



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS



Efecto de la activación del receptor tipo toll - 4 (TLR-4) sobre el potencial metastásico de las células tumorales de mama MDA-MB-231: participación de la vía NF- κ B/iNOS/NO/sGC/cGMP.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

M.C. Karina Ruiseco Flores

DIRECTOR DE TESIS

Eduardo Monjaraz Guzmán

REVISORES:

D.C. Maricruz Anaya Ruiz

D.C. José Everardo Avelino Cruz

D.C. Fabián Galindo Ramírez

D.C. José Eduardo Pérez Salazar,

Julio 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante la beca como alumna de Doctorado (512741).

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo brindado para la conclusión de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán por su guía durante todo el desarrollo de mi tesis, por siempre brindarme apoyó durante mi formación académica y personal.

A mi compañero de vida Rafael Torres Montiel por motivarme siempre a concluir este proyecto. Por acompañarme y reconfortarme aun en los momentos más difíciles.

A toda mi familia, hermanas, sobrinos y sobrinas nietas por su apoyo incondicional, especialmente a mi mamá Lucia Flores Rivera por su ejemplo de lucha y tesón ante los retos de la vida. Además le agradezco a mi nueva familia, a los Torres-Montiel, por alentarme siempre.

A todos mis compañeros de laboratorio que me acompañaron durante estos 4 años, Scar, Eve, Rubén, Miri, Max, Zuly, Cecy, Juan, Angie, Nelly, Irma, Rubí, Sele, Raúl, Eliud, Alain, Marino, Emilio, José David, David Eduardo y todos los jóvenes biomédicos en formación con los cuales he compartido muchas horas de mi vida y de los que siempre he aprendido.

Una mención especial para María Julieta López Cuevas por su contribución profesional en el desarrollo de mi trabajo de tesis y por su gran amistad.

Así como al Biol. José Luis Córdova de la Luz por tener la paciencia y disposición de ayudar en el desarrollo de la fase experimental de la presente tesis.

Agradezco especialmente a mis revisores: D.C. Maricruz Anaya Ruiz, D.C. José Eduardo Pérez Salazar, D.C. Fabián Galindo Ramírez, D.C. José Everardo Avelino Cruz, por su invaluable tiempo y especial apoyo en la realización de este proyecto.

CONTENIDO

INDICE DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
I. CÁNCER.....	5
A. <i>Potencial replicativo ilimitado o proliferación sostenida</i>	6
B. <i>Migración e invasión</i>	6
C. <i>Evasión de la apoptosis</i>	7
II. CARCINOGENESIS	8
III. RELACIÓN CÁNCER - INFLAMACIÓN	10
IV. CÁNCER DE MAMA	13
A. <i>Epidemiología</i>	13
B. <i>Clasificación</i>	13
C. <i>Factores de riesgo</i>	15
V. RELACIÓN CÁNCER DE MAMA - INFLAMACIÓN	15
A. <i>Receptor Tipo Toll-4 (TLR-4)</i>	16
B. <i>Lipopolisacárido (LPS)</i>	19
C. <i>Efectos de LPS sobre la fisiología celular</i>	19
• Sintasa de óxido nítrico (NOS)	19
• Sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS-NOS2).	20
• Óxido nítrico (NO).....	21
• Guanilato ciclasa (GC).....	23
• Guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (cGMP)	24
• Proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKGs)	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
METODOLOGÍA.....	28
I. MODELO CELULAR MCF-7.....	28
II. MODELO CELULAR MDA-MB-231.....	29
III. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES Y REACTIVOS	30
IV. DETERMINACIÓN INDIRECTA DE ÓXIDO NÍTRICO (CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS POR LA REACCIÓN DE GRIESS)	31

V. ENSAYO DE RT-PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA - REACCIÓN EN CADENA LA POLIMERASA)	31
A. <i>Extracción de RNA total</i>	31
B. <i>Síntesis de cDNA (RT)</i>	32
C. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	32
D. <i>Separación electroforética de los productos de PCR</i>	33
VI. ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN CÁMARAS TRANSWELL.....	33
VII. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	34
A. <i>Conteo celular</i>	34
B. <i>Ensayo de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU)</i>	34
VIII. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	35
IX. INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A DOXORRUBICINA EN MDA-MB-231	35
X. INMUNOCITOQUÍMICA.....	36
XI. INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOT).....	37
XII. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CGMP	37
XIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
RESULTADOS	39
I. LPS INCREMENTA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.	39
II. EL EFECTO INDUCIDO POR LPS SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN DE TLR-4.....	41
III. PRESENCIA DE LOS ELEMENTOS MOLECULARES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INICIADA POR TLR-4.....	42
IV. LPS REGULA LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA iNOS.....	43
VI. iNOS EXACERBA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231	47
VII. LA VÍA TLR-4/NF- κ B/iNOS/cGMP/PKG INFLUYE SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	48
VIII. EL FENOTIPO MESENQUIMAL FAVORECE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	51
IX. LPS FAVORECE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	52
X. LA VÍA TLR-4/NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP REGULA LA PROLIFERACIÓN EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231.	54
XI. LPS INFLUYE DE MANERA DIFERENCIAL SOBRE LA QUIMIORRESISTENCIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231 A DOXORRUBICINA.	55

XII. LPS ESTIMULA LA CAPACIDAD MIGRATORIA EN CÉLULAS DE BAJO POTENCIAL METASTÁSICO.	56
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE ABREVIATURAS

1400W N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina

8-Br-cGMP 8-Bromo-guanosin- 3',5'-monofosfato cíclico (de sus siglas en inglés)

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

C34 Isopropyl 2-(acetilamino)-2-deoxi α -D-glucopiranosido 3,4,6-triacetato

CaM Cáncer de mama.

cGMP Guanosin- 3',5'-monofosfato cíclico (de sus siglas en inglés)

COX-2 Ciclooxygenasa-2

DAMPs Patrones moleculares asociados a daño (de sus siglas en inglés).

ERK Cinasa regulada por señales extracelulares (de sus siglas en inglés).

eNOS Sintasa del óxido nítrico endotelial (de sus siglas en inglés)

HER2/*neu* Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (de sus siglas en inglés).

HSP90 Proteína de choque térmico 90 (de sus siglas en inglés).

HMGB1 Proteína del grupo de alta movilidad Box1(de sus siglas en inglés).

IKK Cinasa I κ B (de sus siglas en inglés).

IL-1 β Interleucina 1beta.

IL-6 Interleucina-6

IL-8 Interleucina-8

iNOS Sintasa del óxido nítrico inducible (de sus siglas en inglés).

INEGI Siglas de Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

JNK Cinasa c-Jun N-terminal (de sus siglas en inglés).

LPS Lipopolisacárido

MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos (de sus siglas en inglés).

MyD88 Factor de diferenciación mieloide 88 (de sus siglas en inglés).

Na₂SeO₃ Selenito de sodio

NF- κ B Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B (de sus siglas en inglés).

nNOS Sintasa del óxido nítrico neuronal (de sus siglas en inglés)

ODQ 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona

OMS Siglas de Organización Mundial de la Salud.

OPS Siglas de Organización Panamericana de la Salud.

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos (de sus siglas en inglés).

PBS Solución amortiguadora de fosfatos (de sus siglas en inglés)

PKG Proteína cinasa dependiente de cGMP (de sus siglas en inglés)

RP- 8-Br-PET- cGMPS Rp-8-Bromoguanosina- 3' , 5' - monofosforotioato cíclico de sodio (de sus siglas en inglés)

SFB Suero fetal bovino

sGC Guanilato cilcasa soluble (de sus siglas en inglés)

STAT3 Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (de sus siglas en inglés).

siRNA ARN interferente pequeño (de sus siglas en inglés).

TEM Transición epitelio mesénquima

TLR-4 Receptor tipo Toll 4 (de sus siglas en inglés).

TNBC Cáncer de Triple negativo (de sus siglas en inglés)

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa (de sus siglas en inglés).

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública tanto en México como en el mundo entero, ocupa el primer lugar en casos de incidencia y el segundo lugar en casos de muerte ocasionados por cáncer en la población femenina adulta. La metástasis es la principal causa de muerte en las personas que padecen cáncer (90%).

Hasta el momento se conoce poco acerca de cómo algunas señales extracelulares presentes en el microambiente tumoral son capaces de inducir o exacerbar el potencial metastásico de las células tumorales. Numerosos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos, han mostrado la influencia de un microambiente inflamatorio en el desarrollo y progresión del cáncer, observándose un aumento en algunas de sus capacidades metastásicas, tales como proliferación, migración e invasión. Además, se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre la condición inflamatoria con la capacidad de resistencia a fármacos citotóxicos que llegan a desarrollar las células tumorales. A pesar de los grandes avances que se han realizado en el estudio de la relación entre la inflamación y la progresión tumoral, todavía se desconoce a detalle los elementos moleculares participantes, así como su mecanismo de acción.

Se sabe hasta el momento, que la activación de la vía de señalización canónica del receptor tipo toll – 4 (TLR-4) estimula la producción de mediadores proinflamatorios capaces de promover la progresión tumoral, tales como el óxido nítrico (NO), sintetizado por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). A su vez, diversas evidencias demuestran por su parte, que la vía del NO, dependiente de la sGC (guanilato ciclasa soluble), favorece la capacidad migratoria, proliferativa y de supervivencia de células provenientes de diferentes tipos de cáncer de mama. Con base en estos antecedentes, el propósito general del presente trabajo fue Investigar si la vía de señalización NF- κ B/iNOS/NO/sGC/cGMP iniciada por la activación del (TLR-4) por LPS influye sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB-231.

Experimentos de RT-PCR e inmunocitoquímica muestran que la línea celular MDA-MB-231 expresa de manera basal TLR-4, tanto a nivel de ARNm como de proteína. En este trabajo demostramos que el tratamiento con LPS induce un aumento significativo en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y que este efecto depende de la

activación de TLR-4. El efecto inducido por LPS sobre la capacidad migratoria de las células depende de la expresión funcional de iNOS. El uso de antagonistas específicos nos permitió identificar la participación de la vía de señalización iNOS/NO/sGC/cGMP/PKG sobre la capacidad migratoria exacerbada por LPS en las células MDA-MB 231.

La activación de LPS no solamente influye sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, sino también sobre la capacidad proliferativa, aunque tiene un efecto más discreto, ya que se requiere una mayor concentración de LPS y un tratamiento más prolongado.

De manera complementaria, se considera que la baja eficiencia que tiene la quimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (TNBC) se debe a que las células tumorales desarrollan quimiorresistencia, por lo que decimos investigar la participación de la activación de TLR-4 en esta condición. Nuestros resultados muestran que la exposición crónica a 5 µg/ml de LPS favorece la quimiorresistencia a Doxorrubicina.

Por último, demostramos que células provenientes de cáncer de mama de bajo potencial invasivo, como la línea celular MCF-7, cuando son mantenidas en presencia de LPS, se exagera su capacidad migratoria, adquiriendo un fenotipo metastásico.

Nuestra investigación propone a los elementos de la vía de señalización TLR4/NF-κB /iNOS/ NO/sGC/cGMP como potenciales dianas a considerar en el desarrollo de una alternativa terapéutica novedosa para el tratamiento de TNBC, la cual podría estar dirigida a inhibir o reducir de manera efectiva la capacidad metastásica de las células tumorales, asegurando un mejor pronóstico de vida de los pacientes.

INTRODUCCIÓN

I. CÁNCER

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo (OMS, 2020). Por tanto, el cáncer es una enfermedad degenerativa multifactorial producida por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, constituyendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del mundo (Sociedad Española de Oncología Médica, 2017). La metástasis es la principal causa de muerte ocasionada por cáncer, reportándose 9.6 millones de muertes en el año 2018 (OMS, 2020).

El origen del cáncer es multifactorial, depende de factores genéticos y ambientales, que en algún momento inducen mutaciones en las células, relacionados con los circuitos que regulan: la proliferación, evasión del sistema inmune, capacidad de diseminación, formación de vasos sanguíneos, estabilidad genómica, resistencia a la muerte celular, reprogramación energética y al microambiente tumoral, fenotipo pro o antiinflamatorio (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

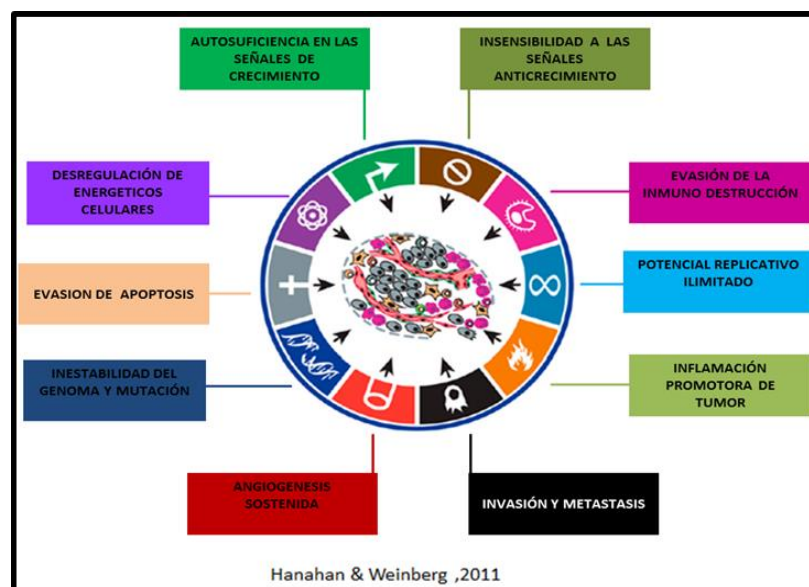


Figura 1. Alteraciones en los circuitos esenciales en la fisiología celular asociada al crecimiento de células tumorales. (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011)

Los circuitos de regulación más ampliamente estudiados son:

A. Potencial replicativo ilimitado o proliferación sostenida

La proliferación es una de las principales capacidades de las células tumorales. Los tejidos normales para mantener la homeostasis celular conservan un balance preciso de la producción y liberación de moléculas de señalización que promueven el crecimiento, estas regulan cada paso del ciclo celular controlando el número de células, lo cual es esencial para mantener la arquitectura y función de los tejidos normales. Los mecanismos moleculares precisos que inducen la desregulación de este delicado engranaje aún son desconocidos; sin embargo, se han descrito eventos relacionados a la adquisición de proliferación sostenida (Cheng et al., 2008; Bhowmick et al., 2004):

- Producción de factores de crecimiento por las células tumorales
- Inducción del tejido estromal para producir factores de crecimiento
- Sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento
- Independencia de señales de crecimiento (por activación constitutiva de elementos de las vías de señalización inductoras de proliferación)
- Activación de vías proinflamatorias que activan factores de transcripción tales como NF- κ B y STAT3 (Fernandes et al., 2015).

B. Migración e invasión

Los carcinomas que se originan en tejidos epiteliales tienden a progresar a formas más agresivas, que se caracterizan por la invasión local y la diseminación a sitios anatómicos distantes (metástasis); para lograr esto las células tumorales desarrollan alteraciones morfológicas y modifican su interacción con otras células y la matriz extracelular. *In vivo*, la adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo requiere de la interacción de las células cancerígenas, células estromales e inflamatorias (Conjuntamente con la expresión de genes específicos que regulan el proceso). Se propone que este proceso está dividido en cuatro condiciones necesarias para que ocurra (Grivennikov et al., 2010):

1. La transición epitelio-mesénquima (TEM), la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo fibroblástico, que le proporciona una mayor movilidad, facilitando la migración e invasión.
2. Intravasación, ingreso de las células tumorales a vasos sanguíneos y linfáticos.
3. Sobrevivencia de las células tumorales que viajan a través de la circulación.
4. Extravasación de las células tumorales, interacción con su nuevo microambiente y asentamiento de estas células en el nuevo sitio de implantación.

C. Evasión de la apoptosis

Defectos en los circuitos de regulación de la muerte celular programada o apoptosis, son muy importantes en el desarrollo y progresión tumoral: incremento de la supervivencia, independencia de señales de supervivencia y disminución de la respuesta al estrés oxidativo e hipoxia, promoviendo el crecimiento tumoral aun en estas condiciones (Hassan et al., 2014). Las terapias actuales contra los tumores incluyen a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, las cuales actúan a través de mecanismos de inducción de apoptosis, los mecanismos moleculares de evasión de este proceso son responsables de manera importante en la resistencia a al manejo terapéutico (Mohammad et al., 2015).

La quimiorresistencia, se define como cualquier circunstancia que se interponga o dificulte el efecto citotóxico de los fármacos quimioterapéuticos en la célula tumoral, para disminuir la progresión del cáncer (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006); el cual es el problema más difícil que enfrenta la quimioterapia, ya que se presenta en las neoplasias más avanzadas, lo cual limita e impide el efecto terapéutico (Dalton, 1993; Lehnert, 1996; Chu & DeVita, 2001).

Se ha descrito dos tipos de resistencia a ciertos medicamentos, la primaria o intrínseca y la adquirida, la cual es posterior a la exposición al agente terapéutico (LaPensee et al., 2009). La mayoría de los tumores sólidos, presentan resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos, este fenómeno es conocido como resistencia a múltiples fármacos o MDR.

Hasta el momento se han propuesto diversos mecanismos de quimiorresistencia (Chai & Lin, 2010), tales como:

- Disminuir la capacidad de absorción del fármaco.
- Aumentar en la expresión de transportadores dependientes de ATP que incrementan el eflujo del fármaco que logra ingresar a la célula.

- Acelerar el ciclo celular.
- Aumentar la degradación metabólica de los fármacos.
- Alterar los blancos farmacológicos.
- Inhibir la vía apoptótica

II. CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis es la serie de etapas necesarias para la formación del cáncer, que se desarrollan en un tiempo variable, las cuales son: a) Iniciación; b) Promoción y c) Progresión (Figura 2).

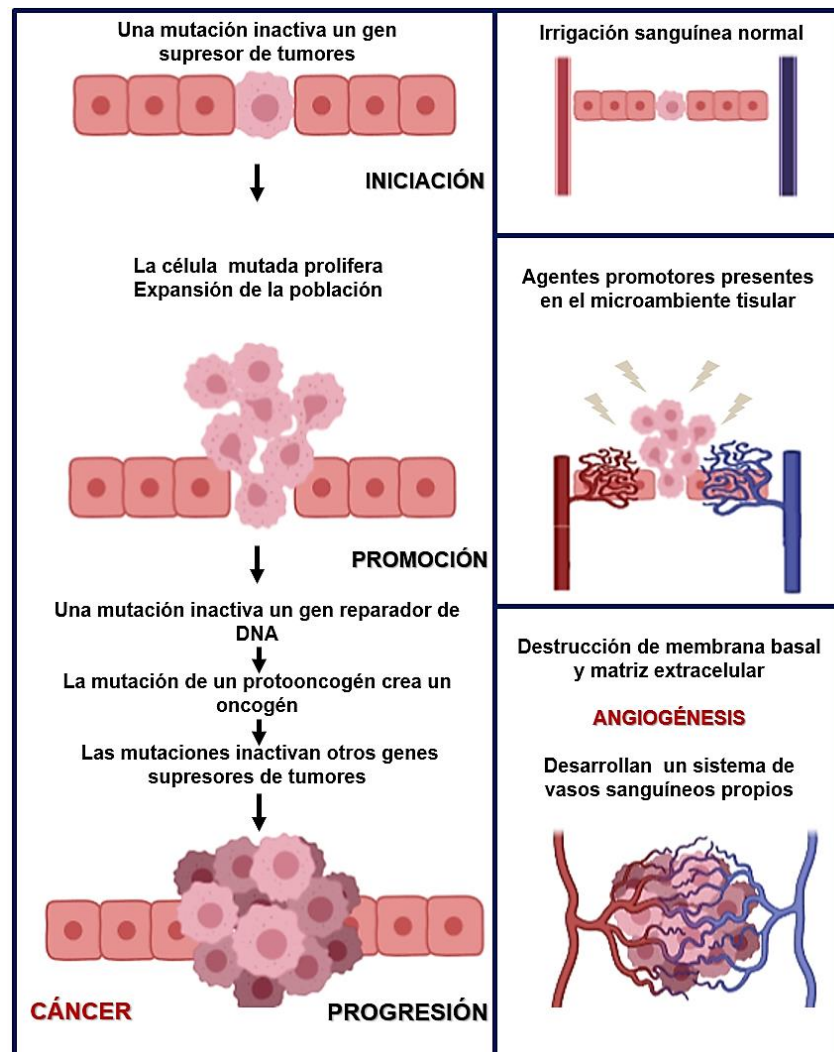


Figura 2. Etapas de la Carcinogénesis. (Modificado de Puente y Velasco, 2019)

El primer paso en la carcinogénesis consiste en la acción de un agente iniciador, que ocasiona daño (mutación) en la secuencia de un gen que codifica para un oncogén o un supresor tumoral. Algunas veces se nace con esta mutación (factor genético), y otras se induce por causas internas (hormonas, infecciones o inflamación crónica) o externas (radiaciones, agentes químicos) al organismo, que en su conjunto se llaman factores epigenéticos o ambientales (Puente y Velasco, 2019).

El segundo paso es la promoción, inducido por la exposición a uno o varios agentes promotores presentes en el microambiente tisular que, estimulan la división celular, aprovechando la ventaja proliferativa que le confiere el paso de iniciación. En otros términos, favorece la expansión de la población celular iniciada por la mutación (clonación) (Puente y Velasco, 2019).

La inducción de la progresión, tercera etapa de la carcinogénesis se debe a nuevas mutaciones, o cambios epigenéticos, que le confieren a la célula tumoral capacidad invasiva y metastatizante. En ausencia de este último paso, el tumor puede no transitar hacia un fenotipo maligno e invasivo. En esta etapa, el microambiente alrededor de la célula tumoral cambia drásticamente. El tumor establece un sistema de crecimiento autónomo propio, generando señales de crecimiento y evadiendo señales de muerte celular. También, produce destrucción de la membrana basal y matriz extracelular para abrirse paso hacia los vasos sanguíneos y linfáticos y así lograr invadir otros tejidos y órganos (metástasis). Por otra parte, con el fin de sustentar su propio aporte de nutrientes, desarrolla un sistema de vasos sanguíneos propios (angiogénesis tumoral) (Puente y Velasco, 2019).

Con respecto a los factores ambientales, estos pueden ser muy diversos, siendo los más importantes aquellos que establecen un microambiente tisular propicio para el desarrollo de un tumor, aumentando la tasa de mutación, entre los factores ambientales, se ha considerado a la condición inflamatoria crónica, independientemente de su origen, como uno de los principales promotores tumorales, ya que no solamente afecta a las propias células neoplásicas epiteliales, sino también a las células estromales, tales como endoteliales, macrófagos y fibroblastos (Grivennikov et al., 2010; Lorusso & Rüegg 2008).

La inflamación crónica favorece el desarrollo y progresión tumoral, se ha propuesto que ayuda a las células transformadas para la adquisición de nuevas capacidades que le ayudan a mantener un potencial replicativo ilimitado, evadir la apoptosis, favorecer la invasión y metástasis, entre otras (Colotta et al., 2009; De Nardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010). La condición de inflamación crónica proporciona al microambiente tumoral mediadores moleculares tales como: factores de crecimiento que promueven la proliferación sostenida, factores de sobrevivencia que limitan la apoptosis, enzimas que modifican la matriz extracelular que favorece la angiogénesis y facilita la activación de programas celulares como la TEM que induce migración e invasión (Karnoub & Weinberg, 2006–2007, De Nardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

III. RELACIÓN CÁNCER - INFLAMACIÓN

En el siglo XIX, se estableció por primera vez la relación entre el cáncer e inflamación con base en estudios hechos por Rudolph Virchow, el cual observó que el desarrollo tumoral con frecuencia surgía en sitios de inflamación crónica y que en el tejido

neoplásico estaban presentes células inflamatorias como los leucocitos (Balkwill & Mantovani, 2001; Munn, 2017).

Múltiples evidencias han demostrado que una minoría de todos los cánceres son debidos a mutaciones en células germinales, por lo que se considera que la mayoría se producen por mutaciones somáticas y factores ambientales. Muchos de estos factores se encuentran vinculados estrechamente con alguna forma de inflamación crónica (Aggarwal et al., 2009; Munn, 2017, Murata M, 2018).

Estudios epidemiológicos han evidenciado 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 & Mantovani, 2001; Munn, 2017).

Existen muchos detonantes de la respuesta inflamatoria que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer. Procesos asociados a patógenos tales como: la infección crónica por *Helicobacter pylori* y su correlación positiva con desarrollo de carcinoma gástrico; hepatitis viral crónica asociada con cáncer de hígado; infecciones recurrentes con *Schistosoma spp* relacionadas con carcinoma de vejiga y colon; la infección con algunas cepas agresivas del virus de papiloma humano se asocian con cáncer cervicouterino; infecciones por el virus de Epstein-Barr están relacionados con la presencia de linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo. Además de procesos no infecciosos como; el consumo excesivo de alcohol promueve inflamación del hígado y páncreas, lo cual correlaciona positivamente con la presencia de cáncer en estos órganos; el consumo de tabaco, la exposición a sílica y asbestos se ha asociado con inflamación y carcinoma en los pulmones; la enfermedad intestinal inflamatoria está asociada con cáncer de colon (Coussens & Werb, 2002; Shacter & Wetzman, 2002; Hussain et al., 2003; Fox & Wang, 2007; Munn, 2017; Murata, 2018).

La relación inflamación-cáncer se sustenta en una de las evidencias más sólidas, ya que se ha descrito que el uso de agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) genera cierta protección contra diversos tumores (Mantovani et al., 2008; Fernandes et al., 2015). Estudios sobre el riesgo de incidencia 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 inhibición de la ciclooxygenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2) como mecanismo de acción de los AINEs, es la principal justificación como agentes de quimioprevención. La COX-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 dependiente de COX-2; sin embargo, se ha demostrado que la inactivación de las plaquetas evita que estas sintetizen prostaglandinas, endoperoxidasas y tromboxano A₂ (Baron & Sandler, 2000; García-Rodríguez & Huerta-Álvarez, 2001).

Estudios epidemiológicos en humanos, así como estudios moleculares en ratones genéticamente modificados, han respaldado la propuesta de que la inflamación juega un papel importante en la tumorigénesis (Mantovani et al., 2008, Munn, 2017; Murata, 2018). Puesto que se ha demostrado la presencia de un microambiente inflamatorio que rodea a los tumores, el cual no está compuesto solo por células cancerosas y células del estroma

circundante (fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales); también lo constituyen 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; Munn, 2017; Murata, 2018).

La conexión entre inflamación y cáncer puede ser abordada desde dos perspectivas; la extrínseca que se refiere a las condiciones inflamatorias que pueden dar lugar a desarrollo del cáncer y la vía intrínseca, en donde los eventos genéticos tempranos que permiten el desarrollo del tumor promueven a la vez la formación de un microambiente inflamatorio (Mantovani et al., 2008). Independientemente de estas dos perspectivas, el microambiente tumoral se caracteriza por la presencia conjunta de células del sistema inmune, células tumorales y células estromales (De Visser et al., 2006); estos diferentes tipos celulares se comunican de manera paracrina y autocrina por medio de citocinas y quimiocinas, controlando así el crecimiento tumoral.

Las citocinas presentes en el microambiente tumoral ejercen un efecto sobre el desarrollo y evolución del cáncer, activando factores de transcripción asociados a la expresión de genes que regulan la proliferación, apoptosis, angiogénesis e invasividad celular, tales como el NF- κ B y el STAT3 (Grivennikov et al., 2009; Yu et al., 2009; Lin & Karin, 2007).

La activación de TLR-4 por LPS o ácidos grasos facilita la translocación del NF- κ B, particularmente la subunidad p65, al núcleo, facilitando la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, enzimas en la vía de síntesis de las prostaglandinas (COX2), la sintasa del óxido nítrico (iNOS o NOS2) y factores angiogénicos, entre otros. (Mantovani et al., 2008).

Los elementos proinflamatorios presentes en el microambiente tumoral promueven la evolución del cáncer a su condición clínica más agresiva, que incluye metástasis, un claro ejemplo ocurre en el desarrollo del cáncer de mama (CaM).

IV. CÁNCER DE MAMA

A. Epidemiología

El cáncer de mama es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en el mundo, en 2018 la OMS reportó una incidencia de 11.6% y una tasa de mortalidad de 6.6% para ambos sexos; sin embargo, es la principal neoplasia diagnosticada en mujeres con un 24.2% (2.09 millones de nuevos casos) y la principal causa de muerte 15% (626,679 defunciones). Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud en este mismo año señaló que el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres de América Latina y El Caribe; estimándose que 27% de los nuevos casos y 16% de las muertes por neoplasias en mujeres son por CaM, además se calcula que para 2030 se incrementará el número de nuevos casos un 60% (OPS, 2018).

Las cifras en México siguen las tendencias internacionales, los datos del INEGI en 2018 indican que el cáncer de mama destaca como la tercera causa de muerte por tumores malignos en ambos sexos. Sin embargo, en las mujeres se observa el mayor impacto en comparación con los varones, debido a que dos de cada 10 fallecimientos femeninos por cáncer se deben a esta enfermedad; los datos de mortalidad entre los varones son marginales. Mientras que en las pacientes mayores de 20 años el cáncer de mama es una de las principales causas de morbilidad hospitalaria por neoplasias representando el 30.9% del total en este grupo. Por otra parte, entre las mujeres de esta edad el cáncer de mama aparece como la segunda causa de mortalidad con 16 defunciones por cada 100 mil personas (INEGI 2018).

B. Clasificación

Se considera al cáncer de mama un tipo de neoplasia maligna que se origina en células epiteliales que cubren los lobulillos y conductos del tejido mamario (carcinoma). Dependiendo si el cáncer se ha propagado o no, se puede clasificar en: *in situ*, localizado y con bajo potencial para progresar a metástasis; invasivo o infiltrante, este se expande más allá de la membrana basal y es en este estado donde se desarrolla el proceso metastásico (ACS, 2020).

Por otra parte, la clasificación molecular del cáncer de mama está fundamentada en la presencia de varios marcadores inmunohistoquímicos, siendo los hormonales los más importantes, con base en esto, y la correlación con el pronóstico, se clasifican en: receptores a estrógenos positivos (buen pronóstico), HER2 positivo y Triple negativo (que presentan un peor pronóstico). Gracias a las técnicas moleculares, tales como secuenciación y microarreglos de DNA se ha ampliado la clasificación a: luminal A, luminal B, Normal, HER2/neu, triple negativo/ basal o claudina baja, las características más importantes se resumen en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación molecular del Cáncer de mama

CLASIFICACIÓN*#	PERFIL INMUNOHISTOQUIMICO#	PRONÓSTICO**	OTRAS CARACTERISTICAS#
Luminal A	ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁻	Bueno	Ki-67 bajo, responsivo a estrógenos, frecuentemente responsivo a quimioterapia
Luminal B	ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁺	Bueno	Ki-67 alto, usualmente responsivo a estrógenos, respuesta variable a quimioterapia, responsivo a trastuzumab
HER2/neu	ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁺	Malo	Ki-67 alto, responsivo a quimioterapia, y a trastuzumab
Basal	ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁻	Malo	EGFR ⁺ y/o CK5/6 ⁺ , Ki-67 alto, no responsivo a estrógenos, frecuentemente responsivo a quimioterapia.
Triple negativo/ Claudina baja	ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁻	Malo	Ki-67, E-caderina, claudina 3/5/7 baja respuesta intermedia a quimioterapia.

Holliday & Speirs, 2011.

* Provenzano et al., 2018.

Como se observa en la tabla 1, los tipos de CaM que presentan un peor pronóstico es el cáncer de mama triple negativo; en este las células tumorales carecen de la expresión de receptores hormonales, receptor de estrógenos y progesterona y del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 /HER (Mehmeti et al., 2015). Otros autores han descrito 6 subtipos moleculares de TNBC, tipo basal 1, tipo basal 2, tipo mesénquima, mesenquimal

stem cell-like, inmunomodulador y receptor andrógeno luminal, cada uno con subcategorías (Lehmann et al., 2011). Por ejemplo, la línea celular MDA-MB-231 pertenece al subtipo mesenquimal stem cell-like, el cual se caracteriza por sobreexpresión de marcadores de la TEM, con alta capacidad migratoria e invasiva.

C. Factores de riesgo

El origen del cáncer de mama está relacionado a diferentes factores de riesgo, los cuales incluye:

- Factores hereditarios y genéticos: Historial familiar o personal de cáncer de mama y ovario; así como mutaciones hereditarias (BCRA1, BCRA2 y otras mutaciones hereditarias). Constituyen solo del 5 a 10% de los casos (Brayet al., 2018).
- Factores no hereditarios: Relacionados a la menstruación (aparición temprana de menarca y aparición tardía de menopausia); relacionados a la reproducción (nuliparidad, maternidad tardía, bajo número de embarazos); relacionados a la administración de hormonas exógenas (anticonceptivos orales y remplazo hormonal), relacionados a la antropometría (alto índice de masa corporal, aumento de peso durante la adultez, distribución de la grasa corporal) y procesos inflamatorios crónicos de leves a moderados (Brinton et al., 2018; Ham & Moon, 2013; Hankinson, et al. 1995; Harlan et al., 2010; Lalloo & Evans, 2012; McPherson et al., 2000, Milne et al., 2005; Richie & Swanson, 2003; Ziegler et al., 1993).

V. RELACIÓN CÁNCER DE MAMA - INFLAMACIÓN

Las células tumorales, al igual que las células del sistema inmune, tienen la capacidad de producir citocinas proinflamatorias, amplificando de esta manera el efecto proliferativo e invasivo de los tumores (Luo et al., 2007). Se sabe además que los tipos de CaM con fenotipo triple negativo muestran un mayor microambiente inflamatorio

(Yamaguchi et al., 2009). En este microambiente están presentes mediadores clave de la respuesta inflamatoria, tales como prostaglandinas y leucotrienos. Se ha observado que la actividad de la COX-2 está asociada a la progresión tumoral y metástasis, ya que el uso prolongado de inhibidores de la COX-2 reducen la progresión y desarrollo del cáncer de mama (Kumar et al, 2013).

Entre los múltiples receptores de membrana involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y que están relacionados con la respuesta inflamatoria, destaca TLR-4 que presenta un alto nivel de expresión en células tumorales de cáncer de mama (Ahmed et al., 2013; Kidd et al., 2013).

La activación de TLR-4 por LPS no solamente estimula la progresión del cáncer de mama, sino también otros tipos de neoplasias, tales como de colon (Wang et al., 2010; Kojima et al., 2000), y páncreas (Ikebe et al., 2009).

En un modelo murino de cáncer de mama se observó que la administración sistémica de LPS estimula la metástasis a pulmón (Harmey et al., 2002). La sobreexpresión de TLR-4 en tejido tumoral correlaciona con recaída y se asocia a metástasis (González-Reyes et al., 2010). El silenciamiento del ARNm que codifica para TLR-4 reduce la viabilidad de las células tumorales, la producción de citocinas y la progresión tumoral (Yang et al., 2010).

A. Receptor Tipo Toll-4 (TLR-4)

El TLR-4 es una glicoproteína transmembrana tipo I, con un peso molecular de 90 a 115 KDa, fue identificado inicialmente en células del sistema inmune, sin embargo, se ha reportado su presencia en otros tipos celulares, incluyendo células tumorales. Para iniciar la cascada de señalización TLR-4 necesita acoplarse a dos proteínas accesorias: MD2 y CD14 (Chang, 2010; Basith et al., 2012; Lee et al, 2001; Liu et al., 2014). Este receptor responde a PAMPs de bacterias gram negativas como lipopolisacárido de diferentes variantes, desde *E. coli* a *S. typhimurium*, activando las diferentes vías de señalización asociadas a este receptor. Por otra parte, los DAMPs también pueden activar a TLR4, de estos los mejor descritos son la proteína nuclear de alta movilidad del grupo B1 y S100A9 (Mehmeti et al., 2015).

La activación de TLR-4 induce una respuesta canónica y una no canónica, la respuesta canónica es dependiente de la proteína MyD88, mientras que la respuesta no canónica es independiente de dicha proteína. La vía canónica tiene como resultado la activación de NF- κ B y la subsecuente transcripción de genes específicos que codifican para diferentes proteínas, como son citocinas (Kawai & Akira 2005; Akira et al., 2006; O' Neill, 2006) y la sintasa de óxido nítrico tipo 2 o inducible (iNOS) (Madrigal et al., 2001). Mientras que la vía no canónica, induce la secreción de Interferón tipo 1 como una respuesta anti-viral (Pandey & Agrawal, 2006).

Se ha involucrado la activación de TLR-4 no solamente en la regulación de la respuesta inmune, sino también en enfermedades inflamatorias no infecciosas, así como en el desarrollo y progresión del cáncer (Jing et al., 2012). La presencia de TLR-4 ha sido detectada en varios tipos de cáncer: páncreas, pulmón, mama, próstata, hígado y colon (Akira & Takeda, 2004; Hua et al., 2009; Wang et al., 2010, Jing et al., 2012). El bloqueo de la actividad y expresión de TLR-4 promueve la reducción significativa en el potencial metastásico de células tumorales provenientes de cáncer de próstata (Hua et al., 2009), en el caso de cáncer de hígado, la actividad de TLR-4 se ha correlacionado positivamente con la expresión de Ki-67 un marcador nuclear de proliferación (Wang et al., 2013). En la línea tumoral HepG2, la activación de TLR-4 provoca un aumento de los niveles de expresión de IL-6 y producción de óxido nítrico, moléculas que modulan positivamente la proliferación y quimiorresistencia en estas células (Hsiao et al., 2015).

Los pacientes que padecen cáncer de mama presentan un incremento en los niveles de expresión de TLR-4, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína, relacionándose de manera positiva el nivel de expresión de TLR-4 con el potencial metastásico del tumor (González-Reyes et al., 2010; Mehmeti et al., 2015). Se ha observado de manera complementaria, que líneas celulares de CaM con fenotipo triple negativo (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SUM-149, SUM-159), sobre-expresan TLR-4, a diferencia de líneas tumorales responsivas a estrógenos y células epiteliales normales (Mehmeti et al., 2015).

En mi trabajo de tesis de maestría demostré que la presencia de LPS, ligando exógeno de TLR-4, exacerba la capacidad migratoria e invasiva de la línea tumoral de mama MDA-MB-231, debido al menos parcialmente a un incremento en la expresión IL-6 y TNF- α (Fig. 3) (Ruiseco-Flores, 2015). Adicionalmente, nuestro grupo demostró que las

células MDA-MB-231 son capaces de expresar los receptores específicos para estas citocinas proinflamatorias las cuales podrían tanto por mecanismos autocrinos como paracrinis, modificar la capacidad migratoria (Fig. 3), ya que la administración exógena de IL-6 y TNF- α regula positivamente la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 (Vázquez – Rojas, 2016). Otro grupo de investigación mostró que la activación de TLR-4 estimula la expresión de la integrina $\beta\alpha3$ y de la metaloproteínasa 9 en el mismo tipo celular (Liao et al., 2012). Existen evidencias que sugieren que la sobreexpresión de TLR-4 exagera la quimiorresistencia que presentan las células MDA-MB 231 al tratamiento con paclitaxel (Rajput et al., 2013).

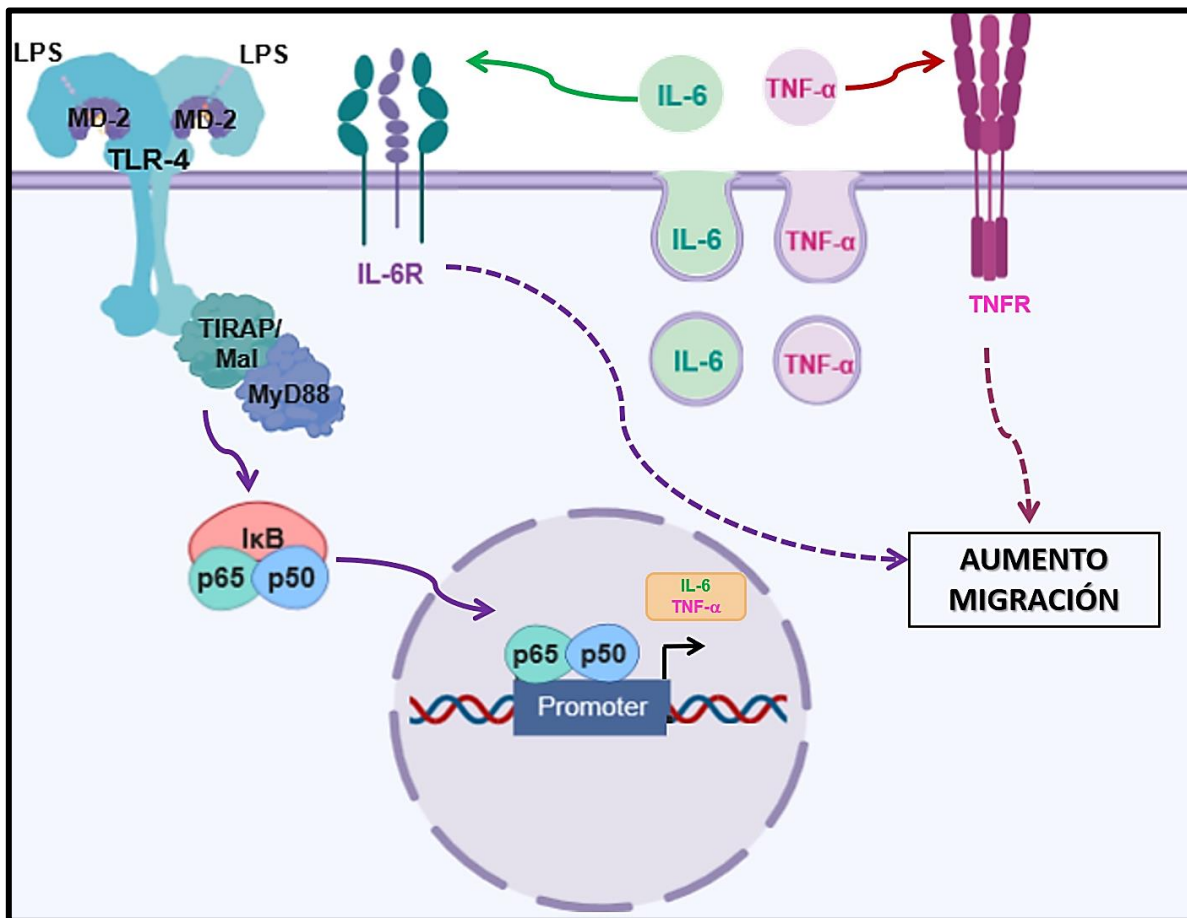


Figura 3. Activación de TLR-4 promueve la migración por un mecanismo dependiente de IL-6 y TNF- α en las células MDA-MB-231. En células de TNBC la activación de TLR-4 por LPS estimula la translocación de NF- κ B al núcleo, lo que promueve la regulación de genes proinflamatorios que codifican para IL-6 y TNF- α , los cuales son traducidos, empaquetados en vesículas y secretados al espacio extracelular en donde, por mecanismos autocrinos y paracrinis interactúan con sus receptores específicos y activan vías de señalización que favorecen la migración celular.

B. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es una macromolécula que tiene un peso molecular de 10 a 20 kDa, se localiza en la lámina distal de la membrana externa de las bacterias gram-negativas; está constituido por tres componentes, el lípido A (altamente conservado), un polisacárido medular (también conservado entre especies) y por último un polisacárido específico, el cual es el responsable de su identidad molecular (Chatterjee & Chaudhuri, 2012). LPS se une de manera específica a TLR-4 (Akira et al., 2006). Los primeros estudios para entender el reconocimiento de esta molécula se basaron en el principio de que existe una proteína de unión a LPS (LBP) en el suero, que cataliza la transferencia hacia la molécula CD14 unida a membrana o bien su forma soluble. Esta es una proteína de anclaje a glicosilfosfatidilinositol que carece de dominio transmembranal y celular, para poder ejercer un efecto intracelular se demostró que se requiere de la presencia de TLR-4 y una molécula adicional, MD-2. LPS ha demostrado ser capaz de activar las vías de señalización NF- κ B, ERK1/2, SAPK/JNK, dependiendo la maquinaria molecular del tipo celular (Triantafilou & Triantafilou, 2002).

C. Efectos de LPS sobre la fisiología celular

La unión de LPS a su receptor específico, TLR-4, facilita la translocación del NF- κ B al núcleo, estimulando la expresión de genes específicos que codifican para citocinas proinflamatorias (Li et al., 2012) y la sintasa de óxido nítrico tipo 2 (iNOS) (Madrigal et al., 2001). El papel de las citocinas ha sido ampliamente revisado en la caracterización de la respuesta inflamatoria y en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Sin embargo, se desconoce a detalle el papel que pudiera estar ejerciendo el óxido nítrico en el desarrollo del cáncer de mama, que fue el interés del presente proyecto.

- **Sintasa de óxido nítrico (NOS)**

La NOS son enzimas homodiméricas, que a pesar de diferenciarse en tamaño (de 130 a 160 kDa), presentan una alta homología en su secuencia, con aproximadamente un 55% de similitud, siendo esta aún mayor en las regiones implicadas en la catálisis. Estas

enzimas catalizan la oxidación de L-Arginina para generar L-citrulina y NO, empleando O_2 y NADPH como cosustratos, y varios cofactores redox (el grupo hemo, BH4 y las flavinas FAD y FMN), un átomo de Zn y la unión de Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CaM).

La principal diferencia entre las tres isoformas de NOS es su proceso de activación. La nNOS y eNOS necesitan un incremento en los niveles intracelulares de calcio para que se produzca la unión de Ca^{2+} /CaM, mientras que la activación de la iNOS es independiente de Ca^{2+} , presenta una gran afinidad por Ca^{2+} /CaM por lo que la enzima es activada a los niveles basales de Ca^{2+} intracelular. Durante muchos años se consideró que la regulación de la síntesis de NO por parte de la iNOS ocurría solamente de manera transcripcional (Cho et al., 1992; MacMicking et al., 1997), pero hoy en día, se sabe que la palmitoilación N-terminal de la iNOS (Navarro-Lerida et al., 2006; Navarro-Lerida et al., 2004), su fosforilación por parte de la cinasa Src (Tyryshkin et al., 2010) o su asociación a proteínas con dominios PDZ a través de su extremo C-terminal (Glynne et al., 2002; Navarro-Lerida et al., 2007) regulan su localización subcelular y actividad enzimática.

- **Sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS-NOS2).**

Esta proteína se encuentra en la fracción soluble y posee un peso molecular de 125-135 kDa. Se diferencia de las otras dos isoformas, nNOS y eNOS, en que su actividad no es dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ y una vez expresada es activa para producir NO. La inducción de su expresión alcanza un grado tal que las células producen enormes cantidades de NO (Nathan & Hibbs 1991). En condiciones fisiológicas, los niveles de expresión de iNOS son bajos, pudiéndose inducir su expresión transcripcional como parte de la respuesta sistémica por endotoxinas (LPS), citocinas inflamatorias y otros agentes.

El NO generado por la iNOS contribuye al efecto bactericida de los fagocitos y de las células implicadas en los mecanismos de defensa del organismo. De hecho, aunque inicialmente fue identificada en macrófagos, su expresión puede ser estimulada prácticamente en cualquier célula o tejido (Förstermann et al., 1994). La iNOS se une a Ca^{2+} /CaM de forma esencialmente irreversible, incluso a concentraciones bajas de Ca^{2+} (Xia et al., 2009). Durante mucho tiempo se ha considerado que la iNOS servía principalmente para generar grandes cantidades de NO con el fin de eliminar bacterias y células tumorales, en definitiva, para ejercer una función de defensa (Bogdan, 2001). En la

actualidad se sabe que la actividad de la iNOS puede estar relacionada positivamente con la progresión tumoral y metástasis (Hickok & Thomas, 2010).

La iNOS interacciona con al menos 10 proteínas diferentes. Una proteína de 110 kDa expresada en macrófagos a la que se llamó NAP110 (NOS-associated protein-110 kDa). Esta proteína interacciona directamente con el extremo N-terminal de la iNOS y, presumiblemente, inhibe la actividad catalítica al impedir la formación de homodímeros de iNOS. Así, la expresión de NAP110 puede servir como mecanismo de defensa por el cual los macrófagos que expresan la iNOS se protegen a sí mismos de niveles de NO citotóxicos (Ratovitski et al., 1999b). La segunda, es una proteína neuronal llamada kalirina, la cual parece jugar un papel de neuroprotección durante la inflamación del sistema nervioso central (Ratovitski et al., 1999a) ya que se asocia con la iNOS e inhibe su actividad enzimática al impedir la dimerización de la iNOS. Otras proteínas que se ha descrito que interaccionan con la iNOS son las caveolina-1, -2, -3, Hsp90, y las proteínas Rac-1 y Rac-2, las cuales pertenecen a la familia de GTPasas pequeñas tipo Rho (Felley-Bosco et al., 2000; Yoshida & Xia, 2003). El NO producido por la iNOS tiene como blanco el guanilato ciclasa en su forma soluble (sCG), la cual es activada para la producción de cGMP.

Existen evidencias que demuestran, en muestras clínicas, que la expresión de iNOS correlaciona positivamente con el grado de malignidad tumoral, ya que hay mayor inmunorreactividad al anticuerpo específico que reconoce a iNOS en biopsias de carcinoma de mama invasivo en comparación con muestras de hiperplasias no neoplásicas (Bulut et al., 2005); además de que la sobre expresión de iNOS está relacionada con una menor sobrevida en tumores ER- (Garrido et al., 2017)

- **Óxido nítrico (NO)**

El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización biológica, que además de participar en el funcionamiento del sistema cardiovascular, sistema nervioso y sistema inmune, regula la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo y progresión del cáncer (Förstermann y Sessa, 2012; Moncada y Higgs, 1993; Vasudevan & Thomas, 2014). Dada la naturaleza química del NO, no puede ser almacenado en las células, por lo que depende de la síntesis de *nov*o para poder llevar a cabo sus funciones. En las células está presente una familia de enzimas denominadas Sintetas de Óxido Nítrico (NOS, por sus

siglas en inglés) responsables de la producción de NO. En el humano, se han caracterizado tres isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS ó NOS1), NOS inducible (iNOS ó NOS2) y NOS endotelial (eNOS ó NOS3). Las isoformas eNOS y nNOS son consideradas constitutivas, mientras que la isoforma inducible, iNOS, se expresa fundamentalmente en células expuestas a endotoxinas y a diversas toxinas proinflamatorias (Knowles y Moncada, 1994; Masters, 1994; Nathan, 1997). Sin embargo, también se ha comprobado que, bajo ciertas condiciones fisiológicas, en algunos tejidos la iNOS se expresa de forma constitutiva y las otras dos isoformas se pueden inducir ante determinados estímulos, tales como las fuerzas de rozamiento hemodinámicas (“shear stress”) o daños en el sistema nervioso (Gao et al., 2008). Una desregulación en la producción de NO y variaciones en los niveles de expresión de la NOS han sido implicados en varios tipos de cáncer, relacionándolos tanto con la progresión tumoral y metastásis, como con la supresión del tumor (Hickok & Thomas, 2010).

Existen efectos fisiológicos diferenciales del óxido nítrico que dependen de su concentración: bajas concentraciones (1 – 100 nM), concentraciones intermedias (100-400nM), altas concentraciones (400 - 1,000 nM). A bajas concentraciones el NO está implicado en la regulación de la relajación del musculo liso y el flujo sanguíneo, como neurotransmisor, actividad de las plaquetas, homeostasis del hierro, sobrevivencia celular y proliferación, con un efecto pro-tumoral; mientras que una alta concentración, mayor de 500nM, pueden tener efectos pro-apoptóticos, produciendo citotoxicidad y actividad antitumoral (Vannini et al., 2015).

Con respecto a las vías estimuladas por el NO las mejor caracterizadas son la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y la nitrosilación directa de proteínas (Hare, 2003). Por ejemplo, el NO se une al grupo hemo de la sGC, estimulando su actividad de GTPasa, quien a partir de GTP genera cGMP. La elevación intracelular de la concentración de cGMP inicia una cascada de señalización, involucrando la activación de numerosas cinasas dependientes de cGMP (PKG) y la transcripción de diversos genes (Senzaki et al., 2001). Por otro lado, a concentraciones fisiológicas, el NO inhibe la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (complejo IV) compitiendo con el O₂, dando lugar a un fenómeno llamado “hipoxia metabólica” en la cual, existiendo una concentración normal de O₂, la célula es incapaz de utilizarlo, obligando a la célula a emplear la vía glucolítica para la producción de ATP (Xu et

al., 2005). Además, el NO puede tener un efecto postraduccional sobre diversas proteínas, como la S-nitrosilación de los residuos de cisteína, afectando drásticamente la función de las proteínas (Stamler et al., 2001). Un ejemplo de proteínas que se nitrosilan son las caspasas, inhibiendo su actividad y por lo tanto la apoptosis (Li et al., 1997; Rossig et al., 1999; Tennesi et al., 1997). Cuando el NO reacciona con el anión superóxido (O_2^-), se forma peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante, capaz de causar daño oxidativo, nitración y S-nitrosilación de biomoléculas, tanto proteínas como lípidos y ADN (Lee et al., 2003; Mikkelsen y Wardman, 2003). Por lo tanto, debido a su potente reactividad química y a su alta difusibilidad, la producción de NO está finamente regulada para dictar la especificidad de su señalización y limitar la toxicidad a otros componentes celulares (Figura 4).

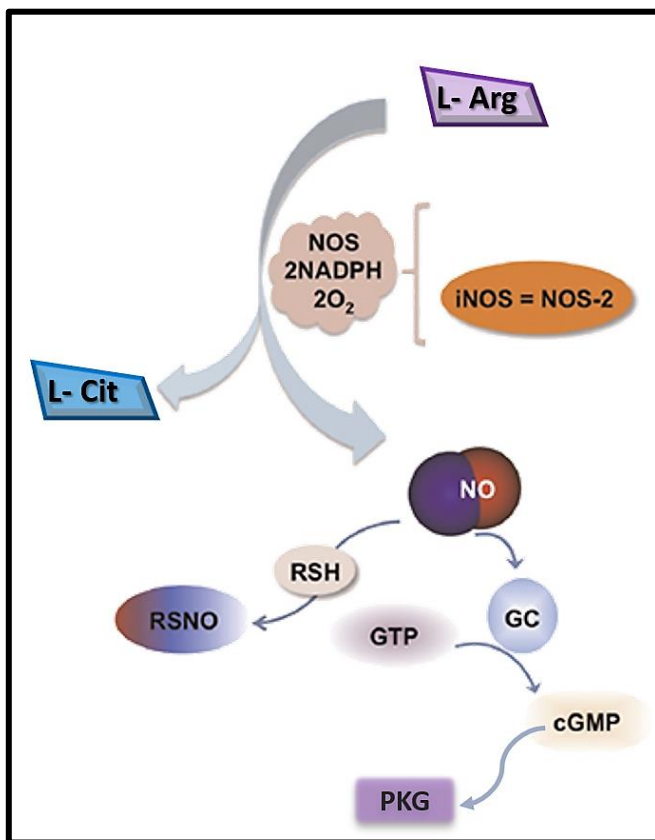


Figura 4. Principales vías de señalización del NO. El aumento de la concentración intracelular de óxido nítrico promueve; 1) la activación de la actividad catalítica de sGC, aumentando la producción de cGMP el cual puede activar diferentes respuestas a través de proteínas efectoras como PKGs, PDEs y canales iónicos. 2) Produce aumento de la producción de especies reactivas de nitrógeno que pueden S-nitrosilar diversas proteínas clave de vías de señalización, proliferativas, antiapoptóticas, migratorias, etc.

- **Guanilato ciclasa (GC)**

La guanilato ciclasa es la enzima responsable de la síntesis de cGMP a partir del GTP. Esta enzima puede encontrarse en el citosol de forma soluble (sGC), o bien estar anclada en la membrana plasmática (pGC), la primera forma es estimulada por NO, y la segunda por el péptido natriurético atrial. La sGC es un heterodímero formado por dos

subunidades, α y β , de las que se han clonado y secuenciado dos isoformas de cada una (α 1-2, β 1-2). Sólo se han encontrado dos combinaciones de heterodímero funcionalmente activas: la α 1 β 1, que es ubicua; y la α 2 β 1, que se ha detectado en placenta humana y en sistema nervioso central (Hobbs, 1997; Denninger & Marletta, 1999; Mergia et al., 2003; Pifarré et al., 2007). La unión del NO al grupo prostético hemo de la sGC induce un cambio conformacional de la enzima que estimula la producción del cGMP a partir del GTP (la actividad de sGC incrementa 200 veces), el aumento en los niveles de cGMP conduce a diversos eventos intracelulares, entre los que se incluyen, la activación de diferentes proteínas efectoras (El-Sehemy, et al., 2016).

- **Guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (cGMP)**

La guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (cGMP), es considerada un segundo mensajero intracelular, que es sintetizada por la sCG y degradada por una fosfodiesterasa (Hardman & Sutherland, 1969). La concentración intracelular de cGMP es un punto importante en el mecanismo de transducción de señales, y puede aumentar o disminuir rápidamente en respuesta al estímulo extracelular. El aumento de los niveles de cGMP favorece la activación de proteínas involucradas en diferentes vías de señalización, entre las que se pueden mencionar las proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKG), canales catiónicos activados por nucleótidos (CNG), fosfodiesterasas (PDE) y proteínas cinasa dependiente de cAMP (PKA) (Fiscus, 1988; Lincoln et al, 2001; Fiscus et al., 2002; Pilz & Casteel, 2003; Hofmann et al, 2006; Francis et al, 2010).

En los últimos años se ha despertado un gran interés por la vía de señalización del cGMP, en el tratamiento de la disfunción eréctil (Middenforff et al., 2000), y su posible papel citoprotector y anti-apoptótico en el sistema nervioso central y en el cardiovascular (Andoh et al., 2003), así como su probable papel en diversos tipos de cáncer. En células tumorales se ha observado que el cGMP está implicado en el proceso de metástasis, la síntesis de ADN, así como un efecto citoprotector relacionado a la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Punathil & Katiyar, 2009; Leung et al., 2010; Wong et al., 2012; Schwappacher et al., 2013). Se ha observado que la capacidad migratoria de las células tumorales, depende al menos parcialmente de un aumento en los niveles del cGMP, el cual es capaz de activar diferentes isoformas de la PKG, por ejemplo, en cáncer de pulmón no microcítico involucra la activación de la vía de señalización de ERK1/2 dependiente de PKG (Punathil

& Katiyar, 2009); mientras que en cáncer de mama la migración es estimulada por un aumento en cGMP con activación secuencial de PKG-I β y caldesmona (Schwappacher et al., 2013).

- ***Proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKGs)***

Las PKGs participan en múltiples funciones fisiológicas, tales como en la regulación del tono vascular, inhibición de la activación plaquetaria, modulación en la función neuronal y mantenimiento de la homeostasis en hueso (Hofmann et al., 2009; Rangaswami et al., 2010). Se ha evidenciado la participación de PKGs en la migración de monocitos y macrófagos estimulada por plasmina y α elastina (Kamisato et al., 1997; Uemura & Okamoto, 1997), así como en la motilidad de neutrófilos inducida por monóxido de carbono y endotelina-1/ endotelina 3 (Elferink & De Koster, 1998; VanUffelen et al., 1996).

Las células de mamífero expresan tres diferentes tipos funcionales de proteínas PKG, transcritas por dos genes separados. El gen tipo I produce dos isoformas de PKGI (PKG-I α and PKG-I β) (Casteel et al., 2002), y el gen tipo II produce una sola forma proteica, PKGII (Uhler, 1993). La interacción proteína-proteína es sumamente importante en la especificidad de la vía de señalización. Se ha identificado un gran número de proteínas que interactúan exclusivamente con PKG-I α o PKG-I β (Schwappacher et al., 2013), por ejemplo, la proteína PKG-I β interactúa específicamente con la caldesmona (CaD), proteína de unión a actina, miosina y calmodulina, que regula la migración e invasión celular (Mayanagi & Sobue, 2011); mientras que en células de cáncer de pulmón no microcítico el uso del inhibidor de PKG (RP-8-Br-cGMP) disminuye la capacidad migratoria de las células (Punathil & Katiyar, 2009).

Se ha observado en cáncer de ovario que la vía NO/GC/cGMP/PKG tiene un papel central en la proliferación y la quimiorresistencia, con una participación específica de PKG isoforma tipo I α , la cual interactúa con la vía de la tirocina cinasa c-Src (Leung et al., 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La metástasis es la principal causa de muerte en las personas que padecen cáncer, que consiste en una compleja serie de eventos que involucra la capacidad adquirida de las células tumorales por migrar del tumor primario e invadir tejidos y órganos cercanos o lejanos. Hasta el momento se conoce poco acerca de cómo algunas señales extracelulares presentes en el microambiente tumoral inducen o exacerban el potencial metastásico de las células tumorales. Numerosos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos, han mostrado la influencia de un microambiente inflamatorio en el desarrollo y progresión del cáncer, sin conocerse hasta el momento con precisión el mecanismo molecular involucrado. Por lo que el propósito del presente trabajo es investigar si la activación de TLR-4 relacionado a la respuesta inflamatoria, influye sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231, línea proveniente de cáncer de mama triple negativo, y determinar a la vez, la vía de señalización intracelular involucrada.

HIPÓTESIS

La activación de TLR-4 por LPS incrementa la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB -231 a través de la vía de señalización NF- κ B/iNOS/NO/sCG/cGMP.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si la vía de señalización NF- κ B/iNOS/NO/sGC/cGMP iniciada por la activación de TLR-4 por LPS induce un incremento en la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB-231.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si la estimulación con LPS influye sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.
2. Determinar si el efecto de LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 depende de la activación de TLR-4.
3. Evaluar si la activación de TLR-4 por LPS incide sobre la expresión funcional de iNOS.
4. Estudiar la participación de la vía de señalización iNOS/NO/sGC/cGMP/PKG sobre la capacidad migratoria inducida por LPS en las células MDA-MB-231.
5. Investigar si la estimulación con LPS influye sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231.
6. Determinar si la vía TLR-4/NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP regula la proliferación en las células MDA-MB-231.
7. Evaluar si la activación de TLR-4 por LPS incide sobre la quimiorresistencia a Doxorrubicina de las células MDA-MB-231.
8. Investigar de manera preliminar si el LPS estimula la capacidad migratoria en células de bajo potencial metastásico.

METODOLOGÍA

I. MODELO CELULAR MCF-7

Las células MCF-7, son la línea celular de CaM más comúnmente utilizada en el mundo, fue establecida en 1973 por la Fundación de Cáncer en Michigan, se trata de células epiteliales derivadas de una efusión pleural de una paciente caucásica de 69 años con cáncer de mama metastásico (Levenson & Jordan, 1997). Su extenso uso se justifica por su alta sensibilidad a hormonas y la expresión del receptor a estrógenos alfa ($ER-\alpha$). El perfil molecular de este tipo celular lo clasifica en el tipo Luminal A, con un perfil ER^+ , $PR^{+/-}$, $HER-2^-$, además de una baja expresión del marcador de proliferación Ki67 (Holliday & Speirs, 2011). Su morfología en cultivo 2D (Fig.5) es típicamente epitelial en forma cohesiva poligonal (Comşa et al., 2015).

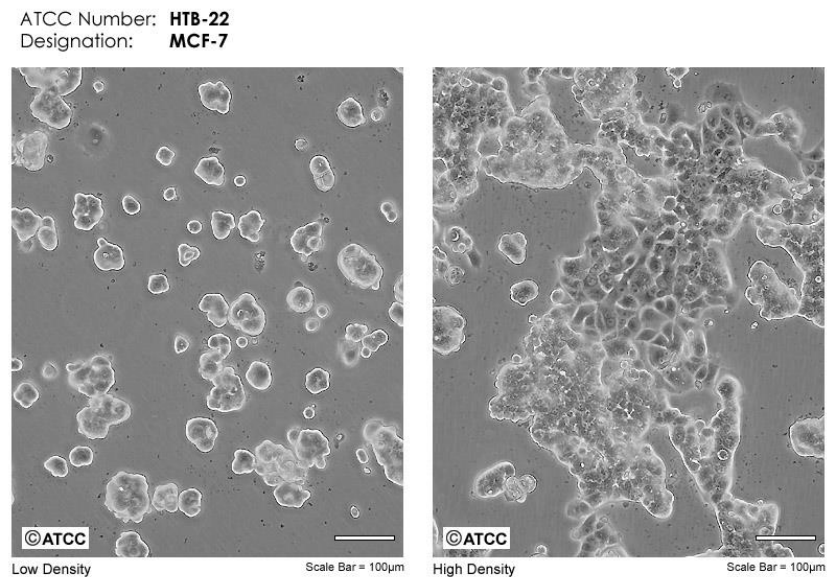


Figura 5. Línea celular MCF-7, morfología en cultivo. Microfotografías de las células en cultivo (barra de calibración corresponde a 100µm) con morfología poligonal, presentan una confluencia diferencial, baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha). Tiempo de duplicación 35 horas en la fase exponencial. Imagen tomada de ATCC.

II. MODELO CELULAR MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231, proveniente de adenocarcinoma de mama grado III (efusión pleural) de una paciente caucásica de 51 años de edad, tienen una morfología fusiforme (Fig. 6) muestran un fenotipo invasivo (poco diferenciado), y con base en su perfil molecular se ha clasificado como de tipo de baja Claudina, antes basal B. Esta línea celular es ampliamente utilizada para estudios *in vitro* de citotoxicidad, migración, invasión y proliferación, así como en estudios *in vivo* donde son trasplantadas en otros organismos con el fin de analizar su potencial metastásico. Se ha descrito un tiempo de duplicación de la población de 38 horas, considerando un inoculo inicial de 5×10^4 células por cm^2 (ATCC, 2012).

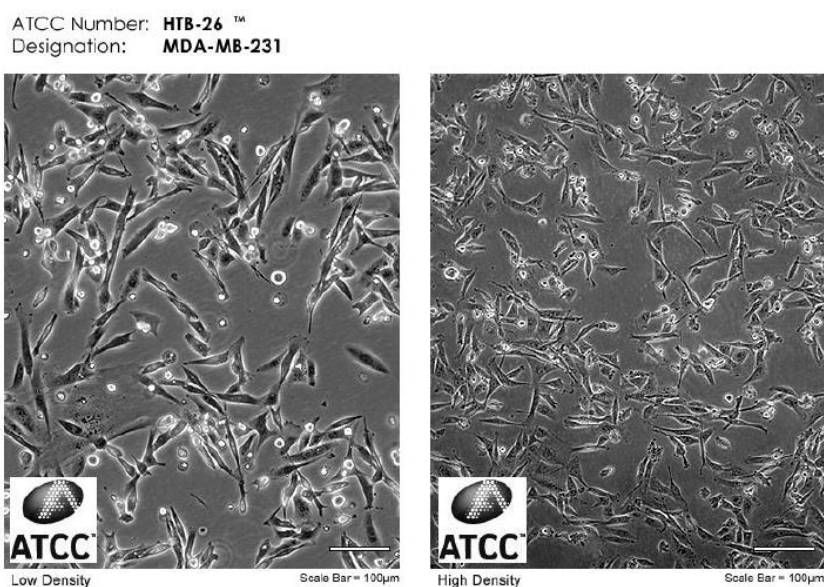


Figura 6. Morfología en cultivo de la línea celular MDA-MB-231. Microfotografías de las células en cultivo (barra de calibración corresponde a 100µm) con morfología fusiforme, presentan una confluencia diferencial, baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha). Los cultivos confluentes contienen $5-6 \times 10^6$ células en una superficie de 80 cm^2 . Imagen tomada de ATCC.

Se utiliza como modelo para el estudio de Cáncer de Mama Triple Negativo (TNBC), ya que sus características son consistentes con esta neoplasia (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación Cáncer de mama Triple negativo y MDA-MB-231.

CARACTERÍSTICAS	CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO [#]	LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 ^{**}
Receptor a estrógeno	Negativo	Negativo
Sobreexpresión de HER-2	Negativo	Negativo
EGFR	Positivo	Positivo
Vimentina	Positivo	Positivo
Mutación de p53	Positivo	Positivo

[#] Anders & Carey, 2009.

^{*} Chavez et al., 2010.

[¥]Huang et al., 2013.

III. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES Y REACTIVOS

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection), los cultivos madre se mantuvieron en matraces planos de poliestireno de 25 cm² de superficie, y se alimentaron con medio de cultivo Advanced-DMEM, suplementados con 3% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico y antimicótico. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C y una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada 48 h y cuando alcanzaron una confluencia del 95%, las células fueron expuestas 5 min a 2.0 ml de una solución salina de Tripsina- EDTA al 0.25% para desprenderlas. La suspensión celular obtenida se utilizó para regenerar el cultivo madre en un matraz plano nuevo, así como para sembrar en placas de multipozos para los diferentes ensayos de RT-PCR, citotoxicidad, migración y proliferación celular. Se mantuvieron las células en diferentes condiciones, condición control y tratamiento con LPS a diferentes concentraciones 1, 5, 10, 20 o 40 µg/ml, por 24, 48 o 72 h, así como con los inhibidores de la vía de señalización de interés: C34 (10µM), Na₂SeO₃ (4µM), 1400W (50µM), ODQ (10µM), RP-8-Br-PET cGMP(50µM), además de 8-Br-cGMP (50µM), análogo de guanósín monofosfato cíclico; en presencia o ausencia de LPS a diferentes concentraciones durante el tiempo establecido para cada tipo de ensayo.

IV. DETERMINACIÓN INDIRECTA DE ÓXIDO NÍTRICO (CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS POR LA REACCIÓN DE GRIESS)

Las células MDA-MB-231, fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron el 60% de confluencia se inició el tratamiento con LPS a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) y por diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Una vez iniciado el tratamiento con LPS ya no se recambió el medio de cultivo, al cumplirse las primeras 24 h de tratamiento, se tomaron 250 μl del medio de cultivo de cada condición experimental y se almacenó a -20°C , esta misma operación se repitió a las 48 y 72 h de tratamiento. Se determinó la concentración de nitritos con el reactivo de Griess, el método está basado en la reacción química de la sulfanilamida y el N-1-naftiletildiamina diclorohidrato (NED) bajo condiciones ácidas. A las muestras problema y soluciones estándar se les adicionó un volumen similar de sulfanilamida, se incubó por 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad, posteriormente se agregó un volumen similar de la solución NED, se volvieron a incubar las muestras por 10 min en la oscuridad. Una vez concluida la incubación, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm.

V. ENSAYO DE RT-PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA - REACCIÓN EN CADENA LA POLIMERASA)

A. Extracción de RNA total

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos y mantenidas en condiciones de cultivo estándar, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dió inicio al tratamiento con LPS y/o selenito de sodio (Na_2SeO_3), durante 24, 48 o 72 h. Al terminar el tratamiento, se procedió a realizar la extracción de ARN total empleando el kit comercial FavorPrep™, Tissue total RNA Mini, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez concluida la extracción del ARN total se determinó su concentración (absorbancia a 260 nm de longitud de onda) y calidad (cociente entre la absorbancia a 260nm y 280nm). Para considerar una muestra de ARN total de calidad, el valor del cociente estuvo entre 1.5 y 2.0.

B. Síntesis de cDNA (RT)

A partir del RNA total extraído y purificado se procedió a la síntesis del cDNA (Transcripción reversa), la cual se llevó a cabo empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Posteriormente los tubos de reacción se colocaron en un termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf®) y fueron sometidos al siguiente protocolo de trabajo: 10 min a 25°C, 2 h a 37°C, 10 min a 85° y finalmente a 4°C.

C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se diseñaron juegos de oligonucleótidos específicos para cada gene de interés, empleando el software en línea de la empresa DNA Technology (Tabla 3). A partir del ADN complementario obtenido en la transcripción reversa se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la PCR punto final.

Oligonucleotidos	Dirección	Secuencia	Tamaño del Amplificado (pb)
MyD88	Forward	GGAGGAATCTGTGCTCTACTTAC	557
	Reverse	GAGGTGGACCCATTAGGAAATAA	
Ki-67	Forward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA	415
	Reverse	CTGCACTGGAGTTCCATAAA	
NFκB1	Forward	TGTAAGTCTGGACCCAAGGAC	290
	Reverse	AAAGCTGTAAACATGAGCCGCACC	
eNOS	Forward	GGTCCTGTGTATGGATGAGTATG	265
	Reverse	GTCTGTGTTACTGGACTCCTTC	
iNOS	Forward	GGAAGCGGTAACAAAGGAGATAG	460
	Reverse	CACAAGGTCAGGTGGGATTT	
nNOS	Forward	CCAGAACTCACACAAGGTCTATC	490
	Reverse	CCCATTTCATTCTCGTACTC	
TLR-4	Forward	TGGATACGTTTCCTTATAAG	507
	Reverse	GAAATGGAGGCACCCCTTC	
sGCα	Forward	AGTTGGGAGGGAGGAGAATAA	635
	Reverse	GGCTGGAAATATCAGGGAGAAG	

sGC β	Forward	ATCACGCATCAGCCCATATAC	515
	Reverse	GTAGCCTGTCAGTGAGGATTTC	
Vimentina	Forward	AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT	201
	Reverse	CTTCCATTTCACGCATCTGGCGTT	

D. Separación electroforética de los productos de PCR

Los productos de PCR amplificados fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2%. La electroforesis se llevó a cabo a 65 V por 80 min. La imagen del gel obtenida fue digitalizada (Axygen GD-1000, Corning) y se realizó el análisis densitométrico correspondiente, empleando el software Image J que fue proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América.

VI. ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN CÁMARAS TRANSWELL.

Para el ensayo de migración se utilizaron Cámaras Transwell® con membranas de policarbonato y poros de 8 μ m de diámetro. Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos bajo condiciones de cultivo estándar, una vez que las células alcanzaron la confluencia requerida se inició el tratamiento con LPS, inhibidores y análogos a diferentes concentraciones por 48 h. Una vez terminado el periodo de incubación se obtuvo de cada condición experimental una suspensión celular mantenida con medio de cultivo libre de suero. En la parte superior de la membrana de policarbonato del inserto de la cámara transwell se agregaron 250 ml de la suspensión celular a una concentración final de 3×10^4 o 5×10^4 células/ml (MDA-MB-231 o MCF-7 respectivamente); posteriormente se adicionaron 750 μ l de medio de cultivo completo en la parte inferior de la cámara transwell, en ambos compartimentos de la Cámara se suplementó al medio con el tratamiento correspondiente, para mantener la condición experimental. Las células se incubarán a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO₂ por 12 h para MDA-MB-231 y 24 h para MCF-7. Al finalizar el tiempo, las células que permanecieron sobre la membrana del inserto fueron retiradas con un hisopo de algodón. Las células que migraron quedaron adheridas en la membrana interna de la membrana del inserto, las cuales fueron fijadas con una solución metanol/acetona (dilución 1:1) durante 20 min y teñidas con cristal violeta (0.05%) por 20 min. 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, estas se analizaron por medio del programa Image J.

VII. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

A. Conteo celular

Las células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron un 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con LPS, inhibidores y análogos a diferentes concentraciones por 48, 72 o 96 h. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se realizó el recuento celular con un citómetro de flujo portátil (Scepter 2.0).

B. Ensayo de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron un 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con LPS, inhibidores y análogos a diferentes concentraciones por 72 h, posteriormente fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo y resembradas en placas de 96 pozos a una concentración final de 6×10^4 células manteniendo las condiciones de tratamiento por 24 h. Para evaluar la capacidad proliferativa de las células se utilizó el kit Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimétrico, Roche Applied Science) siguiendo las indicaciones del proveedor. Después de la incubación, las células fueron adicionalmente tratadas con solución de marcaje de BrdU por 6 h. Después de pasar por un proceso de fijación y desnaturalización de DNA por 30 min, se agregó una solución de Anti-BrdU-POD y se incubó por 90 min. Los conjugados de anticuerpos fueron retirados en tres ciclos de lavado. Los complejos inmunes fueron detectados por medio de la incubación por 15 min con el sustrato TMB, y cuantificado por la determinación por espectrofotometría de la absorbancia a 405 y 490 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado con 6 pozos por grupo experimental y se obtuvieron los promedios de tres series experimentales.

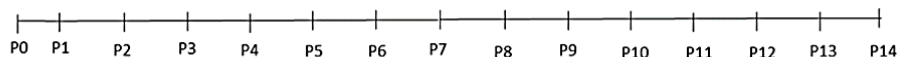
VIII. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se realizó el ensayo de MTT para evaluar la quimiorresistencia. Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron un 80% de confluencia se dio inicio al tratamiento con LPS, inhibidores y análogos a diferentes concentraciones por 48 h, posteriormente fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo y resembradas en placas de 96 pozos a una concentración de 3×10^4 células/pozo; pasadas 24 h se inició el tratamiento con doxorubicina a diferentes concentraciones (1, 5, 10 μ M) y se incubó por otras 48 h, al final del tratamiento se agregaron 100 μ L de reactivo de MTT y se incubó por 4 h, se adicionó una solución solubilizadora para posteriormente leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

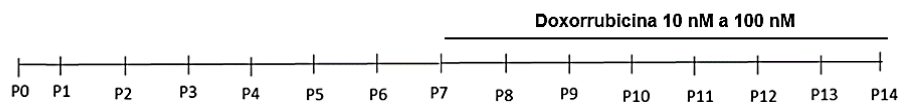
IX. INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A DOXORRUBICINA EN MDA-MB-231

Para la inducción del fenotipo de resistencia (DOX-RES) en MDA-MB-231, las células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (Advanced-DMEM 3% SFB) y fueron expuestas a concentraciones crecientes de doxorubicina durante pasajes consecutivos (10nM a 100 nM), como fue descrito previamente (Fairchild et al, 1987; Marinello et al., 2019). Al inicio del ensayo 5×10^5 células fueron sembradas en placas de cultivo de 35 mm², después de 24 h las células fueron tripsinizadas y resembradas, obteniendo la primera muestra sin doxorubicina, este fue designado como pasaje cero (P0). Se dividió la suspensión celular obtenida en cuatro condiciones, el diseño experimental es ilustrado en la figura 7. Las células fueron consideradas quimiorresistentes cuando la exposición a concentraciones crecientes de doxorubicina no causó muerte celular (evaluada por el número de células en comparación con el grupo control en cada subcultivo). En este estudio las células presentaron quimiorresistencia después de siete pasajes consecutivos en presencia de concentraciones crecientes de doxorubicina. Todos los grupos experimentales se mantuvieron en las diferentes condiciones durante catorce pasajes. Posteriormente se evaluó la supervivencia celular en presencia de Doxorubicina a 1, 5 y 10 μ M por 48 horas, por medio del ensayo de MTT.

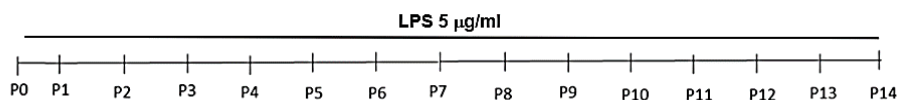
A. Grupo control (cambio de medio cada 24 horas)



B. Grupo DOX-RES



C. Grupo LPS



D. Grupo LPS-DOX

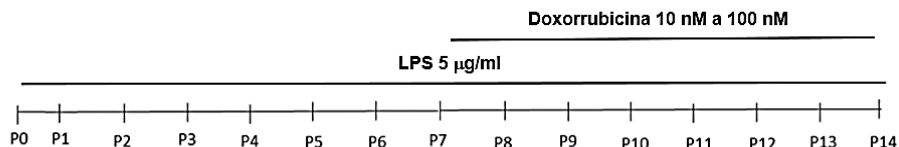


Figura 7. Diseño experimental de inducción de resistencia a Doxorrubicina y LPS. Células control que se mantuvieron 14 pasajes en condiciones de cultivo estándar (A). Células tratadas con concentraciones crecientes de doxorrubicina, 10 nM a 100 nM (B). Células tratadas con 5 mg/ml de LPS por 14 pasajes (C). Células pretratadas 7 pasajes con LPS 5mg/ml y después co-tratadas con concentraciones crecientes de doxorrubicina, 10 a 100 Nm. El tratamiento con LPS fue mantenido durante todo el proceso de inducción de quimiorresistencia (D).

X. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 35 mm² después de 24 h de incubación se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar o en presencia de LPS durante 72 h. Después de finalizado el tratamiento fueron fijadas con paraformaldehído al 3.7% en solución amortiguadora PHEM (PIPES, HEPES, EGTA, Sulfato de magnesio, pH 7.4) por 10 min, se lavó con PBS y permeabilizó con NP-40 al 0.25% durante 30 min. Se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena incubando las células con peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 30 min. Posteriormente las células fueron incubadas con solución bloqueadora (gelatina 0.5% y FBS 1.5%) durante 2 h en agitación constante para reducir la unión inespecífica del anticuerpo primario. El anticuerpo primario para detectar iNOS se trabajó a una dilución 1:250 y se incubó toda la noche a 4°C. Se recuperó el anticuerpo primario y realizaron lavados con PBS. Finalmente, las células fueron expuestas a un sustrato cromógeno específico para la enzima HRP, AEC substrate kit (Sigma-Aldrich).

Las células fueron visualizadas y se tomaron microfotografías de 5 campos aleatorios con el objetivo 40x en un microscopio de campo claro y una cámara modelo c10 plus Jenoptick empleando el programa pro-2.1.

XI. INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOT)

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron el 60% de confluencia se inició el tratamiento con LPS y/o Na_2SeO_3 . Al finalizar el tratamiento, las células fueron lisadas y el homogenado celular obtenido fue centrifugado a 13,000 rpm por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de proteínas con el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Para la separación electroforética de las proteínas se empleó PAGE-SDS al 8% y se corrió a 80 mV durante 1 hora y por 2 h a 120mV; posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF, bajo las siguientes condiciones: 20mA, a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la membrana fue bloqueada con una solución de leche al 5% con TBST durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios que reconocen de manera específica a iNOS y GAPDH, se trabajaron a una dilución 1:250 y 1:500 respectivamente, se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiraron los anticuerpos primarios, y solo para GAPDH se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución de 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con TBST y fue revelada con TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina).

XII. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CGMP

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron el 60% de confluencia se inició el tratamiento con LPS y/o C34, Na_2SeO_3 , 1400W diferentes concentraciones y tiempos. Al finalizar el tratamiento, las células fueron lisadas y el homogenado celular obtenido fue centrifugado a 13,000 rpm por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y a partir de este se realizó la cuantificación de cGMP empleando el kit comercial, Cyclic GMP competitive ELISA (Invitrogen). Se transfirieron 100 µl de muestra o estándar a placas de 96 pozos, tapizada con IgG de conejo, y se les agregó una solución de 0.1M de HCL. El ensayo se basa en la competición entre el cGMP-fosfatasa alcalina con estándares y muestras, por concentraciones limitantes de

anticuerpo monoclonal dirigido contra el complejo cGMP - IgG adsorbidos a la placa. La concentración de cGMP fue determinada por una curva estándar con relación inversa entre la absorbancia medida a 405 nm y la cantidad del analito en la muestra.

XIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y gráficos se realizarán con el programa SigmaPlot versión 11.0. Se utilizará la prueba t de Student para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa p deberá ser menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

I. LPS INCREMENTA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

Múltiples evidencias experimentales, clínicas y epidemiológicas han correlacionado positivamente la presencia y la activación de TLR-4 con la progresión de cáncer de mama. Por lo que se decidió evaluar de manera inicial, si la presencia de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 48 h incide sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 mediante ensayo de cierre de herida. La Figura 8 A muestra que la presencia de LPS reduce el área de herida, y al cuantificar dicha área, se observa de manera significativa un incremento del 50% en el cierre de herida con respecto a la condición control (Figura 8 B), demostrando que LPS favorece la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.

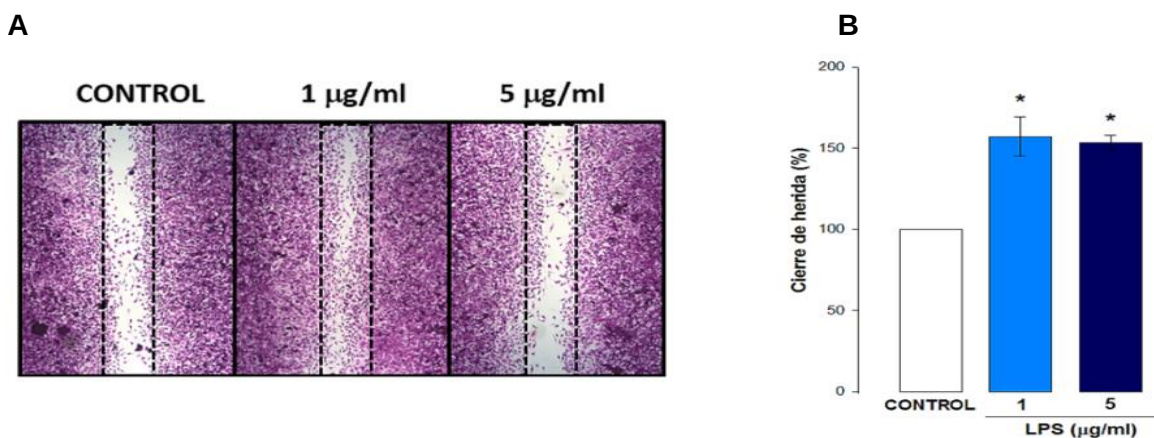


Figura 8. LPS promueve la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con LPS por 48 h a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. La migración fue evaluada por ensayo de cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μm .

Inicialmente se consideraron dos concentraciones de LPS para evaluar su efecto sobre la capacidad migratoria, por lo que se decidió evaluar si la migración celular depende de concentraciones mayores de LPS, para lo que realizamos una curva dosis-respuesta a 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$, manteniendo el estímulo por 48 h. En esta ocasión utilizamos dos ensayos de migración; uno cualitativo, cierre de herida (Fig. 9 A y B) y otro cuantitativo, ensayo en cámaras transwell (Fig. 9 C y D). El ensayo de cierre de herida muestra un aumento estadísticamente significativo del 50% con respecto a la condición control, a partir de la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y que se mantiene hasta los 10 $\mu\text{g/ml}$. Por su parte, el ensayo

en cámara transwell a las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ se observa un incremento del 65%, 78% y 63% respectivamente en el número de células que migran con respecto a la condición control. No se observaron cambios significativos sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 a 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$.

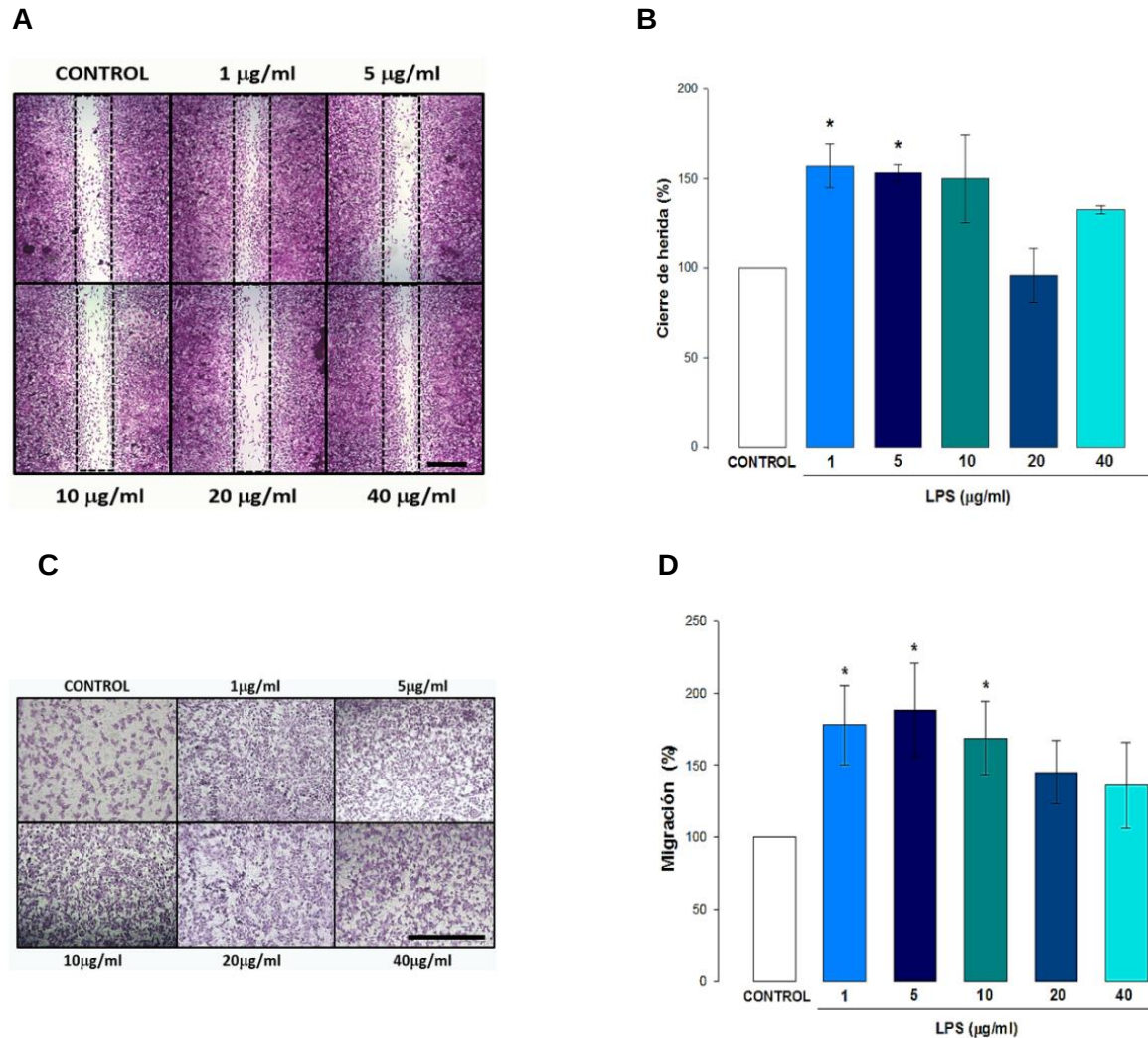


Figura 9. LPS aumenta la capacidad migratoria de manera dependiente de la concentración. Curva dosis efecto a 48 h, células tratadas con concentraciones crecientes de LPS (1 a 40 $\mu\text{g/ml}$), se observa aumento de la capacidad migratoria de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (**A**) y resultados estadísticos (**B**); y cámaras Transwell, imagen representativa (**C**) y resultados estadísticos (**D**). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μm .

II. EL EFECTO INDUCIDO POR LPS SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN DE TLR-4.

Se ha sugerido que el aumento en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 inducido por LPS se debe a la activación de TLR-4. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis se realizaron ensayos de cierre de herida (Fig. 10 A y B) y en cámara transwell (Fig. 10 C y D). Se utilizaron 10 μ M de C34, antagonista específico de TLR-4, en presencia y ausencia de 5 μ g/ml de LPS por 48 h. Los resultados presentados en la Figura 10 muestran que el tratamiento con este inhibidor farmacológico previene de manera efectiva el efecto estimulador que ejerce LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, dejando en claro la participación de TLR-4 en el efecto que ejerce LPS.

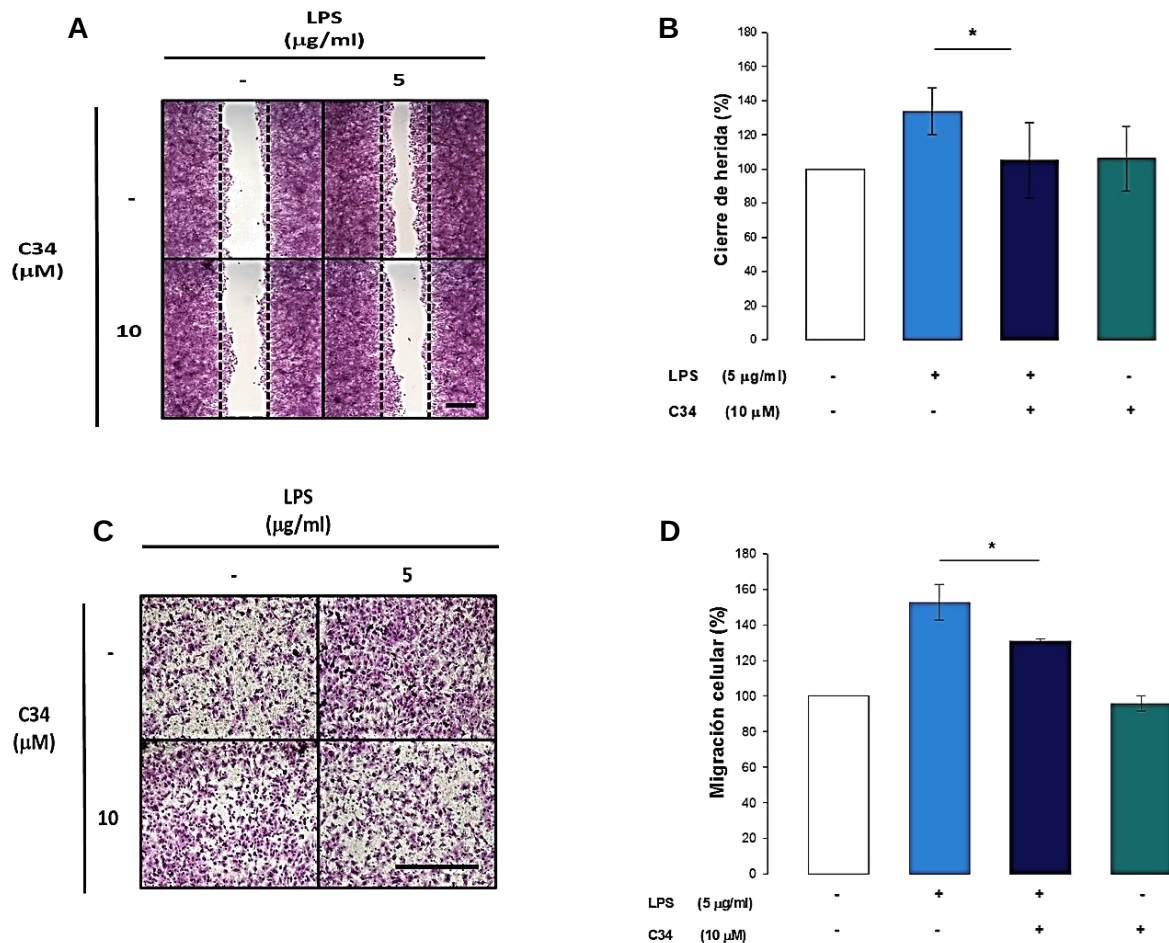


Figura 10. El bloqueo de TLR-4 previene el efecto estimulador sobre la capacidad migratoria dependiente de LPS. El tratamiento con C34 (10 μ M) reduce la migración inducida por el pretratamiento con 5 μ g/ml de LPS. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μ m.

III. PRESENCIA DE LOS ELEMENTOS MOLECULARES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INICIADA POR TLR-4.

La vía de señalización estimulada por la activación de TLR-4 puede ser dependiente o independiente de MyD88, las cuales culminan en la translocación al núcleo del NF- κ B, factor de transcripción que regula en macrófagos, la expresión de mediadores proinflamatorios asociados a la expresión de iNOS. Se evaluó por RT-PCR de punto final los niveles de expresión del ARNm que codifica para los elementos moleculares que participan en la vía de señalización activada por TLR-4 y que fue propuesta en el presente trabajo: TLR-4, MyD88, NF- κ B, eNOS, iNOS, nNOS, sGC β , sGC α . La Figura 11 A muestra que las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifica TLR-4, MyD88, NF- κ B, eNOS, iNOS, así como las subunidades α y β de la guanilato ciclasa soluble. Con respecto a las dos isoformas de la sintasa de óxido nítrico, las células MDA-MB 231 expresan de manera preferencial la isoforma iNOS. También evaluamos por inmunocitoquímica, la expresión a nivel de proteína de la isoforma iNOS, observando que las células MDA-MB-231 presentan inmunorreactividad al anticuerpo que reconoce de manera específica esta enzima (Fig. 11 B).

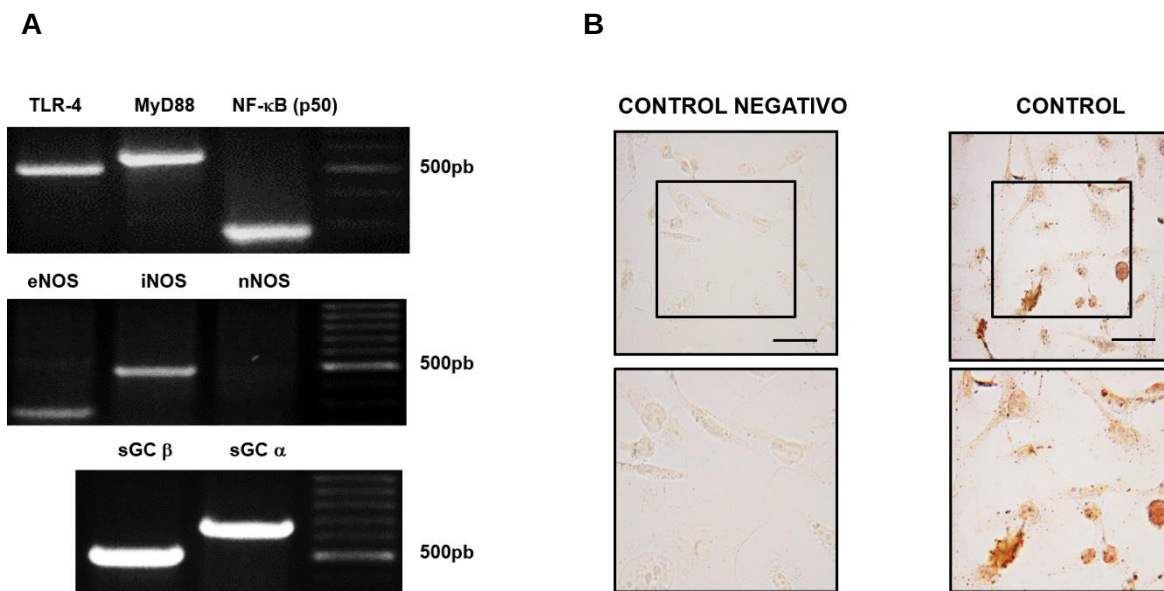


Figura 11. Los elementos de la vía de señalización TLR-4/NF- κ B/iNOS/NO/sGC/cGMP/PKG en las células MDA-MB-231. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en la expresión génica de: TLR-4, MyD88, NF- κ B, eNOS, iNOS, nNOS, sGC β , sGC α (A). Inmunocitoquímica que muestra la presencia de iNOS, a la izquierda se muestra el control negativo, donde se omitió el anticuerpo primario y a la derecha la expresión basal en la línea celular MDA-MB-231 (B). Barra: 500 μ m.

IV. LPS REGULA LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA iNOS.

Una vez que se determinó que las células MDA-MB-231 expresan la isoforma iNOS, elemento molecular de la vía de señalización iniciada por TLR-4, se evaluó si la activación de dicho receptor por LPS influye sobre el nivel de expresión y función de la iNOS. Las células MDA-MB-231 se mantuvieron en presencia de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, y se determinó por RT-PCR el ARNm que codifica para iNOS, por Western-blot la expresión de la proteína y por la reacción de Griess los niveles totales de nitritos para evaluar su funcionalidad. La exposición a 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 h, induce un aumento significativo en la expresión del ARNm que codifica para iNOS del 29 y 43% respectivamente con respecto a la condición control (Fig. 12 A). Mientras que a nivel de proteína se observa un incremento del 31% a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y de 57% a 5 $\mu\text{g/ml}$ después de 72 h de tratamiento (Fig. 12 C). Una manera indirecta de evaluar la producción de NO por parte de la iNOS, es determinando los niveles de nitritos, la Figura 12 B muestra que la activación de TLR-4 por LPS induce un incremento significativo en la producción de nitritos, 38% a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS y de 78% para 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS.

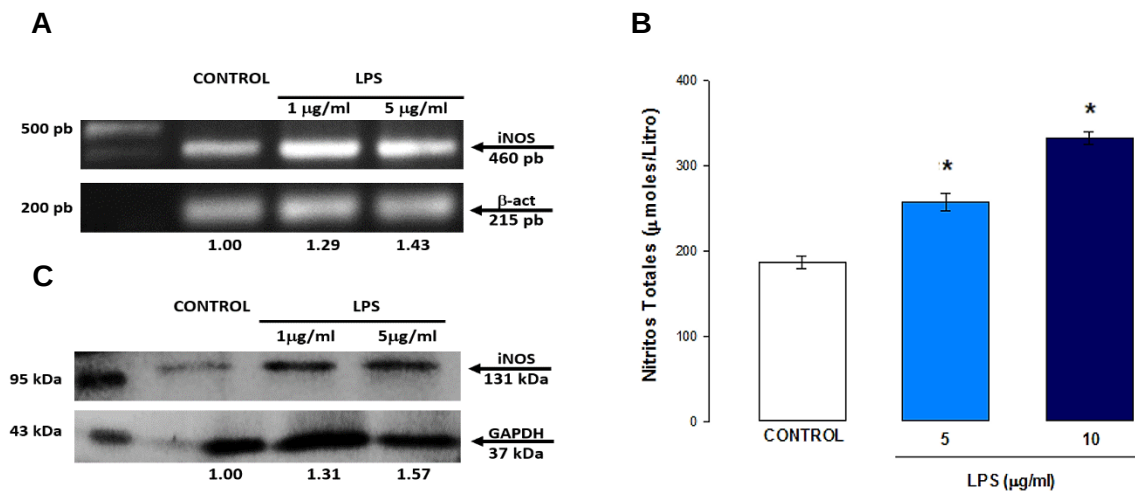


Figura 12. La activación de TLR-4 estimula la expresión y actividad de iNOS. Las células fueron tratadas con LPS 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, se observa un incremento en la expresión de iNOS. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en los niveles de ARNm que codifica para iNOS a las 24 h (A). La expresión a nivel de proteína se evaluó a través de Western-blot a las 72 h (B). La producción de NO se determinó a través del nivel de nitritos en el sobrenadante a las 72 h, utilizando el reactivo de Griess (C). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$.

La siguiente pregunta fue determinar si el efecto de LPS sobre la expresión de iNOS era dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento, para lo cual se realizó una curva dosis-efecto y un curso temporal. Para la curva dosis-efecto se evaluaron 5 concentraciones de LPS (1, 5 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) y se trataron a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) para determinar el curso temporal. La Figura 13 A muestra que la presencia de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 y 48 h, induce un aumento estadísticamente significativo en los niveles del ARNm que codifica para iNOS, mientras que, si las células son tratadas por 72 h, se requieren concentraciones mayores de LPS (10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$) para inducir un cambio significativo en los niveles de expresión de iNOS. A nivel de proteína, LPS induce la expresión de iNOS de manera dosis-dependiente, observando un incremento desde la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, llegando a ser significativo a 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Fig. 13 B). Adicionalmente, se evaluó la producción de nitritos a las 24, 48 y 72 h en presencia de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. La Figura 13 C muestra que en las primeras 24 h de tratamiento hay un aumento diferencial significativo en los niveles de nitritos para las dos concentraciones de LPS probadas, y que se va incrementando de manera dependiente a la duración del tratamiento.

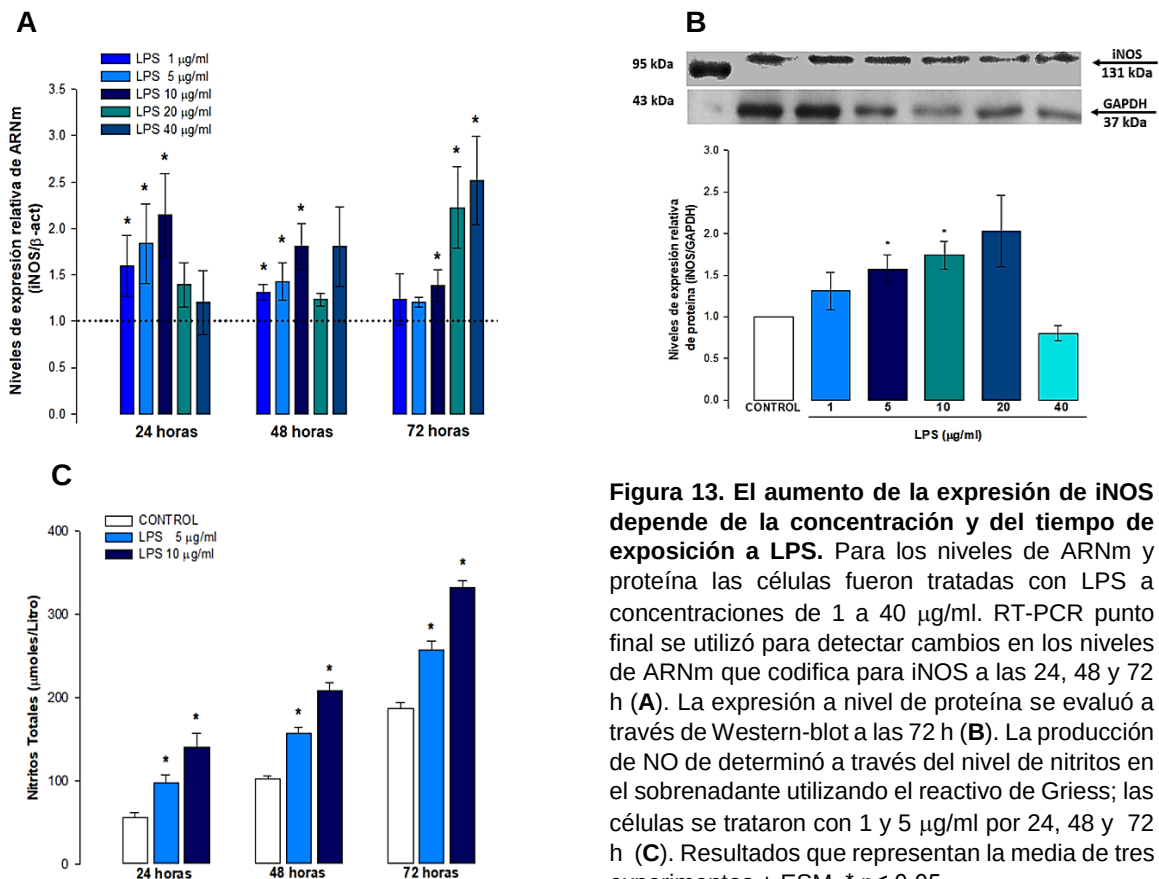


Figura 13. El aumento de la expresión de iNOS depende de la concentración y del tiempo de exposición a LPS. Para los niveles de ARNm y proteína las células fueron tratadas con LPS a concentraciones de 1 a 40 $\mu\text{g/ml}$. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en los niveles de ARNm que codifica para iNOS a las 24, 48 y 72 h (A). La expresión a nivel de proteína se evaluó a través de Western-blot a las 72 h (B). La producción de NO se determinó a través del nivel de nitritos en el sobrenadante utilizando el reactivo de Griess; las células se trataron con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ por 24, 48 y 72 h (C). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$.

V. NF- κ B REGULA LA EXPRESIÓN DE iNOS

La activación de TLR-4 por LPS en los macrófagos, favorece por un lado, la producción de NO, y por otro lado, estimula su capacidad migratoria. Diversas evidencias experimentales muestran que la translocación al núcleo del NF- κ B inducida por la activación de TLR-4, estimula la expresión funcional de iNOS con el consiguiente aumento en los niveles de NO. Por lo que se decidió investigar si el aumento en la expresión funcional de iNOS observado en las células MDA-MB-231 en presencia de LPS (Fig. 12 y 13) requiere de la participación del NF- κ B, tal y como ocurre en las células del sistema inmune. Para resolver esta interrogante, se evaluó la expresión funcional de iNOS en presencia de 4 μ M de selenito de sodio (Na_2SeO_3), compuesto que estabiliza el complejo I κ B/NF- κ B impidiendo la translocación al núcleo de NF- κ B. Es importante mencionar que la concentración empleada de selenito de sodio no tiene efectos citotóxicos. Los resultados obtenidos muestran que la presencia del selenito de sodio previene el efecto estimulador de LPS (5 y 10 μ g/ml) sobre la expresión del ARNm que codifica para iNOS a las 24 h (Fig. 14 A), la síntesis de la proteína a las 72 h (Fig. 14 B) y la producción de nitritos a diferentes tiempos evaluados (24, 48 y 72 h) (Fig. 14 C).

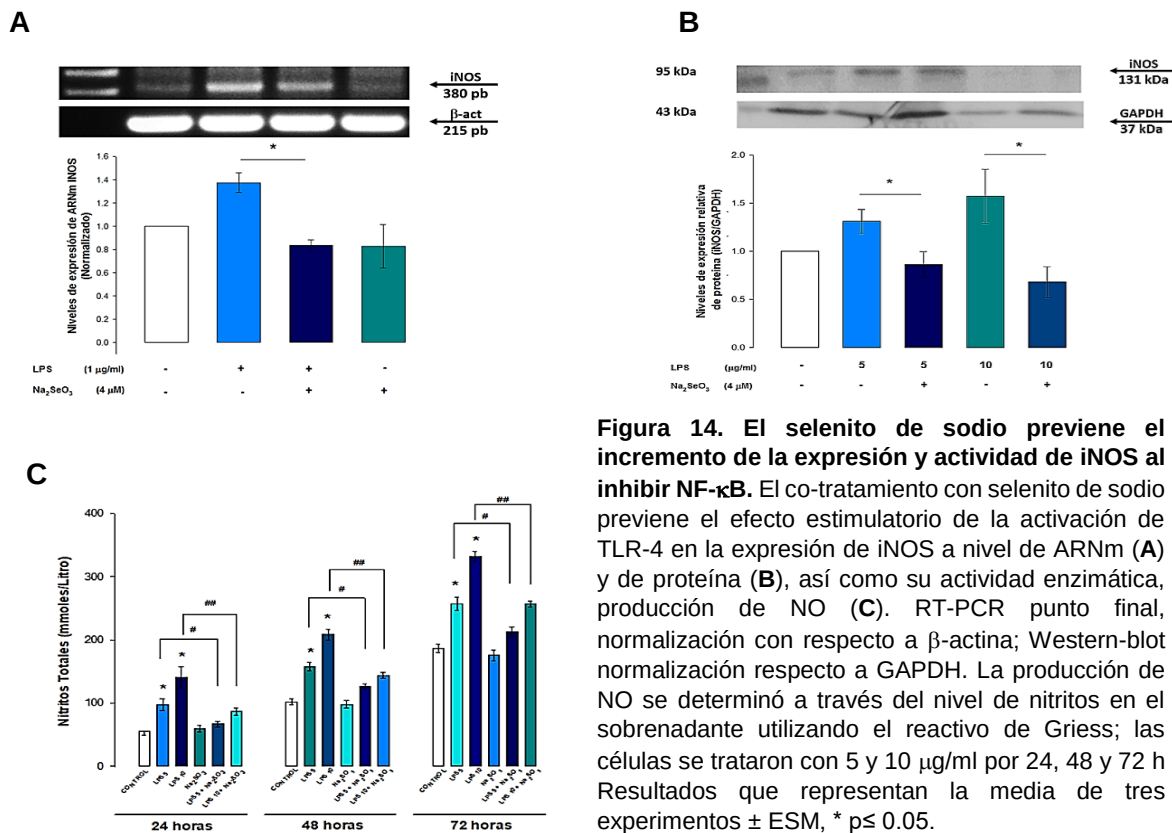


Figura 14. El selenito de sodio previene el incremento de la expresión y actividad de iNOS al inhibir NF- κ B. El co-tratamiento con selenito de sodio previene el efecto estimulador de la activación de TLR-4 en la expresión de iNOS a nivel de ARNm (A) y de proteína (B), así como su actividad enzimática, producción de NO (C). RT-PCR punto final, normalización con respecto a β -actina; Western-blot normalización respecto a GAPDH. La producción de NO se determinó a través del nivel de nitritos en el sobrenadante utilizando el reactivo de Griess; las células se trataron con 5 y 10 μ g/ml por 24, 48 y 72 h. Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$.

De manera complementaria evaluamos si el bloqueo de la translocación al núcleo del NF- κ B incide sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Se realizaron ensayos de cierre de herida (Fig. 15 A y B) y en cámara transwell (Figura 15 C y D) en presencia de selenito de sodio y LPS. Se observa claramente que el selenito de sodio reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 aún en presencia de 5 μ g/ml de LPS por 48 h. Estos resultados muestran lo siguiente: a) la expresión de iNOS inducida por LPS requiere de la activación del NF- κ B, y b) la expresión funcional de iNOS es capaz de exacerbar la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.

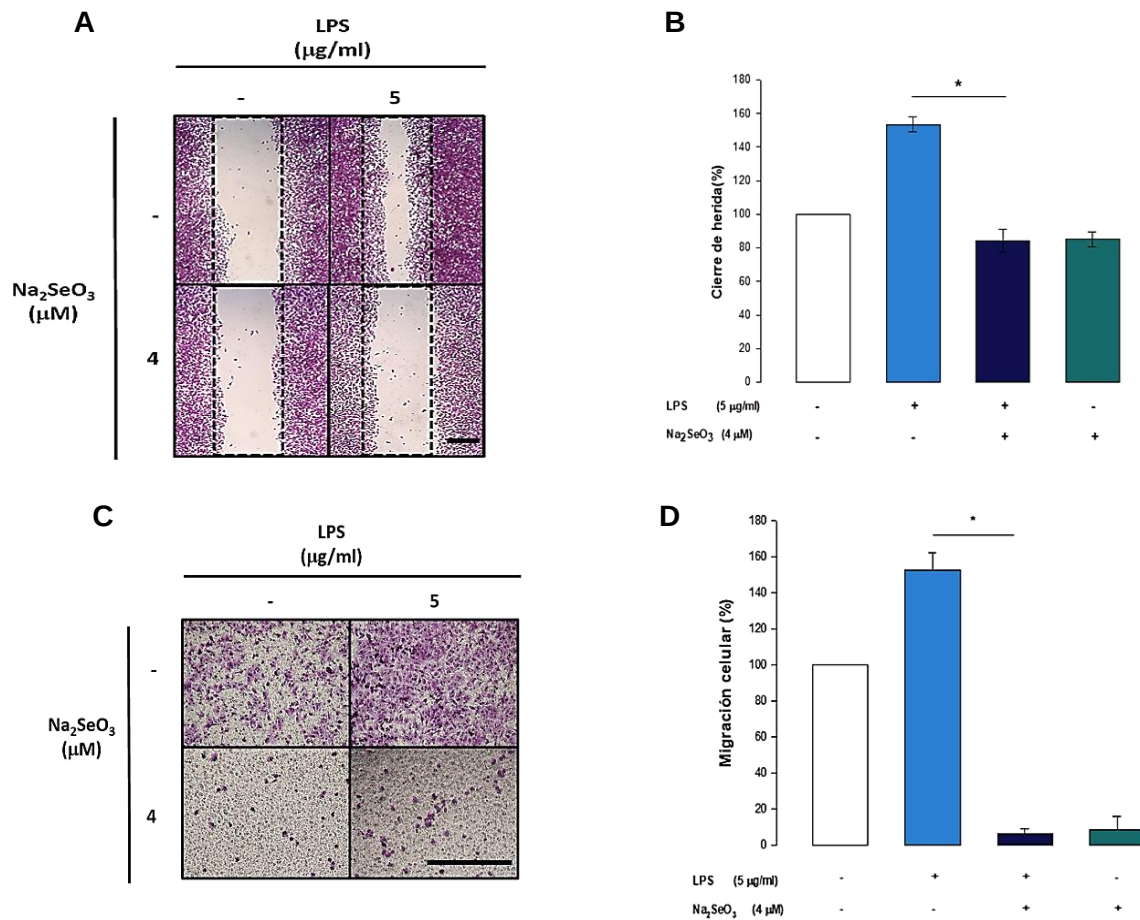


Figura 15. La inhibición de NF- κ B previene el efecto estimulador sobre la capacidad migratoria dependiente de la activación de TLR-4 El tratamiento con Na_2SeO_3 (4 μ M) reduce la migración inducida por el pretratamiento con 5 μ g/ml de LPS. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μ m.

VI. iNOS EXACERBA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231

Los datos experimentales presentados anteriormente, nos sugieren la participación de iNOS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, por lo que, para reforzar dicha propuesta, se investigó la participación directa de iNOS en este modelo celular. Se realizaron ensayos de cierre de herida (Fig. 16 A y B) y en cámara transwell (Figura 16 C y D), se utilizó 50 μ M de 1400W, inhibidor específico para iNOS, en presencia y ausencia de 5 μ g/ml de LPS. La Figura 15 muestra que efectivamente, al inhibir la actividad de la iNOS con 1400W se previene por completo el efecto estimulador que ejerce LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, por lo que podemos proponer que el efecto estimulador de LPS requiere de la expresión funcional de iNOS y probablemente esté involucrada la cascada de señalización activada por NO, como es la NO/cGMP/PKG, lo cual resultaría interesante investigar.

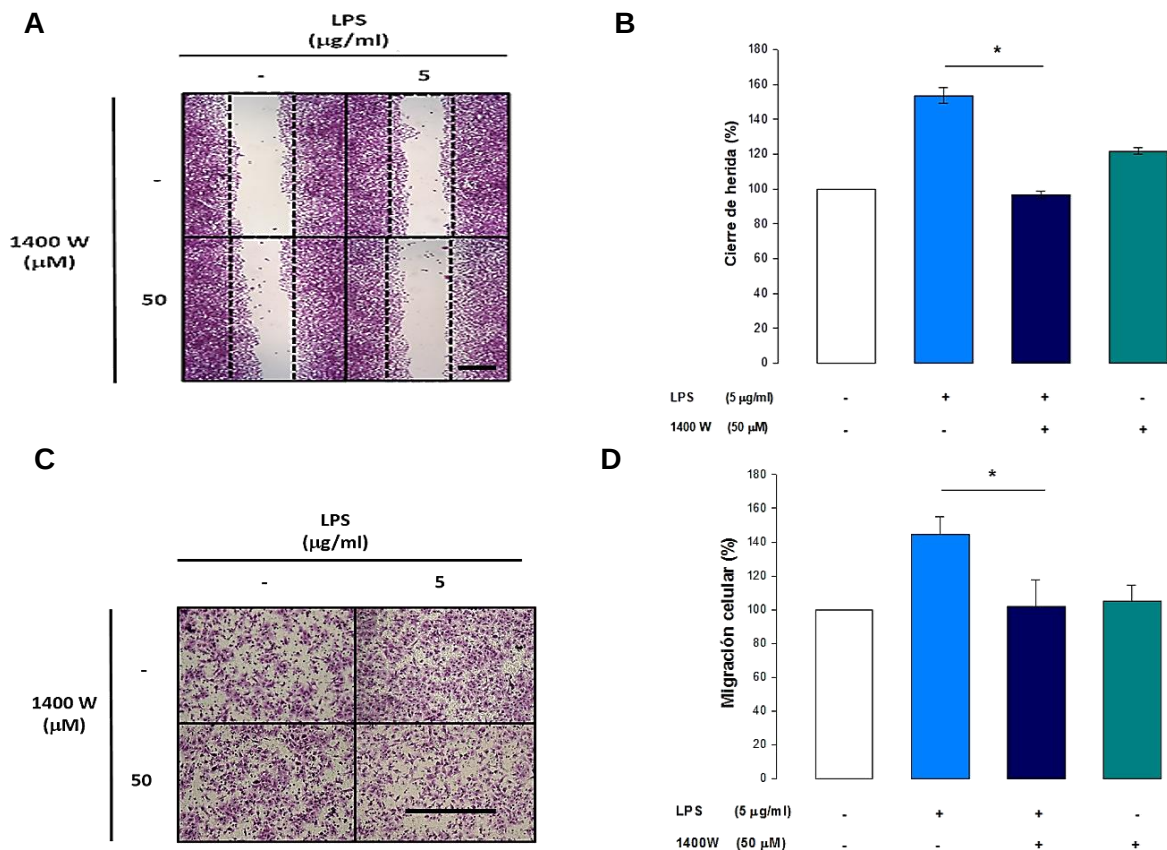


Figura 16. El bloqueo de la actividad de iNOS evita el aumento de la capacidad migratoria estimulada por LPS. Las células se trataron con 1400W (50 μ M) en presencia de 5 μ g/ml de LPS, lo que reduce la migración inducida por la activación de TLR-4. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μ m.

VII. LA VÍA TLR-4/NF- κ B/iNOS/cGMP/PKG INFLUYE SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

A continuación, se decidió determinar si la vía estimulada por LPS, modificaba la producción de cGMP, para lo cual se determinó por ELISA los niveles de cGMP en presencia de 10 μ M de C34 (Fig. 17 A), 4 μ M de selenito de sodio (Fig. 17 B) y 50 μ M de 1400W (Fig. 17 C) en presencia y ausencia de 5 μ g/ml de LPS. Se observó que la activación de TLR-4 estimula la producción de cGMP en más de un 70% con respecto a la condición control, y que la presencia de los inhibidores para TLR-4, NF- κ B e iNOS, revierte el efecto estimulador inducido por LPS sobre los niveles de cGMP.

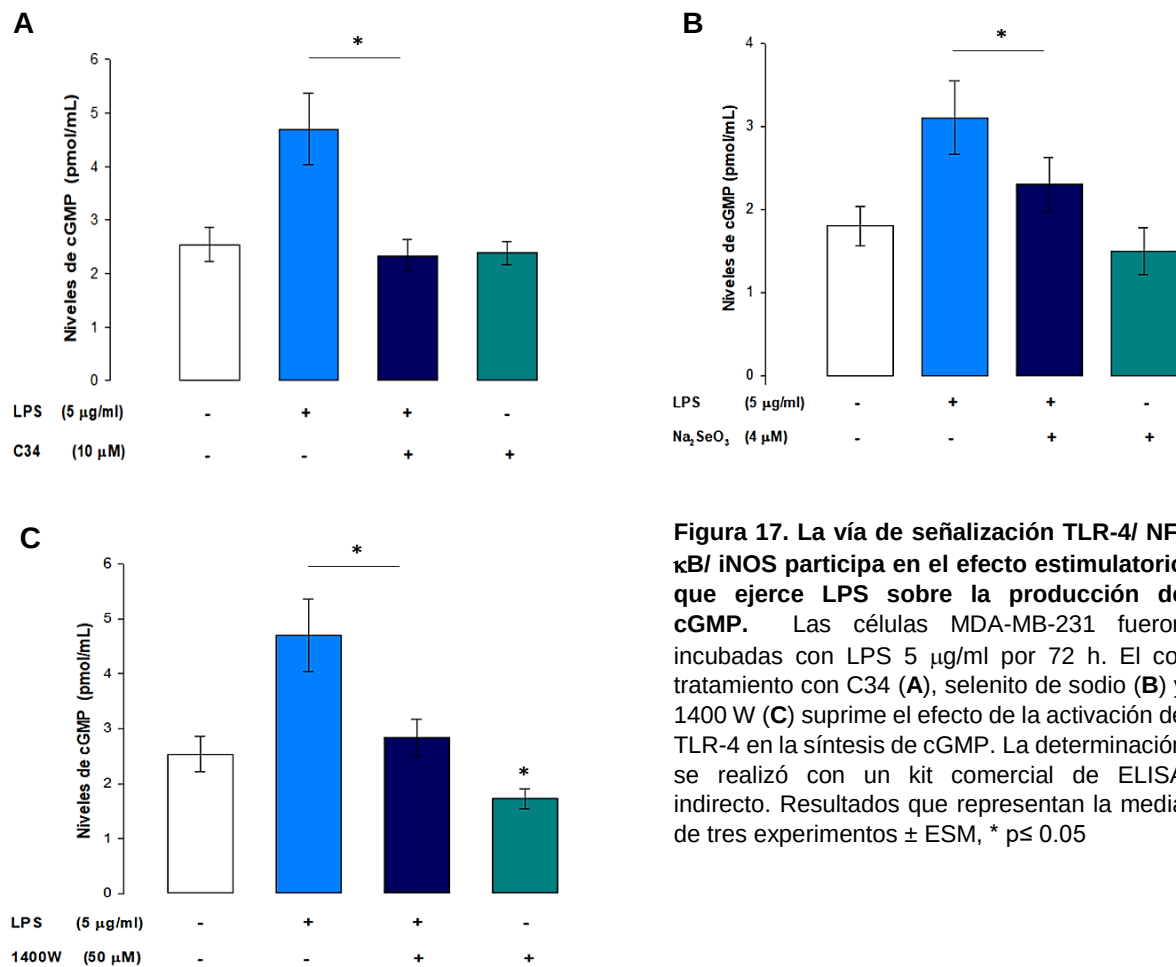


Figura 17. La vía de señalización TLR-4/ NF- κ B/ iNOS participa en el efecto estimulador que ejerce LPS sobre la producción de cGMP. Las células MDA-MB-231 fueron incubadas con LPS 5 μ g/ml por 72 h. El co-tratamiento con C34 (A), selenito de sodio (B) y 1400 W (C) suprime el efecto de la activación de TLR-4 en la síntesis de cGMP. La determinación se realizó con un kit comercial de ELISA indirecto. Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$

Posteriormente, investigamos si la vía de señalización NO/sGC/cGMP está involucrada en el efecto estimulador que ejerce el LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 48 h en presencia y ausencia de 10 μM de ODQ, inhibidor específico de la sGC. El resultado obtenido mediante el ensayo de cierre de herida no es determinante (Figura 18 A y B), por lo que se procedió realizar de manera complementaria el ensayo en cámara transwell, observándose que el efecto estimulador que ejerce LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 requiere de sGC, ya que al inhibir la actividad de este enzima con ODQ, el efecto estimulador ya no presenta (Fig. 18 C y D).

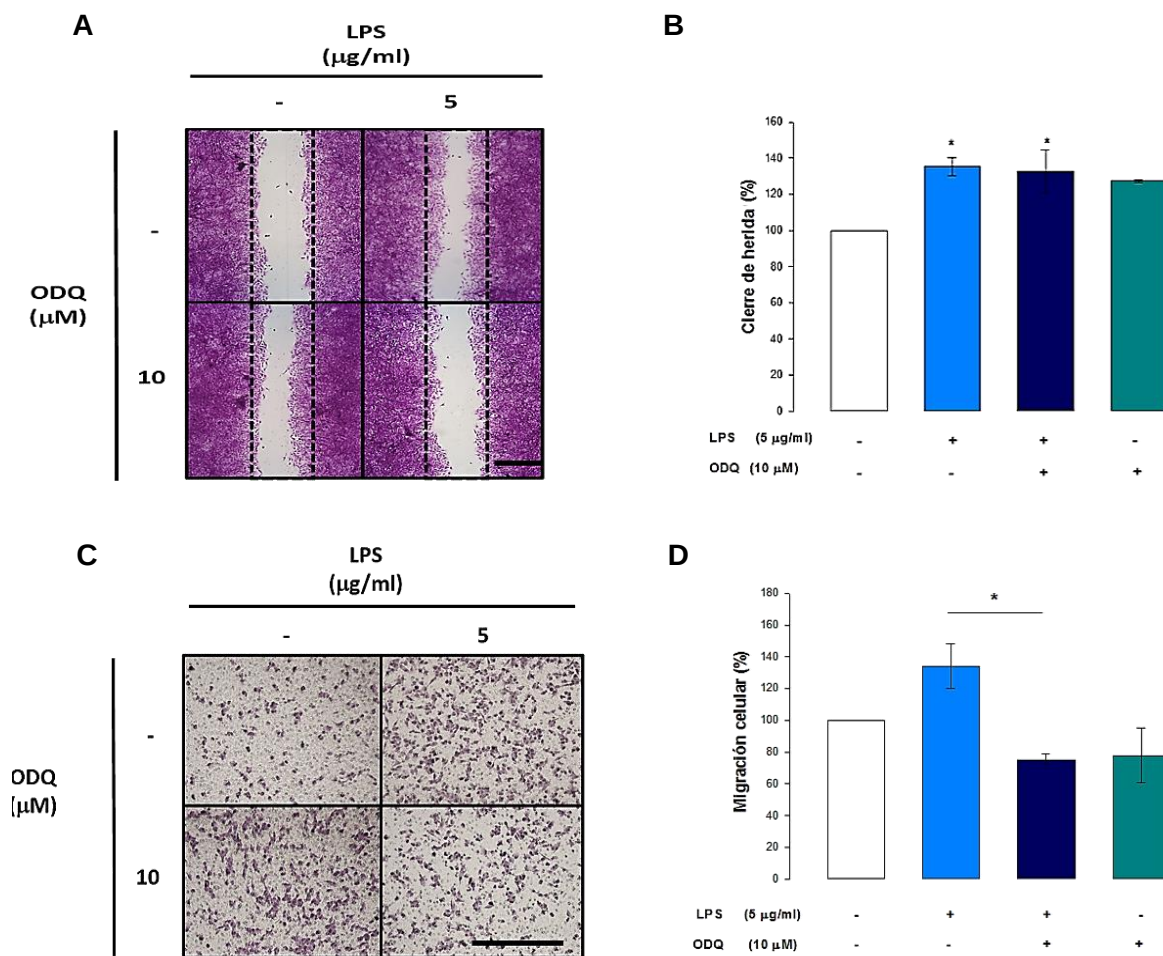


Figura 18. La inhibición de sGC previene el efecto estimulador sobre la capacidad migratoria dependiente de la activación de TLR-4 El tratamiento con ODQ (10 μM) reduce la migración inducida por el pretratamiento con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μm .

Diversos estudios han mostrado la participación del cGMP sobre la capacidad migratoria de células tumorales de mama, no habiendo hasta el momento una evidencia directa en las células MDA-MB-231, por lo que se procedió investigar el papel de este segundo mensajero sobre la capacidad migratoria en nuestro modelo experimental. Las células fueron tratadas con 8-Br-cGMP (análogo permeable de cGMP) y RP-8-Br-PET-cGMPS (inhibidor competitivo y reversible de las proteínas cinasas dependientes de cGMP, PKG) en presencia o ausencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 48 h. El tratamiento con el compuesto análogo del cGMP, indujo un incremento en la migración celular semejante al observado para la condición experimental con LPS (Fig. 19 A – D), el co-tratamiento de LPS con el análogo permeable no potencia la capacidad migratoria, lo cual nos sugiere la convergencia del efecto. Por su parte, la inhibición de la vía cGMP/PKGs disminuye significativamente el porcentaje de células que migran en respuesta al estímulo con LPS (Fig. 20 A – D).

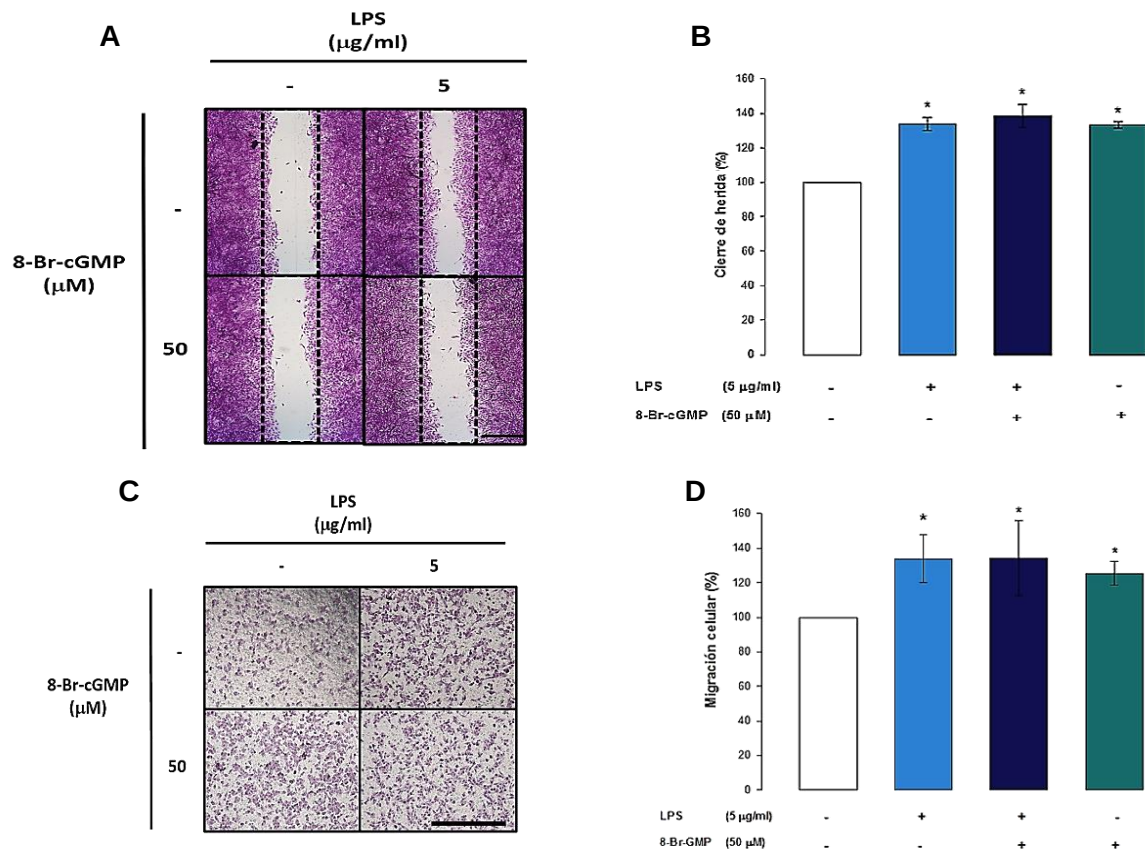


Figura 19. cGMP promueve la capacidad migratoria en la línea celular MDA-MB-231. El tratamiento con 8-Br-cGMP (50 μM) aumenta la migración celular por un mecanismo convergente a la señalización activada por LPS 5 $\mu\text{g/ml}$. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μm .

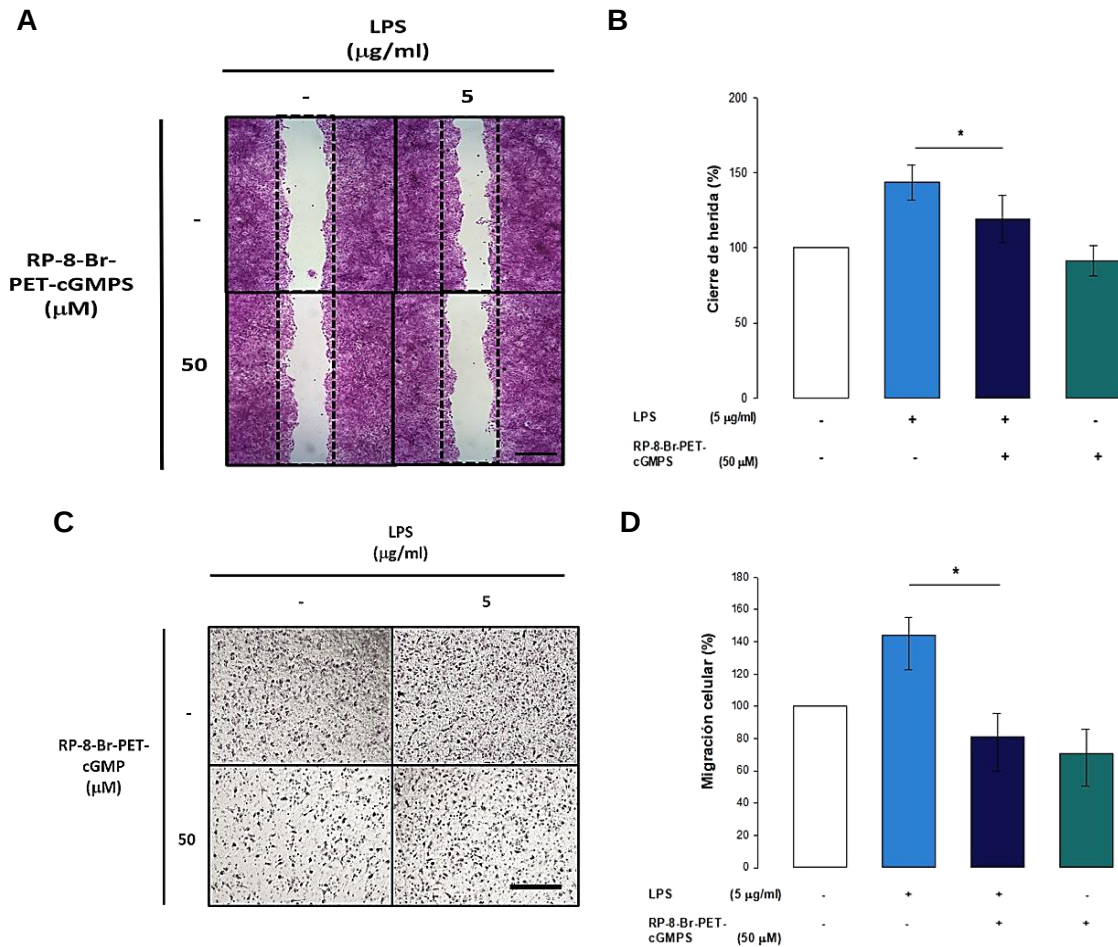


Figura 20. El bloqueo de la actividad de PKG evita el aumento de la capacidad migratoria estimulada por LPS. Las células se trataron con RP-8-Br-PET-CGMPS (50 μ M) en presencia de 5 μ g/ml de LPS, lo que reduce la migración inducida por la activación de TLR-4. La migración fue evaluada por dos tipos de ensayo de migración; cierre de herida, imagen representativa (A) y resultados estadísticos (B); y cámaras Transwell, imagen representativa (C) y resultados estadísticos (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: 500 μ m.

VIII. EL FENOTIPO MESENQUIMAL FAVORECE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la presencia de LPS exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, siendo este efecto mediado por la vía TLR-4/NF- κ B/iNOS/cGMP/PKG, a su vez, diversas evidencias experimentales muestran un correlato positivo entre la capacidad migratoria de las células tumorales y el fenotipo mesenquimal, por lo que se decidió evaluar el nivel de expresión del ARNm que

codifica para vimentina, marcador molecular del fenotipo mesenquimal, en presencia y ausencia de los inhibidores de dicha vía de señalización intracelular. Las células fueron tratadas con selenito de sodio, 1400W, ODQ, RP-8-Br-PET-cGMPS, en presencia y ausencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. La Figura 21 muestra que la interrupción de la vía de señalización intracelular en cualquiera de sus elementos (NF- κB , iNOS, sGC y PKG) reduce el nivel de expresión del ARNm para vimentina, aún en presencia de LPS; demostrando que la activación de TLR-4 por LPS exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 favoreciendo su fenotipo mesenquimal.

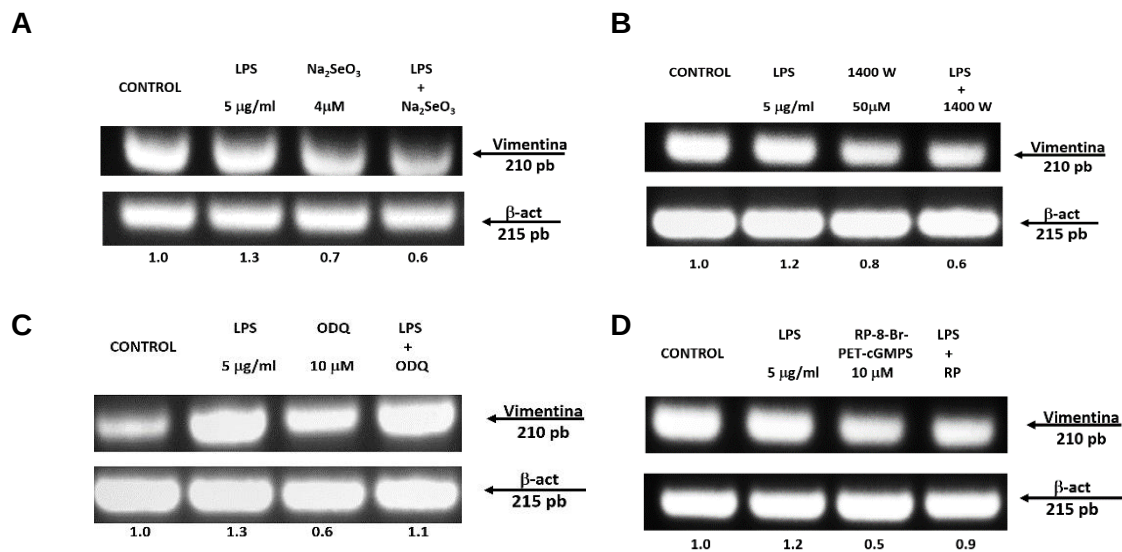


Figura 21. La vía de señalización de TLR-4 regula la expresión del marcador mesenquimal Vimentina. Las células fueron tratadas con inhibidores de la vía TLR-4/NF- κB /iNOS/sGC/cGMP en presencia de LPS 5 $\mu\text{g/ml}$, se observa que el bloqueo de esta modifica la expresión de marcadores mesenquimales. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en los niveles de ARNm que codifica para vimentina a las 24 h cuando las células se están en presencia de selenito de sodio 4 μM (A), 1400W 50 μM (B), ODQ 10 μM (C), RP-8-Br-cGMPS 50 μM (D).

IX. LPS FAVORECE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

Se ha observado en las células del sistema inmune que la activación de TLR-4 no solamente estimula su capacidad de síntesis de citocinas proinflamatorias, sino también su capacidad proliferativa. Evidencias de otros grupos de investigación, han relacionado el tratamiento con LPS a un aumento en el volumen del tumor en modelos murinos de cáncer de mama, así como una participación de la expresión basal de TLR-4 en la supervivencia celular. Por lo que, de manera complementaria, se decidió evaluar si la activación de TLR-4 con LPS incide sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231. Inicialmente

evaluamos si la presencia de LPS modifica la expresión del ARNm que codifica para Ki-67, marcador nuclear de proliferación. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas a diferentes concentraciones de LPS (1, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$) por 24, 48, 72 h. Resulta evidente que se requieren altas concentraciones de LPS para inducir un cambio significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para Ki-67 en los diferentes tiempos evaluados (Fig. 22 A - C). Además de estos resultados con el marcador molecular, se decidió realizar un ensayo de proliferación empleando la incorporación de bromodeoxiuridina. Las células fueron igualmente tratadas con LPS por 96 h, observando un efecto estimulador estadísticamente significativo sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 a las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Fig. 22 D).

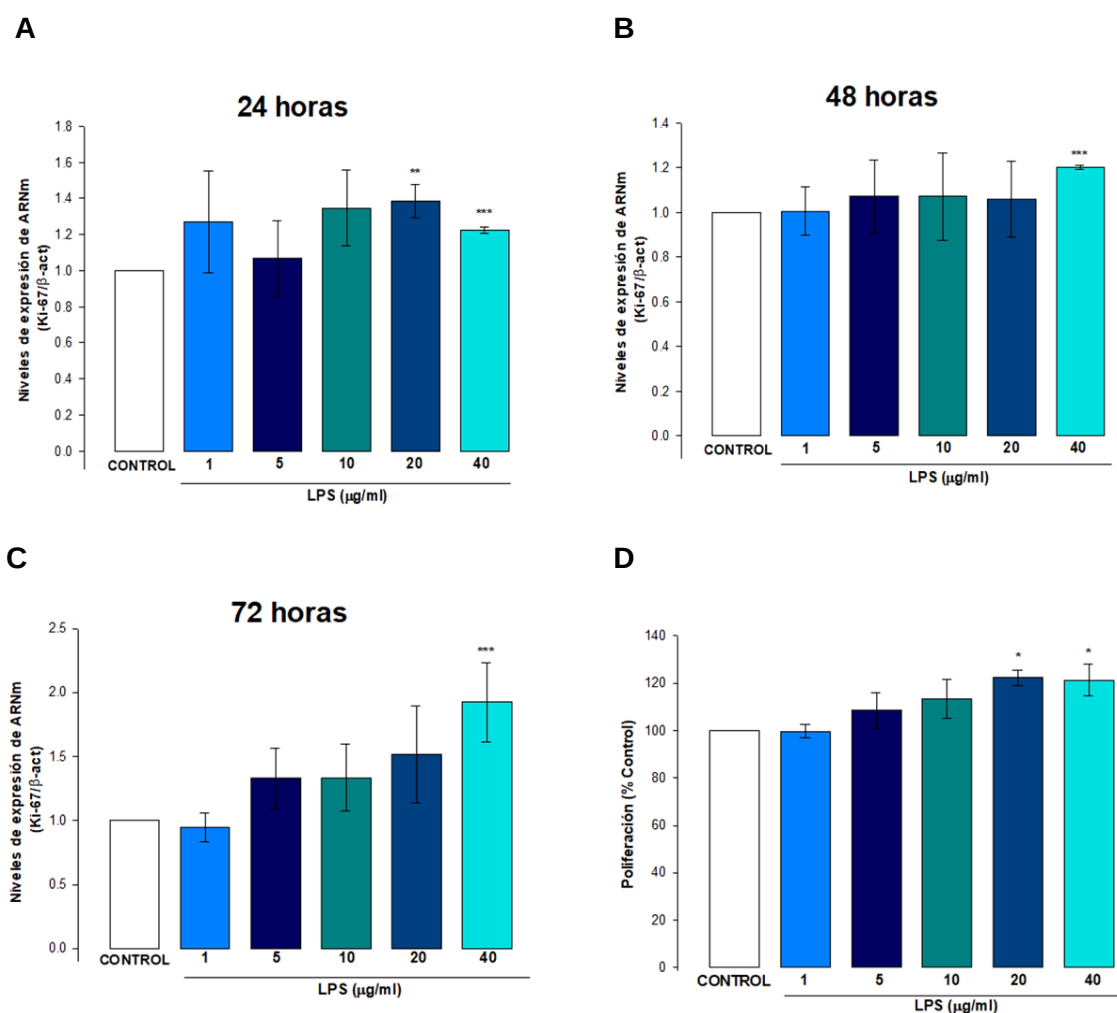


Figura 22. LPS estimula la proliferación en las células MDA-MB-231. Curva dosis efecto a los tiempos señalados, células tratadas con concentraciones ascendentes de LPS (1 a 40 $\mu\text{g/ml}$), se observa aumento de la capacidad proliferativa a 40 $\mu\text{g/ml}$ en todos los tiempos probados. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en los niveles de ARNm que codifica para Ki-67 a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). La proliferación se evaluó con el ensayo de incorporación de BrdU a las 96 h (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

X. LA VÍA TLR-4/NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP REGULA LA PROLIFERACIÓN EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

Posteriormente, evaluamos si la vía TLR-4/NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP estaba involucrada en la regulación positiva de la capacidad proliferativa, así como lo habíamos observado previamente para la capacidad migratoria. Las células MDA-MB-231 se mantuvieron en presencia de los inhibidores farmacológicos C34, selenito de sodio, 1400W, ODQ, RP-8-Br-PET-cGMPS y de 40 μ g/ml de LPS por 96 h. Los resultados evidencian la participación de los elementos de la vía de señalización en la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231, ya que al inhibir cualquier de estos elementos, el LPS es incapaz de inducir un cambio significativo sobre la capacidad proliferativa de las células (Fig. 23 A – D).

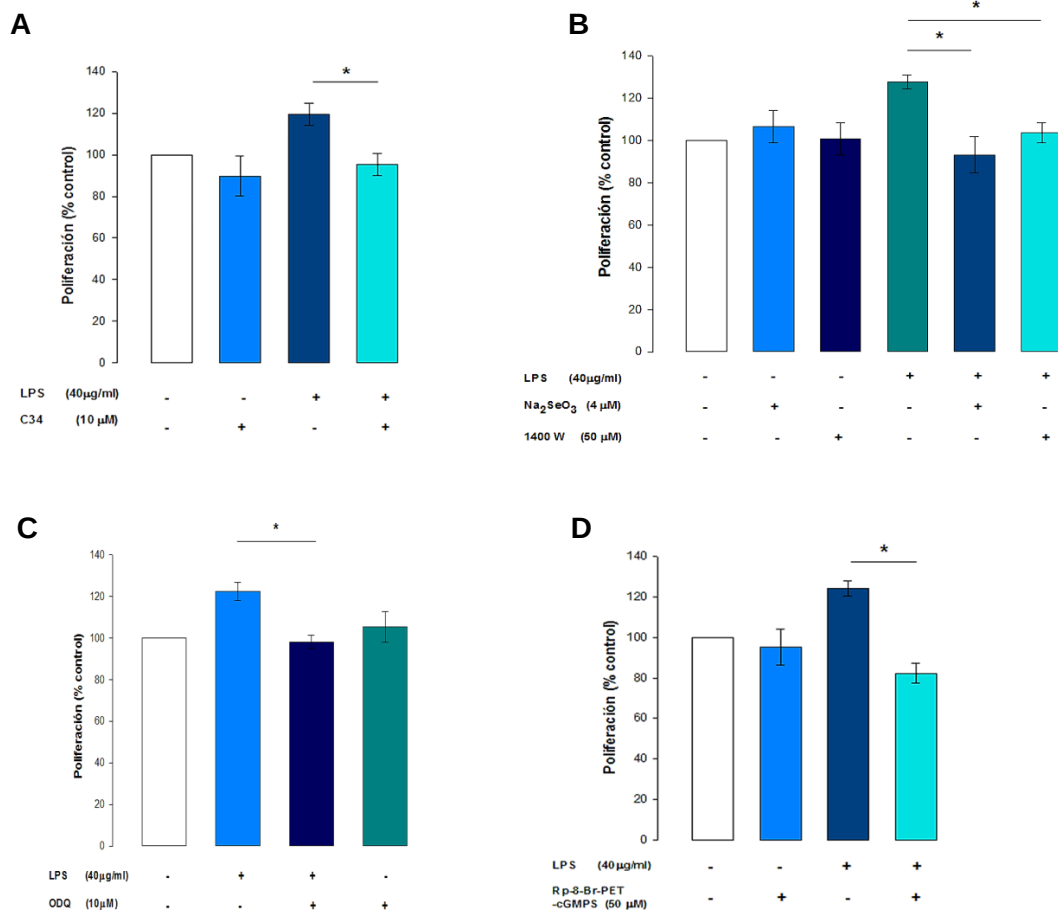


Figura 23. La vía TLR-4/NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP regula la proliferación en las células MDA-MB-231.

Las células fueron tratadas con inhibidores de la vía de señalización de TLR-4 en presencia de LPS 40 μ g/ml, se observa que el bloqueo de esta modifica la capacidad proliferativa. Los cambios en la proliferación se evaluaron con el ensayo de incorporación de BrdU a las 96 h cuando. Se realizó co-tratamiento con C34 10 μ M (A), selenito de sodio 4 μ M y 1400W 50 μ M (B), ODQ 10 μ M (C), RP-8-Br-cGMPS 50 μ M (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM; * $p \leq 0.05$.

XI. LPS INFLUYE DE MANERA DIFERENCIAL SOBRE LA QUIMIORRESISTENCIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB-231 A DOXORRUBICINA.

Una vez que observamos la presencia de LPS incrementa la capacidad migratoria y proliferativa de las células MDA-MB-231 a través de la misma vía de señalización intracelular, quisimos evaluar si este mismo compuesto induce quimiorresistencia en estas células, ya que se ha reportado que la línea parental MDA-MB-231 es sensible a Doxorubicina y que la quimiorresistencia a este agente citotóxico es adquirida, por lo que seguimos un protocolo de inducción de resistencia a fármacos, reportado previamente por Marinello et al en 2019. Se evaluó la supervivencia celular a través del ensayo de MTT en 4 grupos experimentales: células sensibles a Doxorubicina (CONTROL), células resistentes a Doxorubicina (DOX-RES), células sensibles con tratamiento de 5 µg/ml de LPS (LPS), y células resisten con tratamiento de 5 µg/ml de LPS (DOX-RES + LPS). Las células fueron tratadas por 48 h con Doxorubicina a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 µM.

Los resultados muestran que las células MDA-MB-231 expuestas a 1 µM de Doxorubicina reduce aproximadamente un 20% su capacidad de supervivencia, mientras que en las células DOX-RES a esa misma concentración, se observa un incremento de aproximadamente un 14% en la supervivencia. Por su parte, las células LPS presentan un aumento de la supervivencia a la concentración de 0.5 µM de Doxorubicina. Sorpresivamente, las células DOX-RES + LPS generaron una respuesta diferencial a Doxorubicina, favoreciendo la supervivencia celular a 0.5 µM y potenciando el efecto citotóxico a la concentración de 1.0 µM (Fig. 24). Se requieren más estudios para explicar estos hallazgos.

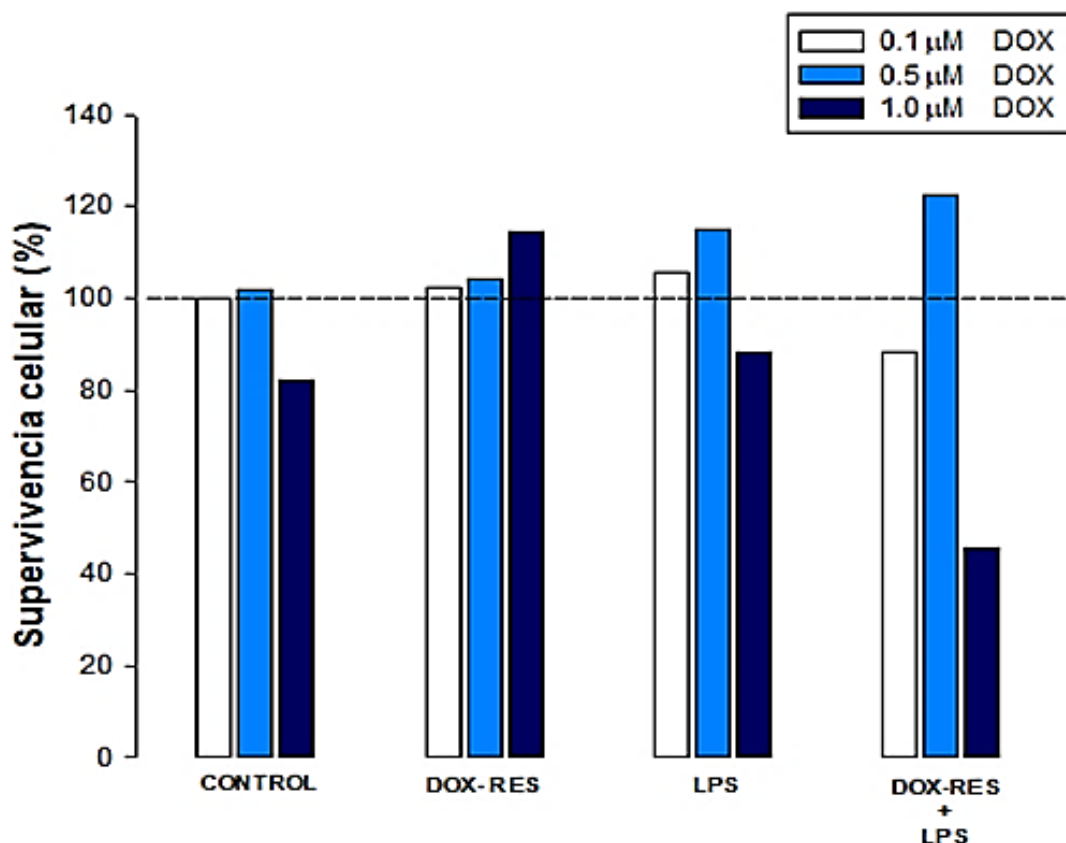


Figura 24. LPS favorece la quimiorresistencia a Doxorrubicina. Las células fueron sometidas a un protocolo de inducción de resistencia a Doxorrubicina durante 14 pasajes, se mantuvieron en concentraciones crecientes del fármaco (10 a 100 nM) y/o tratamiento con LPS 5 μg/ml. Una vez establecido el fenotipo resistente transfirieron a placas de 96 pozos y se expusieron a concentraciones citotóxicas de Doxorrubicina (0.1 a 1.0 μM). Se observa una mayor sobrevivencia en el grupo resistente con co-tratamiento con LPS. La supervivencia celular se determinó por ensayo de MTT después de 48 h.

XII. LPS ESTIMULA LA CAPACIDAD MIGRATORIA EN CÉLULAS DE BAJO POTENCIAL METASTÁSICO.

Para evaluar si el nivel de expresión de iNOS se relaciona con los efectos observados sobre la capacidad migratoria estimulada por la activación de TLR-4; determinamos el efecto de LPS en las células MCF-7, un modelo celular de bajo potencial invasivo. Se determinó el nivel de expresión basal del ARNm que codifica para TLR-4 e iNOS en las dos líneas celulares, mostrando que se expresa preferentemente en la línea celular MDA-MB-231 (Fig. 25 A). Independientemente del nivel de expresión de TLR-4 en las células MCF-7, se propuso investigar si la activación de este receptor con LPS pudiera estimular la capacidad migratoria de estas células, ya que como se comentó líneas arriba, estas células son de bajo potencial metastásico. Las células MCF-7 fueron tratadas con 5

$\mu\text{g/ml}$ de LPS por 48 h y se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para iNOS, observando que hay un aumento estadísticamente significativo del 45% con respecto a la condición control (Fig. 25 B). Posteriormente, decidimos evaluar si a esta concentración se modificaba su capacidad proliferativa y migratoria, para lo cual evaluamos la expresión de Ki-67, como marcador de proliferación y realizamos ensayos en cámara transwell para determinar cambios en su capacidad migratoria. Los niveles de expresión del ARNm para Ki-67 no presentan cambios aun en presencia de LPS $5 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 25 C), tal y como lo observamos en las células MDA-MB-231. Sin embargo, para el caso de la capacidad migratoria hay cambios estadísticamente significativos, se estimuló la migración celular 5.9 veces con respecto a la condición control (Fig. 25 D). Dejando en claro que LPS a bajas concentraciones exagera la capacidad migratoria de células provenientes de cáncer de mama.

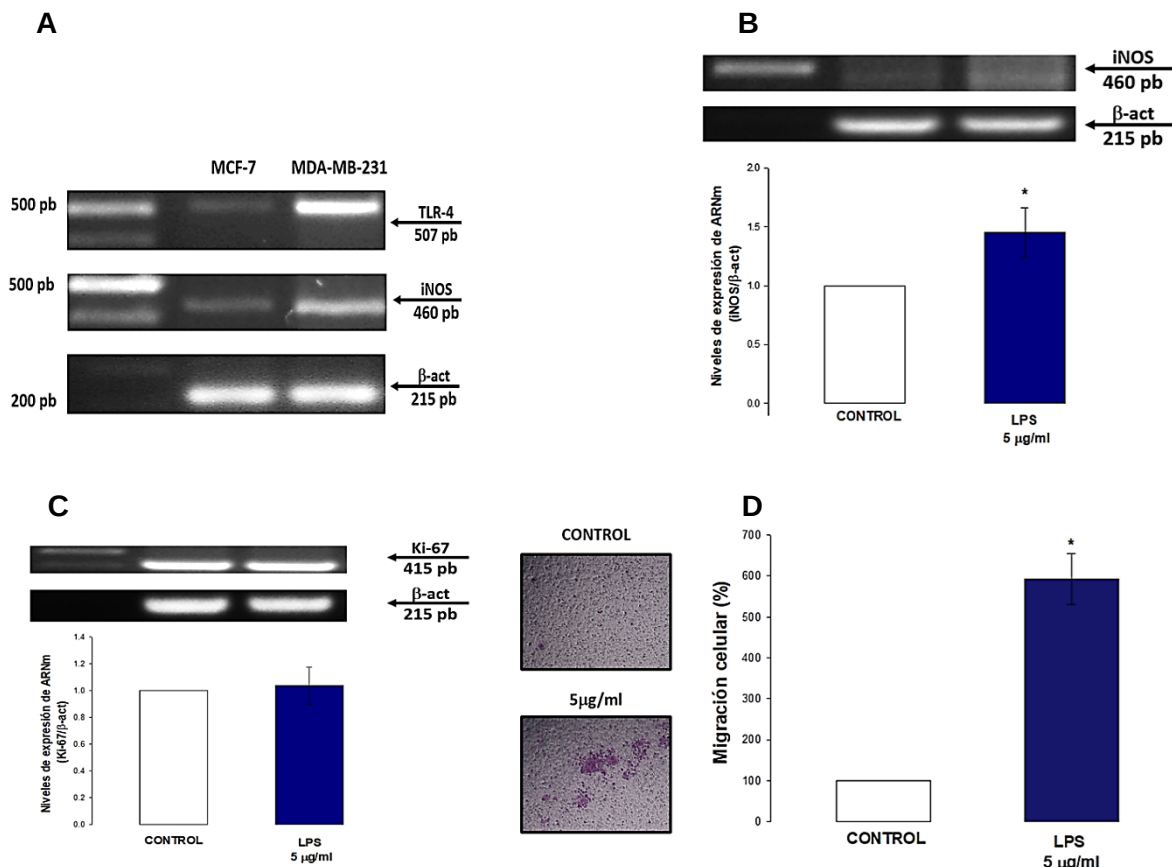


Figura 25. iNOS se expresa diferencialmente y estimula la capacidad migratoria en la línea MCF-7. las células mantuvieron en condiciones control o en tratamiento LPS $5 \mu\text{g/ml}$ RT-PCR, se evidenció aumento de la expresión a nivel de ARNm de iNOS dependiente de la activación de TLR-4 y aumento en la migración. RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en la expresión génica de iNOS (A, B) y Ki- 67 (C), normalización con respecto a β -actina. La migración fue evaluada por ensayo en cámaras Transwell, imagen representativa a la izquierda y resultados estadísticos a la derecha (D). Resultados que representan la media de tres experimentos $\pm$ ESM, * $p \leq 0.05$. Barra: $500 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama triple negativo se considera el tipo de CaM más agresivo, los pacientes con esta neoplasia tienen generalmente un mal pronóstico; lo cual se relaciona con el desarrollo de metástasis, recurrencia y mayor riesgo de muerte en comparación con otros tipos de CaM (Tomao et al., 2014). Los casos de TNBC representan el 15 a 20% de los casos de cáncer de mama y tiene una incidencia más alta en afroamericanas e hispanas en comparación con caucásicas (Zaharia & Gómez, 2013). Dadas sus características moleculares, no responde a los tratamientos hormonales, ni a la terapia dirigida utilizada para HER2/neu, por lo que la quimioterapia es el tratamiento de elección. El TNBC es sensible a los fármacos citotóxicos, pero a pesar de las altas tasas de respuesta, estas no son prolongadas, inicialmente se obtienen resultados favorables que van disminuyendo en el tiempo, debido a la activación de mecanismo de resistencia que se desarrollan precozmente, lo que convierte en un reto el manejo terapéutico para este tipo de cáncer (Zaharia & Gómez, 2013, Brewster et al., 2014; Sharma et al., 2018). La comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos de metástasis y quimiorresistencia temprana, así como el desarrollo de alternativas terapéuticas que aumenten la sobrevida del paciente son los retos actuales en el manejo del cáncer de mama triple negativo.

Múltiples evidencias demuestran que la presencia de un microambiente inflamatorio correlaciona con mayor sobrevivencia de las células tumorales en TNBC (Denkert et al., 2018; Romero-Cordoba et al., 2019), además de que se asocia a mal pronóstico en pacientes con este tipo de CaM (Romero-Cordoba et al., 2019). De los elementos moleculares en el proceso inflamatorio es interesante la participación de TLR-4, receptor descrito inicialmente en células de la respuesta inmune; del cual, actualmente se sabe que se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo células tumorales de mama (Akira & Takeda, 2004; Hua et al., 2009; Wang et al., 2010, Jing et al., 2012).

El papel de TLR-4 en el microambiente tumoral como elemento de respuesta a estímulos proinflamatorios y su correlación positiva con la progresión tumoral en cáncer ha sido previamente descrita en diferentes tipos de neoplasias, incluyendo cáncer de mama (Ahmed et al., 2013). Estudios previos de nuestro grupo, realizados en diferentes líneas de celulares de mama (MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231) demostraron una correlación

positiva de la expresión de TLR-4 a nivel de ARNm con el potencial invasivo; además se observó que al activarlo se estimula la expresión de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , las cuales a través de mecanismos autocrinos y paracrinos regulan la migración celular (Ruiseco-Flores, 2015; Vázquez-Rojas, 2015). La estimulación de TLR-4 con LPS y la vía de señalización activada, ha sido estudiada en diferentes líneas celulares utilizando al LPS como su ligando exógeno, demostrando que es a través de una vía dependiente de NF- κ B (Yang et al., 2010; Mehmeti et al., 2015). La activación de TLR-4, se ha relacionado positivamente con la capacidad migratoria de las células tumorales, característica fundamental que determina el potencial metastásico de los tumores primarios, incluyendo el de mama (Gonzales-Reyes et al., 2010).

Se ha demostrado que la vía de señalización canónica estimulada por la activación de TLR-4 con LPS promueve la translocación de NF- κ B y regula positivamente la expresión de mediadores inflamatorios, entre los que destaca iNOS, enzima que cataliza la producción de NO. La sobreexpresión de la sintasa de óxido nítrico inducible y el aumento de las concentraciones intracelulares de óxido nítrico se han relacionado con sobrevivencia, crecimiento, migración, invasión, resistencia a quimio y radioterapia, así como a terapia fotodinámica (Girotti et al., 2016). Sin embargo, el mecanismo molecular asociado a estos procesos aún se desconoce.

Con base en estos antecedentes el objetivo central del presente trabajo fue determinar la relación entre la activación de la vía de señalización canónica de TLR-4 con la regulación de la señalización del NO, considerando a iNOS como elemento central que permite el acoplamiento de ambas en modelos celulares de cáncer de mama.

Nuestros resultados muestran claramente que LPS al unirse a TLR-4 estimula de manera significativa la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, y que este efecto depende de la concentración, observando una inducción de la migración a concentraciones de 1 a 10 μ g/ml. Estos hallazgos coinciden con lo observado previamente por Yang y colaboradores en 2014, ya que evidenciaron que se presenta aumento en la migración e invasión a una concentración de 10 μ g/ml, en la misma línea celular; por su parte Liao y colaboradores en 2012, observaron incremento en la capacidad invasiva de células MCF-7, MDA-MB-435S y MDA-MB-231, tratando las células con una concentración de LPS (0.1 μ g/ml); sin embargo, no se demostró a detalle el mecanismo molecular responsable.

Además, mostramos que el aumento de la capacidad migratoria es mediado directamente por la activación de TLR-4, usando el inhibidor específico C34, el cual actúa directamente sobre el bolsillo hidrofóbico del correceptor MD2, proteína de diferenciación mieloide 2 (Neal et al., 2013). Este inhibidor se había probado a una concentración de 10 μ M en diferentes tipos células, como macrófagos, enterocitos, células de Sertoli y neutrófilos asociados a tumor modulando negativamente la expresión de mediadores proinflamatorios (Liu et al., 2010; Neal et al., 2013; Adegoke et al., 2019; Zhou et al., 2019). Por su parte Lau y colaboradores en 2017 utilizando la línea celular EC109 de carcinoma de células escamosas de esófago, mostraron que al inhibir la activación de TLR-4 con C34 en concentraciones micromolares se previene el efecto estimulador en la capacidad migratoria e invasiva, apoyando nuestros hallazgos en MDA-MB-231.

Al unirse LPS con TLR-4, activa la vía de señalización canónica, dependiente de MyD88, que culmina con la translocación del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula positivamente la expresión de genes relacionados a la respuesta inflamatoria, tales como iNOS (Prasad & Ravindran, 2010; Natarajan et al., 2018). En el presente trabajo, demostramos no solamente que la activación de TLR-4 induce un aumento en los niveles de expresión de iNOS a nivel de ARN mensajero y proteína en las células MDA-MB-231, sino que también incrementa la producción de óxido nítrico, tal y como ocurre en las células del sistema inmune (Xue et al., 2018). Estudios previos de otros grupos, han propuesto a la activación de TLR-4 como promotor de la expresión de iNOS y la producción de NO en líneas celulares de CaM, incluyendo a MDA-MB-231, sin embargo proponen a S100A8 como agonista del receptor en el microambiente tumoral, esto podría deberse a las diferencias en las condiciones de tratamiento, ya que expusieron a las células a concentraciones bajas de LPS (0.02 μ g/ml) por 24 h, sin observar cambios en la expresión funcional de iNOS, (Heinecke et al., 2014).

De manera complementaria, para probar la participación de NF- κ B, elemento efector de la vía canónica de TLR-4, incubamos las células en presencia de selenito de sodio, lo que previene el efecto estimulador de LPS sobre la expresión funcional de iNOS. El selenito de sodio se ha propuesto como agente antitumoral para diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Gasparian et al., 2002; Pei et al., 2010; Sakalli et al., 2017). Actúa a través de la inhibición de la actividad de IKK, lo cual evita la translocación de NF- κ B, se ha demostrado que actúa regulando la expresión de los genes diana de este factor

de transcripción a concentraciones micromolares. Evidencias previas, utilizando concentraciones de 3 a 5 μ M de selenito de sodio en células PC-3 de cáncer de próstata, observaron la inhibición de la translocación al núcleo de p65, la cual es la subunidad más abundante de NF- κ B, además de regular negativamente la producción de mediadores proinflamatorios como TGF β , VEGF e IL-6 (Pei et al., 2010). Sorpresivamente también disminuye la capacidad migratoria de las células de TNBC por un mecanismo, al menos en parte, dependiente de la expresión funcional de iNOS. Diversas evidencias experimentales, relacionan la actividad de este compuesto como un agente pro-apoptótico y anti-angiogénico (Zhong et al., 2001; Abdulah et al., 2011; Liu et al., 2016), pero poco se ha descrito de su efecto sobre la capacidad migratoria. Se ha sugerido que la regulación de la capacidad migratoria e invasiva, mediada por selenito de sodio, podría relacionarse a la inhibición de la expresión de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, así como de otros mediadores proinflamatorios, lo que explicaría por qué no se observa recuperación de la capacidad migratoria aun en presencia de LPS (Zeng & Combs, 2008).

La participación de iNOS en el desarrollo y progresión del cáncer está ampliamente documentada (Thomsen et al., 1995; Anttila et al., 2007; Zhang et al., 2014). Específicamente en cáncer de mama, se ha observado que la expresión de iNOS correlaciona positivamente con el grado de malignidad y menor sobrevida (Bulut et al., 2015; Garrido et al., 2017). Previamente Zhao y colaboradores en 2017, demostraron que las células MCF-7 y MDA-MB-231, incrementan su potencial migratorio mediante la activación y sobreexpresión de NOS y la producción de NO. Además, se ha descrito que esta enzima juega un papel central en la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva en líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231 y SUM159), y que la inhibición farmacológica de su actividad previene los efectos estimulatorios en el potencial metastásico (Kanugula et al., 2014; Granados-Principal et al., 2015).

Para demostrar que el efecto estimulatorio sobre la capacidad migratoria se debía a la expresión y actividad de iNOS, utilizamos 1400 W, un inhibidor selectivo de esta enzima, observando que se evita el incremento de la migración celular dependiente del tratamiento con LPS. Otros grupos han obtenido resultados similares con respecto a la capacidad migratoria, se ha evidenciado regulación negativa en presencia de 1400W en células HCT116 de cáncer de colon (Gao et al., 2019). Mientras en líneas celulares de cáncer de mama, utilizando diferentes inhibidores de iNOS; análogos de L-Arginina no selectivos, L-

NAME, L-NMMA, y 1400W, se observó disminución de la capacidad migratoria mediada por iNOS (Schwappacher et al., 2013; Kanugula et al., 2014; Granados-Principal et al., 2015).

La producción de óxido nítrico dependiente de la actividad catalítica de iNOS lleva a la activación de dos vías de señalización; puede actuar a través de S-nitrosilación o por medio de la vía dependiente de guanilatociclasa (Lipton et al., 1993; Friebe & Koesling, 2003; Martinez-Ruiz et al., 2013). Estudios previos de nuestro grupo, abordaron la participación de NO en la inducción de S-nitrosilación y su relación con modificaciones de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, observando que utilizando 300 μ M de NOC-18, donador estable de óxido nítrico, se aumenta significativamente la S-nitrosilación, sin embargo, se reduce la capacidad migratoria, esto podría relacionarse a las concentraciones del donador y al tiempo de exposición, ya que recordemos que las concentraciones altas de óxido nítrico tienen una correlación negativa con el potencial metastásico (Aparicio-Carrillo, 2017).

Considerando estos antecedentes, nosotros evaluamos la segunda opción ya que evidencias previas indican que el aumento de las concentraciones de NO que activan a sGC promueven la proliferación, invasión y metástasis en varios modelos de cáncer de mama (Kastrati et al., 2010; Bhowmick et al., 2013; Sen et al., 2013). Nuestros resultados indican que se previene el aumento de capacidad migratoria al tratar las células MDA-MB-231 con ODQ (un potente inhibidor específico de sGC) en presencia de LPS, evidenciando que la migración celular es dependiente de la actividad catalítica de esta enzima. En estudios anteriores se ha reportado el papel de la vía NO/sGC/cGMP en la capacidad migratoria de macrófagos y líneas celulares de glioma (Ridnour et al., 2007; Zhuang et al., 2013). Utilizando modelos celulares de cáncer murino, Jadeski y colaboradores en 2003 demostraron que la migración celular estimulada por NO era dependiente de la actividad de la sGC, ya que en presencia de ODQ se reducía la migración celular en células C3H/HeJ; mientras Punathil y colaboradores en 2008 evidenciaron que la inhibición sGC con ODQ disminuye la capacidad migratoria en la línea celular 4T1.

Otro conjunto de evidencias muestra que la vía del óxido nítrico dependiente de la guanilato ciclasa y que involucra un aumento de las concentraciones intracelulares de GMPc, puede regular la actividad de proteínas que exacerban el potencial metastásico en células tumorales (Leung et al., 2010; Wong et al., 2012; Windham & Tinsley, 2015). Los

mecanismos involucran la activación de moléculas efectoras tales como Protein Kinase G (PKG), canales iónicos dependientes de cGMP o fosfodiesterasas (Friebe et al., 2003). Nosotros utilizamos dos análogos, uno que activa la vía de señalización río abajo, 8-Br-cGMP, y otro que la inhibe RP-8-Br-cGMP-PET. El primero exacerba la capacidad migratoria en ausencia y presencia de LPS, por lo que posiblemente actúen a través de la misma vía de señalización. El segundo inhibe la migración dependiente de la activación de TLR-4, lo cual confirma la participación de cGMP en el potencial metastásico en células de TNBC. Si bien, diversas evidencias proponen un efecto antitumoral de cGMP (Fajardo et al., 2014; Tuttle et al., 2016), también se ha demostrado los efectos son dependientes de la forma de activar la vía de señalización, lo cual polariza la respuesta; ya que cuando es a través de NO, el efecto es protumoral y cuando se activa directamente la sGC generalmente la respuesta es antitumoral (Windham & Tinsley, 2015). Schwappacher y colaboradores en 2013, demostraron que, en condiciones basales, la inhibición de la vía de señalización NO/sGC/cGMP correlaciona con una disminución en la capacidad migratoria, de manera opuesta el tratamiento con 8-Br-cGMP, lo cual exacerba la migración en las células MDA-MB-231.

Las modificaciones en la expresión de vimentina, dependientes de TLR-4/iNOS se relacionan con el mantenimiento del fenotipo mesenquial. Se sabe que la vía de óxido nítrico tiene un comportamiento bimodal en la TEM, que está en función de la concentración. A bajas concentraciones de donadores de NO, 0.01 a 0.250 μ M (Krischel et al. 1998; Burke et al., 2013), se ha observado incremento en la capacidad migratoria e invasiva, mientras que, a altas concentraciones, ≥ 0.5 mM, se produce inhibición de la metástasis por mecanismos de daño a DNA, mutación e inducción de la apoptosis. Se ha reportado que el tratamiento con dipropilenetriamina NONOato, donador de NO, estimula positivamente la expresión de vimentina en células tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (Chanvorachote et al., 2014). Por otro lado, se ha observado co-localización de PKG con vimentina en neutrófilos; sin demostrar las implicaciones fisiopatológicas involucradas. Además de que se han identificado múltiples sitios de fosforilación, en vimentina, que son sustrato de diversas cinasas *in vitro* (Evans, 1998; Satelli & Li, 2011).

En el caso de la capacidad proliferativa hay evidencias contradictorias sobre el papel de la activación de TLR-4 e iNOS. Nosotros observamos un efecto estimulador, pero solo a altas concentraciones y después de 96 h de tratamiento. Se han evidenciado

correlaciones positivas de la expresión basal de TLR-4 con proliferación en diferentes tipos de cáncer incluyendo el de mama; tal como sucede en nuestras condiciones experimentales (Kelly et al., 2006; Fukata et al. 2007, Szecepanski et al., 2009; Yang et al., 2010). En contraparte, otro grupo ha demostrado que la activación de TLR-4 inhibe el desarrollo de cáncer pulmonar (Bauer et al., 2005), además de que han encontrado evidencias de que la expresión y activación de este receptor no modifica la capacidad proliferativa en células tumorales de páncreas, ni en la línea murina de cáncer de mama 4T1 (Ahmed et al., 2013).

Por otra parte la actividad de NF- κ B se relaciona positivamente con la capacidad proliferativa de las células, Liu y colaboradores en 2016 utilizaron la línea celular de cáncer de mama canino CTM12 y evidenciaron que el tratamiento con selenito de sodio (40 μ M) disminuyen la proliferación, en condiciones basales, a través de inducción de la apoptosis.

Con respecto al papel de NO en la capacidad proliferativa, este tiene efectos paradójicos, que dependen de la concentración a la que sean expuestas las células tumorales, considerándose que los efectos estimulatorios sobre la proliferación se producen a bajas concentraciones (Burke et al., 2013; Krischel et al. 1998). Además, se ha demostrado que la inhibición de iNOS en condiciones basales disminuye la proliferación celular en las líneas celulares de TNBC, BT20, HCC38 y MDA-MB-231 (Kastrati et al., 2010; Granados-Principal et al., 2015). Otros grupos reportan efectos de la vía NO/cGMP/sGC en la capacidad proliferativa de células tumorales de ovario a bajas concentraciones de NO (Fraser et al., 2006; Leung et al., 2008; Leung et al., 2010). En células inmortalizadas de mama MCF-10A, se observó el efecto antiapoptótico de NOS por un mecanismo dependiente del guanilato ciclasa soluble, al utilizar inhibidores de la vía de señalización de NO, ODQ (sGC) y KT5823 (PKG) se disminuye la sobrevida en esta línea celular y aumenta la condensación nuclear asociada a la apoptosis (Kastrati et al., 2010).

Hasta el momento no existe un tratamiento efectivo para el manejo del cáncer de mama triple negativo, siendo la terapia con agentes citotóxicos la principal alternativa terapéutica. La quimioterapia basada en antraciclinas como la Doxorrubicina, es una de las aproximaciones terapéuticas más importantes en el manejo de los pacientes con CaM avanzado o metastásico. Los TNBC han reportado una mayor sensibilidad a antraciclinas en comparación de los tumores responsivos a estrógenos, sin embargo, el 70% de los pacientes con este subtipo de cáncer presentan enfermedad residual después de la

quimioterapia. Es más, solo la mitad de los pacientes se benefician con la quimioterapia (Ahmed et al., 2013). Adicionalmente, se ha evidenciado que, conforme progresa el cáncer, las células desarrollan quimiorresistencia a los agentes farmacológicos de uso común para su tratamiento. Nuestros resultados indican que la exposición crónica a 5 µg/ml de LPS favorece la quimiorresistencia a Doxorrubicina en el tratamiento individual con este compuesto, y que exacerba la resistencia a este fármaco en las células DOX-RES. Otros grupos han descrito que TLR-4 induce quimiorresistencia a Paclitaxel, fármaco citotóxico, en las células MDA-MB-231 (Rajput et al., 2013), y en muestra clínicas, se ha descrito que la activación de NF-κB produce disminución de la sensibilidad a Doxorrubicina y peor pronóstico (Inglés-Esteve et al., 2012).

Evidencias previas de nuestro grupo, demostraron que, la línea celular MDA-MB-231 desarrolla resistencia a Doxorrubicina en presencia de EGF por un mecanismo dependiente de la sobreexpresión del transportador ABCG2 (Gallardo-Arriaga, 2017). Finzi y colaboradores en 2009, utilizando células de Mz-ChA-1 de adenocarcinoma de vesícula biliar observaron que, el tratamiento con LPS induce la fosforilación de EGFR; además de que, diversas evidencias muestran el desarrollo de quimiorresistencia relacionado al entrecruzamiento de las vías de señalización de NF-κB y EGFR (Shostak & Chariot, 2015).

Adicionalmente se ha descrito que la vía de señalización NF-κB/iNOS/NO correlaciona positivamente con la resistencia a antraciclinas (Dalmases et al., 2013). También se ha descrito que NO promueve la activación de TEM y quimiorresistencia en líneas celulares de CaM (Switzer et al., 2012; Marinello et al., 2019). Con estas evidencias se puede sugerir la posible participación de la vía TLR-4/NF-κB/ iNOS/NO en la inducción de resistencia a Doxorrubicina, observada en las células MDA-MB-231 tratadas con LPS. Sin embargo, se deben hacer más estudios para obtener evidencias suficientes sobre los mecanismos moleculares propuestos en esta hipótesis.

La línea celular MCF-7, fue utilizada para confirmar el efecto de la activación de TLR-4 e iNOS en la progresión tumoral en cáncer de mama, comparando lo observado en la línea celular de TNBC frente a la ER⁺. MCF-7 representa al tipo molecular Luminal A de CaM, el cual se caracteriza por ser responsivo a estrógenos, así como se ha observado que tiene un fenotipo epitelial con baja capacidad migratoria e invasiva (Holliday & Speirs, 2011; Comşa et al., 2015). Los resultados obtenidos en esta línea celular ER⁺, evidencian

que TLR-4 e iNOS a nivel de ARN mensajero se expresa, pero en menor proporción de lo observado en MDA-MB-231. En el caso de TLR-4 estos resultados son similares a lo determinado previamente (Liao et al., 2012; Yang et al., 2014; Mehmeti et al., 2015; Ruiseco-Flores, 2015). Para iNOS, otros grupos han reportado niveles basales indetectables; pero observaron inducción de la expresión bajo el estímulo con mediadores proinflamatorios (Pervin et al., 2007; Bentrari et al., 2015). El uso de esta línea celular demuestra que, de manera independiente a los niveles de expresión de TLR-4, la activación de este receptor estimula la capacidad migratoria en células de CaM. Este resultado es apoyado por Yang y colaboradores en 2014, quienes observaron aumento en la capacidad migratoria a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, en esta línea celular. Por su parte el grupo de Liao y colaboradores en 2012, evidenciaron que a concentraciones menores (0.1 $\mu\text{g/ml}$), no se observan modificaciones en la capacidad de invasiva de las células MCF-7. Se requiere explorar otros de los elementos de la vía TLR-4/NF- κ B/ iNOS/NO/sGC/cGMP para establecer su participación en la estimulación de la capacidad migratoria.

Considerando los resultados obtenidos, se puede proponer un modelo mecanístico de la maquinaria molecular que participan en la capacidad migratoria y proliferativa de las células MDA-MB-231 estimuladas con LPS. La proteína TLR-4 es activada por LPS y estimula la vía de señalización dependiente de MyD88, lo que lleva a la translocación de NF- κ B, el cual regula la expresión funcional de iNOS, la actividad de esta enzima incrementa la concentración intracelular de NO; este actúa modulando la actividad catalítica de sGC produciendo un aumento de los niveles de cGMP, el cual induce la activación de PKG (Fig. 26). Se ha propuesto que las modificaciones en la capacidad migratoria podrían relacionarse con la activación de proteínas efectoras (como PKG), las que estarían interactuando con elementos del citoesqueleto favoreciendo la migración celular (Schwappacher et al., 2013). Se deben realizar estudios adicionales para evaluar la participación de la vía en los cambios en la capacidad proliferativa, pues el efecto se observa a largo plazo y a altas concentraciones, por lo que esto podría estar mediado por mecanismos independientes de iNOS.

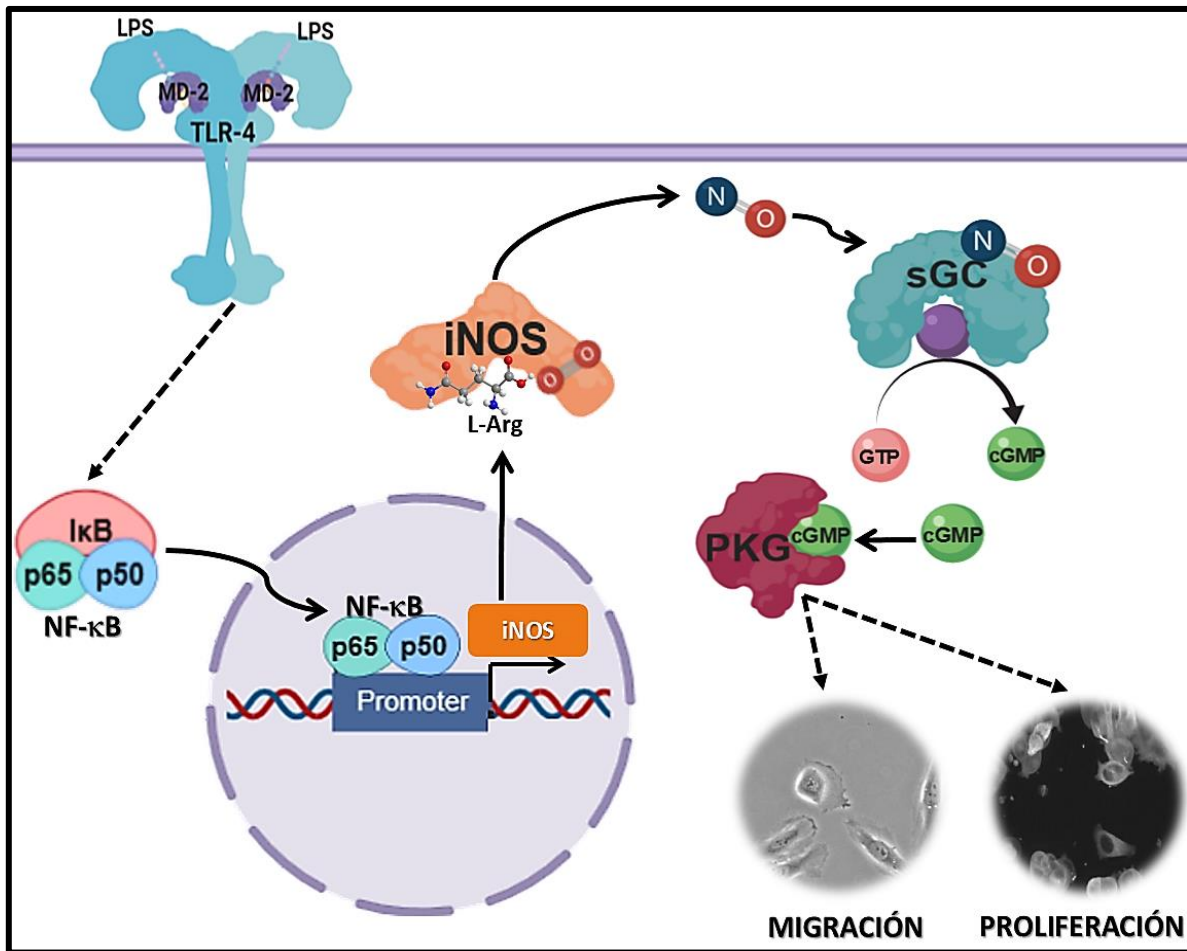


Figura 26. La vía de señalización TLR-4/NF-κB/ iNOS/NO/sGC/cGMP/PKG regula el potencial metastásico. En la línea celular MDA-MB-231, la activación de TLR-4 estimula la vía dependiente de MyD88, lo cual promueve la translocación de NF-κB y estimula la expresión de varios mediadores moleculares proinflamatorio, como iNOS; el cual contribuye, de manera dependiente del tiempo y la concentración en el potencial migratorio o el potencial proliferativo. El NO derivado de la actividad de iNOS, estimula a sGC, la cual cataliza la conversión de GTP en el segundo mensajero intracelular cGMP, este puede activar a PKG, la cual puede modificar las capacidades esenciales de las células tumorales: proliferación y migración.

CONCLUSIONES

1. La activación directa de TLR-4 por LPS produce un efecto estimulador sobre la migración, proliferación y quimiorresistencia de la línea celular MDA-MB-231.
2. TLR-4 al ser activado por LPS, estimula la vía de señalización dependiente de NF- κ B, el cual regula positivamente la expresión funcional de iNOS.
3. El efecto estimulador sobre la capacidad migratoria y proliferativa, dependiente de la activación de TLR-4 por LPS, requiere de la participación de la vía NF- κ B/iNOS/sGC/cGMP/PKG.
4. El tratamiento con LPS estimula la capacidad migratoria en células de bajo potencial metastásico.
5. Los elementos de la vía de señalización TLR4/NF- κ B/iNOS/ NO/sGC/cGMP son potenciales dianas para el desarrollo de alternativas terapéuticas novedosa dirigidas al tratamiento de TNBC, las cuales podrían inhibir o reducir de manera efectiva la capacidad metastásica de las células tumorales, asegurando un mejor pronóstico de vida de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adegoke, EO, Adeniran, SO, Zeng, Y, et al. Pharmacological inhibition of TLR4/NF- κ B with TLR4 - IN - C34 attenuated microcystin - leucine arginine toxicity in bovine Sertoli cells. *J Appl Toxicol*. 2019; 39: 832- 843. <https://doi.org/10.1002/jat.3771>
2. Ahmed A, Gibbs P, Pickles M, Turnbull L. 2013. Texture analysis in assessment and prediction of chemotherapy response in breast cancer. *J Magn Reson Imaging*. 38(1):89 - 101. doi:10.1002/jmri.23971
3. Ahmed, A., Redmond, H.P., Wang, J.H. 2013. Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncoimmunology*. ;2(2):e22945.
4. 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.
5. Akira, S., Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 4,499–511.
6. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006 . Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124,783-801.
7. American Cancer Society. 2020. Tipos de cáncer de seno. Recuperado 25 de mayo de 2020 de; <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>
8. Anders, C.K., Carey, L.A. 2009. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 9 Suppl 2:S73–S81.
9. Andoh, T., Chiueh, C.C., Chock, P.B. 2003. Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Regulates the Expression of Thioredoxin and Thioredoxin Peroxidase-1 during Hormesis in Response to Oxidative Stress-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 10; 278(2):885-890.
10. Anttila MA, Voutilainen K, Merivalo S, Saarikoski S, Kosma VM. 2007. Prognostic significance of iNOS in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 105(1):97 - 103. doi:10.1016/j.ygyno.2006.10.049
11. Aparicio-Carrillo. 2015. Papel del óxido nítrico (NO) y de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) sobre el potencial metastásico de células tumorales de mama, MDA-MB-231. (Tesis de Maestría inédita). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
12. Balkwill, F., Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.
13. Baron JA, Sandler RS. 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med*. 51: 511-523.
14. Basith, S., Manalavan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G, Choi, S. 2012. Roles of Toll-like Receptors in Cancer: A Double-edged Sword for Defense and Offense. *Arch Pharm Res* 35, 1297-1316.
15. Bauer AK, Dixon D, DeGraff LM, et al. 2005. Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*. 97(23):1778 - 1781. doi:10.1093/jnci/dji403
16. Bentrari F, Chantôme A, Knights A, Jeannin JF, Pance A. 2015. Oct-2 forms a complex with Oct-1 on the iNOS promoter and represses transcription by interfering with recruitment of RNA PolII by Oct-1. *Nucleic Acids Res*. 43(20):9757 - 9765. doi:10.1093/nar/gkv829
17. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
18. Bhowmick R, Girotti AW. 2013. Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 57:39 - 48. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.005

19. Brewster, A. M., Chavez-MacGregor, M., & Brown, P. 2014. Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry. *The Lancet Oncology*, 15(13), e625-e634.
20. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10):907-916.
21. Brinton LA, Gaudet MM, Gierach GL. Breast cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018:861-888.
22. Bulut AS, Erden E, Sak SD, Doruk H, Kursun N, Dincol D. Significance of inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant breast epithelium: an immunohistochemical study of 151 cases. *Virchows Arch.* 2005;447(1):24 - 30. doi:10.1007/s00428-005-1250-2
23. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. 2013. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*.34(3):503 - 512. doi:10.1093/carcin/bgt034
24. Casteel, D.E., Zhuang, S., Gudi, T., Tang, J., Vuica, M., Desiderio, S., Pilz, R.B. 2002. cGMP-dependent protein kinase I beta physically and functionally interacts with the transcriptional regulator TFII-I. *J. Biol. Chem.* 277:32003-32014.
25. Chai, S., To, K. K., & Lin, G. 2010. Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chinese medicine*, 5(1), 26.
26. Chang Z.L. 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.* 59, 791-808.
27. Chanvorachote P, Pongrakhananon V, Chunhacha P. 2014. Prolonged nitric oxide exposure enhances anoikis resistance and migration through epithelial-mesenchymal transition and caveolin-1 upregulation. *Biomed Res Int.* 941359. doi:10.1155/2014/941359
28. Chatterjee, S. N., Chaudhuri, K. 2012. Inner and Outer Membrane Vesicles of Bacteria: Gram-Negative Bacteria: The cell Membranes. *SpringerBriefs in Microbiology*.IX, 15-34.
29. Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S. 2010. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 32(1-2):35-48.
30. Cho, H.J.Q.-W., Xie, J., Calaycay, R.A., Mumford, K.M., Swiderek, T.D., Nathan, C . 1992 Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599–604
31. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521–1533.
32. Chu, E., & DeVita, V. T. (2001). Principles of cancer management: chemotherapy. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 6th Edition. Editado por VT DeVita, S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia, 289-386.
33. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. 2009. Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer link to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
34. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 35(6):3147 - 3154.
35. Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-867.
36. Dalmases A, González I, Menendez S, et al. 2014. Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF-κB target genes in human breast cancer. *Oncotarget.* 2014;5(1):196 - 210. doi:10.18632/oncotarget.1556

37. Dalton, W. S. (1993). Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype: Cancer, Principles and Practice of Oncology. Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype: Cancer, Principles and Practice of Oncology.
38. De Nardo, D.G., Andreu, P., Coussens, L.M. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
39. De Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24–37.
40. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. 2018. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* ;19(1):40 - 50. doi:10.1016/S1470-2045(17)30904-X
41. Denninger, J.W., Marletta, M.A. 1999. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 5; 1411 (2-3):334-350.
42. El-Sehemy, A., Postovit, L.M., Fu, Y.2016. Nitric oxide signaling in human ovarian cancer: A potential therapeutic target. *Nitric Oxide.* 1; 54:30-37.
43. Elferink, J. G., De Koster, B. M. 1998. The involvement of protein kinase G in stimulation of neutrophil migration by endothelins. *Eur. J. Pharmacol.* 350, 285–291.
44. Evans RM. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays.* 1998;20(1):79 - 86. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<79::AID-BIES11>3.0.CO;2-5
45. Fairchild CR, Ivy SP, Kao-Shan CS, et al. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1987;47(19):5141 - 5148.
46. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN. 2014. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel).*6(1):436 - 458. Published 2014 Feb 26. doi:10.3390/cancers6010436
47. Felley-Bosco, E., Bender, F.C., Courjault-Gautier, F., Bron, C., Quest, A.F. 2000. Caveolin-1 down regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*19; 97(26):14334-14339.
48. Fernandes JV, Cobucci RN, Jatobá CA, Fernandes TA, de Azevedo JW, de Araújo JM. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(3):527 - 534. doi:10.1007/s12253-015-9913-z.
49. Fiscus, R.R. 1988. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost* 14 Suppl: 12-22.
50. Fiscus, R.R. 2002. Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells. *Neurosignals* 11(4): 175-190.
51. Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. 1994 Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23(6 Pt 2):1121-1131.
52. Förstermann, U., Sessa, W.C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33(7):829-837.
53. Fox JG, Wang TC. 2007. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 117: 60-69.
54. Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D., Sibley, D. 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62(3): 525-563.

55. Fraser M, Chan SL, Chan SS, Fiscus RR, Tsang BK. Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2006;25(15):2203 - 2212. doi:10.1038/sj.onc.1209251
56. Friebe, A., & Koesling, D. 2003. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research*, 93(2), 96-105.
57. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, et al. 2007. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 133(6):1869 - 1881. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.008
58. 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.
59. Gao Y, Zhou S, Xu Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide*. 2019;83:33 - 39. doi:10.1016/j.niox.2018.12.008
60. Gallardo-Arriaga. 2017. Estudio del efecto que ejerce el factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la quimiorresistencia en la línea tumoral MDA-MB-231. (Tesis de Maestría inédita). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
61. Garrido P, Shalaby A, Walsh EM, et al. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017;8(46):80568 - 80588. Published 2017 Jul 26. doi:10.18632/oncotarget.19631
62. Gasparian AV, Yao YJ, Lü J, et al. 2002. Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 1(12):1079 - 1087.
63. Girotti AW. 2016. Modulation of the Anti-Tumor Efficacy of Photodynamic Therapy by Nitric Oxide. *Cancers (Basel)*;8(10):96. Published 2016 Oct 20. doi:10.3390/cancers8100096
64. Glynne, P. A., Darling, K. E., Picot, J., Evans, T. J., 2002. Epithelial inducible nitric-oxide synthase is an apical EBP50-binding protein that directs vectorial nitric oxide output. *J. Biol. Chem*. 277: 33132–33138.
65. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J. Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis associated cancer. *Cancer Cell* 15,103–113.
66. Grivennikov, S.I., Greten F.R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883-899.
67. Gonzalez-Reyes S, Marin L, Gonzalez L, Gonzalez LO, del Casar JM, Lamelas ML, Gonzalez-Quintana JM, Vizoso FJ. 2010. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer*, 10:665.
68. Ham, M., Moon, A. 2013. Inflammatory and microenvironmental factors involved in Breast cancer progression. *Arch. Pharm. Res*. 36:1419–1431.
69. Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. The hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell*. 144, 646-747.
70. Hankinson, S.E., Willett, W.C., Manson, J.E., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Longcope, C., Speizer, F.E. 1995. Alcohol, height and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 87; 1297- 1302.
71. Hare J.M. 2003. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*. 35(7):719-729.
72. Hardman, J.G., Sutherland, E.W. 1969. Guanylcyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3', 5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol. Chem*. 244, 6363-6370.

73. Harlan, L.C. Zujewski, A.J., Goodman, M.T., Stevens J.L. 2010. Breast Cancer in Men in the US: A population-based study of diagnosis, treatment and survival. *Cancer* 116(15): 3558-3568.
74. Harmey JH, Bucana CD, Lu W, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 2002;101(5):415 - 422. doi:10.1002/ijc.10632
75. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:150845. doi:10.1155/2014/150845.
76. Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RY, et al. 2014. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(17):6323 - 6328. doi:10.1073/pnas.1401799111
77. Hickok, J.R., Thomas, D.D. 2010. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Curr Pharm Des*. (4):381-391.
78. Hobbs, A.J. 1997. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*. 18(12):484-489.
79. Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., Schlossmann, J. 2006. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86(1): 1-23.
80. Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P. 2009. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol* 191:137-162.
81. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):215. Published 2011 Aug 12. doi:10.1186/bcr2889
82. Hsiao, C.C., Chen, P.H., Cheng, C.I., Tsai, M.S., Chang, C.Y., Lu, S.C., Hsieh, M.C., Lin, Y.C., Lee, P.H., Kao, Y.H. 2015. Toll-like receptor-4 is a target for suppression of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. *Cancer Lett*. 1; 368(1):144-152.
83. Hua, D., Liu, M.Y., Cheng, Z.D., Qin, X.J., Zhang, H.M., Chen, Y., Qin, G.J., Liang, G., Li, J.N., Han, X.F., Liu, D.X. 2009. Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Mol Immunol* 46, 2876-2884.
84. Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3: 276-285.
85. Ikebe, M., Kitaura, Y., Nakamura, M., Tanaka, H., Yamasaki, A., Nagai, S., Wada, J., Yanai, K., Koga, K., Sato, N., Kubo, M., Tanaka, M., Onishi, H., Katano, M. J. 2009. Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Surg Oncol*. 8, 725-731.
86. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2018. "Estadística a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)" Recuperado el 25 de mayo de 2020, de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
87. Inglés-Esteve J, Morales M, Dalmases A, et al. 2012. Inhibition of specific NF- κ B activity contributes to the tumor suppressor function of 14-3-3 σ in breast cancer. *PLoS One*. 7(5):e38347. doi:10.1371/journal.pone.0038347
88. Jadeski, L. C., Chakraborty, C., & Lala, P. K. (2003). Nitric oxide - mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen - activated protein kinase. *International journal of cancer*, 106(4), 496-504.
89. Jing, Y.Y, Han, Z.P, Sun, K., Zhang, S.S., Hou J., Liu, Y., Li, R., Gao, L., Zhao, X., Zhao, Q.D., Wu M. C., Wei, L.X. 2012. Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide. *BMC Medicine*. 10:98 doi: 10.1186/1741-7015-10-98.

90. Kamisato, S., Uemura, Y., Takami, N., Okamoto, K. 1997. Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J Biochem.* 121(5):862-7.
91. Kanugula AK, Gollavilli PN, Vasamsetti SB, et al. 2014. Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms. *FEBS J.* 281(16):3719 - 3738. doi:10.1111/febs.12893.
92. Karnoub, A.E., Weinberg, R.A. 2006–2007. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26, 75–85.
93. Kastrati I, Edirisinghe PD, Wijewickrama GT, Thatcher GR. Estrogen-induced apoptosis of breast epithelial cells is blocked by NO/cGMP and mediated by extranuclear estrogen receptors. *Endocrinology.* 2010;151(12):5602 - 5616. doi:10.1210/en.2010-0378
94. Kawai, T., Akira, S., 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 338-344.
95. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, et al. 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66(7):3859 - 3868. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3948
96. Kidd, L. C R., Rogers, E.N., Yeyeodu, S.T., Jones, D.Z., Kimbro, K.S. 2013. Contribution of toll-like receptor signaling pathways to breast tumorigenesis and Treatment Breast Cancer. *Dove Med Press.* 5: 43–51.
97. Knowles, R.G., Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298 (Pt 2):249-58.
98. Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K. et al. 2000 Lipopolysaccharide increases cyclooxygenase-2 in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kB activation. *Oncogene* 19, 1225-1231.
99. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kröncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. 1998. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 111(2):286 - 291. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00268.x
100. Kumar, N., Drabu, S., Mondal, S.C. 2013. NSAID's and selectively COX-2 inhibitors as potential chemoprotective agents against cancer: 1st Cancer Update. *Arabian Journal of Chemistry* 6(1): 1-23.
101. Laloo, F., Evans, D.G. 2012. Familial breast cancer. *Clin Genet.* 82(2):105-114
102. Lapensee EW, Tuttle TR, Fox SR, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *Environ Health Perspect.* 2009;117(2):175 - 180. doi:10.1289/ehp.11788
103. Lau MC, Ng KY, Wong TL, Tong M, Lee TK, Ming XY, Law S, Lee NP, Cheung AL, Qin YR, Chan KW, Ning W, Guan XY, Ma S (2017) FSTL1 promotes metastasis and chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma through NFkappaB-bmp signaling cross-talk. *Cancer Res* 77(21):5886–5899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1411>
104. Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Hwang, D., 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 276(20):16683-16689.
105. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells.* 2003;16(1):97 - 105.
106. Lehnert, M. (1996). Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *European Journal of Cancer*, 32(6), 912-920.

107. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121(7): 2750–67.
108. Leung EL, Fraser M, Fiscus RR, Tsang BK. 2008. Cisplatin alters nitric oxide synthase levels in human ovarian cancer cells: involvement in p53 regulation and cisplatin resistance. *Br J Cancer*. 98(11):1803 - 1809. doi:10.1038/sj.bjc.6604375
109. Leung, E.L., Wong, J.C., Johlf, M.G., Tsang, B.K., Fiscus R.R. 2010. Protein kinase G type I α activity in human ovarian cancer cells significantly contributes to enhanced Src activation and DNA synthesis/cell proliferation. *Mol Cancer Res* 8(4): 578-91.
- 110.
111. Li, J., T.R. Billiar, R.V. Talanian, and Y.M. Kim. 1997a. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240,419– 424.
112. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q, Wang Y, Lai YJ, LaBaff AM, Wu TJ, Lin BR, Yang MH, Hortobagyi GN & Hung MC. 2012. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 72, 1290-1300.
113. Liao S-J, Zhou Y-H, Yuan Y, Li D, Wu F-H, et al. 2012. Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes α v β 3-mediated adhesion and invasive migration. *Breast Cancer Research and Treatment* 133: 853–863.
114. Lin, W.W., Karin, M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183.
115. Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H. 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 91(3): 1421-1430.
116. Liu, J., Hu, S., Cui, Y., Sun, M.K., Xie, F., Zhang, Q., Jin, J. 2014. Saturated fatty acids up-regulate COX-2 expression in prostate epithelial cells via toll-like receptor 4/NF- κ B signaling. *Inflammation*. 37(2):467-477.
117. Liu Y, Li W, Guo M, Li C, Qiu C. 2016. Protective Role of Selenium Compounds on the Proliferation, Apoptosis, and Angiogenesis of a Canine Breast Cancer Cell Line. *Biol Trace Elem Res.* 169(1):86 - 93. doi:10.1007/s12011-015-0387-3
118. Lorusso, G., Rüegg, C. 2008. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 30(6), 1091-1103
119. Luo, J.L., Tan, W., Ricono, J.M., Korchynskyi, O., Zhang, M., Gonias, S.L., Cheres, D.A., Karin, M. 2007. Nuclear cytokine-activated IKK α controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446,690–694.
120. MacMicking, J., Xie, Q.W, Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323–350.
121. Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Boscá, L., Leza, J.C. 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem.* 76(2):532-538.
122. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
123. Marinello PC, Panis C, Silva TNX, et al. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Sci Rep.* 2019;9(1):5864. Published 2019 Apr 10. doi:10.1038/s41598-019-42357-w
124. Martinez-Ruiz, S. Lamas. (2005). Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 423:192–199.
125. Masters, B.S. 1994. Nitric oxide synthases: why so complex? *Annu Rev Nutr.* 14:131-145.

126. Mayanagi, T., Sobue, K. 2011. Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh Migr* 5:150-159.
127. McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. 2000. ABC of Breast Disease, Clinical review. *BMJ*. 9; 32:624-628.
128. Mehmeti, M., Allaoui, R., Bergenfelz, C., Saal, L.H., Ethier, S.P., Johansson, M.E., Jirstrom, K., Leandersson, K. 2015. Expression of functional toll like receptor 4 in estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015 Sep 22; 17:130.
129. Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G., Koesling, D. 2003. Major occurrence of the new alpha(2)beta(1) isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signall*. 15, 189–195.
130. Middendorff, R., Kumm, M., Davidoff, M.S., Holstein, A.F., Muller D. 2000. Generation of cyclic guanosine monophosphate by heme oxygenases in the human testis-a regulatory role for carbon monoxide in Sertoli cells. *Biol. Reprod*. 63:651–657.
131. Mikkelsen, R.B., Wardman, P. 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 22(37):5734-5754.
132. Milne, R.L., Knight, J., John, E.M., Dite, G.S., Balbuena, R., Ziogas, A., Andrulis, I.L., West, D.W., Li, F.P., Southey, M.C., Giles, G.G., Margaret McCredie, M.R.E., Hopper, J.L., Whittemore, A.S. 2005. Oral Contraceptive Use and Risk of Early-Onset Breast Cancer in Carriers and Noncarriers of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14 (2):350-356.
133. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl(0):S78 - S103. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.001
134. Moncada, S., Higgs, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway *N Engl J Med*. 30; 329(27):2002-2012.
135. Munn LL. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017;9(2):10.1002/wsbm.1370. doi:10.1002/wsbm.1370.
136. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med*. 2018;23(1):50. Published 2018 Oct 20. doi:10.1186/s12199-018-0740-1
137. Natarajan K, Abraham P, Kota R, Isaac B. NF-κB-iNOS-COX2-TNFα inflammatory signaling pathway plays an important role in methotrexate induced small intestinal injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2018;118:766 - 783. doi:10.1016/j.fct.2018.06.040
138. Nathan, C.F., Hibbs, J.B. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol*. 3:65–70.
139. Nathan, C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*. 100(10): 2417–2423.
140. Navarro-Lerida, I., Corvi, M.M., Alvarez-Barrientos, A., Gavilanes, F., Berthiaume, L.G., Rodriguez-Crespo, I. 2004. Palmitoylation of inducible NOS at Cys3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis *J Biol Chem*. 2004 Dec 31;279(53):55682-55689.
141. Navarro-Lerida, I., Alvarez-Barrientos, A., Rodriguez-Crespo, I. 2006. N-terminal palmitoylation within the appropriate amino acid environment conveys on NOS2 the ability to progress along the intracellular sorting pathways. *J. Cell Sci*. 119, 1558-1569.
142. Navarro-Lerida, I., Martínez-Moreno, M., Ventoso, I., Alvarez-Barrientos, A., Rodríguez-Crespo, I. 2007. Binding of CAP70 to inducible nitric oxide synthase and implications for the vectorial release of nitric oxide in polarized cells. *Mol Biol Cell*. 18(7):2768-2777.
143. Neal, M. D., Jia, H., Eyer, B., Good, M., Guerriero, C. J., Sodhi, C. P.,...Hackam, D. J. (2013). Discovery and validation of a new class of small molecule toll - like receptor 4 (TLR4) Inhibitors. *PLoS One*, 8(6), e65779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065779>

144. O'Neill, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol* 18, 3-9.
145. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Recuperado el 28 de febrero 2020, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
146. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2018. El cáncer de mama en las Américas. Recuperado el 25 de mayo de 2020, de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=fact-sheets-4855&alias=46715-fact-sheet-breast-cancer-in-the-americas-2018&Itemid=270&lang=es
147. Pandey, S., Agrawal, D. K. 2006. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell Biol.* 84, 333-341.
148. Pei Z, Li H, Guo Y, Jin Y, Lin D. Sodium selenite inhibits the expression of VEGF, TGFbeta(1) and IL-6 induced by LPS in human PC3 cells via TLR4-NF-(K)B signaling blockage. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(1):50 - 56. doi:10.1016/j.intimp.2009.09.020
149. Pervin S, Singh R, Hernandez E, Wu G, Chaudhuri G. 2007. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res.* 67(1):289 - 299. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4623
150. Pifarré, P., García, A., Mengod, G. 2007. Species differences in the localization of soluble guanylyl cyclase subunits in monkey and rat brain. *J Comp Neurol.* 500(5):942-957.
151. Pilz, R.B., Casteel, D.E. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93(11): 1034-1046.
152. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem.* 2010;336(1-2):25 - 37. doi:10.1007/s11010-009-0267-2
153. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* 2018;13(3):325 - 338. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.004
154. Puente J, Velasco G. 2019. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Madrid. Sociedad Española de Oncología Médica. Recuperado el 20 de mayo de 2020 de <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>.
155. Punathil, T. Katiyar, S.K. 2009. Inhibition of non-small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2. *Mol Carcinog* 48:232-242.
156. Qian, B.Z., Pollard, J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
157. Rajput, S., Volk-Draper, L. D., Ran, S. 2013. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer, *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8): 1676-1687.
158. Rangaswami, H., Schwappacher, R., Marathe, N., Zhuang, S., Casteel, D.E., Haas, B., Chen, Y., Pfeifer, A., Kato, H., Shattil, S., Boss, G.R., Pilz, R.B. 2010. Cyclic GMP and protein kinase G control a Src-containing mechanosome in osteoblasts. *Sci Signal* 3:ra91.
159. Ratovitski, E. A., Alam, M. R., Quick, R. A., McMillan, A., Bao, C., Kozlovsky, C., Hand, T. A., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A. et al. 1999a. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 993-999.
160. Ratovitski, E. A., Bao, C., Quick, R. A., McMillan, A., Kozlovsky, C. and Lowenstein, C. J. (1999b). An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *J. Biol. Chem.* 274, 30250-30257
161. Richie, R.C., Swanson, J.O. 2003. Breast Cancer: A Review of the Literature. *J Insur Med.* 35:85-101
162. Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, et al. 2007. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(43):16898 - 16903. doi:10.1073/pnas.0702761104.

163. Romero-Cordoba S, Meneghini E, Sant M, et al. 2019. Decoding Immune Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer and Its Association with Systemic Inflammation. *Cancers* (Basel).11(7):911. Published 2019 Jun 28. doi:10.3390/cancers11070911
164. Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Mulsch, A., Dimmeler, S. 1999. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.*274:6823–6826.
165. Ruiseco-Flores, K. 2015. La activación del receptor “*Toll-like 4*” (TLR-4) por lipopolisacárido (LPS) estimula la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB-231, provenientes de cáncer de mama. (Tesis de Maestría inédita). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
166. Sánchez-Suárez, P., & Bentiez-Bibriesca, L. (2006). Procesos biomoleculares de la Resistencia a drogas. *Cancerología*, 1, 187-199.
167. Sakallı Çetin E, Nazıroğlu M, Çiğ B, Övey İS, Aslan Koşar P. 2017. Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of the TRPV1 channel. *J Recept Signal Transduct Res.* 37(1):84 - 93. doi:10.3109/10799893.2016.1160931
168. Satelli A, Li S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.*68(18):3033 - 3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1
169. Schwappacher R, Rangaswami H, Su-Yuo J, Hassad A, Spitler R, Casteel DE. 2013. cGMP-dependent protein kinase I β regulates breast cancer cell migration and invasion via interaction with the actin/myosin-associated protein caldesmon. *J Cell Sci* 126:1626-1636.
170. Senzaki, H., Smith, C.J., Juang, G.J., Isoda, T., Mayer, S.P., Ohler, A., Paolocci, N., Tomaselli, G.F., Hare, J.M., Kass, D.A. 2001. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J.* 15(10):1718-1726.
171. Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G. 2013. Mitochondrial-associated nitric oxide synthase activity inhibits cytochrome c oxidase: implications for breast cancer. *Free Radic Biol Med.*;57:210 - 220. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.545
172. Shacter E, Weitzman SA. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology.* 16: 217-226.
173. Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, et al. Pathological Response and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Carboplatin plus Docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2018;24(23):5820 - 5829. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0585
174. Shostak K, Chariot A. 2015, EGFR and NF- κ B: partners in cancer. *Trends Mol Med.* 21(6):385 - 393. doi:10.1016/j.molmed.2015.04.001
175. Stamler, J.S., Lamas, S., Fang, F.C.2001. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.* 21; 106(6):675-683.
176. Switzer CH, Glynn SA, Cheng RY, et al.2012. S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Mol Cancer Res.* 10(9):1203 - 1215. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0124
177. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al.2009. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 69(7):3105 - 3113. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3838
178. Tanneti, L., D'Emilia, D.M., Lipton, S.A. 1997. Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett.* 236(3):139-142.
179. Thomsen, L. L., & Miles, D. W. 1998. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 107-118.

180. Tomao, F., Papa, A., Zaccarelli, E., Rossi, L., Caruso, D., Minozzi, M., Vici, P., Frati, L., & Tomao, S. 2015. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and therapy*, 8, 177–193. <https://doi.org/10.2147/OTT.S67673>
181. Triantafilou, M., Triantafilou, K. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23(6):301-304
182. Tuttle TR, Mierzwa ML, Wells SI, Fox SR, Ben-Jonathan N. The cyclic GMP/protein kinase G pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2016;370(2):279 - 285. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.024
183. Tyryshkin, A., Gorgun, F.M., Abdel Fattah, E., Mazumdar, T., Pandit, L., Zeng, S., Eissa, N.T. 2010. Src kinase-mediated phosphorylation stabilizes inducible nitric-oxide synthase in normal cells and cancer cells. *J Biol Chem.* 285(1):784-792.
184. Uhler MD. 1993. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 268:13586-13591.
185. Uemura Y., Okamoto K. 1997. Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41, 57–64.
186. Vannini, F., Kashfi, K., Nath, N. 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* 6:334-43.
187. VanUffelen, B. E., De Koster, B. M., VanSteveninck, J., Elferink, J. G. 1996. Carbon monoxide enhances human neutrophil migration in a cyclic GMP-dependent way. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 21–26
188. Vasudevan, D., Thomas, D.D. 2014. Insights into the diverse effects of nitric oxide on Tumor biology. *Vitam Horm.* 96:265-98.
189. Vázquez-Rojas. 2015. La presencia de citocinas proinflamatorias exacerba la capacidad proliferativa y migratoria de células provenientes de cáncer de mama. (Tesis de Maestría inédita). Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
190. Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K, Bando Y, Kudo E, Shimada M., Sano T. 2010. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *BrJ Cancer* 102, 908-915.
191. Wang, L., Zhu, R., Huang, Z., Li, H., Zhu, H. 2013. Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma, *Dig Dis Sci.* 58(8):2223-22236.
192. Windham PF, Tinsley HN. cGMP signaling as a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015;31:106 - 110. doi:10.1016/j.semcancer.2014.06.006
193. Wong, J.C., Bathina, M., Fiscus, R.R. 2012. Cyclic GMP/protein kinase G type-I α (PKG-I α) signaling pathway promotes CREB phosphorylation and maintains higher c-IAP1, livin, survivin, and Mcl-1 expression and the inhibition of PKG-I α kinase activity synergizes with cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *J Cell Biochem.* 13(11):3587-3598.
194. Xia C1, Misra I, Iyanagi T, Kim JJ. 2009. Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 30; 284(44):30708-30717.
195. Xu, W., Charles, I.G., Moncada, S. 2005. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Research*, 15, 63–65.
196. Yamaguchi N, Ito T, Azuma S, Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, et al. 2009. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* 100:1668–16674.
197. Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X. Shen, H., y Zhu, X. 2010. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* 29:92.

198. Yang H, Wang B, Wang T, et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PLoS One*. 2014;9(10):e109980. Published 2014 Oct 9. doi:10.1371/journal.pone.0109980
199. Yoshida, M., Xia, Y. 2003. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19; 278(38):36953-36958.
200. Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809.
201. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. 2018. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci*.;19(12):3805. Published 2018 Nov 29. doi:10.3390/ijms19123805
202. Zaharia M, Gómez H. 2013. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento [Triple negative breast cancer: a difficult disease to diagnose and treat]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.;30(4):649 - 656.
203. Zhang L, Liu J, Wang X, et al. 2014. Upregulation of cytoskeleton protein and extracellular matrix protein induced by stromal-derived nitric oxide promotes lung cancer invasion and metastasis. *Curr Mol Med*. 14(6):762 - 771. doi:10.2174/1566524014666140724103147
204. Zhao, T., Guo, D., Gu, Y., & Ling, Y. 2017. Nifedipine stimulates proliferation and migration of different breast cancer cells by distinct pathways. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 2259-2263.
205. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst*.1993;85:1819-1827.
206. Zhou J, Yang Y, Gan T, et al. 2019. Lung cancer cells release high mobility group box 1 and promote the formation of neutrophil extracellular traps. *Oncol Lett*.18(1):181 - 188. doi:10.3892/ol.2019.10290.
207. Zhuang T, Chelluboina B, Ponnala S, et al. 2013. Involvement of nitric oxide synthase in matrix metalloproteinase-9- and/or urokinase plasminogen activator receptor-mediated glioma cell migration. *BMC Cancer*. 13:590. Published 2013 Dec 11. doi:10.1186/1471-2407-13-590