

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA
MOLECULAR



Instituto de
Fisiología

**“Efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la capacidad proliferativa y migratoria
de células provenientes de cáncer de mama”**

TESIS

Que para obtener el grado de maestra en Ciencia Fisiológicas presenta:

BQC. MONSERRAT VÁZQUEZ ROJAS

Director de Tesis

DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN

JULIO 2015

INTRODUCCIÓN

El cuerpo está compuesto por trillones de células que crecen y se dividen de forma organizada. Cuando las células envejecen o sufren algún tipo de daño, mueren y son reemplazadas por nuevas células. Estos procesos de crecimiento, proliferación y muerte celular en ocasiones se ven alterados debido a cambios que sufre el ADN, tales como eliminación, sustitución, o la adición de nucleótidos. Algunas de las alteraciones resultantes provocan que las células pierdan el control sobre su capacidad replicativa, aumentando de manera drástica el número de células e incrementado el riesgo de invadir otros tejidos y órganos. El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como un amplio grupo de enfermedades generadas por la proliferación sin control y la multiplicación autónoma de un grupo específico de células, dicho crecimiento exacerbado puede propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (OMS, 2015).

Es importante mencionar que en todos los tipos de cáncer hay una función alterada en los genes que controlan el crecimiento y la división celular, la cual puede deberse a herencia genética (5%) o a cambios epigenéticos (95%) que ocurren a lo largo de la vida en el ser humano. Los factores de riesgo más comunes relacionados con la aparición y desarrollo del cáncer son: consumo de tabaco y alcohol, dieta poco saludable, falta de actividad física, presencia de infecciones crónicas, como el virus de hepatitis B y C, y el virus de papiloma humano, entre otros. El envejecimiento es otro factor de riesgo fundamental para desarrollar cáncer, el cual está asociado con la actividad de las telomerasas. Se ha observado que la incidencia de cáncer aumenta de forma dramática con la edad y generalmente se debe a que los mecanismos de reparación celular son menos efectivos a medida que la persona envejece (American Cancer Society, 2015).

La OMS ha reportado que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, ocasionando 7.6 millones de muertes en el año 2008. La sociedad americana del cáncer ha pronosticado 1,658,370 nuevos casos de cáncer en el año 2015, solamente en los Estados Unidos de América. Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud reportó que entre los años 2007 a 2009, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de cáncer fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes (OPS, 2011).

En México, los datos más recientes que se tienen sobre el cáncer son los siguientes:

- En 2012, la principal causa de morbilidad hospitalaria en menores de 20 años es el cáncer en órganos hematopoyéticos (58.8% de los hombres y 59.5% de las mujeres) (INEGI, 2015).
- Durante 2012, más del 50% de los hombres menores de 20 años que egresan de un hospital por cáncer es debido a leucemia (INEGI, 2015).
- En 2013, del total de defunciones por tumores malignos en menores de 20 años 57.4% son hombres y 42.6% son mujeres (INEGI 2015).
- En 2012, el cáncer de mama es la principal causa de egreso hospitalario entre las mujeres de 20 años y más (30.8%) (INEGI, 2015).
- En 2011, 8 de cada 100 hombres de 20 años y más con cáncer, presentan neoplasia de próstata (INEGI, 2013).
- En 2011 de cada 100 defunciones por tumores malignos en hombres de 20 y más años, 17 fallecen por cáncer de próstata, 13 de pulmón y 9 de estómago (INEGI, 2013).

Cáncer de mama (CaM)

a) Epidemiología

El cáncer de mama es una neoplasia maligna de las células epiteliales que revisten los conductos y lobulillos de la mama, actualmente es la principal causa de muerte en las mujeres de entre 20 y 59 años de edad en todo el mundo. En Estados Unidos el cáncer de mama es la segunda causa más común de muerte por cáncer. De acuerdo con la sociedad americana del cáncer, se ha estimado para 2015 la presencia de 231,840 nuevos casos de cáncer de mama y se esperan alrededor de 40,730 muertes debido a esta enfermedad (American Cancer Society, 2015).

En México, el Instituto Nacional de Cancerología reporta que el cáncer de mama ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres y representa 11.34% de todos los casos de cáncer. La situación de la mortalidad por cáncer en México es considerada como un problema prioritario de salud pública, ya que desde 1990 los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general y su ascenso ha sido sostenido. La evidencia observada en las defunciones femeninas por cáncer de mama en la población nacional presenta un registro de 1,206 muertes en 1980, que alcanza un total de 4,897 en 2009; dichos valores absolutos representan 0.3 y 0.9% respecto de las defunciones generales nacionales de esos años (Arce et al., Cancerología 2011).

b) Factores de riesgo

Existe un gran número de estudios enfocados a evaluar la influencia de diversos factores de riesgo sobre el CaM, siendo los más comunes:

1. Género.

El hecho de pertenecer al género femenino es uno de los factores de riesgo más fuertes para padecer cáncer de mama. El género masculino también puede padecer cáncer de mama, sin embargo la incidencia de este padecimiento es escasa y hasta la fecha el cáncer de mama en hombres no está bien comprendido y muchas veces no es diagnosticado a tiempo. El cáncer de mama es más común en las mujeres debido a que las células que forman los ductos mamarios se encuentran más desarrolladas

que en el hombre, dichas células además se encuentran expuestas constantemente al efecto de estrógenos, hormonas esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de la mujer (Canadian Breast Cancer Foundation, 2014).

2. Edad.

El riesgo de padecer cáncer de mama incrementa de forma significativa a medida que la mujer envejece, no obstante este padecimiento puede presentarse a cualquier edad. Alrededor de 1 de cada 8 casos de cáncer de mama invasivo se encuentra en mujeres menores de 45 años, mientras que aproximadamente 2 de cada 3 mujeres que presentan este padecimiento son mayores de 55 años (American Cancer Society, 2015).

3. Etnia.

En general las mujeres de origen caucásico se encuentran ligeramente más predispuestas a desarrollar cáncer de mama en comparación con mujeres afro-americanas, no obstante estas últimas son las que mueren con mayor frecuencia debido a este padecimiento. Por su parte, las mujeres asiáticas, hispanas y nativo-americanas tienen un riesgo menor de desarrollar cáncer de mama y morir por esta enfermedad (National Breast Cancer Foundation, 2014).

4. Historia familiar y factores genéticos.

Aquellas mujeres que tienen algún familiar de primer grado (madre, hermana o hija) con cáncer de mama poseen el doble de riesgo de presentar este padecimiento en comparación con mujeres que no tienen familiares afectados. El riesgo es mucho mayor cuando el número de familiares que presentan cáncer de mama también es mayor. Es importante mencionar que tanto factores ambientales como aquellos relacionados con el estilo de vida representan tres cuartas partes de los factores de riesgo para presentar cáncer de mama y únicamente una cuarta parte está representada por factores hereditarios; de hecho, 87% de las mujeres que presentan cáncer de mama no tienen familiares de primer grado con esta enfermedad, además

una pequeña proporción de familias comparten genes relacionados con predisposición a cáncer de mama.

Los genes BRCA1 y BRCA2 son genes humanos que producen proteínas supresoras de tumor, las cuales ayudan a reparar el ADN dañado asegurando la estabilidad del material genético de la célula. Cuando uno o ambos genes se encuentran mutados o alterados, el ADN dañado no es reparado de forma apropiada y es muy probable el desarrollo de alteraciones celulares que lleven a la presencia de cáncer. Mutaciones específicas heredables en los genes BRCA1 y BRCA2 incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama y de ovario también, además se han visto asociados con el riesgo de padecer otros tipos de cáncer. Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 representan alrededor de un 20 a 25% del cáncer de mama hereditario y alrededor de un 5 a 10% de todos los tipos de cáncer de mama (National Cancer Institute, 2014).

5. Historia menstrual y reproductiva.

El tiempo en el que se da el comienzo y el término del estado reproductivo de una mujer puede influenciar su riesgo de desarrollar cáncer de mama. Aquellas mujeres que han tenido una mayor cantidad de ciclos menstruales debido a que comenzaron a menstruar a edad temprana (antes de los 12 años) y/o experimentaron la menopausia a edad tardía (después de los 55 años) tienen un riesgo ligeramente mayor de presentar cáncer de mama. El incremento del riesgo puede ser debido a la exposición a hormonas como estrógenos y progesterona por un periodo de tiempo mayor.

Algunos factores reproductivos tienen la facultad de modificar los niveles de hormonas sexuales; se ha visto que aquellas mujeres que no han tenido hijos o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen un riesgo ligeramente mayor de padecer cáncer de mama. El tener varios embarazos y embarazarse a edad temprana reduce el riesgo. El embarazo reduce el número total de menstruaciones en la vida de una mujer, la cual podría ser la razón de este efecto (National Breast Cancer Foundation, 2014).

6. Tejido mamario denso.

Los senos están constituidos principalmente por tejido graso, tejido fibroso, y tejido glandular. Cuando la cantidad de tejido fibroso y glandular se encuentra en mayor cantidad que la del tejido graso se dice que el seno posee un tejido mamario denso. Diversos factores pueden afectar la densidad mamaria, tales como la edad, la menopausia, el uso de medicamentos (terapia hormonal durante la menopausia), el embarazo y factores genéticos. Las mujeres que presentan un tejido mamario denso tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas con menos tejido de este tipo (Canadian Breast Cancer Foundation, 2014).

7. Falta de actividad física, sobrepeso y obesidad.

Tener sobrepeso o presentar obesidad sobre todo después de la menopausia incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama. Antes de la menopausia los ovarios producen la mayoría del estrógeno presente en el cuerpo, el tejido adiposo también produce estrógeno pero en poca cantidad, después de la menopausia los ovarios dejan de producir dicha hormona y en este caso la mayoría del estrógeno lo producen las células adiposas. Si una mujer tiene cantidades elevadas de tejido graso sobre todo después de la menopausia posee un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, ya que la cantidad de estrógenos se elevará más allá de sus valores normales. Las mujeres que padecen obesidad o sobrepeso tienen niveles elevados de insulina en la sangre, existen estudios que asocian niveles altos de insulina con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de mama (Cancer Research UK, 2014).

La razón principal por la que existe una alta tasa de mortalidad en el cáncer de mama es la presencia de metástasis, el desarrollo de este proceso es un signo de mal pronóstico en la mayoría de los pacientes que presenta cualquier tipo de cáncer. Uno de los factores más importantes no sólo para la iniciación del tumor sino para la promoción e invasión de las células tumorales es el ambiente que le rodea; en este ambiente se ha identificado la presencia de componentes que son característicos de una respuesta inflamatoria.

Inflamación

La respuesta inflamatoria consiste en la activación del sistema inmune luego de una lesión en la que el cuerpo intenta reparar el tejido dañado. Las lesiones pueden ser de tipo mecánico, químico, físico o pueden ser ocasionadas por la presencia de virus o microorganismos. La inflamación se presenta de forma aguda y crónica (Fundamentals of inflammation, 2010).

La inflamación aguda es una respuesta temprana, casi inmediata que se da después de una lesión en algún tejido y es la primera fase en la reparación de heridas. Una respuesta inflamatoria aguda puede ser desencadenada por daño a nivel celular y tisular, así como por células muertas o por agentes infecciosos. La fase aguda ocurre antes de establecerse una respuesta inmune y su objetivo principal es eliminar el agente causal del daño; se lleva a cabo en dos fases: la fase vascular y la fase celular, en la primera hay una breve constricción, seguida de una dilatación de los vasos sanguíneos presentes en la cercanía del sitio de la lesión, la segunda fase es iniciada por el movimiento de células fagocíticas hacia el área dañada, estas células comienzan a adherirse al endotelio vascular y por medio de extravasación migran hacia el tejido inflamado por medio de un proceso denominado quimiotaxis. Una vez en la zona del daño, las células fagocíticas engullen restos celulares, bacterias y otros agentes infecciosos (Patología Humana, 2008).

Por su parte, la inflamación crónica puede o no manifestarse luego de una respuesta aguda. Este tipo de inflamación es de larga duración (meses o años) debido a un estímulo agresivo persistente. La inflamación crónica es desencadenada por la adhesión de linfocitos y células mononucleares a las paredes del endotelio vascular, seguida de su extravasación al sitio de la lesión. En los compartimentos extracelulares, los linfocitos y los macrófagos secretan factores que estimulan la formación de colágeno extracelular y perpetúan la respuesta inflamatoria (Fundamentals of inflammation, 2010).

En condiciones normales el desarrollo de una respuesta inflamatoria es la forma en que un organismo se defiende de factores que rompen con su homeostasis, sin embargo, hay evidencia de que en muchas ocasiones este proceso al encontrarse de forma persistente o crónica tiene la capacidad de mantener procesos fisiológicos tales como la regeneración y reparación de tejidos generando señales de supervivencia y proliferación que al ser captadas

por células malignas, lleva a la promoción y progresión de tumores (Rakoff-Nahoum et al., 2006).

Cáncer e inflamación

El vínculo entre cáncer e inflamación se estableció por primera vez en el siglo XIX con base en estudios hechos por Rudolph Virchow, quien observó que con frecuencia los tumores surgían en sitios de inflamación crónica y que células inflamatorias como los leucocitos estaban presentes en tejidos neoplásicos (Balkwill and Mantovani, 2001).

Está comprobado que solamente una minoría de todos los cánceres son debidos a mutaciones de línea germinal, por lo que la mayoría es ocasionada por mutaciones somáticas y factores ambientales. Muchos de estos factores se encuentran vinculados estrechamente con alguna forma de inflamación crónica (Aggarwal et al., 2009).

Estudios epidemiológicos han mostrado que la inflamación crónica es un fuerte factor de predisposición para diversos tipos de cáncer. Se estima que ciertas infecciones y respuestas inflamatorias están ligadas a un 15 a 20% de todas las muertes por cáncer en el mundo (Balkwill and Mantovani, 2001).

Existen muchos detonantes de la respuesta inflamatoria que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer. La inflamación del hígado y páncreas, debida al consumo excesivo de alcohol, se encuentra relacionada con la presencia de cáncer en estos órganos; la exposición a asbestos, silica y el consumo de tabaco está asociado con inflamación y carcinoma en los pulmones; la enfermedad intestinal inflamatoria está asociada con cáncer de colon; la infección crónica por *Helicobacter pylori* está asociada con carcinoma gástrico; la hepatitis viral crónica con cáncer de hígado; las infecciones recurrentes con *Schistosoma* spp. están asociadas con carcinoma de vejiga y colon; la infección con algunas cepas agresivas del virus de papiloma humano está asociada con cáncer cervicouterino; infecciones por el virus de Epstein-Barr está relacionado con la presencia de linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo (Coussens and Werb, 2002; Shacter and Wetzman, 2002; Hussain et al., 2003; Fox and Wang, 2007).

Una de las evidencias más convincentes de la relación entre la inflamación y el cáncer se ha visto que el uso de agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) está asociado con la protección contra diversos tumores (Colotta et al., 2009). Estudios sobre el riesgo de cáncer entre pacientes que tienen tratamiento a largo plazo con aspirina y AINEs, indican que el uso de estos fármacos reduce el riesgo de cáncer de colon de un 40% a un 50% y pueden ser usados como una terapia preventiva para cáncer de pulmón, esófago y estómago. La habilidad de los AINEs para inhibir la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2) subyace al mecanismo de quimioprevención. La ciclooxigenasa 2 por ejemplo, convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas, las cuales a su vez inducen reacciones inflamatorias en tejidos dañados. La aspirina por su parte, no es selectiva sobre la inhibición de la función plaquetaria, no obstante la inactivación de las plaquetas evita que estas sintetizen prostaglandinas, endoperoxidasas y tromboxano A₂. (Baron and Sandler, 2000; García-Rodríguez y Huerta-Álvarez, 2001).

En años recientes, varias líneas de evidencia que van desde estudios epidemiológicos en humanos, hasta estudios moleculares en ratones genéticamente modificados, han llevado a la aceptación de que la inflamación juega un papel importante en el proceso de la tumorigénesis (Mantovani et al., 2008). Se ha hecho evidente que la conexión que existe entre la inflamación y el cáncer no está restringida a incrementar el riesgo en un grupo selecto de tumores, sino que, la presencia que un microambiente inflamatorio es un componente esencial de la mayoría de los tejidos neoplásicos, incluyendo aquellos donde una relación causal directa con la inflamación no está comprobada (Colotta et al., 2009; Mantovani et al., 2008).

El microambiente inflamatorio que rodea a los tumores además de estar compuesto por células cancerosas y células del estroma circundante (fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales) presenta células de la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras de origen mieloide, células dendríticas y células NK) y células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B) (de Visser et al., 2006).

En el microambiente tumoral existe un balance entre la inmunidad antitumoral y la actividad proinflamatoria originada por la presencia del tumor (Ben-Baruch, 2006), estas actividades dependen de diferentes mediadores de la inflamación, principalmente

quimiocinas, citocinas y prostaglandinas, los cuales son liberados por células inflamatorias del hospedero, células cancerosas y otros tipos celulares asociados al tumor (Kim et al., 2006). Por lo tanto, la expresión de varios mediadores y moduladores de la respuesta inmune, así como la abundancia y el estado de activación de los distintos tipos celulares que se encuentran en el microambiente tumoral, indican hacia qué dirección irá el balance de la respuesta inflamatoria; si el resultado será una inflamación promovida por el tumor o una fuerte inmunidad antitumoral (Lin and Karin, 2007). Generalmente en tumores ya establecidos el balance se inclina fuertemente hacia la inflamación pro-tumoral y el resultado de un microambiente inflamatorio persistente es una progresión del tumor acelerada, invasión de tejidos vecinos, angiogénesis y metástasis (Coussens and Werb, 2002); Dobrovolskaia and Kozlov, 2005; Karin and Greten, 2005; Karin, 2006).

En algunos tipos de cáncer las condiciones inflamatorias se manifiestan antes de que un cambio maligno ocurra, por otro lado, en otros tipos de cáncer un cambio oncogénico induce un microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo de tumores (Mantovani et al., 2008). Estos hallazgos marcan la pauta para establecer una relación entre el cáncer y la inflamación de dos maneras distintas: la primera hace evidente que la aparición de cáncer se da como una consecuencia de la presencia de condiciones inflamatorias o infecciosas; un ejemplo de esto es que hoy en día diversas lesiones inflamatorias específicas de tejido se encuentran identificadas como precursores neoplásicos, por ejemplo: la aparición de gastritis que puede producir cáncer gástrico, enfermedad inflamatoria intestinal que ocasiona cáncer de colon y pancreatitis que genera cáncer pancreático (Coussens and Werb, 2002; Allavena et al., 2008)

La segunda manera en que el cáncer se vincula con la inflamación es que en ciertas células ocurren eventos genéticos como la activación de oncogenes, rearreglos cromosomales, y la inactivación de genes supresores de tumor, lo cual transforma a las células para que adquieran la capacidad de producir mediadores de la inflamación y por lo tanto generar un microambiente inflamatorio en los tumores. Un estudio que demuestra este comportamiento involucra a la función de proteínas cinasas.

Se ha observado que para el desarrollo de dicho cáncer en la tiroides es necesario que se presente un rearrreglo en el cromosoma donde se encuentra localizado el gen que codifica para la proteína cinasa RET.

Estudios en tirocitos han comprobado que la activación de RET induce un programa transcripcional que es similar a lo que ocurre durante la inflamación, el ARN generado en estas células codifica para varios factores: factores estimuladores de colonias (CSFs) que promueven la sobrevivencia de los leucocitos y su reclutamiento de la sangre a los tejidos; interleucina 1 β , ciclooxigenasa 2 (COX2), quimiocinas como la IL-8, que promueven angiogénesis, el receptor de quimiocinas CXCR4, enzimas degradadoras de matriz extracelular y la L-selectina. Dichas moléculas inflamatorias fueron encontradas en biopsias de tumores de pacientes con metástasis (Borrello et al., 2005; De Falco et al., 2007). Estos resultados muestran que un evento genético temprano, que es necesario para la generación de un tumor, promueve el desarrollo de un microambiente inflamatorio.

Los mediadores y células efectoras de la inflamación son componentes importantes del ambiente local de los tumores ya que ayudan en la proliferación y sobrevivencia de las células malignas, promueven la angiogénesis y metástasis, evaden la respuesta inmune adaptativa y alteran las respuestas a hormonas y a agentes quimioterapéuticos (Mantovani et al., 2008).

Inflamación y cáncer de mama

Con base en diversos estudios se sabe que la formación de tumores en el cáncer de mama se debe no sólo a la presencia de cambios oncogénicos en las células epiteliales sino a las interacciones entre las células tumorales y su microambiente. Está comprobado que tanto mediadores como células efectoras del proceso inflamatorio son importantes constituyentes del microambiente tumoral, y la presencia de un microambiente inflamatorio está considerada como uno de los principales factores involucrados en la progresión maligna del cáncer de mama (Balkwill and Mantovani, 2001; Coussens and Werb, 2002; Ben-Baruch, 2003; Allavena et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, el microambiente tumoral, en el cáncer de mama y otros de estirpe epitelial, es un tejido complejo que comprende diferentes tipos celulares los cuales incluyen a las células tumorales, fibroblastos, células endoteliales, y leucocitos infiltrantes, también se encuentran presentes citocinas,

quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas, que son moléculas claves que controlan la comunicación autócrina y paracrina entre las células ya mencionadas (Valdivia-Silva et al., 2008). Particularmente, citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF- α e IL-6 se han encontrado en el microambiente tumoral del cáncer de mama.

Interleucina 6 (IL-6)

Es una citocina multifuncional que está involucrada tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, entre sus funciones se encuentra la activación de linfocitos B, el inicio de la respuesta inflamatoria aguda y la trombopoyesis (Sfanos 2012). La IL-6 es producida por múltiples tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos, células endoteliales y linfocitos T. Esta citocina además tiene la capacidad de influenciar procesos malignos como la apoptosis y la angiogénesis puede también regular el crecimiento celular, aumentar la proliferación y actuar como una señal de supervivencia para muchos tipos de células malignas (De Marzo, 1999; Haverkamp, 2008).

La IL-6 desempeña sus funciones mediante la interacción con su receptor, la subunidad alfa del receptor a IL-6, también conocida como IL-6R α o CD126 es la proteína de unión al ligando y pertenece a la familia de receptores de citocinas tipo I, el cDNA de la subunidad IL-6R α codifica para una proteína de 80 kDa la cual existe en forma transmembranal y soluble. La proteína consiste en un dominio tipo inmunoglobulina localizado cerca de su sitio N-terminal, así como varios dominios tipo fibronectina III que comprenden el sitio de unión a la citocina. La cola citoplasmática C-terminal de la forma transmembranal es corta y no posee componentes de señalización. Luego de la activación de las células mediante IL-6, el receptor a IL-6 co-precipita un segundo componente, una glicoproteína de 130kDa denominada gp130 (Rose-John S. 2001; Taga et al., 1989). La unión de IL-6 a IL-6R α provoca la dimerización de gp130, dando inicio a una serie de eventos asociados con la activación de la vía de señalización de IL-6.

La transducción de la señal de IL-6 involucra la activación de varios miembros de la familia de tirosinas cinasas JAK. Una vez que IL-6 se une a su receptor, JAK1 se vuelve enzimáticamente activo llevando a la fosforilación de tirosinas conservadas en la cola citoplasmática de gp130 lo cual resulta en la asociación de los transductores de señales y

activadores de la transcripción (STAT) a través de interacciones entre el dominio de homología 2 scr de los STATs y las tirosinas fosforiladas de la subunidad gp130 produciendo la fosforilación de STAT3, el cual se dimeriza y es translocado hacia el núcleo de la célula donde puede iniciar cambios en la transcripción de genes reguladores de la apoptosis como Bcl-X_L, MCL-1, XIAP, *c-myc* y *Fas* (Lutticken et al., 1994; Heinrich et al., 1998; Calo et al., 2003; Darnell, 1997).

Se ha visto que la IL-6 desempeña un papel importante en el comportamiento de las células tumorales, tanto en su proliferación, migración e invasión celular. Por ejemplo, IL-6 estimula el crecimiento tumoral inhibiendo la apoptosis e induciendo la angiogénesis en células de cáncer colon-rectal. Esta citocina también se hace presente en tumores sólidos, donde potencia la migración de células endoteliales, factor importante para la angiogénesis y diseminación del tumor.

Numerosos estudios han ligado a la IL-6 con el cáncer de mama en pacientes humanos. La interleucina 6 como proteína secretada puede ser detectada en el suero sanguíneo; niveles incrementados de IL-6 se han encontrado en el suero de pacientes con cáncer de mama en comparación con pacientes sanos control (Knupfer et al., 2007). Además se ha demostrado que niveles incrementados séricos de IL-6 están correlacionados con un mal pronóstico en grupos de pacientes con cáncer de mama metastásico, aunado a esto, los pacientes con mayores niveles de IL-6 fueron menos responsivos a tratamientos quimioendócrinos que aquellos con niveles bajos de esta citocina (Zhang et al., 1999).

Se piensa que la IL-6 circulante en pacientes con cáncer de mama pueden derivarse de múltiples tipos celulares, incluyendo células inmunes, células estromales y las mismas células tumorales (Knupfer et al., 2007). Por lo tanto, basándose en la relación cada vez más evidente entre la expresión de IL-6 y el cáncer de mama se han usado cultivos de distintas líneas celulares para esclarecer los mecanismos específicos mediante los cuáles esta citocina actúa activando vías de señalización para promover el cáncer de mama.

Estudios recientes usando líneas celulares de cáncer de mama han demostrado que líneas que no poseen el receptor a estrógenos (ER-), tales como las MDA-MB-231 y MDA-MB-468 secretan de forma significativa altos niveles de IL-6, en comparación con líneas que sí

expresan el receptor a estrógenos (ER+) tales como MCF-7, T47D, BT474 Y ZR-75-1 (Sasser et al., 2007). De forma específica, estudios en la línea MCF-7, cual es positiva para receptores a estrógenos (ER+), han mostrado que la sobreexpresión de IL-6 en estas células incrementa su capacidad invasiva a través de la membrana basal *in vitro* (Sullivan et al., 2007)

Los efectos de la IL-6 sobre las células de cáncer de mama han producido resultados contradictorios. Se ha visto que IL-6 puede tanto promover como inhibir la proliferación celular dependiendo del tipo celular del que se trate, no obstante se ha encontrado de forma consistente que IL-6 promueve la movilidad celular de las células de cáncer de mama (Arihiro et al., 2000).

Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina proinflamatoria que en un principio fue identificada funcionalmente como un componente sérico producido en respuesta a una endotoxina y que inducía necrosis hemorrágica en tumores transplantados en ratones (Carswell et al., 1975; Helson et al., 1975; O'Malley et al., 1963).

El TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda y juega un importante papel en distintos eventos celulares, tales como choque séptico, inducción de otras citocinas, proliferación celular, diferenciación, necrosis y apoptosis (Rothe et al., 1992; Tracey and Cerami, 1993)

El TNF- α es producido por macrófagos, células T, células B y células NK, esta citocina se sintetiza en forma de proteína de membrana no glucosilada de tipo II, con un extremo amino terminal intracelular y un gran extremo carboxilo terminal extracelular. La forma membranal del TNF- α es cortado por una metaloproteinasas asociada a la membrana plasmática, liberando un polipéptido de 17 kD, tres de estas cadenas se polimerizan para formar la proteína del TNF- α circulante de 51 kD (Aggarwal, 2003; Black et al., 1997)

El factor de necrosis tumoral alfa media sus efectos a través de la interacción con dos tipos de receptores, TNFR1 y TNFR2. TNFR1 se encuentra expresado en la mayoría de los tipos celulares y en células transformadas, mientras que TNFR2 poseen un patrón de expresión

más limitado siendo principalmente células inmunes y células endoteliales las que lo expresan (Aggarwal, 2003). TNFR1 está compuesto por 426 aminoácidos y tiene una masa molecular de 55-60 kDa y es el que participa predominantemente en los efectos de la señalización por TNF- α . El TNFR2 está compuesto por 439 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. En ambos receptores los dominios extracelulares se encuentran altamente conservados mientras que sus dominios intracelulares son muy distintos (Aggarwal et al., 2002).

Una de las características importantes que diferencia al TNFR1 del TNFR2 es que el primero contiene un dominio de interacción proteína-proteína denominado “dominio de muerte” o “death domain” (DD) el cual está formado por 80 aminoácidos e interactúa con otras proteínas que presentan este mismo dominio, el propósito de dominio de muerte es mediar la apoptosis inducida por ligando (Itoh et al., 1991; Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia, 1993).

Una vez que el TNF- α se une a su receptor TNFR1 en la superficie celular, se desencadena la trimerización del receptor lo que provoca un cambio conformacional de receptor para la liberación de una proteína inhibidora del dominio de muerte conocida como SODD, dicha disociación permite la unión de una proteína adaptadora denominada TRADD (TNFR-Associated Death Domain), la cual sirve como plataforma para la unión de más proteínas (Chen and Goeddel, 2002; Wajant et al., 2003). Una vez que se ha unido TRADD, se pueden activar tres vías diferentes: la activación del factor de transcripción NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B), la activación de las vías de las MAP quinasas (MAPK) y la activación de vías inductoras de la apoptosis.

En el caso de la activación de NF- κ B, TRADD recluta a TRAF-2 (TNF receptor associated factor 2) y RIP (receptor interacting protein), TRAF-2 por su parte recluta al complejo enzimático IKK (I κ B kinase) permitiendo que RIP mediante su actividad de serina-treonina quinasa active a este complejo. Generalmente NF- κ B se encuentra inhibido mediante la unión con la proteína I κ B α , esta proteína al ser fosforilada por el complejo IKK activado es marcada para su degradación por ubiquitinización, debido a esto NF- κ B se encuentra libre para ser translocado al núcleo donde media la transcripción de proteínas

relacionados con la supervivencia celular, proliferación, respuesta inflamatoria y factores anti-apoptóticos (Mukhopadhyay et al., 2001; Yeh et al., 1997).

TNF- α tiene la capacidad de inducir fuertemente la activación del grupo de MAP quinasas JNK (Jun NH2-terminal kinase), así como de la p38-MAPK y en parte de las ERKs. En estas vías, TRAF2 activa quinasas inductoras de JNK tales como MLK2/MLK3, TAK1, MEKK1 y ASK1. MEKK1 puede fosforilar a MKK7, la cual a su vez activa a JNK. JNK se transloca al núcleo y activa distintos factores de transcripción tales como c-Jun y ATF2. Estas vías están involucradas en fenómenos como la diferenciación y proliferación celular (Kant et al., 2011).

Además de activar vías transcripcionales, TNF- α , a través de su receptor TNFR1 puede encender vías apoptóticas, en este caso TRADD es reclutado seguido de FADD (Fas-associated death domain) y este complejo es responsable de la oligomerización y activación de la caspasa 8, posteriormente se inicia una cascada de activación de otras caspasas (caspasa 3, 6 y 7) induciendo finalmente el proceso de apoptosis (Goldberg and Schwertfeger, 2010).

Es necesario mencionar que existe un complejo balance entre las vías de señalización desencadenadas por TNF- α . En la mayoría de los casos el receptor TNFR1 activa la vía transcripcional de NF- κ B y esta misma inhibe la activación de la vía apoptótica, además se da el reclutamiento del inhibidor celular de la apoptosis IAP-1 (Inhibitor of Apoptosis Protein 1) (Varfolomeev et al., 2008). La supresión de la actividad de NF- κ B ha demostrado que hace a las células más sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α , no obstante esto no lleva a las células a experimentar por completo la citotoxicidad inducida por esta citocina, por lo tanto esto indica que NF- κ B no es el único factor que inhibe la vía apoptótica (Natoli et al., 1998).

El factor de necrosis tumoral alfa es uno de los principales mediadores de la inflamación, sus acciones van dirigidas hacia tanto la destrucción como la recuperación de los tejidos. El papel crítico de TNF- α en enfermedades inflamatorias crónicas está bien establecido y sus efectos promotores de tumor se han demostrado ampliamente. Mientras que puede inducir la muerte de células enfermas en el sitio de inflamación, TNF- α puede estimular el

crecimiento de fibroblastos; puede destruir vasos sanguíneos pero también induce factores angiogénicos. Del mismo modo, en enfermedades malignas una alta dosis local de TNF- α puede destruir de forma selectiva vasos sanguíneos presentes en el tumor, no obstante, cuando esta citocina es producida de forma crónica, puede actuar como un promotor de tumor endógeno, contribuyendo al remodelamiento de tejido y al desarrollo de componentes estromales necesarios para el crecimiento y propagación del tumor (Balwill and Mantovani, 2001). El TNF- α producido por células tumorales e inflamatorias puede promover en el microambiente tumoral la supervivencia de las células tumorales mediante la inducción de genes que codifican moléculas antiapoptóticas inducidos por NF- κ B (Luo et al., 2004).

Existe un gran número de hallazgos que demuestran la inminente participación de TNF- α en el desarrollo y la progresión del cáncer. En un modelo experimental de metástasis hacia pulmón debido a adenocarcinoma de colon, la administración de LPS en ratones potenció el desarrollo de lesiones metastásicas, este incremento fue dependiente de la producción de TNF- α por parte de las células hematopoyéticas del hospedero, además de esto TNF- α provocó la activación de NF- κ B en las células tumorales incrementando su proliferación y supervivencia (Luo et al., 2004).

Orosz y colaboradores mostraron la potenciación de la metástasis de pulmón en un modelo experimental de fibrosarcoma, luego de que los animales fueron pre-tratados con TNF- α y que la metástasis hacia pulmón podía verse reducida debido a la participación de un anticuerpo anti-TNF- α , el cual neutralizó de forma importante los altos niveles de TNF- α endógeno (Orosz et al., 1993). Malik y colaboradores describieron la presencia de una sobreexpresión de TNF- α desencadenando la presencia de propiedades invasivas en tumores de xenoinjertos (Malik et al., 1990).

Estudios iniciales del TNF- α en muestras de cáncer de mama humanas demostraron un incremento en la expresión de TNF- α en carcinomas de mama invasivos en comparación con tejido mamario benigno (Miles et al., 1994)). El TNF- α es producido por numerosos tipos celulares, tales como células inmunes, fibroblastos y células tumorales, es importante mencionar que no se sabe si al ser secretado por distintos tipos celulares, el efecto del TNF- α es diferente durante la progresión del cáncer de mama. Estudios adicionales han

demostrado un incremento en los niveles circulantes de TNF- α están correlacionados con un incremento en la metástasis hacia nódulos linfáticos y el estado del tumor (Sheen et al., 1997).

Se han llevado a cabo diversos estudios para examinar los efectos del TNF- α exógeno en células de cáncer de mama incluyendo células ER+ como MCF-7 y T47D y células ER- como las MDA-MB-231. Los primeros estudios que se llevaron a cabo sobre el efecto del TNF- α en las células de cáncer de mama estuvieron enfocados en la promoción de apoptosis por parte de esta citocina, posteriormente se volvió claro que TNF- α tiene efectos promotores de tumor en células cancerosas (Szlosarek et al., 2006).

Como se mencionó con anterioridad, la principal causa de muerte por cáncer de mama es el desarrollo de metástasis; las células tumorales llevan a cabo este proceso debido al desarrollo de capacidades como la migración celular. Es sabido que la movilidad celular es un proceso complejo que requiere de la participación de diferentes tipos de proteínas de membrana, entre ellas se han reportado canales dependientes de voltaje, tales como el canal de sodio, e intercambiadores de iones como el intercambiador de sodio y protones NHE-1.

Canales de Sodio

En los mamíferos, los canales de sodio dependientes de voltaje son complejos proteicos que están formados por una subunidad α formadora del poro y por una o más subunidades β (Catterall, 1992). La subunidad alfa del canal tiene una masa molecular de aproximadamente 260 kDa y se encuentra asociada con al menos dos subunidades β (Catterall, 2000). Los canales de sodio en el sistema nervioso central adulto contienen a la subunidad β_2 y a la subunidad β_1 o β_3 , en las células de músculo esquelético solamente se encuentra presente la subunidad β_1 . La subunidad α formadora del poro es suficiente para la expresión funcional del canal, en cuanto a las subunidades β estas son las responsables de modular la función del canal, además pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas que participan como moléculas de adhesión celular (Isom and Catterall, 1996; Isom, 2001).

La subunidad α de los canales de sodio pertenece a una familia formada por nueve miembros Na_v1.1-Na_v1.9 que está codificada por los genes SCN1A-SCN11A (Catterall,

2008). Existen también cuatro subunidades β , $\beta 1$ - $\beta 4$, codificadas por los genes SCN1B-SCN4B (Catterall, 1992).

La función clásica de estos canales es la de participar en la generación del potencial de acción y en el proceso de conducción de las células excitables (Hille, 1992), sin embargo, también se encuentran expresados en células no excitables, tales como fibroblastos, células de la glía, células inmunes y células cancerígenas metastásicas (Brackenbury et al., 2008).

En los últimos años ha habido un gran número de publicaciones sobre estudios donde se documenta la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje (conocidos por sus siglas en inglés como VGSCs, Voltage-gated sodium channels) a lo largo de un amplio número de tipos de cáncer y se demuestra su papel en la regulación de procesos celulares tales como la migración, invasión y metástasis; estas evidencias han dado la pauta para que los canales de sodio dependientes de voltaje sean un blanco potencial en el desarrollo de terapias que puedan mejorar la calidad y el pronóstico de vida de los pacientes que padecen enfermedad metastásica a causa del cáncer.

Estudios recientes han reportado una predominante expresión de canales de sodio dependientes de voltaje en carcinomas de origen epitelial. Las distintas isoformas de la subunidad α han sido identificadas en células procedentes de los siguientes carcinomas: cáncer de mama (Roger et al., 2003; Fraser et al., 2005), cáncer cervical (Díaz et al., 2008; Hernández-Plata et al., 2012), cáncer de colon (House et al., 2010), melanoma (Carrithers et al., 2009; Allen et al., 1997), neuroblastoma (Ou et al., 2005), cáncer de ovario (Gao et al., 2010) y cáncer de próstata (Diss et al., 2001; Grimes et al., 1995). La expresión de los canales de sodio no sólo se ha visto manifestada en líneas celulares sino también se ha observado dicha expresión *in vivo* en diversas muestras de biopsias (Fraser et al., 2005; House et al., 2010).

Se ha observado que en las células cancerígenas aparece un patrón variable de la expresión de las subunidades alfa del canal de sodio. En diversos tipos de cáncer existe una múltiple expresión de subunidades α , no obstante, en cada uno de ellos se presenta una subunidad de forma dominante, por ejemplo en las células de linfoma y de cáncer de mama la isoforma que más se expresa es la Nav 1.5 (Fraser et al., 2004, Fraser et al., 2005), mientras que en

células de cáncer de próstata es la Nav 1.7 (Diss et al., 2001). Además en distintos tipos de cáncer el mRNA de la subunidad α y la expresión de su proteína se correlacionan con el potencial metastásico de la célula. Por ejemplo en el cáncer de mama la variante neonatal del gen de la subunidad α , SCN5A, se encuentra expresado unas 1800 veces más en la línea celular MDA-MB-231 altamente metastásica en comparación con la línea MCF-7 débilmente metastásica, es importante mencionar que la presencia de splicing alternativo en el ARNm de las subunidades alfa confiere variabilidad adicional entre las mismas isoformas, es por ello que en células de cáncer de mama la subunidad Nav 1.5 que se expresa es la variante neonatal, en la cual se muestra una sustitución de 7 aminoácidos en los segmentos S3 y S4 del primer dominio de la proteína (Roger et al., 2004).

Mediante estudios electrofisiológicos se investigó la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje en distintas líneas celulares de cáncer de mama, así como en una línea celular epitelial de mama normal. Las células MDA-MB-231 que se caracterizan por ser altamente metastásicas presentaron una corriente entrante de sodio activada por despolarización de la membrana; por otro lado, la línea celular epitelial de mama normal MCF-10A y las débilmente metastásicas MCF-7 y MDA-MB-468 no mostraron corriente de sodio (Fraser et al., 2005).

Para evaluar el papel del canal de sodio dependiente de voltaje en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, se utilizó TTX (tetrodotoxina), un bloqueador específico de estos canales. Se observó que la supresión farmacológica de la corriente de sodio en esta línea celular inhibe procesos celulares asociados con el proceso metastásico, los cuales incluyen migración, galvanotaxis e invasión (Roger et al., 2003; Fraser et al., 2005). Toda esta información junto con el hecho de que la baja sensibilidad del canal de sodio sugiere que la principal isoforma expresada en las células MDA-MB-231 es la Nav 1.5 (Fraser et al., 2005), indican que el canal de sodio dependiente de voltaje, específicamente la subunidad α Nav 1.5 podría estar participando de manera importante en el comportamiento maligno de la células de cáncer de mama. Aunque actualmente se desconoce el mecanismo mediante el cual la regulación de esta subunidad se encuentra incrementada, existen algunos estudios donde la actividad de la subunidad Nav 1.5 es indispensable puesto que Nav 1.5 regula la actividad quinasa Src, la fosforilación de la proteína cortactina y la polimerización de los

filamentos de actina; también se ha demostrado que incrementa la actividad del intercambiador de sodio y protones NHE-1 aumentando la salida de protones y la actividad proteolítica de catepsinas de cisteína B y S liberadas extracelularmente (Gillet et al., 2009; Brisson et al., 2011)

Intercambiadores

Los intercambiadores de sodio y protones constituyen una familia de proteínas transportadoras de membrana de tipo antiporte que se encuentran en la mayoría de los organismos. En el ser humano su función principal es la expulsión de protones del espacio intracelular a cambio de la entrada de iones sodio (Tse et al., 1993). A nivel fisiológico los intercambiadores regulan el pH, mantienen el volumen celular y participan en el crecimiento y diferenciación de la célula (Grinstein et al., 1989).

Hasta la fecha nueve isoformas (NHE1-NHE9) del intercambiador de sodio y protones se han identificado en los mamíferos (Orlowski, 2004; Nakamura et al., 2005). Dichas isoformas comparten una identidad de aproximadamente 25-70% y tienen masa molecular calculada de 74 000 a 93 000 Da (Orlowski, 2004; Khadilkar et al., 2001) El intercambiador NHE1 es la isoforma mejor caracterizada, tiene 815 aminoácidos de longitud, su dominio membranal es de 1-500 aminoácidos, cuenta con una cola citoplasmática de 501-815 residuos de aminoácidos. Su dominio transmembranal es necesario para el transporte de iones, mientras que su dominio citoplasmático se encuentra involucrado en la regulación de la actividad del intercambiador (Wakabayashi et al., 1992). El intercambiador NHE1 cuya función básica es la regulación del volumen y del pH celular trae como resultado la intervención de dicha proteína en funciones como el crecimiento, la proliferación y la migración celular, así como también en el proceso de apoptosis (Kemp et al., 2008). El NHE1 también funciona como apoyo estructural participando así en la organización del citoesqueleto. Su localización se encuentra restringida a ciertos dominios membranales y se presenta en diversos tipos celulares, por ejemplo en los lamelipodios de los fibroblastos.

A NHE1 se le ha visto involucrado en la fisiología de diferentes enfermedades siendo las principales afecciones cardíacas y cáncer. Se ha sabido desde hace mucho tiempo que el

NHE es importante para el crecimiento de tumores, ya que, se ha visto que las células tumorales con una deficiencia en la actividad de intercambio de Na^+/H^+ provoca fallas durante el crecimiento de la masa tumoral o retardos severos en su crecimiento cuando estos son implantados en ratones con un sistema inmune deprimido (Rotine et al., 1989). Diferentes estudios han hecho evidente el hecho de que el NHE1 provoca una inversión de la diferencia de pH entre el espacio intra y extracelular de modo que el ambiente intracelular es alcalino y el extracelular es ácido (Cardone et al., 2005). La presencia de esta “acidosis maligna” se considera como un aspecto clave en la transformación oncogénica de la célula y necesaria para el desarrollo y el mantenimiento del fenotipo transformado (Rich et al., 2000; Reshkin et al., 2000; Harguindey et al., 2005). Mientras este intercambiador funciona normalmente regulando el pH en células normales, en las células cancerosas el microambiente de éstas activa de modo aberrante a la proteína del NHE. Un ejemplo claro sucede en células de cáncer de mama, donde la inducción de un microambiente tumoral genera la activación anormal de NHE, lo cual a su vez dio como resultado un incremento en la movilidad e invasión de las células, estas son características que se requieren para que ocurra el proceso de metástasis (Cardone et al., 2005)

JUSTIFICACIÓN

Está comprobado que tanto mediadores como células efectoras del proceso inflamatorio son elementos constituyentes del microambiente tumoral, particularmente TNF- α e IL-6 se han detectado en el microambiente tumoral del cáncer de mama. Es un hecho que tanto IL-6 como el TNF- α estimulan la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales, desconociéndose el mecanismo molecular involucrado. De ahí el interés principal del presente proyecto que es evaluar si la presencia de IL-6 y TNF- α estimulan la capacidad proliferativa y migratoria de la línea celular triple negativa MDA-MB-231, y definir la vía de señalización involucrada.

Con respecto a la capacidad migratoria, investigaremos la expresión funcional de canales de sodio dependientes de voltaje, así como del intercambiador Na⁺/H⁺, proteínas de membrana asociadas a la movilidad celular tanto en células normales como tumorales.

HIPÓTESIS

La presencia de TNF- α e IL-6 estimulan la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB-231, mediante un incremento en los niveles de expresión de la subunidad α del canal de sodio y del intercambiador NHE1.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de TNF- α e IL-6 estimulan la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB-231, mediante un incremento en los niveles de expresión de la subunidad α del canal de sodio y del intercambiador NHE1.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si la presencia de TNF- α e IL-6 influye sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.
2. Determinar si la presencia de TNF- α e IL-6 modifica la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231.
3. Detectar la expresión del ARNm que codifica para el receptor a TNF- α e IL-6 en las células MDA-MB-231.

4. Determinar si el efecto de TNF- α e IL-6 sobre la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB-231 depende tanto de la concentración como de la duración del tratamiento.
5. Evaluar los niveles de expresión del ARNm y de la proteína de la subunidad de α del canal de sodio así como del intercambiador NHE-1 en presencia de IL-6 y TNF- α .
6. Analizar si el incremento en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, inducido por TNF- α e IL-6, es mediado por la actividad de canales de sodio y del intercambiador NHE-1.
7. Determinar la participación de NF- κ B en la vía de señalización activada por TNF- α e IL-6.

METODOLOGÍA

1. Cultivo de la línea tumoral MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama proveniente de adenocarcinoma de mama grado III. Las células crecen en modalidad de monocapa y fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm² de superficie, con medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico, se mantuvieron dentro de una incubadora a 37⁰C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 7 días se sometieron las células a un proceso de tripsinización, el cual consiste en los siguientes pasos: a) retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con 5 ml de PBS estéril (buffer que contiene NaCl, KCl, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄), b) adicionar 2 ml de una solución de tripsina al 0.25% disuelta en 453 mM de EDTA, con el fin de despegar las células del piso del matraz; c) adicionar al matraz 4 ml de medio de cultivo, y con ayuda de una pipeta serológica despegarlas mecánicamente; d) la suspensión celular fue transferida a un tubo cónico y centrifugada a 1500 rpm por cinco minutos; e) se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en medio de cultivo fresco, a partir de la cual se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células para los experimentos planeados en el proyecto.

2. Ensayo de herida para evaluar la capacidad migratoria

Para analizar el efecto de IL-6 y TNF- α sobre la migración celular, se realiza un ensayo de cierre de herida, el cual se lleva a cabo sobre una monocapa de células MDA-MB-231 que se encuentran sembradas en placas de 12 pozos, de 3.8 cm² de área. Las células se siembran y al alcanzar un 70% de confluencia son sometidas a un pre-tratamiento con IL-6 o TNF- α durante 24 horas y 48 horas, cumplidos los tiempos correspondientes, se cambia el medio a las células y se realiza una “herida” con la punta de una micropipeta estéril sobre la monocapa, las células se vuelven a tratar con IL-6 o TNF- α por aproximadamente 12 horas y posteriormente se les cambia el medio y se procede a la fijación y tinción de las células. Se realiza un lavado con 1 ml de PBS por pozo, posteriormente se adiciona un 1 ml de metanol/acetona y se incuba por 20 minutos a 4°C, después del tiempo de incubación se

retira el metanol/acetona y se agrega violeta de cresilo (1 ml por pozo), se incuba por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizan lavados con agua tridestilada y se deja reposar en 4 ml de agua a 4°C. A lo largo de la herida se toman microfotografías de 3 campos aleatorios con el objetivo 4x en un microscopio de campo claro y una cámara modelo c10 plus Jenoptick, empleando el programa pro 2.1, las imágenes son posteriormente analizadas con el programa *Image J*.

3. Conteo celular para la evaluación de la proliferación celular

Con el propósito de evaluar la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 se realizó el conteo de células mediante el uso de un contador automático celular Scepter® una vez que las células cumplen sus tiempos de tratamiento con IL-6 o TNF- α , se retira el medio de cultivo y se lavan las células con 1 ml de PBS, posteriormente se adicionan 500 μ l de tripsina a cada pozo y se incuban a temperatura ambiente por 5 minutos en constante agitación, después de este tiempo se agregan 700 μ l de PBS y la suspensión celular resultante se transfiere a un tubo eppendorf en donde se realiza el conteo.

4. Extracción de RNA

Las células MDA-MB 231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron una confluencia del 80%, se recambió el medio de cultivo.

Cumplido el tiempo de tratamiento se procedió a realizar la extracción de ARN por medio de un kit comercial, Quick- RNA® MiniPrep (Zymo Research). Se retira el medio de cultivo de las placas y se lavan dos veces con buffer salino de fosfatos (PBS), se agregan 600 μ l de buffer de lisis en cada pozo, después de 5 minutos de reposo, se resuspende con ayuda de una micropipeta, transfiriendo el homogenado celular a una columna, la cual es colocada sobre un tubo de recolección, la muestra es centrifugada a 12,000 g por 3 min, se retira el líquido del tubo recolector y se adiciona a cada columna 400 μ l de buffer de pre-lavado, se repite el paso de centrifugado, se retira el líquido del tubo colector y se realizan dos lavados con 400 μ l del buffer de lavado. Después del segundo lavado, se transfiere la columna a un tubo tipo eppendorf estéril de 1.5 ml y se agrega a la columna 50 μ l de agua libre de RNAsa para eluir el ARN contenido en el filtro de la columna, se deja reposar durante 2 minutos y se centrifuga a 12,000 g por 3 min. Se retira la columna y se conserva el líquido contenido en cada uno de los tubos eppendorf, el cual contiene el ARN extraído,

se colocan los tubos tipo eppendorf en un baño maría a 60°C durante 5 minutos y posteriormente se colocan en hielo. Una vez concluida la extracción, se procedió a realizar por espectrofotometría la determinación de la cantidad y calidad del ARN aislado.

5. Transcripción reversa (RT)

La técnica RT-PCR consiste en la síntesis de una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de una secuencia de ARN por medio de la enzima transcriptasa reversa (RT). La RT se llevó a cabo empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), para lo cual se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante. A partir de las concentraciones obtenidas de ARN purificado se prepararon tubos de reacción de 9 µl cada uno para obtener una concentración final de 2 µg de ARN por condición, a cada tubo de reacción se les agregaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Buffer RT	2 µl
dNTPs	0.8 µl
Random primers	2 µl
Reverse transcriptase	1 µl
MULL	
H₂O	3.2 µl

El volumen final de reacción de cada tubo fue de 20 µl, por lo que los 11 faltantes fueron complementados con ARN llegando a una concentración de 2 µg por tubo y agua libre de RNAsas. Los tubos de reacción se colocaron en un termociclador y se aplicó el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, dos horas a 37 °C, 10 minutos a 85°C y finalmente a 4°C. El ADNc resultante debe mantenerse almacenado a -20°C.

Una vez obtenido el ADNc, es amplificado “n” veces por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Finalizada la RT, se procedió a realizar la PCR. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el software proporcionado en internet por la empresa IDT-DNA y SIGMA-ALDRICH. Para llevar a cabo la PCR se utilizó el kit comercial Thermo Scientific Dream Taq PCR Master Mix®, el cual consiste en una solución lista para usar que contiene Dream Taq™, DNA polimerasa, un buffer optimizado Dream Tq, MgCl y dNTPs.

Características generales de los iniciadores:

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Tm (C°)	Tamaño esperado
Nav 1.5 Forward	ACGGCACCTCTGATGTGTTACTGT	67.8	393 pb
Nav 1.5 Reverse	TGAGGGCCTCGTGTTCCTTCTTGA	71.7	393 pb
Na ⁺ /H ⁺ (NHE-1) Forward	TCTCTTCCCCTTGCTGACCCTTT	60.2	443 pb
Na ⁺ /H ⁺ (NHE-1) Reverse	AACCTATCTTCATGAGGCAGGCCA	60.2	443 pb
TNFR-1 Forward	ACCAAGTGCCACAAAGGAAC	63.9	
TNFR-1 Reverse	CTGCAATTGAAGCACTGGAA	64.0	
TNFR-2 Forward	TTCGCTCTTCCAGTTGGACT	63.9	
TNFR-2 Reverse	CACCAGGGGAAGAATCTGAG	63.6	
IL-6R Forward	CGCTGAGACAGAGACCATTTAG	62.8	474 pb
IL-6R Reverse	GGACGTGCTGTGAGATAATAGAG	61.6	474 pb
gp130 Forward	GTCTGGGTAGAAGCAGAGAATG	61.8	679 pb
gp130 Reverse	GAAAGTCACAGGCAGGGATAG	62.6	679 pb
b-Actina Forward	CAAAGACCTGTACGCCAACAC	64.4	
b-Actina Reverse	CATACTCCTGCTTGCTGATCC	63.7	

Para la PCR se prepararon de 20 µl con los siguientes

Reactivo	Cantidad
Dream Taq	10 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl

tubos de reacción reactivos:

cDNA	2 μ l
Agua libre de nucleasas	6 μ l

La PCR consta de tres fases:

- a) Desnaturalización de ADNc: la cual consiste en la separación de las dos hebras del ADN, para ello se calientan las muestras a 94°C durante 30 segundos
- b) Alineación de los oligonucleótidos: la temperatura desciende de tal manera que los oligonucleótidos forward y reverse se alinean a sus secuencias complementarias, la temperatura que se utiliza en esta etapa es dependiente de la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido (T_m), esta fase tiene una duración de 30 segundos.
- c) Extensión: la temperatura aumenta a 72°C por un minuto con el objetivo de que la Taq polimerasa se una a cada iniciador y se sintetice una nueva cadena de ADN.

Estos pasos se repitieron durante 30 ciclos para obtener millones de copias del fragmento de interés. La PCR realizada fue en modalidad semi-cuantitativa, es decir, los niveles de expresión de cada ARN estudiado fueron normalizados respecto a la expresión de un ARN constitutivo, en este caso, β -actina.

7. Electroforesis

Una vez concluido el programa de PCR, se realizó la separación electroforética de los productos obtenidos, en geles de agarosa al 1.2%, preparados de la siguiente manera: en 50 ml de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) se disolvieron 0.6 g de agarosa y se agregaron 4 μ l de Bromuro de Etidio (BrEt).

Las muestras cargadas en el gel se corrieron en buffer TAE a 65 V durante 90 minutos para separar los amplicones de acuerdo a su tamaño y posteriormente visualizarlos y adquirir la imagen respectiva en un documentador de geles (ChemiDoc, Bio-Rad). La densitometría de las bandas se realizó por medio del software *Image J*.

8. Ensayo de migración “Transwell” en cámara de Boyden

Las células MDA-MB231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron una confluencia del 50-60% se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células con IL-6 20nM y con TNF- α 5nM por 48 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados agregando 2 ml. del buffer de fosfatos PBS en cada pozo, posteriormente se agregaron 500 μ l de tripsina y se incubaron por 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación se añadieron 1000 μ l de medio de cultivo libre de suero teniendo un volumen total de 1500 μ l por pozo, de este volumen se retiraron 400 μ l para el conteo celular utilizando el contador automático celular Scepter®.

El ensayo de migración se realizó en placas de 24 pozos con membranas celulares o insertos de tereftalato de polietileno con poros de 8 μ m de diámetro. Al compartimento superior se agregaron 100 μ l de suspensión celular (30,000 células) y 200 μ l de medio libre de suero, al compartimento inferior se adicionaron 750 μ l de medio de cultivo suplementado con 3% de suero fetal bovino (FBS) el cual funciona como quimioatrayente.

Las células fueron incubadas en las cámaras de migración celular por 12 horas a 37°C, al terminar el tratamiento, las células fueron removidas de la membrana del compartimento superior y las células que migraron y se movieron al compartimento inferior fueron fijadas con metanol-acetona y teñidas con cristal-violeta. Para poder contar las células se tomaron microfotografías de 5 campos aleatorios con el objetivo 10x en un microscopio de campo claro y una cámara modelo c10 plus Jenoptick, empleando el programa pro 2.1; las imágenes son posteriormente analizadas con el programa *Image J*.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se sembraron células MDA-MB-231 sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos y una vez que las células alcanzaron una confluencia del 50% aproximadamente, se realizaron lavados con PBS sobre las células, después se llevó a cabo el proceso de fijación para el

cual se preparó un buffer de fijación el cual contiene una solución de PHEM (que contiene PIPES, HEPES, EGTA y $MgSO_4$) y paraformaldehído al 37%, la fijación se llevó a cabo durante 10 minutos en bamboleo constante, después de ese tiempo se realizaron 3 lavados de cinco minutos cada uno con PBS. Las células se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0.1% por 15 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Después las células se pusieron en contacto con una solución bloqueadora, la cual contiene gelatina y suero fetal bovino, durante dos horas, luego de este tiempo se aplicó el anticuerpo primario monoclonal de ratón IgG₁ Na⁺ CP type V α de Santa Cruz Biotechnology® el cual se diluyó en solución bloqueadora para tener una dilución 1:200, las células se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche, al día siguiente se realizaron 3 lavados de cinco minutos cada uno con PBS. Luego de los lavados las células se incubaron por dos horas con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 647 conjugado. Terminado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con solución Hoechst a una concentración de 0.5 μ g/ml por 20 minutos.

Análisis estadístico

Los experimentos realizados en este trabajo fueron repetidos al menos cinco veces, y los datos obtenidos se presentan como la media aritmética \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software SigmaPlot 11.0.

En el estudio del efecto de IL-6 y TNF- α sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células, así como en la evaluación del efecto de estas mismas citocinas sobre el cierre de herida de las células y sobre la expresión del ARNm de la subunidad Nav 1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje y del intercambiador de sodio y protones NHE-1, se utilizó la prueba de *t de Student* para comparar las medias de los tratamientos con el control, para esta prueba se consideró un valor de significancia menor de 0.05 ($p < 0.05$). Esta prueba fue seguida de una prueba aplicada para dos muestras independientes denominada prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS

El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6) no afectan la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231.

Por medio del conteo celular con el citómetro de flujo portable Scepter® se encontró que las células MDA-MB-231 tratadas con TNF- α a una concentración de 5nM ó IL-6 20nM por 24, 48 y 72 horas, no sufren cambios en su capacidad proliferativa, ya que la disminución en la cantidad de células no es significativa para ninguno de los tratamientos con respecto a la condición control. La figura 1a, muestra la gráfica con los resultados obtenidos luego del conteo celular de las células tratadas con IL-6 20nM y TNF- α 5nM por 24 horas. La figura 1b muestra la gráfica con los resultados obtenidos luego del conteo celular de las células tratadas con IL-6 y TNF- α por 48 horas. La figura 1c muestra la gráfica de las células tratadas con las citocinas ya mencionadas por 72 horas.

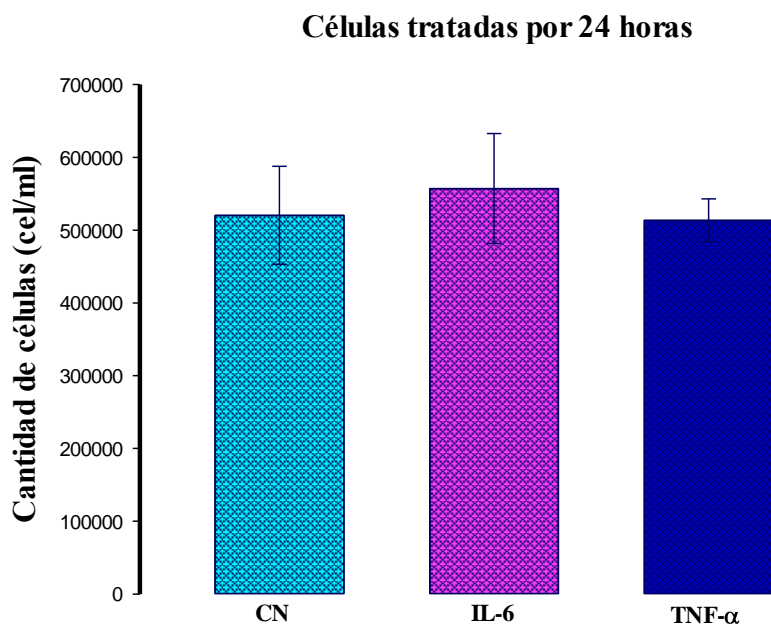


Figura 1a. Gráfica que muestra la ausencia de efecto del TNF- α e IL-6 sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231, tratadas por 24 horas. El análisis estadístico mediante la prueba de *t de Student*, demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y la condición control. Resultados obtenidos mediante conteo celular.

Células tratadas por 48 horas

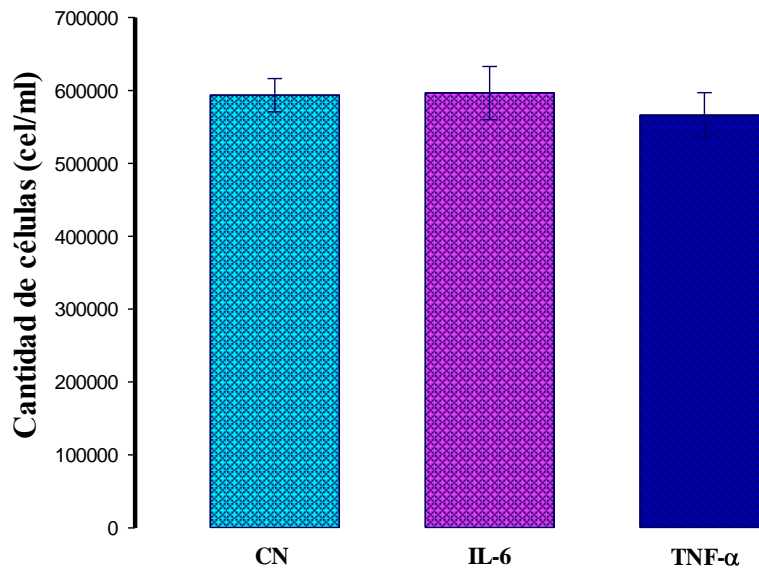


Figura 1b. Gráfica que muestra la ausencia de efecto del TNF- α e IL-6 sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 tratadas por 48 horas. El análisis estadístico mediante la prueba de *t de Student*, demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y la condición control. Resultados obtenidos mediante conteo celular.

Células tratadas por 72 horas

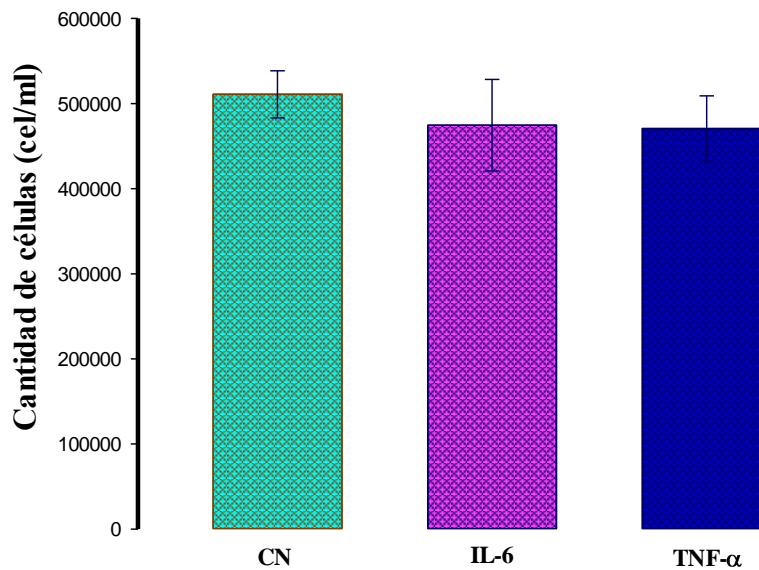


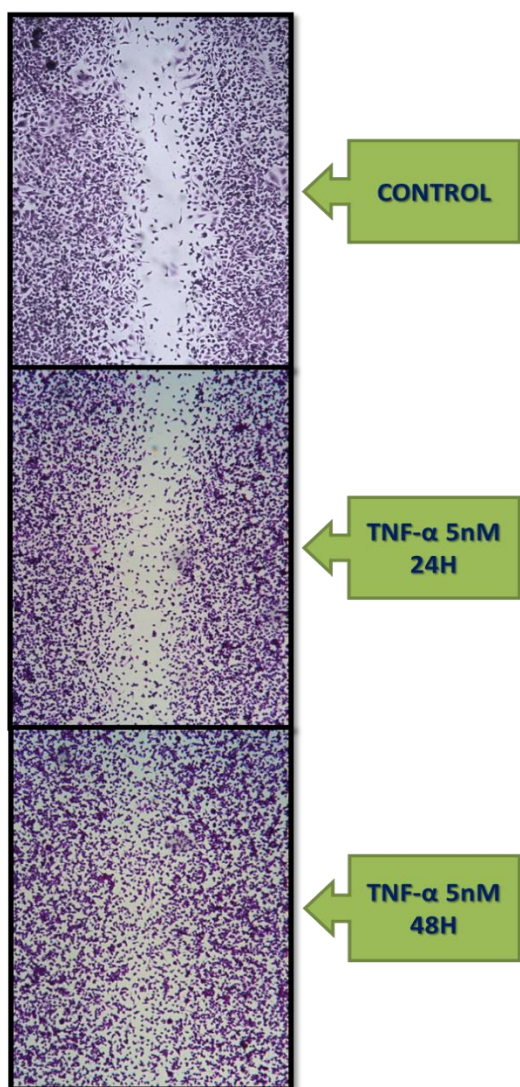
Figura 1c. Gráfica que muestra la ausencia de efecto del TNF- α e IL-6 sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 tratadas por 72 horas. El análisis estadístico mediante la prueba de *t de Student*, demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y la condición control. Resultados obtenidos mediante conteo celular.

Interleucina 6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) aceleran la velocidad de cierre de herida de las células MDA-MB-231.

Se evaluó de forma cualitativa y semicuantitativa la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Después de ser sometidas al ensayo de herida las células se pre-trataron con IL-6 a la concentración de 20nM por 24 y 48 horas; en una placa distinta las células se pre-trataron con TNF- α a la concentración de 5 nM por 24 y 48 horas. Luego de 12 horas de tratamiento se observó una clara disminución del área de la herida, las células tratadas con IL-6 y con TNF- α aceleran de forma significativa la velocidad de cierre de herida. Las figuras 2a y 3a muestran la disminución del área de la herida luego de que las células fueron tratadas por 24 y 48 horas, siendo mayor el cierre a las 48 horas.

Mediante el uso del programa ImageJ las imágenes fueron analizadas de forma semicuantitativa asignándole un valor numérico al tamaño de la herida; se midió el área de varias zonas de la herida y se hizo una normalización de los datos, con los que se obtuvieron las gráficas de las figuras 2b y 3b; en ellas se observa que las células MDA-MB-231 estimuladas con IL-6 y TNF- α aumentan su capacidad migratoria reduciendo el tamaño de la herida.

a



b

**Ensayo de herida
Tratamiento con TNF-alpha 5nM**

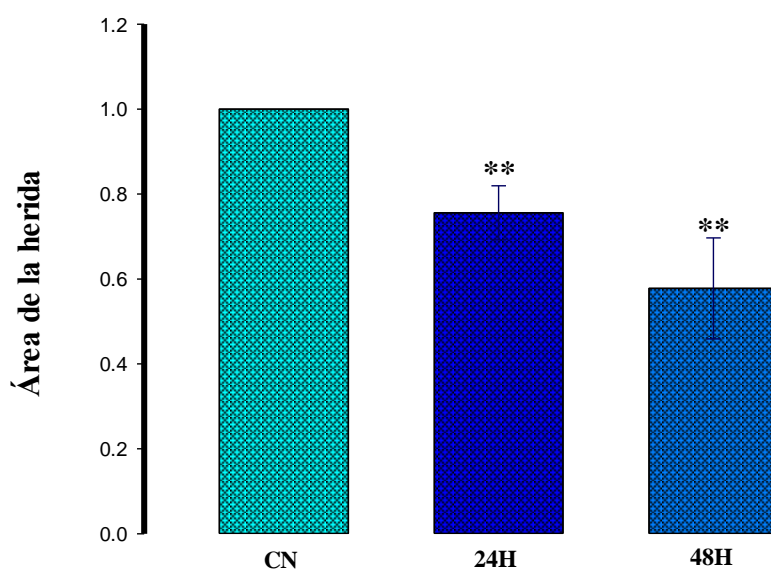
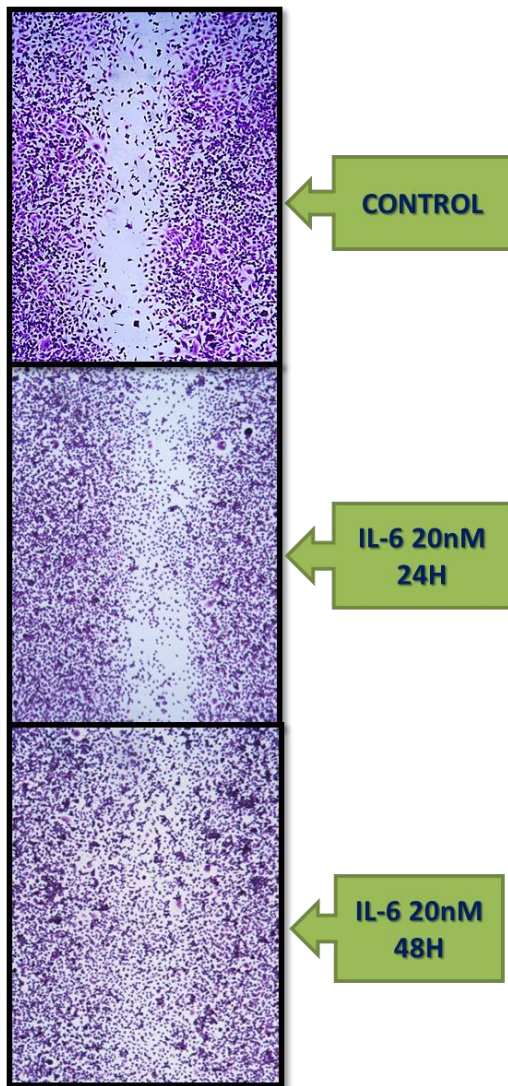


Figura 2. TNF- α acelera la velocidad de cierre de herida de las células MDA-MB-231. a) Microfotografía a 4x de un campo aleatorio de la herida realizada sobre la monocapa de células MDA-MB-231, condición control, células tratadas con TNF- α a una concentración de 5nM por 24 horas y células tratadas bajo la misma condición de tratamiento por 48 horas. b) Análisis semicuantitativo de la disminución del área de la herida, una comparación entre las células tratadas por 24 y 48 horas con TNF- α 5nM revela diferencias significativas con relación al control. n=5 **p<0.005.

a



b

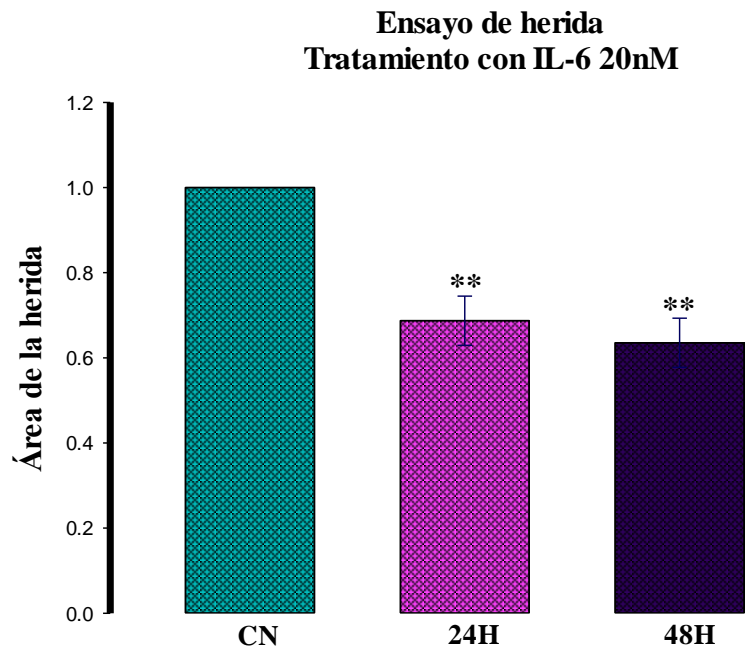


Figura 3. IL-6 acelera la velocidad de cierre de herida de las células MDA-MB-231. a) Microfotografía a 4x de un campo aleatorio de la herida realizada sobre la monocapa de células MDA-MB-231, condición control, células tratadas con TNF- α a una concentración de 5nM por 24 horas y células tratadas bajo la misma condición de tratamiento por 48 horas. b) Análisis semicuantitativo de la disminución del área de la herida, una comparación entre las células tratadas por 24 y 48 horas con IL-6 20nM revela diferencias significativas con relación al control. n=5 **p<0.005.

Interleucina 6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) exacerban la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231

Mediante la técnica de ensayo de migración en cámara de Boyden se evaluó el efecto de TNF- α e IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Se observó que IL-6 a una concentración de 20nM incrementa la capacidad migratoria de las células a las 24 y 48 horas de tratamiento.

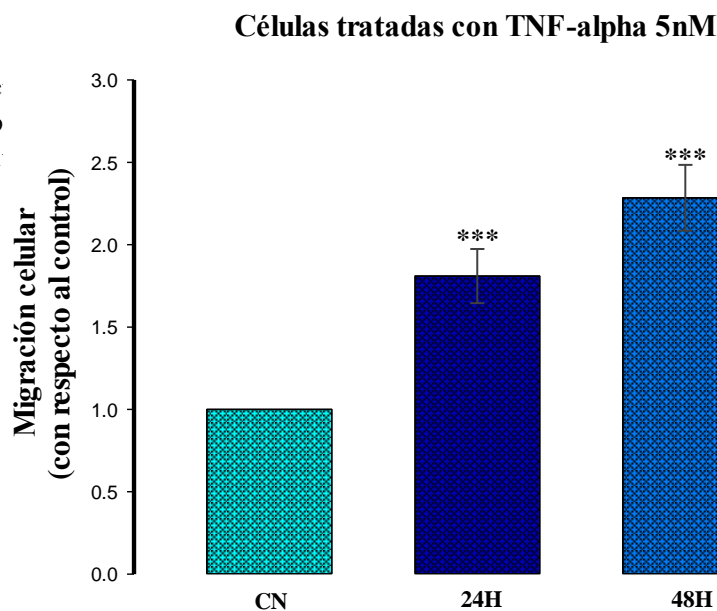
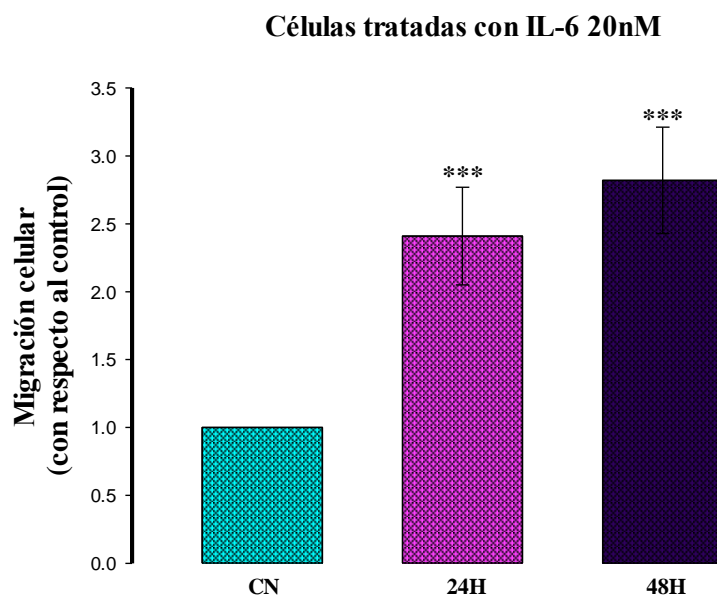


Figura 4.
Análisis de una comparación significativa

MDA-MB-231.
cámara de Boyden,
diferencias

Las células MDA-MB-231 **Figura 5. El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) exagerba la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.** Análisis cuantitativo de las células que migraron a través de la membrana en la cámara de Boyden, una comparación entre las células tratadas por 24 horas y 48 horas con TNF 5nM revela diferencias significativas con relación al control. n=5 ***p<0.001

Para analizar la expresión de los receptores de TNF- α (TNF- α) se encuentran mediando los efectos encontrados sobre la capacidad migratoria y proliferativa de las células MDA-MB-231, se realizó extracción de ARN de dicha línea celular y se llevaron a cabo reacciones de PCR para determinar si las células MDA-MB-231 expresan el ARNm que codifica para el receptor a TNF- α y a IL-6. Como se mencionó anteriormente, el TNF- α media sus acciones a través de dos tipos de receptores el TNFR-1 y el TNFR-2, en las células MDA-MB-231 el receptor que se encuentra expresado es el tipo 1 y no así el tipo 2, la figura 6 muestra el corrimiento del ADN sintetizado a partir de las células MDA-MB-231 y la identificación de la banda de 263 pb que corresponde a la extensión del oligonucleótido para el receptor TNFR-1, la banda que corresponde al TNFR-2 no se presenta. En caso del receptor a IL-6, se sabe que este está formado por el receptor IL-6R cuyo ARNm se identificó por el tamaño de 474 pb y la subunidad gp130 cuya tamaño de banda esperado fue de 679 pb.

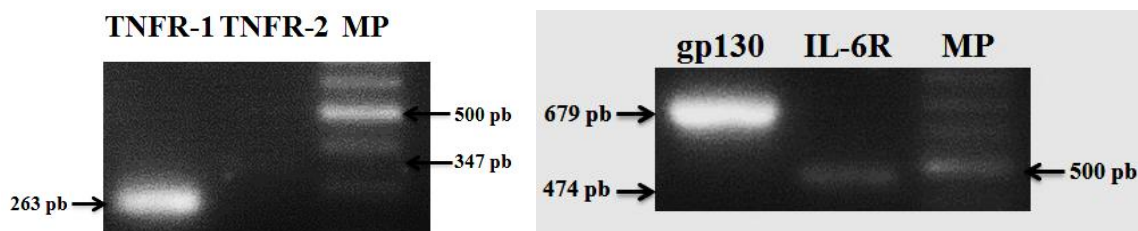


Figura 6. Expresión de ARNm que codifica para los receptores de TNF- α , TNFR-1 y TNFR-2, y para el receptor de IL-6, formado por la subunidad gp130 y el receptor IL-6R. Mediante extracción del ARNm de las células MDA-MB-231 y la realización de retrotranscripción seguida de PCR, se lograron amplificar secuencias específicas para el receptor TNFR1, TNFR2, IL-6R y la subunidad gp130, el análisis realizado fue de tipo cualitativo.

Las células MDA-MB-231 expresan el ARNm que codifica para la subunidad $Na_v1.5$ del canal de sodio dependiente de voltaje.

Con el propósito de identificar la presencia de la subunidad alfa del canal de sodio en las células MDA-MB-231, se llevó a cabo el método de RT-PCR para identificar la expresión de dos de las subunidades cuya presencia se ha confirmado en cáncer de mama. Los resultados muestran la expresión de la subunidad $Na_v1.5$ del canal de sodio y no así la de la subunidad $Na_v1.7$. La figura 7 muestra la evidente expresión del ARNm de la subunidad $Na_v1.5$ del canal de sodio, cuyo amplicón es de 393 pb y se observa que la subunidad $Na_v1.7$ no se expresa en las células MDA-MB-231.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ADNc		-	+			-	+		
Nav 1.5		+	+			-	-		
Nav 1.7		-	-			+	+		

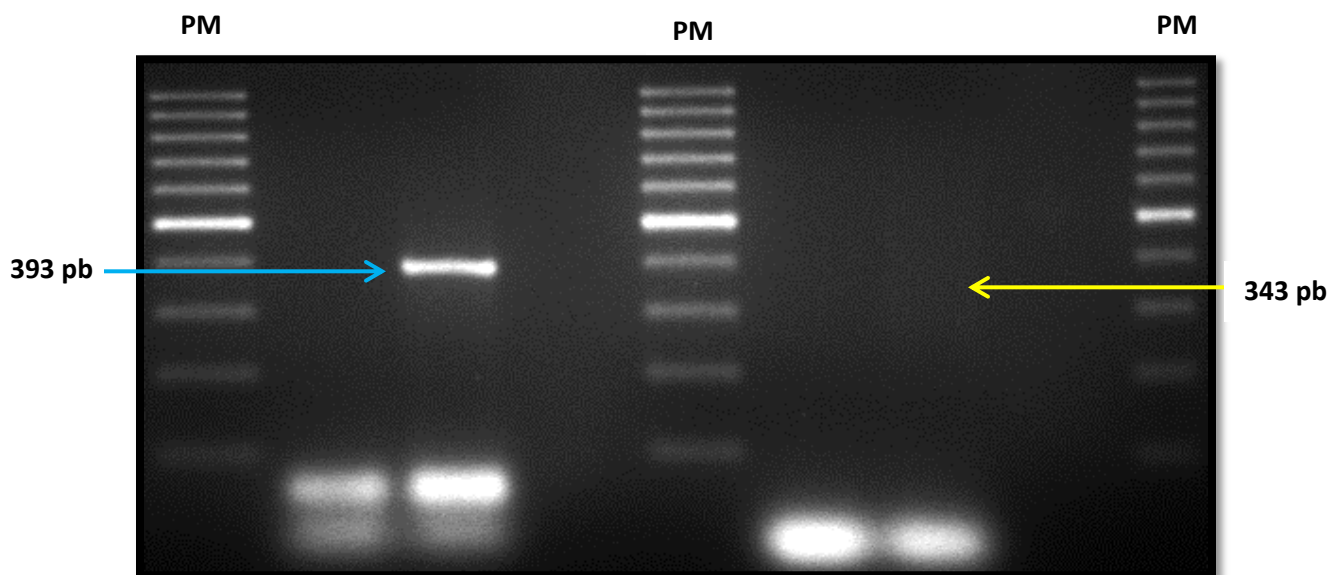
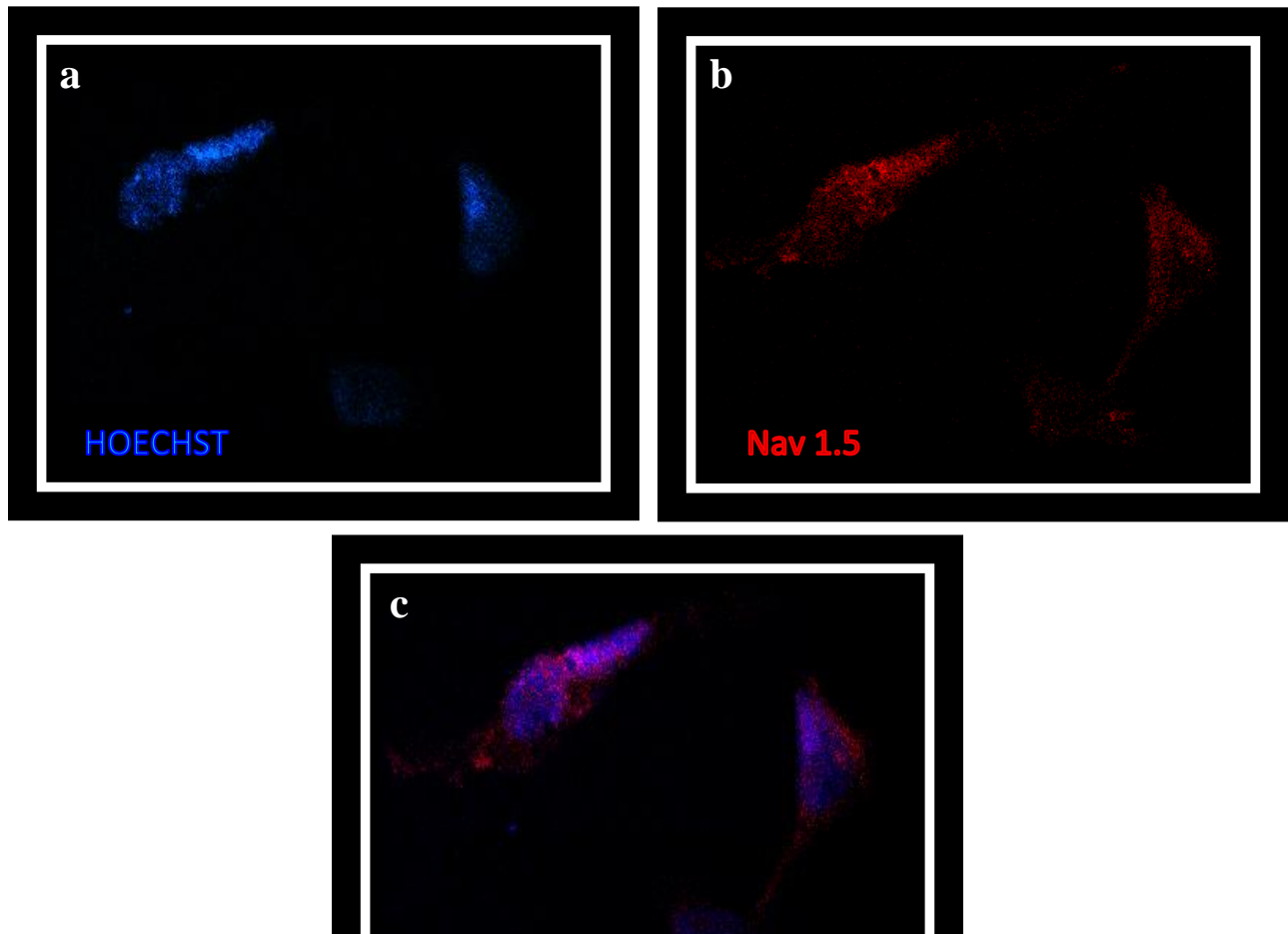


Figura 7. Las células MDA-MB-231 expresan el ARNm de la subunidad Nav 1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje. Mediante la extracción del ARNm de las células MDA-MB-231 seguida de retrotranscripción y PCR se identificó la presencia del ARNm de la subunidad Nav 1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje. Se realizaron cuatro reacciones de PCR, en la primera reacción se agregan todos los reactivos para la PCR y los primers para Nav 1.5, a excepción del ADNc de las células MDA-MB-231 (carril 2), en la segunda reacción se agregan todos los reactivos incluyendo el ADNc y los primers para Nav 1.5 (carril 3), en la tercera reacción se agregan todos los reactivos para la PCR y los primers para Nav 1.7, a excepción del ADNc de las células MDA-MB-231(carril 6), en la cuarta reacción se incluyen todos los reactivos de la PCR, así como los primers para Nav 1.7 y el ADNc de las células. En los carriles 1, 5 y 9 se carga el marcador de peso molecular, siendo la banda más densa de 500 pb.

Las células MDA-MB-231 expresan el ARNm de la subunidad Nav 1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia se logró identificar la forma proteica de la subunidad alfa Nav 1.5 del canal de sodio dependiente de voltaje. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos tras los ensayos de inmunofluorescencia, la localización del núcleo mediante la tinción con el reactivo Hoechst, la inmunodetección de los canales de sodio mediante el marcaje con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 y el “merged” realizado de para apreciar la combinación de ambos.

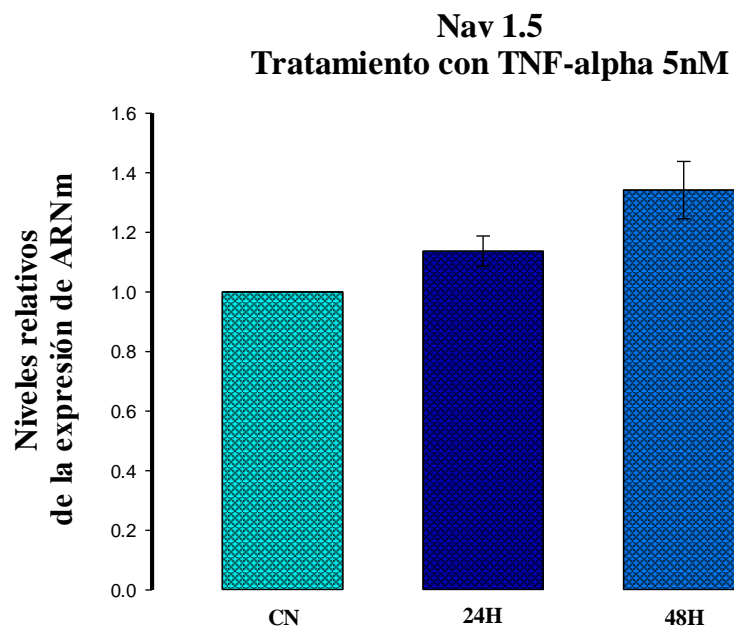


MERGED

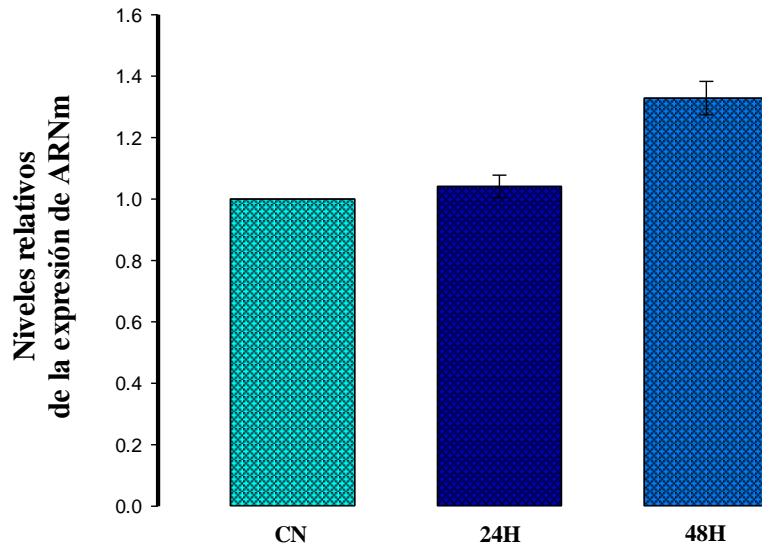
Figura 8. Fotografías representativa de los ensayos de inmunofluorescencia realizados en las células MDA-MB-231. a) Tinción de los núcleos de las células MDA-MB-231 mediante el colorante fluorescente Hoechst, **b)** Células tratadas con el anticuerpo primario contra la subunidad Nav 1.5 del canal de sodio y después con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 647 para su inmunodetección, **c)** Solapamiento de las imágenes a y b para la identificación simultánea del núcleo celular y la presencia de la expresión proteica de las subunidad alfa Nav 1.5 en las células MDA-MB-231.

El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) induce el aumento en la expresión del ARNm de la subunidad $\text{Na}_v1.5$ del canal de sodio y del intercambiador de Na^+/H^+ (NHE-1).

Los resultados de los ensayos de RT-PCR mostraron que las células MDA-MB-231 tratadas con TNF- α a la concentración de 5nM por un tiempo de 24 y 48 horas presentan un aumento en la expresión del ARNm de la subunidad alfa Nav 1.5 y el intercambiador NHE-1.



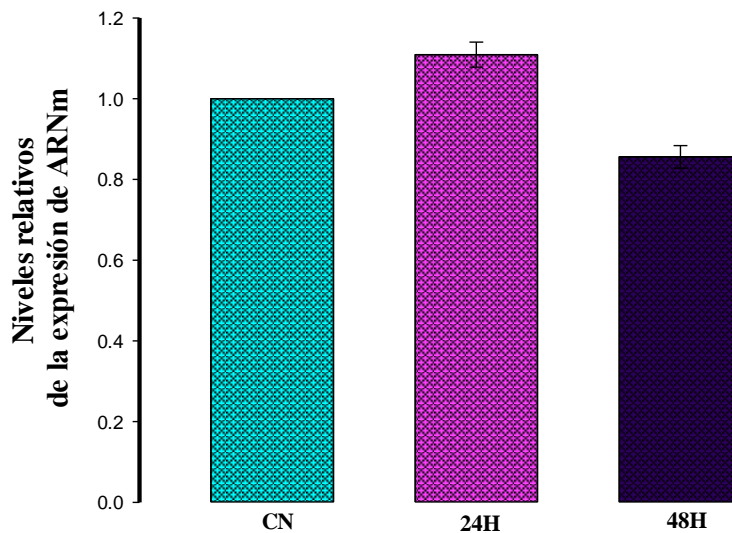
NHE-1
Tratamiento con TNF-alpha 5nM

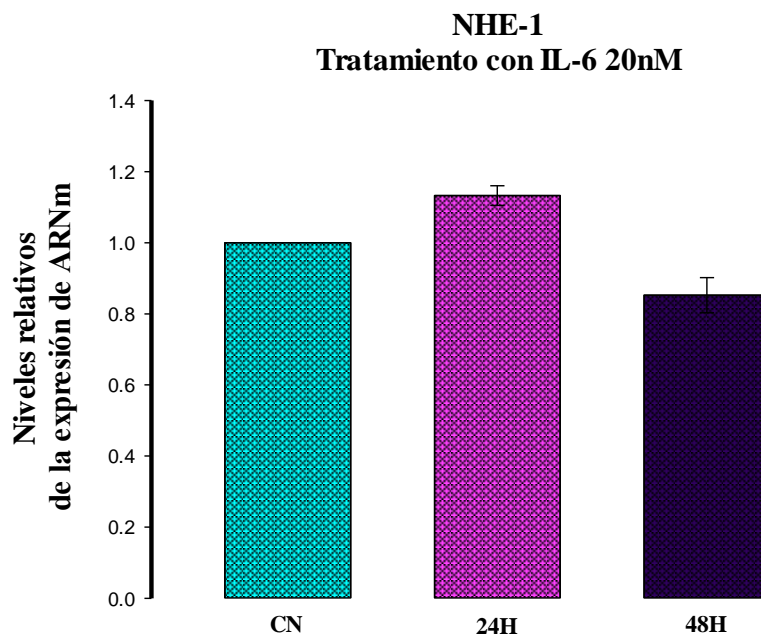


Interleucina 6 (IL-6) induce disminución en la expresión del ARNm de la subunidad $\text{Na}_v1.5$ del canal de sodio y del intercambiador de Na^+/H^+ (NHE-1).

Los resultados de los ensayos de RT-PCR mostraron que las células MDA-MB-231 tratadas con IL-6 a la concentración de 20nM por un tiempo de 24 y 48 horas presentan una disminución en la expresión del ARNm de la subunidad alfa $\text{Na}_v 1.5$ y el intercambiador NHE-1.

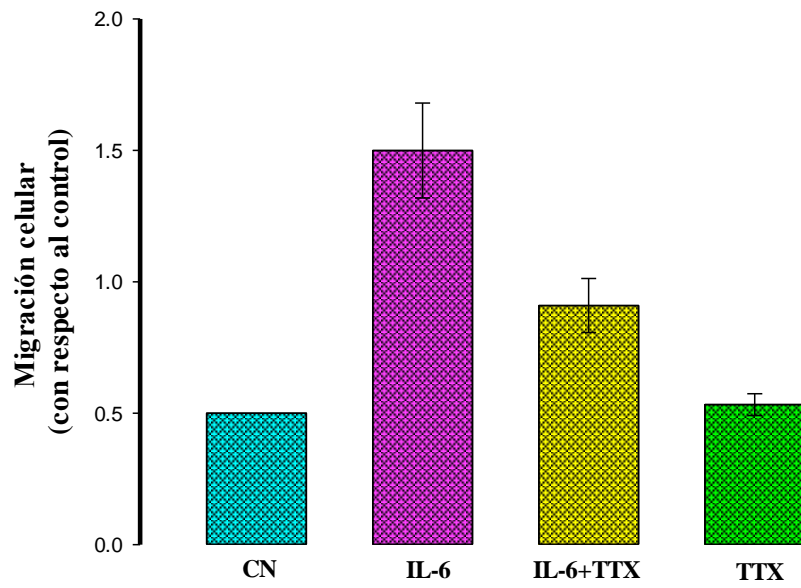
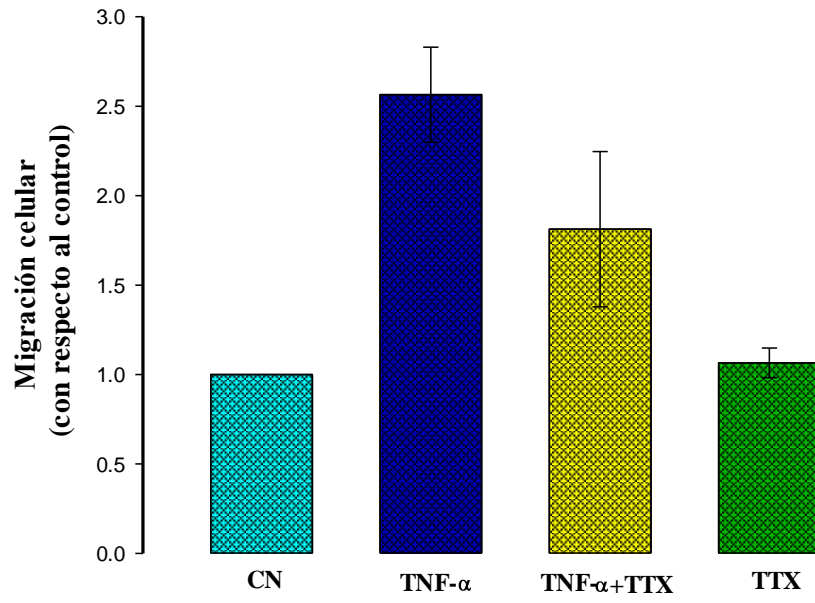
Nav 1.5
Tratamiento con IL-6 20nM





TTX inhibe el efecto de IL-6 y TNF- α sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.

Los ensayos de migración en cámaras de Boyden demuestran que las células tratadas con TNF- α 5nM e IL-6 20nM por 48 horas incrementan su capacidad migratoria en comparación con las células control (sin tratamiento). Sin embargo, cuando los tratamientos con TNF- α e IL-6 se llevan a cabo en presencia de TTX a una concentración de 10 μ M la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 disminuye de forma significativa. Además se realizaron tratamientos únicamente con TTX a una concentración de 10 μ M y no se observaron cambios significativos en comparación con las células control.



BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K and Bharti AC. 2002. The role of the TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 1: 327-341
2. Aggarwal BB, Vijayelekhmi RV, and Sung B. 2009. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*. 15: 425-430.
3. Aggarwal BB. 2003. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 3: 745-756
4. Allavena PA, Sica A, Garlanda C and Mantovani A. 2008. The Ying-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*. 222: 155-161.
5. Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. 1997. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol*. 155:27-34.
6. American Cancer Society. 2013. *Cancer Facts & Figures 2013*.
7. Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez Sánchez V y Villarreal P. 2011. Oncogüía: Cáncer de mama. Instituto Nacional de Cancerología. 6, 77-86.
8. Arihiro K, Oda H, Kaneko M and Inai K. 2000. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer*. 7: 221-30.
9. Balkwill F and Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 357: 539-545.
10. Balkwill F. 2006. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 25: 409-416.
11. Baron JA and Sandler RS. 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med*. 51: 511-523.
12. Ben-Baruch A. 2006. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol*. 16: 38-52.
13. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Bojani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ and Cerretti DP. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. 385: 729-733
14. Borrello MG, Alberti L, Fischer A, Degl'Innocenti A, Ferrario C, Gariboldi M, Marchesi F, Allavena P, Greco A, Collini P, Pilotti S, Cassinelli G, Bressan P, Fugazzola L, Mantovani A, Pierotti MA. 2005. Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 14825-14830.
15. Brackenbury WJ, Isom LL. 2008. Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*. 12:1191-203.

16. Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S and Gore J. 2011. Nav 1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H⁺ efflux in caveolae. *Oncogene*. 30: 2070-2076.
17. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. 2003. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 197: 157-68.
18. Canadian Breast Cancer Foundation, 2014. Recuperado de: <http://www.cbcf.org/central/AboutBreastHealth/Pages/default.aspx>
19. Cancer Research, UK. 2014. Recuperado de: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/breast/riskfactors/breast-cancer-risk-factors#Age>
20. Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A, Casavola V, Zaccolo M and Reshkin SJ. 2005. Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell*. 16: 3117–3127.
21. Cardone RA, Casavola V and Reshkin SJ. 2005. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 5: 786–795.
22. Carrithers MD, Chatterjee G, Carrithers LM, Offoha R, Iheagwara U, Rahner C, Graham M and Waxman SG. 2009. Regulation of podosome formation in macrophages by a novel splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem*. 284: 8114–8126.
23. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B. 1975. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72: 3666-3670.
24. Catterall W. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26: 13-25.
25. Catterall WA. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev*. 72: S15–S48.
26. Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26: 13–25.
27. Chen G and Goeddel DV. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 296: 1634-1635.
28. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C and Mantovani A. 2009 Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30: 1073-1081.
29. Coussens LM and Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
30. Coussens LM and Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
31. Darnell Jr. JE. 1997. STATs and gene regulation. *Science*. 277: 1630-5.

32. De Falco V, Guarino V, Avilla E, Castellone MD, Salerno P, Salvatore G, Faviana P, Basolo F, Santoro M and Melillo RM. 2007. Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer. *Cancer Res.* 67: 11821-11829
33. De Visser KE, Eitchen A and Coussens LM. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 6: 24-37.
34. Díaz D, Delgadillo DM, Hernández-Gallegos E, Ramírez-Domínguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, Berumen J, Camacho J and Gomora JC. 2007. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol.* 210: 469–78.
35. Dobrovolskaia MA and Kozlov SV. 2005. Inflammation and cancer: when NF-kappaB amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets.* 5: 325-344.
36. Fox JG and Wang TC. 2007. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 117: 60-69.
37. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska M, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwv Z, Krasowska M, Brackenbury WJ, Theodorou D, Kovuturk M, Kava H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC and Diamgoz MB. 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 11: 5381–5389.
38. Fraser SP, Diss JK, Lloyd LJ, Pani F, Chioni AM, George AJ, Djamgoz MB. 2004. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Lett.* 569: 191–194.
39. Fundamentals of inflammation. Edited by Serhan CN, Ward PA and Gilroy DW. Cambridge 2010.
40. Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M and Wang Z. 2010. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep.* 23:1293–1299.
41. García-Rodríguez LA and Huerta-Alvarez C. 2001. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med.* 12: 88-93.
42. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, and Le Ghenec JY. 2009. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem.* 284: 8680-8691.
43. Goldberg JE and Schwertfeger KL. 2010. Proinflammatory Cytokines in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Potential Targets for Therapeutics. *Curr Drug Targets.* 11: 1133-1146.
44. Grinstein S, Rotin D, and Marson MJ. 1989. Na⁺/H exchanger and growth factor-induced cytosolic pH change. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 988:73-91.

45. Harguindey S, Orive G, Luis Pedraz J, Paradiso A and Reshkin SJ. 2005. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin – one single nature. *Biochi Biophys Acta*. 1756: 1–24.
46. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen and Schaper F. 1998. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 334: 297-314.
47. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G and Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J*: 374: 1-20
48. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F and Graeve L. 1998 Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 334 (Pt2): 297-311.
49. Helson L, Green S, Carswell E and Old LJ. 1975 Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature*. 258: 731-732.
50. Hernández-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, Rivera M and Gomora JC. 2012. Overexpression of Nav 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer*. 130: 2013–23.
51. Hille B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc. Third Edition. Sunderland, Massachusetts.
52. House CD, Vaske CJ, Schwartz A, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM and Lee NH. 2010. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*. 70: 6957–6967.
53. Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3: 276-285.
54. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Aguascalientes, México. Enero 2015.
55. Isom L. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*. 7: 42-54.
56. Isom LL and Catterall WA. 1996. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature*. 383 (6598): 307-308.
57. Itoh N and Nagata S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. 268: 10932-10937.
58. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y and Nagata S. 1991. The polypeptide encoded by cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 66: 233-243.
59. Kant S, Swat W, Zhan S, Zhang ZY, Neel Bg, Flavell RA and Roger JD. 2011. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a RHO family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*. 25 (19): 2069-2078.

60. Karin M and Greten FR. 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 5: 749-759.
61. Karin M. 2006. Nuclear Factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*. 441: 431-436.
62. Kemp G, Young H. and Fliegel L. 2008. Structure and function of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Channels* 2. 5: 329-336.
63. Khadilkar A, Iannuzzi P and Orłowski J. 2001. Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger important for drug recognition and cation translocation. *J Biol Chem*. 276: 43792–43800.
64. Kim R, Emi M, Tanabe K and Arihiro K. 2006. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*. 66: 5527-5536.
65. Knupfer H and Preiss R. 2007. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat*. 102: 129-35.
66. Lin WW and Karin M. 2007 A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 117: 1175-1183.
67. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H and Karin M. 2004. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*. 6: 297-305.
68. Luttkicken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa and Taga T. 1994. Association of transcription factor APFR and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*. 263: 89-92.
69. Malik STA, Naylor S, East N, Oliff A and Balkwill FR. 1990. Cells secreting tumor necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *European Journal of Cancer*. 26: 1031-1034.
70. Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balwill F. 2008. Cancer related inflammation. *Nature*. Vol 454.
71. Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD and Balkwill FR. 1994. Expression of tumor necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer*. 56: 777-82.
72. Mukhopadhyay A, Suttles J, Stout RD and Aggarwal BB. 2001. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor-kappa B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem*. 276: 31906-31912.
73. Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K and Kanazawa H. 2005. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem*. 280: 1561–1572.
74. National Breast Cancer Foundation, Inc. 2014. Recuperado de: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-risk-factors>

75. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Common Cancer Types. Actualizado Enero 2013. Recuperado de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/commoncancers>
76. National Cancer Institute, 2014. Recuperado de: <http://www.cancer.gov/aboutnci/servingpeople/nci-budget-information>
77. Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Bernardo A, Burgio VL, Agresti C and Levrero M. 1998. Nuclear factor κ B independent cytoprotective pathways originating at tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem.* 273: 31262-31272.
78. O'Malley WE, Achinstein B and Shear MJ. 1963. Action of bacterial polysaccharide on tumors. iii. repeated response of sarcoma 37, in tolerant mice, to *serratia marcescens* endotoxin. *Cancer Res.* 23: 890-895.
79. Orłowski J. and Grinstein S. 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447: 549–565.
80. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D and Mannel DN. 1993. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis. *Journal of Experimental Medicine.* 177: 1391-1398.
81. Ou SW, Kameyama A, Hao LY, Horiuchi M, Minobe E, Wang WY, Makita N and Kameyama M. 2005. Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *Eur J Neurosci.* 22:793–801.
82. Patología humana. Abbas K and Mitchell F. 8a edición. España 2008
83. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Fabbroni, M, Casavola V and Tommasino M. 2000. Na⁺/H⁺ exchanger dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* 14: 2185–2197.
84. Rich IN, Worthington-White D, Garden OA and Musk P. 2000. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Blood.* 95: 1427–1434.
85. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta.* 1616: 107–11.
86. Roger S, Guennec JY and Besson P. 2004. Particular sensitivity to calcium channel blockers of the fast inward voltage-dependent sodium current involved in the invasive properties of a metastatic breast cancer cell line. *Br J Pharmacol.* 141: 610-615.
87. Rose-John S. 2001. Coordination of interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. *Adv Exp Med Biol.* 495: 145-151.
88. Rothe J, Gehr G, Loetscher H, and Lesslauer W. 1992. Tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Immunol Res.* 11: 81-90.

89. Rotine D, Steele-Norwood D, Grinstein S and Tannock I. 1989. Requirement of the Na⁺/H⁺ exchanger for tumor growth. *Cancer Res.* 49: 205–211.
90. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE and Hall BM. 2007. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J.* 21: 3763-3770.
91. Shacter E and Weitzman SA. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology.* 16: 217-226.
92. Sheen-Chen SM, Chen WJ, Eng HL, and Chou FF. 1997. Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 43: 211-215.
93. Siegel R, Naishadham D and Jemal A. 2013. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 63(1): 11-30.
94. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn M and Hall BM. 2009. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene.* 28: 2940-2947.
95. Szlosarek P, Charles KA and Balkwill FR. 2006. Tumor necrosis factor-alpha as a tumor promoter. *Eur J Cancer.* 42: 745-50.
96. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH and Goeddel DV. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 74: 845-853.
97. Tracey KJ and Cerami A. 1992. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 9: 317-343
98. Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J and Dnowitz M. 1993. Structure/Function Studies of the Epithelial Isoforms of the Mammalian Na⁺/H⁺ Exchanger Gene Family. *J Membrane Biol.* 135: 93-108.
99. Varfolomeev F, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshaves K, Fairbrother WJ and Vucic D. 2008. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 283: 24295-24299.
100. Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10 (1): 45-56.
101. Wakabayashi S, Fournoux P, Sardet C and Pouyssegur J. 1992. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls 'H⁺-sensing'. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 2424–2428.
102. World Health Organization. Cancer. Fact sheet No. 297. Reviewed January 2015. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
103. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, De la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW. 1997. Early lethality, functional NF-kappaB activation and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity.* 1997. 715: 715-725.

104. Yu H, Kortyl M and Pardoll D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumor microenvironment. *Nature Rev Immunol.* 7: 41-51.
105. Zhang GL and Adachi I. 1999. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinomas. *Anticancer Res.* 19: 1427-1432.