



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudio de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9
en líneas celulares de Cáncer de mama y su
asociación a procesos invasivos**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ANA PAOLA GARCÍA SÁNCHEZ

DIRECTORA:

DRA. MARICRUZ ANAYA RUIZ

OCTUBRE 2018



DEDICATORIAS

*Para esa persona que me hizo comprender que el amor verdadero es ese que se entrega, sin esperar nada a cambio, mi **MADRE**.*

*Para mi Superhéroe, mi fortaleza inexpugnable y mi paño de lágrimas, mi **PADRE**.*

*Para mi compañera de vida y el mejor regalo que mis padres me pudieron dar, mi **HERMANA**.*

*Para un bello ángel que fue un gran guerrero en la tierra y que ahora se encuentra en el cielo, pero siempre presente en mi corazón, para ti hermano **JCTS** †. Que tu lucha fue mi motivación para seguir día a día.*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación del Oriente (CIBIOR) por permitirme realizar este proyecto y brindarme las herramientas que necesité.

A la Dra. Maricruz Anaya Ruiz, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y brindarme la confianza de llevar a cabo un proyecto tan interesante. Gracias por todo su apoyo, conocimiento y su tiempo que me dio cada día durante mi estancia.

Al M. en C. Jonathan Guerrero Reyes, por todo el apoyo, paciencia y conocimiento que me brindó durante mi estancia en el laboratorio. Más que un compañero fuiste un amigo y un gran ejemplo a seguir.

A la Dra. Guadalupe Delgado López, por su conocimiento y apoyo que me dio durante mi estancia en el laboratorio.

A mis sinodales: la Dra. Lorena Milflores Flores, por haber aceptado ser revisora de este trabajo y por su tiempo y dedicación que me ha brindado. A la Dra. Rosalina Reyes Luna por su tiempo, dedicación y por ser muy atenta.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biología Celular: Ceci, Ariadna, Aurora, Ángeles, Juan Carlos, Jesús y David, gracias por su apoyo y amistad incondicional que me brindaron cada día.

A mis amigos y compañeros del CIBIOR de otros laboratorios: Samanta, Fanny, Areli, Dalia, Ileana, William, Caro, Ane, Johari, Química Tony, Química Blanquita y Rosario. Gracias por brindarme su apoyo, conocimientos y por haberme prestado algunos de sus equipos para hacer mis experimentos.

A mis padres Anita y Raúl por sus palabras de aliento, por sus abrazos en mis momentos de frustración y por todo su apoyo, amor, cariño y comprensión. Gracias por ser los mejores maestros de vida y por confiar en mí, gracias a ustedes soy lo que soy. Los amo muchísimo.

A mi hermana Daniela por acompañarme al CIBIOR cuando requerí ir los domingos, por su compañía y en especial por todo su amor incondicional que me da día a día. Gracias por nunca soltarme de la mano.

A mi consejero, mejor amigo y novio Mario, gracias por todo tu amor, cariño y consejos que me brindas cada día.

A mi familia por todo su amor y apoyo que me dan incondicionalmente. Gracias por siempre estar ahí.

El presente proyecto se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) que pertenece al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) bajo la Dirección de la Doctora Maricruz Anaya Ruiz, responsable del Laboratorio de Biología Celular.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLA	11
RESUMEN	12
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Definición del Cáncer	14
1.2 Origen del cáncer	14
1.3 Epidemiología del cáncer de mama.....	16
1.4 Anatomía de la mama y cáncer de mama	17
1.5 Clasificación fisiológica del cáncer de mama	18
1.6 Clasificación molecular del cáncer de mama.....	21
1.6.1 Tumores de receptor estrógenos positivos	21
1.6.2 Tumor receptor de estrógenos negativo	22
1.7 Metástasis e Invasión	23
1.8 Papel de las proteasas en la progresión tumoral	26
1.9 Metaloproteinasas y su clasificación	27
1.10 Metaloproteinasas y su estructura	29
1.11 Activación de las Metaloproteinasas.....	30
1.12 Inhibidores de las Metaloproteinasas	30
1.13 Funciones de las Metaloproteinasas	31
1.14 Metaloproteinasas en los procesos de intravasación, circulación y extravasación	31
1.15 Matriz Metaloproteinasas 2 (MMP-2).....	33
1.16 Matriz Metaloproteinasas 9 (MMP-9).....	34
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	35
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	41
CAPÍTULO IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
4.1 Hipótesis.....	42
4.2 Objetivo general	42
4.3 Objetivos específicos	42
CAPÍTULO V. METODOLOGÍA	43

5.1 Líneas celulares de cáncer de mama	43
5.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama	47
5.3 Sembrado de células y recolección del medio de cultivo	48
5.4 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	48
5.5 Detección de la actividad enzimática de las MMPs por Zimografía	49
5.6 Identificación de MMPs por Inmunofluorescencia	49
5.7 Cuantificación de MMPs por Citometría de Flujo	50
CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....	51
6.1 Detección de la actividad enzimática de las MMP-2 y MMP-9 por Zimografía.....	51
6.2 Identificación de MMPs por Inmunofluorescencia	53
6.3 Cuantificación de MMPs por Citometría de Flujo	60
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.....	64
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	71
ANEXOS	73
REFERENCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía de la vista lateral de la mama

Figura 2: Proceso que conlleva la Metástasis

Figura 3. Clasificación y estructura de las MMPs

Figura 4. Proceso metastásico de múltiples pasos de células de cáncer

Figura 5. Morfología de la Línea Celular MCF10A

Figura 6. Morfología de la Línea Celular BT-549

Figura 7. Morfología de la Línea Celular MDA-MB-231

Figura 8. Morfología de la Línea Celular MCF7

Figura 9. Morfología de la Línea Celular T47D

Figura 10. Detección de la actividad enzimática de las MMP- 2 y MMP-9 en líneas celulares de cáncer de mama.

Figura 11. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no tumoral MCF10A.

Figura 12. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva BT-549.

Figura 13. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva MDA-MB-231.

Figura 14. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no invasiva MCF7

Figura 15. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no invasiva T47D

Figura 16. Comparación de la Expresión de las MMPs entre las líneas celulares de Cáncer de Mama

Figura 17. Cuantificación por Citometría de Flujo de lasMMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva BT-549

Figura 18. Cuantificación de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva MDA-MB-231

Figura 19. Intensidad media de Fluorescencia

LISTA DE TABLA

Tabla 1. Resumen de la estatificación de cáncer de mama

Tabla 2: Clasificación de los subtipos de cáncer de mama

Tabla 3. Clasificación de los tumores

Tabla 4. Líneas celulares de cáncer de mama.

Tabla 5. Líneas celulares de cáncer de mama y sus medios requeridos

Tabla 6. Células de cáncer de mamas positivas y negativas para la MMP-2 y MMP.

RESUMEN

En la actualidad la incidencia de cáncer de mama en México ha aumentado y a partir de 2006, éste ocupa la primera causa de mortalidad en mujeres de 30 a 54 años de edad, y amenaza a todos los grupos socioeconómicos del país.

El cáncer de mama es el crecimiento anormal desordenado de las células de epitelio de los conductos o lobulillos mamarios, los cuales tienen la capacidad de diseminarse. En términos fisiológicos, la glándula mamaria es un órgano complejo secretorio que consta de distintos tipos celulares como son: células epiteliales, adipocitos, células endoteliales vasculares y células estromales como son los fibroblastos.

Durante los primeros eventos que conllevan al proceso invasivo, las células tumorales necesitan degradar la matriz extracelular (MEC) a través de la activación y liberación de una variedad de enzimas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMPs), de esta manera, la célula tumoral logra escapar y comenzar a colonizar nuevos nichos (metástasis).

Las MMPs son enzimas que pertenecen a la familia de las endopeptidasas que son dependientes de Calcio y Zinc, las cuales tienen la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular, ya que tienen una gran variedad de sustratos como los receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, citoquinas, ligandos apoptóticos, factores antigénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

El presente trabajo tiene como objetivo general comparar la presencia y actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama y relacionarlas con el grado de invasividad.

Para detectar la actividad enzimática de las MMPs, se realizaron ensayos de Zimografía en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando la gelatina como sustrato. Así, se logró identificar a las MMP-2 y MMP-9 en todas las líneas celulares estudiadas. De manera importante, la MMP-9, se secreta mayoritariamente en las líneas celulares invasivas (MDA-MB-231 y BT-549), a diferencia de la MMP-2 que la secretan las células no invasivas (MCF7 y T47D).

En relación a la localización de dichas enzimas, los ensayos de inmunofluorescencia evidenciaron la presencia de la MMP-2 y la MMP-9 en el citoplasma de las células invasivas. Interesantemente, en las células no invasivas la MMP-2 se evidenció de forma polarizada en una zona del citoplasma y la MMP-9 en todo el citoplasma y de forma polarizada.

Con la finalidad de cuantificar la actividad de ambas MMPs en las células cancerosas, se realizaron ensayos por Citometría de Flujo y los resultados mostraron que la MMP-9 es la enzima que está presente en mayor cantidad en las células invasivas, comparada con la MMP-2.

Nuestros resultados confirmaron que las MMP-2 y MMP-9 están presentes en las células de cáncer de mama, pudiendo jugar un papel importante en la invasión y formación de tumores, tal y como se ha descrito en otros tipos de cáncer como el de pulmón, vejiga e intestino.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición del Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se relaciona con anomalías genéticas en las células somáticas, las cuales son causadas por diversos factores, como por ejemplo: por agentes físicos, químicos, infecciones virales, acumulaciones de mutaciones en la replicación del ADN, también por divisiones celulares aberrantes, o simplemente es heredable⁽¹⁾.

Estas alteraciones van a afectar a genes que están relacionados con la regulación del ciclo celular como son la angiogénesis y la invasión del tejido circundante, asimismo, van a afectar a los procesos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, lo que va provocar un crecimiento descontrolado y a su vez, las células adquieren un fenotipo invasivo. La elevada tasa de duplicación celular origina una masa celular llamada neoplasia. Si estas células se mantienen agrupadas y forman una masa con un contorno bien definido, se dice que el tumor es benigno, de manera contraria, un tumor es maligno cuando las células tienen la capacidad de invadir otros tejidos de manera circundante.

1.2 Origen del cáncer

Actualmente se han descrito ciertos factores que pueden intervenir en el desarrollo del cáncer; entre ellos destacan sustancias químicas, herencia, las radiaciones ionizantes, infecciones y los virus o por alguna lesión externa.

Sustancias químicas: actualmente se conocen muchas sustancias carcinogénicas que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer, ya sea por su consumo o contacto. Un ejemplo muy claro es el Arsénico que se asocia con el cáncer de pulmón, debido a que estudios realizados a los trabajadores de minas de cobre y cobalto, fundiciones y fábricas de insecticidas presentaban una incidencia de este tipo de cáncer mayor que lo normal. El tabaco es otro agente

cancerígeno que provoca cáncer de pulmón y es 6 veces mayor entre fumadores y no fumadores. El cigarrillo es tan pernicioso debido a las sustancias que contiene que son la nicotina, ácidos y óxidos de carbono y alquitrán.

Herencia: entre el 5 y 10% de los cánceres tienen un origen hereditario; por ejemplo el cáncer de mama y el cáncer de colon. Esto se debe a que los genes supresores de tumores en condiciones normales previenen la replicación, en cambio si no está presente esto provoca que no haya un control normal de la replicación y esto provoque un daño intrínseco en los cromosomas y conlleve a un cáncer elevado. Un ejemplo muy claro es la mutación de p53. Este gen se encuentra en el núcleo celular, y no siempre es requerido para llevar un desarrollo normal, pero en ocasiones la falta de su función provoca un riesgo grande de desarrollar cáncer. En diferentes tipos de cáncer se ha encontrado la mutación de p53, es por esto que se considera un gen supresor de tumores, este gen normalmente se encuentra en cantidades muy pequeñas, pero cuando las células presentan un estímulo genotóxico, los niveles de p53 aumentan rápidamente e inician un programa de muerte celular. Esta respuesta por lo general se pierde en muchas células tumorales, debido a que tienen inactivado a este gen por mutación o su actividad se encuentra bloqueada por proteínas que se entrelazan a p53 y se neutralizan ⁽¹⁾.

Radiaciones ionizantes: producen un cambio en el ADN como rupturas o trasposiciones cromosómicas en las que los cabos rotos de los cromosomas se pueden intercambiar. Éstas también actúan como un iniciador de carcinogénesis.

Infecciones o virus: actualmente se han asociado algunos agentes patógenos al desarrollo de cáncer, por ejemplo, aquellos que se relacionan con el virus del SIDA. También el cáncer de estómago se ha relacionado con la bacteria *Helicobacter pylori*, ya que algunos estudios demostraron que las personas que están infectadas con esta bacteria, tienen cuatro veces más de probabilidad de desarrollar este cáncer. El virus de Epstein-Barr está asociado con el linfoma de

Burkitt y los linfopiteliomas, virus de la hepatitis con el hepatocarcinoma y el virus herpes tipo II o virus del herpes genital con el carcinoma de cérvix ⁽²⁾.

1.3 Epidemiología del cáncer de mama

En el 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que los principales tipos de cáncer que existen en México son: el de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago. Los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado ⁽²⁾.

A nivel global, los últimos datos provenientes del Informe Mundial sobre el Cáncer del 2014 de la International Agency for Research on Cancer (IARC), señalan que en el 2012 hubo aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de defunciones por esta causa, así como 32.6 millones de personas sobrevivientes a la enfermedad (es decir, que han pasado cinco años después del diagnóstico sin presentar recurrencias). En África, Asia, América Central y Sudamérica se concentra más del 60% de los casos nuevos y 70% de las defunciones por cáncer ⁽³⁾.

En México, en las últimas cinco décadas, la tasa de mortalidad del cáncer de mama ha aumentado, ya que mujeres de entre 30 a 54 años que presentan esta enfermedad, el 60% mueren ⁽⁴⁾.

1.4 Anatomía de la mama y cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de las células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios, que tienen la capacidad de diseminarse ⁽⁵⁾.

En términos fisiológicos, la glándula mamaria es un órgano complejo secretorio que consta de distintos tipos de células como son las epiteliales, que se encargan de formar la red de la glándula, adipocitos que son los componentes de una almohadilla de grasa de los conductos que están inmersos, células endoteliales vasculares que van a conformar los vasos sanguíneos y células estromales como fibroblastos. En la Figura 1, se puede observar con claridad la anatomía del seno y la separación de los tejidos mamarios. Cada lóbulo está conformado por lobulillos pequeños, terminando en docenas de bulbos, los cuales se encargan de producir leche. Los lóbulos, lobulillos y bulbos se encuentran conectados por tubos delgados que reciben el nombre de conductos, los cuales se derivan al pezón.

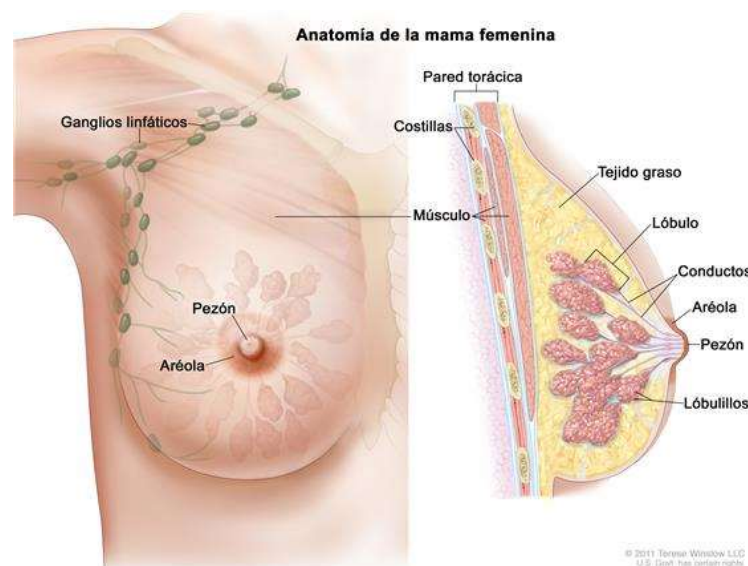


Figura 1. Anatomía de la vista lateral de la mama. En donde se observa la separación de los tejidos mamarios y cómo está conformado cada lóbulo.

El epitelio de la glándula mamaria se va a dividir en dos tipos: luminal y basal. El luminal es el que conforma los conductos y los lóbulos, mientras que el basal está

compuesto esencialmente por células miopitelilales, cuyo origen es epitelial, pero tienen la capacidad de contraerse, ya que es el encargado de producir leche.

La mujer pasa por diferentes etapas como la pubertad, el embarazo, la lactancia y la menopausia. En consecuencia de ello, la mama va a tener cambios drásticos en tamaño, forma y función, debido a que es un órgano muy sensible ⁽⁶⁾.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, debido a esto se conocen múltiples subtipos de este padecimiento, que se mencionarán más adelante. Cada uno tiene diferente expresión génica, la cual se asocia con la progresión clínica que puede implicar la resistencia a los diferentes tratamientos ⁽⁷⁾.

1.5 Clasificación fisiológica del cáncer de mama

De manera clínica de acuerdo con la OMS y a la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002 el cáncer de mama se divide en no invasor (*in situ*) e invasor y otros como enfermedades de Paget de pezón.

En la población de pacientes con cáncer de mama, alrededor del 75-80% presentan el cáncer de mama invasivo infiltrante, ya que las células tienen la capacidad de infiltrar alrededor de los canales linfáticos y vasculares dando origen a la metástasis. El cáncer más común histológicamente es el carcinoma ductal invasivo, que está confinado con el sistema ductal de la mama sin que éste penetre hacia la membrana basal. El segundo más frecuente es el lobulillar invasor, éste se origina en el lobulillo terminal ductal que se distribuye de manera difusa en la mama. La enfermedad de Paget es muy rara, ya que se presenta en el 1% de los cánceres de mama ⁽⁸⁾.

Carcinoma *in situ*: se denomina así al tumor que no tiene la capacidad de infiltrar en las uniones de los tejidos:

Carcinoma ductal *in situ*: es el cáncer más común, no invasivo y se localiza en los conductos.

Carcinoma lobulillar *in situ*: es poco frecuente, se presenta con hiperplasia atípica que se origina en los lobulillos de la mama, se considera como un marcador de riesgo.

Carcinoma invasivo (infiltrante): éste presenta modificaciones genéticas altas, ya que el tumor invade tejidos subyacentes vertiendo células a la sangre o linfa, generando metástasis:

Carcinoma ductal invasivo o infiltrante: es el cáncer más común. Empieza en un canal o conducto lácteo, el cual penetra la pared del conducto e invade el tejido del seno, realizando metástasis.

Carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante: se origina en los lobulillos de la glándula mamaria, propagándose a través de la pared de los lobulillos. También produce metástasis.

Para poder diagnosticar el cáncer de mama se emplean principalmente dos métodos: el primero es la mastografía, que es la exploración por rayos X, la cual consiste en realizar radiografías de las dos mamas. Las imágenes obtenidas permiten visualizar el tipo, posición y tamaño de un bulto. El segundo es la biopsia, que se extrae de un bulto sospechoso, el cual se examina al microscopio para determinar la presencia de células cancerosas. A veces, se emplean los ultrasonidos (ecografía) para examinar el estado de las mamas y los órganos internos.

El cáncer de mama tiene una estadificación que está basada en el sistema internacional denominado TNM, que toma en cuenta la extensión del tumor (T), la afectación de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). En la Tabla 1, se puede observar un resumen de la estadificación de los tumores de acuerdo al American Joint Committee on Cancer que por sus siglas en inglés son AJCC ⁽⁹⁾.

T0	No hay evidencia de tumor.
T1	El tumor no mide más de 2 cm.
T2	El tumor mide entre 2 y 5 cm.
T3	El tumor mide más de 5 cm.
T4	El tumor ha afectado la piel o la pared torácica.
Tx	No se puede evaluar la extensión del tumor.
N0	Los ganglios linfáticos no han sido afectados.
N1	El tumor ha afectado los ganglios linfáticos axilares.
N2-3	El tumor ha afectado los ganglios linfáticos axilares y/o la zona de los grandes vasos en la caja torácica; los ganglios linfáticos están fijados entre ellos o al tejido circundante.
Nx	No se puede evaluar el nivel de afectación de los ganglios linfáticos.
M0	Ninguna metástasis.
M1	Presencia de metástasis en otros órganos (por ejemplo en los huesos o en el pulmón).
Mx	No se puede evaluar la presencia de metástasis.

Tabla 1. Resumen de la estadificación de cáncer de mama.

1.6 Clasificación molecular del cáncer de mama

Esta clasificación se basa en los patrones de expresión génica, los cuales se relacionan con el pronóstico o riesgo de metástasis. La Tabla 2, muestra la clasificación molecular de los subtipos de cáncer de mama, la cual se divide en dos grupos basados en la positividad para el receptor estrógeno: 1) neoplasias de bajo grado, para aquellas que expresan receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y 2) neoplasias de alto grado que no presentan RE y RP, pero en las cuales hay sobreexpresión y/o amplificación del receptor HER2 ^(10,11).

Receptor de Estrógenos Positivos	<i>Luminal A</i> <i>Luminal B</i> <i>Luminal HER2/ neu</i>
Receptor de Estrógenos Negativos	<i>Basal</i> <i>HER2/ neu</i> <i>Normal like</i>

Tabla 2. Clasificación de los subtipos de cáncer de mama.

1.6.1 Tumores de receptor estrógenos positivos

En este grupo de tumores se destacan los luminales que poseen un inmunofenotipo que es muy similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria, que expresan citoqueratinas luminales, receptores de estrógenos y genes asociados a su activación ^(12,13). Los más destacados en este grupo son: subtipo Luminal A que es el más frecuente y corresponde al 67% de los tumores, posee una alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. El subtipo Luminal B que es todo lo contrario. Éste presenta niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de genes de proliferación. También existe otro subtipo que es el Luminal HER2/neu, el cual se caracteriza por expresar citoqueratinas CK9 y CK10 ⁽¹⁴⁾.

Estos tumores luminales están divididos en tres grupos: Luminal A (RE o RP positivos, HER2/neu negativo y bajo índice de proliferación), Luminal B (RE o RP positivos, HER2/neu negativo e índice de proliferación alto), el tercer grupo fue denominado Luminal HER2/neu positivo como se puede observar en la Tabla 3 (15).

Subtipo	RE	RP	HER2/neu
Luminal A	+	y/o +	-
Luminal B	+	y/o +	-
Luminal HER2/neu	-	-	+

Tabla 3. Clasificación de los tumores.

1.6.2 Tumor receptor de estrógenos negativo

Estos tumores se dividen en dos grupos:

- **Subtipo basal**

El subtipo basal/mioepitelial expresa citoqueratinas que son de alto peso molecular en las células mioepiteliales. Esto se presenta del 2 al 18% en los cánceres de mama. El triple negativo es aquel que presenta RE negativo, RP negativo HER/ neu negativo. Este subgrupo tiene la característica de tener genes asociados a células mioepiteliales, el cual tiene un inmunofenotipo a CK5, CK17 (marcadores de citoqueratinas en células luminales) c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina-1, caveolina y laminina (16).

En estos tumores, por lo general se presenta una alteración en los genes reparadores del ADN. Esto se debe a que el promotor de BRCA1 está metilado, lo

cual provoca que el gen se silencie en la expresión génica y a la vez se inactive la transcripción de BRCA1 ⁽¹⁷⁾.

- **Subtipo de sobre-expresión de HER2/neu**

Se presenta entre el 10 y el 15% de los cánceres de mama y tiene una sobre expresión de genes en el cromosoma 17q, que incluye el gen del EGFR-2 (ERBB2) y el growth factor receptor bound protein 7 (GRB7) y genes de proliferación. En casos muy específicos se expresan genes que se asocian al fenotipo luminal. El ERBB2 tiene una relación con caracteres histopatológicos que se asocian con un mal pronóstico con una baja expresión de RE y RP y un alto grado histológico ⁽¹⁸⁾.

1.7 Metástasis e Invasión

La metástasis es definida como la etapa final de un proceso celular complejo y coordinado, que induce a los cambios genéticos, los cuales son responsables de los trastornos en la regulación del crecimiento, que conllevan a una proliferación incontrolada. A este proceso no se le puede llamar metástasis hasta que se encuentre en un ambiente favorable, y así pueda iniciar el proceso de invasión. Esto va depender de un grupo de células que tengan la capacidad de inducir proteínas facilitadoras que interactúen a nivel molecular como intra y extracelularmente, ya que esto hace que inicie el proceso de invasión y metástasis.

La metástasis se conforma de distintos pasos tal como se logra observar en la Figura 2:

1.- Invasión local: tiene varios procesos como la pérdida de adhesión célula-célula y célula-matriz. La matriz extracelular circundante va a sufrir una destrucción de componentes, la cual está mediada por enzimas proteolíticas. Las células tumorales estimulan a sus células vecinas, las cuales producen proteasas incluyendo a las metaloproteinasas que son proteasas de matriz (MMPs). Estas

enzimas son dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} que se encargan de degradar distintos tipos de colágeno en la matriz ⁽¹⁹⁾.

2.- Intravasación: las células tumorales empiezan a invadir los vasos sanguíneos y linfáticos. Esto destruye los componentes de la membrana basal de los vasos, como colágeno IV y laminina ⁽²⁰⁾.

3.- Diseminación: es la entrada de células tumorales en la sangre y células malignas en ganglios linfáticos.

4.- Extravasación: es la trans migración a través del endotelio vascular, lo que involucra el rompimiento de la membrana basal ⁽²¹⁾.

5.- Establecimiento en un órgano distante: es cuando las células tumorales adquieren la capacidad de dividirse, proliferar y estimular la generación de vasos sanguíneos, la cual provee nutrientes y oxígenos al tumor ⁽²²⁾.



Figura 2. Proceso que conlleva a la Metástasis. Las células cancerosas se desprenden del tumor primario, degradan los componentes de la matriz extracelular y empiezan a invadir los vasos sanguíneos y linfáticos, y así nuevamente vuelven a invadir, pero esta vez por trans migración a través del endotelio vascular, formando un tumor secundario.

Las células cancerosas van a tener la capacidad de invadir tejidos adyacentes, en donde interactúan con otras células de distintos tipos de tejidos y comportamientos, lo cual migra a otro tipo de tejidos u órganos a distancia.

Actualmente se sabe que la conducta invasiva no sólo es exclusiva del fenotipo de células tumorales, sino también es de las células normales que actúan en condiciones fisiológicas y patológicas ⁽²³⁾.

El fenotipo invasivo de las células tumorales es observado como una pérdida de regulación de la conducta invasiva de células endoteliales activadas o del trofoblasto. Este fenotipo es importante para estas células, ya que se asocian con los procesos de invasión y metástasis ⁽²⁴⁾. Este fenotipo permite que la célula pierda sus propiedades adherentes, induce la proteólisis local y migración; hacia la membrana basal adyacente y de igual manera hacia la matriz extracelular que se va a encontrar presente en diferentes partes del organismo. Estas interacciones son de suma importancia, ya que son específicas en las células tumorales y así interactúa en la cascada metastásica ⁽²⁵⁾.

Las células tumorales para que inicie el proceso invasivo, la migración y la proteólisis local van a necesitar de estímulos específicos, como por ejemplo para que la célula tumoral se adhiera al lado externo de la membrana basal vascular, deben lograr degradar localmente la matriz y así migrar a través de la membrana basal que se encuentra dañada, y posteriormente pasará entre células endoteliales y vasos sanguíneos ⁽²⁶⁾.

La angiogénesis es importante para la expansión tumoral, ya que este proceso se ha reportado en carcinoma *in situ* de cáncer invasivo que va precedido de una neovascularización ⁽²⁷⁾. También se ha encontrado que tiene una asociación clínica entre la vascularidad del tumor y la agresividad del mismo. Otra característica importante es que la neovascularización tumoral no se encuentra delimitada en tiempo y espacio a comparación de la angiogénesis normal. Esto favorece a las células tumorales para que pierdan su adhesividad y así producir enzimas proteolíticas para poder invadir tejidos adyacentes que migren a través de la circulación ⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾.

1.8 Papel de las proteasas en la progresión tumoral

La degradación de la matriz extracelular y la migración de la célula tumoral es un proceso muy complejo, el cual necesita de la producción, liberación y activación de una variedad de enzimas que sean capaces de degradar la matriz extracelular. Existen enzimas que se encuentran sobre expresadas en la mayoría de las células del microambiente huésped-tumor ⁽³⁰⁾. Se ha observado que la degradación tisular en los procesos normales y en ciertas enfermedades específicas es semejante a lo que ocurre en el cáncer ⁽³¹⁾. Aunque las células tumorales son capaces de inducir la producción de proteasas en células vecinas, a través de la secreción de citocinas o factores de crecimiento y la producción de sustratos para las proteasas, de la misma manera pueden producir y secretar sus propias proteasas, o bien producir factores, los cuales puedan inhibir o activar proteasas que se encuentran localmente ⁽³²⁾.

Las proteasas son moléculas que tienen un papel muy importante en los procesos biológicos, ya que tienen una gran relación con las enfermedades patológicas, entre ellas, el cáncer. Son consideradas enzimas proteolíticas, ya que tienen una gran capacidad de poder degradar sustratos muy específicos de la matriz extracelular y de la membrana basal, y así de esta forma logran la invasión tumoral y la metástasis.

Estas proteasas se clasifican en intracelulares y extracelulares. Intracelularmente las proteasas se asocian con la eliminación y la metabolización de sustancias no deseadas a nivel celular, éstas tienen una organización en cascada que actúan como un mecanismo defensor.

Las proteasas extracelulares se relacionan con mecanismos que facilitan la carcinogénesis, la cual se ha encontrado sobre expresada en los tumores, y a su vez, activa las vías de transcripción ⁽³³⁾. También están relacionadas directamente con la degradación de la matriz extracelular.

En el cáncer, las metaloproteinasas (MMPs) se clasifican en tres grupos:

- A) Dentro de las metaloproteinasas de matriz se encuentran principalmente la colágenasa intersticial, la estromelina, matrilisina, las gelatinasas y las colágenasas, las cuales se van a activar con un pH neutro o ligeramente alcalino.
- B) La serina-proteasas como la trombina. Los activadores de plasminógeno tipo tisular.
- C) Las catepsinas como la B, D y L que son activadas con un pH ácido.

1.9 Metaloproteinasas y su clasificación

Las metaloproteinasas (MMPs) son proteasas que pertenecen a la familia de la endopeptidasas que son dependientes de calcio y zinc, las cuales son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (MEC), ya que tienen una gran variedad de sustratos como los receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, citoquinas, ligandos apoptóticos, factores antigénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾.

Actualmente se han identificado 25 tipos de MMPs de acuerdo a la integridad y composición de la matriz extracelular (MEC). También por su número y estructura, las MMPs se pueden encontrar en forma soluble en la MEC o en forma anclada (MT-MMPs) de acuerdo a sus 17 dominios transmembranales de tipo I y tipo II o a través del glicofosfatidilinositol (GPI) ⁽³⁶⁾ (Figura 3).

Matrilisinas: están constituidas por las MMP-7 y la MMP-26. Su estructura está conformada por un péptido señal, una región propéptido y una región catalítica que se une al átomo de zinc. Estas son capaces de degradar los componentes de la MEC durante los procesos de la remodelación tisular ⁽³⁷⁾.

Colagenasas: están conformadas por las MMP-1, MMP-8 y MMP-13 que se encargan de degradar las fibras de colágeno, que son las únicas enzimas en los mamíferos que cuenta con esa capacidad. Su dominio es similar a la hemopexina, ya que se conecta con una región catalítica que depende de prolina y a la vez puede degradar la hélice nativa de los tipos I, II y III entre otros ⁽³⁷⁾.

Estromalisinas: que son las MMP-3, MMP-10 y MMP-11, las cuales poseen una estructura similar a las colagenasas, sólo que éstas son capaces de degradar gran variedad de sustratos que incluyen a las proteínas de la MEC como fibronectina, laminina y proteoglicanos. Ésta tiene una gran capacidad para adherirse a diversas proteínas de la MEC, pero no pueden interactuar con las fibras de colágeno ⁽³⁷⁾.

Gelatinasas: integran a las enzimas MMP-2 y la MMP-9. Éstas se caracterizan por tener una región adicional de tres repeticiones de fibronectina del tipo II en el dominio catalítico, tienen una gran afinidad por colagenasas desnaturalizadas, gelatina y por otros compuestos como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV, V, VII y X.

Las Metaloproteasas de membranas: es un grupo que constituye a las MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25, las cuales se encuentran ancladas a la membrana plasmática que contienen un dominio de glicosilfosfatidilinositol y es capaz de degradar sustratos de la MEC como la gelatina, fibronectina y otros ⁽³⁷⁾.

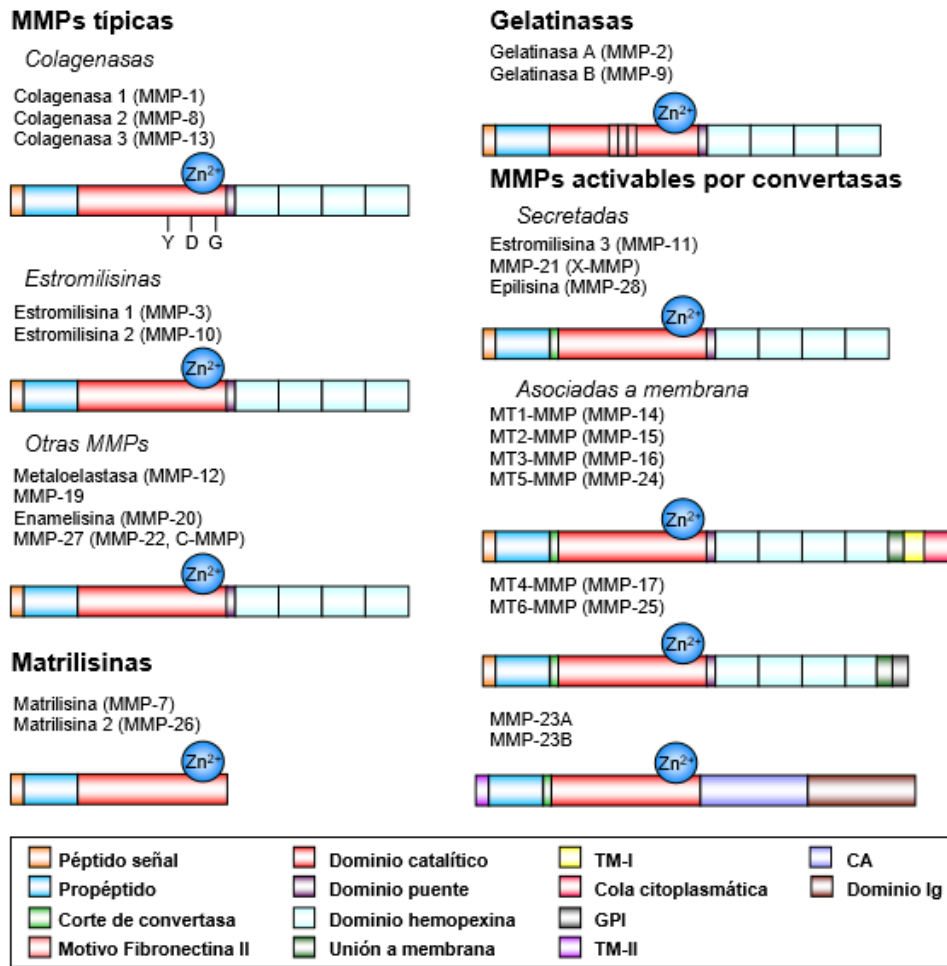


Figura 3. Clasificación y estructura de las MMPs.

1.10 Metaloproteinasas y su estructura

Las metaloproteinasas (MMPs) están conformadas por cuatro dominios conservados que son: un péptido señal o predominio que se encuentra ubicado en un amino terminal y éste se va a eliminar cuando se encuentra en el retículo endoplasmático, el cual es importante, ya que se encarga de determinar si la enzima es secretada o anclada en la membrana. El pro-péptido o predominio de 80-90 aminoácidos va a contener una cisteína conservada que la va a mantener en estado latente o inactivo. Cuando este dominio se procesa, se dice que la enzima ya está activa. El dominio catalítico va de 160-170 aminoácidos, ahí se

encuentra el dominio más conservado, en el cual se van a encontrar tres histeínas que se van a unir al zinc catalítico ⁽³⁹⁾. Esta región determina la especificidad hacia los diferentes sustratos, que tienen conformaciones específicas y regiones que se encuentran fuera del sitio activo. El dominio hemopexina o PEX se encarga de regular la unión de las proteasas a distintos sustratos y a sus inhibidores, los cuales interfieren en la unión y la activación de las MMPs en la membrana celular y va a dirigir a cierta actividad proteolítica ⁽⁴⁰⁾.

1.11 Activación de las Metaloproteinasas

Todas las MMPs son sintetizadas como zimógenos es decir de forma latente o inactiva, para que éstas se puedan activar debe de haber una ruptura entre el enlace de la cisteína con el zinc con el cambio conformacional de la proteína y la proteólisis del pro-péptido, las mayoría de las MMPs son secretadas de forma latente y cuando pasan al exterior celular éstas pasan a su conformación activa ⁽⁴⁰⁾.

1.12 Inhibidores de las Metaloproteinasas

Las MMPs cuentan con inhibidores endógenos específicos que son conocidos como TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs). Su principal actividad biológica es actuar como inhibidores de las MMPs. Se han descrito 4 tipos de inhibidores que son: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 y se localizan en los cromosomas Xp 11.3-p11.23, 17q25, 22q 13.3 y 3p25, tienen un peso molecular bajo de 21-30 kDa, son capaces de inactivar a las MMPs, TIMP-1 y TIMP-2 cuenta con la capacidad de inhibir un amplio número de las MMPs, aunque va a tener diferente efecto, esto va a depender de la proteasa en cambio TIMP-3 y TIMP-4 de su especificidad ⁽⁴¹⁾.

Los TIMPs se van a unir a las MMPs de manera no covalente formando complejos, se dice que el balance neto entre la proteasa e inhibidores es el que determina la actividad inhibidora de las MMPs, se han encontrado estudios en las proteínas RECK que son inhibidores de las MMPs de membrana y actúan como

reguladores de la integridad de la MEC y la angiogénesis y que a su vez son capaces de inhibir a MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP ⁽⁴²⁾.

1.13 Funciones de las Metaloproteinasas

Además de la gran capacidad de las MMPs de degradar diferentes tipos de sustratos, también tienen un papel importante en los procesos fisiológicos y patológicos.

Las MMPs influyen en el comportamiento celular, ya que liberan numerosas sustancias de señalización solubles que se encuentran ancladas en la MEC como TGF- β o FGF-1 que al unirse a sus receptores celulares desencadenan múltiples cascadas de señalización. Las MMPs favorecen a la migración celular y a la formación de vasos sanguíneos mediante los procesos de factores pro (VEGF, bFGF, TGF- β) o antiangiogénicos (angiotensina y endostatina) ⁽⁴³⁾.

1.14 Metaloproteinasas en los procesos de intravasación, circulación y extravasación

Las células tumorales metastásicas están orientadas y polarizadas hacia los vasos sanguíneos. La intravasación de las células neoplásicas se desarrolla en los vasos sanguíneos que están neoformados en el tumor primario ⁽⁴⁴⁾. La entrada de las células tumorales en el torrente sanguíneo es un paso limitante del proceso hacia la metástasis, en donde la degradación de la membrana basal (MB) es realizada por enzimas como las MMP-2 y MMP-9, las cuales se asocian con el proceso de intravasación, el cual es detectado en la sangre de pacientes con cáncer ⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾.

Las células neoplásicas viajan a través de la vía hematológica, en donde éstas llegan a redes capilares que se adhieren mediante la pared vascular para así iniciar al proceso de extravasación ⁽⁴⁷⁾.

La unión de las células tumorales a las células endoteliales es específica y está regulada por moléculas llamadas selectinas. Las integrinas también se unen a las células con la MEC que participan en el arresto celular. La expresión de estas moléculas y sus receptores son órgano-específica, ya que de un tumor primario se da origen a la metástasis en ciertos órganos específicos. Con la adherencia celular se inicia el proceso de extravasación, durante el cual la célula neoplásica atraviesa la capa de células endoteliales y la MB que le da soporte. La migración trans-endotelial ocurre a través de huecos entre las células endoteliales ⁽⁴⁸⁾. En la Figura 4 se muestra brevemente la explicación del proceso mencionado anteriormente.

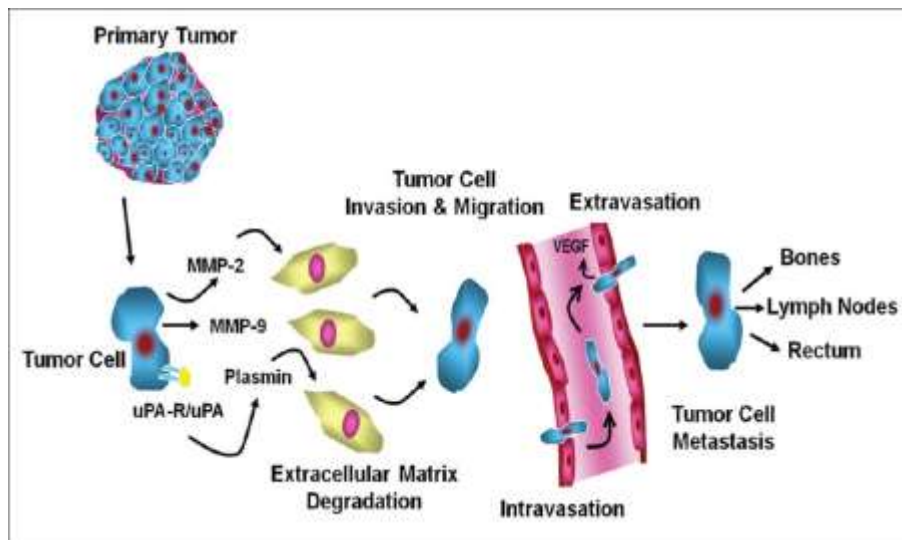


Figura 4. Proceso metastásico de múltiples pasos de células de cáncer. Las células tumorales secretan varios factores que incluyen proteasas como MMPs y plasmina que degradan la matriz extracelular facilitando su migración e invasión. Las células luego se intravascan a través del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos hacia la circulación y se extravascan a órganos distantes como ganglios linfáticos, huesos y recto.

1.15 Matriz Metaloproteinasa 2 (MMP-2)

Esta enzima también es conocida como Gelatinasa tipo A, ya que tiene una afinidad por el colágeno tipo IV que es un componente importante para MB. Además, cuenta como sustrato de las fibras de colágenos tipo V, VII, X, gelatina, laminina, elastina y fibronectina. Tiene un peso molecular de 72 kDa en forma latente y cuando ésta se activa tiene un peso de 62 kDa.

Fisiológicamente, participa en el desarrollo embrionario, en la angiogénesis, la ovulación, la involución mamaria y en la cicatrización. De igual forma, también se encuentra involucrada en la formación osteoblástica del hueso, en la inhibición y reabsorción osteoclástica. La contribución de la MMP-2 a la invasión se debe a diferentes aspectos como la degradación de la membrana basal, lo cual hace que las células migren por el torrente sanguíneo, la liberación de factores bioactivos y exposición de sitios de adhesión ocultos que conducen a la mortalidad celular. La MMP-2 es capaz de activar a citocinas, factores de crecimiento, se encarga de modular el metabolismo de células tumorales, la resistencia celular de la apoptosis y la angiogénesis.

También interactúa en procesos no tumorales, como la aterosclerosis, el infarto del miocardio y en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide.

La MMP-2 tiene un papel importante en los procesos de carcinogénesis de los tumores uroteliales y de próstata, en la mayoría de los casos su sobreexpresión se asocia a un peor pronóstico ⁽⁴⁹⁾.

1.16 Matriz Metaloproteinasa 9 (MMP-9)

También se conoce como Gelatinasa A o MMP-9, tiene una estructura muy similar a la de la MMP-2, ya que ambas comparten la misma afinidad a los sustratos. Una característica de esta enzima de tipo gelatinasa es que tiene una región con tres dominios de unión a fibronectina tipo II, que es capaz de unirse a Gelatina, Laminina y Colágeno tipo I y IV ⁽⁵⁰⁾.

A comparación de la MMP-2, ésta posee un dominio colágeno de tipo V, el cual se encuentra glicosilado y tiene el nombre de dominio OG ⁽⁵¹⁾ ⁽⁵²⁾. Los azúcares que se van a encontrar en esta región van a ser de tipo N- y O-glicosídico, que a la vez van a formar un puente disulfuro entre los dominios catalíticos y el PEX9, el dominio OG es el que va hacer que la MMP-9 sea más flexible y pueda adquirir conformaciones que se asocien con las moléculas de la MEC ⁽⁵³⁾.

Otra característica de esta enzima es que es muy susceptible a numerosas modificaciones pos-transcripcionales que originan cambios en su actividad o en su función. En el dominio de fibronectina se van a encontrar dos puentes de disulfuro que son importantes para la secreción de la MMP-9 al exterior celular ⁽⁵⁴⁾.

La MMP-9 presenta un peso molecular en su forma latente de 92 kDa, cuando ésta se activa su peso molecular cambia a 85 kDa.

La MMP-9 en procesos fisiológicos está involucrada en la remodelación del endometrio durante el ciclo menstrual femenino y durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, posee un papel importante en la angiogénesis regulando factores tanto pro- como antiogénicos en la remodelación de vasos sanguíneos y linfáticos ⁽⁵⁵⁾. También está asociada con los procesos de migración en las células troncales, células precursoras y en células del sistema inmune, el cual cumple un papel muy importante en la regeneración del tejido epitelial, la cicatrización y la plasticidad sináptica neuronal ⁽⁵⁶⁾.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

Las MMPs se han evidenciado como las principales mediadoras de microambientes tumorales durante la progresión del cáncer ⁽⁵⁷⁾. En el crecimiento tumoral ocupan un papel importante, ya que son capaces de degradar el tejido conectivo y los componentes de la membrana basal y a la vez activan factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y quimiocinas ⁽⁵⁸⁾.

Las MMPs tienen la misma capacidad de las células tumorales de migrar, invadir, metastatizar y al mismo tiempo formar sus propios vasos sanguíneos, los cuales dependen de sus interacciones. Éstas pueden degradar moléculas de adhesión celular y modular la interacción célula-célula y célula-MEC, liberar, activar o desactivar moléculas señalizadoras autócrinas y parácrinas y alterar receptores de la superficie celular ⁽⁵⁹⁾. Éstas juegan distintos papeles durante la progresión del cáncer, dependiendo del estadio del tumor. Su invasión local depende de la degradación de proteínas de la membrana basal tales como: colágeno tipo IV o V y proteólisis del colágeno intersticial tipo I, II o III presente en el tejido conjuntivo que rodea las células tumorales ⁽⁶⁰⁾.

La MMP-2 o gelatina tipo A y la MMP-9 conocida como gelatina tipo B son endopeptidasas de matriz, las cuales dependen de zinc y están relacionadas con la invasión tumoral y la metástasis por su capacidad de remodelación tisular de la matriz extracelular, así como la degradación de la membrana basal y la inducción de la angiogénesis ⁽⁶¹⁾. Estas MMPs se encuentran secretadas como zimógenos y su función está regulada por diferentes mecanismos. La MMP-2 es producida por células de linaje mesénquimal, mientras que la MMP-9 es secretada por neutrófilos, macrófagos y está asociada con la respuesta inflamatoria. En el cáncer de mama, ambas gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se encuentran expresadas en los tejidos cancerosos y así como en los sueros de los pacientes. Las expresiones aberrantes de la proteína que activa al factor de transcripción (AP)-2 y HER2 se han relacionado con la progresión de la enfermedad y el aumento de la capacidad invasiva del cáncer de mama, esto se puede deber al aumento de la actividad de las MMPs. También se ha encontrado la MMP-2 en estadios

tempranos de cáncer de mama, ya que probablemente participa en la formación de tumores, aunque también se ha encontrado en tumores benignos como fibroadenomas ⁽⁶²⁾. Se ha evidenciado que entre más avanzado sea el cáncer y el grado del tumor, la inmunorreactividad de MMP-2 puede predecir la supervivencia de pacientes con cáncer de mama ⁽⁶³⁾. De igual manera, se ha encontrado expresada la MMP-9 en carcinomatosis mamaria, la cual está asociada con la metástasis de nódulo linfático ⁽⁶⁴⁾.

A diferencia de los oncogenes, las MMPs no se encuentran sobreexpresadas a partir de amplificaciones o mutaciones activantes, sino se deriva de cambios transcripcionales. Hay evidencias que señalan que las MMPs que son secretadas por células del estroma pueden ser reclutadas por los tumores.

Estas MMPs no son producidas por epitelio maligno, sino al contrario, el estroma circundante es el encargado de producirlas, por ejemplo: en un experimento de hibridación *in situ* demostraron que la MMP-2 era sintetizada por fibroblastos que rodeaban a los grupos de células tumorales.

En otro estudio evidenciaron que en el cáncer de mama, ambas gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) tienen el mismo patrón de expresión entre las células tumorales y su entorno estromal, ya que sus interacciones epiteliales-estromales son capaces de inducir la extracción de otras proteínas que se asocian en la invasión en fibroblastos que son capaces de invadir a las células tumorales invasoras ⁽⁶⁵⁾.

Las MMP-2 y MMP-9 también están involucradas en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y su sobreexpresión está correlacionada con tumores más agresivos y de mal pronóstico ⁽⁶⁶⁾.

En estudios clínicos también se asoció la sobreexpresión de la MMP-9 y un mejor pronóstico en pacientes con cáncer mamario y ganglios linfáticos negativos, con correlación inversa entre presencia de la proteasa y metástasis hepática en pacientes con cáncer colorrectal ⁽⁶⁷⁾.

En líneas celulares de carcinoma mamario de bajo potencial metastásico, Scorilas A. y colaboradores en 1991, demostraron que “la baja regulación de la MMP-8 conlleva al incremento en el potencial metastásico de estas células, mientras que su sobreexpresión en células con potencial metastásico alto trae consigo disminución de este último ⁽⁶⁷⁾.

Cuando hay una sobreexpresión de MMPs por tumores que interactúan con los sistemas linfáticos y vasculares, se genera una mayor expresión y actividad de MMPs y TIMPs en los tejidos y los fluidos biológicos; un ejemplo muy claro es la sangre y la orina. En distintos estudios se ha demostrado la existencia de patrones de expresión y sobreexpresión de MMPs y TIMPs. Gracias a esto, hay un gran interés hacia la investigación de diversos tipos de neoplasias como son: cáncer de mama, colon, próstata, ovario y vejiga.

En el cáncer vesical estas gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) juegan un papel muy importante en el crecimiento y la diseminación tumoral ⁽⁶⁸⁾.

Sun y colaboradores en el 2008, desarrollaron un estudio en donde evaluaron el comportamiento de algunas poblaciones de células tumorales que provenían de carcinomas de laringe, con el cual se pudo comprobar que “al silenciar las MMP-2 y MMP-9 existe una disminución significativa en la proliferación y en la supervivencia celular” ⁽⁶⁹⁾.

Ruokoilaney y colaboradores en el 2004 analizaron a la MMP-9 en estadios iniciales de carcinoma de cavidad bucal, lo hicieron con carcinoma de cabeza y cuello con localización y estadios diversos ⁽⁷⁰⁾.

También se han encontrado distintas MMPs en los procesos invasivos como son la MMP-7 que se encuentra expresada en los fibroblastos del fenotipo invasivo, y su presencia se asoció con tumores de gran tamaño y poca diferenciación ⁽⁷⁰⁾.

La MMP-1 se asocia con ganglios linfáticos positivos, MMP-1, MMP-7, MMP- 9, MMP-3, MMP-14 y TIMP-1 se relacionan con parámetros de tumores más agresivos, ganglios positivos, receptores de estrógenos negativos e inflamación peritumoral ⁽⁷¹⁾. Por otro lado, niveles elevados de MMP-7 y 14 y TIMP-3 se detectaron en fibroblastos y células mononucleares de ganglios linfáticos metastásicos.

Al igual que las MMP-2 y MMP-9, se han encontrado otras MMPs en distintos tipos de cáncer por ejemplo: la MMP-7, se observó en la línea celular MCF7 de cáncer de mama y su sobreexpresión activa a la pro-MMP-2 y a la MMP-9, además, su alta sobreexpresión aumenta la probabilidad de metástasis ⁽⁷²⁾.

La MMP-11, se ha encontrado expresada en células estromales, las cuales se relacionan con la progresión del tumor y la metástasis. La MMP-18 se deriva de fibroblastos y frecuentemente se le ha relacionado con la microinvasión y en estudios *in situ* tiene un papel importante en las lesiones del carcinoma ductal de cáncer de mama, de igual manera se ha encontrado expresada la MMP-14, la cual tiene un peor pronóstico en esta enfermedad. Cabe señalar que niveles elevados de MMP-14 y bajos de TIMP-2 son marcadores de mal pronóstico ⁽⁷³⁾.

En el cáncer de colon se ha reportado la expresión de los genes de la MMP-1, MMP-2, MMP-3 MMP-7 y MMP-9 en donde su aumento es significativo comparado a la mucosa normal o en adenomas, que se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad ⁽⁷⁴⁾.

En estudios *in vitro* se ha demostrado que la proteína TNF- α estimula la producción y secreción de MMPs en el endometrio normal⁽⁷⁵⁾, y a la vez participa en la disminución de la expresión de las TIMPs en lesiones en dometriósicas, lo cual permite el incremento de la actividad de las MMPs ⁽⁷⁶⁾.

Bullimore y colaboradores en el 2003, identificaron que la pérdida de MMP-8 incrementa la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer cutáneo murino,

indicando su acción antitumoral; contrariamente al trasplantar médula ósea rica en neutrófilos (fuente principal de MMP-8), el crecimiento tumoral disminuyó al restaurarse la acción de esta proteasa ⁽⁷⁶⁾.

La MMP-26, que fue caracterizada por Marchenko y Colaboradores ⁽⁷⁷⁾ y Park y Colaboradores ⁽⁷⁸⁾, se va a encontrar expresada normalmente en útero, placenta y también en células cancerígenas de origen epitelial donde tiene un papel importante en la progresión tumoral ⁽⁷⁹⁾.

En otro estudio la MMP-26, se encontró que era secretada por macrófagos y polimorfonucleares, la cual es importante para la respuesta inflamatoria antitumoral ⁽⁸⁰⁾.

Lukka y Colaboradores en el 2006, realizaron un estudio inmunohistoquímico con 81 pacientes con carcinoma de cabeza y cuello en donde evaluaron la expresión de la MMP-13 y encontraron un 75% de positividad ⁽⁸¹⁾.

Saussez y colaboradores en el 2009, obtuvieron muestras de carcinoma de faringe de 73 pacientes y de carcinoma de laringe de 45 pacientes, las analizaron mediante inmunohistoquímicas y evaluaron el porcentaje del tejido que se teñía y su intensidad de tinción y en donde la compararon con muestras de mucosa provenientes del edema de Reinke ⁽⁸²⁾.

Blanton y colaboradores en el 2004, evidenciaron que había una asociación entre los individuos con labio y paladar fisurado no sindrómico y translocaciones en los genes de cromosomas ubicados en 10p13, 16p13, (MMP-25)⁽⁸³⁾. Estos resultados demuestran la importancia que tiene la MMP-25 en el desarrollo palatino, de igual manera se demostró en el estudio con un modelo animal publicado por Brown y colaboradores, en el 2010 ⁽⁸⁴⁾.

Gorin y su grupo en el 2000, señalaron que la expresión de la MMP-12 reducía el tamaño tumoral en un modelo murino de melanoma ⁽⁸⁵⁾, debido quizá a su acción

antiangiogénica hallazgo corroborado por Dong en 1997, quien demostró que la acción antitumoral de esta proteasa, podría deberse a la generación de angiostatina⁽⁸⁶⁾.

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la incidencia de cáncer de mama en México ha aumentado, en cada año se detectan alrededor de 1.38 millones de casos nuevos y una mortalidad de 458 mil muertes.

En México a partir del año 2006, el cáncer de mama ocupa la primera causa de mortandad en mujeres de 30 a 54 años de edad, y amenaza a todos los grupos socioeconómicos.

A pesar de que el autoexamen es un método muy sencillo y de bajo costo, aún no es suficiente, ya que hasta el momento no se ha podido repercutir en el diagnóstico oportuno, ya sea por falta de conocimiento de la técnica o por simple apatía de la mujer. Es importante seguir promoviendo en las mujeres el autoexamen, porque su conocimiento puede llevar a un diagnóstico temprano.

La detección temprana de cáncer de mama es de gran interés para la salud pública de nuestro país, ya que reduciría el costo social y económico en los tratamientos.

Actualmente muchos estudios han evidenciado la gran importancia que tienen las metaloproteinasas en la progresión del tumor, ya que como se ha establecido, dichas enzimas se encargan de degradar los componentes de la MEC, y al mismo tiempo ,juegan un papel importante en la invasión de otros tejidos vecinos. Por esta razón, es necesario incrementar la investigación en torno a este tema y evaluar los parámetros de metástasis y de invasión. Entre estos parámetros se encuentra el papel pro-metastásico de las proteasas. Por lo anterior, este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, T47D, BT-549 y MDA-MB-231, además de la línea no tumoral MCF10A, las cuales poseen un grado de malignidad y morfología diferente.

Este tipo de enzimas son tan relevantes que en un futuro podrían llegar a ser consideradas como biomarcadores en el cáncer de mama y en otros tipos de carcinomas. Para ello, es necesario realizar más investigación tanto *in vitro* como *in vivo* al respecto para tener más evidencia de su participación en los diferentes estadios de la progresión tumoral

CAPÍTULO IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1 Hipótesis

Los niveles de expresión de la MMP-2 y MMP-9 serán diferentes de acuerdo al grado de malignidad de las líneas celulares de cáncer de mama.

- La MMP-2 se va expresar en las líneas celulares de cáncer de mama no invasivas.
- La MMP-9 se encontrará expresada en las líneas celulares de cáncer de mama con un grado más maligno como el triple negativo o invasivas.

4.2 Objetivo general

Comparar la presencia y actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama invasivas y no invasivas.

4.3 Objetivos específicos

- Establecer los cultivos de las diferentes líneas celulares de cáncer de mama.
- Determinar la actividad enzimática mediante Zimografía de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Localizar por Inmunofluorescencia a las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Cuantificar por Citometría de Flujo las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de cáncer de mama.

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA

5.1 Líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en el presente proyecto se enlistan a continuación y se mantuvieron de acuerdo a las especificaciones de cada una (Tabla 4).

Línea invasiva	Línea no invasiva	Línea no tumoral
MDA-MB-231	MCF7	MCF10A
BT-549	T47D	

Tabla 4. Líneas celulares de cáncer de mama.

Línea celular no tumoral MCF10A ATCC CLR- 10317: es una línea celular no tumorigénica, las células son positivas para sialomucinas epiteliales, citoqueratinas y antígenos de glóbulos grasos de la leche. También expresa antígenos específicos de mama detectados por reacción positiva con anticuerpos monoclonales MFA-Breast y MC-5. El contenido de calcio del medio ejerce un fuerte efecto sobre la morfología de las células (Figura 5).



Figura 5. Morfología de la Línea Celular MCF10A. 20x

Línea celular BT-549 ATCC HTB-133: esta línea celular procede de un tejido de glándula mamaria con patología de carcinoma ductal, el tipo celular es epitelial que consiste en un tumor ductal papilar e invasivo que había hecho metástasis a 3 de 7 ganglios linfáticos regionales. Es triple negativa, altamente agresiva e invasiva y carece de los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), así como HER2 (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2) (Figura 6).



Figura 6. Morfología de la Línea Celular BT-549. 20x.

Línea celular MDA-MB-231 ATCC HTB-26: es una línea celular epitelial de cáncer de mama, es triple negativa, altamente agresiva e invasiva y carece de los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), así como HER2 (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2). Estas células carecen de la capacidad de diferenciarse, no forman tejidos, presentan un número cromosómico alterado 64-69 y su forma es epitelial adherente (Figura 7).

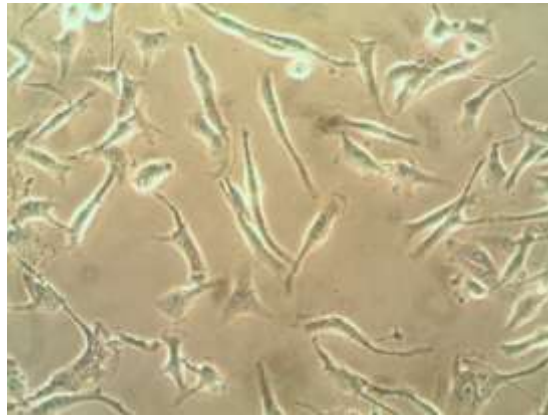


Figura 7. Morfología de la Línea Celular MDA-MB-231. 20x.

Línea celular MCF7 ATCC HTB-22: esta línea se deriva de un adenocarcinoma del pecho y tiene la característica diferenciada del epitelio mamario. Esto incluye la capacidad para procesar el estrógeno en forma de estradiol a través de los receptores de estrógeno en el citoplasma de la célula. Lo principal que se destaca de la línea celular MCF7 es que su receptor de estrógeno es positivo (RE) y el receptor de progesterona negativo (RP). Además de retener la sensibilidad a los estrógenos, las células MCF7 también son sensibles a la citoqueratina. No son receptivos a desmina, endotelina, GAP y vimentina (Figura 8).

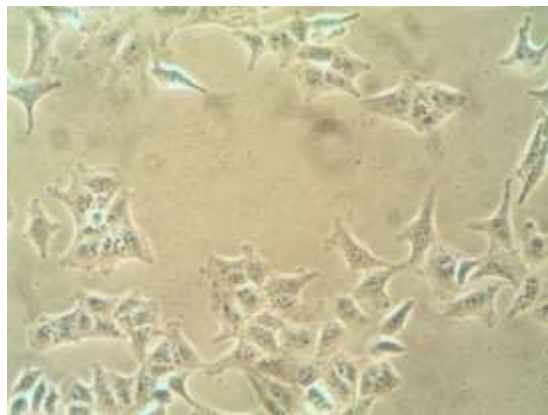


Figura 8. Morfología de la Línea Celular MCF7. 20x.

Línea celular T47D ATCC HTB 133: esta línea celular proviene de un tumor de glándula mamaria del tipo histológico ductal infiltrante, presenta uniones citoplasmáticas y receptores de 17 beta estradiol, esteroides y calcitonina (Figura 9).

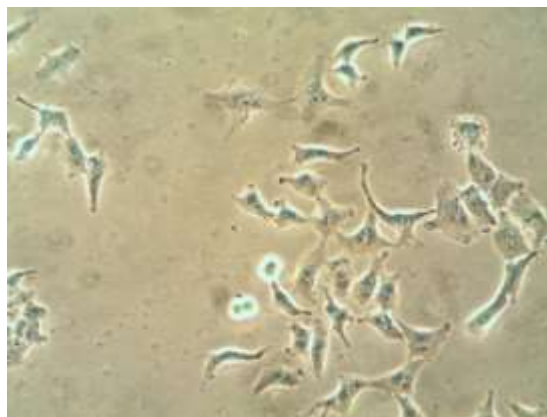


Figura 9.Morfología de la Línea Celular T47D.20x.

5.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares MCF7, T47D y BT-549 se cultivaron con medio RPMI y Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, mientras que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10A fueron cultivadas con medio F12 en 10% de SFB. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Se despegaron con Tripsina y EDTA al 0.25% (Ver anexos). La tabla 5 muestra las líneas celulares estudiadas, así como sus medios de cultivo.

Línea celular	Medio	SFB
MCF10A	F12	10%
BT-549	RPMI	10%
MDA-MB-231	F12	10%
MCF7	RPMI	10%
T47D	RPMI	10%

Tabla 5. Líneas celulares de cáncer de mama y sus medios requeridos.

5.3 Sembrado de células y recolección del medio de cultivo

Para la recolección del medio de cultivo de las líneas celulares a estudiar, se partió de 10^6 células y se sembraron en pozos de 6. El número de células se obtuvo de la siguiente fórmula:

Núm. de células obtenidas en los cuatro cuadrantes x 10 x volumen del medio

Una vez obtenido el número de células, se sembraron en placas de 6 pozos con 2ml de medio y SFB al 10% y se incubaron por 24 horas a 37°C al 5% de CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS y se agregaron 2ml de medio y SFB al 10% y se incubaron por 48 horas. Posteriormente, se recolectó el medio y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos para retirar restos celulares y se almacenó a 4°C.

Las células se recuperaron con 150 µl de tripsina y se agregó además 150 µl de PBS (para inactivar la acción de dicha enzima), se centrifugaron a 3000rpm por 5 minutos y finalmente se almacenaron a 4°C.

5.4 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se determinó la cantidad de proteína tanto de los medios de secreción como de los productos del lisado celular mediante el método de Bradford⁽⁸⁷⁾. Se utilizó una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y la cantidad de proteína se cuantificó a 595nm.

5.5 Detección de la actividad enzimática de las MMPs por Zimografía

Para detectar la actividad enzimática de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, se realizaron ensayos de Zimografía. Así, 5 μ g de proteína de los sobrenadantes correspondientes a 10⁶ células cultivadas en medio sin SFB de 48 horas, se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes y copolimerizados con 10mg/ml de Gelatina (como sustrato).

La corrida se realizó a 120 volts, al terminar, se realizaron tres lavados de 30 minutos cada uno en agitación; el primero con agua desionizada, el segundo con 2.5% de Tritón X-100 en agua y el tercero únicamente con agua desionizada.

Después de los lavados se incubó con Buffer de replegamiento, constituido por azida de Na, CaCl₂, H₂O, Tris pH 8.8 y se incubó a 37°C por 19 horas. Finalmente, se detectó la MMP-2 y MMP-9 mediante la tinción del gel en Coomassie y ácido acético.

5.6 Identificación de MMPs por Inmunofluorescencia

Se utilizaron cubreobjetos estériles que se colocaron en placas de 12 pozos y se sembraron 10⁶ células en 500 μ l de medio y 5% SFB. Al siguiente día, se retiró el medio y se hicieron dos lavados con PBS, se fijaron las células con 500 μ l de formaldehído al 4% por 30 minutos, se lavó nuevamente y se permeabilizó con Tritón X-100, BSA y PBS por 30 minutos, se lavó dos veces con PBS y se bloqueó con PBS-Tween, BSA y Glicina por 30 minutos. Se lavó dos veces y se incubó con el anticuerpo primario; anti-MMP-2 y anti-MMP-9 (Santa Cruz) ambos a una dilución de 1:250 (en PBS-Tween y BSA) por dos horas, se realizaron dos lavados y finalmente las células se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa-405 por una hora y se tiñó con DAPI por 5 minutos. Se realizaron tres lavados con

PBS-Tween y las células se montaron en portaobjetos. Posteriormente, las muestras se sellaron con barniz, se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz y finalmente se analizaron en el microscopio de epifluorescencia Nikon.

5.7 Cuantificación de MMPs por Citometría de Flujo

Se utilizaron aproximadamente 1×10^2 células de cada línea celular de cáncer de mama y no tumoral. Se fijaron con Citofix Cytopern BD por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron dos veces con Perm Wash a 200rpm durante 5 minutos. Las células fueron bloqueadas con SFB al 50 % en PBS por 15 minutos, nuevamente se centrifugaron dos veces con Perm Wash con las mismas condiciones. Se incubaron con el anticuerpo primario MMP-2 y MMP-9 de la marca Santa Cruz con una dilución de 1:50 toda la noche con una temperatura de 4°C. Después se incubó el anticuerpo secundario Alexa-405 por 1 hora a temperatura ambiente, se filtraron las células y se dejaron con Facs Flow y se analizaron finalmente en el citómetro de flujo FACS Canto II.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

6.1 Detección de la actividad enzimática de las MMP-2 y MMP-9 por Zimografía

Las MMP-2 y la MMP-9 son enzimas secretadas que se encuentran localizadas en la membrana celular uniéndose al colágeno tipo IV, y son reguladas por activación enzimática. Para poder detectar la actividad de estas enzimas, se utiliza principalmente la técnica de Zimografía. A pesar de que dicha técnica está sumamente descrita, decidimos llevar a cabo una serie de modificaciones a la misma, de tal manera que pudiéramos contar con las condiciones experimentales idóneas para visualizar la proteólisis de las mismas sobre el sustrato gelatina. Así, consideramos los siguientes aspectos:

- 1) Concentración de gelatina: se logró estandarizar el protocolo con 10mg/ml del sustrato, en un gel al 10% y con una concentración de proteínas de secreción de 5µg.
- 2) Número de células óptimo y tiempo de secreción de las metaloproteasas: primero, se inició con 5×10^5 células por 24 horas de secreción, sin embargo, no se logró ver actividad proteolítica alguna (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió sembrar 1×10^6 células/triplicado durante 24, 48 y 72 horas de secreción, lográndose ver actividad de las MMP-2 y MMP-9 a las 48 horas, razón por la que se consideraron estas condiciones para los experimentos siguientes.

En la Figura 10 se muestra la actividad de MMPs a través de los ensayos zimografía, en las líneas celulares de cáncer de mama; carril 1: Marcador de Peso Molecular (MPM); carril 2: línea celular no tumoral MCF10A en donde se muestra ligeramente actividad por abajo del peso de 72kDa, que correspondería a la MMP-2 en su forma activa de 62 kDa. En relación a las líneas celulares invasivas, los carriles 3 y 4 corresponden a las células BT549 y MDA-MB-231, respectivamente. En ambas líneas celulares se aprecia una marcada proteólisis de alrededor de 95

kDa, que consideramos, se trata de la MMP-9 en su forma latente, la cual se presenta con un peso molecular de 92 kDa.

Los carriles 5 y 6, corresponden a las líneas no invasivas; MCF7 y T47D, respectivamente. Es de notarse que en estas líneas celulares aparecen dos bandas de actividad enzimática, una tenue de 95 kDa que, al igual que con las células invasivas, se trata de la MMP-9 en su forma latente y la segunda actividad está por debajo del peso de 72 kDa, que corresponde a la forma activa de la MMP-2 (62 kDa). Es de notarse que la línea celular T47D secreta una intensa actividad de la MMP-2.

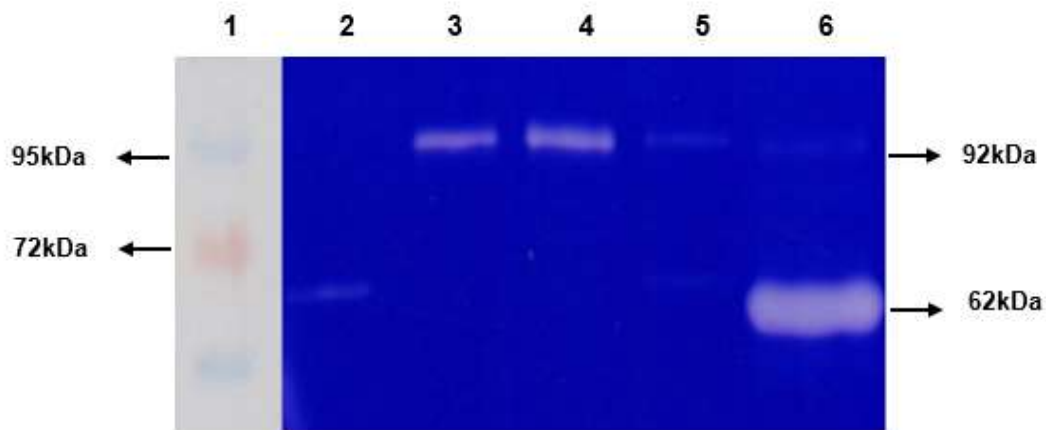


Figura 10. Detección de la actividad enzimática de las MMP- 2 y MMP-9 en líneas celulares de cáncer de mama. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (MPM); Carril 2: línea no tumoral MCF10A; Carril 3: línea celular invasiva BT-549; Carril 4: línea celular invasiva MDA-MB-231; Carril 5: línea celular no invasiva MCF7, Carril 6: T47D no invasiva.

Con base en lo anterior, podemos concluir que todas las líneas celulares de cáncer de mama secretan a las MMP-2 y MMP-9, sin embargo, la expresión de la MMP-9 es selectiva de las células invasivas triple negativas (BT-549 y MDA-MB-231). Por el contrario, las células no invasivas, aunque presentan ambas MMPs, llama la atención la secreción de la MMP-2 en la línea celular T47D, la cual es altamente secretada al medio en comparación con la línea celular MCF7.

6.2 Identificación de MMPs por Inmunofluorescencia

Con la finalidad de continuar con la caracterización de las MMPs en las líneas celulares de cáncer de mama, consideramos interesante realizar ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para conocer la distribución de estas dos proteínas en dichas células.

Al obtener las imágenes de microscopía de fluorescencia, éstas se analizaron con el software ZEISS ZEN microscope con la finalidad de conocer en un número determinado de células, aquellas positivas o negativas a la MMPs. Los resultados se muestran en la tabla 6. Se seleccionaron 45 células por campo de cada línea celular estudiada y se contaron las positivas y negativas de cada una de las MMPs.

Línea Celular	MMP-2	MMP-9
MCF10A	45+	45+
BT-549	31+ / 14-	45+ / 1-
MDA-MB-231	39+ / 6-	37+ / 8-
MCF7	25+ / 20-	32+ / 13-
T47D	35+ / 10-	35+ / 10-

Tabla 6. Células de cáncer de mama positiva y negativa para la MMP-2 y MMP-9.

Las imágenes obtenidas en el microscopio de inmunofluorescencia, nos permitieron identificar en las células cancerosas y en las células no tumorales a las MMP-2 y MMP-9. A continuación se evidencia la distribución de las MMPs en cada una de las líneas celulares estudiadas, en donde se representa en azul, al núcleo teñido con DAPI y en rojo se evidencia la positividad para las MMP-2 y MMP-9, según corresponda. Además en cada uno de los casos, se utilizó como control negativo, al segundo anticuerpo.

La Figura 11, A: representa la distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no tumoral MCF10A y en donde se aprecia que ambas MMPs se localizan en el citoplasma de las células no tumorales. Como se esperaba, en el control negativo sólo se ve teñido el núcleo. Con la finalidad de tener un mejor análisis de la presencia de estas dos MMPs en las células no tumorales se decidió seleccionar 45 células por campo y graficar la intensidad de fluorescencia de las células, el análisis se muestra en la Figura 11,B: en donde se aprecia que la MMP-2 está en mayor cantidad que la MMP-9.

A

B

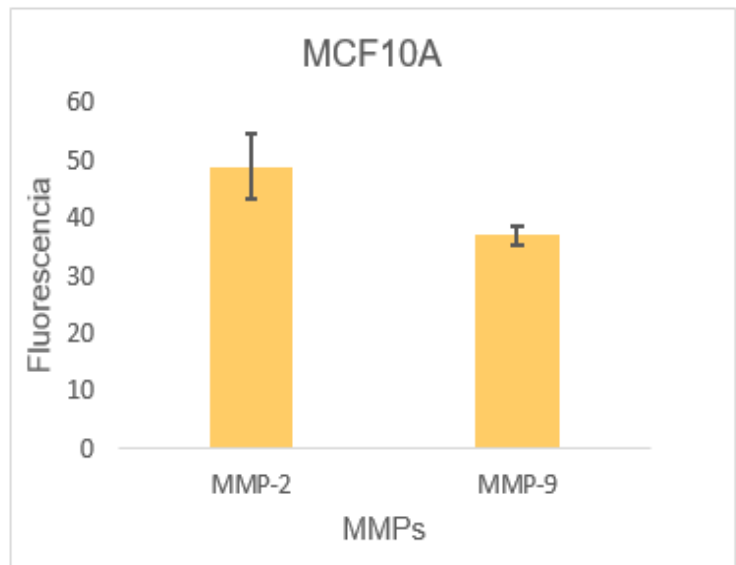
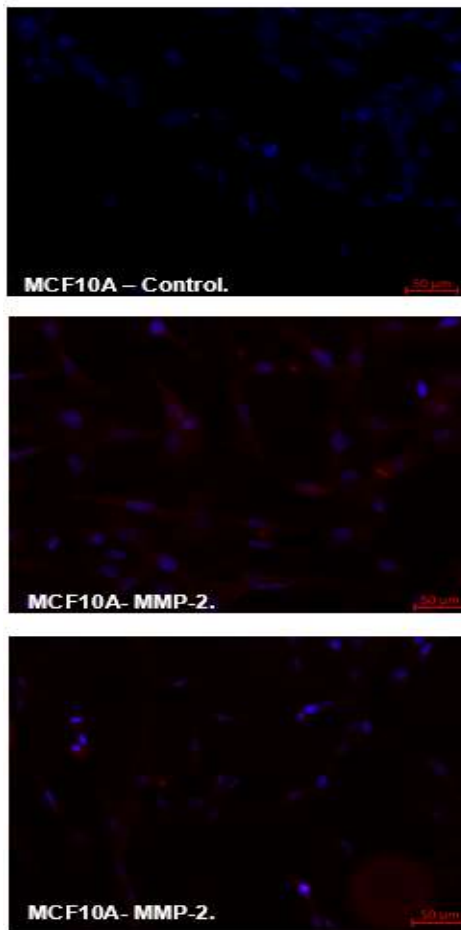
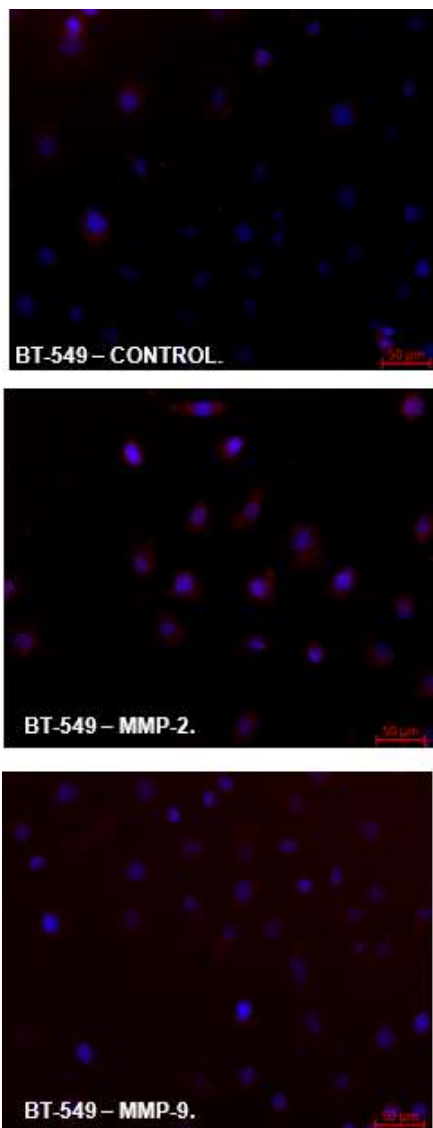


Figura 11. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no tumoral MCF10A. A) Microscopia de Fluorescencia al 20X. Azul: DAPI, tinción para núcleo, y rojo: tinción para las MMP-2 y MMP-9. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las células que presentan a las MMP-2 y a la MMP-9.

La distribución de las MMP-2 y MMP-9, en las líneas celulares cancerosas se muestra a continuación: así la Figura 12, A: muestra que la línea celular invasiva BT-549 presenta ambas MMPs (MMP-2 y MMP-9) en el citoplasma y de manera interesante se muestra en la Figura 12, B: que la MMP-9 está presente con mayor intensidad que la MMP-2.

A



B

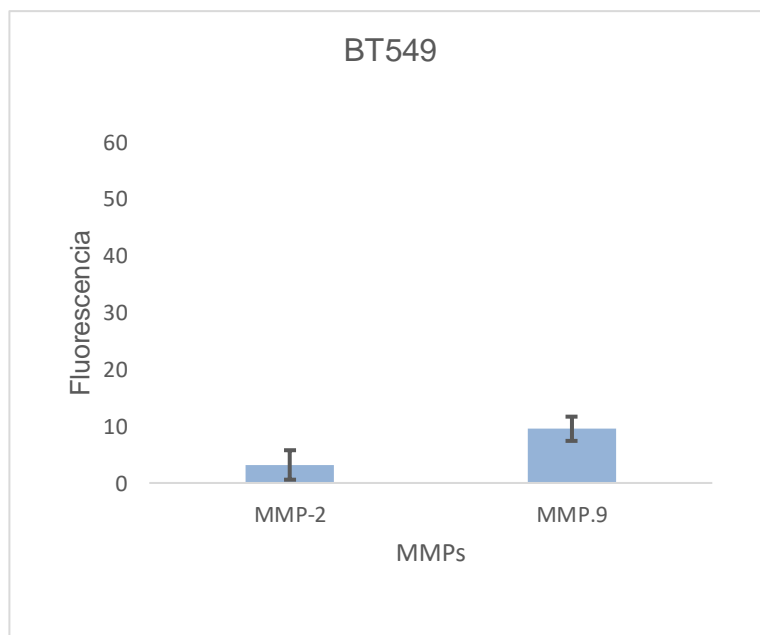


Figura 12. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva BT-549. A) Microscopia de Fluorescencia. 20X: azul: tinción para núcleo, rojo tinción de las MMP-2 y MMP-9. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las MMP-2 y MMP-9

En relación a la otra línea celular invasiva que es la MDA-MB-231, en la Figura 13, A: se aprecia la distribución de ambas MMPs, a diferencia de las células anteriores, interesantemente, ambas proteínas se encuentran polarizadas hacia un lado del citoplasma. Cuando se analizó la intensidad de fluorescencia en las células seleccionadas, en la Figura 13, B: se logra apreciar que la intensidad de la MMP-9 es ligeramente mayor que la MMP-2.

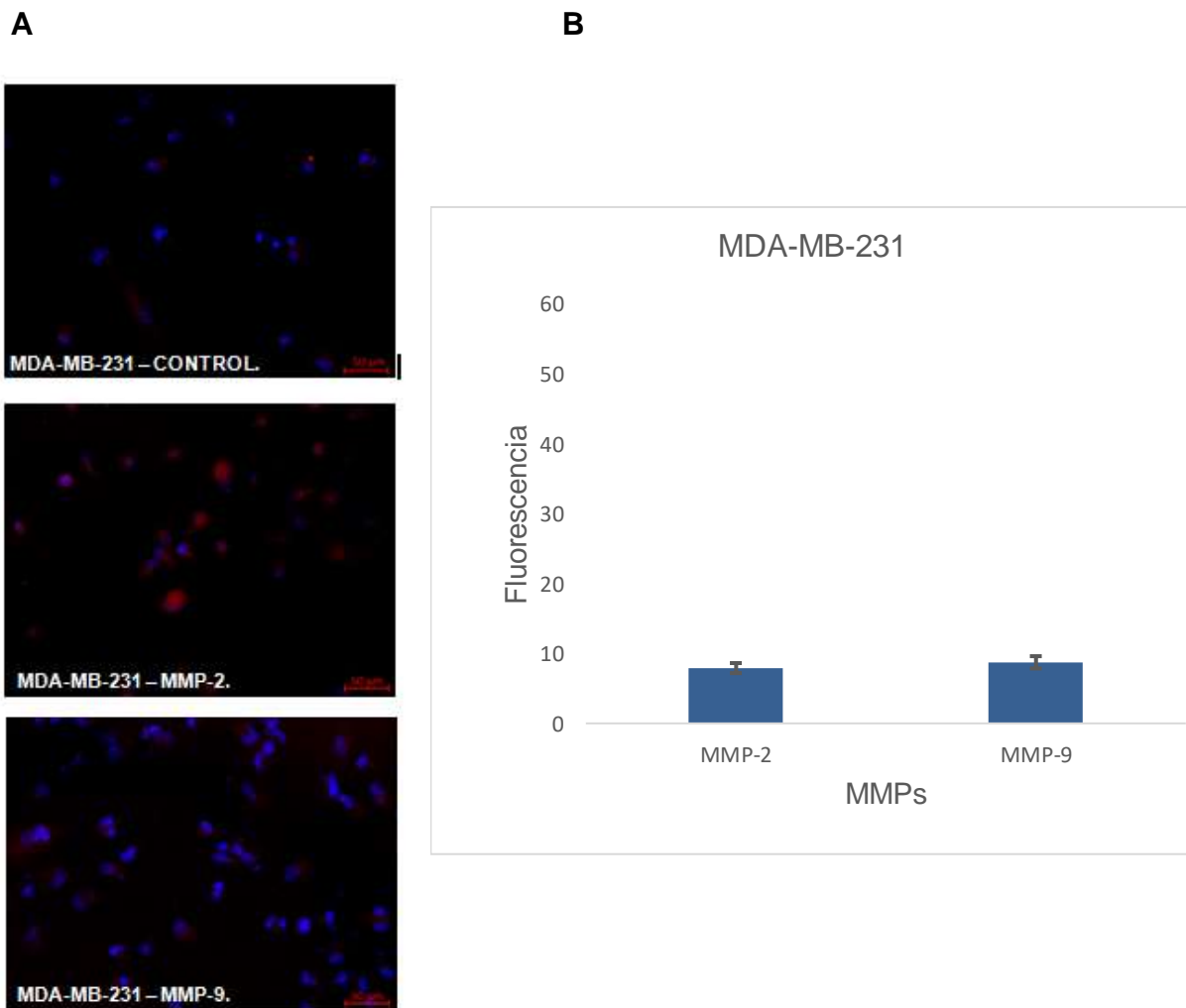


Figura 13. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva MDA-MB-231. A) Microscopia de Fluorescencia al 20X. Azul: tinción para núcleo, rojo: tinción de las MMP-2 y MMP-9. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las MMP-2 y MMP-9.

Cuando se analizó la localización de las MMPs en las células no invasivas se encontró lo siguiente: En la Figura 14, A: se observa que ambas MMPs están presentes en la línea celular MCF7, sin embargo, su distribución es diferente, ya que la MMP-2 está polarizada hacia un lado del citoplasma y la disposición de la MMP-9 es heterogénea, es decir; tanto polarizada como en todo el citoplasma. La gráfica en B, muestra que la MMP-9 es más abundante que la MMP-2 en estas células.

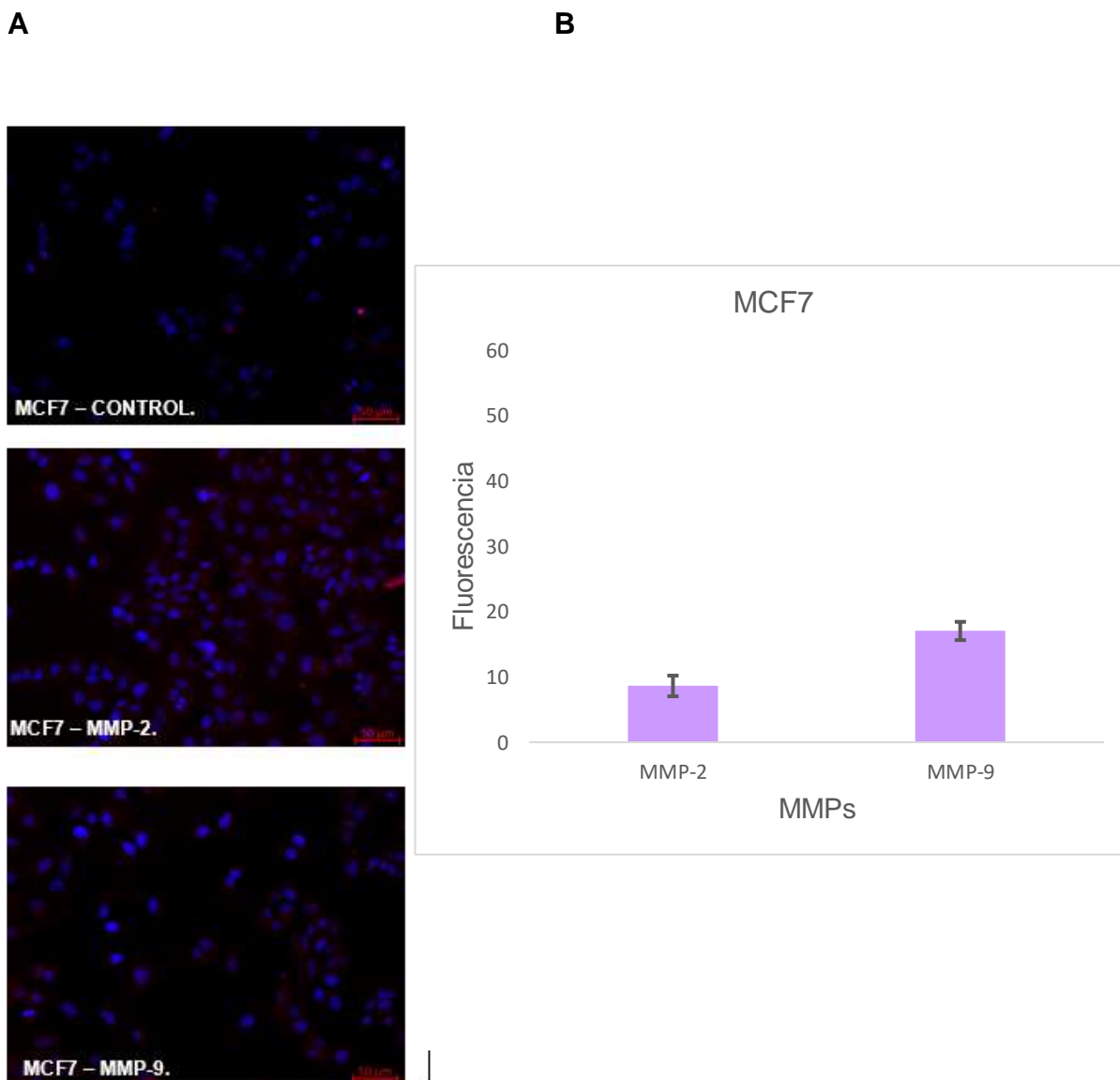
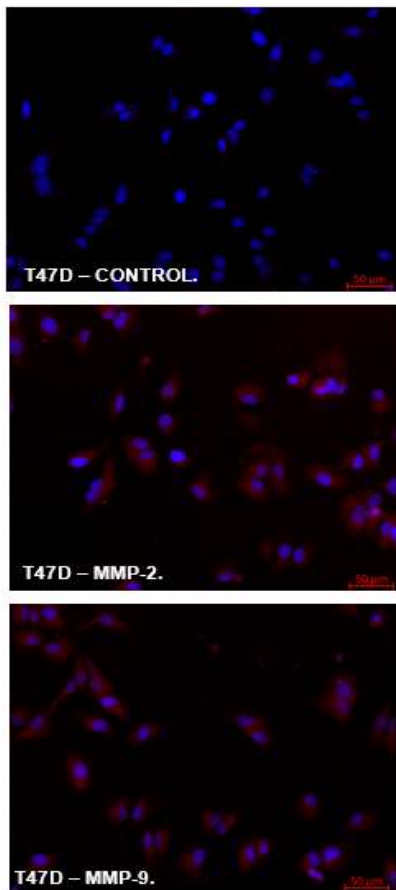


Figura 14. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no invasiva MCF7.A) Microscopia de Fluorescencia al 20X. Azul: tinción para núcleo; rojo: tinción de las MMP-2 y MMP-9.B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la MMP-2 y MMP-9.

Por último, cuando se analizó la distribución de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no invasiva T47D que se muestra en la Figura 15, A: encontramos una fuerte señal de ambas MMPs, llama la atención que nuevamente la MMP-2 se dispone de manera polarizada en un punto de la célula tal y como se observa en la otra línea celular no invasiva MCF7; en cambio la MMP-9 se presenta en todo el citoplasma, resultado que también coincide con las células MCF7. En la gráfica B se aprecia que la intensidad de la MMP-2 es mayor que la de la MMP-9.

A



B

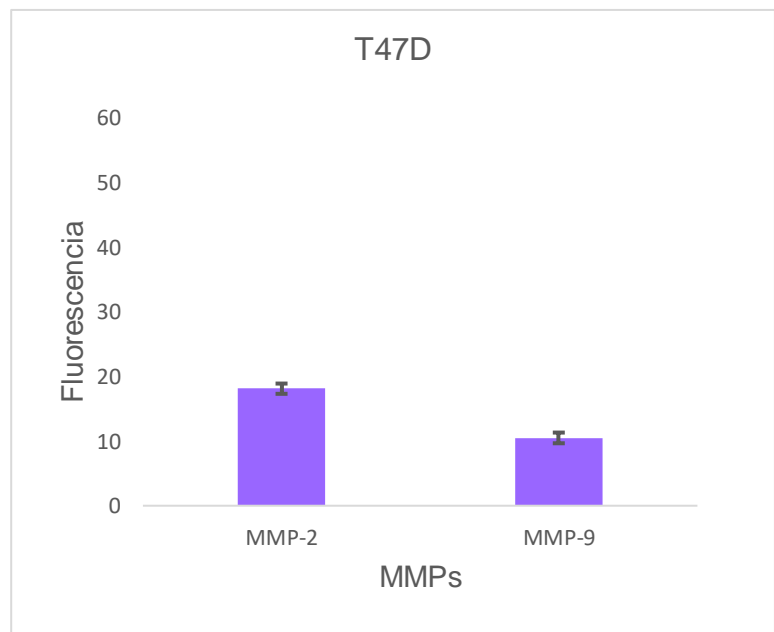


Figura 15. Distribución de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular no invasiva T47D. A) Microscopia de Fluorescencia al 20X. Azul: tinción para núcleo; rojo: tinción de las MMP-2 y MMP-9. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la MMP-2 y MMP-9.

En la Figura 16 se muestra comparativamente la intensidad de fluorescencia de las MMPs en las cinco líneas celulares. A): positividad de las células para la MMP-2, en donde la línea celular no tumoral MCF10A tiene mayor presencia de la MMP-2, seguido por las células no invasivas MCF7 y T47D y finalmente las células invasivas MDA-MB-231 y BT-549 presentan niveles menores de fluorescencia. En B): se muestra el análisis de la intensidad de fluorescencia de aquellas células que reconocen al anticuerpo anti MMP-9. En donde se observa que la MMP-9 está presente mayormente en la línea no tumoral MCF10, seguido de las líneas celulares no invasivas MCF7 y T47D y con una intensidad menor de fluorescencia muy pareada en las líneas celulares invasivas de cáncer de mama.

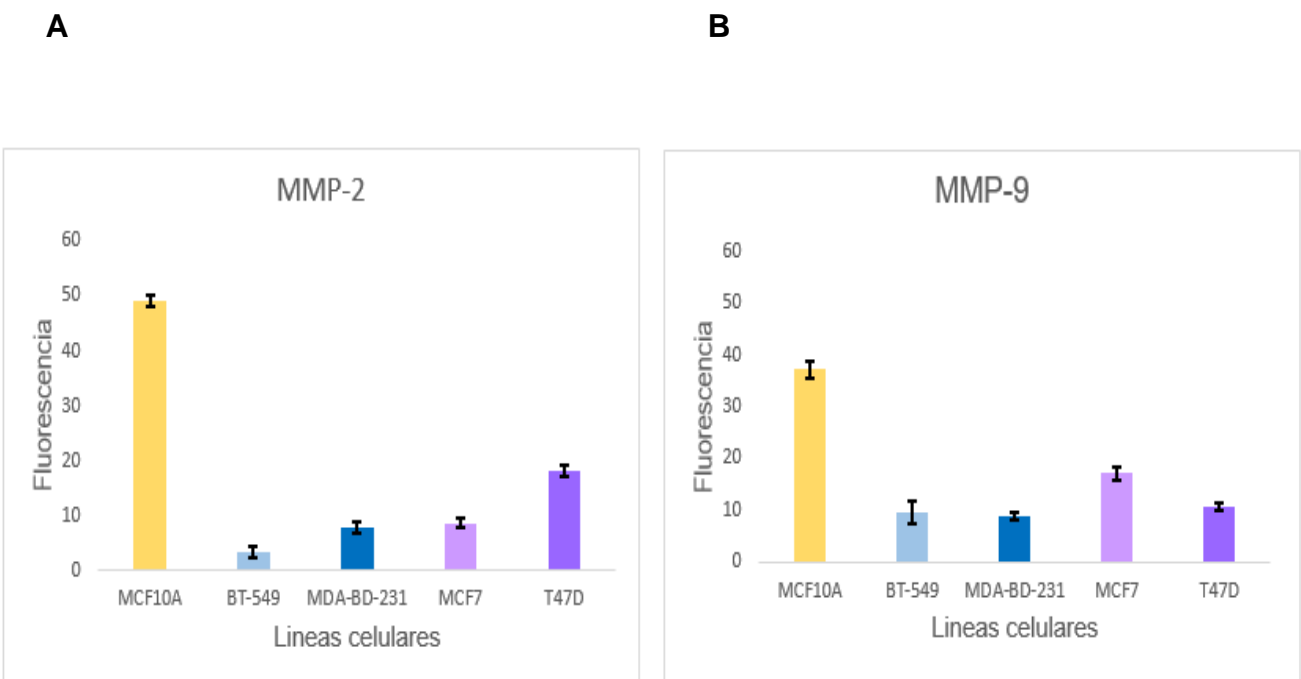


Figura 16. Comparación de la Expresión de las MMPs entre las líneas celulares de cáncer de mama.
 A) Células positivas a la MMP-2. B) Células positivas a la MMP-9.

Como se puede observar en ambas gráficas, en la línea celular MCF10A hay mayor presencia de la MMP-2 y de la MMP-9 en comparación de las líneas celulares invasivas y no invasivas, esto se debe a que las MMPs están presentes en procesos fisiológicos, inflamatorios y de regeneración, pues éstas se

encuentran de manera latente dentro de las células normales. Si estos resultados los comparamos con los de la zimografía se puede observar que son muy diferentes, ya que tanto las líneas celulares invasivas como las no invasivas presentan a las MMP-2 y MMP-9, esto se debe a que las células tumorales tienen la capacidad de secretar a las MMPs y asimismo promueven el desarrollo de cáncer, inestabilidad genética, crecimiento celular, angiogénesis e invasión.

6.3 Cuantificación de MMPs por Citometría de Flujo

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de zimografía e inmunofluorescencia, se decidió realizar la cuantificación de las MMPs por Citometría de Flujo únicamente en las líneas invasivas: BT-549 y MDA-MB-231.

Recordemos que la Citometría de Flujo es una técnica rápida que analiza un número elevado de células en corto tiempo, y lo más importante es que es una técnica con una alta sensibilidad, especificidad y objetividad, por lo que para nosotros era muy importante medir cuantitativamente el nivel de expresión de estas importantes enzimas en las células invasivas.

En la Figura 17 A: se muestra la cuantificación de las MMPs en la línea invasiva BT-549, en donde de color naranja se aprecia la intensidad media de fluorescencia de la MMP-9, y también se puede observar en los picos el número de células que fueron positivas por las proteínas, de color azul se muestra la intensidad de la MMP-2 y de color rojo el anticuerpo secundario ALEXA 405, en donde ligeramente la intensidad de fluorescencia de la MMP-9 es mayor que la MMP-2.

En B se muestra claramente la especificidad de las células: la línea negra nos separa a las células francas positivas para la MMP-9 de color naranja y para la MMP-2 de color azul con respecto al control de fluorescencia (anticuerpo ALEXA 405). El cuadrante Q2 nos muestra a las células positivas; mientras que el

cuadrante Q3 son células negativas o débilmente positivas a nuestras proteínas, en donde la población de la MMP-9 es mayor a la MMP-2.

El eje Y muestra la intensidad media de fluorescencia y el eje X la dispersión de altura de las células.

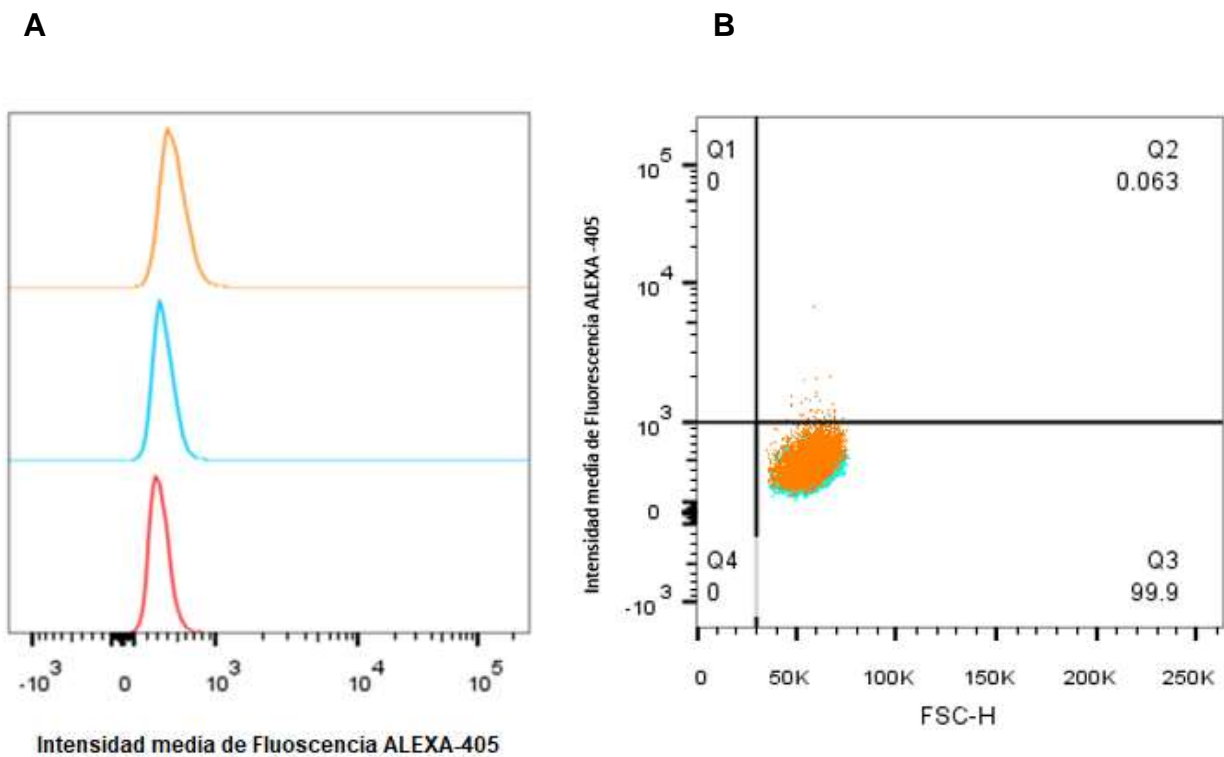


Figura 17. Cuantificación por Citometría de Flujo de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva BT549. A) Naranja: MMP-9; Azul: MMP-2; Rojo: ALEXA-405. B) Población naranja: para MMP-9 y población azul: para MMP-2.

En la Figura 18A se muestra la cuantificación de la otra línea celular invasiva que es la MDA-MB-231, de igual manera, se aprecia en el mismo orden, la cuantificación de cada proteína y en donde la intensidad de fluorescencia es mayor para la MMP-9 que para la MMP-2, en el inciso B se logra apreciar que la población

de células de la MMP-9 es mayor que la de la MMP-2 y la línea separa a las células francas positivas con respecto al control de fluorescencia (anticuerpo ALEXA 405). El cuadrante Q2 nos muestra a las células positivas; mientras que el cuadrante Q3 son células negativas o débilmente positivas a nuestras proteínas.

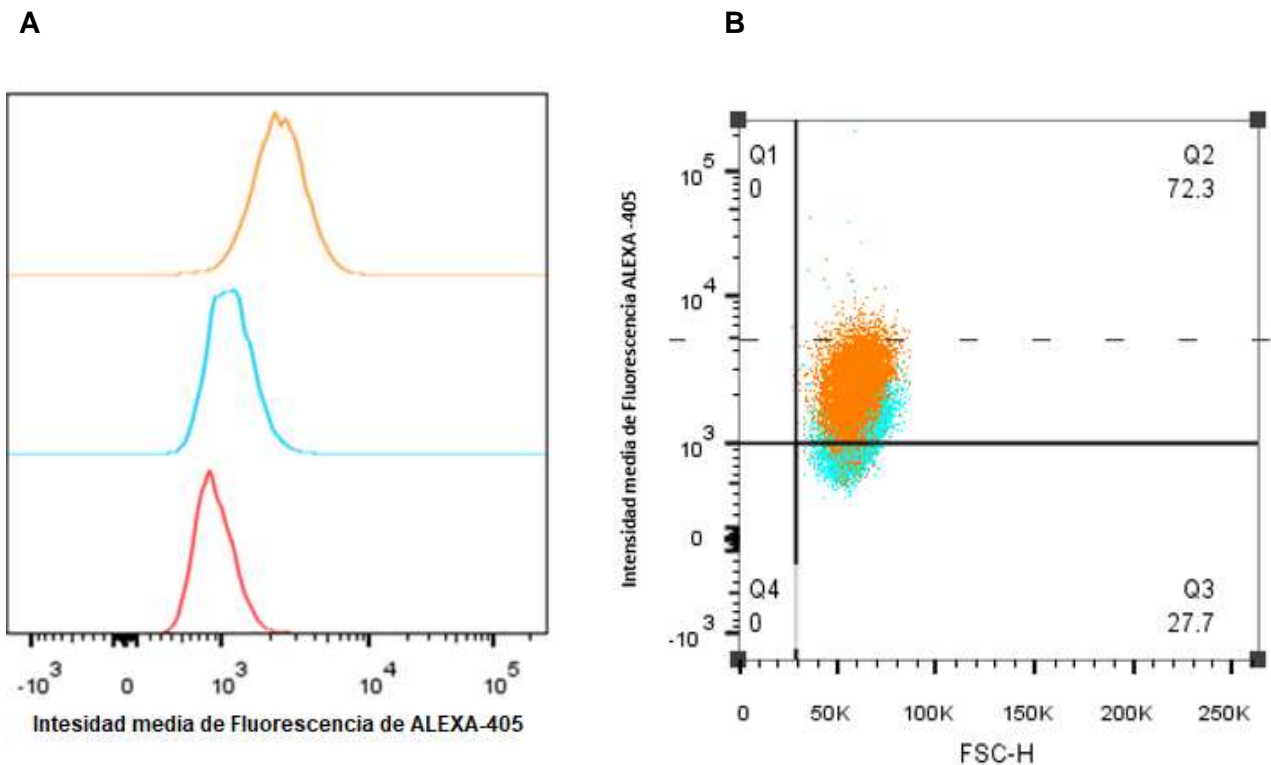


Figura 18. Cuantificación de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular invasiva MDA-MB-231. A) Naranja: MMP-9; Azul: MMP-2; Rojo: ALEXA-405. B) Población Naranja: MMP-9, población azul: MMP-2.

Finalmente, para tener una mejor interpretación de los resultados de Citometría anteriormente señalados, se decidió graficar la intensidad media de fluorescencia; y en la Figura 19, se muestra la intensidad de los anticuerpos primarios, para las dos líneas invasivas; A) BT-549 y B) MDA-MB-231, y en donde se aprecia que la expresión de la MMP-9 es mayor a la de la MMP-2 en las células triple negativas MDA-MB-231, contrariamente a lo reflejado para la otra línea celular triple negativa BT-549.

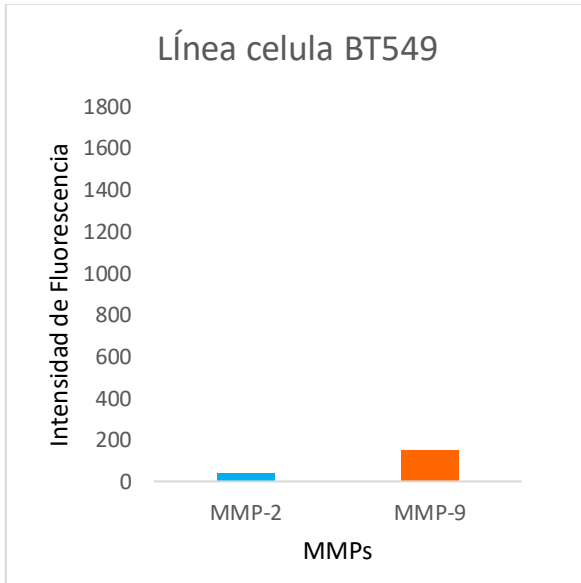
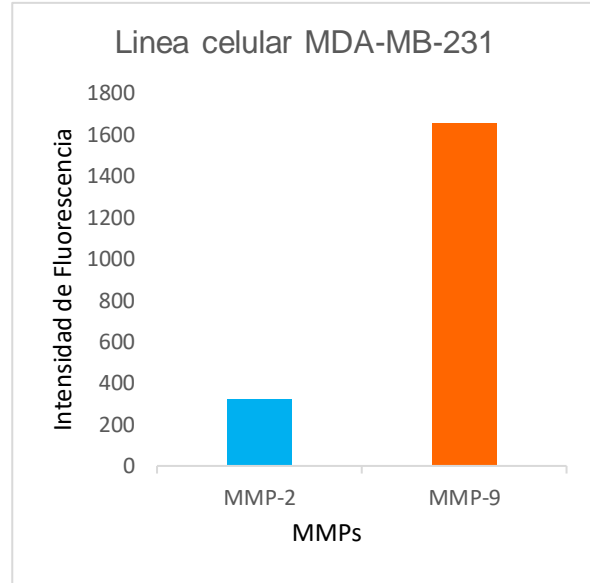
A**B**

Figura 19. Intensidad media de Fluorescencia. Se muestra la fluorescencia que tuvieron las células hacia el anticuerpo de las MMP-2 y MMP-9. A) línea celular invasiva BT-549 y B) línea celular MDA-MB-231.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (1.3 millones de defunciones al año). La mortalidad debida a esta enfermedad se puede atribuir en parte a la falta de diagnóstico temprano, ya que es frecuente que el paciente recurra a la atención médica cuando ya existe una invasión local y/o metástasis, siendo ésta última, la principal causa de muerte del paciente con cáncer.

La invasión y destrucción de los tejidos por las células neoplásicas malignas, está asociada con la degradación de macromoléculas de matriz extracelular, incluyendo los componentes de la membrana basal, vasos sanguíneos y del estroma. Las metaloproteinasas (MMPs), son un grupo de estas enzimas descritas en carcinomas; cáncer de mama, cérvicouterino, de pulmón, de colon, de la cavidad oral, entre otros y algunas de ellas asociadas a mayor agresividad.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue comparar la presencia y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en algunas líneas celulares de cancer de mama invasivas y no invasivas. En este sentido, vale la pena señalar que la razón para estudiar estas importantes proteínas también se desprende de que en nuestro laboratorio estamos interesados en su identificación y caracterización, debido a que las hemos contemplado en nuestros proyectos como piezas clave para estudiar los procesos de invasión y metástasis de las células tumorales de mama, ya sea *in vitro* (a través de líneas celulares) o *in vivo* (modelo de cáncer mamario murino), por lo que los resultados que se desprenden de este trabajo dan la pauta al estudio de estas proteínas y su papel en el cáncer de mama.

Cabe señalar que existen pocos reportes en la literatura que describen la actividad de MMPs en cáncer de mama *in vitro*, por lo que la mayoría de los estudios se han centrado en la identificación y caracterización de las mismas *in vivo* (biopsias y sueros de pacientes).

Las líneas celulares de cáncer de mama que decidimos estudiar en el presente trabajo son aquellas que han sido descritas en la literatura como de importancia biológica o clínica para este padecimiento. Así, a través de los ensayos de zimografía, logramos detectar la actividad secretoria de las MMP-2 y MMP-9 en las células de cáncer de mama de los subtipos invasivos y no invasivos, así como de una línea celular no tumoral.

A través de nuestros ensayos de zimografía, logramos ver a la MMP-2 en su forma activa de 62 kDa y a la MMP-9 en su forma latente de 92 kDa. Las líneas celulares con fenotipo invasivo (MDA-MB-231 y BT549) sólo presentaron la MMP-9, en cambio, las líneas no invasivas (T47D y MCF7) presentaron ambas MMPs. Interesantemente, la línea no tumoral (MCF10A) únicamente presentó la actividad de la MMP-2.

Diversos estudios a través de zimografía en gelatina, han demostrado niveles más altos de MMP-2 y MMP-9 en su forma activa, en tejidos malignos en comparación con los tejidos normales, así, nuestros resultados con las líneas celulares estudiadas coinciden con esto predicamento, ya que como se señaló anteriormente, encontramos una baja expresión únicamente de la MMP-2 en la línea MCF10A.

Bachmeier y Colaboradores en 2001, investigaron la presencia y actividad de algunas MMP en las líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, poco invasiva, MDA-MB-231, invasiva y MDA-MB-435 invasiva y altamente metastásica. La presencia de las MMPs se estudió por inmunocitoquímica, en donde las MMP-3 y MMP-9, así como la MMP-1, MMP-10 y MMP-11 se evidenciaron en el citoplasma en las células altamente metastásicas de manera muy parecida entre ellas, mientras que la MMP-2 reveló una tinción intracelular menor en las tres líneas celulares. A través de Western Blot de los medios condicionados, se demostró la presencia de las MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-10 y MMP-11 en las dos líneas celulares metastásicas. Por otro lado, mediante Zimografía en gelatina se

identificó a la MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo de las tres líneas celulares estudiadas, siendo elevada en las células más malignas MDA-MB-453. Este análisis confirmó los resultados previos a través de otros grupos de investigación que establecen que las células malignas sintetizan más las MMP que las menos malignas y proporcionan evidencias de una asociación biológica general entre la expresión de MMPs y el crecimiento de células tumorales⁽⁸⁸⁾.

El grupo de investigación de Bartsch y Colaboradores en el 2003, evaluaron por RT-PCR semicuantitativo y zimografía en gelatina, la expresión de varias MMP-1, MMP-16 en las líneas celulares tumorales de mama MDA-MB-231, T47D y MCF7, demostrando que dichas metaloproteasas se expresan de manera constitutiva en algunas células tumorales. Además, para conocer su posible regulación, administraron a las células TPA (ácido tereftálico purificado), ConA y RGD (péptido para Fibronectina), aumentando así la expresión de algunas de ellas (MMP-1, MMP- 2, MMP-9 y MMP-10). Mientras que otras fueron susceptibles a la inhibición por antagonistas de MAPK ⁽⁸⁹⁾.

En el 2009, el grupo de Roomi y Colaboradores, estudiaron la actividad de MMP-2 y MMP-9 en diversas líneas celulares cancerosas humanas. El objetivo de este estudio fue examinar el efecto de la PMA (como inductor de enzimas) sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9 en 42 líneas celulares de cáncer humano, seleccionadas en función de las malignidades de sus órganos. Con base en la secreción de MMP-2 y MMP-9 sin y con el tratamiento de PMA, las diversas líneas celulares de cáncer humano en donde se detectó en uno de los dos principales grupos. El primero de ellos caracterizado por la baja secreción basal de MMP-9, se detectó en tres categorías diferentes de susceptibilidad a la inducción de PMA de expresión de MMP-9: resistente, moderadamente susceptible y altamente susceptible. Los altos niveles basales de MMP-9 que responden a la inducción de PMA caracterizaron al segundo grupo. La mayoría de las líneas celulares de cáncer examinadas exhibieron niveles basales de MMP-2, MMP-9 o ambos. La PMA no indujo la secreción de MMP-2 en ninguna de las

células cancerosas examinadas. Estos resultados son importantes, porque ayudan a determinar si las MMP-2 y MMP-9 pueden ser blancos de diagnóstico o tratamiento⁽⁹⁰⁾.

En relación a algunos estudios relacionados con la MMPs tanto en biopsias como en sueros de pacientes con cáncer, cabe destacar los siguientes trabajos:

Garbett y Colaboradores en 1999, encontraron mediante zimografía de tejidos de cáncer de mama (43 pacientes) y colorrectal (24 pacientes) a las metaloproteasas MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en sus dos formas: latente y activa, observando mayor expresión de estas enzimas en el tejido tumoral comparado con el normal en ambos tejidos. De manera interesante, la expresión de dichas metaloproteasas fue mayor en el tejido colorrectal que en el tejido mamario⁽⁹¹⁾.

Otro estudio que sustenta la importancia de las MMPs en cáncer de mama es el realizado por Remacle y Col en 1998, en donde al analizar 84 muestras de carcinomas de mamas encontraron a través de zimografía en gelatina, la forma precursora de MMP-2 (72 kDa) y en un número menor de dichas muestras encontraron a sus formas activadas (62 y 59 kDa). En relación a la MMP-9, la mayoría de las muestras analizadas (52%) contenían a la MMP-9 en su forma precursora. Por otro lado, a través de ensayos en ELISA, encontraron a la MMP-1 en el 12% de las muestras y pocas presentaron a la MMP-3 (2%). Cabe señalar que los niveles de estas tres MMPs se correlacionaron inversamente con el número de metástasis ganglionares. En este estudio se determinó que ni los niveles de la MMP-2 ni los de la MMP-9 se correlacionaron significativamente con el estado clínico del paciente. Sin embargo, aquellos con niveles altos de una banda de 50 kDa tuvieron una supervivencia significativa mejor que los pacientes con niveles bajos. Lo interesante de estas pruebas es que esta actividad de 50 kDa nunca se observó en un tejido normal de mama⁽⁹²⁾.

Estudios como el de Kuvaja y Colaboradores en el 2006 afirman que los niveles séricos de la MMP-2 se asocian con un pronóstico adverso en el cáncer de

mama, al menos en el carcinoma de mama con ganglios positivos, además llegaron a la conclusión de que el bajo nivel de suero proMMP-2 se correlaciona con un comportamiento agresivo. Los autores además señalan que las formas de la MMPs circulantes requieren ser evaluadas en más estudios con la finalidad de explorar su potencial en la clínica ⁽⁹³⁾.

Scorilas y Colaboradores en el 2001 encontraron a la MMP-9 principalmente en células cancerosas y en menor grado en células estromales circulantes. Interesantemente, la expresión de MMP-9, no se detectó en tejido mamario normal. Sus resultados sustentan que MMP-9 puede ser un factor de pronóstico favorable independiente en pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos. Así la sobreexpresión de MMP-9 también se podría utilizar como un marcador para subdividir los pacientes con cáncer de mama negativo en ganglios, con la finalidad de determinar su tratamiento más idóneo ⁽⁹⁴⁾.

Una vez que se determinó la actividad enzimática de las MMP en las líneas celulares de estudio, se procedió a estudiar su distribución subcelular a través de ensayos de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos. Los resultados mostraron un patrón heterogéneo de las MMPs en las células. En donde, la distribución de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, en las líneas celulares estudiadas fue citoplásmica de manera general, llamando la atención células como la MDA-MB-231, en las cuales la distribución de ambas enzimas si bien fue citoplásmica, se polarizó mayoritariamente hacia un polo. Es importante recordar que dicha línea celular proviene de un carcinoma ductal de mama triple negativo y representa uno de los subtipos de cáncer de mama humano más agresivos y difícil de tratar. Considero importante resaltar que dichas células son altamente invasivas, por lo que quizás la polaridad de la MMPs se deba a la condición invasiva de las mismas células, en las que la formación de estructuras de invasión llamadas invadopodios se asocian a una mayor secreción de las MMP-2 y MMP-9.

De manera interesante, las células triple negativas (BT-549 y MDA-MB-231) presentan una mayor cantidad de MMP-9 tanto en su forma secretada (zimografía) como en la forma intracelular (inmunofluorescencia), resultado que coincide con diversos reportes como los mencionados anteriormente, en los que se ha evidenciado una mayor expresión de dicha enzima tanto en líneas celulares cancerosas, como en biopsias de pacientes con diversos tipos de cáncer, aspecto que la han convertido en un buen biomarcador de invasividad para diferentes tipos de cáncer.

La línea celular immortalizada de epitelio mamario humano (MCF10A), se utilizó como control en todos los ensayos. Interesantemente, dicha línea celular no tiene la capacidad de secretar a la MMP-9 (zimografía), pero sí la contiene a nivel intracelular (inmunofluorescencia).

En relación a las líneas celulares no invasivas (MCF7 y T47D), pudimos determinar a través de los ensayos de zimografía e inmunofluorescencia que ambas MMP (MMP-2 y MMP-9) están presentes en las células y también se pueden secretar débilmente al medio de cultivo.

Para nuestro grupo de investigación resulta imperante continuar con la caracterización de las MMPs en las líneas celulares a través de la microscopía de fluorescencia, para poder determinar así su posible co-localización con proteínas estructurales importantes para la migración de las células (actina, filamentos intermedios, microtúbulos, etc). Además, es importante establecer también la posible participación de estas enzimas en los procesos de invasión *in vitro*, a través del modelo de formación de la estructura llamada invadopodio, utilizando sustratos como la gelatina, colágena y laminina, para poder establecer su posible papel en los procesos de transducción de señales ocasionadas por la interacción de las células con los componentes de matriz extracelular anteriormente mencionados, aspectos que influyen en la polaridad celular, en la proliferación e invasión.

En relación a los resultados obtenidos a través de la citometría de flujo, se puede determinar que las células invasivas MDA-MB-231 y BT549 presentan una mayor cantidad de MMP-9 que de MMP-2. Estos resultados coinciden con los de la zimografía en los que se evidenciaron zonas claras de lisis alrededor de 92kDa correspondientes a la actividad de la MMP-9.

Será necesario continuar caracterizando a través de la citometría de flujo, la presencia de las MMPs en las líneas celulares de interés para el laboratorio con la finalidad de tener completo el panel de expresión de dichas enzimas, tanto en las células no invasivas como en las células no tumorales de mama MCF10A.

Como ya quedó establecido en esta tesis, si bien las MMPs son proteínas ampliamente conocidas tanto en escenarios celulares normales, como cancerígenos, su análisis *in vitro* y/o *in vivo* será siempre importante de seguir discutiendo. Por tal motivo, la consideración de aplicar nuevas técnicas que nos permitan evaluar ampliamente a estas enzimas, contribuirá a un mejor entendimiento de sus funciones dentro de la compleja biología molecular del cáncer de mama.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad de la MMP-2 (forma activa, 62 kDa) y MMP-9 (forma inactiva, 92 kDa) utilizando la técnica Zimografía y como sustrato a la Gelatina en las líneas celulares de cáncer de mama:

2. Algunas líneas celulares de cáncer de mama secretan únicamente a la MMP-2 (MCF10A) o a la MMP-9 (BT-549 y MDA-MB-231), y algunas ambas (MCF7 y T47D).

3. La expresión de la MMP-9 de secreción es selectiva de las células invasivas triple negativas: BT-549 y MDA-MB-231.

Este resultado es relevante ya que confirma que la MMP-9 participa activamente en los procesos durante la invasión y metástasis de la célula tumoral, por lo que constituye un buen candidato para utilizarse en la terapia anti-metastásica para el cáncer de mama triple negativo, un subtipo con pronóstico desfavorable y con pocas opciones terapéuticas.

4. Los ensayos de Inmunofluorescencia demostraron que: la MMP-2 y la MMP-9 se localizan a lo largo de todo el citoplasma de las células invasivas (BT-549 y MDA-MB-231) y en las no invasivas (T47D y MCF7) la MMP-2 se encuentra polarizada hacia un lado del citoplasma. La MMP-9 en dichas células se distribuye de manera heterogénea en toda la célula.

5. La línea no tumoral MCF10A presenta a la MMP-2 y MMP-9 en todo el citoplasma y en mayor proporción que en las células tumorales (invasivas y no invasivas).

Es importante resaltar que la MMP-2 y la MMP-9 en condiciones normales son expresada por las células del estroma de la mayoría de los tejidos (macrófagos, mastocitos, fibroblastos, células dendríticas, endoteliales, hematopoyéticas); por lo que era de esperarse que estuviesen presentes en las células MCF10A.

6. Por citometría de flujo se confirma que: las células triple negativas y altamente invasivas MDA-MB-231 contienen a la MMP-9 en mayor proporción que la MMP-2. Este resultado es interesante ya que confirma lo establecido por la literatura en relación a que esta importante MMP está estrechamente relacionada con los subtipos más agresivos de esta enfermedad.

ANEXOS

A) Preparación de medios de cultivo

A.1. Medio RPMI 1640

Preparación de los medios en polvo:

- Disolver el polvo en aproximadamente el 95% de volumen total a realizar. El otro 5% será ocupado por Suero Fetal Bovino (SFB).
- Añadir la cantidad necesaria de bicarbonato de sodio (2g/L).
- Ajustar el pH de 0.2 a 0.3 unidades por debajo del pH de trabajo deseado (7.0 a 7.4) por adición de 1N NaOH o HCL 1N con agitación, ya que el medio sube 0.1-0.2 unidades después de filtración en algunos casos.
- Mantener el recipiente cerrado hasta que esté listo para filtrar.
- Filtrar a través de un filtro de 0.22 micras (Millipore) con ayuda de una bomba peristáltica.

A.2. Medio DMEM (Dulbecco Medio Esencial Mínimo)

Preparación de los medios en polvo:

- Disolver el polvo en aproximadamente el 95% de volumen total a realizar. El otro 5% será ocupado por Suero Fetal Bovino (SFB).
- Añadir la cantidad necesaria de bicarbonato de sodio, 25 Mm HEPES, 2.05 Mm de L-Glutamina.
- Ajustar el pH de 0.2 a 0.3 unidades por debajo del pH de trabajo deseado (7.0 a 7.4) por adición de 1N NaOH o HCL 1N con agitación.
- Mantener el recipiente cerrado hasta que esté listo para filtrar.
- Filtrar a través de un filtro de 0.22 micras (Millipore) con ayuda de una bomba peristáltica.

A.3. Medio F12

Para la preparación de este medio se mezclan los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
DMEM/F12 (Invitrogen #11330-032)	500ml
Suero de caballo (Invitrogen #16050-122)	25ml
EFG (100 μ l /ml stock)	100 μ l
Hidrocortisona (1mg/ml)	250 μ l
Toxina Colérica (1mg/ml stock)	50 μ l
Insulina (10mg/ml stock)	500 μ l
Pen/Strep (Solución 100X, Invitrogen #15070-063)	5ml

Tabla A.1: cantidad de reactivos necesarios para medio F12.

B. Preparación de soluciones

B.1. Tripsina

- Preparar tripsina disuelta en PBS al 0.25%. Pesar con exactitud 0.0125g de tripsina y aforar a un matriz de 5 ml con PBS.
- Preparar EDTA disuelto en PBS al 0.25%. Pesar con exactitud 0.0125 de EDTA y aforar en un matraz de 5ml con PBS.
- Poner en proporción 1:1 de tripsina y EDTA.

B.2. Solución de PBS concentración 1X

Para esta solución se mezclan los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad (gr)
NaCl	0.8
KCl	0.02
NaHPO ₄ 7H ₂ O	0.1125
KH ₂ PO ₄	0.019

Tabla B.1: cantidad de reactivos necesaria para PBS.

Aforar con un matriz de 100ml con agua destilada y mantener a 4°C.

B.3 Bradford al 5x

- Pesar 100 mg (de azul brillante Comassie G-250).
- Disolver en 50ml de etanol al 95% y mezclar con 100ml de ácido fosfórico.
- Aforar a 200ml con H₂O.

C. Preparación de soluciones para Zimografía

C.1.Solucion Tris pH 8.8 1,5 M (50 ml)

Reactivos:

- Tris base 9.085gr
- Disolver aproximadamente en 40ml
- Aforar en 50ml en agua desionizada.

C.2 Solución Tris pH 6.8 0.5 M (50ml)

Reactivos:

- Tris base 3.03gr
- Disolver aproximadamente en 40ml.

- Aforar en 50ml en agua desionizada.

C.3. Solución SDS al 10%

- 1.0gr de duodecilsulfato de sodio (SDS); disolver en 500ml de agua desionizada.

C.4. Solución destiñidora (500 ml)

- Agua desionizada (250ml)
- Ácido acético gracial (50ml)
- Metanol al 95% (200ml).
- Agitar.

C.5 Azul de Coomassie (500 ml)

- Agua desionizada. (250 ml)
- Ácido acético glacial (25 ml)
- Metanol (225 ml)
- Agitarlo y suavemente agregar azul de Coomassie R 1.25gr.

C.6 Buffer de corrida 1 x (1 L)

- Agregar un volumen de agua desionizada de 750 ml
- 14gr de glicina.
- 3gr de Tris–base.
- 1gr de SDS.
- Agitar y finalmente aforar a un volumen de 1000ml.

C.7. Acrilamida – bis acrilamida

- Agregar un volumen de 20ml de agua desionizada.
- 14.6gr de Acrilamida.
- 0.4gr de Bis–acrilamida.

- Finalmente aforar a un volumen de 50ml

C.8. Gelatina

- Utilizar una concentración de gelatina 10 mg/ml.

C.9. Gel concentrador

Buffer	Volumen
H ₂ O desionizada	1.82 ml
Acrilamida –bis acrilamida	415 µl
Buffer de 0.5 M, pH 6.8	210 µl
SDS al 10%	25 µl
Persulfato de amonio al 10%	25 µl
TEMED al 10%	2.5 µl

Tabla C.1. Reactivos para la preparación del gel concentrador

C.10. Gel Separador al 10%

Buffer	Volumen
H ₂ O desionizada	1.5 ml
Acrilamida –bis acrilamida	1.66µl
Buffer de 1.5 M, pH 8.8	1.25 ml
SDS al 10%	50 µl
Persulfato de amonio al 10%	50µl
TEMED al 10%	3µl
Gelatina 10 mg / ml	500 µl

Tabla C.2. Cantidad de volumen para gel separador.

C .11. Buffer de Tritón -100 para lavado

- 48.25ml. de agua desionizada.
- 1.75ml de Tritón-100 (al 25%).
- Este buffer se debe realizar al momento en que será utilizado.

C.12.Buffer de incubación

- Agregar un volumen de 48.4ml de agua desionizada.
- Pesar 0.01gr de azida de Na.
- 0.4gr de CaCl₂
- Agitar y agregar 1.6ml del buffer 1.5 M, pH 8.8.
- Este buffer se realiza en el momento que será incubado el gel.

D. Soluciones para ensayos de Inmunofluorescencia

- PBS
- Para permeabilizar las células se utiliza Tritón X.100 al 0.1% más BSA al 1%.
- Para fijar las células se ocupa paraformaldehido al 9% en PBS.
- Para bloquear las células se necesita PBS –TWEEN 20 al 0.1%, BSA al 1% y glicina a 22.5 mg/ml
- Los portaobjetos se montan con agua –glicerol 1:1.

REFERENCIAS

1. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al, Molecular Cell Biology. 4th ed2000, New York.
2. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Recuperado el 2 de enero de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. International Agency for Research on Cancer [IARC]. (2012). Cancer fact sheets: all cancers excluding non-melanoma skin cancer. Recuperado el 2 de enero de 2017, de: <http://gco.iarc.fr/today/data/pdf/fact-sheets/cancers/cancer-fact-sheets-29.pdf>
4. Lozano R, Knaul FM, Gómez-Dantés H, Arreola-Ornelas H, Méndez O. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud.
5. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en el segundo y tercer nivel de atención. Instituto Mexicano del Seguro Social. 2010 México DF.
6. Russo, J. and I.H. Russo. Development of the human breast. *Maturitas* 2004. 49(1): p. 2-15
7. Campbell, L.L. and K. Polyak. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution. *Cell Cycle* 2007. 6(19): p. 23-32
8. Heywang-Köbrunner SH, Dershaw DD, Schreer I. Diagnostic Breast Imaging. 2nd Ed. New York, NY: Thieme; 2001

9. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. AJCC Cancer staging manual. 6th. Ed. New York, NY: Springer Verlag; 2002
10. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res. 2004;10(16):5367-74
11. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol 2006;19(2):264-71
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Christian A. Rees CA, et al: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406:747-752
13. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10393-10398
14. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:8418-8423
15. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 736e5

16. Soutiriou C. and Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:790-800
17. Foulkes WD; Stefansson IM; Chappuis PO; Begin LR; Goffin JR; Wong N et al. Germ line BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(19):1482-5
18. McCafferty M; Healy N; Kerin M. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology* 2009; 15(10):485-9
19. Bal de Kier Joffé E., M.E., Aguirre Ghiso J. Vías de señalización que regulan la expresión de proteasas durante la progresión tumoral. *Medicina*, 2000. 60 (Supl. II).
20. Fidler, I.J., The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 453-8
21. Al-Rawi, M.A. and W.G. Jiang, Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. 16: p. 723-39. 15
22. Nishida, N., et al., Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*, 2006. 2(3): p. 213-9
23. Manzotti C. Audisio RA, Pratesi G. Importance of orthotopic implantation for human tumors model systems: relevance to metastasis and invasion. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 5-14
24. Sage EH, Borstein P. Extracellular matrix proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 1991; 266: 14831-14834. 14

25. Kerbel R. Expression of multicytokine resistance and multigrowth factor independence in advanced stage metastatic cancer. *Am J Pathol* 1992; 141: 519-524
26. Fidler IJ, Hart R. Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982; 217: 998-1001
27. Folkman J, and Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934
28. Maria BL, Rehder K. Brainstem glioma: I. pathology, clinical features, and therapy. *J Child Neurol* 1993; 8: 112-128. 25
29. Weidner KM, Hartman G. Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 229-237
30. Plow EF, Miles LA. Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell Differ Dev* 1990; 32: 293-298
31. DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell B. The presence and possible functions of the matrix metalloproteinase activator protein in developing enamel matrix. *Biochem J* 1989; 264: 917-920
32. Krystosek A, Seeds NW. Normal and malignant cells, including neurons, deposit plasminogen activator on the growth substrata. *Exp Cell Res* 1986; 166: 31-46
33. Lopez-Otin C, Mastrin LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 800-807
34. Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs-an historical perspective . *Mol Biotechnol* 2002;22:33-49

35. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry . *Circ Res* 2003;92:827-839
36. Egeblad, M., and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev* 2, 2002;161-174
37. Arvelo, F. y C. Cotte. Metaloproteasas en la progresión tumoral. *Investigación clínica* 2006;ISSN 0535-5133
38. Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev* 2,2002; 657-672
39. Overall, C. M. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151,2001; 79-120
40. Van de Steen, P. E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R., et al. (2006). The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem* 281, 18626-18637
41. Baker, A. H., Edwards, D. R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115, 3719-3727
42. Miki T., Takegami, Y., Okawa, K., Muraguchi, T., Noda, M., and Takahashi, C. (2007). The reversioninducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK)

interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase Chem 282, 12341-12352

43. Imai K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., and Okada, Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 1997;322, 809-814

44. Amoh Y, Li L, Yang M, et al. Hair follicle-derived blood vessels vascularize tumors in skin and are inhibited by Doxorubicin. *Cancer Res* 2005;65:2337-2343

45. Hrabec Z. Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. *Respir Med* 2001;95:1-4

46. Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase 2, -9, and -13. *J Biol Chem* 2003;278:22404-22411

47. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006;12:895-904 D.

48. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004;167:223-229

49. Min C, Eddy SF, Sherr DH, et al. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem*. 2008;104:733-44

50. Bjorklund, M. and E. Koivunen. Gelatinasemediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1755(1): p. 37-69

51. Van den Steen, P.E., et al., Biochemistry and molecular biology of gelatinase Bormatrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002. 37(6): p. 375536

52. Rudd, P.M., et al., Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. *Biochemistry*, 1999. 38(42): p. 13937-50

53. Van den Steen, P.E., et al., The hemopexin and Oglycosylated domains tune geltinase B/MMP9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Bi ol Chem*, 2006. 281(27): p. 18626-37

54. Khan, M.M., et al., Protein disulfide isomerase mediated disulfide bonds regula te the gelatinolytic activity and secretion of matrix metalloproteinase9. *Exp Cell Res*, 2012. 318(8): p. 904-14

55. Vu, T.H., et al., MMP9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenes is and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 1998. 93(3): p. 411-2

56. Vandooren, J., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, Biochemistry and molecular bi ology of gelatinase B or matrix metalloproteinase9 (MMP9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013. 48(3): p. 222-72

57. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cáncer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278: 16-27

58. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 161-8
59. Cascales Angosto M, Alvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm* 2010; 76: 59-84
60. Rucci N, Sanită P, Angelucci A. Expanding View of the Role of Matrix Metalloproteases in Metastatic Growth. *Curr Mol Med* 2011; 11: 609-22
61. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–74
62. Polette M, Gilbert N, Stas I, Nawrocki B, Noel A, Remacle A, Stetler-Stevenson WG, Birembaut P, Foidart M: Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch* 424(6): 641–645, 1994
63. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, BlancoSequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T: Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 83(6): 1153–1162, 1998
64. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y: Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 87(6): 602–611, 1996.
65. Uria JA, Stahle-Backdahl M, Seiki M, Fueyo A, Lopez-Otin C: Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997; 57(21): 4882–4888.

66. Jingga DC, Blidaru A, Condrea I, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 499-510

67. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001;84:1488-1496.

68. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, et al. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol.* 1991;4:239-46

69. Sun Y, Liu M, Yang B, Lu J, Li B. Inhibition of laryngeal cancer cell invasion and growth with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human MMP-9 gene. *Cancer Invest* 2008;Dec;26(10):984-9

70. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:3110-3116

71. Del Casar JM, González LO, Alvarez E, et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 116: 39-52

72. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med J* 2006; 47: 333-42

73. Têtu B, Brisson J, Wang CS, et al. The influence of MMP14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R28
74. Surlin V, Ioana M, Pleșea IE. Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors - clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52: 231-6
75. RAWDANOWICZ TJ, HAMPTON AL, NAGASE H, WOOLLEY DE, SALAMONSEN LA. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(2):530-6
76. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha. *Med Hypotheses* 2003; 60(1):84-8.
77. MARCHENKO GN, MARCHENKO ND, LENG J, STRONGIN AY Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J* 2000; 363(Pt 2):253-62
78. PARK HI, NI J, GERKEMA FE, LIU D, BELOZEROV VE, SANG QX. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem* 2000; 275(27):20540-4
79. PILKA R, NORATA GD, DOMANSKI H, ANDERSSON C, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLÉN B. Matrix metalloproteinase-26 (matrilysin-2) expression

is high in endometrial hyperplasia and decreases with loss of histological differentiation in endometrial cancer. *Gynecol Onco* 2004.; 94(3):661-70

80. Savinov A, Remacle A, Golubkov V, Krajewska M, Kennedy S, Duffy MJ, et al. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:2716-2724

81. Lukkaa M, Vinhien P, Kronqvist Pet al. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patient head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:22

82. Saussez S, Claudts S, Capouillez A et al. Identification of matrix metalloproteinase -9 as an independent prognostic marker in laryngeal and hypopharyngeal cancer with opposite correlations to adhesion growth-regulatory lectins-1 and -7. *Int J Oncol* 2009,34;433-439

83. Blanton SH, Bertin T, Serna ME, Stal S, Mulliken JB. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13 and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2004; 125A(1): 23-7

84. Brown GD, Nazarali AJ. Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF-beta3. *BMC Dev Biol*. 2010; 10: 93

85. Gorrin-Rivas M, Arii S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, et al. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:1647-1654. 161

86. Dong, Z., Kumar, R., Yang, X. & Fidler, I. J. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997;88:801-810
87. Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
88. Bachmeier BE, Nerlich AG, Lichtinghagen R, Sommerhoff CP. Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. 2001. *Anticancer Res.* (6A):3821-8
89. Bartsch JE1, Staren ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. 2003. *J Surg Res.* (2):383-92
90. M.W. Roomi, J.C. Monterrey ,T. Kalinovsky, Mz. Rath and A. Niedzwiecki. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. 2009. *Oncology Reports* 21: 1323-1333
91. Garbett EA, Reed MW, Brown NJ. Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;81:287-93
92. Ramacle AG, Noel A, Duggan C, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, *et al.* Assay of matrix metalloproteinases types 1,2,3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:926-31
93. Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P & Turpeenniemi-Hujanen T (2006) Low serum levels of pro-matrix metalloproteinase 2 correlates with aggressive behavior in breast carcinoma. *Hum Pathol* 37: 1316–1323

94. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001;84:1488–96