fragmentos de 429 y 342 pb, respectivamente. Para pLenti6.3/TO/V5-EGFP se utilizó la enzima *EcoRV* que corta en los sitios 2527-3341, obteniéndose un fragmento de 813 pb (Fig. 6.1).

Una vez corroborada la integridad de los vectores se procedió a la transfección de estos en las células 293FT. Posteriormente, los lentivirus fueron titulados usando la resistencia al antibiótico adquirida por las células infectadas. El título viral obtenido fue de 2.6×10^7 pv/mL para los lentivirus GAS1, 14×10^7 pv/mL para los lentivirus tGAS1 y 1.5×10^7 pv/mL para los lentivirus EGFP.

6.2 GAS1 y tGAS1 reducen las células viables por detención del ciclo celular

Después de las infecciones con los lentivirus, se obtuvieron tres líneas celulares con un sistema Tet-On, que en respuesta a tetraciclina ($2 \mu\text{g} / \text{mL}$) expresan GAS1 (MDA-GAS1), tGAS1 (MDA-tGAS1) y EGFP (MDA-EGFP), como se demuestra por la expresión del ARNm y la proteína transgénicos (Fig. 6.2).

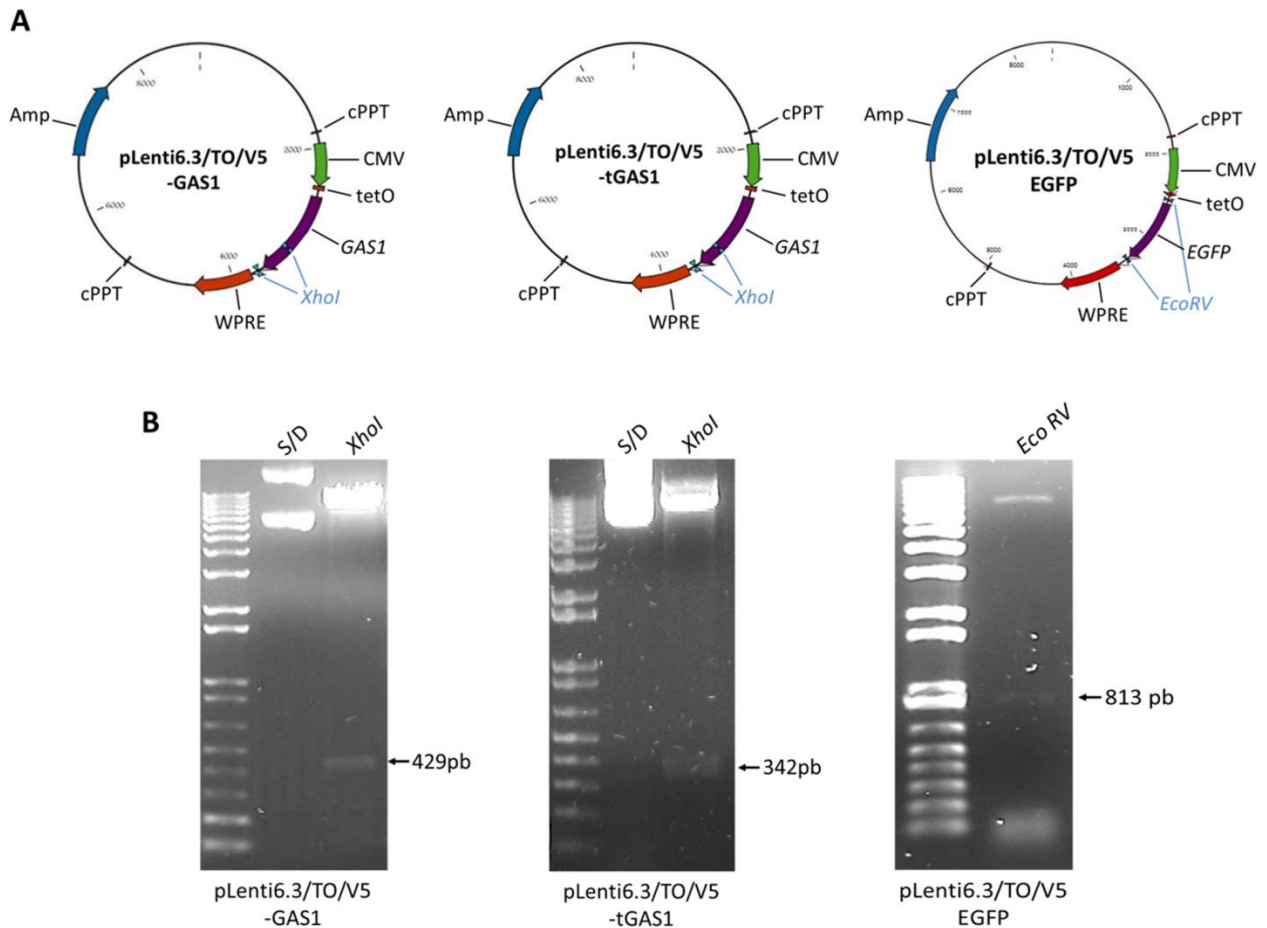


Figura 6.1: Análisis de los vectores lentivirales empleados. A) Diagramas representativos de los vectores pLenti6.3/TO/V5-DEST. B) Análisis de restricción con *XhoI* de los vectores pLenti6.3/TO/V5-GAS1 y pLenti6.3/TO/V5-tGAS1 obteniéndose los fragmentos de 429 y 342 pb, respectivamente, y con *EcoRV* para pLenti6.3/TO/V5-EGFP obteniéndose un fragmento de 813 pb.

Nuestro primer objetivo fue determinar si GAS1 y tGAS1 podrían afectar la viabilidad de la línea celular MDA MB 231 de cáncer de mama humano. Los resultados muestran que después de 72 h en presencia de tetraciclina, hubo una disminución en el número de células viables MDA-GAS1 y MDA-tGAS1 pero no de células MDA-EGFP. Además esta disminución fue mayor en las células MDA-tGAS1 con respecto a la observada en las células MDA-GAS1, indicando que tal vez la proteína soluble liberada al medio de cultivo ejerció su efecto sobre las células vecinas (Fig. 6.3).

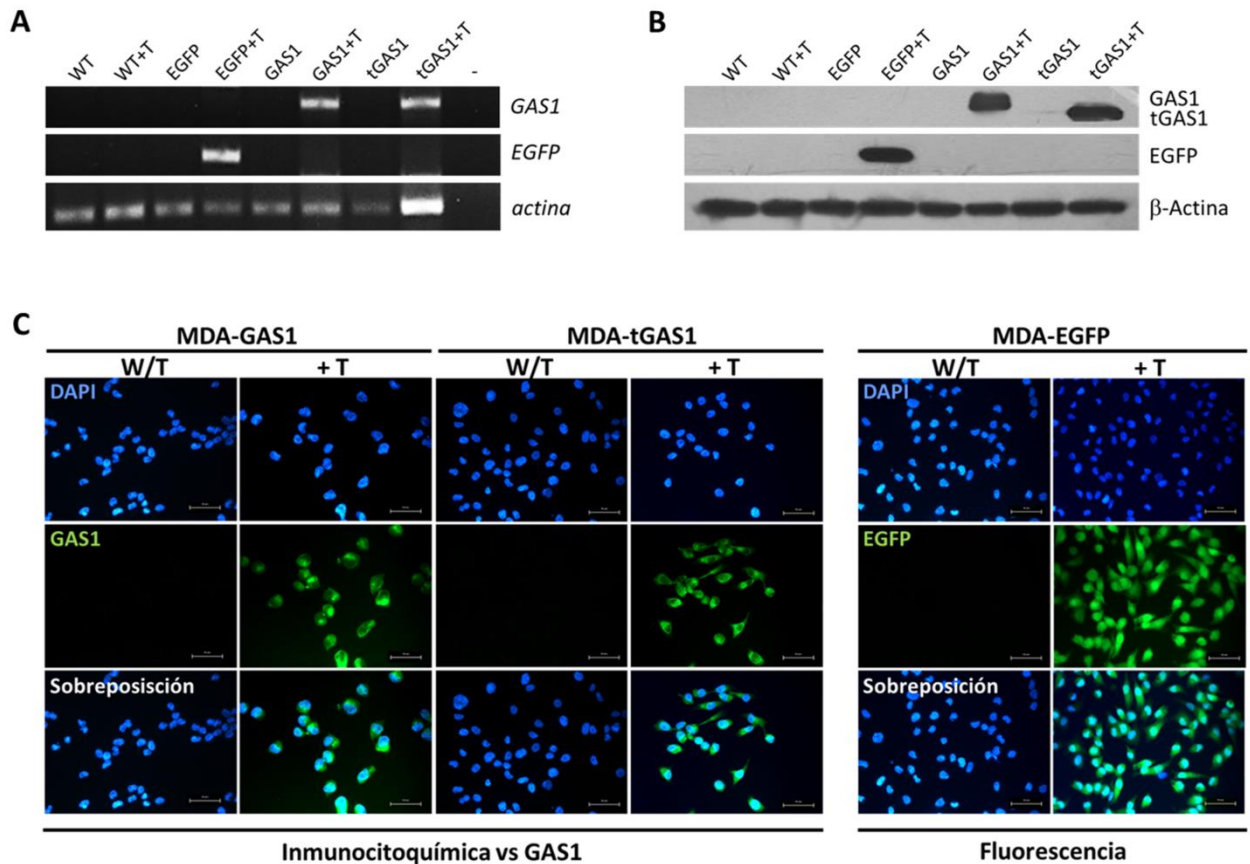


Figura 6.2: Expresión regulable de GAS1 y tGAS1 en las células MDA MB 231. A) Expresión de los transgenes a nivel de ARNm por RT-PCR, B) Determinación de la presencia de los transgenes nivel de proteína mediante *western blot*. C) Presencia de los transgenes determinada por inmunocitoquímica, en presencia (+T) y ausencia (W/T) de tetraciclina. WT: células MDA MB 231 silvestres, EGFP, GAS1 y tGAS1: células MDA MB 231 infectadas con los lentivirus ER+ EGFP, GAS1 o tGAS1. Escala 50 μ m.

En el ensayo de viabilidad celular también se observa que el número de células teñidas con azul de tripano, es decir, muertas, no se modifica en ninguno de los casos, tanto en ausencia como en presencia de tetraciclina. En estudios anteriores se ha encontrado que tanto GAS1 como tGAS1 reducen la viabilidad celular en gliomas y neuroblastomas a través de la inducción de apoptosis (López-Ornelas et al 2011, Zarco et la 2012), sin embargo aquí no se observó diferencia en la cantidad de células muertas cuando se sobreexpresó a GAS1 y tGAS1 en comparación con los controles. Esto sugiere, que tal vez, la disminución en la cantidad de células vivas observada con la sobreexpresión de GAS1 y tGAS1 se debe al arresto del ciclo celular como un efecto de GAS1 que también ya se ha descrito (Del Sal et al 1992).

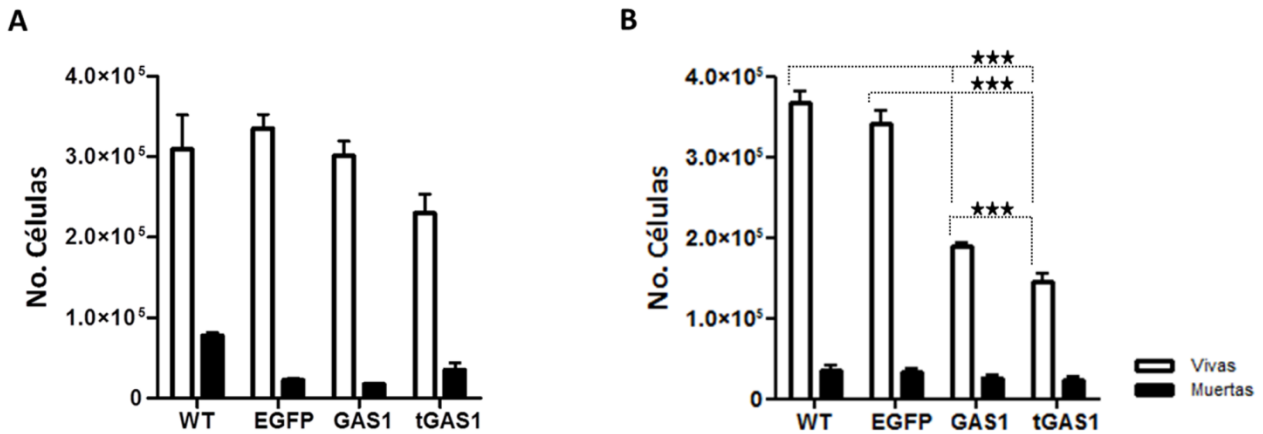


Figura 6.3: La sobreexpresión de GAS1 y tGAS1 disminuye el número de células viables. A) La viabilidad de las células MDA de expresión regulable no se modifica en comparación con las silvestres en ausencia de tetraciclina (n=3). B) Reducción en el número de células MDA-GAS1 y MDA-tGAS1 vivas tras la exposición a tetraciclina (n=4). ANOVA de un factor y Duncan post hoc *** P<0.001.

Para determinar si la reducción en la viabilidad de las células MDA-GAS1 y MDA-tGAS1 se debe a la detención del ciclo celular, se midió por citometría de flujo la incorporación de yoduro de propidio para determinar cambios en la proliferación celular. Los resultados muestran un aumento de la población de células en la fase G0/G1 y una reducción en las fases S y G2/M en las células MDA-GAS1 y MDA-tGAS1 tratadas con tetraciclina, indicando arresto del ciclo celular (Fig. 6.4).

Se sabe que las células MDA MB 231 no expresan GFR α 1 ni GDNF pero si expresan ARTN (Kang et al 2009), sin embargo, la presencia de GFR α 3, el receptor canónico de ARTN, no se ha descrito previamente en estas células. Por lo que se investigó la expresión de GFR α 3, y por medio de RT-PCR se encontró el ARNm de GFR α 3 en células MDA MB 231 (Fig. 6.5 A). Esto sugiere que tGAS1 puede estar interfiriendo con la señalización de ARTN en las células MDA MB 231, tal vez afectando la interacción ARTN-GFR α 3. También se observó, como se había descrito previamente (Boulay et al 2008), que las células MDA MB 231 no expresan RET (Fig. 6.5 B), por lo que el efecto de GAS1 y tGAS1 en estas células debe ser independiente de RET.

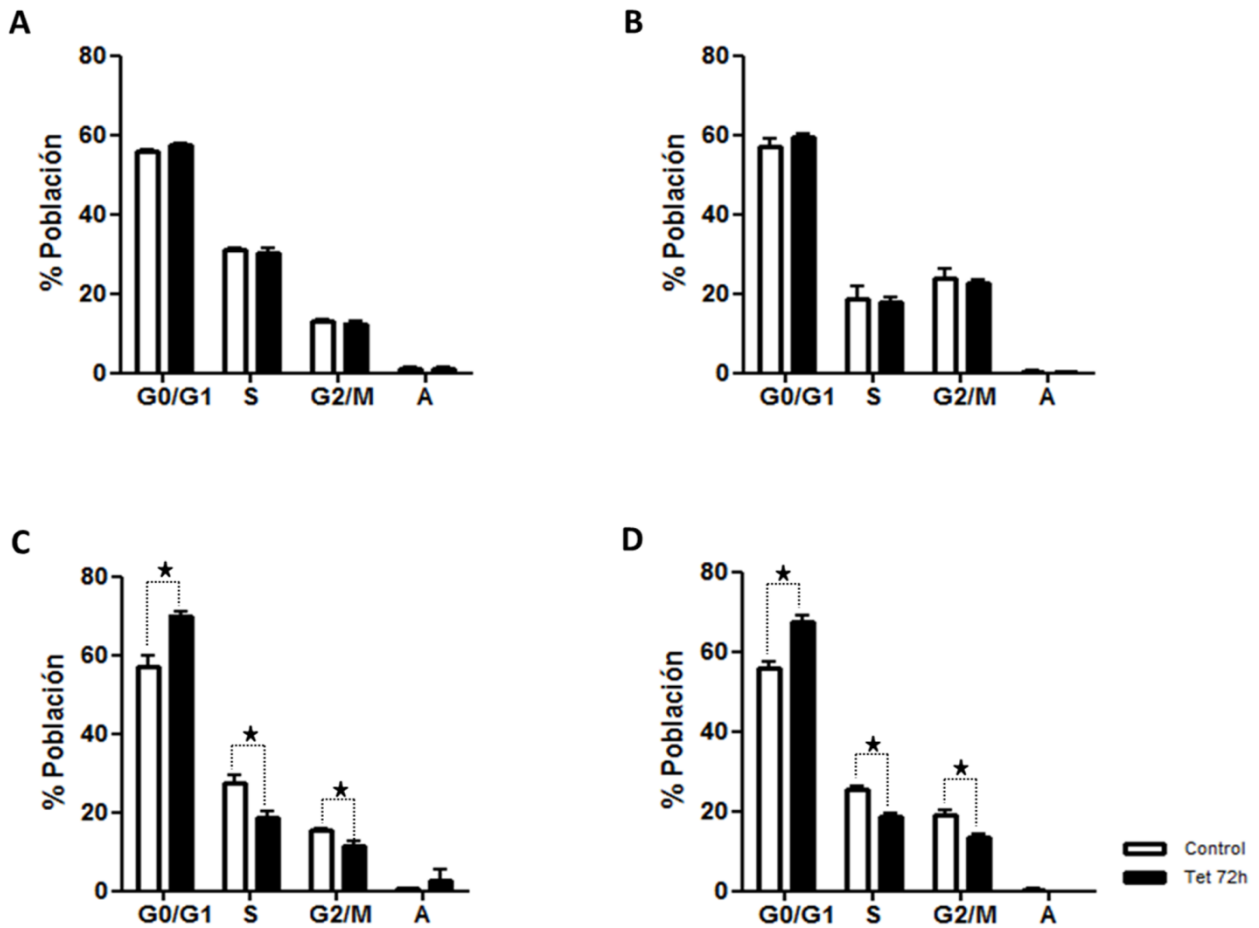


Figura 6.4: La expresión de GAS1 y tGAS1 induce detención del ciclo celular. Análisis del ciclo celular en las clonas A) MDA-WT, B) MDA-EGFP, C) MDA-GAS1 y C) MDA-tGAS1 (n=3). Las barras blancas representan las células en ausencia de tetraciclina (control) y las barras negras en presencia de tetraciclina para inducir la expresión de EGFP, GAS1 y tGAS1. t de Student, *P<0.05.

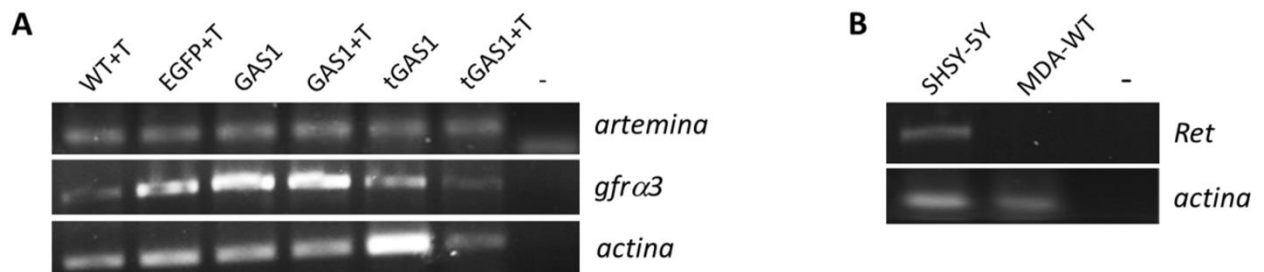


Figura 6.5: Las células MDA MB 231 expresan ARTN, GFR α 3 pero no RET. A) RT-PCR para *artemina* y *gfr α 3* en las clonas MDA. B) RT-PCR para *Ret* en las células MDA-WT, las células SHSY-5Y fueron usadas como control positivo de expresión. WT: MDA MB 231 silvestres, EGFP, GAS1 o tGAS1: células MDA MB 231 estables para EGFP, GAS1 o tGAS1, en presencia (+T) y ausencia de tetraciclina.

6.3 El medio condicionado con tGAS1 disminuye el número de células viables

Se ha reportado que el medio condicionado conteniendo tGAS1 disminuye la viabilidad de células C6 de glioblastoma de rata debido a sus efectos autocrinos y paracrinos (López-Ornelas et al 2011). Para probar si tGAS1 también disminuye la viabilidad en células de cáncer de mama de forma paracrina, se indujo la expresión de tGAS1 en las células MDA-tGAS1 durante 72 h y luego el medio fue administrado a cultivos independientes de células MDA-WT.

Los resultados indican que después de 72 h de incubación con medio condicionado conteniendo tGAS1 hubo una reducción significativa en el número de células viables MDA-WT en comparación con las que recibieron el medio control (Fig. 6.6 A, tercera columna). Para descartar la posibilidad de que otros factores contenidos en el medio condicionado fueran los responsables de este efecto, se eliminó a tGAS1 del medio condicionado por inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GAS1 humano. No se observó ninguna diferencia entre la viabilidad de las células que recibieron el medio condicionado control y la de las que recibieron el medio condicionado del que fue retirado tGAS1 por inmunoprecipitación (Fig. 6.6 A, segunda columna).

Además, el análisis por *western blot* del inmunoprecipitado corrobora que la proteína inmunoprecipitada del medio de cultivo fue tGAS1, ya que en los controles medio tratado con anticuerpo no relacionado (NMDA ϵ 1), y el medio sin anticuerpo y en condiciones sin tetraciclina no se obtuvo respuesta, indicando la especificidad del ensayo (Fig. 6.6 B). Estos datos indican que tGAS1 reduce la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA MB 231 por un efecto paracrino.

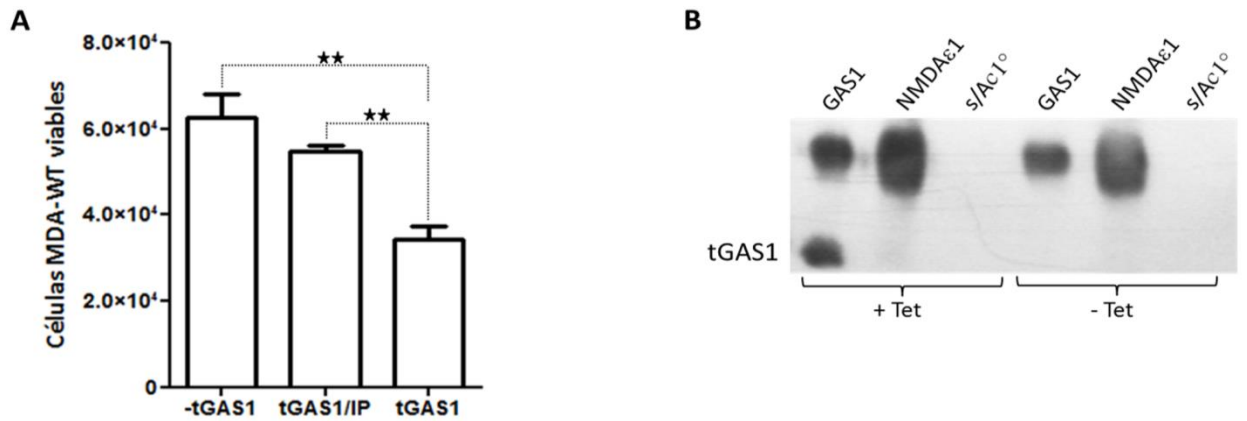


Figura 6.6: El medio condicionado con tGAS1 reduce la viabilidad celular. A) La viabilidad de las células MDA-WT expuestas al medio condicionado conteniendo tGAS1 disminuye. B) *Western blot* de la inmunoprecipitación de tGAS1 del medio condicionado con (+Tet) o sin (-Tet) tetraciclina (n=4). -tGAS1: medio condicionado sin tetraciclina; tGAS1/IP: medio con tetraciclina inmunoprecipitado vs tGAS1; tGAS1: medio con tetraciclina, NMDAε1: control de anticuerpo no relacionado, s/Ac1°: sin anticuerpo primario. ANOVA de un factor y Duncan post hoc, ** P <0.01.

6.4 tGAS1 disminuye la activación de ERK al bloquear la señalización de la ARTN

Ya antes se ha demostrado que el efecto de GAS1 en gliomas y neuroblastomas se asocia con GDNF y RET (Lopez-Ramírez et al 2008, Zarco et al 2012). Sin embargo, las células MDA MB 231 no expresan ninguno de estas proteínas, pero si ARTN (Kang et al 2009) y aquí demostramos que también expresan GFR α 3. Esto indica que el efecto de GAS1 en las células MDA MB 231 es independiente de RET, lo cual podría involucrar otros blancos río abajo de la cascada de señalización de ARTN, como las MAPKs.

A continuación se decidió investigar si la expresión de tGAS1 podía afectar la activación de ERK1/2 inducida por ARTN en las células MDA-tGAS1. Se observó que el tratamiento de las células MDA-tGAS1 con la proteína recombinante humana ARTN en ausencia de tetraciclina aumentó significativamente la fosforilación de ERK1/2. Interesantemente, este efecto fue contrarrestado por la presencia de tGAS1 cuando las células fueron expuestas a tetraciclina. Aunque no alcanzo a ser significativa, también se observó una tendencia a reducirse la fosforilación de ERK1/2 por la expresión de tGAS1 sin la adición de ARTN (Fig. 6.7). Estos resultados demuestran que tGAS1 inhibe la capacidad de ARTN para activar a ERK e inducir la proliferación de las células.

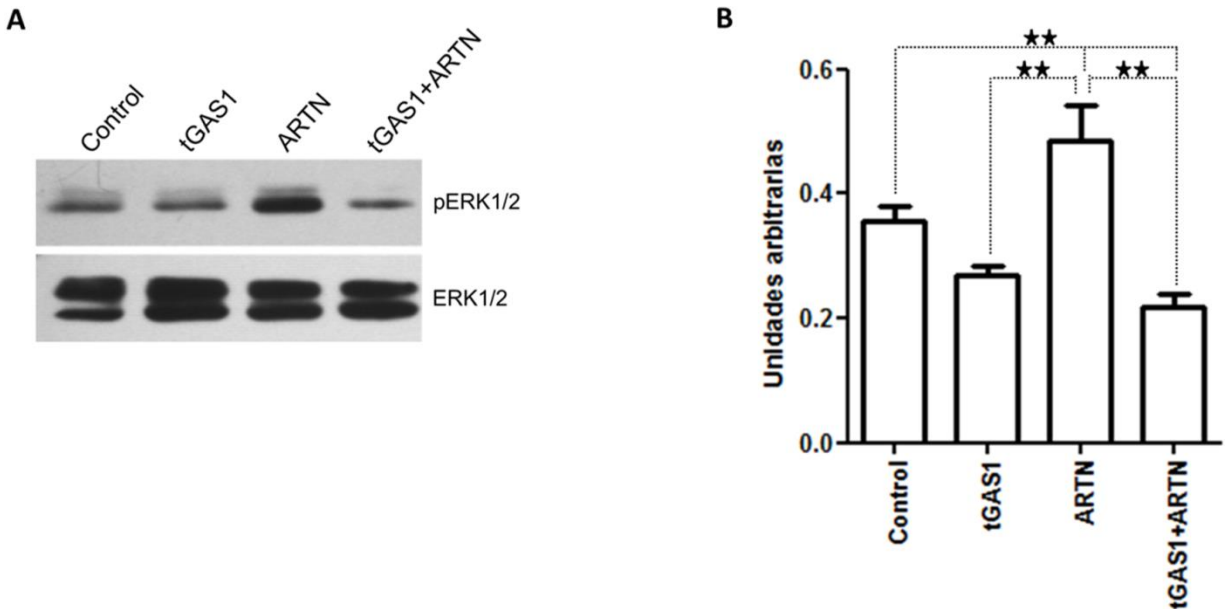


Figura 6.7: tGAS1 disminuye la activación de ERK bloqueando la señalización de la ARTN. A) Análisis de *western blot* representativo de la fosforilación de ERK1/2 en presencia y ausencia de tGAS1 y ARTN. B) Análisis densitométrico de pERK1/2 normalizado con ERK1/2 total (n=3). Control: células MDA-tGAS1 sin tetraciclina y ARTN, tGAS1: con adición de tetraciclina, ARTN: con adición de ARTN y tGAS1+ARTN: con adición de tetraciclina y ARTN. ANOVA de un factor y Duncan post hoc, ** P < 0.01.

6.5 tGAS1 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

Para probar el potencial de tGAS1 para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*, se inocularon células MDA-WT en ratones hembra inmunosuprimidos para generar tumores subcutáneos (heterotópicos) que fueron tratados con los lentivirus tGAS1 o EGFP, o con el vehículo. Los tumores fueron medidos durante un periodo de 15 días y se calculó el volumen tumoral en cada una de las condiciones. Los resultados señalan que a partir del día 4, los ratones tratados con los lentivirus tGAS1 desarrollaron tumores más pequeños (<100 mm³), en comparación con los ratones que recibieron los lentivirus EGFP o el vehículo que llegaron a alcanzar los 300 mm³ (Fig. 6.8 A y B).

Al final del seguimiento los animales fueron sacrificados para investigar en los tumores la presencia de tGAS1 y EGFP entregados a través de los lentivirus. Se detectaron tanto los mensajeros como las proteínas correspondientes en cada uno de los tratamientos, indicando que estos funcionaron de la forma adecuada (Fig. 6.8 C). Estos datos muestran que tGAS1 reduce el crecimiento de los tumores de mama MDA-WT *in vivo*.

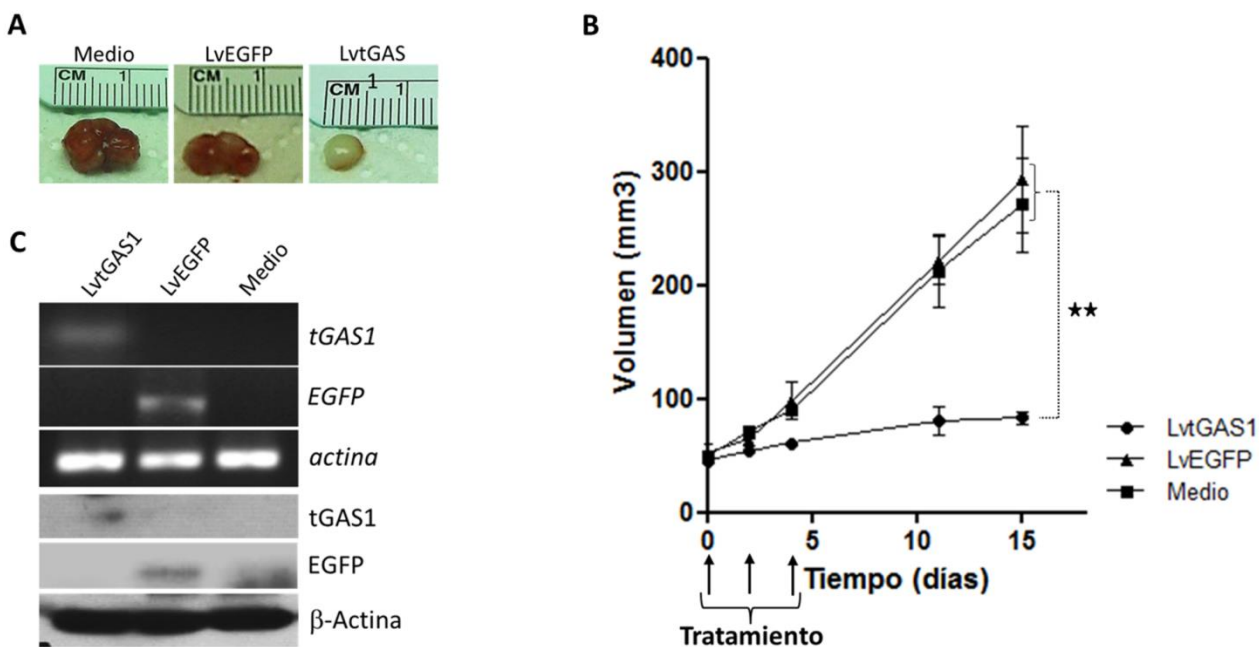


Figura 6.8: tGAS1 inhibe el crecimiento de los tumores de mama heterotópicos. A) Imágenes representativas de los tumores subcutáneos MDA-WT al final del seguimiento. B) tGAS1 y EGFP se expresan exclusivamente en tumores tratados con los lentivirus tGAS1 y EGFP respectivamente. C) Crecimiento de los tumores subcutáneos MDA-WT con los diferentes tratamientos (n=5). LvtGAS1, LvEGFP y Medio: tratamientos con los lentivirus tGAS1 y EGFP, y con medio de cultivo, respectivamente. ANOVA y Duncan post hoc, ** P <0,01.

Se ha documentado que los xenotransplantes ortotópicos replican el desarrollo de tumores de forma más fiable (Francia et al 2011), por lo tanto decidimos investigar la eficacia de tGAS1 en tumores generados en las glándulas mamarias mediante la inoculación de células MDA MB 231 con expresión constitutiva de la EGFP.

Los tratamientos se iniciaron a dos distintos volúmenes tumorales, 30 y 50 mm³, con el fin de representar las condiciones en un estado temprano y un estado avanzado de la enfermedad, respectivamente. Previamente se demostró que los lentivirus que expresan una proteína irrelevante (EGFP) no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento tumoral, para estos experimentos solo se utilizó como control la inyección de vehículo.

Se encontró que en los ratones que recibieron los lentivirus tGAS1 el crecimiento de los tumores se redujo significativamente en comparación con los ratones que recibieron solo medio de cultivo, tanto en el experimento representado la etapa temprana como avanzada del desarrollo tumoral. Sin embargo, de acuerdo al estadio en que se inició el tratamiento se pudo observar que en etapas tempranas de la enfermedad tGAS1 detuvo por completo el crecimiento del tumor. Esto debido a que en los animales tratados con tGAS1, los tumores no sobrepasaron los 50 mm³ y en los animales control estos crecieron unas 6 veces más hasta aproximadamente 300 mm³. Por otro lado, cuando se comenzó el tratamiento en la etapa más avanzada, aunque tGAS1 no abatió totalmente el crecimiento de los tumores, si lo redujo significativamente en comparación con los controles, puesto que los tumores que recibieron tGAS1 alcanzaron poco más de 200 mm³ al final del tratamiento y los controles aproximadamente 600 mm³ (Fig. 6.9).

6.6 tGAS1 disminuye la activación de ERK *in vivo*

Anteriormente se mostró la inhibición del crecimiento tumoral en glioblastomas por GAS1, la cual involucra la disminución en la activación de RET (López-Ramírez et al 2008). En este trabajo, también observamos que tGAS1 reduce el crecimiento de los tumores de mama *in vivo*, pero estos derivan de células que no expresan RET. Sin embargo, estas células si expresan ARTN y GFR α 3, y aquí mostramos que tGAS1 inhibe la activación de ERK1/2 por interferencia de la señalización de ARTN *in vitro*. Por lo tanto, a continuación se decidió investigar si tGAS1 podía afectar la activación de ERK1/2 *in vivo* en los tumores de mama derivados de las células MDA-WT.

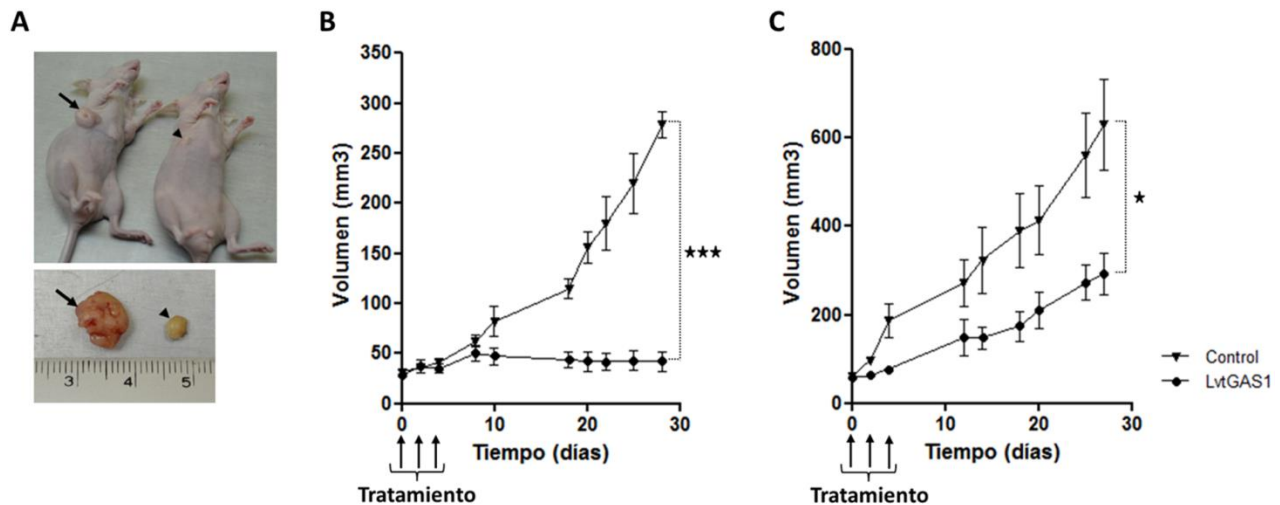


Figura 6.9: tGAS1 reduce el crecimiento de los tumores de mama ortotópicos. A) Imágenes representativas de los tumores de mama ortotópicos sometidos a los diferentes tratamientos en la etapa temprana (30 mm³) al final del seguimiento. B) Crecimiento de tumores ortotópicos en respuesta a los diferentes tratamientos en el estadio temprano (30 mm³, n=4). C) Crecimiento de tumores ortotópicos con los diferentes tratamientos en el estadio avanzado (50 mm³, n=6). Las flechas indican los tumores control y las puntas de flecha los tumores tratados con los lentivirus tGAS1. LvtGAS1 y Control: tratamientos con los lentivirus tGAS1 y medio de cultivo, respectivamente. ANOVA y Duncan post hoc, * P <0,05; *** P <0,001.

Mediante *western blot* se analizaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los tumores subcutáneos con los distintos tratamientos. Se observó una reducción significativa de la fosforilación de ERK1/2 en los tumores que recibieron los lentivirus tGAS1 en comparación con los que recibieron los lentivirus EGFP y el vehículo (Fig. 6.10).

Por otro lado, queda la posibilidad de que tGAS1 no solo afecte la activación de ERK sino también de AKT, puesto que se ha observado que el tratamiento de gliomas con GAS1 reduce la fosforilación de esta última (López-Ramírez et al 2008). Por lo tanto, también se investigó la activación de AKT en los tumores MDA-WT, y no se encontró diferencia entre el nivel de fosforilación de AKT en los tumores que recibieron el tratamiento con tGAS1 con respecto al control (Fig. 6.11). Estos resultados muestran que tGAS1 reduce el crecimiento de los tumores de mama MDA-WT por inhibición de la activación de ERK1/2 y no de AKT.

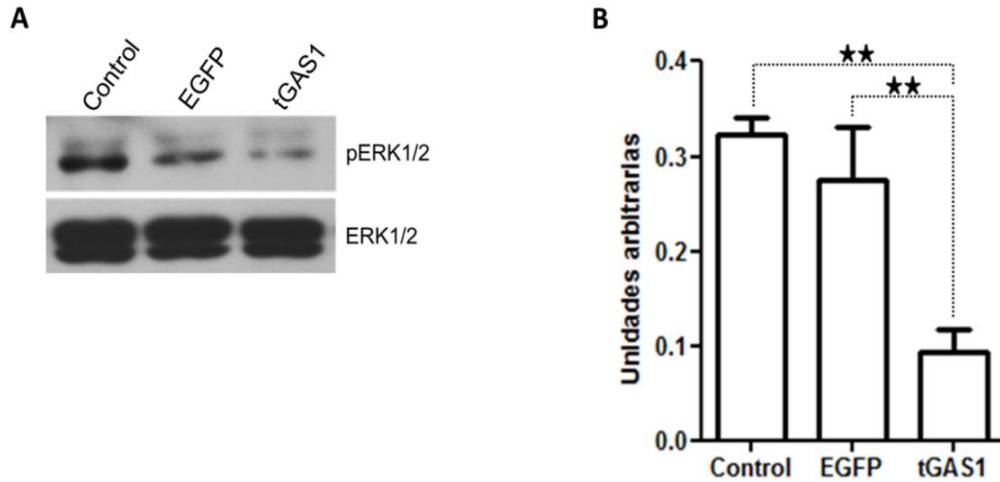


Figura 6.10: El tratamiento con tGAS1 disminuye la fosforilación de ERK en los tumores de mama. A) Imagen representativa de *western blot* para pERK1/2 en los tumores MDA-WT subcutáneos. B) Análisis densitométrico de pERK1/2 normalizado con respecto a ERK1/2 total en los tumores MDA-WT subcutáneos (n=3). Control, EGFP y tGAS1: tratamientos con medio de cultivo o con los lentivirus EGFP y tGAS1, respectivamente. ANOVA de un factor y Duncan post hoc, ** P <0,01.

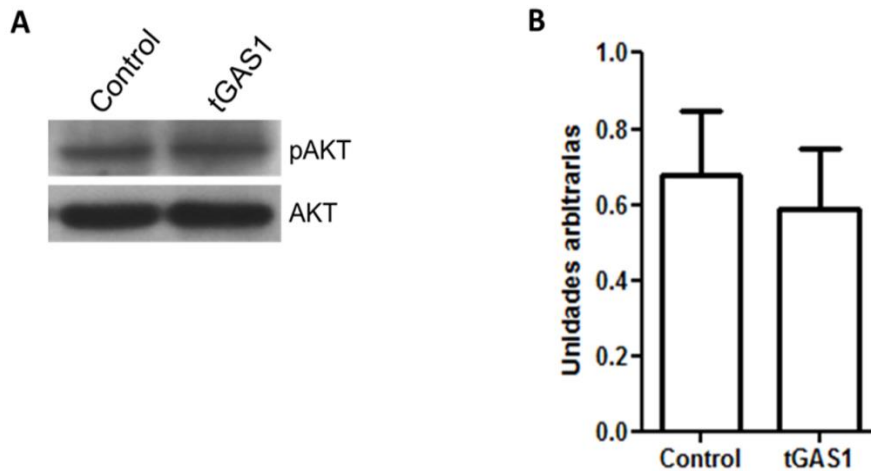


Figura 6.11: El tratamiento con tGAS1 no afecta la activación de AKT en los tumores de mama. A) Imagen representativa de *western blot* para pAKT en los tumores MDA-WT subcutáneos. B) Análisis densitométrico de pAKT normalizado con respecto a AKT total en los tumores MDA-WT subcutáneos (n=3). Control, tGAS1: tratamientos con medio de cultivo o con los lentivirus tGAS1, respectivamente.

6.7 tGAS1 disminuye la vascularización de los tumores de mama

Además de observar que el tratamiento con tGAS1 reduce el crecimiento de los tumores de mama, también observamos que este parece reducir la vascularización de los tumores (Figs. 6.8 A y 6.9 A). Para profundizar en este aspecto, se identificaron los vasos sanguíneos de los tumores ortotópicos, que se distinguen por expresar EGFP, identificando la expresión de la VE-cadherina por inmunofluorescencia (Labelle et al 2008). Se contó el número de áreas positivas a VE-cadherina por tumor en cada condición, como un indicativo de la abundancia de vasos sanguíneos.

Los resultados indican que se detectaron menos áreas positivas para VE-cadherina en los tumores tratados con tGAS1 en comparación con el control (Fig. 6.12), es decir, el tratamiento con tGAS1 redujo la formación de vasos sanguíneos, lo que concuerda con la apariencia de los tumores observada en las figuras 6.8 y 6.9. Este efecto adicionalmente podría haber influenciado el crecimiento tumoral, ya que al reducir el suministro de oxígeno y nutrientes los tumores alcanzarían un menor volumen.

Interesantemente, se encontraron señales positivas para VE-cadherina en las células tumorales (Fig. 6.12 A, segundo panel). Se ha reportado que las células MDA MB 231 requieren unirse a VE-cadherina de las células endoteliales durante el proceso de migración transendotelial (Sahni et al 2009), esto podría sugerir que las células tumorales están haciendo contacto con las endoteliales para extravasarse y migrar a otro sitio a través del torrente sanguíneo.

6.8 tGAS1 disminuye la migración de células endoteliales microvasculares

Los resultados anteriores sugieren que tGAS1 puede inhibir la angiogénesis en los tumores de mama, sin embargo cabe la posibilidad de que la reducida vascularización en los tumores tratados con tGAS1 se deba simplemente a que estos crecieron mucho menos en comparación con los controles, y que no fuese un efecto directo de tGAS1 sobre la angiogénesis.

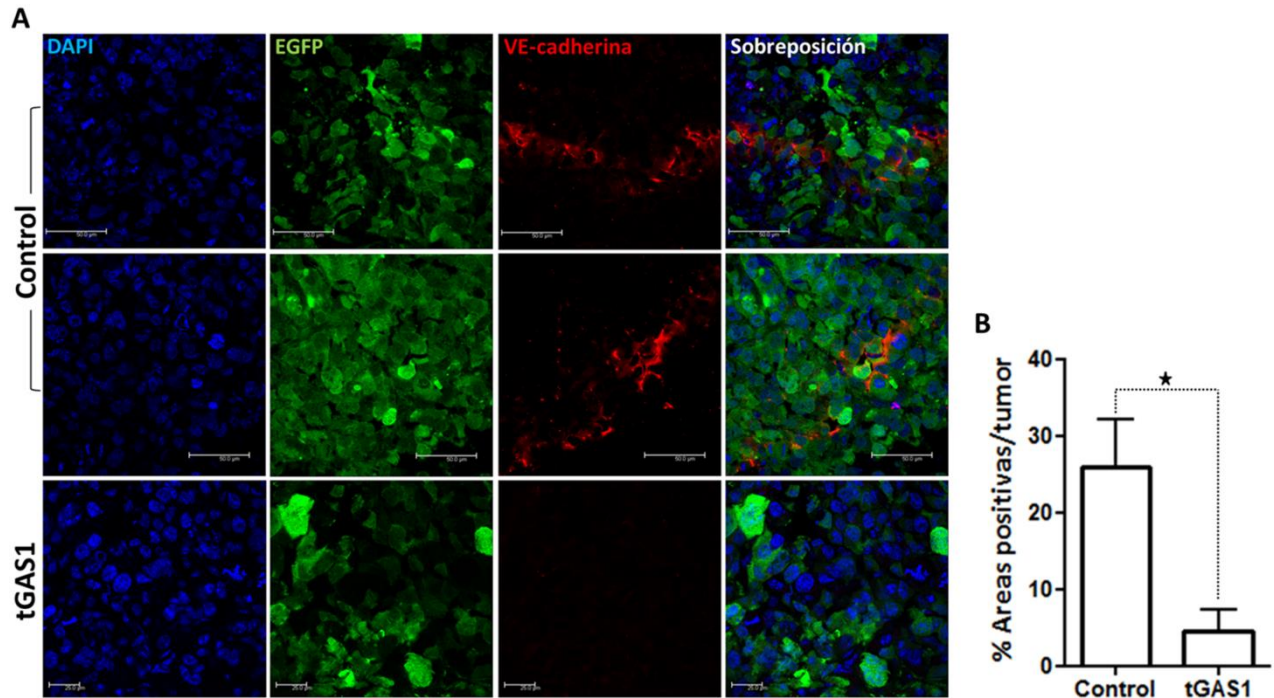


Figura 6.12: tGAS1 reduce la vascularización de los tumores de mama. A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra VE-cadherina en los tumores de mama ortotópicos. Las células tumorales se distinguen de las vasculares por la expresión de EGFP (panel superior). También se observan células tumorales (en verde) con marca para VE-cadherina (rojo) lo que sugiere que están en contacto con las células endoteliales vasculares en el proceso de extravasación. B) Porcentaje de áreas positivas para VE-cadherina por tumor en cada condición (n = 4). Control y tGAS1: tratamientos con medio de cultivo y con los lentivirus tGAS1, respectivamente. Escala 50 μ m en los paneles superiores y 25 μ m en el panel inferior. t de Student, * P < 0,05

De acuerdo a lo anterior, decidimos investigar si tGAS1 podía directamente afectar la angiogénesis y dado que la migración de las células endoteliales es un evento clave para la angiogénesis, probamos este proceso *in vitro* en respuesta al medio condicionado conteniendo tGAS1. Para este propósito, se sembraron células endoteliales en cámaras de Boyden y fueron expuestas al medio condicionado conteniendo o no tGAS1.

Las células endoteliales mostraron una migración basal en presencia del mismo medio de cultivo cuando fue usado como medio condicionado, pero cuando fueron incubadas con el medio de cultivo de las células tumorales MDA-tGAS1 sin tetraciclina, es decir, sin tGAS1, la migración aumentó significativamente. En contraste, cuando se indujo la presencia de tGAS1 en el medio condicionado por adición de tetraciclina, se observó una reducción de la migración de las células endoteliales, llegando a un nivel similar al basal (Fig. 6.13 A y B).

Como ya se mostró antes, el tratamiento con tGAS1 induce el arresto del ciclo celular en las células MDA MB 231, por lo que, cabe la posibilidad de que la disminución en el número de células endoteliales que migraron a través de las cámaras de Boyden no se debiera a que estas migraron menos, sino a que proliferaron menos por la presencia de tGAS1. Para descartar esto, se determinó el efecto de tGAS1 en la viabilidad de las células endoteliales. Empleando el ensayo de azul de tripano, se encontró que la viabilidad celular no se afectó por la presencia de tGAS1 en comparación con los controles (Fig. 6.13 C). Con esto podemos descartar que el efecto de tGAS1 en la migración de células endoteliales se deba a la inhibición de la proliferación, sino a que efectivamente impide que las células endoteliales migren y por lo tanto afecta directamente la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso que requiere de la migración y proliferación de las células endoteliales. Un factor crucial en la modulación de estos procesos es el VEGF secretado por las células tumorales, así que se determinó si la expresión de este factor podía afectarse por la presencia de tGAS1. Por inmunohistoquímica se observó muy poca diferencia entre la expresión de VEGF en las células MDA-tGAS1 expresando o no tGAS1 (Fig. 6.14), lo que sugiere que tGAS1 inhibe la migración de células endoteliales por un mecanismo independiente de VEGF.

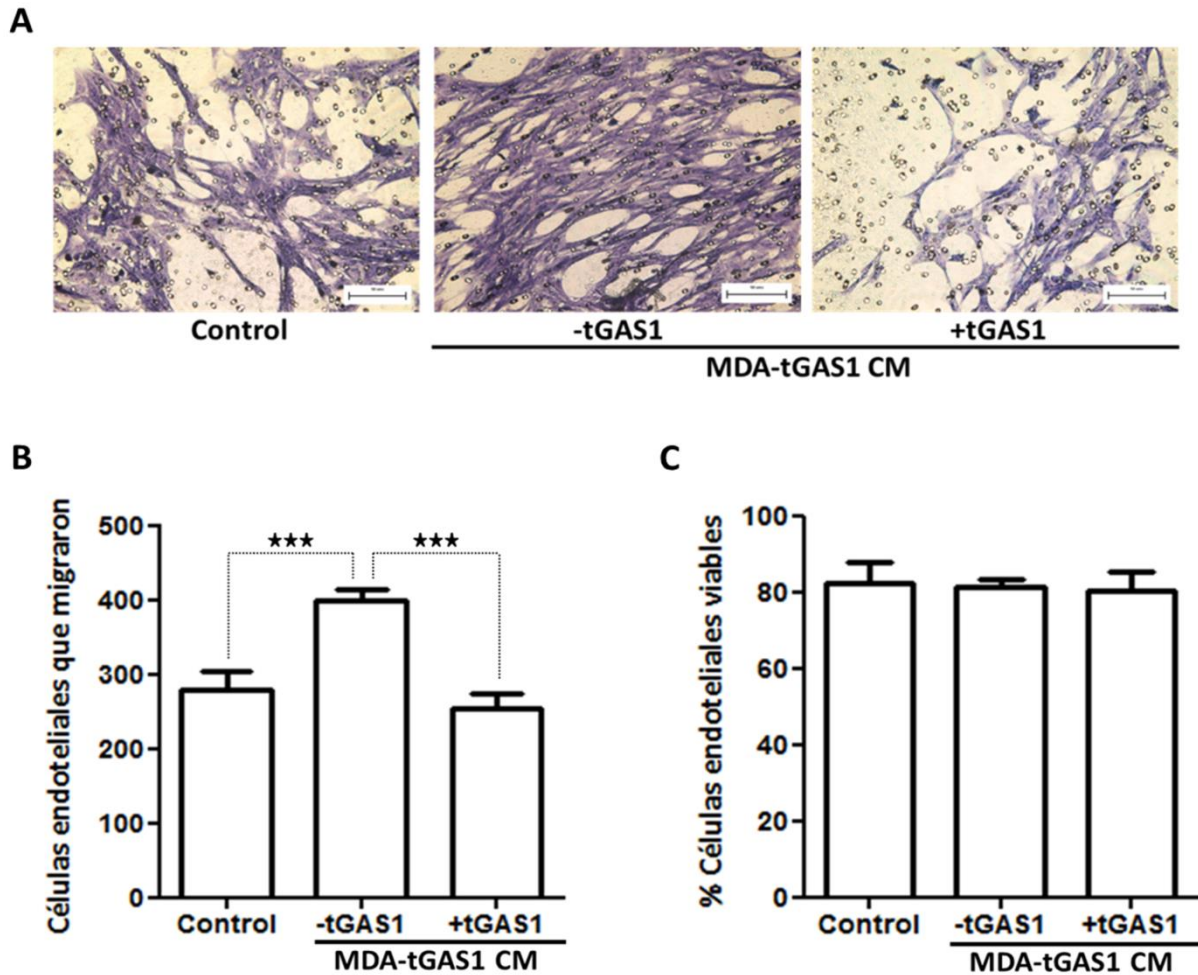


Figura 6.13: El medio acondicionado que contiene tGAS1 disminuye la migración de las células endoteliales. A) Imágenes representativas de la migración de las células endoteliales en las cámaras de Boyden en las diferentes condiciones. B) Las células endoteliales expuestas al medio condicionado con tGAS1 reducen su migración, evaluada por el ensayo de migración en la cámara de Boyden. C) El medio condicionado con tGAS1 no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de las células endoteliales. MDA-tGAS1 CM: medio condicionado de células MDA-tGAS1 con tetraciclina (+tGAS1) o sin tetraciclina (-tGAS1). Control: medio condicionado de células endoteliales. Escala 50 μ m. ANOVA de un factor y Duncan post hoc, *** $P < 0.001$

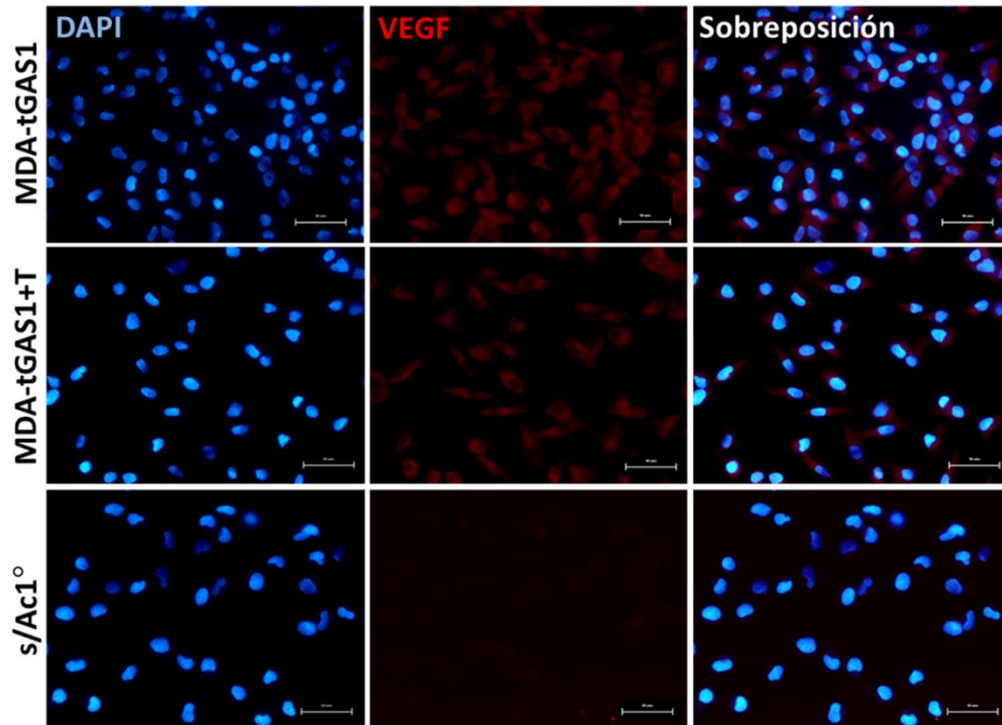


Figura 6.14: La presencia de tGAS1 no afecta la expresión de VEGF. Inmunocitoquímica de VEGF en las células MDA tGAS1 en presencia (T +) o ausencia de tetraciclina durante 72 h. w/Ab1 °: sin anticuerpo primario, escala 50 μm.

7. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres a nivel mundial, y aunque los avances recientes en la investigación de las bases moleculares que lo conforman han mejorado su tratamiento, se necesitan nuevas alternativas. En este trabajo, se demuestra la capacidad de GAS1 y tGAS1 para inducir la detención del ciclo celular de las células de cáncer de mama humano MDA MB 231, así como de tGAS1 para impedir el crecimiento de tumores originados en ratones inmunosuprimidos a partir de estas mismas células, lo que sugiere que tGAS1 se puede utilizar como una terapia adyuvante para el tratamiento de cáncer de mama.

Primero se probó el efecto de la sobreexpresión de GAS1 y tGAS1 en la viabilidad de las células MDA MB 231, observándose que esta ocasionó la disminución del número de células viables, sin modificar la cantidad de células muertas, es decir, redujo su proliferación manteniéndolas en arresto en la fase G0/G1, sin afectar su sobrevivencia (Fig. 6.4). Este efecto de GAS1 es consistente con los estudios realizados en fibroblastos NIH3T3, a partir de los cuales se determinó la participación de GAS1 en la detención del ciclo celular (Stebel et al 2000).

Por otro lado, se ha reportado que el anclaje GPI que mantiene unido a GAS1 con la membrana celular no es indispensable para producir sus efectos sobre la detención del crecimiento celular (Ruaro et al 2000). Además, se ha demostrado que la forma soluble de GAS1 (tGAS1) disminuye la viabilidad de células de C6 glioblastoma y tumores derivados de estas células (López-Ornelas et al 2011, 2014). Aquí se demuestra que tGAS1 es secretado al medio de cultivo cuando es producido por las células MDA-tGAS1, y que también puede interaccionar con las células que no lo producen provocando en estas la disminución de su viabilidad (Fig. 6.6).

La reducción de la viabilidad celular por GAS1 se asocia con el bloqueo de la vía de señalización de GDNF implicando la participación de los receptores $GFR\alpha1$ y RET para inducir apoptosis (López-Ramírez et al 2008, Domínguez-Monzón et al 2009, Zarco et al 2012). Curiosamente las células MDA MB 231 carecen tanto de RET como de $GFR\alpha1$ (Esseghir et al 2007, Boulay et al 2008), pero expresan ARTN, un ligando de la familia de GDNF que promueve el crecimiento de los tumores de mama y la invasividad (Kang et al 2009). Además, la expresión de ARTN ha sido observada en distintos tipos de cáncer como cáncer endometrial, de pulmón y pancreático en los cuales está relacionada con la proliferación y la metástasis (Pandey et al 2010, Tang et al 2010, Ceyhan et al 2006). Sin embargo, aún no se ha reportado la expresión del receptor canónico de ARTN, $GFR\alpha3$. En este trabajo se demuestra la expresión del ARNm de $GFR\alpha3$ en las células MDA MB 231 (Fig. 6.5). Este resultado sugiere que tGAS1 induce arresto del ciclo celular al interferir con la interacción entre ARTN- $GFR\alpha3$.

Aunque RET no está presente en las células MDA MB 231, varios reportes muestran que los complejos $GFR\alpha$ -GFL pueden iniciar su señalización en una manera independiente a RET a través de las moléculas de adhesión tales como NCAM, e inducir la activación de la cinasa intracelular Fyn que provoca la inhibición de la adhesión celular (Sariola et al 2003, Parartcha et al 2003). También, hay informes de la interacción de los complejos $GFR\alpha$ -GFL con las integrinas (Chao et al 2003) que participan en procesos como la proliferación, crecimiento, invasión y supervivencia de las células en el cáncer (Jahangiri et al 2014).

Por otro lado, se ha reportado que el bloqueo de ARTN con anticuerpos neutralizantes inhibe completamente la activación de ERK y RET inducida por ARTN (Thornton et al 2013). Estos datos están de acuerdo con la reducción en la fosforilación de ERK1/2 observada en las células MDA-tGAS1 en presencia de tetraciclina y ARTN, por lo tanto, al carecer estas células de RET, el efecto de tGAS1 debe ser mediado a través de la inhibición de ERK1/2 (Fig. 6.7).

ERK1/2 tiene una importante participación en la progresión del ciclo celular porque las vías RAS/ERK/MAPK y RAS/PI3K inactivan a la proteína de retinoblastoma (RB) que regula negativamente el crecimiento. Además, la inhibición de ERK1/2 regula a la baja las proteínas BCL-2 y promueve la muerte de las células tumorales (Balmanno et al 2009, Coleman et al 2004). Recientemente, se ha identificado en neuronas sensoriales periféricas que NRTN y ARTN pueden desencadenar vías de señalización involucrando o no a RET. En estos estudios se encontró que ARTN induce la sensibilización de las neuronas para liberar al péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), tanto de forma dependiente como independiente de RET a través de NCAM, ocasionando la activación de ERK y AKT (Schmutzler et al 2011). Aquí se muestra que tGAS1 inhibe la activación de ERK por un mecanismo independiente de RET sin afectar la activación de AKT (Fig. 6.11), sugiriendo que tGAS1 en ausencia de RET induce arresto del ciclo celular y no apoptosis, interfiriendo con la activación de ERK1/2 en lugar de la de AKT.

Adicionalmente se probó el efecto de tGAS1 *in vivo*. Para este propósito, las células MDA MB 231 se inocularon en los flancos de las extremidades de los miembros inferiores y en las glándulas mamarias de ratones hembra inmunocomprometidos para inducir el desarrollo de tumores. Los resultados muestran que tGAS1 redujo significativamente el crecimiento de los tumores en ambos modelos (Figs. 6.8 y 6.9). También se observó que el tratamiento con tGAS1 en las primeras etapas de crecimiento del tumor (30 mm³) es más efectivo, debido a que en los tumores de este tamaño tGAS1 detuvo completamente el crecimiento tumoral, lo que indica que el potencial terapéutico de tGAS1 es mayor en las fases tempranas de la enfermedad (Fig. 6.9).

Finalmente la señalización de ERK está desregulada en aproximadamente un tercio de todos los cánceres incluyendo el cáncer de mama en donde su hiperactividad juega un papel importante en la progresión de la metástasis (Whyte et al 2009, Dhillon et al 2007). Con base en estos datos y en los resultados obtenidos *in vitro*, se decidió investigar la activación de ERK en los tumores de mama.

Se encontró una reducción significativa de la fosforilación de ERK1/2 en los tumores tratados con los lentivirus tGAS1 en comparación con los tratados con el vehículo en concordancia con los resultados obtenidos con las células MDA-tGAS1 en presencia de ARTN y tetraciclina (Figs. 6.10 y 6.7). Esto sugiere un papel importante para tGAS1 en la inactivación de ERK, posiblemente a través de la interacción con las moléculas de adhesión, como las implicadas en la señalización de los GFLs independiente de RET, como NCAM y las integrinas (Sariola et al 2003, Parartcha et al 2003, Chao et al 2003).

Dado que los tumores control parecían estar más vascularizados que los que recibieron el tratamiento con tGAS1 (Figs. 6.8 A y 6.9 A), se investigó si tGAS1 podría inhibir la angiogénesis en los tumores. Para este propósito, se identificaron los vasos sanguíneos en los tumores mediante inmunohistoquímica contra VE-cadherina tomando en cuenta la morfología según los datos reportados por Labelle (2008), y se contaron las áreas positivas a VE-cadherina por tumor en cada condición para determinar la abundancia de vasos sanguíneos.

Se encontró que los tumores tratados con tGAS1 tuvieron menos áreas positivas para la VE-cadherina en comparación con los tumores control. Esto sugiere que el tratamiento con tGAS1 provoca una reducción del suministro de sangre a los tumores, lo que limita su crecimiento y reduce su capacidad metastásica.

Cabe destacar que los vasos sanguíneos fueron identificados del tejido tumoral por la expresión de la EGFP en las células tumorales (Fig. 6.12 A panel superior), pero también se encontraron señales positivas para VE-cadherina en las células tumorales (Fig. 6.12 A, segundo panel), sin embargo no se ha descrito la expresión de esta proteína en las células MDA MB 231. Este hallazgo acompaña el proceso de migración transendotelial, mediante el cual las células ingresan al torrente sanguíneo para colonizar otros sitios del organismo. Se ha reportado que las células MDA MB 231 necesitan unirse a la VE-cadherina presente en las células endoteliales durante el proceso de migración transendotelial (Sahni et al 2009).

Además, se ha demostrado que la unión de las células MDA MB 231 a células endoteliales provoca la fosforilación de la VE-cadherina a través de la vía H-Ras/Raf/MEK/ERK, lo que lleva a la disociación de VE-cadherina y β -catenina alterando la integridad del endotelio vascular (Haidari et al 2012). Estos datos sugieren que las células de los tumores de mama están en contacto con las células endoteliales para darse paso hacia el torrente sanguíneo, proceso que no se observó en los tumores tratados con tGAS1.

En un esfuerzo para determinar si la reducción en la formación de vasos sanguíneos en el tumor se debía a un efecto directo de tGAS1 se realizaron ensayos *in vitro* de migración de células endoteliales. Observamos que el medio que contiene tGAS1 reduce la migración de las células endoteliales (Fig. 6.13). Además se demostró que tGAS1 no afecta la proliferación de las células endoteliales sino solo su migración (Fig. 6.13 C), por lo que podemos decir que tGAS1 interfiere directamente de forma negativa con el desarrollo de la angiogénesis.

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de GAS1 es inducida por VE-cadherina y VEGF (Spagnuolo et al 2004). Nuestros resultados muestran que tGAS1 disminuye la capacidad migratoria de las células endoteliales, pero no afecta su viabilidad en comparación con los controles. Por otra parte, la expresión de tGAS1 en las células MDA-tGAS1 induce un efecto muy limitado sobre la expresión del VEGF (Fig. 6.14). De acuerdo con estos datos, se propone que la reducción de la angiogénesis inducida por el tratamiento con tGAS1 puede deberse a un mecanismo que implica la inhibición de la señalización ARTN-GFR α 3, ya que se ha reportado que este ligando promueve la angiogénesis en células de cáncer de mama con expresión negativa para el receptor de estrógenos, como son las células MDA MB 231 (Banerjee et al 2012).

En el cáncer, la generación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso crítico para generar metástasis, las cuales se originan cuando las células del tumor primario acceden al torrente sanguíneo y viajan a sitios distantes en el cuerpo donde crean colonias y generan nuevos tumores que siguen proliferando (Francia et al 2011).

De acuerdo con el efecto de tGAS1 sobre la angiogénesis y un reporte anterior en el que se muestra que la disminución en la expresión de GAS1 aumenta la metástasis a pulmón (Gobeil et al 2008), tGAS1 podría reducir la generación de metástasis del cáncer de mama, y por lo tanto, se considera relevante evaluar el efecto del tratamiento con tGAS1 en la formación de metástasis en el cáncer de mama.

8. CONCLUSIÓN

Se ha demostrado la capacidad de GAS1 para inhibir el crecimiento de gliomas y células de neuroblastoma mediante la inhibición de la vía de señalización de GDNF/RET/AKT. En el presente trabajo, extendemos esas observaciones, mostrando que tGAS1 también puede inhibir el crecimiento de tumores de mama, al interferir con la otra rama de la vía de GDNF, es decir, bloqueando la señalización ARTN-GFR α 3/ERK en una manera independiente de RET. Estos resultados refuerzan la posibilidad de utilizar tGAS1 en el tratamiento de diferentes tumores.

9. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se mostró la capacidad de tGAS1 para inhibir el crecimiento y la angiogénesis de tumores de mama. El hecho de que tGAS1 afecte negativamente la angiogénesis hace razonable pensar que el tratamiento del cáncer de mama con tGAS1 también puede reducir la metástasis, ya que es un proceso altamente vinculado al desarrollo de vasos sanguíneos. De esta forma, consideramos importante investigar el papel de tGAS1 en la progresión de la metástasis en modelos *in vivo* de cáncer de mama.

REFERENCIAS

- ACS Detailed Guide: Breast Cancer, 2009
- Airaksinen MS, Saarma M, The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value, *Nat Rev Neurosci* 3 (2002) 383-394.
- Allen BL, Tenzen T, McMahon AP, The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development, *Genes Dev* 10 (2007) 1244-57.
- Andre F, Pusztai L, Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy, *Nat Clin Pract Oncol* 11 (2006) 621-32.
- Balmanno K, Cook SJ, Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway, *Cell death and differentiation* 16 (2009) 368-377.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J, Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex, *Neuron* 6 (1998) 1291-302.
- Banerjee A, Wu ZS, Qian P, Kang J, Pandey V, Liu DX, Zhu T, Lobie PE, ARTEMIN synergizes with TWIST1 to promote metastasis and poor survival outcome in patients with ER negative mammary carcinoma, *Breast Cancer Res* 6 (2011) R112.
- Banerjee A, Wu ZS, Qian PX, Kang J, Liu DX, Zhu T, Lobie PE, ARTEMIN promotes de novo angiogenesis in ER negative mammary carcinoma through activation of TWIST1-VEGF-A signalling, *PLoS One* 7 (2012) e50098.
- Benitez JA, Arregui L, Vergara P, Segovia J, Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas, *Cancer Gene Ther* 14 (2007) 836-846.
- Benítez JA, Domínguez-Monzón G, Segovia J, Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors, *Curr Med Chem* 8 (2008) 729-42.
- Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC, Early breast cancer, *Lancet* 373 (2009) 1463-1479.
- Beshpalov MM1, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhães AC, Kuleskiy E, Paveliev M, Rivera C, Rauvala H, Saarma M, Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin, *J Cell Biol* 102 (2011) 153-69.
- Bielke W, Ke G, Feng Z, Buhner S, Saurer S, Friis RR, Apoptosis in the rat mammary gland and ventral prostate: detection of celldeath-associated genes using a coincident expression cloning approach, *Cell Death Differ* 4 (1997) 114-24.
- Boulay A, Breuleux M, Stephan C, Fux C, Brisken C, Fiche M, Wartmann M, Stumm M, Lane HA, Hynes NE, The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer, *Cancer Res* 68 (2008) 3743-3751.
- Brandan ME, Villaseñor Y, Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México, *Cancerología* 1 (2006) 147-162.
- Cabrera R, Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Mañes S, Naranjo JR, Mellström B, Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors and regulates Ret signaling, *J Biol Chem* 281 (2006) 14330-9.

- Cancer facts and figures 2014, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>
- Ceyhan GO, Giese NA, Erkan M, Kerscher AG, Wente MN, Giese T, Buchler MW, Friess H, The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion, *Ann Surg* 244 (2006) 274-281.
- Chao CC, Ma YL, Chu KY, Lee EH, Integrin alpha v and NCAM mediate the effects of GDNF on DA neuron survival, outgrowth, DA turnover and motor activity in rats, *Neurobiol Aging* 24 (2003) 105-116.
- Chetram MA, Hinton CV, PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer, *J Recept Signal Transduct Res* 32 (2012) 90-5.
- Cobourne MT, Miletich I, Sharpe PT, Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development, *Development* 131 (2004) 2875-85.
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF, RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 355-366.
- Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C, The growth arrest specific gene, gas1, is involved in growth suppression, *Cell* 70 (1992) 595-607.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W, MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene* 26 (2007) 3279-3290.
- Diaz-Coranguéz M, Segovia J, Lopez-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, Chavez B, Meraz-Cruz N, Gonzalez-Mariscal L, Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells, *PLoS One* 8 (2013) e60655.
- Dominguez-Monzon G, Benitez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J, Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh, *Int J Dev Neurosci* 27 (2009) 305-313.
- Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A, Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways, *Cancer Treat Rev* 38 (2012) 698-707.
- Escors D, Breckpot K, Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58 (2010) 107-19.
- Espina V, Liotta LA, What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? *Nat Rev Cancer* 1 (2011) 68-75.
- Essegir S, Todd SK, Hunt T, Poulson R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, Isacke CM, A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer, *Cancer Res* 67 (2007) 11732-11741.
- Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D, PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer, *Am J Pathol* 177 (2010) 1647-1656.
- Evdokiou A, Cowled PA, Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines, *Int J Cancer* 75 (1998) 568-577.

- Evdokiou A, Webb GC, Peters GB, Dobrovic A, O'Keefe DS, Forbes IJ, Cowled PA, Localization of the human growth arrest-specific gene (GAS1) to chromosome bands 9q21.3-q22, a region frequently deleted in myeloid malignancies, *Genomics* 3 (1993) 731-3.
- Folkman J, Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 4 (2007) 273-86.
- Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS, Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics, *Nat Rev Cancer* 11 (2011) 135-141.
- Garcia-Tovar CG, Perez A, Luna J, Mena R, Osorio B, Aleman V, Mondragon R, Mornet D, Rendon A, Hernandez JM, Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain, *Acta Histochem* 103 (2001) 209-224.
- GLOBOCAN, <http://globocan.iarc.fr>, Accessed 01 Mar 2014 (2012).
- Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR, A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene, *Genes Dev* 22 (2008) 2932-2940.
- Gómez Dantés H, El cáncer de mama en América Latina y el Caribe: morbilidad, mortalidad y carga de la enfermedad (2009) Fundación Mexicana para la Salud, A.C.
- Haidari M, Zhang W, Caivano A, Chen Z, Ganjehei L, Mortazavi A, Stroud C, Woodside DG, Willerson JT, Dixon RA, Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin induced by invasive breast cancer cells, *J Biol Chem* 287 (2012) 32981-92.
- INEGI (2012), <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est&c=23589>
- Izzi L, Lévesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, Krauss RS, McMahon AP, Allen BL, Charron F, Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation, *Dev Cell* 6 (2011) 788-801.
- Jaggi R, Marti A, Guo K, Feng Z, Friis RR, Regulation of a Physiological Apoptosis: Mouse Mammary Involution, *J Dairy Sci* 79 (1996) 1074-84.
- Jahangiri A, Aghi MK, Carbonell WS, beta1 Integrin: Critical Path to Antiangiogenic Therapy Resistance and Beyond, *Cancer Res* 74 (2014) 3-7.
- Jiménez Hernández A, Tesis de Maestría, Determinación del efecto de Growth arrest specific 1 (Gas1) sobre la proliferación y sobrevivencia de líneas celulares de cáncer de mama y próstata, Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN, 2009.
- Kang J, Perry JK, Pandey V, Fielder GC, Mei B, Qian PX, Wu ZS, Zhu T, Liu DX, Lobie PE, Artemin is oncogenic for human mammary carcinoma cells, *Oncogene* 28 (2009) 2034-2045.
- Kang J, Qian PX, Pandey V, Perry JK, Miller LD, Liu ET, Zhu T, Liu DX, Lobie PE, Artemin is estrogen regulated and mediates antiestrogen resistance in mammary carcinoma, *Oncogene* 29 (2010) 3228-3240.
- Kelley KC, Hemophilia treatment. An introduction to gene therapy, *Haemophilia* 6 (2000) 110-4.
- Kullberg M, McCarthy R, Anchordoquy TJ, Systemic tumor-specific gene delivery, *J Control Release* 172 (2013) 730-6.

- Labelle M, Schnittler HJ, Aust DE, Friedrich K, Baretton G, Vestweber D, Breier G, Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor beta signaling, *Cancer Res* 68 (2008) 1388-1397.
- Lee CS, Fan CM, Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes, *Mech Dev* 101 (2001) 293-7.
- Li J, Klein C, Liang C, Rauch R, Kawamura K, Hsueh A JW, Autocrine regulation of early embryonic development by the artemin-GFRA3 (GDNF family receptor-alpha 3) signaling system in mice, *FEBS Lett* 583 (2009) 2479–2485.
- Li S, Li Z, Guo F, Qin X, Liu B, Lei Z, Song Z, Sun L, Zhang HT, You J, Zhou Q, miR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human esophageal carcinoma, *J Biomed Sci* 2011 18-24.
- Liu C, Zhang N, Emerging biotechnological strategies for non-viral antiangiogenic gene therapy, *Angiogenesis* 4 (2012) 521-42.
- Liu Y, May NR, Fan CM, Growth Arrest Specific Gene 1 Is a Positive Growth Regulator for the Cerebellum, *Dev Biol* 236 (2001) 30-45.
- Lopez-Ornelas A, Mejia-Castillo T, Vergara P, Segovia J, Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth, *Cancer Gene Ther* 18 (2011) 87-99.
- Lopez-Ornelas A, Vergara P, Segovia J, Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth, *Cytherapy* 7 (2014) 1011-23.
- Lopez-Ramirez MA, Dominguez-Monzon G, Vergara P, Segovia J, Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling, *Int J Dev Neurosci* 26 (2008) 497-503.
- Martinelli DC, Fan CM, Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling, *Genes Dev* 10 (2007) 1231-43.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM, ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics, *BMJ* 321 (2000) 624-628.
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC, Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer, *Clin Cancer Res* 2 (2002) 361-7.
- Morandi A, Plaza-Menacho I, Isacke CM, RET in breast cancer: functional and therapeutic implications, *Trends Mol Med* 17 (2011) 149-157.
- Moulder S, Hortobagyi GN, Advances in the Treatment of Breast Cancer, *Clin Pharmacol Ther* 83 (2008) 26-36.
- Musgrove EA, Sutherland RL, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer, *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 631-43.
- NCI Web site, <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>
- Neuzillet C, Hammel P, Tijeras-Raballand A, Couvelard A, Raymond E, Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Metastasis Rev* 32 (2013) 147-62.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J, Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization, *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 274-284.

- O. Schueler-Furman, E. Glick, J. Segovia, M. Linial, Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?, *Trends Pharmacol Sci* 27 (2006) 72-77.
- Pandey V, Qian PX, Kang J, Perry JK, Mitchell MD, Yin Z, Wu ZS, Liu DX, Zhu T, Lobie PE, Artemin stimulates oncogenicity and invasiveness of human endometrial carcinoma cells, *Endocrinology* 151 (2010) 909-920.
- Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF, The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands, *Cell* 113 (2003) 867-879.
- Ramos JW, The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells, *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2008) 2707–2719.
- Rochlitz CF. Gene therapy of cancer, *Swiss Med Wkly* 131 (2001) 4-9.
- Ruaro ME, Stebel M, Vatta P, Marzinotto S, Schneider C, Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity, *FEBS Lett* 481 (2000) 159-163.
- Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP, Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights, *Prog Neurobiol* 86 (2008) 186-215.
- Sahni A, Arévalo MT, Sahni SK, Simpson-Haidaris PJ, The VE-cadherin binding domain of fibrinogen induces endothelial barrier permeability and enhances transendothelial migration of malignant breast epithelial cells, *Int J Cancer* 125 (2009) 577-84.
- Sariola H, Saarma M, Novel functions and signalling pathways for GDNF, *J Cell Sci* 116 (2003) 3855-3862.
- Schmutzler BS, Roy S, Pittman SK, Meadows RM, Hingtgen CM, Ret-dependent and Ret-independent mechanisms of Gfl-induced sensitization, *Mol Pain* (2011), 7:22.
- Schneider BP, Miller KD, Angiogenesis of breast cancer, *J Clin Oncol* 23 (2005) 1782-1790.
- Schneider C, King RM, Philipson L, Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells *Cell* 6 (1988) 787-93.
- Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M, Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci* 27 (2006) 72-7.
- Seol MB, Bong JJ, Baik M. Expression profiles of apoptosis genes in mammary epithelial cells. *Mol Cells* 20 (2005) 97-104.
- Spagnuolo R, Corada M, Orsenigo F, Zanetta L, Deuschle U, Sandy P, Schneider C, Drake JC, Breviario F, Dejana E, Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis, *Blood* 103 (2004) 3005-3012.
- Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C, The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein, *FEBS Lett* 481 (2000) 152-158.
- Stine ZE, McGaughey DM, Bessling SL, Li S, McCallion AS, Steroid hormone modulation of RET through two estrogen responsive enhancers in breast cancer, *Hum Mol Genet* 20 (2011) 3746-56.
- Stoff-Khalili MA, Dall P, Curiel DT, Gene therapy for carcinoma of the breast, *Cancer Gene Ther*, 7 (2006) 633-47.
- Tang JZ, Kong XJ, Kang J, Fielder GC, Steiner M, Perry JK, Wu ZS, Yin Z, Zhu T, Liu DX, Lobie PE, Artemin-stimulated progression of human non-small cell lung carcinoma is mediated by BCL2, *Mol Cancer Ther* 9 (2010) 1697-1708.

- Thornton P, Hatcher JP, Robinson I, Sargent B, Franzen B, Martino G, Kitching L, Glover CP, Anderson D, Forsmo-Bruce H, Low CP, Cusdin F, Dosanjh B, Williams W, Steffen AC, Thompson S, Eklund M, Lloyd C, Chessell I, Hughes J, Artemin-GFRalpha3 interactions partially contribute to acute inflammatory hypersensitivity, *Neuroscience letters* 545 (2013) 23-28.
- Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, Klein J, Fridman E, Skarda J, Srovnal J, Hajdich M, Murray P, Kolar Z, Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis, *BMC Cancer* 7 (2007) 55.
- Weis SM, Cheresh DA, Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets, *Nat Med* 17 (2011) 1359-70.
- Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F, Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development, *Breast Cancer Res* 11 (2009) 209.
- Zamorano A, Lamas M, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J, Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis, *J Neurosci Res* 71 (2003) 256-63.
- Zarco N, Gonzalez-Ramirez R, Gonzalez RO, Segovia J, GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway, *Apoptosis* 17 (2012) 627-635.
- Zhao L, Pan Y, Gang Y, Wang H, Jin H, Tie J, Xia L, Zhang Y, He L, Yao L, Qiao T, Li T, Liu Z, Fan D, Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library, *J Biol Chem* 284 (2009) 26273-85.

ANEXO 1

Parte de los resultados obtenidos en este proyecto doctoral fueron publicados en la revista *Experimental Cell Research*:

A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. Jiménez A, López-Ornelas A, Estudillo E, González-Mariscal L, González RO, Segovia J. *Exp Cell Res*. 2014 Jun 30. pii: S0014-4827(14)00263-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.016. [Epub ahead of print]