



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis de expresión endotelial asociado a cáncer
de mama”.**

Tesis que presenta:

M. en C. Minerva Janini Mejía Rangel

Para obtener el grado de:

Doctora en ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

**Dr. Patricio Gariglio Vidal
Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

Este trabajo se realizó en el laboratorio 25 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la co-tutoría de Dr. Patricio Gariglio y en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), bajo la co-tutoría del Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Siendo becaria Conacyt desde septiembre del 2008 a agosto del 2012 con número de registro 203785.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores: Dr. Patricio Gariglio y Dr. Alejandro Zentella por guiarme durante la realización de este trabajo.

A mis asesores: Dra. Rosa María Bermúdez, Dr. Efraín Garrido, Dr. José Vazqu ez y Dr. Emilio C ordova por sus comentarios y consejos.

Al Dr. Luis  lvarez por su compromiso y apoyo como coordinador académico.

A la Dra. Lourdes Muñoz por su confianza y respaldo durante mi estancia en su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo de la beca otorgado con número de registro 203785.

Al Biólogo Enrique García Villa, al Dr. Rodolfo Ocadiz Delgado y a Lauro Macías González por su apoyo técnico y disposición durante el desarrollo del trabajo experimental.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos del IIB-UNAM/INCMNSZ por su apoyo técnico durante el desarrollo experimental.

Al Lic. en Inv. Biom dica Básica Alberto Cabrera Quintero del INCMNSZ por su ayuda en la realización del protocolo para la recolección de cordones umbilicales, 11-62-2014 aprobado por el comité de  tica del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

A la secretaria Gabriela Mora Macías por las facilidades brindadas.

DEDICATORIA

A mi abue Norma Huguet Soto y a Roberto Espinosa Neira.

A mis papas Cuauhtémoc Mejía Huguet y Rosa Rangel Ramírez y a mis hermanos: Azarel, Blanca, Edgar, Fernanda, Nilda y Amaya.

A mi tío Sergio Mejía Ontiveros.

A mi sobrino Logan Jesús Pineda Mejía.

A mis abuelos: Virgilio Mejía Ontiveros, Agapito Rangel Izaguirre y Cecilia Ramírez Jiménez.

A mis tíos: Janitzio Mejía Huguet, Ángela Gutiérrez, Mariana Mejía Ascencio, Sergio Mejía Ascencio y Martha Rangel Ramírez.

A mis primas: Yunuen, Yesta, Tzetzangari y Karen.

A mis amigos: Karla, Marco, Jenny, Chucho, Sihomara, Ale, Karen, Laura, Tere G., Loreta y Luis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	pág. vi
INDICE DE FIGURAS	pág. vii
INDICE DE TABLAS	pág. viii
RESUMEN	pág. 9
ABSTRACT	pág.10
INTRODUCCIÓN	pág. 11
Cáncer de mama	pág. 11
Epidemiología del cáncer de mama	pág. 12
Clasificación del cáncer de mama	pág. 13
Factores de riesgo para el cáncer de mama	pág. 15
Microambiente tumoral, inflamación y cáncer	pág. 16
Vía de señalización NfkB	pág. 19
Vía de señalización STAT3	pág. 24
Metástasis	pág. 27
Etapas de la metástasis	pág. 28
Teorías de la metástasis	pág. 30
Interacción entre células endoteliales y células tumorales:	
Extravasación	pág. 31
Papel de las células endoteliales en la progresión tumoral	pág. 37
JUSTIFICACIÓN	pág. 39
HIPÓTESIS	pág. 39
OBJETIVO GENERAL	pág. 40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	pág. 40
DISEÑO EXPERIMENTAL	pág. 41
MATERIAL Y METODO	pág. 42
RESULTADOS	pág. 55
DISCUSIÓN	pág. 84
CONCLUSIONES	pág. 96
PERSPECTIVAS	pág. 97
BIBLIOGRAFIA	pág. 98
ANEXO	pág. 106

ABREVIATURAS

CAMs: Moléculas de Adhesión Celular
CM: Medio Condicionado
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
ECs: Células Endoteliales
G-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
HUVEC: Células Endoteliales de Vena de Cordón Umbilical Humana
ICAM1: Molécula de adhesión Intercelular 1
IFN- γ : Interferon gamma,
I κ B α : Inhibidor de kappa B alfa
IL-6: Interleucina 6
IPA: Análisis de Vías por Ingenuity
JAK: Cinasa Janus
LPS: Lipopolisacarido
MMP2: Metaloproteasa 2
MMP9: Metaloproteasa 9
NCI-DAVID: Base de Datos para la Visualización, Anotación y el Descubrimiento Integrado
NEMO: Modulador Esencial de NF κ B
NF κ B: Factor Nuclear kappa B
PANTHER: Anotación de Proteínas a través de Relaciones Evolutivas
PECAM: Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas
RNA: Ácido Ribonucleico
SCF ^{β TrCP}: Complejo ubiquitina ligasa formado por subunidades Skp, Cullin y Fbox
STAT3: Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 3
STRING: Herramienta de Búsqueda para el Acceso a la Interacción de genes y proteínas,
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
TRADD: Dominio de Muerte Asociado a TNFRSF1A
TREM1: Receptor Desencadenado Expresado en Células Mieloides
VCAM1: Molécula de Adhesión Celular Vascular 1
VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VEGFR2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

INDICE DE FIGURAS

Figura #	Descripción	Pág.
1	Familias de proteínas NFκB, IκBs e IKKs.	21
2	Vías de señalización de NFκB.	23
3	Vía de señalización de STAT3.	25
4	Principales eventos en la formación de metástasis.	30
5	Comparación entre la extravasación de los leucocitos y la de las células cancerosas a través de la monocapa de células endoteliales.	34
6	Mecanismos de diapédesis de células tumorales.	37
7	Apariencia de los cultivos de células HUVEC y valoración de la fracción poblacional que expresa el marcador endotelial FvW.	55
8	Expresión del receptor de estrógenos alfa (REα) en las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30.	56
9	Patrón de bandeado de las proteínas secretadas por las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30.	57
10	Perfil de citocinas secretadas por las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30.	58
11	El medio condicionado de la línea ZR75.30 (MC-ZR75.30) induce un fenotipo pro-adhesivo y la expresión de moléculas de adhesión (CAMs) en células HUVEC.	60
12	Curva dosis-respuesta de MC-ZR75.30.	62
13	RNA total de células HUVEC empleado en el microarreglo.	63
14	Expresión del mensajero de VCAM1 en células HUVEC.	63
15	Análisis del número de integridad del RNA (RIN).	64
16	Mapas de componente principal (PCA) de los microarreglos.	66
17	Genes alterados en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF.	68
18	Los diez genes con mayor sobre-expresión o represión en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF.	69
19	Análisis bioinformático de ontología génica.	71
20	Red de asociación del transcriptoma de MC-ZR75.30 generada en STRING.	73
21	Red de asociación del transcriptoma de TNF generada en STRING.	74
22	Redes construidas en el programa Ingenuity (IPA) a partir de la lista de genes de células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF.	77
23	Validación de los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo de células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF mediante PCR en tiempo real.	78
24	Participación de la vía NFκB en el fenotipo adhesivo inducido por MC ZR75.30.	81
25	Activación del receptor 2 de VEGF y el factor de transcripción STAT3 en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30.	83

INDICE DE TABLAS

Tabla #	Descripción	Pág.
1	Elementos que contribuyen a la heterogeneidad del cáncer de mama.	11
2	Regulación de la metástasis	27
3	Moléculas de superficie celular endoteliales y sus contra-receptores en leucocitos y células cancerosas.	33
4	Anticuerpos utilizados en western blot.	48
5	Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-qPCR.	52
6	Valores de número de integridad del RNA (RIN), concentración y radio 260/280.	65
7	Vías canónicas alteradas en el microarreglo de HUVEC de acuerdo al análisis bioinformático realizado en IPA.	75
8	Reguladores moleculares alterados en el microarreglo de HUVEC de acuerdo al análisis bioinformático realizado en IPA y PANTHER.	76
9	Función de genes validados por RT-qPCR.	79

RESUMEN

El microambiente tumoral es un importante promotor de la tumorigenesis en todas las formas de cancer de mama y ha sido asociado con el riesgo a desarrollar metastasis en los diferentes subtipos de cáncer de mama, incluyendo los subtipos luminales que abarcan el 60% de las pacientes con cancer de mama.

Las propiedades adhesivas de las células endoteliales (CE) se ven afectadas durante la diseminación de las células cancerosas y están relacionadas con cambios funcionales de los receptores adhesivos. La contribución de los factores solubles tumorales en la adhesión tumor-CE representa una oportunidad terapéutica para interferir en la metastasis del cáncer de mama. El medio condicionado (MC) de las células tumorales puede ser utilizado como un modelo para estudiar el papel de las moléculas secretadas en el microambiente del tumor.

En el presente trabajo analizamos los cambios transcriptómicos asociados a un fenotipo pro-adhesivo en células endoteliales primarias humanas de cordón umbilical (HUVEC) tratadas con MC de la línea celular de cancer de mama ZR75.30 o con TNF durante 3 h. Algunos genes fueron seleccionados para validar el microarreglo mediante RT-qPCR. El análisis bioinformático identificó a NFκB como el principal regulador del fenotipo pro-adhesivo y esto se confirmó mediante la inhibición farmacológica de la vía NFκB utilizando el inhibidor BAY 11-7085.

Los cambios inducidos por el MC-ZR75.30 mimetizan aquellos inducidos por TNF y muestran cambios en la expresión de genes relacionados con inflamación, cicatrización, matriz extracelular, citocinas, metabolismo y comunicación celular. A pesar de la abundancia de G-CSF, IL-8, IL-6 y VEGF en el MC-ZR75.30 y la confirmación de la activación de las vías STAT3 y VEGFR2, los resultados sugieren una dominancia de NFκB como el principal regulador de la respuesta transcripcional de las CEs a las células de cancer de mama, promoviendo así la expresión de los receptores de adhesión celular.

ABSTRACT

Tumor microenvironment is an important promoter of tumorigenesis in all forms of breast cancer and has been associated with the risk of metastasis in the different breast cancer subtypes including the more frequent luminal subtypes that encompass 60% of cancer patients.

Adhesive properties of endothelial cells (ECs) are strikingly affected during cancer cell dissemination and are related to functional changes of adhesion receptors. The contribution of tumor secreted factors to tumor- EC adhesion represents a therapeutic opportunity for breast cancer metastasis. Conditioned medium (CM) of tumor cells can be used as a model to study the role of the secreted molecules to the tumor microenvironment.

We explored transcriptomic changes associated to a pro- adhesive phenotype in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with CM of the breast cancer cell line ZR75.30 or with TNF for 3 h. Selected genes were used to validate the microarray through RT- qPCR. The bioinformatic analysis identified NFκB as the main regulator of the pro- adhesive phenotype and this was confirmed by pharmacological inhibition of NFκB pathway with BAY 11- 7085.

The changes induced by ZR75.30- CM mimic those promoted by TNF and display changes in the expression of genes related to inflammatory response, wound healing, extracellular matrix, cytokines, metabolism and cell communication. Despite the abundance of G- CSF, IL- 8, IL- 6 and VEGF in the ZR75.30- CM and the confirmed activation of STAT3 and VEGFR2 pathways, our results suggest dominance of NFκB as a central controller of the transcriptomic response of ECs to breast cancer cells leading to expression of cell adhesion receptors.

I. INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama

El cáncer de mama es la enfermedad neoplásica más común en mujeres de occidente, siendo su metástasis, la principal causa de muerte; es una enfermedad clínicamente heterogénea (Tabla 1). El cáncer de mama se origina en el tejido mamario, el cual está formado por glándulas productoras de leche que se organizan en lóbulos y ductos que conectan a los lóbulos con los pezones. El resto de la mama está formado por tejido graso, tejido conectivo y linfático [1]. Con base en el perfil de expresión molecular se reconocen diferentes formas de cáncer de mama, del 10-15% de estas pacientes presentan formas agresivas de la enfermedad que se desarrolla en metástasis distales dentro de los 3 años posteriores a la detección inicial del tumor primario. Sin embargo, en el resto de los pacientes (85-90%), la manifestación de metástasis en sitios distales se detecta frecuentemente a los 10 años o más posteriores al diagnóstico inicial. La metástasis del cáncer de mama puede ocurrir en varios órganos, siendo los más comunes el hueso, pulmón, hígado y cerebro [1].

Tabla 1. Elementos que contribuyen a la heterogeneidad del cáncer de mama [2].

Clasificador	Clasificaciones/variables
Histológico	CDI NS, CLI, medular, neuroendocrino, tubular, metaplásico, mucinoso (A y B), inflamatorio, comedón, quiste adenoide, micropapilar.
Inmunopatológico	Estatus RE, estatus RP, estatus HER2
Transcripcional	Luminal A, luminal B, semejante al normal, basal/ semejante al basal, HER2, bajo en claudina, apocrino molecular
Genómico	17q12, basal complejo, luminal simple, luminal complejo, amplificado, mixto.
Hereditario	Mutaciones con pérdida de función de gen BRCA1 y/o BRCA2
Heterogeneidad genómica	Monogenómico, poligenómico
MiRNA	Múltiple
Epigenético	Múltiple
Microambiental	Presencia/activación de células inmunes locales (células T, células B, células dendríticas, macrófagos), fibroblastos, composición de MEC, fibroblastos asociados al tumor, angiogénesis, hipoxia
Macroambiental	Niveles hormonales sistémicos, IMC, estados del sistema inmunológico
Longitudinal	Características de CTC, características metastásicas
Otros	Heterogeneidad intratumoral

CDI: carcinoma ductal invasivo, NS: no especificado, CLI: carcinoma lobular invasivo, RE: receptor de estrógenos, RP: receptor de progesterona, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano, BRCA1 y 2: cáncer de mama 1 y 2 (Breast CAncer 1 y 2) MEC: matriz extracelular, IMC: índice de masa corporal.

Epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el mundo en mujeres, ocasionando 500,000 muertes cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo [3] . En 2008 fueron reportadas 460,000 muertes, de las cuales 269,000 (58%) ocurrieron en poblaciones de bajo y medio ingreso económico, mientras que 68,000 (15%) se reportaron en personas de entre 15-49 años en países de bajo ingreso [4, 5]. El riesgo a padecer esta enfermedad aumenta en las mujeres de países con un nivel socioeconómico alto, pero el riesgo de morir por ella es mayor en las mujeres de países pobres, debido a la falta de acceso a la detección temprana, tratamiento y control [6].

En México, a partir del 2006 el cáncer de mama ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, [7] desplazando de esa posición al cáncer cérvico-uterino, contabilizando el 14% de muertes por cáncer [8]. En el 2010 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en las últimas dos décadas [9].

El análisis de mortalidad por área geográfica muestra diferencias notorias por entidad federativa, con las tasas más altas en los estados del norte y centro [7]. En el 2010, seis estados concentraron la mitad de las muertes por cáncer de mama: Distrito Federal (13.4%), Estado de México (12.4%), Jalisco (8.2%), Veracruz (6.4%), Nuevo León (6%) y Guanajuato (3.8%). En el periodo de 1990-2010, la tasa de mortalidad por cáncer de mama aumentó en todos los estados, principalmente en Chihuahua, Coahuila y Guerrero (en este último la mortalidad incremento de 1.8 en 1980 a 11.1 en 2009), con aumentos de más de 200%; en contraste, aquellos con menor elevación fueron Aguascalientes, Durango y Baja California (este último tenía 20.2 en 1980 y en 2009 la tasa registrada fue de 26.7, por lo que se mantiene con la tasa más alta del país) [9].

Estudios socioeconómicos han revelado que estas desigualdades probablemente favorecen la incidencia y mortalidad del cáncer de mama en los estados del norte [7]. Independientemente de la región geográfica el cáncer de mama se reconoce como un grave problema de salud pública en nuestro país.

Clasificación del cáncer de mama

Aunque el cáncer de mama se ha clasificado de muchas maneras; la clasificación basada en la histología que describe la ubicación, la organización de las células y su origen sigue siendo de gran utilidad clínica. Siguiendo estos criterios el cáncer de mama se divide en 5 tipos:

- Carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Es un trastorno canceroso no invasivo, donde se encuentran células anormales en el revestimiento del ducto. Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios [10].
- Carcinoma ductal infiltrante o invasivo. Se inicia en el conducto mamario, pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama; tiene una alta probabilidad metastásica en otras partes del organismo. Es el más común de los carcinomas de la mama y representa aproximadamente el 80% de los casos [11].
- Carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Se origina en los lóbulos y aunque no es un cáncer “verdadero”, aumenta el riesgo de que el paciente pueda desarrollar un cáncer en el futuro; pero rara vez llega a ser cáncer invasivo [12].
- Carcinoma lobular infiltrante o invasivo. Se origina en los lóbulos, pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo [11].

- Carcinoma inflamatorio. Es poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de crecimiento rápido, ocasiona enrojecimiento en la piel de la mama y aumenta su temperatura [13].

La clasificación de subtipos moleculares de cáncer de mama ha generado la posibilidad de tener un pronóstico más certero y predecir la respuesta de las pacientes a nuevas terapias, basándose en la expresión de los marcadores moleculares de cada subtipo. Estos subtipos moleculares fueron identificados mediante análisis de expresión génica por microarreglos y agrupamiento jerárquico y se dividen en los siguientes subtipos:

- Triple negativo: tumores cuyos marcadores son RE⁻, RP⁻ y Her2⁻. Representa del 10-17% de todos los carcinomas mamarios. Dependiendo del umbral utilizado para definir la expresión del RE y RP y del método para evaluar HER2 [14].
- Bajo en claudinas: Representa el 12-14% de los tumores, los marcadores moleculares que lo caracterizan son: Claudina-3/4/7^{Bajo}, RE⁻, vimentina⁺, E-cadherina^{Bajo}, y ZEB1⁺ [15, 16].
- Parecido al basal: Se caracteriza por una sobre-expresión de queratinas 5, 14 y 17 (Ker 5/14/17⁺), laminina, la proteína de unión a ácidos grasos 7, EGFR⁺, ESR1⁻, RE⁻, RP⁻ y Her2⁻. Representa el 15-20% de los tumores [16-18].
- Her2⁺ (ERBB2⁺): Se caracteriza por la elevada expresión de varios genes localizados en el amplicón 17q22.24 incluyendo a los genes ERBB2 (Her2⁺) y GRB7. Es negativo para el receptor de estrógenos (RE⁻). Representa el 10-15% de los tumores [16-18].
- Luminal A: Sus marcadores son la elevada expresión del receptor de estrógenos alfa (RE^{Alto}), la proteína de unión a GATA 3, proteína de unión a la caja X 1, Her2^{Bajo}, factor nuclear de hepatocitos 3 α , LIV1-regulado por estrógenos, entre

otros genes. Representa aproximadamente el 40% de los tumores mamarios [16-18].

- Luminal B: Se caracteriza por una elevada proliferación. Sus marcadores moleculares son: Her2⁺, Her2^{Bajo} o Her2⁻, RE^{Bajo} y RP menor al 20%. Representa aproximadamente el 20% de los tumores mamarios, [16-18].
- Luminal C: Este subtipo, se diferencia del luminal A y B por la elevada expresión de un grupo de genes nuevos de los cuales se desconoce su función, la cual es una característica que comparte con los subtipos ERBB2⁺ y parecido al basal [17].
- Parecido al tejido mamario normal: Este tipo de tumor se caracteriza por la elevada expresión de genes del tejido adiposo y tipos celulares no epiteliales. También tienen una fuerte expresión de genes epiteliales basales y baja expresión de genes epiteliales luminales [16-18]. Porcentaje variable menor al 5%.

Factores de riesgo para el cáncer de mama

Si bien el cáncer de mama se reconoce como una enfermedad multifactorial, existen factores que juegan un papel importante en su incidencia de esta enfermedad.

- Edad. La incidencia de cáncer mamario aumenta dramáticamente con la edad, ya que en el intervalo de edad de 20 a 30 años solo se presentan 10 casos por cada 100,000 mujeres; mientras que en mujeres de más de 60 años esta cifra aumenta a 200 casos por cada 100,000 [19].
- Factores genéticos. Del total de casos de cáncer de mama, alrededor del 9% se debe a la predisposición genética asociada a mutaciones del gen BRCA1 y se ha

visto que en las mujeres con historial de cáncer de mama familiar el riesgo de padecer dicha enfermedad se incrementa [20].

- Factores hormonales. Diversos estudios han determinado que existe una relación directa entre la exposición a estrógenos y el desarrollo de cáncer mamario. La presentación de la menarca a edad temprana, menopausia tardía, primer embarazo a edad avanzada, falta de lactancia, terapia de reemplazo hormonal en la menopausia y un mayor número de años con ciclos ovulatorios se asocian con la aparición de cáncer de mama, presumiblemente por la exposición prolongada a los niveles fisiológicos proliferativos de los estrógenos [21].

Microambiente tumoral, inflamación y cáncer.

El tejido tumoral está formado por dos fracciones íntimamente asociadas. La primera fracción la constituyen las células tumorales. La segunda es el microambiente tumoral. Este compartimento contiene varios tipos celulares normales, incluyendo células endoteliales y sus precursores, pericitos, células de músculo liso, fibroblastos, fibroblastos asociados al tumor, miofibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células cebadas, linfocitos B y T, células asesinas naturales (NK) y células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas. Además de los elementos celulares, el segundo compartimento contiene numerosas moléculas como factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, anticuerpos, proteasas entre otros tipos de enzimas y una diversidad de metabolitos. Las moléculas que conforman este microambiente pueden provenir de las células tumorales o de las células normales y reflejan un complejo sistema de comunicación entre ellas [22-24].

La función del microambiente tumoral se percibe como un campo activo en el cual el tumor es dirigido hacia una o varias vías moleculares que le permiten adquirir un fenotipo particular a lo largo de la progresión tumoral. Una consecuencia de interés clínico es que hay diferentes microambientes tumorales que pueden conducir en mayor

o menor grado a un fenotipo metastásico. La interacción entre los componentes microambientales y el tumor es bidireccional, ya que las células tumorales y sus productos son capaces de regular la expresión génica de células no tumorales residentes o infiltradas en el microambiente. La acción conjunta de estos factores y los cambios de expresión génica que inducen, determinan el fenotipo y función de las células que conforman el microambiente tumoral. Actualmente es ampliamente aceptado que las interacciones de las células cancerosas con componentes de su microambiente son determinantes en la progresión de las células cancerosas hacia una metástasis o hacia un estado quiescente.

Existen numerosas interacciones tumor-microambiente que favorecen o interfieren en la progresión a un fenotipo maligno. Estas incluyen interacciones que conducen a proliferación o a muerte; así como angiogénesis, motilidad, quimiotaxis, invasión, evasión de la respuesta inmune, inflamación y metástasis. Las interacciones tumor-microambiente involucran moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y otros factores de crecimiento, enzimas y componentes de inmunidad innata y adaptativa, así como otras moléculas propias de las interacciones de la biología tumoral como angiogénesis, invasión, inflamación y transición epitelio-mesénquima [24].

La primera evidencia de que los componentes del tejido no canceroso pueden afectar la formación y crecimiento tumoral viene de estudios sobre la inflamación. El vínculo entre inflamación y cáncer fue reconocido desde 1863 por Rudolf Virchow, cuando reportó la presencia de leucocitos en tejidos tumorales [25]. Basado en esta observación, él propuso la idea de que el cáncer se origina en sitios de inflamación crónica. La presencia de leucocitos en tumores fue interpretada como un intento fallido del sistema inmune para eliminar al tumor. Esta observación fue rechazada por más de un siglo hasta que en años recientes se demostró que las células de inmunidad innata, en particular los fagocitos, tienen un papel preponderante en la promoción del proceso de carcinogénesis [23]. Además de la infiltración de leucocitos, la angiogénesis ha sido reconocida como otra reacción del estroma que promueve la progresión del proceso de carcinogénesis. Si bien hoy se reconoce que en etapas tempranas si se da una

respuesta celular del sistema inmune contra el tumor, los tumores que progresan logran controlar esta respuesta y terminan convirtiéndola en un proceso colaborativo. Es interesante que en los últimos años, la inflamación crónica y la neovascularización se reconozcan como procesos críticos, si no es que esenciales para la progresión del cáncer [26].

La inflamación crónica crea un microambiente local capaz de promover la progresión tumoral a través de una serie de interacciones recíprocas y dinámicas entre las células tumorales y las células inflamatorias [22]. Inicialmente, las células tumorales y las células del microambiente tumoral, responden a la hipoxia tumoral y necrosis secundaria causada por el excesivo crecimiento tumoral. Esta respuesta se da mediante la liberación de numerosos factores de crecimiento y citocinas que son quimioatrayentes de monocitos y macrófagos, incluyendo el factor estimulador de colonias de monocitos-granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento transformante (TGF- β), quimiocinas (CCL2, CCL7, CCL3, CCL4) y alarminas [27]. Por otro lado, el reclutamiento de macrófagos capaces de secretar factores de crecimiento que afectan el comportamiento de células tumorales, activa el endotelio tumoral y perpetúa la inflamación [28]. Los factores secretados por los macrófagos reclutados incluyen a las isoformas A y C del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de necrosis tumoral (TNF), miembros de la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y quimiocinas como CXCL12 e interleucina 8 (IL-8) [27, 29]. Monocitos y macrófagos también secretan mucha de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) presente en el ambiente tumoral [23]. La expresión de COX-2 y la producción de prostaglandinas dentro del ambiente tumoral estimulan la proliferación de la célula cancerosa, sobrevivencia, motilidad y también angiogénesis tumoral [30].

El proceso inflamatorio resulta en la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 α/β e interferón (IFN- γ). Un proceso de inflamación crónica no controlado se asocia con un aumento en la conversión de células normales a focos pre neoplásicos [23].

La activación de la familia de factores de transcripción nucleares kappa B (NFκB), es uno de los principales vínculos entre inflamación y tumorigénesis, lo que se suma a su participación en el escape de la apoptosis de células malignas y pre-neoplásicas [31, 32]. Además de los macrófagos, las células cebadas y neutrófilos pueden promover la progresión tumoral mediante una inflamación sostenida y secreción de citocinas, factores de crecimiento y proteasas [23].

Las citocinas inflamatorias pueden actuar como iniciadores y promotores de la carcinogénesis, incrementando directamente la proliferación de las células epiteliales. La inflamación también puede promover, indirectamente, la tumorigénesis, modulando el fenotipo y la función de células que regulan la inmunidad innata o adaptativa [33].

Dichos efectos pueden conducir al remodelamiento de tejido, angiogénesis, promoción de crecimiento y supresión del sistema inmune, todas características de una inflamación crónica asociada a un fenotipo supresor tumoral alterado con daño tisular típico de una inflamación aguda. Las células inflamatorias pueden producir citocinas anti-angiogénicas, como IL-12, TGF-β, entre otros, y suprimir el crecimiento tumoral bajo una estimulación específica. Sin embargo, en la mayoría de los tumores las células inflamatorias promueven crecimiento tumoral, angiogénesis, diseminación de células tumorales y remodelación del tejido. La mayoría de los tumores se asocian con la activación de inmunidad innata como respuesta antitumoral, mientras que la activación de la inmunidad adaptativa o específica es menos eficiente en la supresión del crecimiento tumoral [23].

Vía de señalización NFκB

La regulación de la expresión génica es un elemento central de la fisiología normal y es la clave de la capacidad de los organismos multicelulares para adaptarse al estrés ambiental, mecánico, químico y microbiológico. Debido a su importancia en enfermedades y a su facilidad en la experimentación, NFκB ha servido como un modelo estándar en el estudio de factores de transcripción [34]. El factor de transcripción NFκB

tiene un papel muy importante y conservado evolutivamente en la regulación del sistema inmune, sin embargo la regulación transcripcional mediada por NF κ B va más allá de la respuesta inmune, actuando ampliamente para influenciar eventos de expresión génica que impactan en la sobrevivencia, diferenciación y proliferación celular [34]. Recientemente ha quedado claro que la señalización por NF κ B tiene un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer. NF κ B provee la unión mecánica entre inflamación y cáncer y es el principal factor anti-apoptótico tanto de células pre-neoplásicas como malignas, basado en mecanismos de sobrevivencia tumoral. NF κ B también regula la angiogénesis e invasión tumoral, así como las vías de señalización que regulan su activación [31].

Los factores de transcripción NF κ B se ensamblan a través de la dimerización de las subunidades: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50/NF κ B1 y p52/NF κ B2 (Figura 1 A). La primera evidencia de la relación de NF κ B en cáncer, fue el reconocimiento de que *c-rel*, (homólogo celular del oncogen *v-rel*), codifica una subunidad de NF κ B, y que todas estas proteínas comparten el dominio de unión a DNA, conocido como “dominio de homología a Rel” (60). La sobre-expresión de proteínas Rel promueve la transformación oncogénica [31].

muchos de los cuales dependen también de otros factores de transcripción. Aunque es de vital importancia, esta vía denominada la vía clásica o canónica, es solo una de las dos vías principales que activan a los factores de transcripción NF κ B. La segunda vía, la vía alternativa o no canónica, promueve la activación de los heterodímeros p52:RelB y no es requerida para la activación de los dímeros p50:RelA [35]. A diferencia de la vía clásica, la cual es dependiente de IKK γ y de la actividad de IKK β , la vía alternativa es dependiente de los homodímeros IKK α , cuyo sustrato es el precursor de p52, p100/NF κ B2 [36]. p52 se une a RelB a través de su dominio de homología a Rel, localizado en el extremo amino terminal y mantiene el heterodímero en el citoplasma a través del dominio parecido a I κ B localizado en el extremo carboxilo terminal. La activación de los dímeros IKK α resulta en la degradación de estos últimos y la entrada del dímero p52: RelB al núcleo (Figura 2).

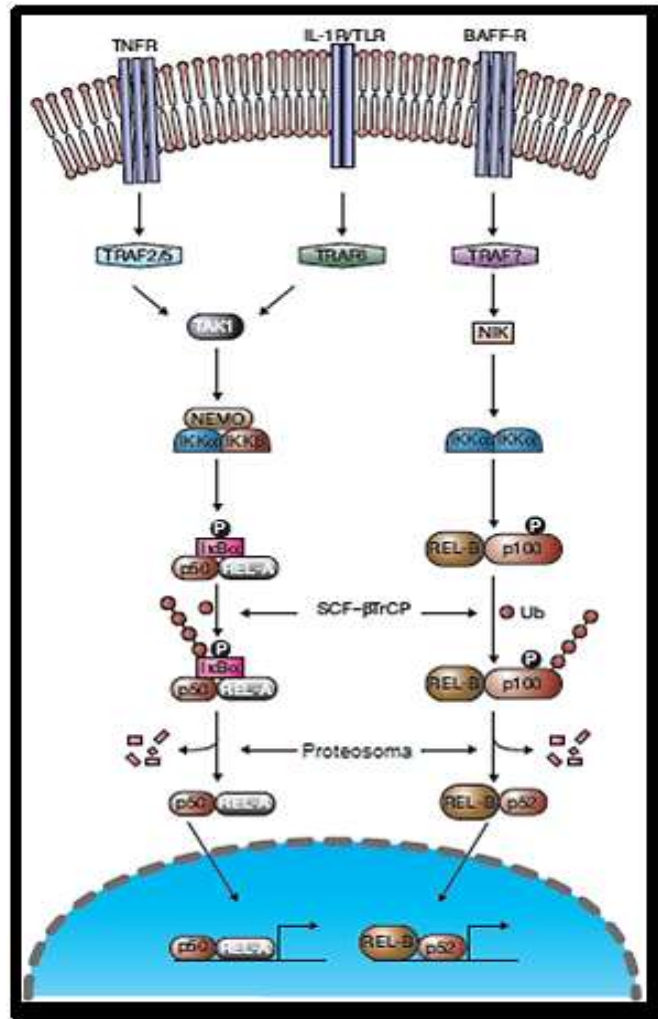


Figura 2. Vías de señalización de NFκB. En la vía canónica (izq.), la estimulación de los receptores de TNF (TNFR), el receptor IL-1 (IL-1R) o los receptores tipo toll (TLRs) con sus ligandos activa el factor asociado a TNFR (TRAF) y posteriormente a la proteína cinasa activada por TGF-β 1 (TAK1), que fosforila y activa a IKKβ. Después IKKβ fosforila a IκBα, lo que resulta en su ubiquitinación por el complejo de ubiquitina- ligasa SCF^{βTrCP} y posterior degradación por el proteosoma. El dímero NFκB, que consiste de p50 y REL-A, puede a continuación, entrar al núcleo para regular la expresión de genes blanco involucrados en inflamación, inmunidad y supervivencia celular. En la vía no-canónica (der.), un conjunto de receptores pertenecientes a la superfamilia de TNFR, como el receptor de células B para BAFF (BAFF-R), activa la cinasa NIK a través de un mecanismo desconocido. NIK después fosforila a IKK, que a su vez fosforila al precursor p100/ NFκB2. Posteriormente p100 es poliubiquitinado por el proteosoma y procesado en la subunidad madura p52. El dímero p52 y REL-B entran al núcleo para activar genes que son importantes para la maduración de las células B [37].

Aunque esta vía no está involucrada directamente en la inmunidad innata y la inflamación, es necesaria para la generación de órganos linfoides secundarios y para la maduración y sobrevivencia de células B [35]. Su relevancia en cáncer está asociada a translocaciones cromosomales en linfoma de células B, que remueven la región que codifica para el dominio parecido a I κ B de p100 [38]. Además, la vía alternativa se ha asociado a la carcinogénesis mamaria [39]. Se han identificado mutaciones que afectan otras subunidades de NF κ B en otros tipos de cáncer, especialmente en aquellos de origen linfoide [40].

Otra vía que puede conducir a la activación de NF κ B es independiente de IKK y está basada en la activación de la caseína cinasa 2 (CK2), la cual induce la degradación de I κ B α a través de su fosforilación en sitios del extremo carboxilo terminal [41]. Esta vía tiene un papel menor en la activación fisiológica de NF κ B, aunque puede contribuir a la carcinogénesis de la piel debido a que es activada en respuesta a la radiación ultravioleta [31].

La sobre-expresión de IKK α en células endoteliales promueve la motilidad de estas y la angiogénesis tumoral. Se ha visto que existe sobre-expresión de IKK α en la vasculatura tumoral comparada con la del endotelio normal. Esta función de IKK α en la angiogénesis tumoral se da a través de la vía canónica de NF κ B [42].

Vía de señalización STAT3

La señalización de receptores de citocinas a través de la vía JAK/STAT, es una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas. Casi 40 receptores de citocinas señalizan a través de la combinación de 4 miembros de JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) y 7 miembros de STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) [43].

STAT3 es un miembro de la vía de señalización JAK/STAT. Las proteínas STAT son una familia de factores de transcripción que se encuentran latentes en el citoplasma y contiene un dominio de unión al DNA en la región media, así como un dominio SH2

(homología a src 2) y un dominio de unión a fosfotirosinas en el carboxilo terminal. Una vez que STAT3 es activado ya sea por citocinas, factores de crecimiento, incluyendo al factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-6, así como por proteínas oncogénicas como Ras y Src. STAT3 es fosforilado en un residuo de tirosina por la cinasa JAK, conduciendo a la formación de homodímeros y heterodímeros y su migración al núcleo, dónde regulan la transcripción (Figura 3) [44].

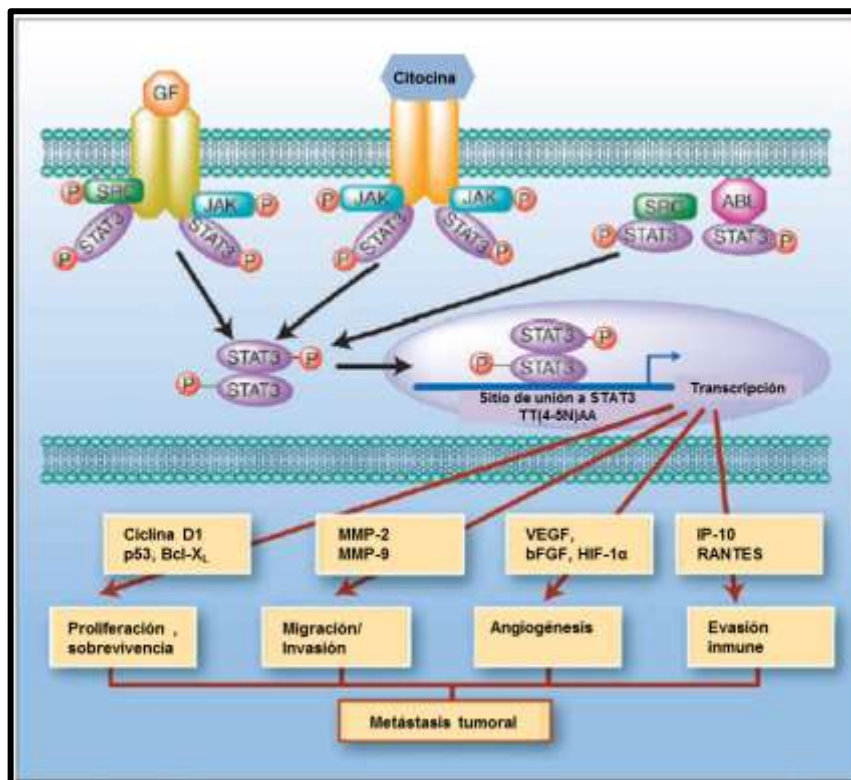


Figura 3. Vía de señalización de STAT3. STAT3 se localiza en el citoplasma de células sin estimular, STAT3 se puede activar mediante el reclutamiento de sus motivos de fosforilación a los complejos de los receptores de factores de crecimiento (EGFR), receptores de citocinas (IL-6) o tirosin cinasas (Src, BCR-ABL) a través de su dominio SH2. Posteriormente STAT3 es fosforilado en un residuo de tirosina por las tirosin cinasas (JAK, Src) activadas reclutadas en los complejos del receptor. STAT3 fosforilado forma homo y heterodímeros y se trasloca al núcleo, en el núcleo los dímeros se unen a promotores específicos para regular la expresión de genes asociados a proliferación celular, supervivencia, migración, invasión, angiogénesis y evasión del sistema inmune [44].

La inhibición de STAT3 está regulada por varias proteínas, que incluyen a la familia de supresores de la señalización de citocinas (SOCS3) y a las proteínas inhibidoras de proteínas STAT3 activadas (PIAS3) [44]. SOCS3 se une al loop de activación de JAK como un pseudosustrato inhibidor a través de su dominio SH2, bloqueando así la subsecuente señalización que requiere la fosforilación y activación de STAT3 [45]. Por otro lado, PIAS3 es un factor nuclear capaz de interactuar con STAT3 fosforilada y bloquear la transcripción [46].

Los efectos de STAT3 en la biología del cáncer están mediados en parte por la expresión de los genes blanco de STAT3, los cuales son esenciales en la sobrevivencia de la célula tumoral, crecimiento, angiogénesis, evasión del sistema inmune e invasión. La activación de STAT3 protege a las células tumorales de la apoptosis y promueve la proliferación por medio de la regulación de genes como: BCL-XL, MCL-1, BCL2, Fas, ciclina D1, survivina y c-Myc [44]. También induce el procesamiento de p100/NF κ B2 a p52, el cuál inhibe la apoptosis de las células tumorales [47]. Además, STAT3 reprime la transcripción del gen *TP53* mediante la unión a su promotor, afectando la apoptosis tumoral mediada por p53 [48]. El papel de STAT3 en la angiogénesis se evidenció cuando el VEGF se encontró como un blanco directo de STAT3 en células de melanoma murino [49]. STAT3 también regula indirectamente la transcripción de VEGF controlando la expresión del factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α) [50]. Asimismo, STAT3 puede activarse por la unión de PDGF y VEGF a sus receptores y transduciendo las señales del receptor en células endoteliales [51-53]. La activación de STAT3 es necesaria para la migración y proliferación endotelial, así como para la formación de tubos microvasculares [51-53]. La activación de STAT3 aumenta la migración e invasión mediante la regulación de la transcripción de las metaloproteinasas de matriz, entre ellas MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-10 en varias líneas celulares de cáncer [54-57].

Sin embargo, STAT3 también puede contribuir a la migración e invasión tumoral por medio de vías independientes de la transcripción, por ejemplo, por medio de la interacción directa con microtúbulos y adhesiones focales. STAT3 interactúa con la

cinasa de adhesión focal (FAK) fosforilada y con paxilina, para modular la invasión de las células [58].

Finalmente, se ha visto un papel ambiguo de STAT3 en la regulación de la inmunidad tumoral, ya que por un lado inhibe la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que activan la inmunidad tumoral, innata y adaptativa, como IFN- β , TNF, IL-6 e IP10 (proteína inducible de IFN- γ 10) y también promueve la expresión de VEGF e IL-10, que inhiben la maduración de células dendríticas y la activación de células T, aumentando así la tolerancia inmune [44].

Metástasis

La metástasis representa el paso final en la progresión del cáncer, y continúa siendo la primera causa de mortalidad entre los pacientes con cáncer [59]. La metástasis es un proceso que involucra numerosas funciones biológicas, que permiten que la célula cancerosa de un sitio primario se disemine y alcance órganos distantes donde se establece un foco de crecimiento tumoral secundario. Actualmente se proponen dos tipos de regulación en el fenómeno metastásico: a) Cambios intrínsecos de la célula tumoral como alteraciones genéticas y epigenéticas y b) La respuesta del huésped o microambiente tumoral [60, 61] (Tabla 2).

Tabla 2. Regulación de la metástasis[60].

Tipo celular	Inducción de metástasis	Inhibición de metástasis
Células tumorales	Producción de factores de crecimiento y sus receptores Producción de factores angiogénicos, pérdida de cohesión epitelial Motilidad, invasividad Agregación, deformabilidad	Antigenicidad Inhibidores de angiogénesis Cohesión epitelial (expresión de E-cadherina) Inhibidores tisulares de enzimas proteolíticas
Células del huésped	Receptores de superficie celular específicos y moléculas de adhesión Factores de crecimiento parácrinos y endócrinos Neovascularización Plaquetas y sus productos Células inmunológicas y sus productos	Barreras tisulares Turbulencia sanguínea, células endoteliales Inhibidores tisulares de enzimas proteolíticas Factores antiproliferativos Inhibidores de angiogénesis

El proceso metastásico es considerado una cascada secuencial y estocástica que involucra la intravasación de la célula tumoral, su diseminación a través de los compartimentos linfáticos y/o circulatorios, extravasación dentro de un órgano distante al tumor primario, angiogénesis, y finalmente crecimiento excesivo o colonización en un órgano distal [59]. Sin embargo, la formación de metástasis es un proceso ineficiente, debido principalmente a la necesidad de las células cancerosas de encontrar un microambiente apropiado para iniciar el crecimiento tumoral en un órgano secundario. Se ha propuesto que, para formar metástasis, los tumores primarios deben producir factores que inducen un ambiente apropiado y favorable en el órgano en el cual la metástasis pueda prosperar [23].

Etapas de la metástasis.

- 1) *Transformación celular y crecimiento tumoral.* Se caracteriza por la adquisición de mutaciones con ganancia en oncogenes, como la amplificación de Her2. El crecimiento de las células neoplásicas es progresivo y requiere de un aporte continuo de nutrientes para sostener la expansión del tumor primario, inicialmente es obtenido por simple difusión.
- 2) *Proliferación y angiogénesis.* La vascularización extensiva ocurre cuando la masa tumoral excede 1-2 mm en diámetro limitando la difusión de oxígeno y nutrientes. La hipoxia resultante induce la síntesis y secreción de factores pro-angiogénicos (VEGF, IL-8) y establece una red de capilares del tejido adyacente del huésped.
- 3) *Invasión.* La invasión local del estroma por algunas células tumorales ocurre a través de varios mecanismos paralelos. Estos implican la secreción o activación de proteasas de la matriz que le permitan romper las láminas basales y la matriz extracelular del estroma intersticial. Las células tumorales también deben poseer la capacidad de migrar para así invadir los tejidos circundantes. Es en esta etapa que la transición epitelio- mesénquima es muy importante.

- 4) *Intravasación (embolia/circulación)*. Las paredes delgadas de vénulas post-capilares y los canales linfáticos, ofrecen poca resistencia a la penetración de las células tumorales y proporcionan la ruta más común para la entrada de las células tumorales dentro de la circulación. La unión y el embolismo de una célula tumoral o agregados de estas ocurren después de que la mayoría de las células tumorales circulantes han sido rápidamente destruidas. Después de que las células tumorales han sobrevivido a la circulación, éstas son atrapadas en los capilares de órganos distales mediante la adhesión a las células endoteliales capilares a la membrana basal sub-endotelial que se encuentra expuesta.

- 5) *Extravasación*. El proceso de extravasación involucra la diapédesis de las células tumorales a través del endotelio. Similar a la extravasación de neutrófilos en sitios de inflamación, las células tumorales inicialmente se adhieren al endotelio formando interacciones débiles por medio de moléculas de adhesión antes de iniciar el rodamiento y finalmente formar uniones firmes antes de la diapédesis. En sitios específicos de metástasis en varios tumores se han descrito interacciones específicas entre el tumor y las células endoteliales [62].

- 6) *Colonización o micrometástasis*. La proliferación dentro del órgano invadido completa el proceso metastásico. Para continuar creciendo, la micrometástasis debe encontrar un microambiente favorable y promover el desarrollo de una red vascular y evadir la destrucción por las defensas del huésped. Las células tumorales pueden entonces invadir los vasos sanguíneos, entrar a la circulación y producir una metástasis adicional (Figura 4) [60]. Este es un proceso altamente ineficiente, con pocas células completando todas las etapas para establecer la metástasis.

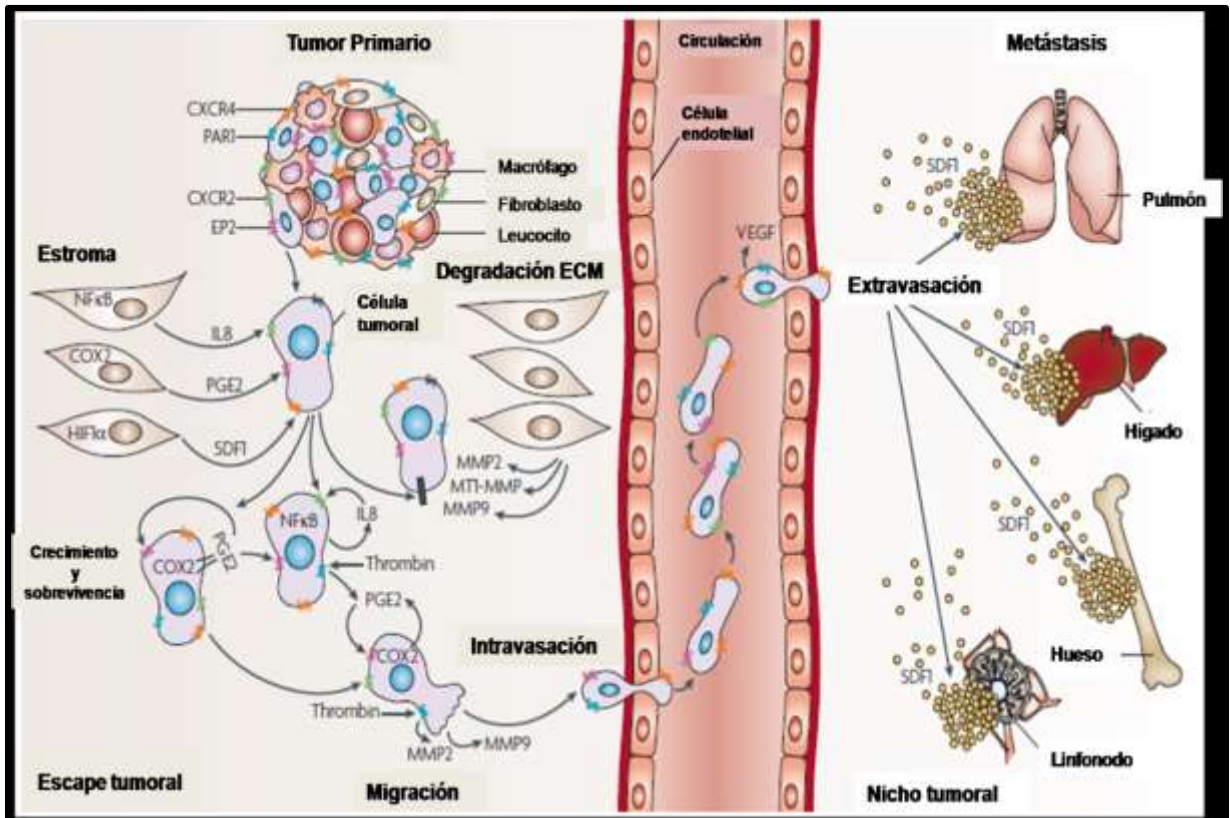


Figura 4. Principales eventos en la formación de metástasis. Las células del tumor primario degradan la matriz extracelular migran hacia el tejido adyacente, intravascan los vasos sanguíneos viajan a través del torrente sanguíneo hacia su órgano blanco, extravascan los vasos sanguíneos para colonizar y formar metástasis en su nuevo órgano blanco [60].

Teorías de la metástasis

Se han propuesto varias teorías para explicar la especificidad metastásica. La teoría del “nicho” sugiere que órganos dístales a sitios primarios de la enfermedad atrapan o arrestan activamente las células malignas por medio de la expresión de receptores de adhesión, como selectinas o factores quimiotácticos solubles como quimiocinas. Por otro lado, existe evidencia experimental que implica a los receptores de quimiocinas y a sus ligandos en el proceso de quimioatracción en la teoría del “nicho” [63, 64]. Además, la presencia de “direcciones moleculares” o receptores de adhesión sobre la membrana apical de células del endotelio vascular de órganos distales que permitan “atrapar”

específicamente a las células malignas circulantes, apoya el punto de vista del “arresto” activo de la teoría del “nicho” [65, 66].

En contraste, la teoría de la “semilla fértil” propone que diferentes ambientes en los órganos proveen de condiciones óptimas para el crecimiento de diferentes tipos de células tumorales circulantes. Si bien la teoría del “nicho” y de la “semilla fértil” parecen antagónicas, éstas no son necesariamente excluyentes. Se ha documentado que tejidos específicos y moléculas o mecanismos específicos del cáncer dirigen el viaje y sobrevivencia de las células malignas a un tejido ectópico. Por otro lado, las células inmunológicas activadas crónicamente (como ocurre en el proceso de inflamación) han emergido como reguladores funcionales importantes del desarrollo de un tumor primario así como también de la sobrevivencia y proliferación en tejidos ectópicos [61].

Originalmente se había postulado que las células metastásicas son el resultado de un proceso de micro-evolución de un tumor benigno a uno maligno. Sin embargo, los estudios moleculares de tumores primarios que progresaron a una condición metastásica han revelado que en el tumor primario se pueden identificar firmas genéticas asociadas a metástasis [67, 68].

Interacciones entre células endoteliales y células tumorales: Extravasación

Las interacciones entre las células tumorales y células normales circundantes son las fuerzas centrales y principales de la progresión tumoral, en la metástasis estas interacciones se dan principalmente con las células endoteliales. La angiogénesis es la interacción tumor-endotelio más conspicua y por ello ha sido extensamente estudiada. Otras interacciones críticas tumor-endotelio, no menos importantes, son la invasión al interior de vénulas o vasos linfáticos (intravasación) y la salida de las células cancerosas de la circulación, fenómeno conocido como extravasación [24].

La primera percepción acerca del proceso de extravasación de las células tumorales viene de estudios realizados en la extravasación de leucocitos, conduciendo a la hipótesis general de que las células tumorales experimentan interacciones dinámicas similares o idénticas a las de los leucocitos con las células endoteliales [69].

Las células endoteliales son activadas por citocinas pro-inflamatorias incluyendo interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF. Estas citocinas inducen la sobre-expresión de la familia de Moléculas de Adhesión Celular (CAMs) en el endotelio, las cuales facilitan la captura de los leucocitos. Moléculas de adhesión presentes en la superficie de las células endoteliales como Selectinas-E,-P y -L, se unen a CAMs parecidas a mucinas como Selectinas-P (PSGL-1) y otras moléculas como sialyl Lewis X o sialyl Lewis A (SLeX, SLeA) que contienen glicoproteínas en los leucocitos. Estas interacciones se vuelven más estrechas y favorecen el “rodamiento” sobre el endotelio (Tabla 3a). La baja afinidad en la interacción selectina-carbohidrato permite relajar la adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales [69].

Los leucocitos son pequeños en diámetro, aproximadamente 8 μm o menos, mientras que las células cancerosas tienen casi el doble de diámetro que los leucocitos, y no pasan tan fácil a través de los estrechos capilares de la vasculatura [70, 71]. Existe controversia entre si la extravasación de las células cancerosas es una consecuencia del atrapamiento dentro de los estrechos capilares o si requiere de adhesión intercelular específica con las células endoteliales de la microvasculatura. La teoría del atrapamiento mecánico postulada por James Ewing propone que las células cancerosas están establecidas en un sitio metastásico particular debido a la dirección de la corriente sanguínea y linfa, mientras que la teoría de la semilla fértil propuesta por Stephen Paget, atribuye la “siembra” de las células tumorales en un sitio secundario específico al suelo “nutritivo” provisto por un microambiente favorable presente en los órganos blanco. [60, 72].

La adhesión preferencial de las células cancerosas a células endoteliales particulares ha sido demostrada en estudios *in vitro* e *in vivo*, y apoya la evidencia de la adherencia tejido específica de las células cancerosas previo a la migración transendotelial (TEM), contrario al simple atrapamiento en la microvasculatura precedido por la ruptura del vaso sanguíneo (Figura 5) [69].

Tabla 3. Moléculas de superficie celular endoteliales y sus contra-receptores en leucocitos y células cancerosas [69].

(a) Moléculas de superficie en células endoteliales	Contra-receptor en leucocito
<i>Selectinas</i>	
E-selectina	PSGL-1;SLeA-,SLeX-glicoproteínas
P-selectina	PSGL-1;SLeA-,SLeX-glicoproteínas
L-selectina	PSGL-1;SLeA-,SLeX-glicoproteínas
<i>Inmunoglobulinas</i>	
ICAM	α L β 2 (LFA-1); α M β 2 (Mac-1)
VCAM	α 4 β 1 (VLA-4)
JAM	α L β 2
MadCAM	α 4 β 7
PECAM	α v β 3
<i>Integrinas</i>	
α β v3	L1
α 5 β 1 (VLA-5)	L1
(b) Moléculas de superficie en células endoteliales	Contra-receptor en célula cancerosa
<i>Selectinas/lectinas</i>	
E-Selectina	SLeA-,SLeX-glicoproteínas
P-Selectina	SLeA-,SLeX-glicoproteínas
Galectina 3	Glicoproteínas antígeno-TF: MUC1
<i>Inmunoglobulinas</i>	
ICAM	α 4 β 1 (VLA-4):MUC1
VCAM	CD44
L1	Av β 3
<i>Integrinas</i>	
α 4 β 1	VCAM:CD44
α 6 β 1	α 6 β 1
	β 4
<i>Otras</i>	
CLCA	α 6 β 4

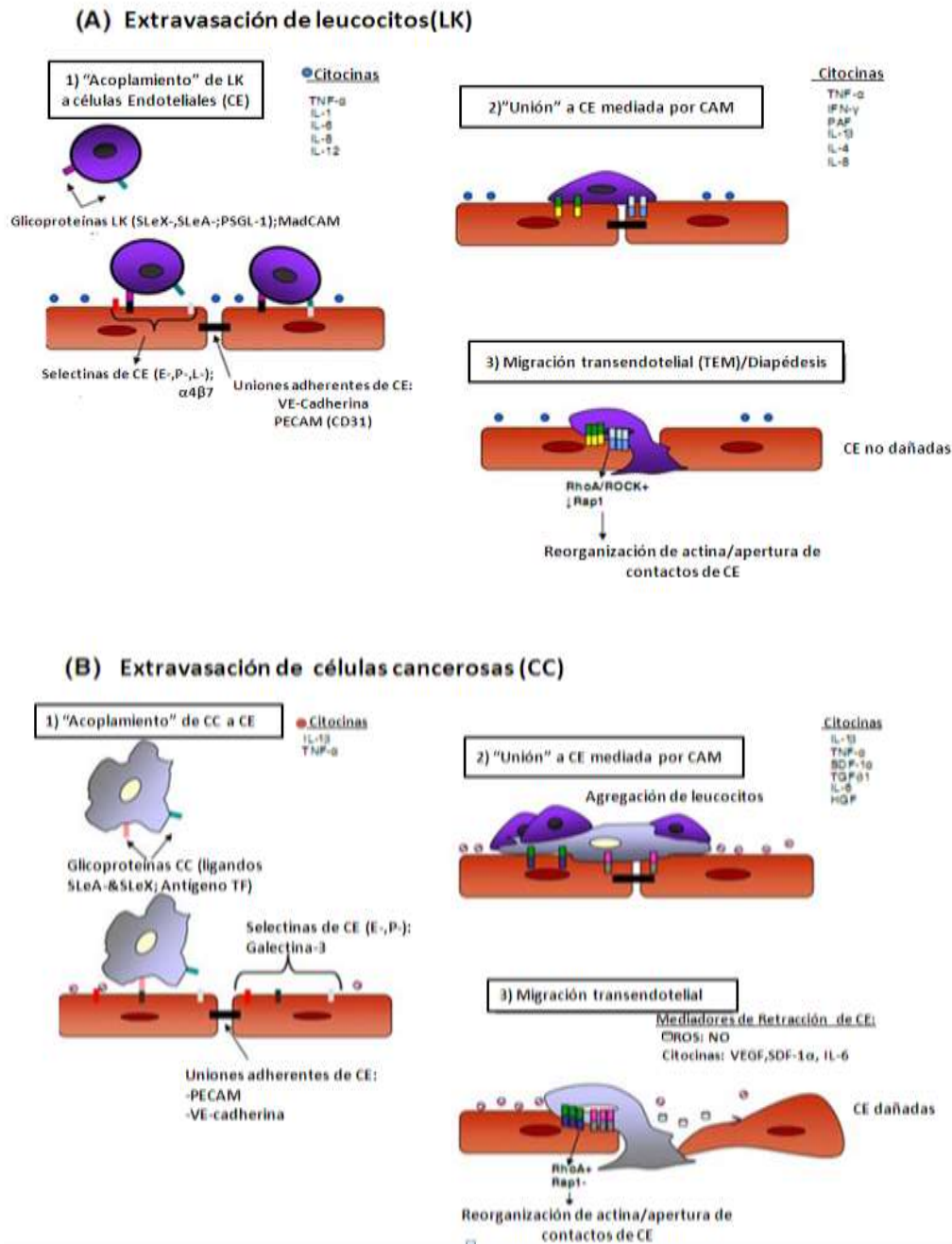


Figura 5. Comparación entre la extravasación de los leucocitos o de las células cancerosas a través de la monocapa de células endoteliales. Las diferencias principales se dan en las moléculas que actúan como ligando y receptor en el proceso de acoplamiento y en que las células tumorales llegan a dañar las uniones entre las células endoteliales al llevar a cabo la migración transendotelial, mientras que los leucocitos no causan este daño debido a la diferencia en tamaño entre un leucocito (8 μ m) y una célula tumoral (20 μ m) [69].

Aunque las células tumorales aparentemente forman adhesiones selectivas con el endotelio, es controvertido cómo el “rodamiento” controlado por las selectinas contribuye al arresto de las células tumorales. Mientras que la activación de leucocitos mediada por citocinas resulta en la interacción de selectinas con carbohidratos como ligandos. En el caso de los leucocitos, estas interacciones son responsables del rodamiento y la subsecuente adhesión [73], en contraste, el rodamiento de las células cancerosas es poco frecuente, pero ha sido observado [74]. Se ha visto que selectina-E controla el rodamiento de líneas celulares de cáncer de mama y colon en un endotelio activado con TNF en un sistema de flujo continuo [75]. El arresto de células de cáncer de mama y próstata al endotelio puede ser mediado por la unión de lectina y galectina-3 de las células endoteliales al antígeno Thomsen-Friedenreich (TF) expresado sobre la superficie de la célula tumoral (Tabla 3b) [76-78].

Células de cáncer colorectal humanas y murinas aumentan la producción de TNF de las células de Kupffer localizadas en vasos que rodean a las células tumorales metastásicas, las cuales inducen la expresión de selectinas-E y P así como de VCAM-1 e ICAM-1 [79]. Recientemente se vio que selectina-E promueve el arresto de células metastásicas de cáncer de colon, las cuales se unen subsecuentemente a VCAM-1 y atraviesan el endotelio [80]. Sin embargo, la evidencia de la unión de las células tumorales al endotelio mediada por selectinas como una precondition para una adhesión estable y subsecuente TEM sigue siendo controversial.

Algunas células cancerosas pueden formar adhesiones transitorias con células endoteliales para “acoplarse”, dicha adhesión está mediada por selectinas endoteliales y glicoproteínas de las células cancerosas. Esto seguido de interacciones más firmes y estables con el endotelio, mediadas por varias CAMs. La integrina $\alpha 4\beta 1$ interactúa con VCAM para mediar la adhesión de varias líneas celulares de cáncer *in vitro* [69]

En cáncer de mama, el entrecruzamiento de CD44 de la célula cancerosa, induce la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$, permitiendo la adhesión tumor-endotelio y TEM [81], y esta interacción activada por CD44, también estimula TEM en células de cáncer

de colon [82]. La molécula de adhesión endotelial PECAM es un ligando de $\alpha\beta3$, sin embargo no parece activar TEM mediada por la integrina $\alpha\beta3$ [83]. Existe evidencia de que la unión de MUC1, (inmunoglobulina con varios dominios de mucina extracelulares) a ICAM de las células endoteliales promueve TEM [84]. Las cadherinas también juegan un papel importante en la migración transendotelial de las células cancerosas [85, 86].

En contraste con la evidencia de que la adhesión de la célula tumoral al endotelio promueve TEM, existe evidencia de que la adhesión célula tumoral-endotelio sirve como una defensa contra la metástasis [87].

Las citocinas pueden activar células cancerosas y endotelio para mediar el “acoplamiento” y expresión de CAMs durante la formación de las adhesiones débiles entre la célula cancerosa y el endotelio, y pueden fortalecer estas interacciones para “unir” la célula tumoral a la célula endotelial [88]. Las CAMs presentes en las uniones endotelio-endotelio y tumor-endotelio juegan un papel muy importante en la reorganización de los contactos focales durante la diapédesis de la célula cancerosa a través del endotelio [69].

Tremblay y colaboradores describieron 3 mecanismos diferentes de migración transendotelial o diapédesis en células de cáncer de colon: 1) diapédesis paracelular a las uniones endoteliales, 2) formación de un mosaico quimérico de tejido tumoral y células endoteliales y 3) diapédesis transcelular (Figura 6) [89]. La mayoría de las células tumorales adheridas (75%), atravesó el endotelio insertándose con la capa de células endoteliales, creando un mosaico quimérico. Sin embargo, muchas de estas células no completaron la migración a través del endotelio. De las células que atravesaron el endotelio, solo 25% de las células de cáncer de colon completaron la diapédesis. Este proceso se dio por dos mecanismos, el primero mediante diapédesis paracelular (las células tumorales migran a través de las uniones entre las células endoteliales) el cual requiere señalización de selectina-E a través de ERK. El segundo, diapédesis transcelular, las células tumorales se adhieren a las células endoteliales induciendo retracción de las células endoteliales y engullendo a las células tumorales

dentro de vacuolas y transportadas a través de la célula. Este proceso resulta en la pérdida de contacto de la célula endotelial con la matriz extracelular, sin embargo, no es fatal para la célula endotelial [62, 89].

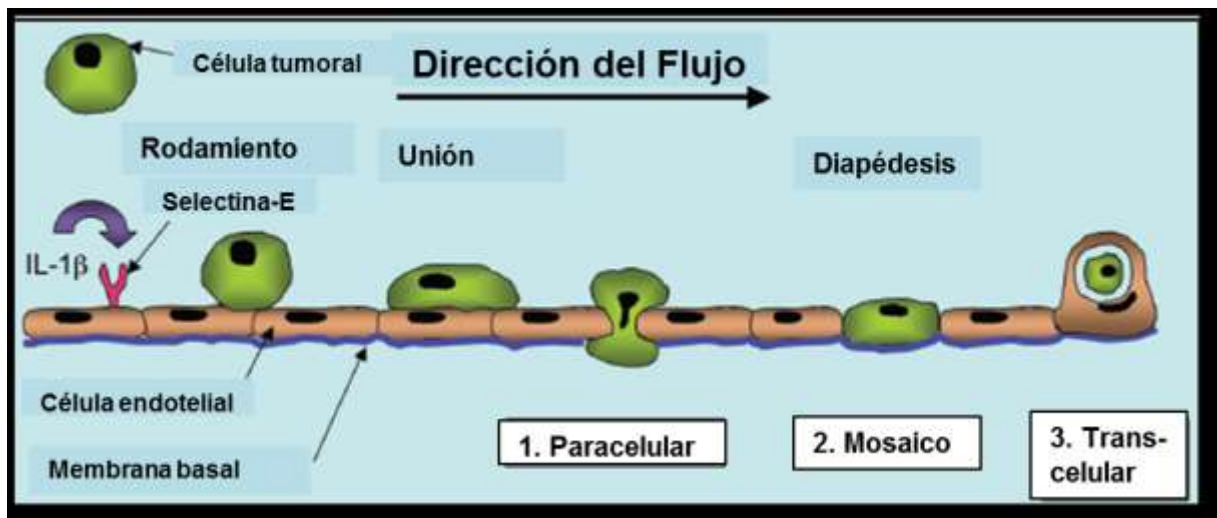


Figura 6. Mecanismos de diapédesis de células tumorales. Bajo condiciones de flujo, las células tumorales forman uniones débiles con el endotelio previo al rodamiento y a la formación de uniones firmes, mediadas por CAMs como selectina-E. Después de la adhesión firme las células tumorales inician la diapédesis a través del endotelio por: 1) diapédesis paracelular, a través de las uniones entre las células endoteliales, 2) Mosaico, formando una capa de células de ambos tipos celulares y 3) diapédesis transcelular, atravesando la célula endotelial dentro de vacuolas [62].

Papel de las células endoteliales en la progresión tumoral

Durante mucho tiempo se debatió la idea de si las células endoteliales normales y aquellas localizadas en el tumor compartían el mismo fenotipo. En la última década, ha sido reconocido que las células endoteliales en el tumor expresan un fenotipo diferente al de las células endoteliales en el tejido normal correspondiente [90, 91]. Utilizando un análisis serial modificado de ensayos de expresión génica, St. Croix y colaboradores compararon células endoteliales aisladas de cáncer colorectal y de mucosa colorectal normal. Este análisis condujo a la identificación de marcadores de endotelio tumoral

(TEMs por sus siglas en inglés Tumor Endothelial Markers), los cuales estaban sobre-expresados en el endotelio del cáncer colorectal y de otros tipos de tumores [90]. Varios TEMs estaban expresados abundantemente en vasos sanguíneos de embriones de ratones y humanos en desarrollo [92, 93]. Algunos TEMs fueron identificados como proteínas de superficie celular y otros están involucrados en la formación y la interacción con la matriz extracelular, y con su remodelamiento [91-94].

Modificaciones epigenéticas mediadas por DNA metiltransferasa [95] y desacetilasas de histonas [96] están involucradas en la regulación de la expresión génica endotelial y en la angiogénesis tumoral. Un estudio reciente sugiere que las proteínas clusterina, fibrilina 1 y quiescina Q6 funcionan como genes supresores de angiogénesis, siendo silenciados en células endoteliales expuestas *in vitro* a condiciones que imitan la angiogénesis tumoral [97]. Los resultados de este estudio llevan a la hipótesis de que el endotelio tumoral puede no estar sujeto al control fisiológico que limita normalmente la angiogénesis. Los resultados de que las células endoteliales en los tumores son diferentes en varios aspectos a las células endoteliales en el tejido normal correspondiente fueron confirmados por varios grupos [98-104]. Además de los estudios de expresión génica, también se han realizado análisis de expresión proteica por medio de 2D-SDSPAGE y espectrometría de masas utilizando cultivos primarios de células endoteliales (HUVEC) estimuladas con VEGF y medios condicionados de fibrosarcoma, para identificar las moléculas asociadas a la angiogénesis tumoral inducida por las moléculas secretadas por la célula tumoral [105].

La conclusión de dichos estudios, ya sea a nivel transcriptómico o proteico, es que el tumor directa o indirectamente, imprime sus huellas sobre las células endoteliales para de esta manera promover un fenotipo endotelial favorable al tumor. Moléculas específicas derivadas del microambiente tumoral pueden estar involucradas en las alteraciones fenotípicas de las células endoteliales tumorales [24, 93, 97].

II. JUSTIFICACIÓN

Las interacciones entre células cancerosas y células endoteliales juegan un papel central en la progresión tumoral y la metástasis. Un microambiente tumoral permisivo permite estas interacciones que son particularmente importantes para que el tumor primario pueda generar metástasis. Hasta ahora, se tiene bastante información acerca del papel que juegan las células endoteliales en los procesos de angiogénesis y la neo-vascularización tumoral. Sin embargo, la información sobre los cambios de expresión en las células endoteliales durante los eventos asociados a un proceso metastásico es escasa.

Por ello proponemos identificar y analizar cambios en la expresión transcripcional de células endoteliales tratadas con factores solubles derivados de células humanas de cáncer de mama con potencial metastásico.

III. HIPÓTESIS

La presencia de moléculas secretadas (medio condicionado) por células de cáncer de mama humano con potencial metastásico inducirá en células endoteliales humanas primarias, la expresión de moléculas esenciales para la activación endotelial y el fenotipo pro-adhesivo.

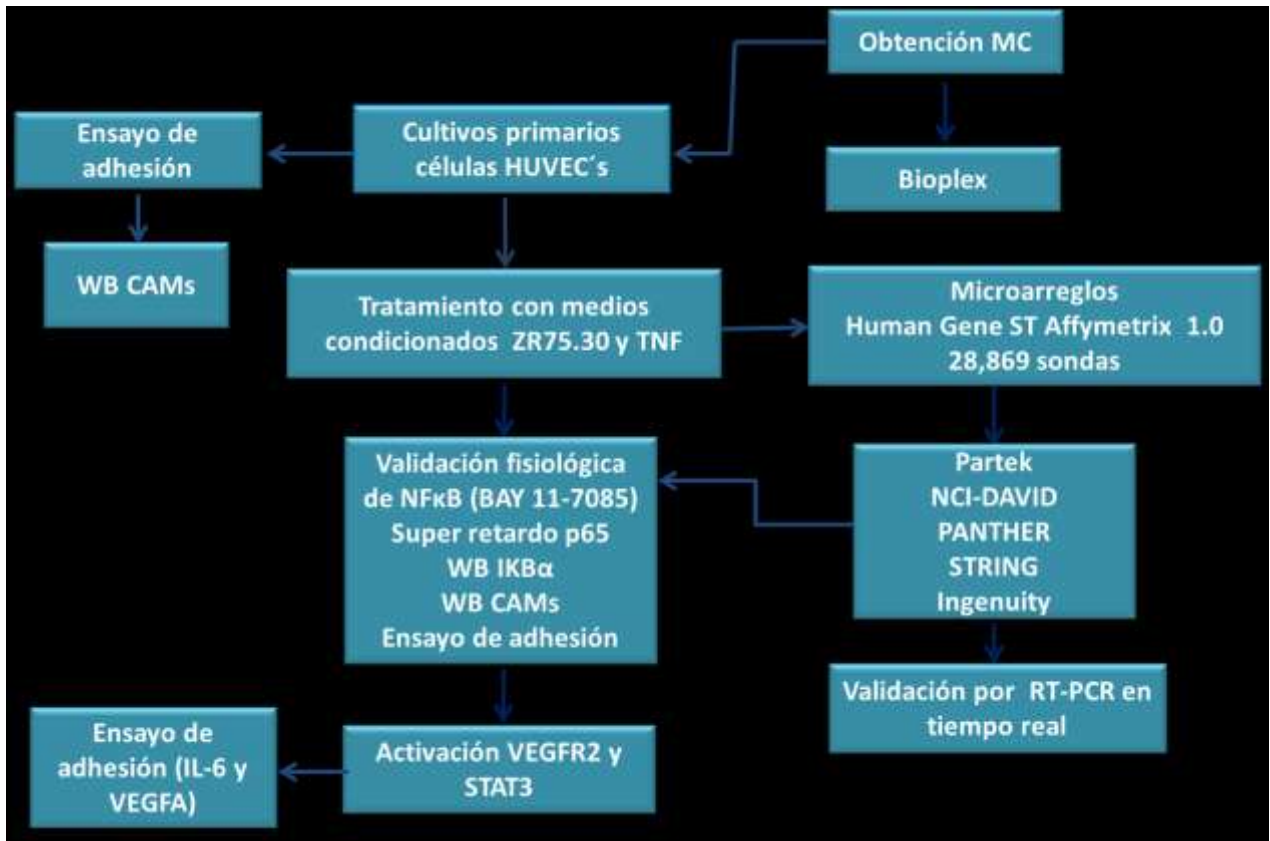
IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón global de expresión transcripcional de células endoteliales humanas primarias (HUVEC) tratadas con medios condicionados (MC) provenientes de células de cáncer de mama con potencial metastásico

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el perfil de expresión global de las células HUVEC tratadas con medio condicionado de la línea celular ZR75.30 mediante microarreglos.
2. Validar por PCR en tiempo real los resultados obtenidos del microarreglo de los mensajeros que presentan los cambios más significativos.
3. Confirmar la participación de la vía NF κ B en el proceso pro-adhesivo en las células HUVEC tratadas con medio condicionado de la línea celular ZR75.30.
4. Determinar la activación de STAT3 y VEGFR2 en el proceso pro-adhesivo inducido por los medios condicionados de la línea celular ZR75.30.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



VII. MATERIAL Y MÉTODO

Líneas celulares y cultivo celular.

Se utilizó la línea celular ZR75.30 derivada de fluido de ascitis de una mujer afroamericana pre-menopáusica de 47 años de edad con carcinoma ductal de glándula mamaria y la línea celular MCF-7 derivada de una efusión pleural de una mujer caucásica de 69 años de edad con adenocarcinoma de glándula mamaria. La línea celular monocítica humana U937, se derivó de un hombre de 37 años de edad con linfoma histiocítico difuso aislado. Las líneas celulares se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA). Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY), suplementado con 10% SFB (Gibco BRL, Grand Island, NY), y penicilina 10000 unidades/ml, estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25 µg/ml (PAA Laboratories GmbH, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ) a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂.

Obtención de cultivos primarios de células endoteliales HUVEC.

Se utilizaron cordones provenientes de mujeres gestantes sanas. Una vez cortado el cordón de la placenta se almacenó a 4°C en PBS/antibiótico (10000 unidades/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomycin y 25 µg/ml anfotericina B; PAA Laboratories GmbH, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ) como máximo 48 h. El resto del procedimiento se realizó dentro de una campana estéril, la vena del cordón umbilical se lavó colocando una cánula en la vena y fijándola con pinzas de presión, después se colocó un cinturón de plástico estéril debajo de las pinzas y se lavó varias veces con PBS para verificar que el cordón no estuviera roto, retirar sangre, coágulos y limpiar la vena; una vez lavado se colocó un cinturón en el extremo inferior del cordón y se agregó una solución estéril de colagenasa tipo II (*Clostridium histolyticum*, Gibco BRL, Grand Island, NY), al 0.02% diluida en HEPES 1X (150 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.5, 12 mM glucosa) y filtrada, hasta llenar el cordón buscando que quedara firme y evitando romperlo. Se incubó 15 min en solución salina en baño a 37°C y al finalizar se retiró la solución salina para después frotar el cordón a lo largo haciendo una

ligera presión. Se colocaron las pinzas arriba del cinturón inferior, se cortó entre las pinzas y el cinturón y se recuperó la solución de colagenasa del cordón dentro de un tubo con SFB para inactivar la enzima. Enseguida se vació el resto de la colagenasa a través del cordón y se lavó con PBS; el contenido del tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió con 1ml de medio M199 (Gibco BRL, Grand Island, NY), suplementado (10% SFB (Gibco BRL, Grand Island, NY), 5000u/l heparina (Lab. Pisa S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México, 177M90 SSA IV), 20 mg/l mitógeno endotelial, (Biomedical technologies Inc., Stoughton, MA) 2 M/l de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY) y 10000 unidades/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomicina y 25 µg/ml anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ), se sembró en cajas de cultivo de 3 cm de diámetro durante 24 h, pasado este tiempo, el cultivo se lavó con PBS para retirar leucocitos y detritos, después de los lavados se adicionó medio M199 suplementado. Las células se trabajaron en los primeros 3 pases.

Inmunofluorescencia.

Se sembraron 50,000 células HUVEC en porta objetos (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min y lavadas tres veces con PBS 1X. Se permeabilizó usando Triton X-100 al 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente. Enseguida, las células fueron lavadas dos veces con PBS y se agregó 50 mM NH₂Cl por 15 min. Las células fueron bloqueadas usando BSA al 3% en PBS durante 20 min. El anticuerpo anti-factor von Willebrand (M0616 clona F8/86; Dako, Carpinteria, California, USA.) fue usado 1:50 diluido en PBS-3% BSA por 2 h. Después se removió el anticuerpo primario y las células fueron lavadas tres veces con PBS durante 5 min cada uno. El anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA.) se usó 1:250 diluido en PBS-5%BSA por 40 min, las células se lavaron tres veces con PBS y una vez con agua MilliQ. Finalmente se montó y contratiñó la laminilla con VECTASHIELD® Medio de Montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole (1.5 µg/ml)) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). La microscopía confocal se realizó con el microscopio TCP-SP5,

Leica (Leica, Heidelberg, Germany), utilizando un objetivo con aceite de inmersión Plan Neo Fluor 63x (NA = 1.4).

Obtención de medios condicionados (MC).

Se sembraron las células ZR75.30 o MCF7 en placas P100 a 80% de confluencia con medio RPMI suplementado (5% suero de ternera/5% suero fetal bovino), pasadas 48 h se realizaron 5 lavados con 10 ml de PBS 1X/RPMI sin rojo fenol cada uno, y posteriormente se adicionó a cada placa 8 ml de medio RPMI blanco (Lab. Microlab S.A. de C.V., Mexico, D.F., Mexico) sin suplementar, se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó 15 min a 3000 rpm; se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70°C. Posteriormente el sobrenadante congelado se liofilizó y se dializó empleando una membrana para diálisis PM-3 ultra-filtration membrane (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA), previamente se hirvió la membrana durante 5 min en dH₂O estéril o milliQ. Se resuspendió el liofilizado en 1/10 del volumen original en dH₂O estéril y se mezcló en vórtex. Se centrifugó 15 min a 3000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se colocó en la membrana de diálisis. Se colocó la membrana en un matraz con 2 L solución salina (150 Mm NaCl) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Después de 24 h se cambió la solución salina y se dejó a 4°C toda la noche en agitación constante. Posteriormente se centrifugó el contenido de la bolsa de diálisis a 3000 rpm durante 10 min y se filtró el sobrenadante (medio condicionado) con filtro de 0.22 µm y se almacenó a 4°C. Para conocer la concentración y la integridad de las proteínas se realizó la cuantificación por el método de Bradford (Bio-Rad DC, Hercules, CA).

Tinción con Nitrato de Plata.

Se cargaron 3 µg de proteína en un gel SDS-PAGE al 10% y se tiñó con nitrato de plata: Se fijó por 30 min en solución fijadora (40% etanol absoluto, 10% ácido acético glacial, 50% dH₂O), se incubó 30 min en solución sensibilizadora (30% etanol absoluto, 6.8% acetato de sodio anhidro, 0.2% tiosulfato de sodio penta-hidratado, 0.125% glutaraldeído al 25%), se hicieron tres lavados de 10 min con agua desionizada, se incubó 30 min en

solución de plata (0.25% de nitrato de plata, 0.015% formaldehído al 37%), se realizaron dos lavados de 1 min con agua desionizada, se incubó por aproximadamente 10 min en solución de revelado (2.5% carbonato de sodio anhidro, 0.0074% formaldehído), finalmente se detuvo la reacción incubando el gel 10 min en solución de paro (1.5% Na₂EDTA y ácido acético 12%) y realizando tres lavados de 5 min con agua desionizada.

Ensayo de identificación de citocinas Bio-Plex.

La detección y cuantificación de citocinas se realizó con el sistema de detección múltiple de moléculas en suspensión Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, Cal.). El principio del método consiste en la combinación de dos técnicas: 1) ELISA que atrapa una proteína entre dos anticuerpos (uno de captura adherido a una superficie sólida y otro de detección que se marca con biotina), ambos anticuerpos específicos se unen mutuamente en sitios exclusivos de la proteína. 2) citometría de flujo, que puede separar y cuantificar células marcadas con fluorocromos, a partir de una mezcla. Siguiendo las recomendaciones del fabricante se utilizó una microplaca de 96 pozos y se colocaron 50 µl/pozo del cóctel de microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos. Enseguida se agregaron 50 µl/pozo de cada uno de los estándares y de las muestras de medio condicionado (MC-MCF7 y MC-ZR75.30); se dejaron en incubación durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante a 500 rpm. La detección de la proteína se realizó con un cóctel de anticuerpos policlonales marcados con biotina, se agregaron 25 µl/pozo del cóctel y se dejó incubando durante 1 h en las condiciones descritas. Enseguida se utilizó estreptavidina-ficoeritrina (como molécula reportera con marcaje fluorescente) y 50 µl/pozo de la dilución y se dejó, nuevamente, en incubación durante 30 min. Por último, las microesferas se resuspendieron en 125 µl de amortiguador de ensayo, con agitación de 1100 rpm durante 30 seg; entre cada uno de los pasos se realizaron tres lavados por aspiración, con solución amortiguadora de lavado. La lectura de la placa se realizó en la plataforma Luminex (Bio-Plex de Bio-Rad), en donde las esferas se aspiraron para hacerlas pasar por un canal en donde cada una es incidida por dos diferentes láseres. El primero, en rojo, excita la esfera y detecta el código de la

misma, discriminando entre una molécula y otra; el segundo láser (verde) excita el marcaje fluorescente y, de esta forma, cuantifica la señal emitida por cada una de las esferas. El equipo cuenta con un software que permite la utilización de métodos de regresión de cinco parámetros que dan como resultado la concentración en pg/ml de las citocinas.

Ensayo de adhesión.

Se sembraron 50,000 células HUVEC por pozo en una placa de 48 pozos en 1 ml de medio M199 suplementado 48 h previas al experimento. Se lavaron las células con medio M199 no suplementado o con PBS previo a la adición de los estímulos: 10 ng/ml de TNF (R&D Systems; Minneapolis, MN), 1, 10 y 100 ng/ml de IL-6 o VEGFA (Peprotech; Rocky Hill, NJ) o 9 µg/ml de proteína total de los medios condicionados de las células MCF-7 o ZR75.30. Para descartar la posible contaminación con LPS los medios condicionados se incubaron con polimixina B (10 µg/ml) durante 1h a 37°C, pasado este tiempo el estímulo se adicionó en un volumen máximo de 250 µL/pozo y se incubó por 3 h a 37°C. Todos los controles y tratamientos se realizaron por triplicado. Pasadas las 3 h de la incubación con el estímulo, este se retiró y se adicionaron células U937-³H. 48 h previas al experimento las células se marcaron con 1 µCurie/ml de timidina tritiada, centrifugando a 1500 rpm durante 10 min se retiró el medio con marca no incorporada; después se hizo un lavado con PBS y se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 10 min. Posteriormente se colocaron 200,000 células U937 marcadas con timidina resuspendidas en 500 µl de medio M199 suplementado/RPMI suplementado (1:1) a cada pozo. También se colocaron 200,000 células U937 marcadas con timidina en 3 tubos eppendorf de 1.5 ml; la placa y los tubos se incubaron 3 h a 37°C. Al finalizar la incubación cada pozo se aspiró y se lavó 2 veces con medio M199 o PBS para retirar las células U937-³H que no hayan sido adheridas a las células HUVEC. Posteriormente se agregaron 500 µl de NaOH 0.2 N y se incubó toda la noche a 37°C. Por otro lado, los tubos que contienen únicamente las células U937 marcadas con timidina tritiada se centrifugaron dos veces a 3500 rpm durante 5 min y se lavaron con PBS. Se agregaron

500 μ l de NaOH 0.2 N a los tubos y al igual que la placa se incubaron a 37°C toda la noche, finalmente se mezclaron 500 μ L de la solución de NaOH con ~2ml de líquido de centelleo, las cpm's fueron leídas en el contador β (1600 TR liquid scintillation analyzer, PACKARD a Canberra Company), además se realizó un análisis morfológico con azul tripano y se tomaron micrografías en el microscopio invertido de contraste de fases Nikon ECLIPSE TS 100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY).

Tratamiento de células HUVEC.

Las células HUVEC se sembraron en cajas P60 a un 90% de confluencia. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X, se trataron con 10 ng/ml de TNF o 9 μ g/ml de MC-ZR75.30 diluidos en medio M199 completo, se incubaron 3h a 37° C y como control se utilizaron células incubadas con medio M199 completo.

Western Blot.

Las células se lisaron con amortiguador RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 0.25% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF, 1X cocktail complete (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), 2 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₂MoO₄ y 5 mM NaF) y clarificados por centrifugación 10 min a 12,000 rpm; la concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry (Bio-Rad DC protein assay, Hercules, CA) y se cargaron 10-30 μ g de proteína total. Se agregó amortiguador de carga 5X (Tris-HCl 200 mM pH 6.8, EDTA 1 mM, SDS 6%, 2-mercaptoetanol 4%, glicerol 10%) y fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 7.5-10% y separadas aproximadamente 2 h a 100 V y transferidas a membranas de PVDF (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA), previamente activadas (15 seg en metanol y 2 min en H₂O MilliQ) y equilibradas en amortiguador de transferencia 1X (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, metanol 10%). La transferencia se realizó 3 h a 250 mA a 4°C en agitación constante. Se tiñó la membrana con rojo de Ponceau para verificar la transferencia. Se bloqueó la membrana durante 1h a temperatura ambiente con leche Svelty 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% o con BSA 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% para anticuerpos fosforilados. Se lavó con TBS-Tween 20 al 0.1% durante 5 min y se incubó con el

anticuerpo primario toda la noche a 4°C (Tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en western blot.

Anticuerpo	Cat./Fuente	Dilución	Incubación
VCAM1	sc-13160/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%-2%BSA
ICAM1	sc-8439/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%-1%BSA
Selectina-E	sc-14011/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%-3%BSA
RE α	sc-7207/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%
IKB α	sc-371/Santa Cruz	1:500	TBS-Tween 0.1%-3%BSA
p-STAT3(Y705)	#4113/Cell signaling	1:2000	TBS-Tween 0.1%-5%BSA
STAT3	sc-482/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%
p-VEGFR2 (Y1175)	#2478/Cell signaling	1:1000	TBS-Tween 0.1%-5%BSA
VEGFR2	#2479/Cell signaling	1:1000	TBS-Tween 0.1%
Calnexina	sc-11397/Santa Cruz	1:2000	TBS-Tween 0.1%
Lámina A/C	sc-7293/Santa Cruz	1:2000	TBS-Tween 0.1%
Lámina B1	sc-20682/Santa Cruz	1:1000	TBS-Tween 0.1%
β -Actina	A3854/Sigma-Aldrich	1:25000	TBS-Tween 0.1%
Anti-conejo-HRP	A9169/Sigma-Aldrich	1:10000	TBS-Tween 0.1%- 5% leche
Anti-ratón-HRP	A4416/Sigma-Aldrich	1:5000	TBS-Tween 0.1%

Después de la incubación con el anticuerpo primario, este se retiró y se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 20 al 0.1% y un último lavado de 5 min con TBS. Finalmente se reveló la señal quimioluminiscente utilizando placas de autoradiografía y el kit Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Thermo.

Desnudado de membrana.

Se incubó la membrana 2 veces durante 5 min con amortiguador de desnudado para PVDF (6 M GnHCl, 0.2% NP40, 100 mM beta-mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl pH 7.5)

en agitación suave, después se hicieron 4 lavados de 3 min cada uno con TBS-Tween 20 al 0.1% [106].

Extracción de RNA.

La extracción de RNA se realizó por el método de TRIzol (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA.), adicionando 500 µl de Trizol a placas de 60 mm con células HUVEC confluentes, se cosechó el extracto de células en Trizol y se colocó en un tubo eppendorf. Los tubos se agitaron para mezclar y se dejaron 5 min a temperatura ambiente, después se agregaron 100 µl de cloroformo, los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron 3 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 15 min a 12000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase superior y se le agregaron 250 µl de isopropanol; se incubó 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó 20 min a 12000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de EtOH 75%-agua libre de RNAsas, se centrifugó 5 min a 7500 a 4°C. Finalmente se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, una vez seca la pastilla se resuspendió con agua libre de RNAsas. Se hizo un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar la integridad del RNA y por último se cuantificó la concentración por espectrofotometría a 260nm.

Determinación del Número de Integridad del RNA (RIN).

La determinación del Número de Integridad del RNA (RIN) se realizó para determinar la integridad y calidad del RNA total, este análisis asigna un número que va de 0-10 siendo 10 el máximo valor y un indicativo de integridad y calidad. Para este análisis se utilizó el chip Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.) el cual consiste en una electroforesis capilar que detecta los fragmentos ribosomales 18S y 28S del RNA, así como la ausencia o presencia de fragmentos de degradación. El procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Microarreglos.

Para establecer el perfil de expresión génica e identificar los niveles de expresión génica se utilizó el microarreglo de expresión Affymetrix GeneChip® Exon and Gene 1.0 ST.

Las muestras se procesaron de acuerdo al protocolo wt sense target manual, del fabricante (Affymetrix, Inc.). El protocolo considera que a partir de una muestra con un contenido entre 100 - 300 ng de RNA se realiza la síntesis de una primera hebra de DNA complementario utilizando la transcriptasa reversa Superscript II y los hexámeros al azar que incorporan la secuencia del promotor de T7. La síntesis de la segunda hebra complementaria de cDNA se genera a partir del producto de la reacción anterior utilizando una DNA Polimerasa. El DNA de doble cadena generado se utiliza para generar una hebra de cRNA mediante una reacción de transcripción in vitro donde se obtendrán múltiples copias de RNA en antisentido. Este RNA se usó como templado para una nueva síntesis de cDNA mediante una reacción de transcripción inversa donde a diferencia de la primera se incorporan dUTPs, nuevamente se utilizaron oligos con el promotor de T7 y la Superscript II transferasa. Esta nueva cadena de cDNA se trató con uracil DNA glicosilasa y apurina apirimidina endonucleasa I (APE I) que reconoce específicamente los dUTPs presentes en la hebra, generando fragmentos de 40-70 nucleótidos. Los fragmentos se marcaron con estreptavidina utilizando el kit de marcaje patentado por Affymetrix. El DNA marcado se hibridó a los microarreglos y se incubó a 45°C durante 17 ± 1 h. Los microarreglos se lavaron con 2 amortiguadores uno de baja y otro de alta astringencia y se tiñeron con un anticuerpo anti-estreptavidina marcado con fluoresceína. Finalmente, los microarreglos se analizaron en un escáner de alta resolución y el análisis de calidad se realizó utilizando el programa Expresión Console de Affymetrix. Los datos obtenidos fueron importados al programa Partek Genomics Suite (Partek, Inc.) para determinar los genes expresados diferencialmente utilizando un valor de $p < 0.05$ y un diferencial de veces de cambio de 1.5 en ambas direcciones, positiva y negativa.

Análisis bioinformático

La clasificación ontológica (GO) se realizó utilizando NCBI-DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) [107] y para la construcción de las redes de asociación de los genes se utilizó el programa STRING (string-db.org) [108]. La determinación de las vías canónicas enriquecidas, reguladores moleculares y las redes con el programa

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). El programa PANTHER (www.pantherdb.org) se utilizó para la determinación de procesos biológicos y vías moleculares [109].

RT-qPCR

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) a partir de 2 µg de RNA, 1 µl de oligo dT, 1 µl de RiboLock inhibidor de RNAsa (20 U/µl), 4 µl de amortiguador de reacción 5X, 2 µl de mezcla de dNTPs 10mM, 2µl de enzima transcriptasa reversa M-MuLV (20 U/µl). Se incubó 1 h a 37°C y 5 min a 70 °C para inactivar la enzima.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl: 10 µl de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.), 3.8 µl de agua, 0.6 µl (0.3 µM) de oligo sentido, 0.6 µl (0.3 µM) de oligo antisentido y 5 µl (100 ng/µl) de cDNA. Se utilizó el termociclador 7300 ABI PRISM Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 5 min a 95° C, seguido de 40 ciclos a 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s. Se añadió la curva de disociación para analizar la especificidad de los oligos, la cual consistió en 1 ciclo a 95°C 15 s, 60°C 30 s, 95°C 15 s. Los oligos se diseñaron en primer-BLAST y se sintetizaron en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO.), la secuencia de los oligos se muestra en la Tabla 5. Los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [110].

Tabla 5. Secuencias de oligonucleotidos utilizados en RT- qPCR

Gen	Oligonucleotido sentido 5'→3'	Oligonucleotido antisentido 5'→3'	Número Genbank
ACTIN	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	NM_001101
ICAM1	GACCAGAGGTTGAACCCAC	GCGCCGGAAAGCTGTAGAT	NM_000201
SELE	CCGAGCGAGGCTACATGAAT	GCATCGCATCTCACAGCTTC	NM_000450
VCAM1	TGTTTGCAGCTTCTCAAGCTTTTA	GTCACCTTCCCATTTCAGTGGA	NM_001078
NFKBIA	CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC	GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA	NM_020529
CCL20	TGCTGTACCAAGAGTTTGCTC	CGCACACAGACAACTTTTCTTT	NM_004591
TNFAIP2	GGCCAATGTGAGGGAGTTGAT	CCCGCTTATCTGTGAGCCC	NM_006291
TRAF1	TCCTGTGGAAGATCACCAATGT	GCAGGCACAACCTTGTAGCC	NM_005658
CXCL2	TGCCAGTGCTTGCGAGAC	TCTTAACCATGGGCGATGC	NM_002089
PPP1R3C	GGTGGCACAGATAGTGATACCT	ACCATCATTGTTGTCCCAAAAAGA	NM_005398
IL6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	NM_000600
MAP3K8	CTCCCCAAAATGGACGTTACC	GGATTTCCACATCAGATGGCTTA	NM_005204
CDKN1B	TAATTGGGGCTCCGGCTAACT	TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC	NM_004064
NFKB2	GGGCCGAAAGACCTATCCC	CAGCTCCGAGCATTGCTTG	NM_002502
TGFB3	GGAAAACACCGAGTCGGAATAC	GCGGAAAACCTTGGAGGTAAT	NM_003239
SORBS1	CACAATCGAGAACAGCAAAAACG	ACCCGCCTACTGTGCATCCTTT	NM_001034954

Inhibición de la vía NFκB.

La inhibición de la vía NFκB se realizó utilizando el inhibidor específico de IKKs Bay1170-85 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), pre-incubando las células 1 h con 10 μM de inhibidor. Después de la pre-incubación las células se estimularon con 9 μg/ml de MC-ZR75.30 por 3 h para el western blot de las moléculas de adhesión y 20 min para el EMSA y el western blot de IκBα.

Fraccionamiento celular.

Las células HUVEC fueron lavadas con PBS 1X frío, raspadas y recolectadas, se centrifugaron 5 min a 3500 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y congeló el paquete celular en un baño de hielo seco-etanol por 1 min, se resuspendió en amortiguador hipotónico (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), se incubó en hielo 10 min, se centrifugó 10 min a

3500 rpm a 4°C. Se colectó el sobrenadante (fracción citoplásmica) y se lavó el botón en amortiguador

hipotónico, se centrifugó 10 min a 3500 rpm a 4°C, se resuspendió el botón en amortiguador hipertónico (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 25% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) se incubó 30 min en un agitador giratorio. Los extractos nucleares fueron recuperados por centrifugación a 14000 rpm por 20 min a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas usando reactivo de Lowry (Bio-Rad DC protein assay, Hercules, CA) y se realizó western blot contra lámina B1 y calnexina para determinar la pureza de los extractos.

Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) y súper retardo.

Como sonda se usaron oligonucleótidos de doble cadena con sitios específicos para NFκB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se usaron 20 pmol de cada oligonucleótido para marcar con [γ -³²P] ATP (0.5 ul) usando la enzima polinucleótido cinasa T4 (5 U), amortiguador 10 X (1μl) y agua desionizada, se incubó a 37°C por 30 min e inactivó la enzima 15 min a 65°C. El oligonucleótido marcado con ³²P (≈1 ng) fue incubado con 10 μg de extracto nuclear en una mezcla de reacción que contenía 1 μg poly dl-dC, HEPES 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, EDTA 0.2 mM pH 8, DTT 1 mM, glicerol 20%, BSA 10 μg, durante 20 min a temperatura ambiente. Para el súper retardo se utilizó, 1 μg de anticuerpo anti-p65 (sc-372X (C20)) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). El anticuerpo se incubó con el extracto nuclear por 30 min a temperatura ambiente, previa adición de la mezcla de reacción. Un exceso de cien veces de oligonucleótido sin marcar (NFκB) fue usado como competidor específico. Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6% en amortiguador EDTA-Tris borato 1X. Los complejos DNA-proteína se visualizaron en Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics, San Francisco, CA).

Curso temporal de activación de STAT3 y VEGFR2.

Las células HUVEC se ayunaron por 4 h previo al estímulo, se lavaron con PBS 1X y se trataron con 9 µg/ml de MC-ZR75.30 diluido en medio M199 sin suplementos durante, 5, 10, 30, 60, 120 y 180 min. Pasado el tiempo se hizo la lisis celular con amortiguador RIPA y se realizó el western blot.

Análisis densitométrico.

El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ NIH.

Análisis estadístico.

Los resultados son expresados como la media \pm error estándar (SE), y realizados con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple de Dunnett y ANOVA de dos vías con una corrección de Bonferroni. La probabilidad estadística considerada como significativa fue de $P < 0.05$. Todo el análisis estadístico fue realizado a partir de al menos tres experimentos independientes.

VIII. RESULTADOS

Aislamiento de células HUVEC primarias y valoración de la expresión del factor von-Wilebrand como marcador específico de células endoteliales.

El método de digestión enzimática empleado en la preparación de células endoteliales humanas primarias derivadas de la vena de cordón umbilical libera una diversidad de tipos celulares [111]. Los fibroblastos corresponden a la población contaminante más importante con una frecuencia menor al 1%. La apariencia de las células en cultivo es la de un epitelio poligonal ordenado (Figura 1B), que corresponde a la morfología reportada para las células endoteliales humanas primarias de cordón umbilical (HUVEC) [111]. Para monitorear la pureza del cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical, se realizó una inmunofluorescencia empleando un anticuerpo que reconoce al factor von-Wilebrand, (FvW) (Figura 7).

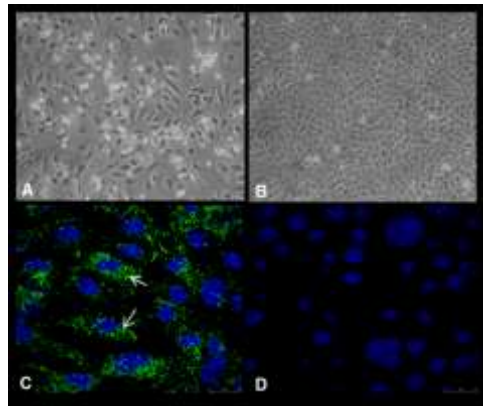


Figura 7. Apariencia de los cultivos de células HUVEC y valoración de la fracción poblacional que expresa el marcador endotelial FvW. A) Células HUVEC 24 h después de iniciar el cultivo. Las partículas refringentes corresponden a eritrocitos y fragmentos celulares. B) Cultivo primario totalmente confluyente; las células presentan la morfología poligonal típica de células endoteliales humanas primarias. C) Inmunofluorescencia empleando anticuerpos contra el Factor von Wilebrand (FvW) acoplados a fluoresceína; la fluorescencia verde está indicada por las flechas blancas. D) Células de cáncer cervical C33A como un control negativo de la expresión del marcador endotelial FvW.

Como se muestra en la Figura 7C, después de 24 h de cultivo, todas las células de los cultivos presentaron una tinción granular citoplásmica al emplear el anticuerpo contra el FvW. Este patrón coincide con la distribución citoplásmica esperada para las vesículas que constituyen los cuerpos de Weibel Palade. La ausencia de señal en las células humanas de cáncer cérvico-uterino que normalmente no expresan este factor, (Figura 7D) confirma la especificidad del anticuerpo primario. En base a los criterios morfológicos y marcadores antigénicos se puede concluir que los experimentos se realizaron con cultivos con una pureza del 100%.

La línea celular de cáncer de mama ZR75.30 es receptor de estrógenos alfa (RE α) negativa.

Con el fin de confirmar que las líneas celulares empleadas en la producción de medios condicionados corresponden a fenotipos: luminal A (positivo para el receptor de estrógenos alfa (RE α)) y luminal B (negativo para RE α), se realizó un western blot empleando anticuerpos contra este receptor. La figura 8 confirma una señal positiva para el RE α con el peso molecular esperado en los extractos totales de las células MCF-7 y ausencia de señal en los extractos de las células ZR75.30. Confirmando que los medios condicionados se obtuvieron de células de cáncer de mama con fenotipo RE $^{+}$ (MCF-7) y RE $^{-}$ (ZR75.30).

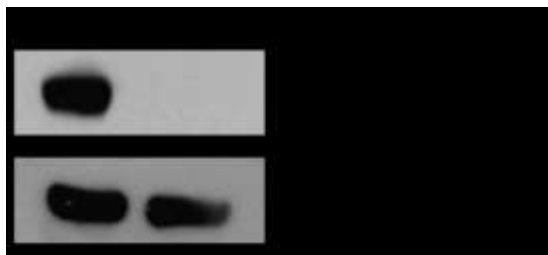


Figura 8. Expresión del Receptor de estrógenos alfa (RE α) en las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30. El nivel de expresión del receptor de estrógenos se determinó por western blot, utilizando extractos totales. La línea celular MCF-7 expresa fuertemente el receptor, mientras que la línea celular ZR75.30 no expresa el receptor. Se utilizó β -Actina como control de carga.

El medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama ZR75.30 está enriquecido en VEGF, G-CSF, IL-8, IL-6, TNF e INF- γ .

Para visualizar el patrón de bandeo de proteínas del medio condicionado de las células MCF-7 y ZR75.30, se realizó un gel SDS-PAGE seguido de una tinción con plata. La figura 3 muestra diferentes patrones de bandeo de los medios condicionados generados por las dos líneas celulares (Figura 9).

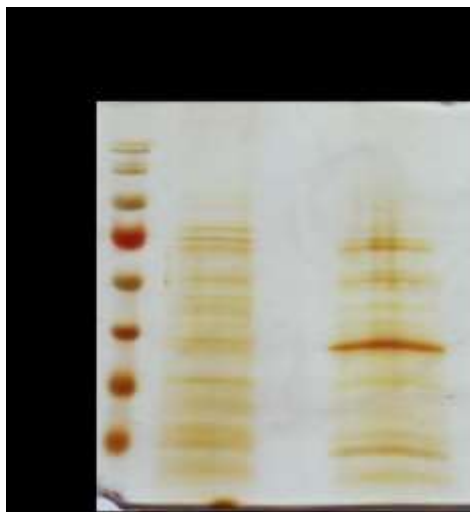


Figura 9. Patrón de bandeo de las proteínas secretadas por las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30. Gel SDS-PAGE al 10% teñido con nitrato de plata para visualizar el bandeo de proteínas de secreción de cada línea celular, utilizando 3 μ g de proteína total de cada medio condicionado. El carril de la izquierda muestra el marcador de peso molecular.

Considerando que previamente se había reportado la presencia diferencial de citocinas y quimiocinas en los medios condicionados de diferentes tipos de células de cáncer de mama, se empleó un panel de anticuerpos en un ensayo de ELISA-Bioplex de 24 analitos. El panel incluye: citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1Ra), pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12 (P70), IL-6, INF- γ , TNF, IL-15, IL-17), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, eotaxina y RANTES), factores de crecimiento (B-FGF, PDGF-BB y VEGF) y citocinas hematopoyéticas (IL-5, IL-7, IL-9, GM-CSF y G-CSF). Los analitos

más abundantes fueron VEGF, G-CSF e IL-8, su concentración fue tan alta que sobrepasó el límite de detección. En general, el medio condicionado de ZR75.30 contiene una mayor concentración de las citocinas analizadas, con la excepción de la quimiocina RANTES, que se encontró con mayor abundancia en el medio condicionado de MCF-7. Esta diferencia se puede deber a que la expresión de esta quimiocina es dependiente del receptor de estrógenos [112] (Figura 10).

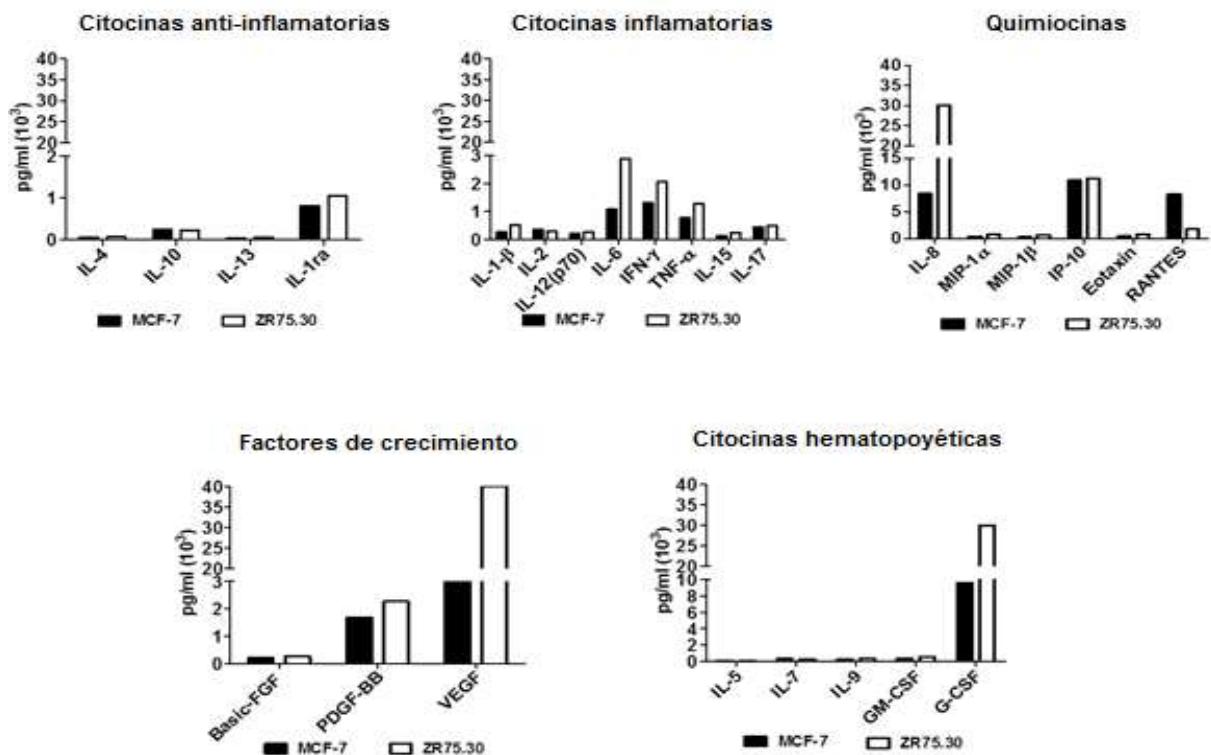


Figura 10. Perfil de citocinas secretadas por las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30. Se utilizó el sistema Bioplex de 24 citocinas para identificar algunas de las moléculas presentes en los medios condicionados. Las citocinas se agruparon en 5 grupos de acuerdo a su función en citocinas anti-inflamatorias, pro-inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y citocinas hematopoyéticas.

El medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama ZR75.30 promueve un fenotipo pro-adhesivo y la expresión de CAMs en células HUVEC.

Se valoró la capacidad de los medios condicionados de inducir un fenotipo endotelial capaz de adherir monocitos (células U937) en un ensayo in vitro.

Las células HUVEC fueron pre-tratadas con medios condicionados o TNF previo a la adición de los monocitos. El medio condicionado de la línea ZR75.30 induce una adhesión de 24.5% comparado con el 32.1% que induce TNF. El medio condicionado de la línea MCF-7 (MC-MCF-7) no indujo aumento en la adhesión con respecto al control (Figura 11A). Para evaluar cambios moleculares asociados al fenotipo adhesivo se realizó un ensayo de western blot para determinar cambios en la expresión de las moléculas de adhesión Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta al tratamiento con los medios condicionados. El medio condicionado de ZR75.30 (MC-ZR75.30) induce la expresión de las tres moléculas de adhesión al igual que TNF, mientras que el medio condicionado de MCF-7 no indujo expresión de ninguna de las tres moléculas (Figura 11B).

En respuesta al medio condicionado de las células ZR75.30, la expresión de ICAM-1 aumentó 7.29 veces comparada 6.59 con TNF, mientras que selectina-E aumento 5.16 veces comparada con 18.12 con TNF y VCAM-1 19.55 veces comparada con 45.97 con TNF. El western blot de VCAM-1 muestra una sobre-expresión de 9.83 veces de la isoforma glicosilada de VCAM-1 reportada previamente [113] comparada con 32.82 veces del tratamiento con TNF.

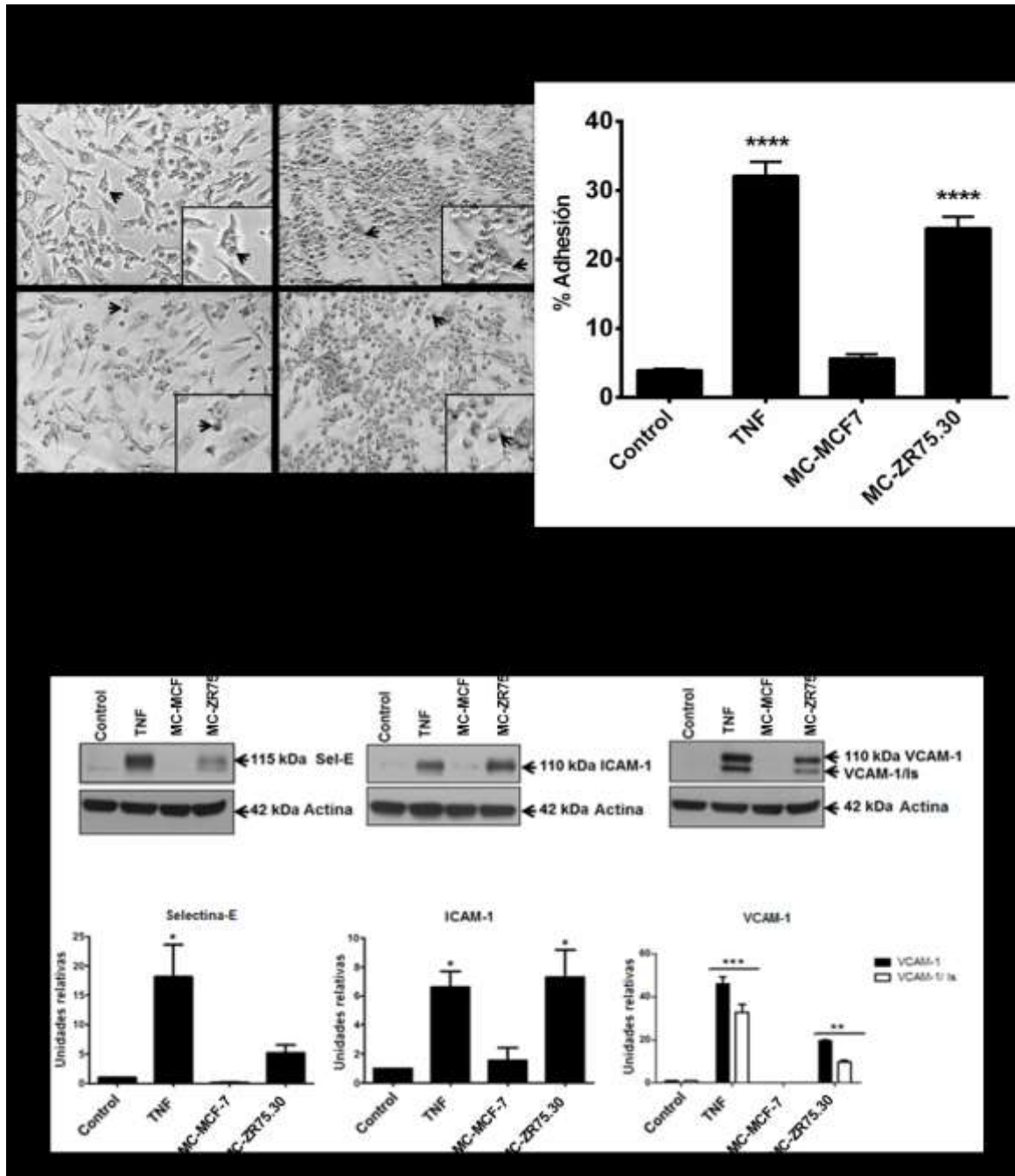


Figura 11. El medio condicionado de la línea ZR75.30 (MC-ZR7.30) induce un fenotipo pro-adhesivo y la expresión de moléculas de adhesión (CAMs) en células HUVEC. A) En las micrografías se muestra la monocapa de las células HUVEC y adheridas a ellas las células U937, la punta de flecha señala a las células U937 adheridas a las HUVEC y una magnificación de dichas células. Las células HUVEC fueron pre-tratadas con cada estímulo durante

3 h previo a la adición de las células U937. Se muestra la adhesión basal del control (células HUVEC sin estimular), la adhesión inducida por TNF (10 ng/ml), por el MC-ZR75.30 (9 µg/ml) y por el MC-MCF-7 (9 µg/ml), en el histograma se muestra el porcentaje de adhesión inducido por cada estímulo como el promedio \pm S.E. del porcentaje de las células adheridas totales en al menos tres experimentos independientes. **** $p < 0.0001$. B) Expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E y VCAM-1. En el western blot se emplearon extractos totales de HUVEC estimuladas 3 h con MC-ZR75.30 (9 µg/ml), MC-MCF-7 (9 µg/ml), o TNF (10 ng/ml) se observa una sobre-expresión de las tres moléculas comparado con el control sin estimular, también se observa que la sobre-expresión es mayor en el tratamiento con TNF. Se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se muestra el promedio (radio ICAM1/actina, Selectina-E/actina o VCAM1/actina) \pm S.E de los niveles de expresión relativa de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Optimización de las condiciones para la obtención de los RNAs analizados en el microarreglo.

Para determinar el perfil de expresión global del fenotipo pro-adhesivo se realizó un ensayo de microarreglos de células endoteliales estimuladas con medios condicionados provenientes de ZR75.30 o MCF-7 y se comparó con el perfil de expresión de células HUVEC inducido por TNF como control positivo, las células HUVEC sin estímulo se utilizaron como condición basal.

Se realizó una curva dosis respuesta para determinar la concentración óptima de proteína total de medio condicionado para estimular las células endoteliales. Como marcadores moleculares asociados al fenotipo adhesivo se utilizó a Selectina-E y VCAM-1 cuya expresión se monitoreó a través de un western blot en respuesta a diferentes concentraciones de medio condicionado, previamente se reportó que 3 h es el tiempo mínimo requerido para obtener una adhesión estable. Es por ello que únicamente se variaron las concentraciones y no el tiempo. La concentración óptima fue de 9 µg/ml ya que, a esta concentración VCAM-1 presenta un aumento considerable, siendo su máximo a 12 µg/ml, sin embargo, Selectina-E a esta concentración, muestra una expresión significativamente menor que a 9 µg/ml (Figura 12).

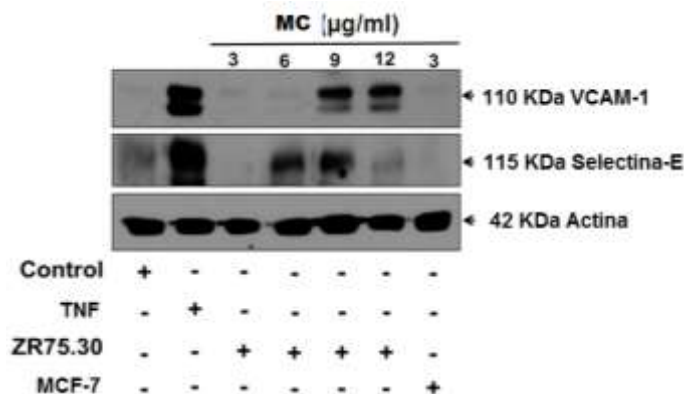


Figura 12. Curva dosis-respuesta de MC-ZR75.30. Western blot de selectina-E y VCAM-1, utilizando extractos totales de células HUVEC estimuladas 3 h con TNF (10 ng/ml), MC-ZR75.30 (3, 6, 9 y 12 µg/ml) y MC-MCF-7 (3 µg/ml). Como control, células HUVEC sin estimular. Se usó β -actina como control de carga.

Para realizar los microarreglos se utilizó RNA total extraído por el método de Trizol verificando la integridad de los RNAs ribosomales y el rendimiento en geles desnaturizantes con 0.5 ug de RNA total (Figura 13), previo a la hibridación en el microarreglo se realizó RT-PCR para analizar la expresión del mensajero de VCAM-1 y actina en cada una de las muestras de las diferentes condiciones, esto con el fin de tener un control de calidad de las muestras (Figura 14).

Dado que el medio condicionado de MCF-7 no induce adhesión ni expresión de moléculas de adhesión, no se realizó RT-PCR para medir el mensajero de VCAM1. Con el fin de tener un parámetro objetivo de la integridad de los RNAs también se determinó el número de integridad del RNA (RIN) mediante el chip Agilent; esto para elegir las muestras a utilizar en el microarreglo (Figura 15). Finalmente, el principal criterio de selección de las muestras a utilizar en el microarreglo se basó en la expresión homogénea del mensajero de VCAM-1 (Figura 16), es por ello que algunas de las muestras seleccionadas no presentan los mejores valores de RIN. Las muestras empleadas en los microarreglos se muestran marcadas (✓) en la Tabla 6. El microarreglo se realizó utilizando el chip Human Gene ST 1.0 de Affimetrix, que contiene 28,869 sondas.

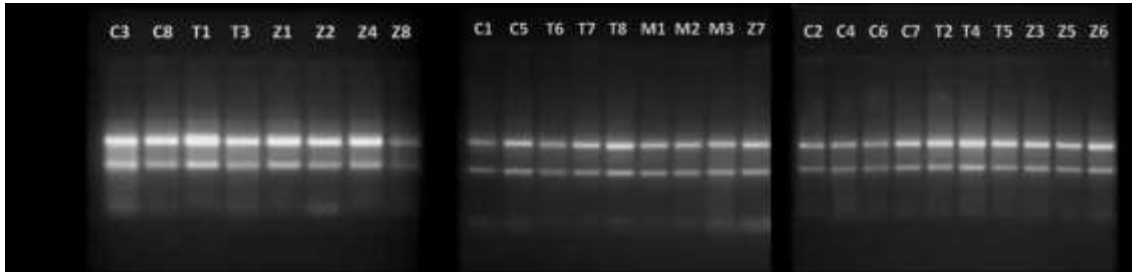


Figura 13. RNA total de células HUVEC empleado en el microarreglo. Análisis por electroforesis de los RNAs totales de células HUVEC tratadas durante 3 h con TNF (10 ng/ml), MC-ZR75.30 (9 µg/ml) o MC-MCF-7 (9 µg/ml). Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio mostrando bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S. Las letras corresponden a los tratamientos: control (C), TNF (T), ZR75.30 (Z) y MCF-7 (M), los números corresponden al número de la muestra.

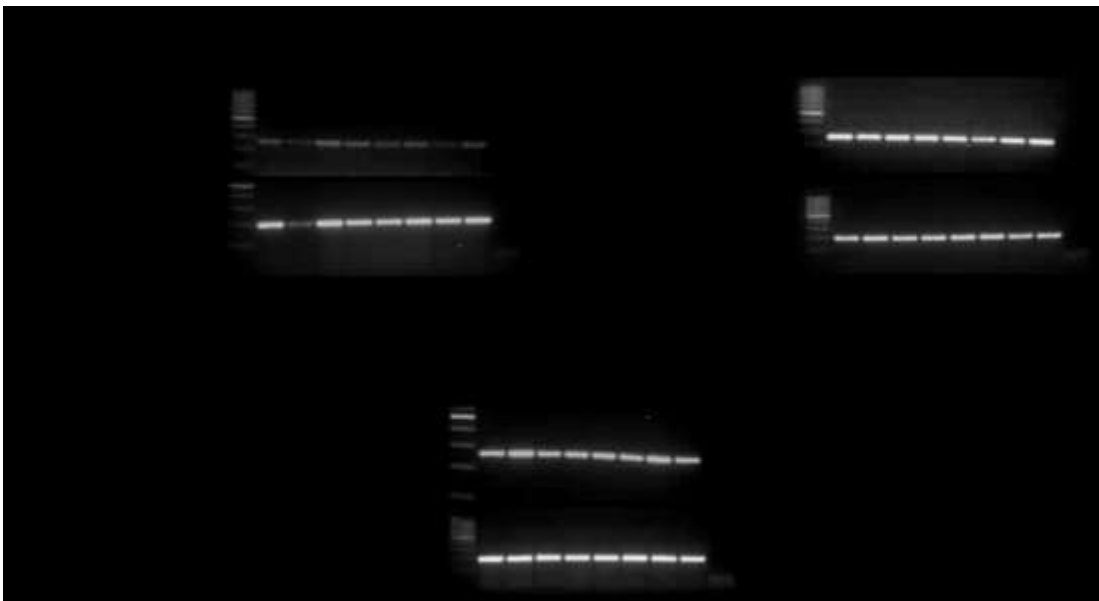


Figura 14. Expresión del mensajero de VCAM1 en células HUVEC. Geles de agarosa al 1% de las reacciones de RT-PCR punto final para analizar la expresión del mensajero de VCAM1 partiendo de 1 µg de RNA total y una PCR punto final de 30 ciclos. Como gen constitutivo se utilizó actina (194 pb). Las flechas señalan la banda en el peso correspondiente de acuerdo al marcador de peso molecular (M).

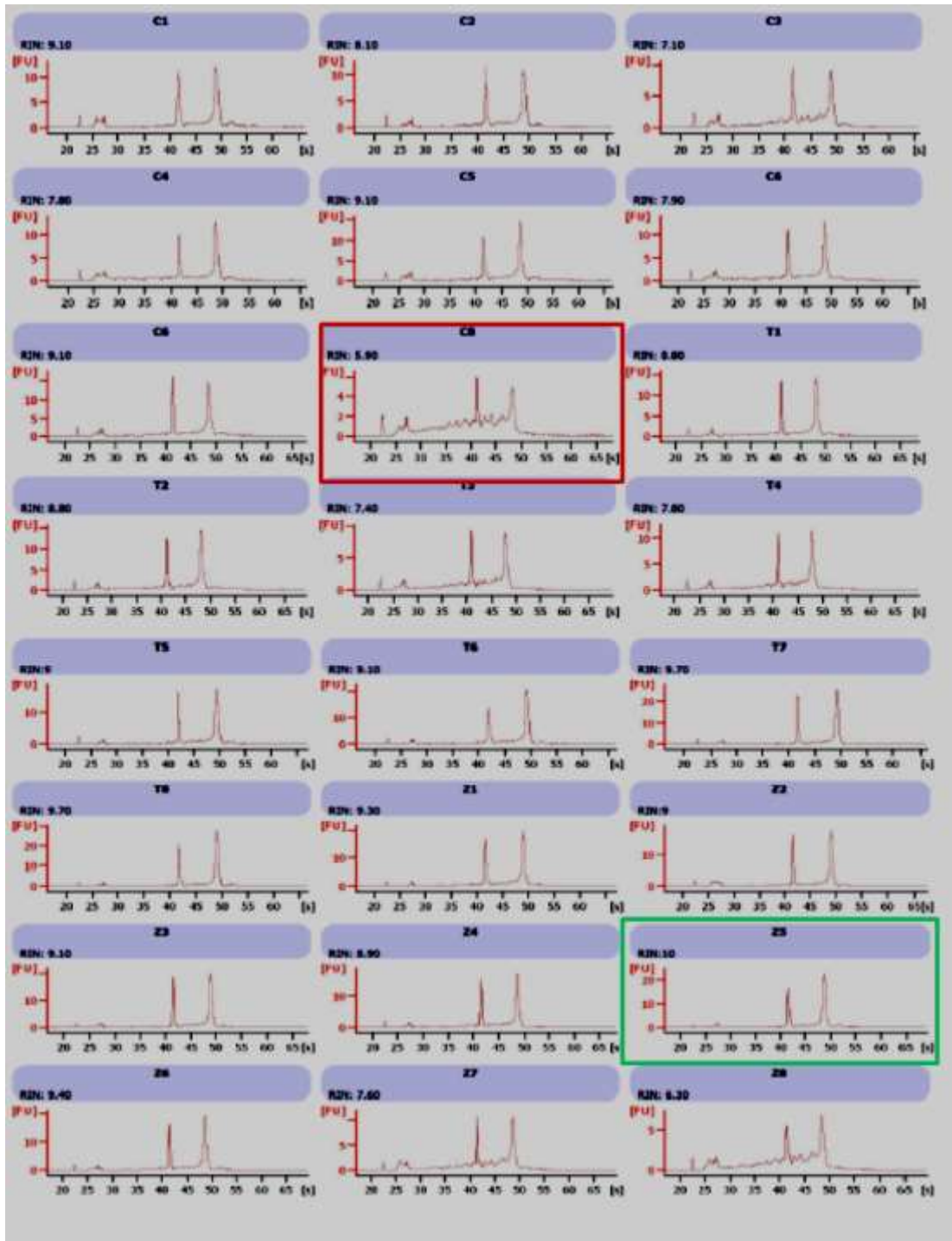


Figura 15. Análisis del número de integridad del RNA (RIN). Gel digital obtenido con el bioanalizador Agilent, se muestran los electroferogramas del RNA total de cada una de las muestras analizadas. El recuadro verde representa una muestra con el RNA intacto y un RIN de 10, el recuadro rojo muestra una muestra con degradación y un RIN de 5.9.

Tabla 6. Valores de número de integridad del RNA (RIN), concentración y radio 260/280. Las muestras utilizadas en el microarreglo están marcadas (✓).

Muestra	RIN	260/280	ng/μl	Microarreglo
C1	9.1	2.00	115.94	
C2	8.1	1.97	107.72	
C3	7.1	2.03	118.73	
C4	7.8	2.04	110.77	✓
C5	9.1	1.95	111.26	✓
C6	7.9	2.01	125.2	✓
C7	9.1	2.00	107.59	
C8	5.9	2.00	107.67	
T1	8.8	1.97	104.17	
T2	8.8	2.00	105.42	
T3	7.4	1.98	115.33	
T4	7.8	1.97	107.04	✓
T5	9	1.96	101.34	
T6	9.1	1.95	109.06	✓
T7	9.7	2.00	110.99	
T8	9.7	1.99	122.35	✓
Z1	9.3	1.99	105.91	
Z2	9	2.00	109.50	
Z3	9.1	1.98	113.53	
Z4	8.9	1.97	106.17	✓
Z5	10	1.95	112.14	
Z6	9.4	2.02	113.06	✓
Z7	7.6	1.96	117.82	
Z8	6.3	2.02	100.19	✓

Microarreglo de células endoteliales estimuladas con MC-MCF-7

El medio condicionado de MCF-7 produjo perfiles de expresión heterogéneos. Al realizar el análisis de componente principal no fue posible agrupar las muestras obtenidas de tres replicas biológicas independientes, lo que no permitió realizar el análisis estadístico (Figura 16 A). Este fue el motivo se decidió trabajar únicamente con el perfil de expresión inducido por el medio condicionado de ZR75.30 (Figura 16 B).

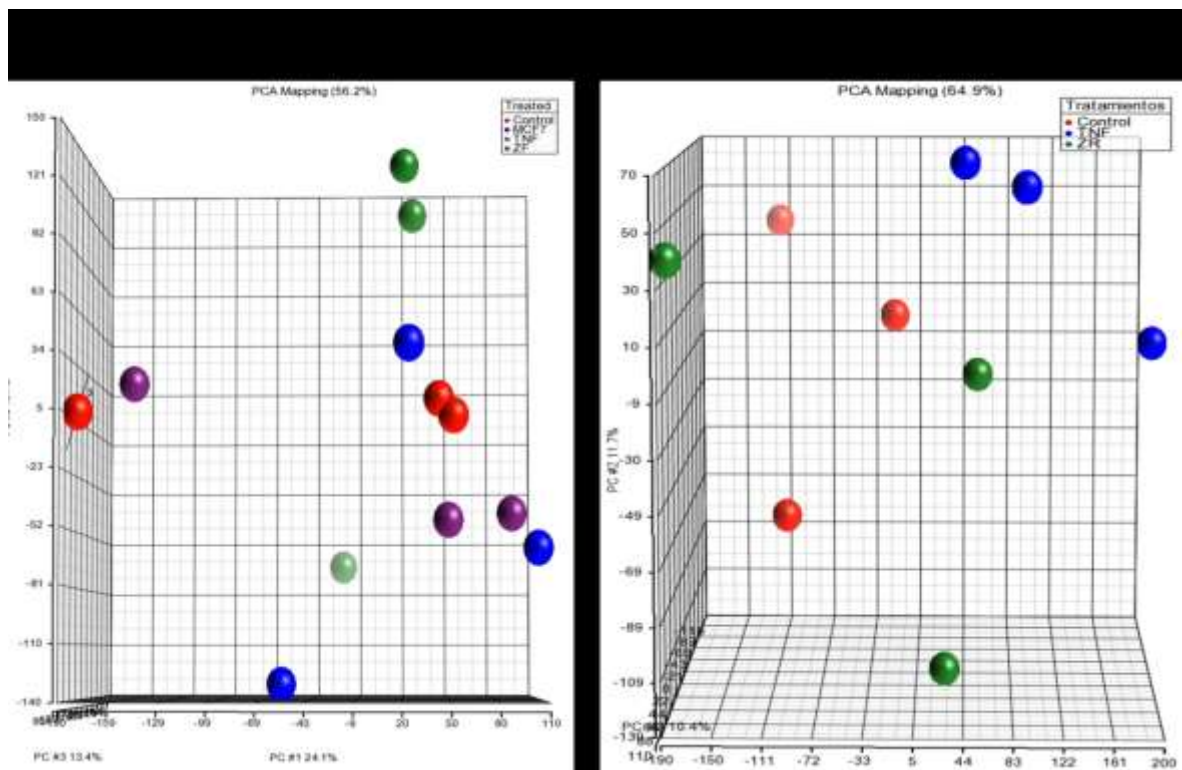


Figura 16. Mapas de componente principal (PCA) de los microarreglos. Mapas generados en el programa Partek, A) se muestra el mapa del microarreglo que incluye a MCF-7 (círculos azules). B) se muestra el mapa del segundo microarreglo en el cual se excluyó a MCF-7.

Perfil de expresión global de células HUVEC estimuladas con el medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama ZR75.30.

El perfil de expresión de células HUVEC tratadas con medio condicionado de ZR75.30 (MC-ZR75.30) arrojó variaciones significativas en 54 genes comparado con 299 del tratamiento con TNF (Figura 17). El análisis estadístico que generó la lista de genes se realizó con el programa Partek Genomics Suite (Partek, Inc.) utilizando un valor de $p < 0.05$ y un diferencial de 1.5 veces de cambio en ambas direcciones, tanto positiva como negativa. De los 54 genes afectados por el MC-ZR75.30, el 93% (50 genes) se comparten con el transcriptoma inducido por TNF y sólo un gen se encuentra reprimido, que codifica para una fosfatasa de proteínas relacionada con el metabolismo de glucógeno (*PPP1R3C*). Los 53 genes restantes del transcriptoma inducido por el MC-ZR75.30 se encuentran sobre-expresados. Solo 4 genes fueron afectados exclusivamente por el tratamiento con MC-ZR75.30 (*PKD1L1*, *SORBS1*, *TGFB3* y *KIAA1199*). En el tratamiento con TNF se encontraron 249 genes sobre-expresados y 50 genes reprimidos. De manera interesante, la fosfatasa *PPP1R3C* fue el gen con el valor más negativo (-3.11) de los 50 genes reprimidos con TNF.

Al comparar la lista de los 10 genes con mayor sobre-expresión en los dos tratamientos encontramos que comparte 5 de los genes: *CCL20*, *CXCL2*, *TNFAIP3*, *SELE* y *VCAM-1* (Figura 18 A). Mientras que los 10 genes con la mayor represión en el tratamiento con TNF, en su mayoría están asociados a transcripción (Figura 18 B).

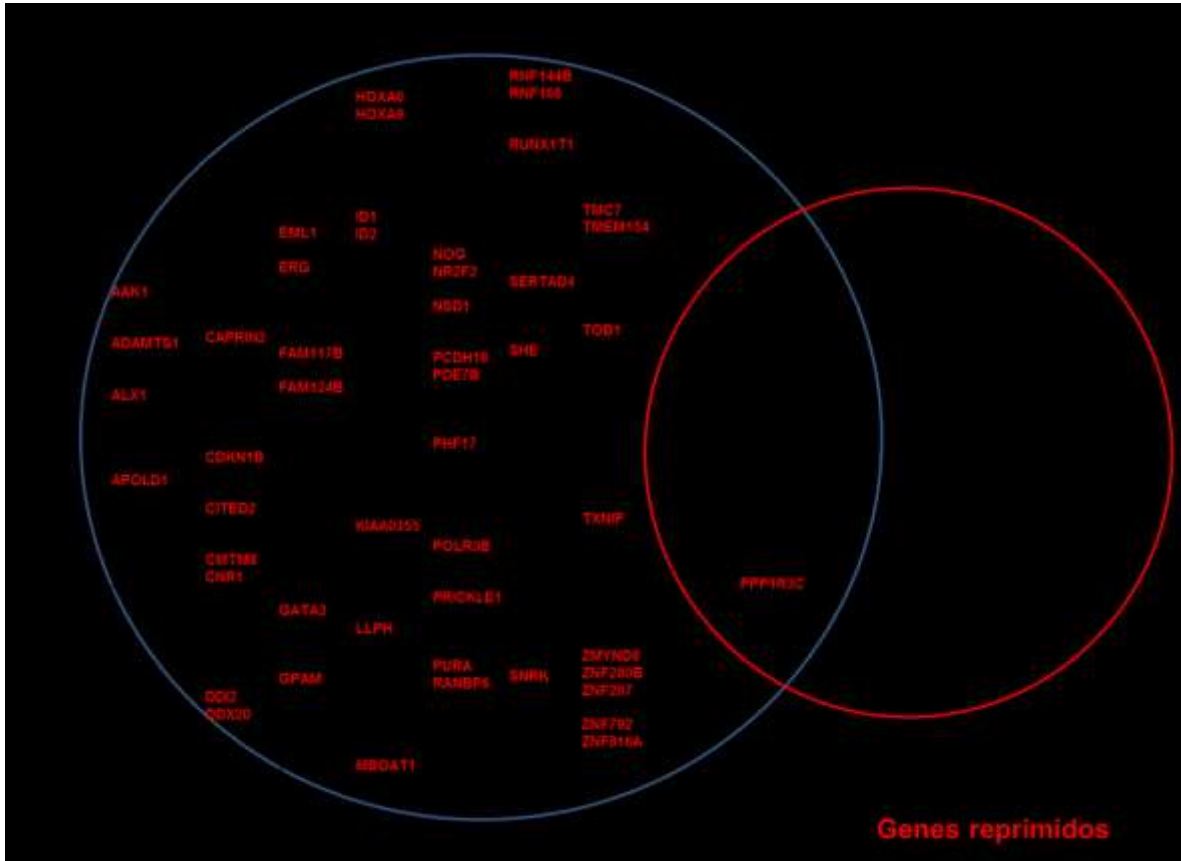


Figura 17. Genes alterados en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF. Diagrama de Venn construido con la lista de genes obtenida del programa Partek. El estímulo con MC-ZR75.30 indujo la expresión de 54 genes, 53 están sobre-expresados y 1 reprimido. 50 genes son comunes al estímulo con TNF y 4 son exclusivos al estímulo con MC-ZR75.30. TNF indujo la expresión de 299 genes, 249 sobre-expresados y 50 reprimidos.

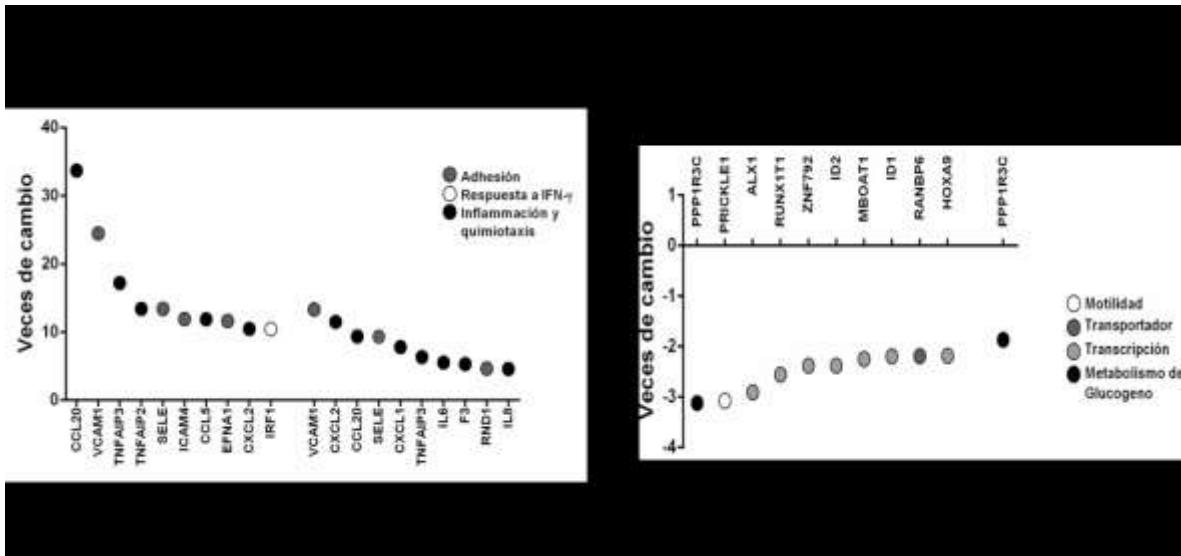


Figura 18. Los diez genes con mayor sobre-expresión o represión en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF. A) Histograma de los 10 genes con mayor sobre-expresión en los dos tratamientos. Para TNF el gen con la mayor sobre-expresión fue CCL20 (33.68 veces) y para MC-ZR75.30 fue VCAM1 (13.31 veces). B) Histograma de los 10 genes con la mayor represión en respuesta al estímulo con TNF. El gen con el valor más negativo fue PPP1R3C (-3.11), este gen fue el único gen reprimido en respuesta a MC-ZR75.30 (-1.86).

Análisis bioinformático del microarreglo: NFκB como principal regulador transcripcional.

El análisis bioinformático se realizó utilizando diferentes plataformas. Para la clasificación ontogénica se utilizaron los programas NCI-DAVID y PANTHER, para la generación de las redes de asociación se utilizó el programa STRING y finalmente el análisis de vías se realizó con el programa Ingenuity-IPA (Ingenuity pathways analysis) y con PANTHER.

De los procesos obtenidos mediante NCI-DAVID, se eligieron aquellos que tenían un valor de p menor a e^{-10} , obteniendo así 3 procesos biológicos para el tratamiento con MC-ZR75.30: respuesta inflamatoria ($1.1 e^{-10}$), respuesta a cicatrización ($4.1 e^{-10}$) y espacio extracelular ($8.5 e^{-10}$) y 7 procesos para el tratamiento con TNF: sistema inmune ($1.7 e^{-13}$), respuesta inflamatoria ($1.2 e^{-11}$), respuesta a cicatrización ($1.3 e^{-11}$), citocinas ($5.5 e^{-11}$), regulación de la apoptosis ($2.6 e^{-10}$), migración de leucocitos ($4.3 e^{-10}$) y metabolismo del nitrógeno ($7.9 e^{-10}$) (Figura 19 A). A partir de las listas de genes

involucrados en los procesos biológicos de MC-ZR75.30 se generó un diagrama de Venn, en cuyo centro se puede observar 10 genes que son comunes a los tres procesos (*CCL2*, *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *F3*, *IL6*, *IL8*, *SELE* y *TNF*) 4 genes (*APOL3*, *NFKB1*, *NFKBIZ*, *IRAK2*) son comunes a los procesos de inflamación y cicatrización, 1 gen (*TGFB3*) en común a cicatrización y espacio extracelular, 1 gen (*SOD2*) exclusivo de cicatrización y 5 genes (*CSF1*, *LIF*, *ICAM1*, *TNFAIP2*, *VCAM1*) exclusivos a espacio extracelular. (Figura 19 B). El análisis ontológico realizado en PANTHER, para el tratamiento con MC-ZR75.30, identifica al sistema inmune como el proceso biológico más representativo, seguido de comunicación celular, procesos celulares, respuesta a estímulos y metabolismo (Figura 19 C). Para el tratamiento con TNF, el proceso más representativo fue metabolismo, seguido de procesos celulares, comunicación celular, sistema inmune y desarrollo (Figura 19 D). El análisis bioinformático de redes de asociación realizado en STRING, se basa en experimentos, homología, bases de datos, publicaciones, co-expresión, co-ocurrencia, fusión génica y vecindad genómica. Para el transcriptoma de MC-ZR75.30 la red construida, muestra a NFκB como un nodo central. En forma arbitraria nosotros identificamos 3 clusters dentro de esta red: El primer cluster incluye moléculas de adhesión, citocinas y a NFκB, el segundo incluye quimiocinas y a CEBPD y el tercero a miembros de la vía de señalización de NFκB (Figura 20). La red de TNF muestra un cluster principal, en el que están interconectadas las moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, miembros de la vía NFκB-TNF y factores de transcripción (*NFKB*, *GATA3*, *STAT5a*, *JUNB*, *FOSL1*, *RUNX1T1*, *HOXA9*, *CEBPD*, *SMAD3*) (Figura 21). El análisis de vías en Ingenuity (IPA), mostró como vías representativas aquellas asociadas a procesos inflamatorios crónicos, como cirrosis hepática, artritis y aterosclerosis, sin embargo, entre las vías asociadas a MC-ZR75.30 aparece en tercer lugar adhesión en granulocitos y diapédesis. En la tabla 7 se muestran las 5 vías canónicas para ambos tratamientos que obtuvieron los menores valores de p, también se incluye el número de genes asociados a cada vía. En el programa PANTHER también se obtuvieron las vías de señalización asociadas a cada

tratamiento, y en ambos casos la vía de señalización más representativa fue la señalización mediada por citocinas y quimiocinas (Figura 19 C y D).

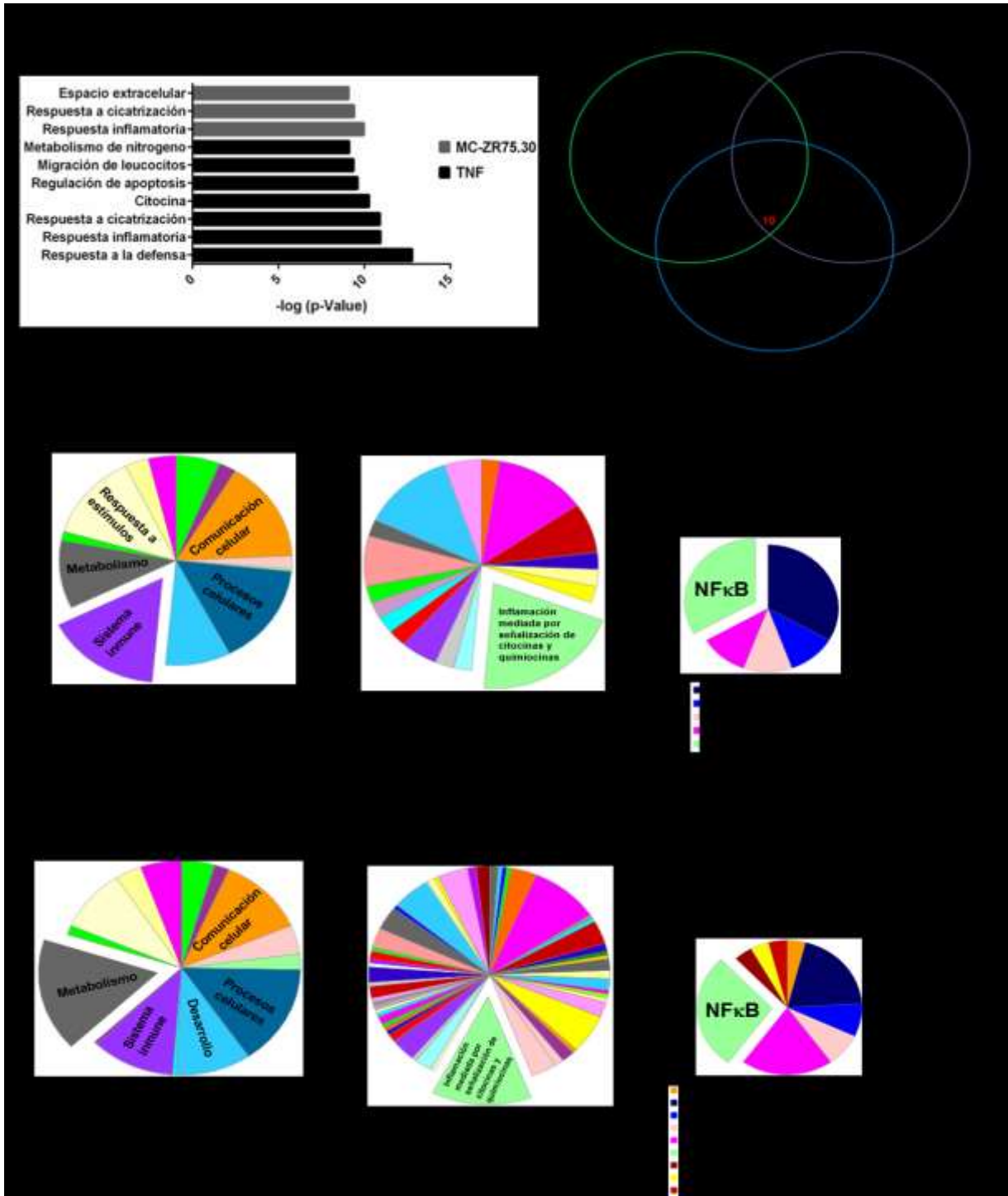


Figura 19. Análisis bioinformático de ontología génica. A) Procesos biológicos asociados a cada estímulo obtenidos con el programa NCI-DAVID, se muestran los procesos con un valor de p menor a $e-10$. Para MC-ZR75.30 se obtuvieron 3 procesos y para TNF 7. B) Diagrama de Venn construido con la lista de genes de los procesos biológicos asociados al estímulo de MC-ZR75.30: respuesta inflamatoria, respuesta a cicatrización y espacio extracelular. Análisis de procesos biológicos y vías de señalización con el programa PANTHER. El proceso biológico representativo para MC-ZR75.30 fue el sistema inmune, la vía de señalización fue inflamación mediada por citocinas y quimiocinas, y las moléculas involucradas o reguladores moleculares: NF κ B, quimiocinas, receptor de citocinas, NFKBIA e IL-2 (C) para TNF el proceso representativo fue el metabolismo, la vía de señalización fue inflamación mediada por citocinas y quimiocinas, y las moléculas involucradas o reguladores moleculares: NF κ B, quimiocinas, IL-2, receptor de quimiocinas, receptor de citocinas, NFKBIA, NFAT, STAT y AP1 (D).

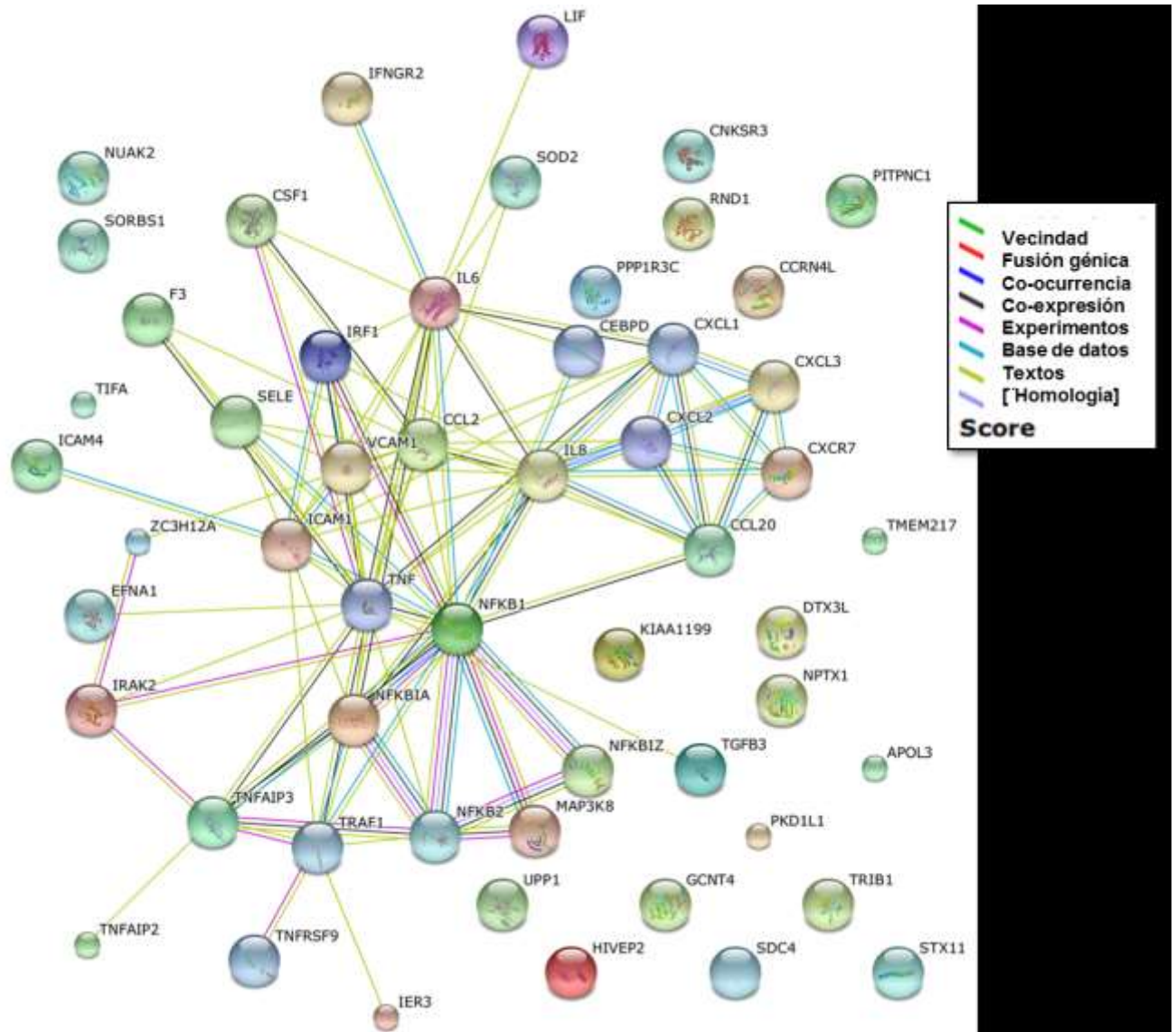


Figura 20. Red de asociación del transcriptoma de células endoteliales estimuladas con MC-ZR75.30 generada en STRING. Red construida con el transcriptoma completo de MC-ZR75.30 (54 genes). Cada línea coloreada corresponde a información obtenida de diferentes fuentes: vecindad genómica, fusión génica, co-ocurrencia, co-expresión, experimentos, bases de datos, textos o publicaciones y homología (ver recuadro).

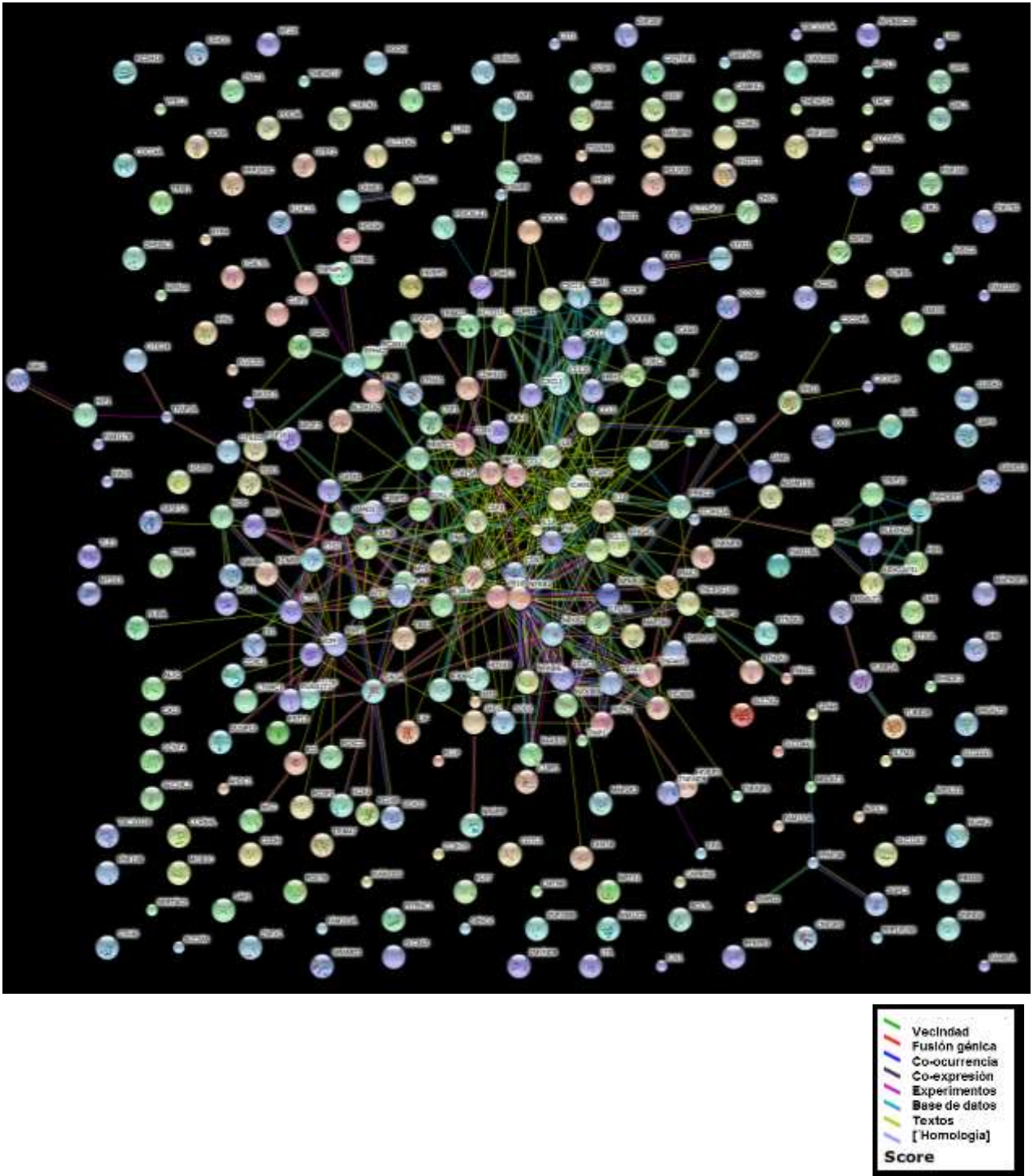


Figura 21. Red de asociación del transcriptoma de células endoteliales estimuladas con TNF generada en STRING. Red construida con el transcriptoma completo de TNF (299 genes). La red muestra un nodo principal. Cada línea coloreada corresponde a información obtenida de diferentes fuentes: vecindad, fusión génica, co-ocurrencia, co-expresión, experimentos, bases de datos, textos o publicaciones y homología (ver recuadro).

Tabla 7. Vías canónicas alteradas en el microarreglo de HUVEC de acuerdo al análisis bioinformático realizado en IPA.

IPA		
Vías MC-ZR75.30	p-value	No. Genes
Fibrosis hepática/activación de células estelares hepáticas	3.46e-15	12
Señalización en aterosclerosis	3.34e-14	11
Adhesión de granulocitos y diapédesis	1.72e-12	11
Papel de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en artritis reumatoide	2.01e-12	13
Papel de IL-17A en artritis	2.18e-12	8
Vías TNF	p-value	No. Genes
Papel de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en artritis reumatoide	1.5e-15	29
Fibrosis hepática	2.03e-12	18
Señalización de TNFR2	3.93e-12	10
Papel de IL-17A en artritis	1.49e-11	12
Señalización de TREM1	5.92e-11	13

IPA: Análisis de Vías por Ingenuity

Además de las vías canónicas, el análisis con IPA también nos dio los reguladores moleculares implicados en el proceso adhesivo, para el tratamiento con MC-ZR75.30 el complejo NF κ B obtuvo el menor valor de p y en segundo lugar se encontró a TNF. Para el caso del tratamiento con TNF el orden se invirtió. Mientras que los reguladores moleculares obtenidos en el análisis con PANTHER muestran a NF κ B en primer lugar, y en segundo lugar a las quimiocinas y este orden se conservó en ambos tratamientos (Tabla 8 y Figura 19 D).

Tabla 8. Reguladores moleculares alterados en el microarreglo de HUVEC de acuerdo al análisis bioinformático realizado en IPA y PANTHER.

IPA			PANTHER	
Reguladores MC-ZR75.30	p-value	No. Genes	Reguladores MC-ZR75.30	No. Genes
Complejo NFκB	8.93e-38	32	NFκB	3
TNF	1.29e-35	40	Quimiocinas	2
IL-1B	1.14e-34	33	Receptor citocinas	1
TRADD	1.98e-33	15	NFKBIA	1
NFKBIA	1.79e-32	27	IL-2	1
Reguladores TNF	p-value	No. Genes	Reguladores TNF	No. Genes
TNF	1.11e-61	119	NFκB	7
Complejo NFκB	2.42e-56	77	Quimiocinas	4
IL-1B	3.50e-42	74	IL-2	4
LPS	5.49e-41	99	Receptor de citocinas	2
CD40LG	1.20e-39	54	NFKBIA	2

IPA: Análisis de Vías por Ingenuity, PANTHER: Anotación de Proteínas a través de Relaciones Evolutivas.

Otra información que se obtuvo con IPA fue la construcción de redes a partir de los datos del microarreglo, estas redes son construidas de novo, a partir de la lista de genes, a diferencia de las vías canónicas en las cuales únicamente se busca que genes de la lista importada están presentes en alguna de las 342 vías de señalización o en alguna de las 302 vías metabólicas que tiene registradas el programa. Se generaron varias redes a partir de los datos, las redes mostradas son las que obtuvieron el valor de p más significativo. Se puede observar que la red generada para MC-ZR75.30 tiene como nodo central a TNF (Figura 22 A), mientras que la red de TNF tiene al complejo NFκB (Figura 22 B).

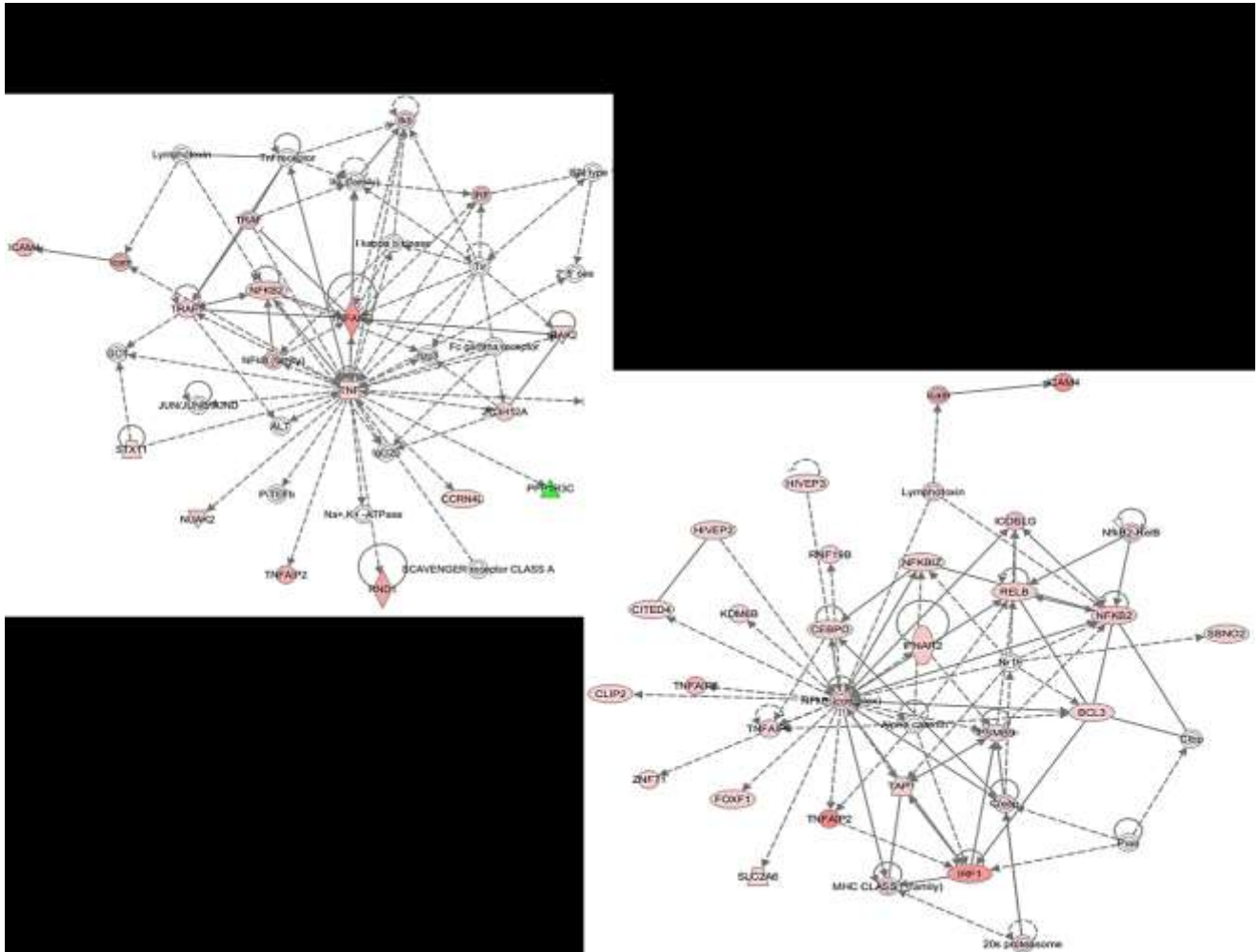


Figura 22. Redes construidas en el programa Ingenuity (IPA) a partir de la lista de genes de células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF. A) Red generada con los datos del estímulo con medio condicionado de ZR75.30 como nodo central se muestra a TNF. B) Red generada con los datos de TNF, en el nodo central se observa al complejo NFKB. Las líneas continuas representan interacciones directas y las líneas punteadas interacciones indirectas.

Validación por RT-qPCR de los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo de algunos genes sobre-expresados y reprimidos.

La validación de los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. Se analizaron 11 genes sobre-expresados en ambos tratamientos (*CCL20*, *CXCL2*, *ICAM1*, *IL6*, *MAP3K8*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *SELE*, *TNFAIP2*, *TRAF1* y *VCAM1*), 1 gen reprimido en ambos tratamientos (*PPP1R3C*), 2 genes exclusivos al tratamiento con MC-ZR75.30 (*SORBS1* y *TGFB3*) y 1 gen exclusivo al tratamiento con TNF (*CDKN1B*) (Figura 23 A y B). Los genes validados se eligieron en base al número de veces de cambio obtenidos en el microarreglo y a su asociación con el proceso adhesivo y a la vía NFκB (Tabla 9). Los valores de expresión obtenidos por RT-qPCR no son iguales a los obtenidos en el microarreglo, en general fueron más altos, sin embargo, la tendencia se mantuvo. En el caso de los genes reprimidos, no se obtuvieron valores reprimidos en el ensayo de tiempo real, pero si por debajo del control.

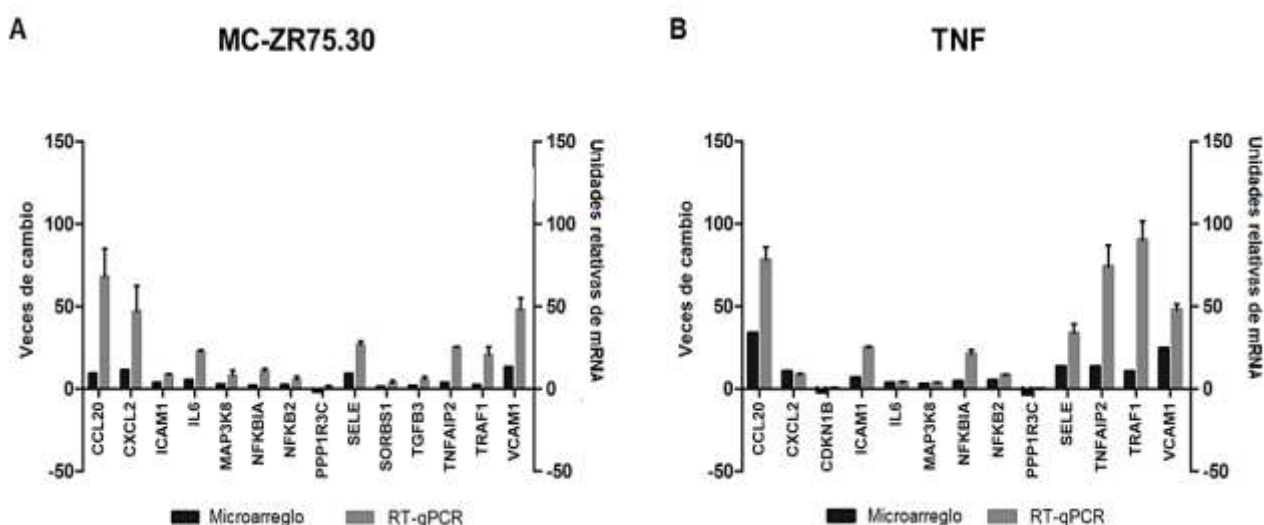


Figura 23. Validación de los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo de células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o TNF mediante PCR en tiempo real. A) Comparación entre los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo y RT-qPCR en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30 o B) TNF. Los niveles de expresión obtenidos en el microarreglo y por RT-qPCR presentaron la misma tendencia. Los valores de RT-qPCR se expresan como unidades relativas de mRNA y los valores del microarreglo como veces de cambio (eje de la ordenada).

Tabla 9. Función de genes validados por RT-qPCR.

Gen	Veces de cambio MC-ZR75.30/ TNF	Función
<i>CCL20</i>	9.35/33.68	Quimiocina involucrada en el “homing” durante la metástasis y quimioatrayente de células T [114]. Secretada por células endoteliales y epiteliales, su sobre-expresión sugiere una contribución en la progresión tumoral [115, 116].
<i>CXCL2</i>	11.47 /10.45	Quimiocina involucrada en aterosclerosis, angiogénesis y metástasis [117]. Forma parte del circuito de retroalimentación positiva de NFκB en células tumorales, conduciendo a la quimioresistencia [118]. Su receptor se expresa en células endoteliales, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.
<i>CDKN1B</i>	(-)/-1.94	p27, inhibidor de Cdk (cinasa dependiente de ciclina). Se une a los complejos ciclina E-CDK2 o ciclina D-CDK4, controla la progresión del ciclo celular [119].
<i>ICAM1</i>	3.81/6.69	CAM asociada a inflamación [120]. Activa vías de señalización relacionadas con motilidad. Relacionada con la invasión y metástasis del cáncer de mama [121].
<i>IL6</i>	5.52/3.46	Citocina pro-inflamatoria asociada a señales de crecimiento, resistencia a la apoptosis, enfermedades vasculares inflamatorias como aterosclerosis y progresión tumoral [122, 123].
<i>MAP3K8</i>	2.86/2.79	Cinasa de serina/treonina activada en cáncer [124].
<i>NFKB2</i>	2.58/5.11	Subunidad p52 del complejo NFκB [34].
<i>NFKBIA</i>	2.13/4.46	Ubiquitina ligasa que inhibe al complejo NFκB [34]
<i>PPP1R3C</i>	-1.86/-3.11	Fosfatasa involucrada en el metabolismo del glucógeno. Candidato a supresor tumoral, su represión se asocia a la metilación del promotor en melanoma [125]. En células endoteliales, su expresión se ha asociado a angiogénesis [126].
<i>SELE</i>	9.31/13.39	CAM expresada exclusivamente por células endoteliales, está relacionada con el proceso de inflamación; ha sido relacionada con angiogénesis y diseminación metastásica [121, 127].
<i>SORBS1</i>	1.52/(-)	Relacionada con el anabolismo de lípidos. Es sustrato de la cinasa de tirosinas c-Abl y se ha asociado a FAK [128].
<i>TGFB3</i>	2.0/(-)	Involucrado en la diferenciación celular y el desarrollo. En células endoteliales esta isoforma participa en la homeostasis y mantenimiento de las células cuando se someten a tensión tangencial [129].
<i>TNFAIP2</i>	3.76/13.41	Proteína inducible por TNF 2, asociada recientemente con cáncer. Su sobre-expresión se asocia con la densidad microvascular, migración y metástasis [130].
<i>TRAF1</i>	2.46/10.36	Forma un complejo heterodimérico necesario para la activación de MAPK8/JNK y NFκB a través de TNF, interactúa con IAPs para regular la señal anti-apoptótica mediada por receptores de TNF [131]. Se ha asociado a TRAF1 con artritis reumatoide [132].
<i>VCAM1</i>	13.31/24.44	CAM relacionada con inflamación, involucrada en el proceso de adhesión de leucocitos [133]. Se expresa en células endoteliales y células tumorales, esta expresión se asocia con metástasis de pulmón y hueso y con la activación de las vías PI3K/Akt y NFκB [134, 135].

La vía canónica de NF κ B es responsable del fenotipo pro-adhesivo inducido por MC-ZR75.30.

Para determinar la participación de la vía NF κ B, se utilizó el inhibidor específico Bay11-7085 cuyo blanco son las IKKs encargadas de fosforilar I κ B α . Se realizó un pre-tratamiento con el inhibidor, previo a la estimulación con el medio condicionado de ZR75.30, posteriormente se analizó la unión de NF κ B a su secuencia consenso, específicamente la subunidad p65 y se observó que el medio condicionado induce dicha unión, pero cuando se preincubo con el inhibidor seguido de la estimulación con el medio condicionado, esta unión se abate (Figura 24 A). Posteriormente se analizó la expresión de I κ B α en respuesta al estímulo con el medio condicionado de ZR75.30 mostrando un abatimiento en la expresión comparado con el control, mientras que cuando se preincubo con el inhibidor y después se estimuló con medio condicionado la expresión de I κ B α no fue abatida (Figura 24 B). También se analizó la expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta al inhibidor, encontrando que cuando se dio el estímulo con el medio condicionado se indujo la expresión de las tres moléculas mientras que con el pre-tratamiento del inhibidor dicha expresión se abatió en los tres casos (Figura 24 C). Finalmente se determinó la participación de la vía NF κ B en el proceso adhesivo mediante ensayo de adhesión, al estimular las células HUVEC con medio condicionado se indujo una adhesión de 24.6% comparada con el control, en presencia del inhibidor la adhesión se abatió incluso a niveles menores que el control sin estímulo (Figura 24 D).

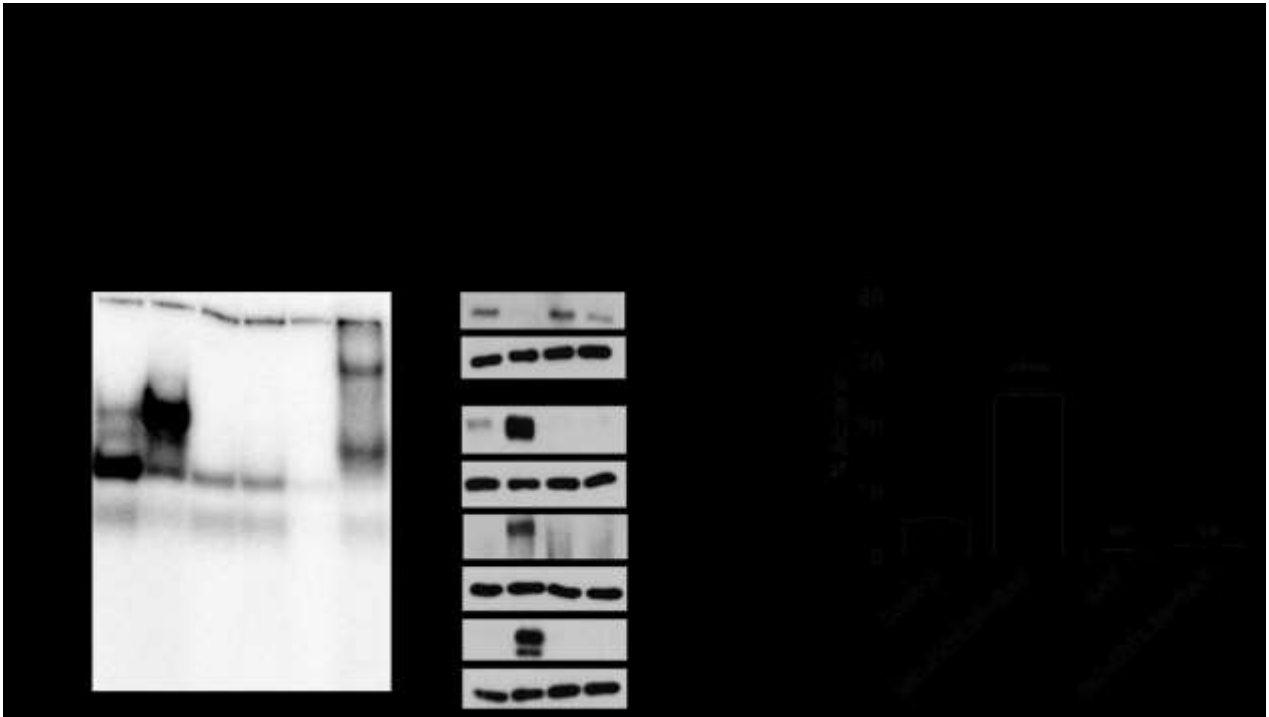


Figura 24. Participación de la vía NFκB en el fenotipo adhesivo inducido por MC-ZR75.30. A) Unión de NFκB a su secuencia consenso mediante un EMSA y súper retardo utilizando anticuerpo anti- p65 y extractos nucleares de células HUVEC sin tratamiento (control), estimuladas 20 min con 9 µg/ml de MC-ZR75.30, pre-tratadas 1 h con 10 µM del inhibidor específico de NFκB BAY11-7085 (BAY), pre-tratadas y estimuladas con MC-ZR75.30. Control de especificidad con un exceso de 100 veces de sonda fría que se observa en el carril 5. B) La participación de IκBα se determinó mediante un western blot de extractos citoplasmicos de células HUVEC estimuladas con las mismas condiciones del EMSA. C) Western blot de extractos totales de células HUVEC estimuladas 3 h con 9 µg/ml de MC-ZR75.30, pre-tratadas 1 h con 10 µM del inhibidor específico de NFκB BAY11-7085 (BAY), pre-tratadas y estimuladas con MC-ZR75.30 para determinar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E y VCAM-1. Como control de carga se utilizó β-Actina. D) Ensayo de adhesión en células pre-tratadas con el inhibidor de NFκB, el ensayo se realizó como se describió en la figura 2, previo pre-tratamiento de 1h con 10 µM de BAY11-7085. En el histograma se muestra el porcentaje de adhesión como el promedio ± S.E. del porcentaje de las células adheridas totales. **p<0.01, ****p<0.0001.

Activación del receptor 2 de VEGF y STAT3 en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30.

Debido a la elevada concentración de VEGF, IL-6, G-CSF e IL-8 en los medios condicionados de ZR75.30 y a la falta de genes blanco asociados a estas moléculas en el microarreglo, se realizó un curso temporal de 5 -180 min en células HUVEC estimuladas con medio condicionado, encontrando que tanto el receptor 2 de VEGF como el factor de transcripción STAT3 se encuentran activados desde tiempos tempranos, obteniendo un pico máximo de activación a los 30 min en ambos casos (Figura 25). Dicha activación se determinó mediante la fosforilación del residuo de tirosina 1175 de VEGFR2 y el residuo de tirosina 705 de STAT3. Confirmando la activación de ambas moléculas en las células HUVEC estimuladas con el medio condicionado de ZR75.30, sin embargo, la respuesta transcripcional converge en la activación de NF κ B. Por otro lado, el fenotipo pro-adhesivo inducido con diferentes concentraciones (1,10 y 100 ng/ml) de las citocinas recombinantes IL-6 y VEGFA no fue significativo al compararlo con TNF o el medio condicionado.

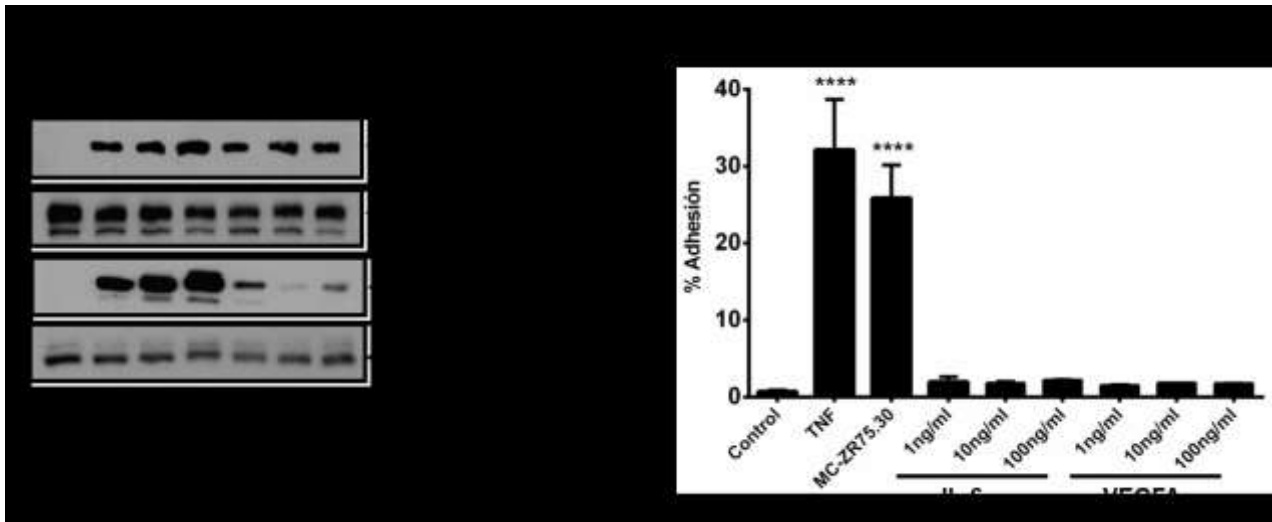


Figura 25. Activación del receptor 2 de VEGF y el factor de transcripción STAT3 en células HUVEC estimuladas con MC-ZR75.30. A) Las células HUVEC se estimularon con 9 μ g/ml de medio condicionado de la línea ZR75.30 durante 5-180 min, se realizó un western blot con 30 μ g de proteína de extractos totales y se detectó la fosforilación del residuo de tirosina 1175 en el receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y la fosforilación en el residuo de tirosina 705 de STAT3. En ambos casos la activación se da desde los 5 min alcanzando su máxima activación a los 30 min. Se detectaron los niveles de proteína total para descartar que los cambios en la fosforilación se debieran a una mayor cantidad de proteína. B) Las células HUVEC fueron pre-tratadas con cada estímulo durante 3 h previo a la adición de las células U937. Se muestra la adhesión basal del control (células HUVEC sin estimular), la adhesión inducida por TNF (10 ng/ml), MC-ZR75.30 (9 μ g/ml), IL-6 (1,10 y 100 ng/ml) y VEGFA (1,10 y 100 ng/ml) en el histograma se muestra el porcentaje de adhesión inducido por cada estímulo como el promedio \pm S.E. del porcentaje de las células adheridas totales en al menos tres experimentos independientes. **** p <0.0001.

IX. DISCUSIÓN

En años recientes se ha dado gran importancia a la inflamación y al microambiente tumoral y sus componentes (células tumorales, células normales, citocinas, proteasas, quimiocinas, factores de crecimiento) en el desarrollo del cáncer, tanto así que Hanahan y Weinberg en el 2011 los incluyen dentro de los nuevos “hallmarks” del cáncer [136].

Las células del endotelio linfático y vascular son importantes componentes celulares del microambiente tumoral, juegan un papel central en la progresión del tumor, principalmente en los procesos de angiogénesis, intravasación y extravasación procesos previos al establecimiento de la metástasis. Por esta razón se han establecido varios modelos experimentales para estudiar el papel de estas células en cáncer. El modelo mejor estudiado corresponde a las células HUVEC primarias que han mostrado ser una herramienta útil para estudiar los procesos que involucran la progresión tumoral.

Los cultivos primarios de células HUVEC se obtienen de la vena de cordones umbilicales provenientes de donadoras con embarazos normales. Las células se obtienen mediante la técnica reportada originalmente por Murayama [137] y estandarizada en 1973 por Jaffe [111]. Las células extraídas de los cordones fueron identificadas de acuerdo a su morfología romboide en cultivos en sub-confluencia y una morfología plana y poligonal cuando alcanzan confluencia (Figura 7A y B), sin embargo, por tratarse de cultivos primarios existe el riesgo de que los cultivos tengan poblaciones contaminantes como fibroblastos. Por esta razón se realizó una inmunofluorescencia para un marcador endotelial específico como es el Factor Asociado al Factor VIII de Coagulación también conocido como Factor von Willebrand (Figura 7C) cuya expresión está confinada a células endoteliales y megacariocitos. El Factor von Willebrand está presente en plasma, en los cuerpos Weibel Palade de las células endoteliales, en los gránulos alfa de megacariocitos y plaquetas y también en la matriz sub-endotelial de la pared vascular [138]. Este marcador es específico de estas células, lo que permitió

determinar que aproximadamente el 100% del cultivo corresponde a células HUVEC, evitando la presencia de poblaciones como fibroblastos o células de músculo liso.

Es importante remarcar que los cultivos empleados provienen de 3 o más cordones umbilicales de cesáreas y partos independientes. Por tanto, en realidad se trabajó con mezclas de cultivos con diferentes fondos genéticos. La baja desviación estándar en los ensayos de adhesión no mayor al 0.25% en condiciones basales o estimuladas con TNF sugiere que las posibles variaciones debidas a los diferentes fondos genéticos no se manifiestan en una mayor dispersión. Cabe notar que la dispersión aumenta en los ensayos de western blot y en los de RT-qPCR. Al momento no sabemos si la dispersión de los ensayos moleculares está ligada al hecho de haber trabajado con mezclas de fondos genéticos.

Para corroborar la clasificación de las líneas celulares MCF-7 y ZR75.30 y debido a que existe controversia en cuanto a la expresión del receptor de estrógenos alfa en las células ZR75.30, se realizó un western blot para determinar la expresión del receptor en dichas células y se comparó con la expresión de las células MCF-7 que son receptor de estrógenos positivas (Figura 8). El resultado obtenido muestra una expresión negativa del receptor de estrógenos alfa de las células ZR75.30 empleadas en este estudio. La bibliografía documenta que a pesar de que ambas líneas celulares provienen de un carcinoma ductal invasivo (CDI) y ambas son de tipo luminal, existen diferencias en la expresión de diversos marcadores entre ambas líneas, tales como el receptor de progesterona (RP), HER2 y TP53. Reportando a MCF-7 positiva a RE y RP, TP53 silvestre y HER2 negativa, mientras que a ZR75.30 positiva a HER2 y RE (niveles bajos), negativa a RP y TP53 silvestre [139]. Sin embargo, en otro estudio los datos de expresión a partir de mRNA del RE son de 0.307 para MCF-7 y 0.022 para ZR75.30 [140]. En base a la bibliografía y a la expresión mediante proteína del RE en ambas líneas celulares, se sugiere que MCF-7 pertenece al tipo luminal A mientras que ZR75.30 pertenece al luminal B. Considerando que las formas lumbinales se presentan en el 60% de las pacientes con cáncer de mama en el mundo los resultados de este estudio pueden aplicarse a los procesos de activación endotelial en las pacientes con

esta forma de la enfermedad. Si bien nuestro grupo ha mostrado previamente que los medios condicionados de las células MDA-MB-231 que corresponden a un tipo triple negativo (RE-, RP-, HER2-) son capaces de inducir un fenotipo endotelial pro-adhesivo, queda por verificarse si con las otras formas de cáncer de mama como HER2+, parecido al basal o bajo en claudinas se inducen perfiles de expresión semejantes a los que aquí describimos.

A partir de ambas líneas celulares se obtuvo medio condicionado y este se analizó mediante el sistema bioplex encontrando que la línea ZR75.30 secreta citocinas en concentraciones mayores a MCF-7, además tiene un enriquecimiento en las citocinas VEGF, G-CSF, IL-8, IL-6, TNF e INF- γ comparado con MCF-7 (Figura 10) Este enriquecimiento es interesante debido a que estas citocinas también han sido descritas en otros sistemas como componentes del microambiente tumoral y juegan un papel importante en la progresión tumoral participando en la proliferación, apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis [123, 141-143]. Por otra parte, el papel que juegan INF- γ [144] y G-CSF [145, 146] es ambiguo ya que dependiendo del contexto pueden promover o inhibir la progresión tumoral.

Estos componentes pro-inflamatorios, angiogénicos, anti-apoptóticos, proliferativos y metastásicos presentes en ambos medios condicionados son importantes ya que pueden inducir un fenotipo adhesivo en células HUVEC [69, 147].

Sin embargo, en el ensayo de adhesión realizado para determinar la funcionalidad de los medios condicionados, se encontró que solamente el medio condicionado de ZR75.30 induce un fenotipo pro-adhesivo asociado a la expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 (Figura 11 A y B). Este perfil es similar al inducido por TNF [148]. Esta diferencia en la inducción de la adhesión entre ambos medios condicionados puede estar relacionada con la concentración de las citocinas presentes en los medios condicionados. Por otro lado, hay que considerar que el análisis bioplex solo analiza 24 moléculas y por tanto el medio condicionado puede

contener otras moléculas capaces de influir positiva o negativamente en el fenotipo adhesivo.

En base a las diferencias fenotípicas de cada medio condicionado, se empleó un análisis de microarreglos para conocer el perfil de expresión global de las células HUVEC tratadas con los medios condicionados y TNF. Para realizar el microarreglo se realizaron una serie de experimentos para la elección de las muestras adecuadas. Primeramente, se hizo una curva dosis respuesta de medio condicionado y se determinó la expresión de las proteínas Selectina-E y VCAM-1 obteniendo a 9 $\mu\text{g/ml}$ como la dosis en la que se expresan ambas moléculas en proporción similar (Figura 12). Selectina-E muestra una inducción que va de 6-12 $\mu\text{g/ml}$, pero decae con 12 $\mu\text{g/ml}$ mientras que la inducción de VCAM-1 va de 9-12 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo que la expresión de VCAM-1 necesita un estímulo mayor que Selectina-E. Una vez elegida la concentración de medio condicionado se realizó el tratamiento, extracción de RNA (Figura 13) y RT-PCR para el mensajero de VCAM1 (Figura 14). Como se esperaba, el tratamiento con el medio condicionado de ZR75.30 y TNF induce sobre-expresión del mensajero de VCAM1 comparado con la expresión basal de las células sin tratamiento, una vez corroborada la respuesta de las células HUVEC al tratamiento se determinó el número de integridad del RNA (RIN) obteniendo valores de 5.9-10 (Figura 15). El valor de RIN de las muestras utilizadas para el microarreglo fue en promedio de 8.5, en algunos casos se descartaron las muestras con los valores de RIN más altos y se dio prioridad a aquellas con valores menores pero que mostraron una expresión de VCAM1 más homogénea. Finalmente, el criterio de selección de las muestras se basó en un RIN aceptable y una expresión homogénea del mensajero de VCAM1.

El análisis de componente principal de los datos del microarreglo mostró una conducta errática en el tratamiento del medio condicionado de MCF-7. Esto impidió el mantenimiento de la variación de los datos y la reducción de dimensionalidad [149]. En base a este comportamiento, se repitió el microarreglo pero quitando el tratamiento con MCF-7 (Figura 16). Al momento desconocemos porqué el medio condicionado de las células MCF-7 produjo tanta variación en el perfil de expresión de 3 réplicas biológicas

de HUVECs. Queda por verificar si otras cepas de células MCF-7 producen medios condicionados que inducen perfiles de expresión endotelial tan variados, este estudio podría extenderse a otras líneas celulares de mama como las MCF-10A (con baja capacidad tumorigénica), BT-474, SKBR-3 (HER2+) o MDA-MB-231 (triple negativa).

El transcriptoma de células HUVEC tratadas con TNF contiene 299 genes, 249 sobre-expresados y 50 reprimidos, mientras que el transcriptoma de células HUVEC tratadas con MC-ZR75.30 se compone de 54 genes, 53 sobre-expresados y 1 reprimido (*PPP1R3C*) de los cuales el 93% los comparte con el transcriptoma de TNF, es importante señalar que el gen *PPP1R3C*, en ambos tratamientos presenta el valor más negativo, siendo así el gen más reprimido tanto para TNF como para MC-ZR75.30. El 7% restante del transcriptoma de MC-ZR75.30, corresponde a 4 genes exclusivos: *KIAA1199*, *PKD1L1*, *SORBS1* y *TGFB3* (Figura 17). La presencia o ausencia de estos genes ha sido asociada a enfermedades como cáncer, trombosis y diabetes.

En cáncer de mama, el aumento de la expresión de *KIAA1199* correlaciona con hipometilación y unión de NF κ B al promotor de *KIAA1199*, también conocido como *CEMIP* (proteína inductora de migración celular) [150]. Mientras que la represión de *KIAA1199* en células de cáncer de colón reduce la proliferación y atenúa la activación de la vía Wnt [151]. El gen *PKD1L1* codifica para la proteína poliquística de riñón 1, con función de canal de calcio. Se ha encontrado formando quimeras con el gen *RIF1* en líneas celulares de cáncer de mama [152]. Mientras que *SORBS1* se ha asociado al anabolismo lipídico y también se ha encontrado asociado a FAK y es sustrato de la cinasa de residuos de tirosina c-Abl, se asocia a enfermedades relacionadas con la resistencia a insulina principalmente [128]. Finalmente, *TGFB3* está asociado a desarrollo y diferenciación embrionaria, sin embargo, en células endoteliales esta isoforma participa en el mantenimiento y homeostasis cuando dichas células son sujetas a tensión tangencial [129].

La diferencia en el número de genes afectados es interesante si se considera que el medio condicionado de las células ZR-75.30 es una mezcla compleja de factores capaces de afectar la fisiología y el perfil de expresión endotelial, comparado con el efecto de una citocina recombinante como TNF. Una posible explicación es que el perfil de expresión inducido por los medios condicionados produzca una mayor dispersión y que el procesamiento primario de los valores de expresión elimina aquellos que presentan datos de expresión discordante.

El análisis bioinformático realizado mediante diferentes programas buscó asociaciones con procesos celulares también denominados análisis de ontología génica, así mismo se buscaron asociaciones con vías canónicas de señalización buscando los reguladores moleculares centrales, también se analizaron redes de asociación. Es interesante que las diferentes aproximaciones convergen en el sistema NF κ B como el principal regulador transcripcional tanto para la estimulación con TNF como para el medio condicionado de las células ZR75.30 (Tabla 8). TNF es el inductor clásico del fenotipo endotelial pro-adhesivo a través de la activación de NF κ B [148, 153]. Sin embargo, encontrar a NF κ B como el regulador principal activado por la compleja mezcla que constituye el medio condicionado de las células ZR-75.30 es inesperado. Entre otros, el medio condicionado contiene VEGF, G-CSF, IL-6 e IL-8, todos ellos con receptores en las células endoteliales y por tanto capaces de promover la activación directa de factores de transcripción como STAT3, HIF-1, AP-1 y β -catenina (73, 74, 87). Es interesante notar que a pesar de que sus vías canónicas no activan al sistema NF κ B hay reportes de que lo pueden activar indirectamente, sugiriendo vías alternas o no canónicas [123, 143, 154]. El análisis bioinformático revela que no obstante la presencia de estos factores que promueven respuestas angiogénicas, de invasión y proliferación, a las 3 h prevalece la respuesta inflamatoria. Al momento no sabemos si esta dominancia es permanente, aunque es probable que suceda únicamente durante la ventana tiempo que analizamos (3 h). Un estudio de microarreglos de expresión inducido por VEGF (100 ng) a tiempos cortos (0.5-6 h) en células HUVEC es consistente con este último punto

de vista. En este reporte el 58% de los genes inducidos por VEGF están relacionados con inflamación, solo el 22% son inducidos selectivamente por VEGF y el 20% restante se comparte con EGF e IL-1. Algunos de los genes que se reportan como sobre-expresados en respuesta a VEGF se encontraron dentro de los genes sobre-expresados en HUVEC tratadas por 3 h con MC-ZR75.30 o TNF; dichos genes son: *F3*, *SELE*, *CEBPD*, *CXCL2*, *IL-8*, *NFKBIZ*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CCL2*, *VCAM1*, *HIVEP2*, *MAP3K8* y *CNKSR3* [155]. Hacer una comparación entre el transcriptoma inducido por cada una de las citocinas presentes en los medios condicionados y el transcriptoma de MC-ZR75.30 está limitado por los pocos estudios que existen en ese sentido. Por otra parte, TNF [153, 156, 157] y VEGF [155, 158, 159] son las citocinas más utilizadas en estudios de expresión seguidas por IL-1 [160], sin embargo, para IL-6, IL-8, IFN- γ y G-CSF no hay bibliografía existente de microarreglos en células endoteliales HUVEC tratadas con alguna de estas citocinas. Sin embargo, si existen análisis de expresión de células endoteliales asociadas al tumor (TAECs por sus siglas en inglés), en dicho trabajo se aislaron células asociadas al tumor de un modelo murino singénico silvestre de melanoma y un knock out para el receptor 1 y 2 de TNF (TNFR1 y 2). Al realizar el análisis bioinformático encontraron a NF κ B como regulador del proceso tumoral así como a genes asociados a inflamación como TNF e IFN- γ [161].

El análisis de ontología génica realizado con el programa NCI-DAVID, arrojó 3 procesos biológicos con un valor de p menor a e^{-10} . Para el tratamiento con MC-ZR75.30 hubo 3 procesos en esta categoría: respuesta inflamatoria, respuesta a cicatrización y espacio extracelular. Para el tratamiento con TNF hubo 7 procesos: sistema inmune (“defense response”), respuesta inflamatoria, respuesta a cicatrización, citocinas, regulación de la apoptosis, migración de leucocitos y metabolismo del nitrógeno (Figura 19 A). De estos 7 procesos el tratamiento con TNF comparte 2 con el tratamiento con MC-ZR75.30: respuesta inflamatoria y respuesta a cicatrización. De las listas de genes involucrados en los procesos biológicos de MC-ZR75.30 obtenemos 10 genes que son comunes a los tres procesos (*CCL2*, *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *F3*, *IL6*, *IL8*, *SELE* y *TNF*) 4 genes (*APOL3*, *NFKB1*, *NFKBIZ*, *IRAK2*) comunes a inflamación y cicatrización, 1 gen

(*TGFB3*) común a cicatrización y espacio extracelular, 1 gen (*SOD2*) exclusivo de cicatrización y 5 genes (*CSF1*, *LIF*, *ICAM1*, *TNFAIP2*, *VCAM1*) exclusivos a espacio extracelular. (Figura 19 B) estos genes podrían tener un papel relevante en el proceso adhesivo ya que además forman parte de los grupos o “clusters” más evidentes en la red obtenida por STRING (Figura 20) y algunos se encuentran dentro de los 10 genes con los valores de veces de cambio más grandes tales como *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2*, *F3*, *IL6*, *IL8*, *SELE*, *TNFAIP2* y *VCAM1* (Figura 18).

Es interesante que el proceso de respuesta inflamatoria y cicatrización aparezcan en primer y segundo lugar, ya que este último involucra una respuesta inflamatoria, movilización de tipos celulares y reparación del tejido, eventos similares que se llevan a cabo en la progresión tumoral. Hace más de dos décadas, Dvorak reconoció que la composición del estroma tumoral, es muy similar al tejido de granulación de las heridas cicatrizantes de la piel, sugiriendo que los tumores son heridas que no cicatrizan [162]. El estudio de varias fases de la cicatrización y la tumorigénesis, revelan muchas similitudes entre ambos procesos [163]. Además de que se promueve una respuesta inflamatoria en ambos procesos con el fin de eliminar las células muertas y restaurar la integridad tisular [163]. Sin embargo, la respuesta inflamatoria en el proceso de cicatrización está regulada tanto en duración como en magnitud, a diferencia de la respuesta inflamatoria durante el desarrollo del cáncer la cual no parece estar limitada.

Por otro lado, el análisis ontológico realizado en PANTHER, para el tratamiento con MC-ZR75.30, identifica al sistema inmune como el proceso biológico más representativo, seguido de comunicación celular, procesos celulares, respuesta a estímulos y metabolismo (Figura 19 C). En el tratamiento con TNF, el proceso más representativo fue metabolismo, seguido de procesos celulares, comunicación celular, sistema inmune y desarrollo (Figura 19D). Este cambio de los procesos en el tratamiento con TNF principalmente, se puede deber a que hubo cambios en la expresión de varios factores de transcripción ya sea sobre-expresados o reprimidos; inclusive de los 10 genes reprimidos 7 son factores de transcripción o están asociados al proceso transcripcional y

además algunos de ellos asociados a desarrollo, es probable que por esta razón ahora aparezca el metabolismo como el proceso más representativo. En contraste, en el análisis con el programa NCI-DAVID el metabolismo del nitrógeno ocupa el séptimo lugar y el desarrollo no está presente. La importancia de los factores de transcripción en el transcriptoma de TNF, se puede apreciar en la red de asociación de STRING, en donde varios factores de transcripción se encuentran dentro de la agrupación o cluster principal (Figura 21).

Encontrar enfermedades relacionadas con inflamación crónica como fibrosis hepática, aterosclerosis y artritis, como vías canónicas de señalización (Tabla 7) resulta confuso, y lo es más, que la fibrosis hepática aparezca en primer lugar en el tratamiento con MC-ZR75.30 y en segundo lugar en el tratamiento con TNF. Lo más probable es que este hecho se deba a que hay varios genes con las veces de cambio más altas, como los relacionados al complejo NF κ B, moléculas de adhesión (*ICAM1* y *VCAM1*), citocinas (*IL6*) y quimiocinas (*IL8*). Todos estos genes, se encuentran asociados a las vías de señalización de la fibrosis hepática. Por otra parte, se sabe que la fibrosis hepática es un evento previo a la cirrosis o al desarrollo de un hepatocarcinoma cuyos principales agentes causales son los virus de hepatitis B o C los cuales generan infiltrados de células inflamatorias generando ciclos de daño-inflamación-regeneración. La activación de la vía clásica de señalización de NF κ B ha sido estudiada ampliamente en modelos murinos de carcinogénesis hepática, sugiriendo que es una de las vías de señalización más importantes en este ciclo de daño-inflamación-regeneración que conlleva al hepatocarcinoma [164]. Esto puede explicar también porque los procesos de inflamación y cicatrización sobresalen como los procesos más representativos en el tratamiento con MC-ZR75.30. Además, es importante mencionar que dentro de las vías canónicas de los genes asociados al tratamiento con MC-ZR75.30 se encuentra en tercer lugar la adhesión de granulocitos y diapédesis. Los genes asociados a esta vía de señalización son *TNF*, *IL8*, *SELE*, *ICAM1* y *VCAM1*. A pesar de no tener el puntaje o “score” más alto la adhesión y diapédesis, como era de esperarse ya que es el proceso analizado, si aparece dentro de las tres primeras vías canónicas.

Apoyando los datos de las vías canónicas, cabe resaltar que Pitroda y colaboradores, realizaron una comparación entre genes ortólogos humanos obtenidos del microarreglo de ratones con aquellos genes reportados en las bases de datos de enfermedades anti-inflamatorias humanas. En este estudio encontraron 49 genes en común con cirrosis, enfermedad de Bowel y artritis, dichos genes, los analizaron en diversos tipos de cáncer identificando 6 genes asociados a cáncer de los 49 genes relacionados con enfermedades inflamatorias [161]. Demostrando que un perfil de expresión endotelial inflamatorio, diferencialmente expresado en enfermedades inflamatorias, puede estar asociado a procesos de carcinogénesis. Tomando en cuenta que el transcriptoma aquí analizado proviene de células endoteliales normales, se sugiere que las moléculas secretadas por las células tumorales inducen a la célula endotelial normal a responder a estas señales pro-carcinogénicas expresando genes de programas celulares de adhesión, migración y proliferación que contribuyen a una remodelación vascular y ayudaría en la progresión tumoral.

Como resultado del análisis bioinformático se seleccionaron 15 genes para validar por PCR en tiempo real. Estos genes están asociados a los procesos de adhesión, inflamación, quimiotaxis y algunos forman parte del complejo NF κ B otros son exclusivos a los tratamientos como *CDKN1B* que codifica para el inhibidor de ciclo celular p27, *TGFB3* que codifica para la isoforma 3 de TGF β y *SORBS1* que codifica para una proteína de asociación a FAK y también funciona como sustrato de c-Abl. *SORBS1* además participa en la vía PAK y en las uniones adherentes (Tabla 9). Varios de los genes validados han sido asociados a cáncer, incluso *PPP1R3C* ha sido propuesto como posible supresor tumoral en melanoma [125] y su expresión en células endoteliales está asociada a angiogénesis [126].

En general, la validación de los mensajeros coincide con el microarreglo, si bien no se obtuvieron los mismos valores, si se conserva la misma tendencia de sobre-expresión. En contraste, los genes reprimidos como *PPP1R3C* y *CDKN1B* mostraron tener una expresión menor al control, pero no negativa. Esta diferencia en los valores se puede explicar considerando que los ensayos de tiempo real tienen mayor sensibilidad y

precisión debido a la flexibilidad en el número de ciclos que se utilizan, lo que permite detectar señales cercanas al umbral de detección del microarreglo. En los ensayos de microarreglo, el análisis de este grupo de valores se ve afectado por la necesidad de emplear una misma T_m para todas las sondas [165, 166]. Podemos concluir que ambas metodologías son complementarias y que para tener una certeza en la expresión se debe comparar con otras metodologías como el northern blot o microarreglos de cDNA.

La participación de la vía canónica de $\text{NF}\kappa\text{B}$ en el fenotipo pro-adhesivo se corroboró mediante la inhibición farmacológica con el inhibidor irreversible y selectivo Bay 11-7085 cuyo blanco es $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. La función del inhibidor es impedir la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ resultando en una disminución de $\text{NF}\kappa\text{B}$, dicho efecto ocurre a una IC_{50} de 10 μM . Este compuesto actúa inhibiendo la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ inducida en respuesta a citocinas, principalmente TNF sin afectar la fosforilación constitutiva de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ [167]. Debido a esto, la formación del complejo: $\text{NF}\kappa\text{B}$ -secuencia consenso se abate cuando se pre-trata con el inhibidor y el medio condicionado, mientras que la expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se abate cuando se trata con el medio condicionado y se restablece cuando se da pre-tratamiento con el inhibidor (Figura 24 A y B). Esta relación inversa se da debido a que es necesaria la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ por las IKKs para que pueda ser degradada por el proteosoma y permita la liberación del complejo $\text{NF}\kappa\text{B}$ permitiendo su traslocación al núcleo y así llevar a cabo la activación transcripcional de sus genes responsivos, tales como selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 [148, 167]. Es por esto que, la expresión de estas tres proteínas también se ve afectada por el tratamiento con Bay 11-7085 (Figura 24 C). La inhibición de la vía culmina con la reversión del fenotipo pro-adhesivo ya que este fenotipo es dependiente de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 (Figura 24 D). En el ensayo de adhesión, la condición que solo fue tratada con Bay 11-7085 muestra menor adhesión que el control sin tratamiento, este efecto puede ser por la toxicidad del vehículo del inhibidor, en este caso se utilizó DMSO, para evitar este efecto, se podría sustituir al DMSO por etanol como vehículo. Quedaría por realizar un experimento de validación fisiológica con

RNAs de interferencia contra las IKKs o miembros de NF κ B como p65, p50, C-Rel o p52.

Por último, se determinó la activación de STAT3 y el receptor 2 de VEGF a tiempos cortos, ya que no se obtuvieron datos que indicaran una expresión génica asociada a estas moléculas a 3 h de tratamiento con el MC-ZR75.30. Sin embargo, al analizar la activación mediante un curso temporal de 5 a 180 min si encontramos activación tanto de VEGFR2 como de STAT3 (Figura 25). Estos resultados indican que ambas vías se encuentran funcionales y se activan en respuesta al MC-ZR75.30. No obstante, el fenotipo pro-adhesivo inducido por IL-6 y VEGFA no fue significativo al compararse con TNF o MC-ZR75.30. Por otra parte, como se mencionó antes, al analizar la lista de genes y la bibliografía, encontramos 13 genes responsivos a VEGF (*F3, SELE, CEBPD, CXCL2, IL-8, NFKBIZ, CXCL1, CXCL3, CCL2, VCAM1, HIVEP2, MAP3K8 y CNKSR3*) [155] y 8 a STAT3 (*IL6, CEBPD, NFKBIA, SOD2, ICAM1, IRF1, CXCL2 y CCL2*) [168]. Así mismo, se ha reportado una interacción en la activación de STAT3 y NF κ B en la regulación del microambiente tumoral y las células tumorales, ya que es común que citocinas cuya expresión es dependiente de NF κ B en células del sistema inmune promuevan a su vez la activación de STAT3 tanto en células tumorales como en células normales como es el caso de IL-6 [123, 164, 169, 170]. Otras formas de interacción entre NF κ B y STAT3 incluyen: 1) la interacción directa entre los dos factores de transcripción, 2) la cooperación de ambos factores en los promotores o amplificadores de algunos genes es decir actúan como cofactores, 3) la expresión dependiente de NF κ B de inhibidores de la activación de STAT3 y 4) la participación de STAT3 como regulador negativo de NF κ B en células inflamatorias [169]. A pesar de estas diversas interacciones, algunas veces incluso antagónicas, ambos factores cooperan para promover el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer.

X. CONCLUSIONES

En el presente estudio, demostramos que el MC-ZR75.30 induce un fenotipo pro-adhesivo en células HUVEC similar al inducido por TNF y que este fenotipo pro-adhesivo está regulado por genes asociados a inflamación y a la vía NFκB. La inhibición farmacológica con BAY11-7085 inhibe la traslocación de NFκB (p65) al núcleo, la adhesión y la expresión de las CAMs: Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 y restaura la expresión de IκBα. Por lo tanto, podemos concluir que la activación de la vía canónica NFκB es esencial en el fenotipo pro-adhesivo.

NFκB es un blanco terapéutico potencial, ya que intervenir con esta vía podría comprometer la eficiencia de los procesos de adhesión y extravasación asociados con la metástasis.

XI. PERSPECTIVAS

- Determinar si la inhibición de VEGFR2 y STAT3 (IL-6, G-CSF, IL-8) afecta el proceso adhesivo inducido por MC-ZR75.30.
- Analizar la expresión de blancos transcripcionales de VEGF y STAT3 inducidos por MC-ZR75.30.
- Determinar el patrón de expresión de células endoteliales tratadas con medios condicionados provenientes de diferentes líneas celulares de cáncer de mama (MCF-10A, MDA-MB-23, BT474, SKBR3).
- Determinar si la inhibición de la vía NF κ B inhibe el crecimiento tumoral en modelos de metástasis experimental en ratones nu/nu.

XII.BIBLIOGRAFIA

1. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
2. Bertos, N.R. and M. Park, *Breast cancer - one term, many entities?* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3789-96.
3. Organización Mundial de la Salud. *Cáncer.*; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
4. Forouzanfar, M.H., et al., *Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet, 2011. **378**(9801): p. 1461-84.
5. Porter, P., *"Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries*. N Engl J Med, 2008. **358**(3): p. 213-6.
6. World Health Organization. *Breast cancer: prevention and control.*; Available from: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>.
7. Palacio-Mejia, L.S., et al., *[Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006]*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 2**: p. s208-19.
8. INEGI, *Statistics about the world day against cancer national data*. 2011: INEGI.
9. *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario*. 2015, Masson Doyma México, S.A.: México, D.F.
10. Ernster, V.L., et al., *Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(20): p. 1546-54.
11. Corben, A.D., *Pathology of invasive breast disease*. Surg Clin North Am, 2013. **93**(2): p. 363-92.
12. Andersen, J.A., *Lobular carcinoma in situ of the breast. An approach to rational treatment*. Cancer, 1977. **39**(6): p. 2597-602.
13. Harrison, A.M., et al., *Lessons learned from an unusual case of inflammatory breast cancer*. J Surg Educ, 2012. **69**(3): p. 350-4.
14. Badve, S., et al., *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. Mod Pathol, 2011. **24**(2): p. 157-67.
15. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
16. Malhotra, G.K., et al., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(10): p. 955-60.
17. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
18. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
19. Hsieh, C.C., et al., *Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study*. Int J Cancer, 1990. **46**(5): p. 796-800.
20. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
21. Vassilopoulou-Sellin, R., *Breast cancer and hormonal replacement therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **997**: p. 341-50.
22. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.

23. Lorusso, G. and C. Ruegg, *The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(6): p. 1091-103.
24. Witz, I.P., *Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons*. *Adv Cancer Res*, 2008. **100**: p. 203-29.
25. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
26. Ruegg, C., *Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(4): p. 682-4.
27. Robinson, S.C. and L.M. Coussens, *Soluble mediators of inflammation during tumor development*. *Adv Cancer Res*, 2005. **93**: p. 159-87.
28. Allavena, P., et al., *The inflammatory micro-environment in tumor progression : the role of tumor associate macrophages*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. **66**: p. 1-9.
29. Benelli, R., et al., *Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(24): p. 3101-15.
30. Prescott, S.M. and F.A. Fitzpatrick, *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1470**(2): p. M69-78.
31. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
32. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(1): p. 19-26.
33. Rollins, B.J., *Inflammatory chemokines in cancer growth and progression*. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(6): p. 760-7.
34. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 344-62.
35. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(6): p. 280-8.
36. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
37. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(8): p. 758-65.
38. Neri, A., et al., *B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50*. *Cell*, 1991. **67**(6): p. 1075-87.
39. Demicco, E.G., et al., *RelB/p52 NF-kappaB complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor *IkappaB-alpha* expression and promote carcinogenesis of the mammary gland*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(22): p. 10136-47.
40. Gilmore, T.D., *The *Rel1/NF-kappa B/I kappa B* signal transduction pathway and cancer*. *Cancer Treat Res*, 2003. **115**: p. 241-65.
41. Kato, T., Jr., et al., *CK2 Is a C-Terminal *IkappaB* Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response*. *Mol Cell*, 2003. **12**(4): p. 829-39.
42. DeBusk, L.M., P.P. Massion, and P.C. Lin, **IkappaB* kinase-alpha regulates endothelial cell motility and tumor angiogenesis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(24): p. 10223-8.
43. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
44. Huang, S., *Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(5): p. 1362-6.

45. Nicholson, S.E. and D.J. Hilton, *The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 665-8.
46. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1803-5.
47. Nadiminty, N., et al., *Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7264-9.
48. Niu, G., et al., *Role of Stat3 in regulating p53 expression and function*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7432-40.
49. Niu, G., et al., *Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis*. Oncogene, 2002. **21**(13): p. 2000-8.
50. Xu, Q., et al., *Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways*. Oncogene, 2005. **24**(36): p. 5552-60.
51. Deo, D.D., et al., *Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21237-45.
52. Bartoli, M., et al., *VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells*. FASEB J, 2003. **17**(11): p. 1562-4.
53. Schaefer, L.K., et al., *Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2)*. Oncogene, 2002. **21**(13): p. 2058-65.
54. Xie, T.X., et al., *Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3188-96.
55. Xie, T.X., et al., *Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis*. Oncogene, 2004. **23**(20): p. 3550-60.
56. Itoh, M., et al., *Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells*. Oncogene, 2006. **25**(8): p. 1195-204.
57. Dechow, T.N., et al., *Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10602-7.
58. Silver, D.L., et al., *Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility*. Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3550-8.
59. Molloy, T. and L.J. van 't Veer, *Recent advances in metastasis research*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 35-41.
60. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
61. DeNardo, D.G., M. Johansson, and L.M. Coussens, *Immune cells as mediators of solid tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 11-8.
62. Woodward, J., *Crossing the endothelium: E-selectin regulates tumor cell migration under flow conditions*. Cell Adh Migr, 2008. **2**(3): p. 151-2.
63. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
64. Wilson, J. and F. Balkwill, *The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(2): p. 113-20.

65. Borsig, L., et al., *Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2193-8.
66. Laakkonen, P., et al., *A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 751-5.
67. Weigelt, B., et al., *Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15901-5.
68. Minn, A.J., et al., *Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 44-55.
69. Miles, F.L., et al., *Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(4): p. 305-24.
70. Zetter, B.R., *Adhesion molecules in tumor metastasis*. Semin Cancer Biol, 1993. **4**(4): p. 219-29.
71. Tantivejkul, K., L.M. Kalikin, and K.J. Pienta, *Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone*. J Cell Biochem, 2004. **91**(4): p. 706-17.
72. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
73. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell, 1991. **65**: p. 859-873.
74. Giavazzi, R., et al., *Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 3038-44.
75. Tozeren, A., H.K. Kleinman, and D.S.e.a. Grant, *E-selectin-mediated dynamic interactions of breast and colon cancer cells with endothelial cell monolayers*. Int J Cancer, 1995. **60**: p. 426-431.
76. Khaldoyanidi, S.K., et al., *MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4127-34.
77. Glinsky, V.V., et al., *The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4851-7.
78. Glinskii, O.V., et al., *Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs*. Neoplasia, 2005. **7**(5): p. 522-7.
79. Khatib, A.M., et al., *Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 749-59.
80. Auguste, P., et al., *The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1781-92.
81. Wang, H.S., et al., *CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1)*. Exp Cell Res, 2005. **304**(1): p. 116-26.
82. Fujisaki, T., et al., *CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4427-34.
83. Voura, E.B., N. Chen, and C.H. Siu, *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) redistributes from the endothelial junction and is not required for the transendothelial migration of melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(6): p. 527-32.
84. Rahn, J.J., et al., *MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1*. Clin Exp Metastasis, 2005. **22**(6): p. 475-83.

85. Lewalle, J.M., et al., *Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro*. *Exp Cell Res*, 1997. **237**(2): p. 347-56.
86. Sandig, M., et al., *Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1997. **38**(4): p. 351-64.
87. Iizumi, M., et al., *Tumor-endothelial cell interactions: therapeutic potential*. *Microvasc Res*, 2007.
88. Cooper, C.R., et al., *Cancer cells homing to bone: the significance of chemotaxis and cell adhesion*. *Cancer Treat Res*, 2004. **118**: p. 291-309.
89. Tremblay, P.L., J. Huot, and F.A. Auger, *Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions*. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5167-76.
90. St Croix, B., et al., *Genes expressed in human tumor endothelium*. *Science*, 2000. **289**(5482): p. 1197-202.
91. Arap, W., R. Pasqualini, and E. Ruoslahti, *Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model*. *Science*, 1998. **279**: p. 377-380.
92. Carson-Walter, E.B., et al., *Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6649-55.
93. Seaman, S., et al., *Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(6): p. 539-54.
94. Nanda, A. and B. St Croix, *Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy*. *Curr Opin Oncol*, 2004. **16**(1): p. 44-9.
95. Hellebrekers, D.M., et al., *Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(2): p. 467-75.
96. Kim, M.S., et al., *Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 437-43.
97. Hellebrekers, D.M., et al., *Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4138-48.
98. Baluk, P., H. Hashizume, and D.M. McDonald, *Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(1): p. 102-11.
99. Bielenberg, D.R., et al., *Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function*. *Exp. Cell Res*, 2006. **312**: p. 584-593.
100. Buckanovich, R.J., et al., *Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer*. *J. Clin. Oncol.*, 2007. **25**: p. -861.
101. Castronovo, V., et al., *A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer*. *Mol. Cell Proteomics*, 2006. **5**: p. 2083-2091
102. Hida, K. and M. Klagsbrun, *A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities*. *Cancer Res*, 2005. **65**: p. 2507-2510.
103. Lu, C., et al., *Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma*. *Cancer Res.*, 2007. **67**: p. 1757-1768.
104. Zhang, T., et al., *Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential*. *Clin. Cancer Res*, 2005. **11**: p. 8557-8563.
105. Katanasaka, Y., et al., *Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30**(12): p. 2300-7.
106. Yeung, Y.G. and E.R. Stanley, *A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobings*. *Anal Biochem*, 2009. **389**(1): p. 89-91.

107. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
108. Szklarczyk, D., et al., *STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D447-52.
109. Mi, H., et al., *Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system*. Nat Protoc, 2013. **8**(8): p. 1551-66.
110. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
111. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
112. Luboshits, G., et al., *Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4681-7.
113. Montes-Sanchez, D., et al., *Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells*. BMC Chem Biol, 2009. **9**: p. 7.
114. Ghadjar, P., et al., *The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer*. Int J Cancer, 2009. **125**(4): p. 741-5.
115. Marsigliante, S., C. Vetrugno, and A. Muscella, *CCL20 induces migration and proliferation on breast epithelial cells*. J Cell Physiol, 2013. **228**(9): p. 1873-83.
116. Bruneau, S., et al., *DEPTOR regulates vascular endothelial cell activation and proinflammatory and angiogenic responses*. Blood, 2013. **122**(10): p. 1833-42.
117. Bendall, L., *Chemokines and their receptors in disease*. Histol Histopathol, 2005. **20**(3): p. 907-26.
118. Acharyya, S., et al., *A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis*. Cell, 2012. **150**(1): p. 165-78.
119. Chu, I.M., L. Hengst, and J.M. Slingerland, *The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 253-67.
120. Konstantopoulos, K. and S.N. Thomas, *Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells*. Annu Rev Biomed Eng, 2009. **11**: p. 177-202.
121. Tesarova, P., et al., *Endotelial activation and flow-mediated vasodilation in young patients with breast cancer*. Neoplasma, 2013. **60**(6): p. 690-7.
122. Brasier, A.R., *The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 211-8.
123. Naugler, W.E. and M. Karin, *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer*. Trends Mol Med, 2008. **14**(3): p. 109-19.
124. Bieche, I., et al., *Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6789-95.
125. Bonazzi, V.F., D. Irwin, and N.K. Hayward, *Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(1): p. 10-21.
126. Ferrari, N., et al., *The transforming growth factor-beta family members bone morphogenetic protein-2 and macrophage inhibitory cytokine-1 as mediators of the antiangiogenic activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(12): p. 4610-9.
127. Gout, S., P.L. Tremblay, and J. Huot, *Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(4): p. 335-44.
128. Genua, M., et al., *c-Abl and insulin receptor signalling*. Vitam Horm, 2009. **80**: p. 77-105.

129. Walshe, T.E., N.G. dela Paz, and P.A. D'Amore, *The role of shear-induced transforming growth factor-beta signaling in the endothelium*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(11): p. 2608-17.
130. Chen, L.C., et al., *A novel role for TNFAIP2: its correlation with invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(2): p. 175-84.
131. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(9): p. 372-7.
132. Song, G.G., et al., *Associations between TRAF1-C5 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. *Immunol Invest*, 2014. **43**(2): p. 97-112.
133. Luster, A.D., R. Alon, and U.H. von Andrian, *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1182-90.
134. Lu, X., et al., *VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(6): p. 701-14.
135. Chen, Q., X.H. Zhang, and J. Massague, *Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(4): p. 538-49.
136. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
137. Maruyama, Y., *The human endothelial cell in tissue culture*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1963. **60**(1): p. 69-79.
138. Denis, C.V., *Molecular and cellular biology of von Willebrand factor*. *Int J Hematol*, 2002. **75**(1): p. 3-8.
139. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 515-27.
140. Tong, D., et al., *Association of in vitro invasiveness and gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2 and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **56**(1): p. 91-7.
141. Landskron, G., et al., *Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 149185.
142. Kowanzet, M. and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(17): p. 5018-22.
143. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
144. Zaidi, M.R. and G. Merlino, *The two faces of interferon-gamma in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6118-24.
145. Altundag, K., et al., *Addition of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) to adjuvant treatment may increase survival in patients with operable breast cancer: interaction of G-CSF with dormant micrometastatic breast cancer cells*. *Med Hypotheses*, 2004. **63**(1): p. 56-8.
146. Natori, T., et al., *G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **297**(4): p. 1058-61.
147. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(12): p. 858-70.
148. Denk, A., et al., *Activation of NF-kappa B via the I kappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28451-8.

149. Ringner, M., *What is principal component analysis?* Nat Biotechnol, 2008. **26**(3): p. 303-4.
150. Kuscu, C., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of KIAA1199 gene expression in human breast cancer.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44661.
151. Birkenkamp-Demtroder, K., et al., *Repression of KIAA1199 attenuates Wnt-signalling and decreases the proliferation of colon cancer cells.* Br J Cancer, 2011. **105**(4): p. 552-61.
152. Howarth, K.D., et al., *Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes.* Oncogene, 2008. **27**(23): p. 3345-59.
153. Viemann, D., et al., *Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells.* Blood, 2004. **103**(9): p. 3365-73.
154. Josko, J. and M. Mazurek, *Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis.* Med Sci Monit, 2004. **10**(4): p. RA89-98.
155. Schweighofer, B., et al., *The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation.* Thromb Haemost, 2009. **102**(3): p. 544-54.
156. Zhou, J., et al., *Genomic-scale analysis of gene expression profiles in TNF-alpha treated human umbilical vein endothelial cells.* Inflamm Res, 2002. **51**(7): p. 332-41.
157. Perrot-Appanat, M., et al., *Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21589.
158. Shin, J.W., R. Huggenberger, and M. Detmar, *Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis.* Blood, 2008. **112**(6): p. 2318-26.
159. Rivera, C.G., et al., *Analysis of VEGF--a regulated gene expression in endothelial cells to identify genes linked to angiogenesis.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24887.
160. Mayer, H., et al., *Deciphering regulatory patterns of inflammatory gene expression from interleukin-1-stimulated human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1192-8.
161. Pitroda, S.P., et al., *Tumor endothelial inflammation predicts clinical outcome in diverse human cancers.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46104.
162. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.* N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
163. Schafer, M. and S. Werner, *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 628-38.
164. He, G. and M. Karin, *NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer.* Cell Res, 2011. **21**(1): p. 159-68.
165. Sinicropi, D., M. Cronin, and M.-L. Liu, *Gene expression profiling utilizing microarray technology and RT-PCR,* in *BioMEMS and biomedical nanotechnology.* 2007, Springer. p. 23-46.
166. Allanach, K., et al., *Comparing microarray versus RT-PCR assessment of renal allograft biopsies: similar performance despite different dynamic ranges.* Am J Transplant, 2008. **8**(5): p. 1006-15.
167. Pierce, J.W., et al., *Novel inhibitors of cytokine-induced IkkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo.* J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21096-103.
168. Dauer, D.J., et al., *Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer.* Oncogene, 2005. **24**(21): p. 3397-408.
169. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(1): p. 11-9.

170. McFarland, B.C., et al., *NF-kappaB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78728.

XIII. ANEXO

- Figuras:

Figura 26: Controles para la obtención de extractos nucleares enriquecidos.

- Artículos publicados:

Mejia- Rangel J, Córdova E, Orozco L, Ventura- Gallegos JL, Mitre- Aguilar I, Escalona- Guzmán, Vadillo F, Vázquez- Prado J, Gariglio P, Zentella- Dehesa A. Pro- adhesive phenotype of normal endothelial cells responding to metastatic breast cancer cell conditioned medium is linked to NFκB- mediated transcriptomic regulation. Int J Oncol. 2016.

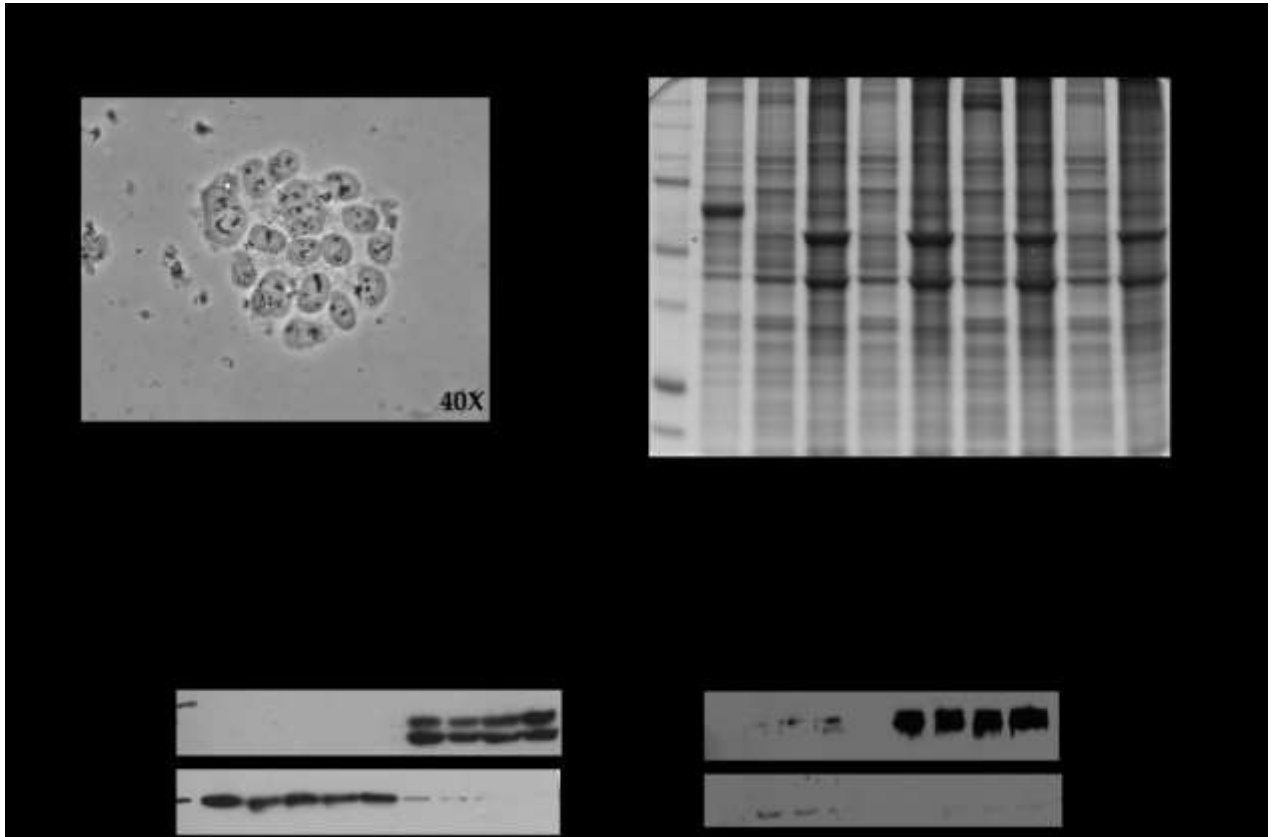


Figura 26: Controles para la obtención de extractos nucleares enriquecidos. A) Micrografía de núcleos de células HUVEC. B) SDS-PAGE del patrón de proteínas en extractos totales, nucleares y citoplasmicos. C y D) Western blot de marcadores nucleares (lámina B1 y lámina A/C) y citoplasmicos (calnexina) expresados en células HUVEC.

Pro-adhesive phenotype of normal endothelial cells responding to metastatic breast cancer cell conditioned medium is linked to NF κ B-mediated transcriptomic regulation

JANINI MEJÍA-RANGEL¹, EMILIO CÓRDOVA², LORENA OROZCO², JOSÉ LUIS VENTURA-GALLEGOS³, IRMA MITRE-AGUILAR⁴, ALMA ESCALONA-GUZMÁN³, FELIPE VADILLO^{5,6}, JOSÉ VÁZQUEZ-PRADO⁷, PATRICIO GARIGLIO¹ and ALEJANDRO ZENTELLA-DEHESA^{3,4}

¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV);

²Immunogenomics and Metabolic Disease Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN);

³Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM; ⁴Biochemistry Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ);

⁵Faculty of Medicine, UNAM; ⁶Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN); ⁷Department of Pharmacology, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Mexico City, Mexico

DOI: 10.3892/ijo_XXXXXXX

Abstract. Tumor microenvironment is an important promoter of tumorigenesis in all forms of breast cancer and has been associated with the risk of metastasis in the different breast cancer subtypes including the more frequent luminal subtypes that encompass 60% of cancer patients. Adhesive properties of endothelial cells (ECs) are strikingly affected during cancer cell dissemination and are related to functional changes of adhesion receptors. The contribution of tumor secreted factors to tumor-EC adhesion represents a therapeutic opportunity for breast cancer metastasis. Conditioned medium (CM) of tumor cells can be used as a model to study the role of the secreted molecules to the tumor microenvironment. We explored transcriptomic changes associated to a pro-adhesive phenotype in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with CM of the breast cancer cell line ZR75.30 or with TNF for 3 h. Selected genes were used to validate the microarray through RT-qPCR. The bioinformatic analysis identified NF κ B as the main regulator of the pro-adhesive phenotype and this was confirmed by pharmacological inhibition of NF κ B pathway with BAY 11-7085. The changes induced by ZR75.30-CM mimic those promoted by TNF and display changes in the expression of genes related to inflammatory response, wound

healing, extracellular matrix, cytokines, metabolism and cell communication. Despite the abundance of G-CSF, IL-8, IL-6 and VEGF in the ZR75.30-CM and the confirmed activation of STAT3 and VEGFR2 pathways, our results suggest dominance of NF κ B as a central controller of the transcriptomic response of ECs to breast cancer cells leading to expression of cell adhesion receptors.

Introduction

Breast cancer is one of the most frequent causes of death among female population worldwide (1). Metastasis is responsible for >90% of breast cancer mortalities but it is one of the least understood stages of tumor development. Primary luminal A and B subtypes of breast cancer represent 60% of the tumors (2). From the two luminal subtypes, luminal B is the most aggressive tumor (2,3). Following initial clinical response, 40-50% of these patients present recurrence with metastases (4).

The crucial role of the tumor microenvironment in cancer development and metastasis has recently been highlighted (5). Virchow provided the first evidence of the interaction between normal tissue and tumor formation, postulating that cancer originates at sites of chronic inflammation (6,7).

The tumor microenvironment and chronic inflammation share several soluble molecules, such as cytokines, growth factors and metalloproteases, as well as a variety of distinct cell types, including endothelial cells (ECs) (8). Recruitment of ECs by tumors is essential in metastasis during tumor vascularization and because they regulate the intra- and extravasation of tumor cells (9). For a circulating tumor cell to exit the circulatory system (extravasation), it must first bind to a blood vessel wall by one of two mechanisms of arrest: physical occlusion or cell adhesion. The relative prevalence of these mechanisms depends on the biology of the tumor

Correspondence to: Dr Alejandro Zentella-Dehesa, Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico City, Mexico
E-mail: azentell@biomedicas.unam.mx

Key words: transcriptome, adhesion, NF κ B, endothelial cells, breast cancer, tumor microenvironment, metastasis