



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISOLOGÍA**

**LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA**



**La activación del receptor “*Toll-like 4*” (TLR-4) por lipopolisacárido (LPS) estimula la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB-231, provenientes de cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

PRESENTA

Q.F.B. Karina Ruiseco Flores

DIRECTOR DE TESIS

Eduardo Monjaraz Guzmán

AGOSTO 2015

## INDICE

	Pág
INDICE DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CANCER.....	5
CANCER DE MAMA.....	8
Epidemiología.....	8
Patogénesis.....	9
Factores de riesgo.....	11
RELACIÓN CANCER E INFLAMACIÓN.....	12
Inflamación y Metástasis.....	12
Mantenimiento del fenotipo mesénquimal.....	15
RELACIÓN CANCER DE MAMA E INFLAMACIÓN .....	16
SEÑALES INDUCTORAS DE INFLAMACIÓN.....	17
LIPOPOLISACARIDO (LPS).....	19
RECEPTOR A LIPOPOLISACARIDO, TLR-4.....	19
EFFECTO DE LPS SOBRE LA FISILOGIA CELULAR.....	21
Interleucina-6 .....	22
Factor de necrosis tumoral alfa.....	23
Subunidad alfa del canal de sodio sensible a voltaje Na <sub>v</sub> 1.5.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPOTESIS.....	25

OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
METODOLOGIA.....	27
Modelo celular MDA-MB-231.....	27
Cultivo de línea celular.....	28
Ensayo de RT-PCR.....	28
Extracción de ARN total.....	28
Síntesis de ADN complementario.....	28
PCR.....	29
Separación electroforética de los productos de PCR.....	30
Densitometría.....	30
Ensayos de migración.....	30
Herida.....	30
Transwell.....	30
Ensayo de proliferación (recuento celular).....	31
Inmunocitoquímica.....	32
ELISA.....	32
Preparación de las placas.....	32
Protocolo de ELISA.....	33
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
Expresión diferencial del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) en líneas celulares de mama.....	34

La activación de TLR-4 por LPS no afecta la capacidad proliferativa de células MDA-MB-231.....	35
TLR-4 activado por LPS promueve el aumento de la capacidad migratoria.....	37
El aumento de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 mediado por la activación de TLR-4, depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición de LPS.....	38
La activación de TLR-4 dependiente de LPS aumenta la expresión de citocinas pro-inflamatorias.....	41
La expresión de factores de transcripción asociados al fenotipo mesénquimal <i>SNAIL-1</i> , <i>SNAIL-2</i> y <i>ZEB-1</i> , así como de Vimentina incrementan vía activación de TLR-4 por LPS.....	42
El incremento en la expresión de IL-6, TNF- $\alpha$ , <i>SNAIL-1</i> , <i>SNAIL-2</i> y <i>ZEB-1</i> , es mediado por la activación de NF- $\kappa$ B.....	44
Na <sub>v</sub> 1.5 participan en la exacerbación de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, dependiente de la activación de TLR-4.....	46
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	52
BIBIOGRAFIA.....	54



## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BCRA1</b>	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1
<b>CaM</b>	Cáncer de mama.
<b>CD71</b>	Antígeno de diferenciación 71/ Receptor de transferrina
<b>CLS-B</b>	Estructuras en forma de corona de la mama
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares
<b>GGH</b>	Gamma-glutamil hidrolasa
<b>HER2/<i>neu</i></b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
<b>HSP22</b>	Proteína de choque térmico 22
<b>HSP60</b>	Proteína de choque térmico 60
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico 70
<b>HSP96</b>	Proteína de choque térmico 96
<b>HMGB1</b>	Proteína del grupo de alta movilidad Box1
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International
<b>IKK</b>	Cinasa I $\kappa$ B
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1beta.
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
<b>IRAK</b>	Cinasa asociada al receptor de la interleucina 1
<b>JNK</b>	Cinasa c-Jun N-terminal
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido

<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MYB</b>	Proteína relacionada a la mieloblastosis.
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88.
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud.
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SQLE</b>	Monooxigenasa de escualeno
<b>STAT 3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
<b>siRNA</b>	ARN interferente pequeño
<b>TAK</b>	cinasa 1 activadora del factor transformador del crecimiento
<b>TAMs</b>	Macrófagos asociados a tumor.
<b>TEM</b>	Transición epitelio- mesénquima
<b>TIRAP/Mal</b>	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR / Adaptador semejante a MyD88
<b>TP53</b>	Proteína tumoral p53.
<b>TN</b>	Triple negativo
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TRAF 6</b>	Factor asociado al receptor de TNF 6
<b>TTX</b>	Tetradotoxina
<b>VGSC</b>	Canales de sodio dependientes de voltaje

## RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública, en México y el mundo, en nuestro país corresponde a 30.8% de los casos de cáncer en mujeres de 20 años y más. La metástasis es la evolución clínica más agresiva del cáncer, causa el 90% de los descensos. Se ha correlacionado un microambiente inflamatorio con el desarrollo y exacerbaciones de capacidades tales como un aumento en la movilidad e invasión, esta exacerbación de la capacidad migratoria se relaciona con el mantenimiento de un fenotipo móvil (mesenquimal) y la participación de proteínas de membrana tales como canales de sodio dependientes de voltaje.

Nosotros decidimos evaluar un elemento de ese microambiente inflamatorio, el receptor tipo toll 4 (TLR-4), receptor que fue descrito inicialmente en células involucradas en la respuesta inmune innata, pero se ha demostrado que se encuentra presente en células de tipo epitelial y de cáncer. La vía de señalización activada por su ligando LPS es la dependiente de MyD88, la cual culmina con la translocación al núcleo del factor NF- $\kappa$ B,

Utilizando como modelo experimental la línea celular MDA-MB-231, evidenciamos la presencia a nivel de ARNm y proteína de TLR-4. Además al tratar las células con LPS observamos que no se modifica la capacidad proliferativa de estas células, sin embargo provoca cambios en la capacidad migratoria de manera dependiente a la concentración utilizada y al tiempo de exposición de las células.

Desde otro acercamiento experimental en tratamientos agudos con 1  $\mu$ g/ml evaluamos la expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal. Observando que al igual que en las células de la respuesta inmune la exposición a LPS regula de manera positiva la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$ ; además de que aumenta los niveles de expresión a nivel de ARNm de *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, y *ZEB-1*. La participación de la vía de señalización de TLR-4 dependiente de MyD88 en la expresión de las moléculas antes mencionadas, fue evaluada inhibiendo con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (20  $\mu$ M) al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, evidenciando que participa de manera importante en el aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias tal como se ha observado en células de la respuesta inmune innata y de igual manera se asocia con la regulación positiva de la expresión de factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal.

Por otra parte evaluamos los efectos de LPS sobre la expresión de la subunidad  $\alpha$  de canal de sodio dependiente de voltaje Nav 1.5, observando que tratamiento de 24 a 96 horas aumentan los niveles de expresión del ARNm que codifica para esta proteína. Analizando la funcionalidad del canal lo bloqueamos con tetrodotoxina (10nM) y observamos que la capacidad migratoria de las células disminuye, demostrando la participación de Nav 1.5 en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 estimulada por LPS.

Al identificar los moleculares responsables de la capacidad migratoria de las células tumorales se pueden desarrollar antagonistas específicos que inhiban o reduzcan de manera efectiva la capacidad metastásica de las células tumorales, asegurando un mejor pronóstico de vida de los pacientes afectados por cáncer de mama. La elección del blanco farmacológico debe considerar entre otros aspectos la relación beneficio/riesgo.

## INTRODUCCIÓN

### CANCER

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al Cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales y que pueden invadir otros tejidos y órganos del organismo, proceso conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte ocasionada por cáncer (OMS, 2014). La OMS reportó en el año 2012 la muerte de 8,2 millones de personas por cáncer, considerándose la principal causa de muerte a nivel mundial, no habiendo distinciones en cuanto el nivel socioeconómico y desarrollo de los países, esta misma organización prevé que el número de defunciones por cáncer aumentará hasta 11.4 millones en 2030 (OMS, 2007).

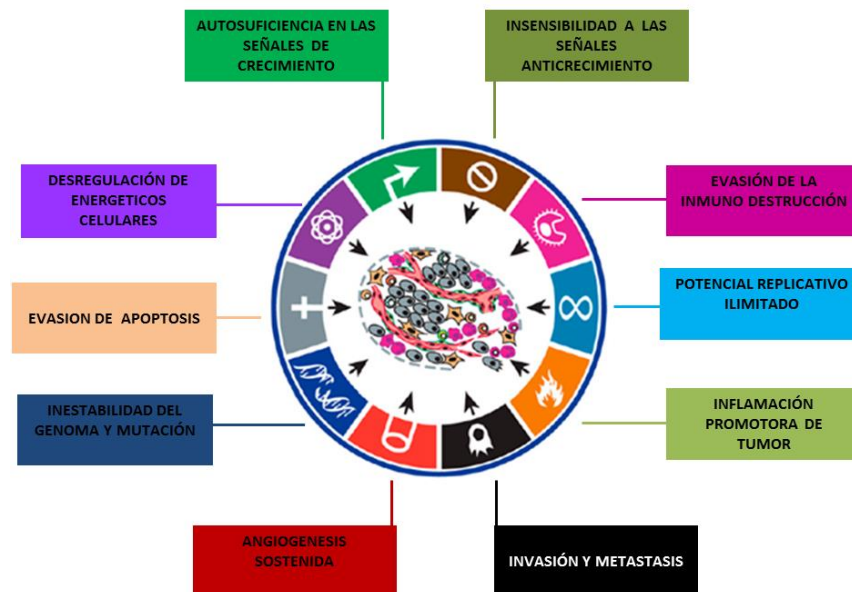
El origen del cáncer es multifactorial. Para esta patología sea considerado la participación del 5 al 10% de factor genético primario (Zabalegui et al., 2003), siendo solo el 1% de los casos considerados como Síndrome de Cáncer Hereditario (Fearon, 1997), sin embargo se contemplan también la contribución de rasgos recesivos y combinaciones de genes que pueden estar afectados. Se ha observado que el factor genético presenta variación dependiendo del tipo de tejido afectado, estudios han reportado efectos estadísticamente significativos de los factores hereditarios, que van desde 27% a 42% para cáncer de colon, mama y próstata (Lichtenstein et al., 2000). En los casos de cáncer esporádico las alteraciones genéticas no pueden ser subsanadas por los mecanismos de reparación celular, los cuales tienen la capacidad de mantener el equilibrio, además estas son acumulativas y capaces de transmitirse a la progenie celular; aunado a estos eventos ciertas condiciones pueden establecer un microambiente propicio para el desarrollo de una neoplasia, aumentando la tasa de mutación, tal como puede ser un estado inflamatorio crónico, así como alteraciones relacionadas a las células estromales, tales como células endoteliales, macrófagos y fibroblastos asociados a cáncer (Grivennikov et al., 2010; Lorusso & Rüegg 2008).

Durante años se han considerado que el desarrollo del cáncer está relacionado con defectos en los circuitos regulatorios de la proliferación celular y la homeostasis. Diversos

estudios han permitido considerar la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente facilitan el crecimiento de células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2000).

- Autosuficiencia en la señales de crecimiento
- Insensibilidad a inhibidores del crecimiento
- Evasión de la muerte celular programada
- Potencial de replicación ilimitado
- Angiogénesis sostenida
- Invasión tisular y metástasis

A partir de 2011, se añadieron cuatro nuevas alteraciones, evasión de la inmunodestrucción, desregulación de los energéticos celulares, inestabilidad genética y mutación, así como la inflamación promotora de tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).



Hanahan & Weinberg ,2011

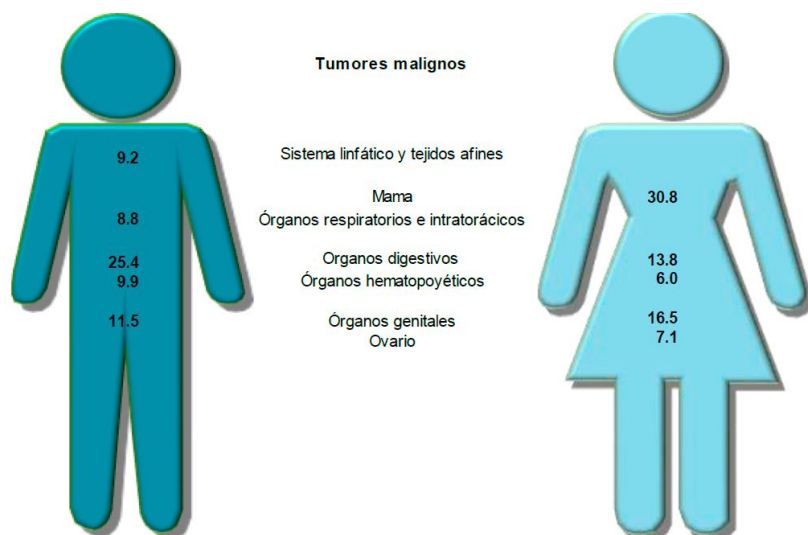
**Figura 1. Capacidades y habilidades esenciales en la fisiología celular que facilitan el crecimiento de células tumorales.** Las capacidades principales que se adquieren durante el desarrollo de los tumores humanos son; autosuficiencia en la señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis; añadiéndose también a la lista recientemente la evasión de la inmunodestrucción, desregulación de los energéticos celulares . Subyacente a esto la inestabilidad genómica y la inflamación permiten adquirir estas capacidades, por su participación en la generación de la diversidad genética así como fomentar estas funciones distintivas (.Hanahan & Weinberg, 2000, 2011)

La inflamación promotora de tumor aparece como una característica que permite a las células adquirir capacidades que contribuyen al desarrollo y progresión de cáncer, a través del suministro de moléculas que juegan un papel importante en el microambiente tumoral tal como factores de crecimiento, factores de sobrevivencia, factores proangiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular, así como señales que activan la transición epitelio mesénquima (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian & Pollard, 2010; Karnoub & Weinberg, 2006–2007).

La historia natural del desarrollo y progresión del cáncer está en función del tipo celular que origina el desarrollo del cáncer, el 80% son carcinomas, entre los que destacan a nivel mundial por la alta morbilidad y mortalidad están:

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| Cáncer de colon    | Cáncer endometrial |
| Cáncer de mama     | Cáncer pancreático |
| Cáncer de próstata | Cáncer pulmonar    |
| Cáncer de tiroides | Cáncer renal       |
| Cáncer de vejiga   |                    |

En México el panorama no es muy diferente datos del Instituto de Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (Figura 2), reporto que en 2012 las principales neoplasias en la población mexicana masculina de 20 años y más se presentan principalmente en órganos digestivos (25.4%), en órganos genitales (11.5%) y en órganos hematopoyéticos (9.9%); mientras que en las mujeres de este mismo grupo de edad, en mama (30.8%); órganos genitales (16.5%) y órganos digestivos (13.8 por ciento).



**Figura 2 Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más según sexo, 2012.** Se observa que para mujeres de 20 años y más el 30.8% corresponde a los casos de cáncer de mama (INEGI, 2015).

Entre las mujeres de 40 a 59 años la primera causa de egreso hospitalario por tumores malignos son las neoplasias en la mama, 27.9 de cada 100 mujeres de 40 a 49 años y 28.4 de cada 100 de 50 a 59. La OPS por su parte reporto para 2010 la tasa de mortalidad de los 10 tipos de cáncer que representan la mayoría de los casos de cáncer registrados, teniendo que en mujeres el 14% de la mortalidad es debido a cáncer de mama (INEGI, 2015).

## **CANCER DE MAMA**

### **Epidemiología.**

Según datos del Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), el cáncer de mama es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado con 1.7 millones (11.9% del total registrado) de nuevos casos en el 2012. En el reporte de este mismo año se observó que de 2008 a 2012 la incidencia de esta neoplasia incremento más del 20%, mientras que la mortalidad en un 14%. El cáncer de mama se considera la causa de muerte por cáncer en mujeres más común (522 000 muertes en 2012) y es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en 140 de 184 países, esto representa 1 de cada 4 casos de neoplasias en mujeres. Existe una evidente desigualdad entre países, mientras que en los desarrollados, debido a la industrialización y el estilo de vida (factores de riesgo asociados a la reproducción, dieta y hormonas), hay un marcado aumento en la incidencia de esta patología, la mortalidad es relativamente mucho mayor en países en vías de desarrollo, la alta tasa se relaciona a las carencias en materia de salud pública, por lo cual no se realiza una temprana detección, ni se sigue los esquemas terapéuticos adecuados. (IARC, 2013).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala que el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres de América Latina y El Caribe; estima que en 2008 se diagnosticaron poco más de 320 mil mujeres con este padecimiento y calcula que para 2030 se incrementará 60 por ciento (OPS, 2012).

Para el 2012 la detección de tumores malignos de mama ocuparon el segundo lugar en la población mexicana con 18.9 % del total hospitalizada en este año. La morbilidad

hospitalaria en mujeres es la más alta para esta neoplasia, 30 de cada 100 mujeres. El cáncer de mama ocupa el sexto lugar como causa de muerte en nuestro país, ocho de cada cien personas que padecen una neoplasia maligna. Entre los hombres ocupa el último lugar con solo el 0.1 % de la proporción de defunciones; mientras que en mujeres ocupa el tercer lugar con 14.7%(INEGI, 2015).

## Patogénesis

Se estima que del total de casos de cáncer de mama el noventa y cinco por ciento son carcinomas. Consideramos 2 tipos *in situ* e invasivo; ambos pueden ser ductales o lobulares, el primero se mantiene confinado al epitelio sin invasión de la membrana basal, al estar localizado es considerado que tiene un potencial bajo para hacer metástasis. Cuando se expande más allá de la membrana basal el cáncer se considera invasivo o infiltrante, es en este estadio donde se desarrolla el proceso metastásico, que constituye el estado más agresivo de esta patología (Richie & Swanson, 2003).

La clasificación clínica del Cáncer de mama se basa en el tamaño o la infiltración local del tumor, la afectación de ganglios linfáticos y presencia de metástasis; se indica generalmente por numeración del 0 (buen pronóstico) al 4 (mal pronóstico) (Edge et al., 2010). Con herramientas tales como la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fluorescente se han determinado tres subtipos de cáncer de mama;

- Receptor hormonal positivo: con expresión de receptores de estrógeno o progesterona, responsivos a terapia hormonal (moduladores de estrógeno, tales como tamoxifen; así como inhibidores de la aromatasa). Este subtipo tiene generalmente buen pronóstico (Brewster et al. 2014).
- Positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano: este tipo de cáncer puede presentarse en casos positivos o negativos a estrógenos, la sobreexpresión de HER2/*neu* fue asociada en los inicio con un mal pronóstico; sin embargo el desarrollo de un tratamiento específico para esta condición (trastuzumab) ha mejorado la sobrevida de los pacientes (Schiff et al., 2010).
- Triple negativo: se caracteriza por que las células neoplásicas carecen de receptores a estrógeno y progesterona, así como por la ausencia de

sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER 2) o incluso de su amplificación génica (Rakha et al., 2007). Presenta un comportamiento agresivo, son frecuentes las recaídas con metástasis a cerebro y pulmones, con una alta tasa de mortalidad en comparación con otros tipos de CaM (Bauer et al., 2007; Millikan et al., 2008; Ander & Carey, 2009). Esta patología representa del 15 al 20% del total de casos de cáncer de mama, pero ocurre con alta frecuencia en mujeres jóvenes en la pre-menopausia con ancestros de origen africano (Carey et al. 2006). Un análisis de los datos del programa de supervivencia, epidemiología y resultados finales del Instituto Nacional de Cáncer en EUA, sobre las mujeres diagnosticadas durante 2010, demuestra que las afroamericanas e hispanas tiene más probabilidad de ser diagnosticadas con CaM triple negativo, en comparación con las mujeres caucásicas y de origen asiático (Howlander et al., 2014). Otros factores de riesgo asociados a esta neoplasia son; un índice de masa corporal elevado y múltiples partos, esta particularidad marca la diferencia con otros tipos de cáncer, los cuales se relacionan con un bajo número de embarazos (Millikan et al., 2008; Phipps et al., 2011; Phipps et al., 2011). Con respecto a la susceptibilidad genética se ha descrito que las mujeres que portan mutaciones en BCRA1 tienen más de un 50% de probabilidades de desarrollar cáncer de mama triple negativo (Zhang et al., 2012). Variantes de baja penetrancia podrían estar contribuyendo también a la predisposición; en un estudio de asociación del genoma completo en mujeres con CaM que tenían ancestros de origen africano se identificó un polimorfismo de nucleótido simple en el cromosoma 5p15, TERT-rs10069690, con asociación significativa con los tipos de CaM negativo a estrógenos y triple negativo (Haiman et al., 2011). La quimioterapia es el tratamiento estándar para este tipo de neoplasia, a pesar de su curso agresivo, el cáncer de mama triple negativo es muy sensible a los fármacos citotóxicos, el porcentaje de pacientes que presentan una respuesta completa después del tratamiento de quimioterapia (antraciclinas y taxanos) reforzado con adyuvantes o neoadyuvantes (sales de platino) es de 30-45%.

## Factores de Riesgo

**Etnicidad:** Para cáncer de mama en Norte América y Europa del norte se encuentra la mayor incidencia y la más baja en países como Asia y África, sin embargo el factor de estilo de vida parece tener más peso que el grupo étnico de procedencia.

**Genético:** Esta limitado, pero es muy importante, estudios en gemelos estiman que el 27% de los casos de cáncer de mama tienen factores hereditarios, sin embargo solo del 5-10% de estos tiene un fuerte componente genético, mientras que solo un 4-5% es causado por genes de alta penetrancia genética, que se transmiten de forma autosómica dominante. Una mayor proporción es causada por genes de penetrancia moderada de 7-10% y aproximadamente 20 genes de baja penetrancia involucrados en el desarrollo de esta patología se han identificado (Lalloo & Evans, 2012)

**Género:** el cáncer de mama es 100 veces más común en mujeres que en hombres

**Edad:** De los 45 a 50 años la incidencia aumenta de manera acelerada, posteriormente el aumento es lento, hasta que de 70 a 80 años la curva de incidencia decrece, esto se relaciona directamente con la menopausia.

**Menarca y menopausia:** las mujeres que inician su periodo menstrual de manera temprana o aquellas con una menopausia tardía aumentan su riesgo de desarrollar cáncer de mama.

**Embarazos:** la nuliparidad y un primer embarazo tardío incrementan significativamente el riesgo. Mujeres que se embarazan por primera vez después de los treinta y cinco, duplican el riesgo.

**Enfermedades benignas previas:** las mujeres con una hiperplasia epitelial atípica tienen de 4 a 5 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres con ningún cambio proliferativo. Esta condición se puede sumar con la historia familiar que aumenta las probabilidades nueve veces (McPherson, K. et al., 2000).

Anticonceptivos orales: mujeres que usan anticonceptivos orales antes de los 20 años tiene mayor riesgo en comparación con mujeres que iniciaron a mayor edad.

Terapia Hormonal: las mujeres que requieren terapia de remplazo hormonal tienen 53% mayor riesgo con terapia combinada y solo 34% en tratamientos de estrógeno, especialmente si es utilizada por más de 5 años.

Radiación: mujeres que reciben radiación antes de los 45 años, usualmente a causa de enfermedad de Hodgkin, aumentan el riesgo considerablemente. El grupo más vulnerable es aquel que pasa por la pre pubertad alrededor de los 10 a 14 años (Richie & Swanson, 2003).

Obesidad: estudios epidemiológicos consideran a esta como factor de riesgo en mujeres post-menopáusicas, esto relacionado al alto niveles de estrógenos derivados de la aromatización de la androstenediona presente en los depósitos adiposos de las mujeres con alto índice de masa corporal (Hankinson, S.E. et al. 1995).

Inflamación: La inflamación crónica induce desarrollo tumoral y progresión en esta neoplasia, también se le considera factor de riesgo de recaída. Estudios clínicos muestran que la inflamación está asociado positivamente a progresión maligna y a mal pronóstico en pacientes de cáncer de mama (Ham & Moon, 2013). En el tejido adiposo de la glándula mamaria la inflamación crónica relacionada a la obesidad, participa en la estabilización del microambiente que favorece la mutagénesis, proliferación, progresión y el desarrollo de tumores con alto potencial metastásico. La infiltración de Macrófagos M1 y la formación de estructuras en forma de corona de la mama (CLS-B) son claros marcadores histológicos del proceso (Rose & Vona – Davis, 2013). Se considera actualmente que al menos un 20% de los procesos cancerígenos están relacionados con estados de inflamación crónica.

## **RELACIÓN CÁNCER E INFLAMACIÓN**

En el siglo XVIII, Virchow propuso la existencia de una relación entre el proceso inflamatorio y el cáncer, ya que observó la presencia de leucocitos en los tumores. La conexión entre inflamación y cáncer puede ser abordada desde dos perspectivas; la

extrínseca que se refiere a las condiciones inflamatorias que pueden dar lugar a desarrollo del cáncer y la vía intrínseca en donde los eventos genéticos tempranos que permiten el desarrollo del tumor también promueven la formación de un microambiente inflamatorio (Mantovani et al., 2008).

El microambiente tumoral se caracteriza por la presencia de células inmunes de la respuesta adaptativa e innata junto con las células tumorales y su estroma circundante que contiene fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales (De Visser et al., 2006). Estos diferentes tipos celulares se comunican de manera paracrina y autocrina por medio de citocinas y quimiocinas, controlando el crecimiento tumoral.

Las citocinas liberadas en el microambiente tumoral ejercen un efecto significativo en el proceso de desarrollo y evolución del cáncer, pues activan factores de transcripción, tales como el NF- $\kappa$ B y STAT3, asociados a la expresión de genes que controlan la sobrevivencia, proliferación, crecimiento, angiogénesis, invasividad, motilidad y producción de quimiocinas y citocinas, (Grivennikov et al., 2009; Yu et al., 2009; Lin & Karin, 2007).

NF- $\kappa$ B es un coordinador clave de inmunidad innata y la inflamación, además es considerado como un promotor tumoral. Su actividad es crucial para las células tumorales o potencialmente tumorales y para las del sistema inmune, en estos tipos celulares NF- $\kappa$ B se activa en respuesta a la estimulación por microorganismos y daño tisular de la vía de señalización de los receptores tipo Toll dependiente de MyD88 y las vías de señalización paracrina y autocrina de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Mantovani et al., 2008)

Todos estos elementos pro- inflamatorios en el microambiente tumoral participan como promotores de la evolución clínica más agresiva del cáncer, la metástasis que es la causa de aproximadamente el 90% de las muertes por neoplasia (Grivennikov et al., 2010).

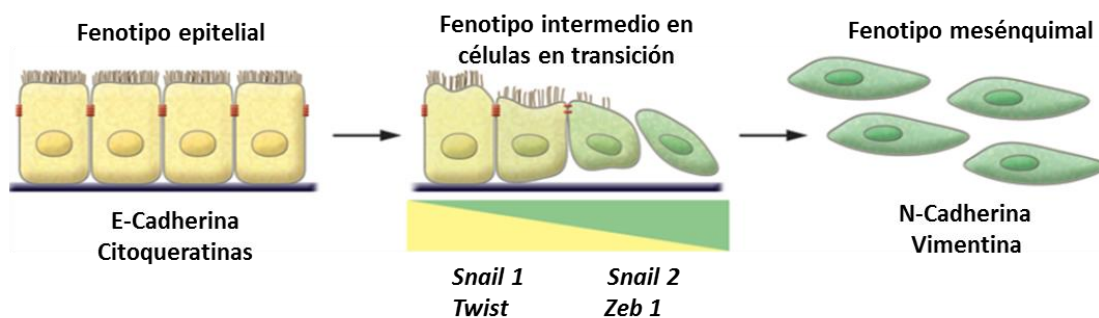
### **Inflamación y Metástasis**

La adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo de las células tumorogénicas requiere la participación *in vivo* de las células cancerígenas, células estromales e


inflamatorias. Se propone que este proceso ésta dividido en cuatro condiciones necesarias para que ocurra (Grivennikov et al., 2010):

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


La Transición Epitelio Mesénquima es un proceso a través del cual las células epiteliales pierden sus uniones adherentes y estrechas con las células vecinas, además de adquirir propiedades mesénquimales (Figura 3).



**Figura 3. Transición Epitelio – Mesenquima.** La TEM involucra una transición funcional de células epiteliales polarizadas a células móviles de fenotipo mesenquimal. Un marcador del fenotipo epitelial que se pierde de manera característica durante este proceso es la E-cadherina, los factores de transcripción que funcionan como sus represores clásicos se encuentran altamente expresados durante la transición, *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST* y *ZEB-1*, participando en múltiples formas durante la adquisición del fenotipo móvil; en el cual se expresan marcadores específicos, tales como Vimentina y N- Cadherina. La detección de células que expresan ambos grupos de marcadores define el fenotipo intermedio de TEM (Modificado de Kalluri & Weinberg; 2009)

Las células que entran en la TEM se caracterizan por cambios en la expresión génica, incremento en la capacidad de movimiento y de migrar largas distancias. Este fenómeno fue inicialmente descrito en el desarrollo embrionario, actualmente se han descrito tres tipos, incluyendo los fenómenos que acompañan al cáncer epitelial .


- Tipo I: se refiere a los eventos que ocurren durante la implantación y formación del embrión, gastrulación y migración de la cresta neural.
- Tipo II: involucrado al cierre de heridas, regeneración tisular y fibrosis.
- Tipo III: Este ocurre en las células cancerosas de tipo epitelial y participa como primer paso del proceso de metástasis (Wang & Zhou, 2011; Kalluri & Weinberg; 2009).

El acontecimiento clave durante la TEM es la pérdida de la expresión de la E-cadherina, molécula presente en las uniones adherentes célula - célula. La gran mayoría de vías de señalización conocidas que regulan a la transición epitelio-mesénquima activan factores de transcripción que reconocen la secuencia de E-Box del ADN localizada cerca del inicio de transcripción de E-cadherina, donde reclutan cofactores y desacetilasas de histona, regulando negativamente su expresión (Wang & Zhou, 2011). .

Se ha descrito hasta ahora la participación de la familia *SNAIL/SLUG* (*SNAIL-1* y *SNAIL-2*), *TWIST*, *ΔE F1/ZEB1*, *SIP1/ZEB2*, y *E12/E47* (Nieto, 2002; Wang & Zhou, 2011; Yang et al., 2004). Múltiples evidencias también relacionan a estos factores de transcripción con la disminución en la expresión de otras moléculas específicas del fenotipo epitelial, como claudinas y mucina-1; así como la regulación positiva de marcadores moleculares del fenotipo mesénquimal, tales como N-cadherina y vimentina (Wang & Zhou, 2010). Estudios experimentales han descrito que los factores de la familia *SNAIL* y *TWIST* podrían trabajar conjuntamente para inducir la expresión de *ZEB-1* (Dave et al., 2011).

### **Mantenimiento del fenotipo mesenquimal**

La transición epitelio mesénquima se asocia con la adquisición de la capacidad de migración, invasión y auto-renovación de las células. Durante el desarrollo normal y en la patogénesis tumoral el cambio en el fenotipo celular es inducido por las señales que las células epiteliales reciben en el microambiente; sin embargo las señales responsables de

la inducción de la TEM y del mantenimiento del estado celular resultante no han sido del todo esclarecidas (Scheel et al., 2011). 

En estudios utilizando cultivos primarios, células inmortalizadas y células neoplásicas humanas de epitelio mamario la TEM no puede ser eficientemente inducida por la activación de una u otra vía de señalización (TGF- $\beta$  o Wnt), si no que múltiples vías de señalización deben colaborar para lograr la transición. Una vez que las células han pasado por la TEM tanto células neoplásicas como normales, se mantienen en un estado mesénquimal / célula madre a causa de señales autocrinas constantes. Este circuito autocrino presumiblemente estaría participando asegurando la continua expresión de los miembros de la maquinaria transcripcional asociada a la adquisición del fenotipo mesenquimal, tales como *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST*, *ZEB-1* y *ZEB-2* (Scheel et al., 2011).

Se ha descrito la sobreexpresión de *SNAIL-1* tanto en células epiteliales y endoteliales de cáncer de mama invasivo, siendo indetectable en tejido normal de mama; la presencia de este factor de transcripción ha sido relacionada al grado tumoral, la metástasis, recurrencia y mal pronóstico (Martin et al, 2005; Parker et al., 2004). La familia de proteínas *SNAIL* (*SNAIL-1/SNAIL*, *SNAIL-2/SLUG*, *SNAIL-3/ SMUC*), colaboran con otros factores de transcripción, se observó que existe un alta correlación entre la expresión de *TWIST* y *SLUG* con el desarrollo de tumores de mama; de igual manera *SNAIL-1* y *TWIST* cooperan para inducir *ZEB-1* (Casas et al, 2011; Dave et al., 2011). *ZEB-1* ha demostrado activar la transcripción de genes relacionados al fenotipo mesenquimal, tales como Vimentina y N-caderina, participa además en el mantenimiento del fenotipo tipo célula madre, regular el ciclo celular y la senescencia, así como se le ha involucrado en los procesos de resistencia a quimioterapia y radioterapia (Sánchez-Tilló et al., 2012).

## **RELACION CANCER DE MAMA E INFLAMACION**

La inflamación crónica está implicada en el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluyendo el Cáncer de mama. Las células tumorales, al igual que las inflamatorias, tienen la capacidad de producir citocinas, amplificando de esta manera el efecto proliferativo e invasivo de los tumores (Luo et al., 2007). En otros modelos experimentales, como es el cáncer de próstata, las células del sistema inmune secretan algunas citocinas, IL-6 y TNF-

$\alpha$ , las cuales promueven la proliferación de células epiteliales y la angiogénesis, facilitando la invasión epitelial tanto en el estroma, como a nivel circulatorio (Condeelis & Pollard, 2006; Lewis & Pollard, 2006).

En el caso particular del cáncer de mama se ha observado que en el microambiente tumoral existen mediadores claves de la respuesta inflamatoria, tales como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos). Por tanto la actividad de la Ciclooxygenasa – 2 (COX-2) está íntimamente asociada con la inflamación relacionada a esta neoplasia, la progresión tumoral y metástasis. Se ha demostrado que el uso prolongado de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, pueden reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Estudios clínicos han revelado un incremento en los niveles circulantes de citocinas, IL-6 e IL-8 en pacientes con cáncer, los cuales se han relacionado con el desarrollo de metástasis y una reducida supervivencia. Las citocinas pro-inflamatorias se han propuesto como diana terapéutica para varios tipos de cáncer.

Dentro de los múltiples receptores de membrana involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, relacionados a la respuesta inflamatoria, es importante destacar el papel de los receptores tipo Toll, una superfamilia de glicoproteínas que de manera clásica se describen como pieza clave en la respuesta inmune innata y adaptativa, sin embargo numerosos estudios clínicos y experimentales han descrito su presencia en las células tumorales de cáncer de mama. Su participación en el microambiente tumoral inflamatorio aun es discutida, ya que polimorfismo en TLR-4 se han reportados como factores de riesgo en CaM, así como que la estimulación de células inmunes con agonistas de este mismo receptor disminuyen el tamaño tumoral y aumentan la actividad de linfocitos citotóxicos. No obstante en líneas celulares de cáncer de mama el tratamiento con lipopolisacárido aumenta la capacidad invasiva de las células (Kidd et al., 2013).

## **SEÑALES INDUCTORAS DE INFLAMACIÓN**

En la respuesta inflamatoria, las células epiteliales participan activamente no solo como barreras si no directamente en los mecanismos de reconocimiento de la inmunidad

innata; existe evidencia de la interacción de estas con patrones moleculares asociados a patógenos a través de la familia de receptores similares a Toll (TLR) (Bäckhed & Hornef, 2003). En cáncer de colon ha demostrado que el LPS liberado por la membrana de las bacterias Gram-negativas, promueven la activación de NF- $\kappa$ B a través de la interacción de su receptor de membrana TLR-4 (Wang et al., 2010 2006; Kojima et al., 2000). El tratamiento con LPS de las líneas celulares Panc-1 y AsPC-1 de cáncer de páncreas incrementa la capacidad invasiva. Al bloquear la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, específicamente por el uso de siRNA para TLR-4 o MyD88 decrece este sugiriendo que el estímulo inflamatorio puede participar en el desarrollo de cáncer a través de la activación de este factor de la transcripción (Ikebe et al., 2009). En cáncer de páncreas LPS el tratamiento con LPS de las líneas celulares Panc-1 y AsPC-1 incrementa la habilidad invasiva. Al bloquear la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, específicamente por el uso de siRNA para TLR-4 o MyD88 decrece este efecto estas observaciones sugieren que el estímulo inflamatorio puede participar en el desarrollo de cáncer a través de la activación de este factor de la transcripción (Ikebe et al., 2009).

En líneas celulares de cáncer de mama se observó en un modelo murino de cáncer de mama, que la administración sistémica de LPS estimulaba la metástasis en pulmón (Harmey et al., 2002). El knockdown del gen TLR-4 resulta en una dramática reducción de la viabilidad de las células cancerígenas y la inhibición de las citocinas IL-6 e IL-8 (Yang et al., 2010).

En 1994 se describió que el sistema inmune no solo responde a patrones moleculares de patógenos, también puede ser estimulado por señales intracelulares de alarma provenientes de la muerte celular no fisiológica, daño, estrés, así como también pueden ser resultado de la secreción de leucocitos activados en respuesta a patógenos o a citocinas. A estas señales se les llamo inicialmente alarminas y posteriormente se denominaron patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés). Estas DAMPs incluyen a varias proteínas intracelulares, DNA, RNA y nucleótidos, son expresadas en diversos tipos celulares y tiene funciones normales en la homeostasis. El reconocimiento de estas moléculas está a cargo de los receptores similares a Toll (TLRs) y de los receptores para los compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) (Srikrishna & Freeze, 2009)

## **LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)**

El LPS es una macromolécula que tiene un peso molecular variable, que va de 10 a 20 kDa, se localiza en la lámina distal de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El LPS está constituido por tres componentes, el primero es el lípido A que está altamente conservado, un polisacárido medular también conservado entre las especies y por último, un polisacárido específico, el cual es el responsable de la identidad molecular del LPS (Chatterjee & Chaudhuri, 2012). LPS se une de manera específica a un receptor tipo Toll, específicamente a la isoforma TLR-4 (Akira et al., 2006).

## **RECEPTOR A LIPOPOLISACÁRIDO, TLR-4**

El TLR-4 es una glicoproteína transmembrana tipo I, con un peso molecular de 90 a 115 KDa. El dominio extracelular presenta segmentos repetidos de leucina (16-28) (Matsushima et al., 2007), el segmento transmembrana es una  $\alpha$ -hélice y el dominio intracelular posee un sitio de reconocimiento llamado TIR (Toll-Like/Interleukin-1) responsable de la activación de la señalización (Manavalan et al., 2011).

El TLR-4 fue identificado inicialmente en células de la respuesta inmune innata, sin embargo, se ha reportado su presencia en una amplia gama de tipos celulares, incluyendo líneas celulares normales y tumorales.

TLR-4, al igual que los otros TLR's, no es funcional como monómero si no que actúa en un complejo multimérico, donde para el reconocimiento de sus ligando y la movilización de las proteínas adaptadoras que requiere para la señalización, utiliza dos moléculas accesorias MD2 y CD 14. Este receptor puede reconocer distintos tipos de ligando, como son: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), en la tabla 1 se observan los ligandos descritos (Chang , 2010; Basith et al., 2012; Lee et al, 2001; Liu et al., 2014).

Receptor TLR-4 y sus ligandos asociados		
Endógenos	Exógenos	Sintéticos
HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, b- defensina 2, estra dominio A de la fibronectina, ácido hialuronico, heparan sulfato, proteína A surfactante de fibrinógeno, ácidos grasos saturados, tales como ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico.	LPS (bacterias gram negativas), HSP60 de <i>Chlamydia pneumoniae</i> , proteínas de envoltura del virus sincitial respiratorio, y del virus tumoral de mama en ratón, proteína de fusión del virus sincitial respiratorio, fosfolípidos de glicoinositol ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ), placitaxel (derivado vegetal), Bacilo de Calmette-Guerin, ácido lipoteicoico.	E6020, E5531, E5564, mimetizados del lípido A (Monofosforil lípido A, aminoalquil glucosamina 4-fosfato)

Tabla 1. Ligandos endógenos, exógenos y sintéticos de TLR-4

La activación de TLR-4 induce dos tipos de respuesta, la primera es dependiente de MyD88, llamándosele la vía canónica, y la segunda vía que es independiente de MyD88. La vía dependiente de MyD88 tiene como resultado la activación de NF- $\kappa$ B y la subsecuente transcripción de sus genes relacionados, que se traducen en la expresión de citocinas, tales como IL-6, IL- $\beta$ 1 y TNF- $\alpha$ . (Kawai & Akira 2005; Akira et al., 2006; O' Neill, 2006). Mientras que la vía no canónica, culmina con la secreción de Interferón tipo 1 como una respuesta anti-viral (Pandey & Agrawal, 2006).

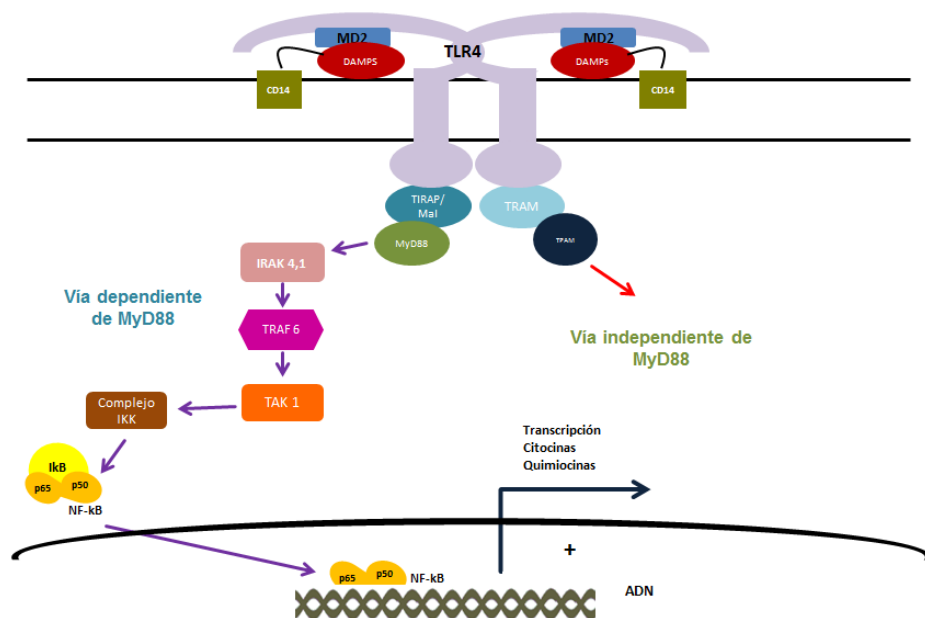


Figura 4. Vía de señalización de TLR-4 dependiente de MyD88. TIRAP/Mal es necesario para la activación de MyD88, el cual recluta a la familia de proteínas IRAK (IRAK 4 e IRAK 1 son las isoformas activas) y TRAF 6 al estimular con LPS. TRAF 6 a su vez activa el complejo TAK 1, el cual activa al complejo IKK (IKK  $\alpha$ , IKK  $\beta$ , IKK  $\gamma$ ) que cataliza la destrucción vía proteosoma de I $\kappa$ B, lo que libera a NF- $\kappa$ B para ser translocado al núcleo (Chang, 2010; Kawai & Akira, 2006)

TLR-4 participa no solamente en la regulación de la respuesta inmune, sino también está involucrado en enfermedades inflamatorias no infecciosas, así como en la invasión tumoral y la supervivencia celular (Jing et al., 2012). La presencia de TLR-4 ha sido detectado en varias líneas celulares de origen tumoral, cáncer de páncreas, pulmón, mama, próstata, hígado y colon (Akira & Takeda, 2004; Hua et al., 2009; Wang et al., 2010, Jing et al., 2012). Al usar ARN de interferencia para TLR-4 en líneas celulares se observa una reducción en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales provenientes de cáncer de próstata (Hua et al., 2009).

En pacientes de cáncer de mama se ha demostrado la presencia a nivel de ARN mensajero y de proteína de TLR-4 en tejido tumoral, además se ha encontrado correlación entre los niveles de expresión y metástasis, considerándose un indicador de agresividad (González-Reyes et al., 2010). El tratamiento con LPS en una línea celular de cáncer de mama triple negativa (MDA-MB-231) incrementa la capacidad migratoria e invasiva de este tipo celular, debido al aumento en la expresión de la integrina  $\alpha\beta3$  por la activación del factor NF- $\kappa$ B, lo que resulta en un incremento de la capacidad de adhesión, aumento en la polimerización de actina y la producción de MMP-9 en respuesta a la matriz extracelular (Liao et al., 2012). Además de LPS y DAMPs se ha demostrado, en dos líneas celulares de cáncer de mama HCC1806 y MDA-MB-231, que fármacos utilizados como línea de tratamiento en CaM (específicamente Paclitaxel, ) activan a TLR-4, en este estudio también se describió que la sobreexpresión de este receptor provoca un incremento en la quimioresistencia, además de aumentar la expresión de citocinas y sus respectivos receptores, sirviendo como primer evidencia de que estas podrían estar actuando por mecanismos autócrinos (Rajput et al., 2013).

## **EFFECTOS DE LPS SOBRE LA FISILOGIA CELULAR**

La unión de LPS a su receptor específico, TLR-4, estimula la activación y translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, el cual induce la expresión de genes específicos que codifican para moléculas pro-inflamatorias, como es el caso de la IL-6 y TNF- $\alpha$ , las cuales son las responsables de propagar la respuesta inflamatoria localizada (Li et al., 2012).

## Interleucina-6

La citocina IL-6 es un polipéptido de 185 aminoácidos con un peso molecular que va de 21 a 28 KDa, es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo las células del sistema inmune, células endoteliales, fibroblastos, miocitos y adipocitos.

El efecto de IL-6 depende de su unión a su receptor específico que se localiza en la membrana plasmática. El receptor a IL-6 consiste de 2 glicoproteínas de membrana; la primera una subunidad receptora específica designada IL-6R y la segunda subunidad llamada gp130. El receptor a IL-6 está asociado a la proteína cinasa JAK, la cual al activarse, fosforila residuos de tirosina localizados en el dominio citosólico del receptor, que sirven como sitios de unión para dominios SH2 que forman parte de proteínas de señalización para la transducción, en este caso las proteínas STAT (proteína de señalización activadora de la transcripción). Las proteínas STAT al ser fosforiladas por los residuos de fosfotirosina forman dímeros (homo o heterodímeros) para ser translocados al núcleo celular y así estimular la expresión de genes específicos (Kishimoto, 2005).

En el contexto del cáncer de mama IL-6 a través de mecanismos autocrinos y paracrinos ha sido relacionado con el proceso de metástasis en varios estudios en líneas celulares a través de múltiples procesos incluyendo la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM), y el reclutamiento de células madre mesenquimales o MSC por sus siglas en inglés (Badache & Hynes, 2001; Lee et al., 2010; Sasser et al., 2007; Tamm et al. 1989). En células MCF-7 expuestas a IL-6 se ha demostrado la adquisición de un fenotipo mesenquimal por la inducción de Vimentina, N-Cadherina, *SNAIL-1* y *TWIST*, además de reprimir la expresión de E-cadherina (Leslie et al. 2010; Sullivan et al., 2009). Se ha demostrado adicionalmente que IL-6 disminuye la adhesión de las líneas de cáncer de mama ER-positivas T47-D, ZR-75-1 y MCF-7, mientras que sobre MDA-MB-231 línea ER-negativa, no tiene este efecto (Asgeirsson et al., 1998). También bajo condiciones de hipoxia las células de cáncer de mama secretan altos niveles de IL-6, lo cual activa y atrae a MSCs, este reclutamiento es atenuado por el bloqueo de la señalización de IL-6 (Rattigan et al., 2010).

## **Factor de necrosis tumoral alfa**

El Factor de Necrosis tumoral alfa es una citocina pro-inflamatoria secretada por diferentes tipos celulares, incluyendo adipocitos, monocitos, macrófagos, células B, células T y fibroblastos. TNF- $\alpha$  es una proteína soluble de 157 aminoácidos y un peso de 17.4 KDa; se han descrito hasta el momento dos diferentes receptores específicos, TNFR1 y TNFR2. Estudios experimentales han descrito que esta citocina ejerce diferentes efectos sobre células cancerosas, en primer lugar se ha observado actividad citotóxica en una amplia variedad de células tumorales, aunque en algunos otros tipos de cáncer estimula la capacidad migratoria e invasiva, como es el caso del cáncer de colon.(Locksley et al., 2001; Hehlhans & Pfeffer, 2005).

La activación del receptor para TNF- $\alpha$  conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan múltiples vías de señales transductoras (Hehlhans & Pfeffer, 2005; Varfolomeev & Ashkenazi, 2004). La activación de TNFR1 induce la expresión de un amplio rango de mediadores inflamatorios y factores del crecimiento, a través de la activación del factor de transcripción AP-1 o del NF- $\kappa$ B. Este último factor de transcripción estimula la expresión de supresores de la apoptosis, tales como c-FLIP<sub>L</sub>, Bcl-2, entre otros. Por su parte, al unirse TNF- $\alpha$  a su receptor TNFR2 activa las vías de señalización asociadas a JNK, p38, MAPK, ERK y PI3K.

Se ha propuesto que el TNF- $\alpha$  participa en la iniciación tumoral al estimular la producción de moléculas genotóxicas, especies reactiva de oxígeno y nitrógeno, las cuales provocan daño en el ADN (Husain et al., 2003). Además, influye positivamente en la progresión tumoral al inducir angiogénesis y metástasis (Elgert et al., 1998). Diversos estudios clínicos muestran que las personas que sufren cáncer de próstata mantienen niveles plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$  (Pfitzenmaier et al., 2003).

## **Subunidad alfa del canal de sodio sensible a voltaje Nav 1.5**

Los canales de sodio están compuestos por una subunidad principal  $\alpha$ , asociada a proteínas auxiliares  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  posee 4 dominios homólogos (D1-D4), y cada uno de ellos está constituido por 6 segmentos transmembrana (S1-S6). Se han identificado 10

diferentes genes que codifican para la subunidad principal  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje, cuya expresión dan como resulta 9 diferentes isoformas del canal (Nav 1.1- Nav 1.9) (Goldin et al, 2000).

Existen crecientes evidencias de la participación de los canales iónicos en la señalización molecular relacionada al transporte de iones, la actividad secretoria de enzimas y la comunicación intercelular en cáncer (Kunzelman, 2005; Schuller, 2009; Onkal & Djamgoz, 2009; Roger et al. 2006). La participación de canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) se ha descrito clásicamente en las células excitables, tales como neuronas y cardiomiocitos, donde son responsables de la fase de despolarización del potencial de acción, así como son importantes para la extensión de la neurita y la liberación de neurotransmisores. La activación de este tipo de canales produce un incremento en el flujo de  $\text{Na}^+$ , causando a su vez alteraciones en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , cambios en el pH, además de cambios en la homeostasis celular normal (Carrie et al, 2010).

Desde la segunda mitad del siglo XX se describió que muestras tumorales presentaban altas concentraciones de sodio intracelular comparadas con tejido normal, este fenómeno fue relacionado con la oncogénesis (Cameron et al., 1980) Estudios previos muestran que las células tumorales provenientes de cáncer de glándula mamaria, cáncer de próstata y de ovario, expresan de manera diferencial las isoformas del canal de sodio Nav 1.5, Nav 1.6 y Nav 1.7, y estos están en función del grado de invasividad del cáncer. Esto sugiere la probable participación de los canales de sodio en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales.

Los canales de sodio dependientes de voltaje expresados en células tumorales participan en múltiples funciones, como motilidad lateral, galvanotaxis (Fraser, 2003), invasión transversa y actividad secretoria de la membrana (Mycielska, 2003). Específicamente la sobreexpresión de la isoforma Nav1.5 en cáncer de mama ha sido observada en varios estudios (Gao, 2009; Roger, 2003, Fraser, 2005). En la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, se ha observado la sobreexpresión de la forma funcional del canal Nav1.5 (Fraser, 2005), esta se ha asociado con la capacidad migratoria e invasiva de este tipo celular, lo cual correlaciona con el potencial maligno en el cáncer de mama triple negativo.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres adultas a nivel mundial, 11.9% del total de las registradas en 2012, siendo la metástasis el principal responsable. Numerosos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos, han mostrado la influencia de un microambiente inflamatorio en el desarrollo y progresión del cáncer. Aunado a esto existen evidencias de la participación de los factores de transcripción que regulan la plasticidad epitelio-mesenquima, así como proteínas integrales de membrana, tales como canales de sodio dependientes de voltaje durante la metástasis, sin conocerse hasta el momento con precisión el mecanismo molecular involucrado. Por lo que el propósito del presente trabajo es evaluar si la activación del receptor tipo toll-4 (TLR-4) por LPS, exacerba la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231, provenientes de cáncer de mama, a través de los factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesénquimal, *SNAIL1*, *SNAIL2*, *TWIST* y *ZEB1*, así como por la producción endógena de citocinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de probar si la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje  $\text{Na}_v$  1.5 participa en este proceso.

## HIPÓTESIS

La activación del receptor TLR-4 por LPS exacerba la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB 231 a través de aumento en los niveles de expresión de factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal: *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST*, *ZEB -1*, citocinas pro-inflamatorias (Interleucina 6 y Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ ) y la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje  $\text{Na}_v$  1.5.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la activación del receptor TLR-4 por LPS exagera la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales MDA-MB 231 a través de aumento en los niveles de expresión de factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal: *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST*, *ZEB -1*, citocinas pro-inflamatorias (Interleucina 6 y Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ ) y la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje  $Na_v$  1.5.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto estimulador de lipopolisacárido sobre la capacidad proliferativa y migratoria de células MDA- MB 231
2. Confirmar la presencia de TLR-4 tanto a nivel de ARNm como de proteína
3. Establecer si el efecto estimulador de LPS sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB-231 depende tanto de la concentración como de la duración del tratamiento.
4. Investigar si la presencia de LPS regula los niveles de ARNm que codifica para los factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal: *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST*, *ZEB-1*.
5. Establecer si la presencia de LPS regula la expresión de Vimentina, marcador del fenotipo mesenquimal
6. Evaluar si la presencia de LPS regula la expresión a niveles de ARNm y de proteína secretada de citocinas inflamatorias: IL-6 y TNF  $\alpha$ .
7. Determinar si la activación de TLR-4 aumenta los niveles de expresión de  $Na_v$  1.5

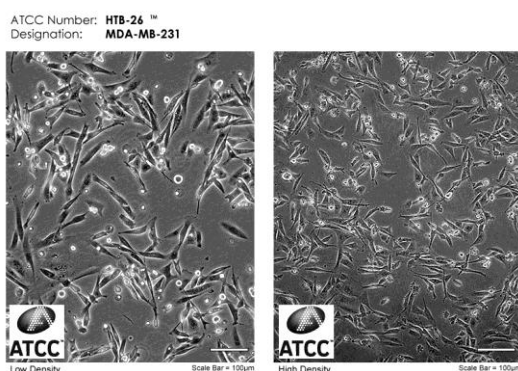
8. Analizar la participación del NF- $\kappa$ B por bloqueo de la vía de señalización activada por la unión de LPS a TLR-4.

9. Investigar si la participación de Nav 1.5 en la capacidad migratoria es dependiente de la activación de TLR-4

## METODOLOGÍA

### Modelo celular MDA-MB-231

Las células MDA-MB 231, proveniente de adenocarcinoma de mama grado III (efusión pleural) de una paciente caucásica de 51 años de edad, en base a su perfil molecular se ha clasificado como de tipo de baja claudina (antes basal B). Tiene un fenotipo invasivo, sus células son fusiformes por lo que es un buen un indicador de la transformación y tumorigenicidad (Figura 5). Ha sido utilizado como modelo de tumores xenográficos ya que *in vitro* ha demostrado una alta capacidad invasiva, además *in vivo* es útil para los modelos experimentales de metástasis al introducirse directamente a circulación. Es ampliamente usada como herramienta en la investigación preclínica de agentes quimioterapéuticos.



**Figura 5. Morfología en cultivo de la línea celular MDA-MB-231.** Microfotografías de las células en cultivo con morfología fusiforme, sembradas a baja densidad a la izquierda y en alta densidad a la derecha

## **Cultivo de línea celular**

Las células MCF-10A, MCF-7, MDA-MB 231, fueron sembradas en matraces planos de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, y alimentadas con medio de cultivo Advanced- DMEM suplementados con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico y antimicótico. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C y una mezcla de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas y cuando alcanzó una confluencia del 90%, las células fueron expuestas 5 minutos a 2.0 mL de una solución salina Tripsina- EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich) para despegarlas. La suspensión celular obtenida se utilizó para regenerar el cultivo madre en un matraz plano nuevo, así como para sembrar en placas de 6 y 12 pozos para los ensayos de RT-PCR. Los experimentos de migración, proliferación celular, inmunocito química e inmunofluorescencia fueron diseñados con la línea celular MDA-MB-231 como modelo de estudio, manejando los cultivos celulares en las condiciones antes descritas.

## **Ensayo de RT-PCR**

### **Extracción de ARN total**

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos, utilizando el medio de cultivo Advanced- DMEM, suplementado con 3% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico. Una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo, se dio inicio al tratamiento de las células con lipopolisacárido (LPS). Una vez que se cumplió el tiempo de tratamiento, se procedió a realizar la extracción de ARN por medio del kit comercial FavorPrep TM, Tissue total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez concluida la extracción se determinó por espectrofotometría la concentración y calidad del ARN aislado.

### **Síntesis de ADN complementario**

La retro transcripción se llevó a cabo empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), para lo cual se siguió el procedimiento sugerido por el

fabricante. Posteriormente los tubos de reacción se colocaron en un termociclador y se aplicó el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 min a 85° y finalmente a 4°C.

## PCR

A partir del ADN complementario obtenido en la retro transcripción se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20 µl. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

oligonucleotidos	Dirección	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)
SNAIL 1 Humano	Forward	CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTT	388
	Reverse	GGCACTGGTACTTCTTGACATC	
SNAIL 2 Humano	Forward	CTCTCTCCTCTTTCCGGATACTC	235
	Reverse	CAGTGCAGCTGCTTATGTTTG	
TWIST Humano	Forward	AGCTGAGCAAGATTGAGACCTCA	452
	Reverse	AGAATGCAGAGGTGTGAGGATGGT	
ZEB- 1 Humano	Forward	TTCAGCATCACCAGGCAGTC	736
	Reverse	GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG	
E- Cadherina Humano	Forward	TTCCCTCGACACCCGATTCAAAGT	877
	Reverse	TTCCCTCGACACCCGATTCAAAGT	
Vimentina Humano	Forward	AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT	201
	Reverse	CTTCCATTTACGCATCTGGCGTT	
Nav 1.5 Humano	Forward	ACGGCACCTCTGATGTGTTACTGT	393
	Reverse	TGAGGGCCTCGTGTCTTTCTTGA	
IL-6 Humano	Forward	GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT	388
	Reverse	GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	
TNF $\alpha$ Humano	Forward	CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG	325
	Reverse	CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	
TLR-2 Humano	Forward	CCATTGCTCTTTCACTGCTTTC	536
	Reverse	GGTGTCCATATTTCCCACTCTC	
TLR-4 Humano	Forward	TGGATACGTTTCCTTATAAG	507
	Reverse	GAAATGGAGGCACCCCTTC	

## **Separación electroforética de los productos de PCR**

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética, utilizando geles de agarosa al 1.2%, se cargaron las muestras en el gel con buffer 6X DNA Loading Dye y se utilizó marcador de peso Gene Ruler 100bp DNA Laddery (ambos de Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 65 V por 80 minutos. La imagen del gel fue digitalizada en un documentador de geles, Chemidoc (Bio Rad) empleando el software Quantitive One.

## **Densitometría**

Esta se realizó mediante el software Image J que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH).

## **Ensayos de migración**

### **Herida**

Placas de 12 pozos fueron sembradas e incubadas en medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 3% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico, una vez alcanzaron el 70% de confluencia, se inició pre-tratamiento de 48 horas con LPS a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0, 5.0 o 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Concluido el tiempo de incubación se realizó la herida con la punta de una micropipeta P200, se lavó con PBS y se agregó nuevamente medio de cultivo (antes descrito) incubándose 6 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Posteriormente las células se tiñeron con cristal violeta y se observan al microscopio. Para el análisis de las imágenes se tomaron fotografías a un aumento de 4X, ulteriormente fueron analizadas por medio del software Image J.

## **Transwell**

Para el ensayo se utilizaron Soportes Permeables Transwell® con membranas de policarbonato (poro de 8.0µm, Corning Incorporated). Se siembran células bajo las condiciones antes descritas después de llegar a la confluencia requerida se pre-tratan con LPS a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0, 5.0 o 10.0 µg/ml) durante el tiempo establecido. Una vez terminado el periodo de incubación se preparó una suspensión celular que contiene  $3 \times 10^5$  células ml<sup>-1</sup> en medio Advanced- DMEM libre de suero y se agregaron 100 µl en la parte superior de cada inserto, se adiciono LPS en las concentraciones antes mencionadas. La parte inferior contenía medio completo con SFB al 3% y LPS a las diferentes concentraciones. Se dejaron incubar a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO<sup>2</sup> por 12 horas. Las células que no migran son retiradas del interior del inserto con un hisopo de algodón. Las células con capacidad migratoria permanecen en la parte inferior del inserto, estas son fijadas con un metanol/acetona (dilución 1:1) durante 20 minutos y teñidos con cristal violeta (0.05%) por 20 minutos.

Para los ensayos de inhibición de la migración se adiciona 10µM de tetradotoxina en la parte superior del inserto, 1 hora antes de agregar LPS a la concentración correspondiente.

## **Ensayo de proliferación (recuento celular)**

Las células MDA-MB 231 fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pozos utilizando el medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 3% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico. Después de 24 o 72 horas, se expusieron las células a varias concentraciones de LPS (0.25, 0.5, 1.0, 5.0 o 10.0 µg/mL) por el tiempo indicado a la concentración adecuada para cada ensayo. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y re suspendidas en medio de cultivo. Después las suspensión celular fue transferida a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se realizó el recuento con el equipo Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Merck Millipore), equipado con un sensor de 60µm, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron número de células y la distribución del volumen de los histogramas mostrados por equipo, los datos fueron analizados con el Scepter 2.0 Software Pro 2.1.

## **Inmunocitoquímica**

Células incubadas y tratadas el número de horas indicadas, fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma- Aldrich) al 3.7% en solución amortiguadora PHEM (PIPES, HEPES, EGTA, Sulfato de magnesio, pH 7.4) por 10 minutos, se lavaron con PBS y permeabilizaron con NP-40 (Roche Diagnostics GmbH) al 0.25% durante 30 minutos, además se inhibió la peroxidasa endógena incubando con peróxido de hidrógeno al 0.5% durante 30 minutos. Posteriormente las células fueron incubadas con solución bloqueadora (gelatina 0.5% y FBS 1.5%) durante 2 horas en agitación constante. Después se incubó con anticuerpo policlonal primario (anti-TLR-4 de conejo, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:250 durante toda la noche a 4°C. Se incubó con anticuerpo secundario (anti conejo de cabra, Invitrogen) a una dilución de 1:1000 durante 1 hora. Seguido por 30 minutos de incubación con complejo avidina-HRP (Invitrogen) a dilución 1:500 durante en agitación constante. Finalmente durante 15 minutos se expuso al sustrato cromógeno del AEC Chromogen kit (Sigma- Aldrich) y se lavó con agua tridestilada 4 veces.

## **ELISA**

Medio condicionado obtenido de células tratadas por 48 horas con 20 y 40 µg/ml de LPS fue analizado por ELISA para evaluar las concentraciones de IL-6 y TNF-α. La determinación se realizó por medio de Human IL-6 ELISA Development Kit 900-K16 y Human TNF-α ELISA Development Kit 900-K25 (ambos de PEPROTECH) respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante.

## **Preparación de las placas**

El anticuerpo de captura se diluyó en PBS hasta una concentración de 1 µg/ml. Se adicionarán 100 µl a cada pozo en un placa de 96, se cubrió la placa e incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se removió el líquido y lavó 4 veces utilizando 300 µl de solución amortiguadora. Se adicionó después 300 µl de solución bloqueadora y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 4 lavados.

## Protocolo de ELISA

Se prepararon diluciones del estándar de 0 – 2ng/ml. Adicionamos 100  $\mu$ l por pozo de las soluciones estándar y de las muestras problemas por triplicado. Luego se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Se aspiró y lavo cuatro veces; se preparó una dilución a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml del anticuerpo de detección, agregamos 100  $\mu$ l por pozo e incubamos por 2 horas a temperatura ambiente. Se aspiró y lavo 4 veces nuevamente y se adicionaron 100  $\mu$ l de conjugado Avidina-HRP (dilución 1:2000) a cada pozo, posteriormente se incubo por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último se aspiró y se dieron 4 lavados, luego adicionamos 100  $\mu$ l de substrato (ABTS) e incubamos a temperatura ambiente hasta desarrollar color. Se determinó la densidad óptica por medio de un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

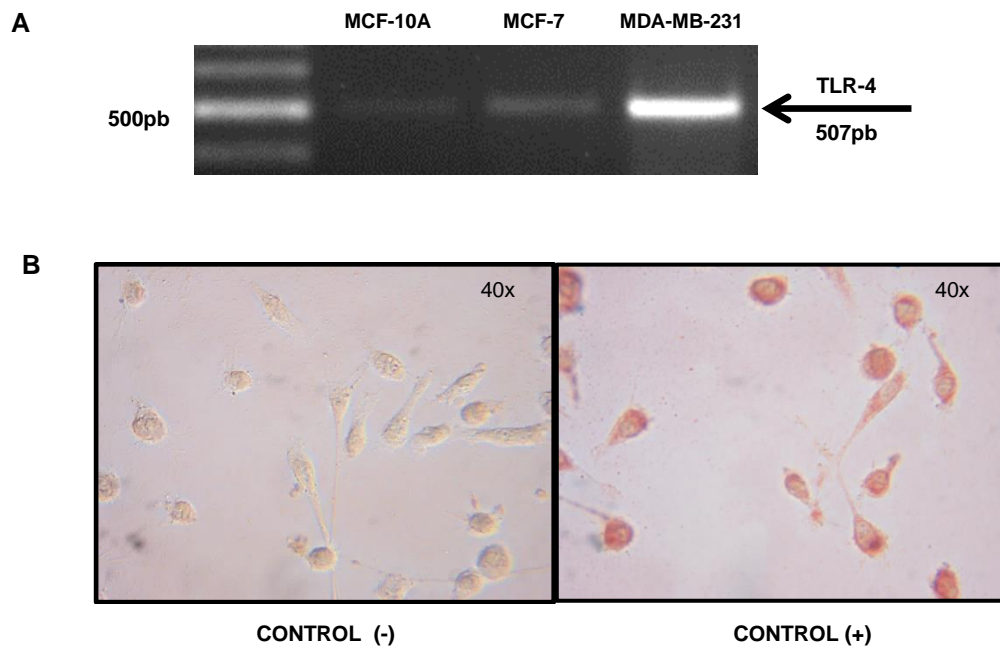
## Análisis estadístico

El análisis estadístico y gráficos se realizaron con el software SigmaPlot 11.0. Se utilizó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa *p* debe ser menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Expresión diferencial del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) en líneas celulares de mama.

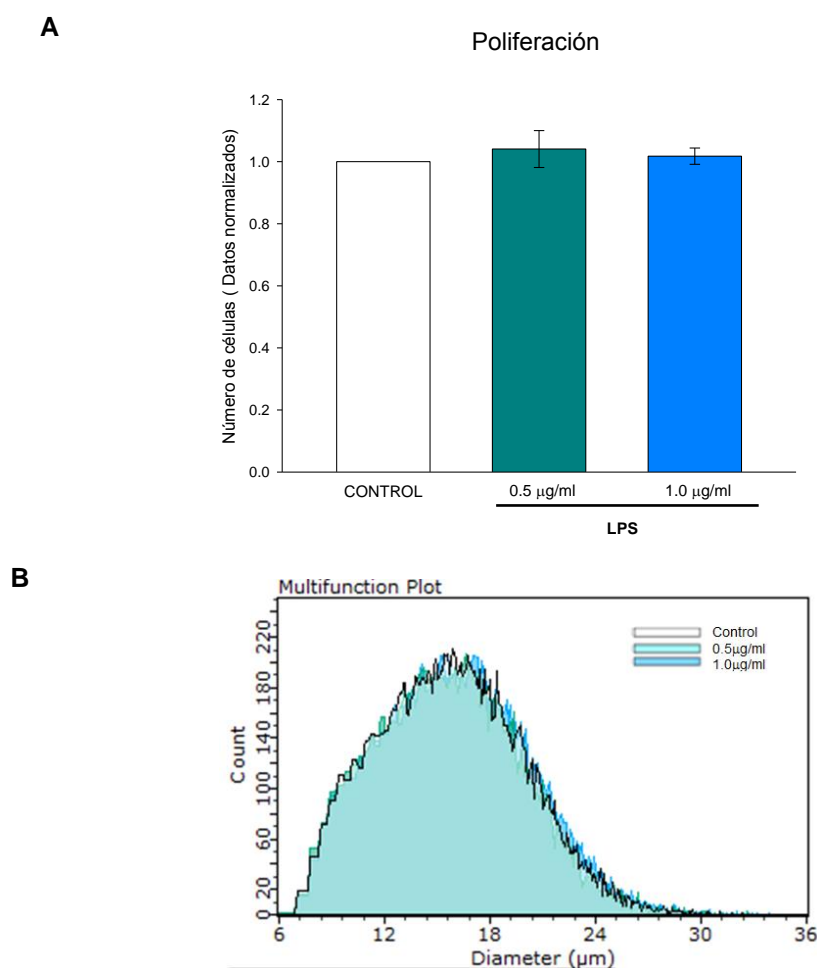
La presencia de altos niveles de citocinas proinflamatorias en el microambiente tumoral se debe no solamente a la activación de las células del sistema inmune, sino también a la participación de las propias células tumorales, probablemente a través de la activación del receptor tipo toll-4, al igual como ocurre en los linfocitos. Con esta idea, evaluamos si diferentes líneas celulares de mama, normales y tumorales, expresan el ARNm que codifica para TLR-4. Ensayos de RT-PCR muestran que el nivel de expresión de TLR-4 es directamente proporcional al grado de malignidad de las células de mama, observándose que las células MDA-MB 231, con alto potencial metastásico, presentan elevados niveles de expresión del ARNm que codifica para TLR-4, con respecto al observado en células MCF-7, células tumorales con bajo potencial metastásico, y MCF-10A, células normales de mama (Figura 6A). La presencia de TLR-4 a nivel de proteína se evidenció a través de una inmunocitoquímica (Figura 6B).



**Figura 6. El receptor tipo toll-4 se expresa en las células MDA-MB-231. A)** Ensayo de RT-PCR muestra los niveles de expresión de ARNm que codifica para TLR-4 en células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 en condiciones de cultivo estándar, se observa un incremento directamente proporcional al grado de malignidad de cada línea celular. **B)** Inmunocitoquímica que muestra la presencia del receptor toll-4 en células MDA-MB-231, la microfotografía a la izquierda muestra el control negativo, donde se omitió el anticuerpo primario y a la derecha se muestra el control positivo

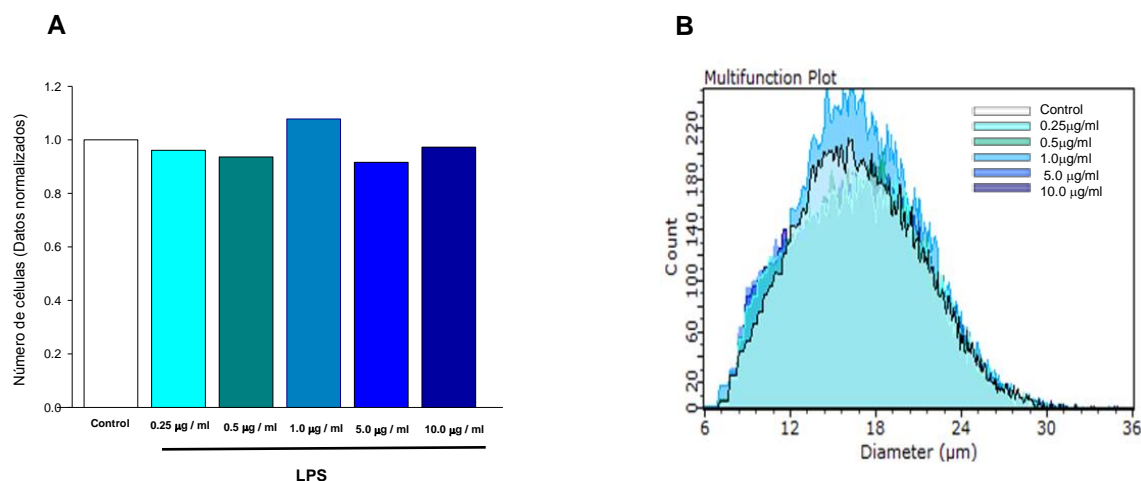
## La activación de TLR-4 por LPS no afecta la capacidad proliferativa de células MDA-MB-231.

La activación de TLR-4 en las células del sistema inmune estimula no solamente su capacidad de síntesis de citocinas proinflamatorias, sino también su capacidad proliferativa, por lo que decidimos investigar si este último efecto se presentaba en las células tumorales de mama. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con LPS a concentraciones de 0.5 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  por 48 horas. Se realizó el conteo celular en un citómetro de flujo portátil, observándose que la presencia de LPS no afecta de manera significativa la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231 (Figura 7, A y B).



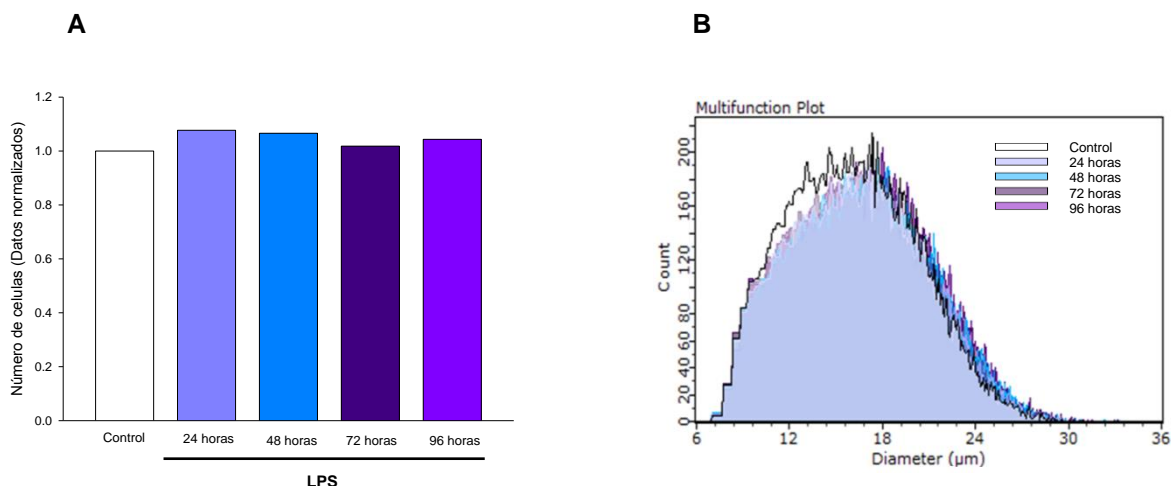
**Figura 7. LPS no modifica la capacidad proliferativa en células MDA-MB-231. A)** Conteo celular con citómetro *Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter*, no se observa un cambio importante en el número de las células después de 48 h de tratamiento con LPS a las concentraciones de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  con respecto al control. **B)** Histogramas de distribución representativo de la cuantificación celular ( $n=6$ )

Para este primer acercamiento empleamos dos concentraciones de LPS (0.5 y 1.0 mg/ml), por lo que decidimos ampliar nuestro estudio con otras concentraciones de LPS por el mismo tiempo de tratamiento. Las células fueron tratadas a concentraciones crecientes de LPS: 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$ . Independientemente de la concentración empleada de LPS, no se observa un efecto significativo sobre la proliferación celular (Figura 8, A y B).



**Figura 8. Curva dosis efecto de LPS sobre la capacidad proliferativa en células MDA-MB-231. A)** Cuantificación celular después de 48 h de tratamiento con 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, no se observa una modificación significativa en el número de células. **B)** Histogramas representativos, no se altera la distribución del número células con respecto a su tamaño, independientemente del incremento de la concentración de LPS.

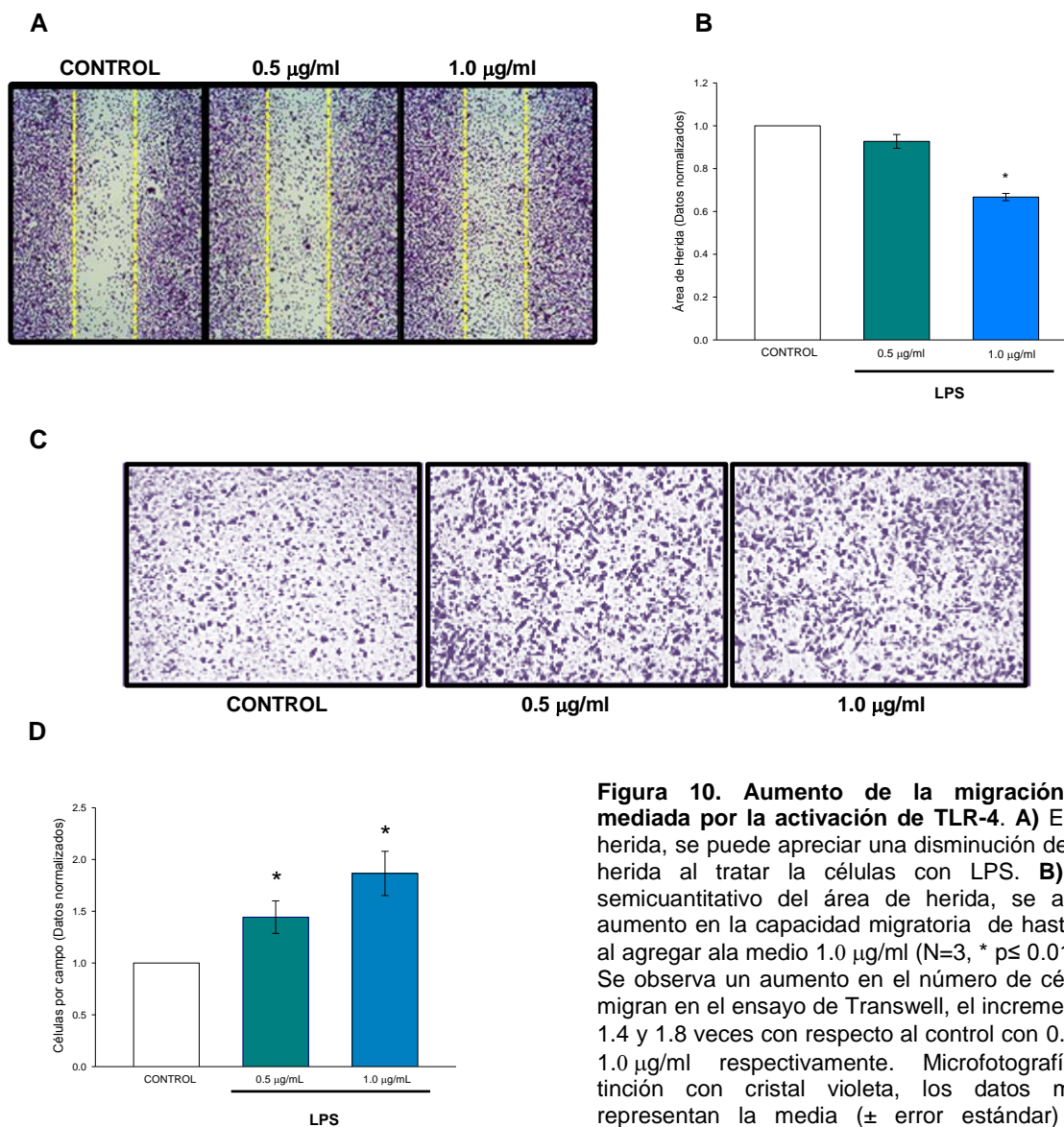
La curva dosis-efecto muestra que LPS a diferentes concentraciones por 48 horas de tratamiento no afecta la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231, probablemente el tiempo de tratamiento sea insuficiente para observar un cambio significativo, por lo que decidimos incrementar la duración del tratamiento hasta 96 horas a una concentración fija de LPS. Las células MDA-MB 231 se mantuvieron en presencia de 1 mg/ml de LPS a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas. La figura 9 muestra el curso temporal, observándose que aun incrementando la duración del tratamiento, LPS es incapaz de modificar la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.



**Figura 9. Cuso temporal de la activación de TLR-4 por LPS sobre la capacidad proliferativa en células MDA-MB-231. A)** Número de células posterior al tratamiento con 1.0  $\mu\text{g/ml}$  por 24, 48, 72 y 96 (la cuantificación se realizó con citómetro *Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter*), no hay cambios en la capacidad proliferativa después de un tratamiento tónico de hasta 96 horas. **B.** No se altera la distribución con respecto al tamaño a pesar del aumento del tiempo de exposición, histogramas representativos de la cuantificación celular.

### TLR-4 activado por LPS promueve el aumento de la capacidad migratoria.

Inicialmente evaluamos, en nuestro modelo celular de cáncer de mama triple negativo, los efectos de la activación de TLR-4 sobre la capacidad migratoria, por medio del ensayo de herida. Las células MDA-MB-231 por su propia condición de células metastásicas, migran en la condición control, sin embargo el pre-tratamiento con 0.5 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 48 horas, exacerba dicha capacidad migratoria entre un 7.3 y un 33.3% respectivamente (Figura 10, A y B). La realización de experimentos de migración en cámaras transwell permitió evaluar cuantitativamente el efecto que ejerce LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Las células fueron pretratadas por 48 horas en presencia de LPS, posteriormente fueron sembradas en las cámaras transwell y se mantuvieron por 12 horas en presencia de la señal inductora. El resultado final muestra que LPS induce de manera significativa un incremento en la capacidad migratoria de las células tratadas con respecto al control (Figura 10, C y D).

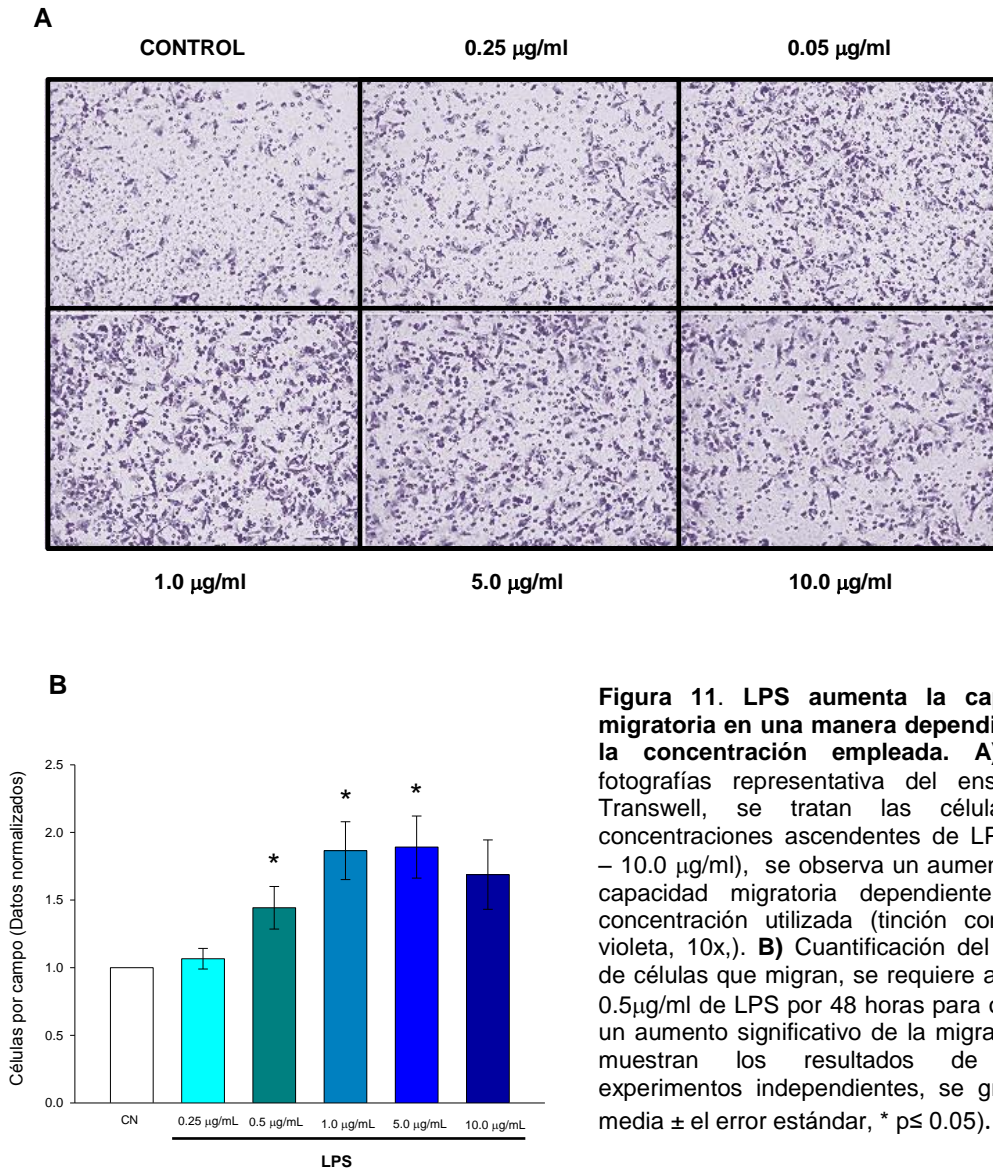


**Figura 10. Aumento de la migración celular mediada por la activación de TLR-4.** **A)** Ensayo de herida, se puede apreciar una disminución del área de herida al tratar la células con LPS. **B)** Análisis semicuantitativo del área de herida, se aprecia el aumento en la capacidad migratoria de hasta 33.3 % al agregar ala medio 1.0 µg/ml (N=3, \* p≤ 0.01). **C y D)** Se observa un aumento en el número de células que migran en el ensayo de Transwell, el incremento es de 1.4 y 1.8 veces con respecto al control con 0.5 µg/ml y 1.0 µg/ml respectivamente. Microfotografías 10x, tinción con cristal violeta, los datos mostrados representan la media (± error estándar) de tres experimentos independientes; (\* p< 0.05).

**El aumento de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 mediado por la activación de TLR-4, depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición de LPS.**

Evaluamos seis diferentes concentraciones de LPS (0.25 – 10.0 µg/ml) a 48 horas para el ensayo de Transwell en la línea celular MDA-MB-231 con el fin de construir una curva dosis-efecto (Figura 11A). La estimulación de la capacidad migratoria con LPS

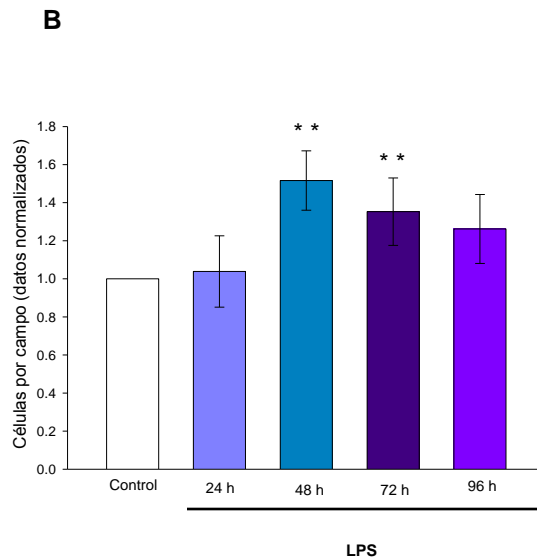
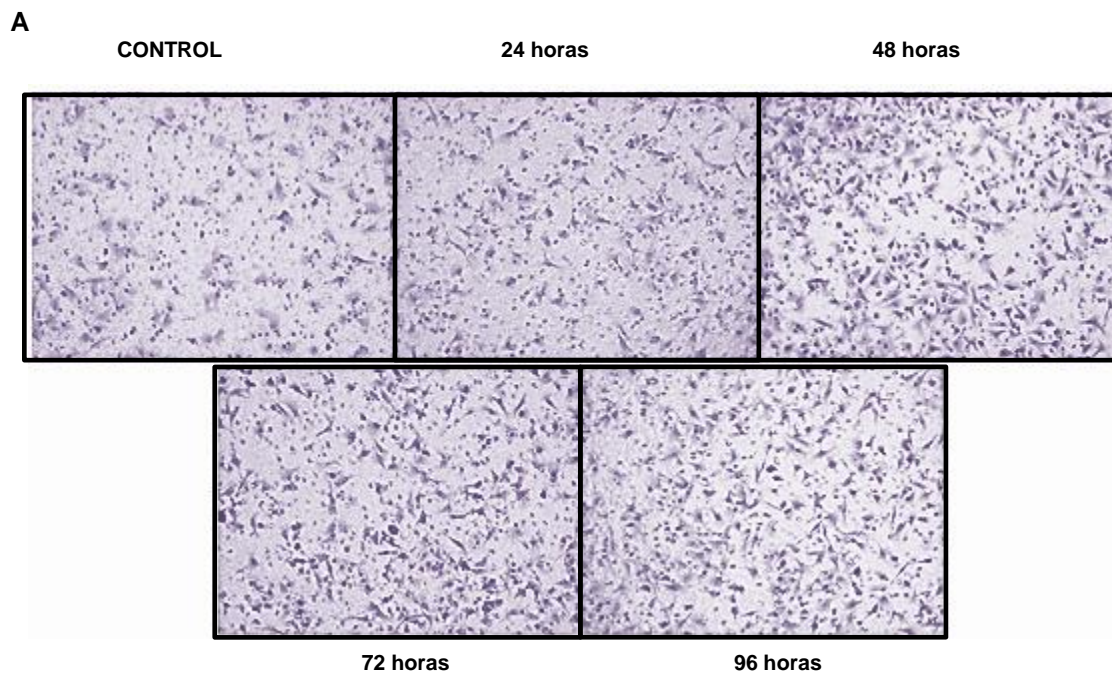
depende de la concentración empleada, se requiere de una concentración mínima de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de LPS para observar un efecto significativo, alcanzando un valor máximo a partir de 1  $\text{mg/ml}$  de LPS (Figura 11B).



**Figura 11. LPS aumenta la capacidad migratoria en una manera dependiente de la concentración empleada. A)** Micro fotografías representativa del ensayo de Transwell, se tratan las células con concentraciones ascendentes de LPS (0.25 – 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), se observa un aumento en la capacidad migratoria dependiente de la concentración utilizada (tinción con cristal violeta, 10x.). **B)** Cuantificación del número de células que migran, se requiere al menos 0.5 $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 48 horas para observar un aumento significativo de la migración (se muestran los resultados de cuatro experimentos independientes, se grafica la media  $\pm$  el error estándar, \*  $p \leq 0.05$ ).

Para el caso del curso temporal con el cual se establece el efecto estimulador de LPS sobre la capacidad migratoria en las células MDA-MB 231, las células fueron pre-tratadas con LPS (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). La figura 12 muestra que es necesario que hayan transcurrido más de 24 horas de pre-tratamiento para que LPS sea capaz de inducir un aumento significativo en la capacidad migratoria de las

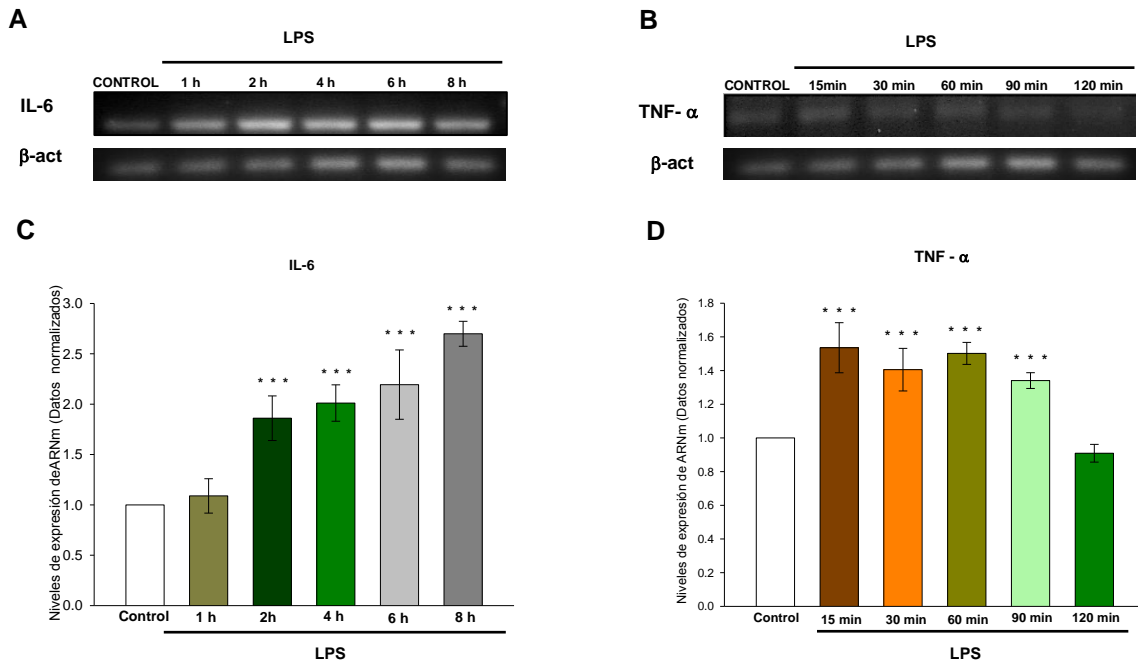
células MDA-MB 231, lo cual sugiere la participación de un mecanismo genómico, relacionado con cambios en la expresión de proteínas específicas.



**Figura 12. El aumento de la capacidad migratoria depende del tiempo de exposición a LPS. A)** Imágenes representativas del ensayo de Transwell, que muestran las células que migran en condición control y pre-tratadas con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 24, 48, 72 y 96, (tinción con violeta de metilo microfotografías 10x). **B)** Cuantificación de la migración celular, la diferencia entre el número de células por campo en la condición control y el tratamiento con 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 48 y 72 horas es estadísticamente significativa (se muestran los resultados de cuatro experimentos independientes, se grafica la media  $\pm$  el error estándar, \*  $p \leq 0.05$ ).

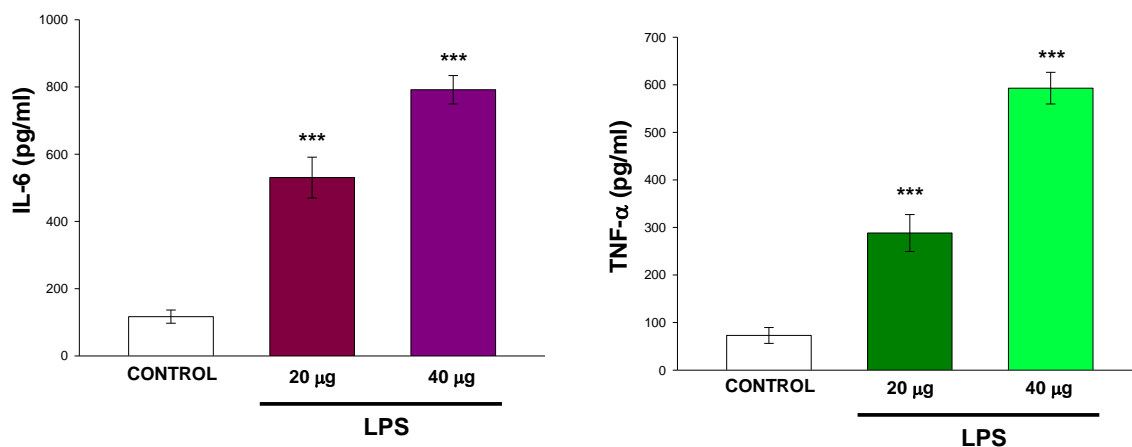
## La activación de TLR-4 dependiente de LPS aumenta la expresión de citocinas pro-inflamatorias

LPS a través de la activación de TLR-4 induce un aumento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en células del sistema inmune. Decidimos evaluar si este mismo efecto se presentaba en las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas con 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, determinamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-6 y TNF- $\alpha$ , como citocinas pro-inflamatorias clásicas. La exposición a LPS induce un aumento significativo en la expresión del ARNm que codifica para IL-6 a partir de las 2 primeras horas de tratamiento, manteniéndose dicho efecto estimulador hasta las 8 horas de tratamiento, 2.7 veces con respecto al control (Figura 13, A y C). Para el caso del ARNm que codifica para TNF- $\alpha$ , el efecto del LPS es más rápido, ya que es posible observar un cambio significativo a partir de los primeros 15 min de tratamiento, manteniéndose hasta los 90 minutos (Figura 13, B y D).



**Figura 13. La activación de TLR-4 en las células MDA-MB-231 regula positivamente la expresión del ARNm que codifica para citocinas pro-inflamatorias. A y B)** RT-PCR punto final se utilizó para detectar cambios en la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ . **A)** Tratamiento con 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS a diferentes intervalos y el ARNm fue analizado por RT-PCR semicuantitativo, se observa incremento de la expresión de una manera dependiente del tiempo. **B)** Se aprecia el incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  de hasta 1.5 veces después de 15 minutos de tratamiento (resultados que representan la media de tres experimentos, \*\*\*  $p \leq 0.001$ . Normalización con respecto a  $\beta$ -actina)

Para evaluar el efecto de LPS sobre los niveles de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  a nivel de proteína se realizaron ensayos de ELISA, utilizando medio condicionado de células tratadas con 20 y 40  $\mu$ g/ml de LPS por 48 horas. Se observa para IL-6 que la secreción de esta citocina aumenta 4.5 y 6.8 veces respectivamente con respecto al control (Figura 14 A). Para TNF- $\alpha$  también observamos un aumento significativo de la expresión de 3.9 y 8.1 veces respectivamente con respecto al control (Figura 14 B). Estas citocinas se han asociado con el mantenimiento y exacerbación de la capacidad metastásica de las células tumorales, actuando a través de mecanismos autocrinos y paracrinos.

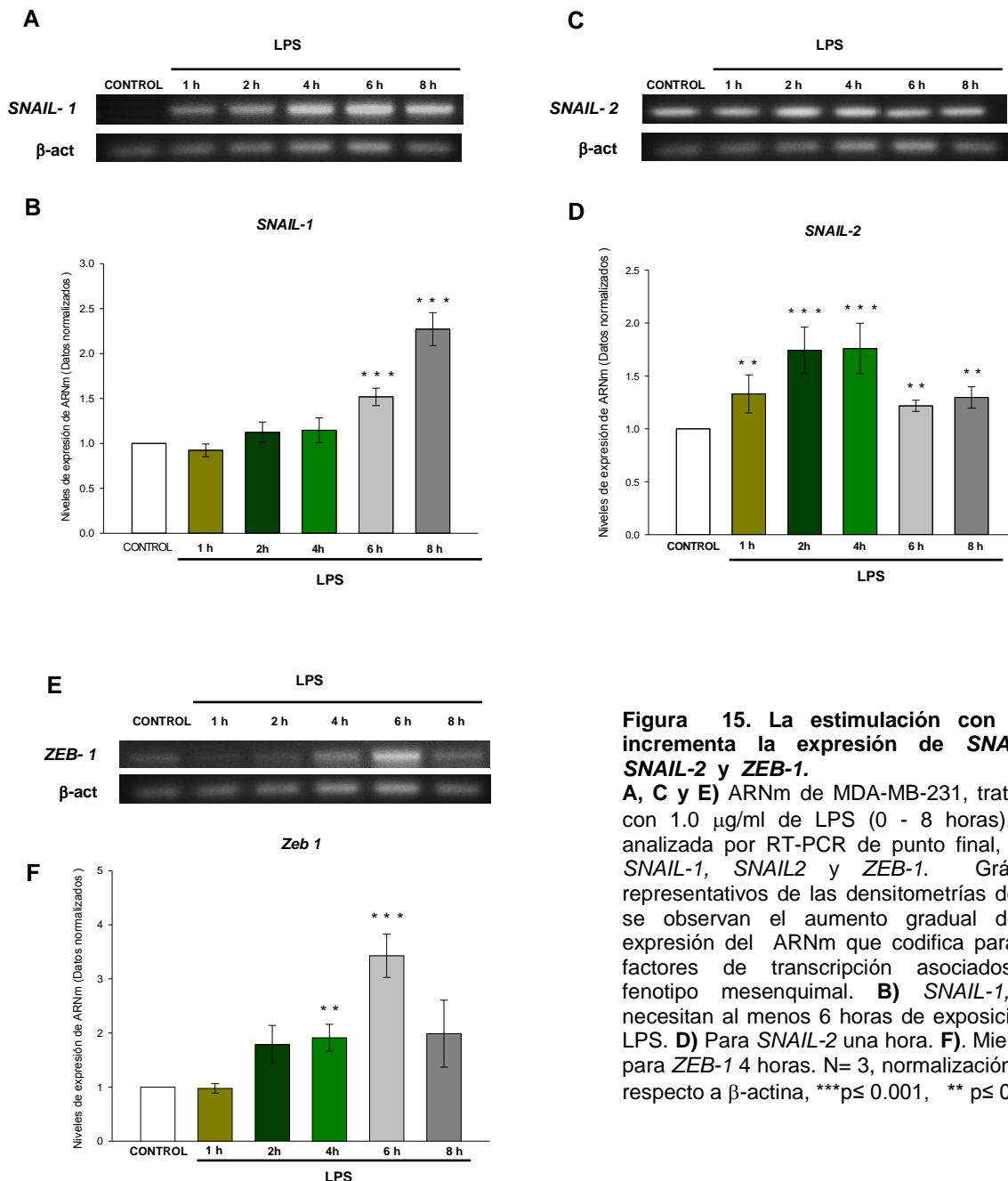


**Figura 14. LPS incrementa la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en la línea celular MDA-MB-231.** Ensayos de ELISA tipo Sándwich para detectar niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ . **A)** Nivel de expresión de IL-6, se trataron células con 20 y 40  $\mu$ g/ml de LPS durante 48 horas, se observa un incremento dependiente de la concentración de 4.5 y 6.8 veces respectivamente. **B)** Se aprecia el incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  de hasta 8.1 veces después de 48 horas de tratamiento con 40  $\mu$ g/ml de LPS (resultados que representan la media de tres experimentos, \*\*\*  $p \leq 0.001$ )

### La expresión de factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal *SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1*, así como de Vimentina incrementan vía activación de TLR-4 por LPS

La capacidad migratoria de las células tumorales está asociada a un aumento en los niveles de expresión de los factores de transcripción relacionados con la transición epitelio-mesénquima. Determinamos establecer si el tratamiento con 1.0  $\mu$ g/ml de LPS afecta el nivel de expresión del ARNm que codifica para diferentes factores de transcripción relacionados a la transición epitelio-mesénquima: *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST* y *ZEB-1*. Las células MDA-MB 231 en presencia de LPS presentan un aumento

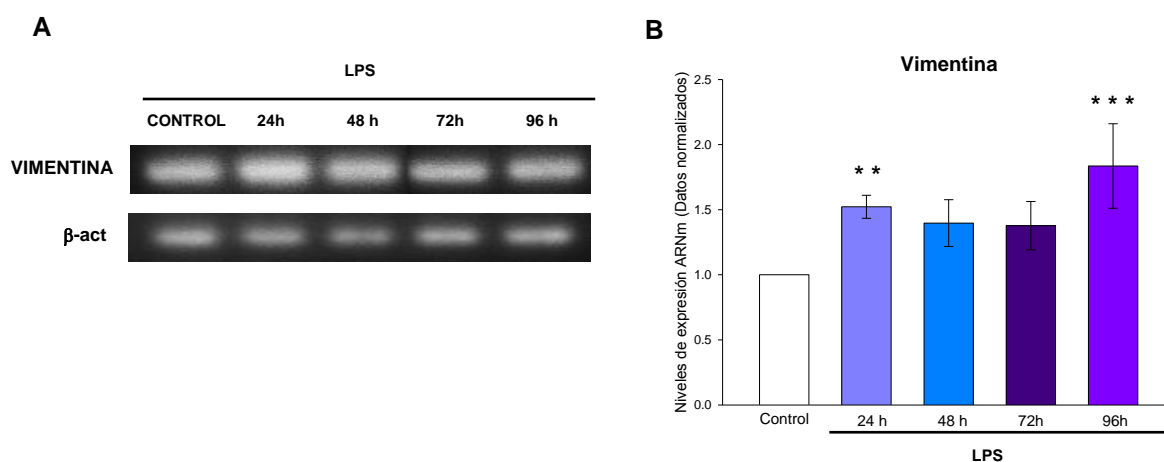
significativo en tres de los cuatro factores de transcripción investigados, observándose claramente además, una diferencia significativa en su curso temporal, por ejemplo, el nivel del ARNm que codifica para SNAIL-2 alcanza su valor máximo en las primeras 2 horas de tratamiento (Figura 15, A y B), ZEB-1 por su parte, en las primeras 4 horas (Figura 15, C y D), mientras que para SNAIL-1 son necesarias por lo menos 6 horas de tratamiento con LPS (Figura 15, E y F). No detectamos en nuestras condiciones experimentales el ARNm que codifica para TWIST. La expresión de estos factores de transcripción se ha asociado con el mantenimiento de un fenotipo invasivo de las células tumorales.



**Figura 15. La estimulación con LPS incrementa la expresión de SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1.**

**A, C y E)** ARNm de MDA-MB-231, tratadas con 1.0 µg/ml de LPS (0 - 8 horas), fue analizada por RT-PCR de punto final, para SNAIL-1, SNAIL2 y ZEB-1. Gráficos representativos de las densitometrías donde se observan el aumento gradual de la expresión del ARNm que codifica para los factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal. **B)** SNAIL-1, se necesitan al menos 6 horas de exposición a LPS. **D)** Para SNAIL-2 una hora. **F)** Mientras para ZEB-1 4 horas. N= 3, normalización con respecto a β-actina, \*\*\*p≤ 0.001, \*\* p≤ 0.01.

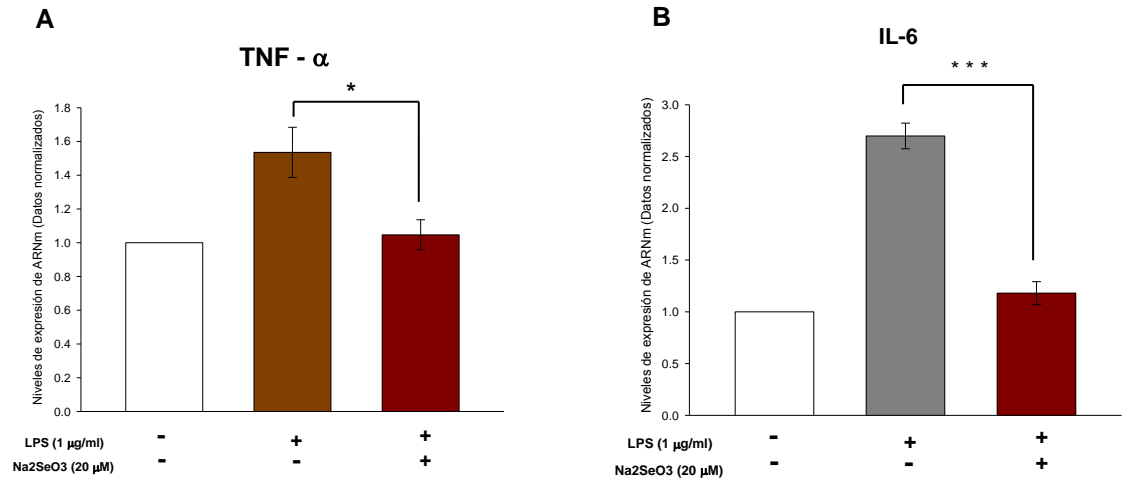
Como consecuencia de la expresión de los factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima (*SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1*), las células tumorales dejan de expresar marcadores epiteliales, como es el caso de la E-caderina y comienzan a expresar marcadores mesenquimales, como la Vimentina. Evaluamos los niveles de expresión del ARNm que codifica para Vimentina en células MDA-MB 231 mantenidas en presencia de LPS (1.0 µg/ml) por 24, 48, 72 y 96 horas. Encontramos que en las primeras 24 horas de tratamiento existe un aumento estadísticamente significativo en la expresión de Vimentina, y que este se mantiene hasta las 96 horas de tratamiento (Figura 16, A y B).



**Figura 16. El tratamiento tónico con LPS induce la expresión de Vimentina. A)** Gel de agarosa, RT-PCR tiempo final. **B)** Graficas representativas de las densitometrías de RT-PCR para Vimentina. Se observa un incremento significativo a las 24 y 96 horas (PCR punto final, N= 3, normalización con respecto a β-actina, significancia \*\*p≤ 0.01, \*\*\* p≤ 0.001)

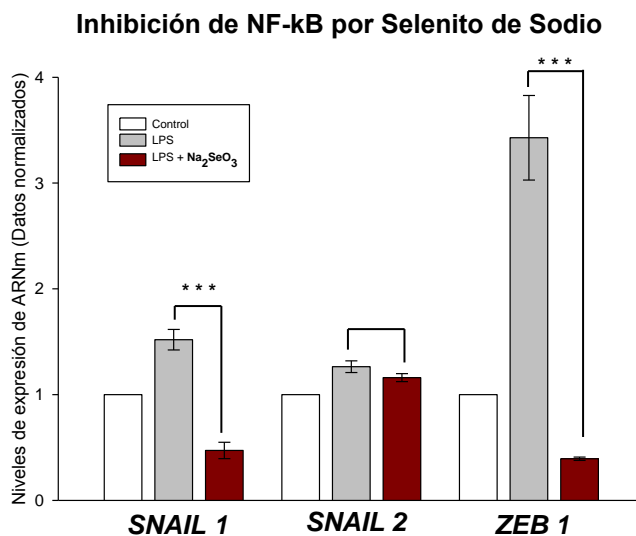
### El incremento en la expresión de IL-6, TNF-α, *SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1* es mediado por la activación de *NF-κB*.

En las células del sistema inmune, LPS al unirse a su receptor específico, TLR-4, activa una cascada de señalización comandada por el factor nuclear kappa-B (NF-KB), el cual se transloca al núcleo y se une a la región promotora del ADN de los genes que codifican para IL-6 y TNF-α, estimulando su transcripción. Con el fin de poner a prueba la presencia de este mismo mecanismo en las células MDA-MB 231, mantuvimos las células en presencia de LPS (1.0 µg/ml) y de selenito de sodio (20 µM). La presencia de selenito de sodio previene el efecto estimulador que ejerce LPS sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-6 (Figura 17A) y TNF-α (Figura 17B), dejando en claro la participación del NF-κB una vez que ha sido activado el TLR-4 por LPS.



**Figura 17. Selenito de sodio previene el incremento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias al inhibir NF- $\kappa$ B.** inhibición de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ . por Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 20 $\mu$ M. **A)** Se observa recuperación de los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  al inhibir NF- $\kappa$ B con selenito de sodio. **B)** Prevención del efecto estimulador de IL-6 por LPS al agregar selenito de sodio al medio de cultivo, se evaluó después de una hora de exposición (resultados que representan la media de tres experimentos,  $p \leq 0.001$ . Normalización con respecto a  $\beta$ -actina).

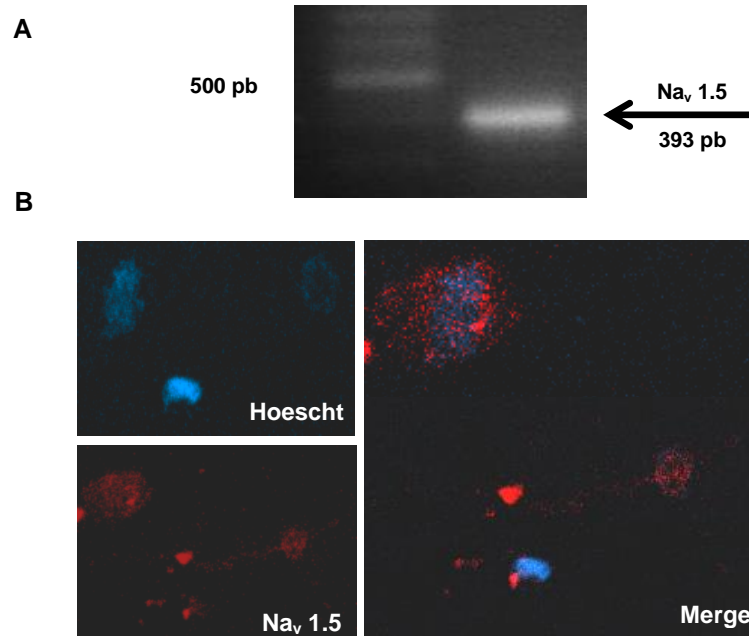
De manera complementaria, evaluamos el efecto que pudiera ejercer el selenito de sodio sobre la expresión de los factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal. La presencia de selenito de sodio reduce significativamente la expresión de solamente dos factores de transcripción: *SNAIL-1* y *ZEB-1*, dependiente de la activación de TLR-4 (Figura 18).



**Figura 18. La vía de señalización TLR-4/ NF- $\kappa$ B participa en el efecto estimulador que ejerce LPS sobre la expresión de *SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1*.** Grafica representativa de la densitometría de los ensayos de RT-PCR de cada serie experimental. Después del pretratamiento 20  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y la exposición por seis horas con LPS 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , se previene el efecto estimulador de la actividad de TLR-4 sobre los factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal, la disminución es estadísticamente significativa para los niveles de expresión de *SNAIL-1* y *ZEB-1*. Resultados que representan la media de tres experimentos,  $p \leq 0.001$ . Normalización con respecto a  $\beta$ -actina)

## Nav 1.5 participan en la exacerbación de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, dependiente de la activación de TLR-4

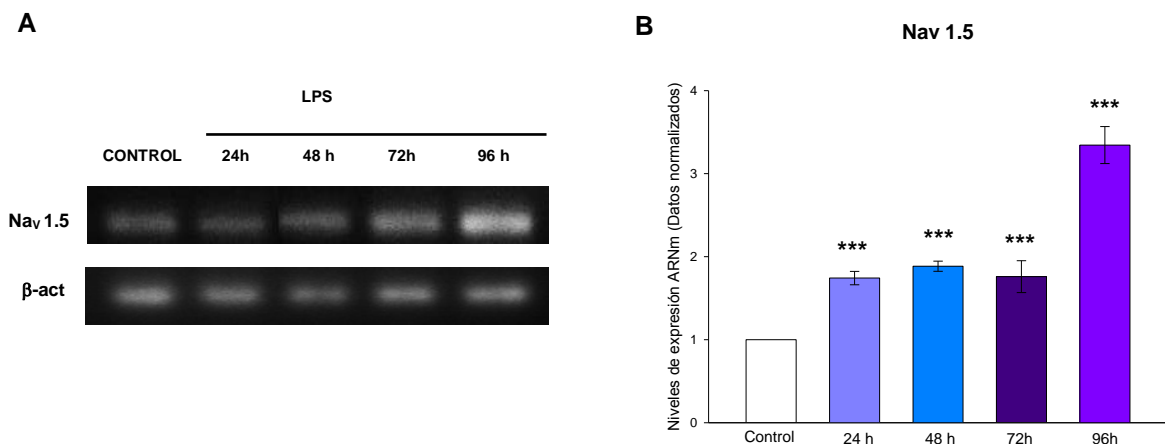
Diversos trabajos han relacionado la expresión de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio sensibles a voltaje (Nav 1.5) con un aumento en la capacidad migratoria de células tumorales. Las células MDA-MB 231 expresan tanto a nivel de ARNm (Figura 19A) como de proteína la subunidad  $\text{Na}_v$  1.5 (Figura 19B).



**Figura 19. Las células MDA-MB-231 expresan a nivel de ARNm y proteína la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje  $\text{Na}_v$  1.5.**

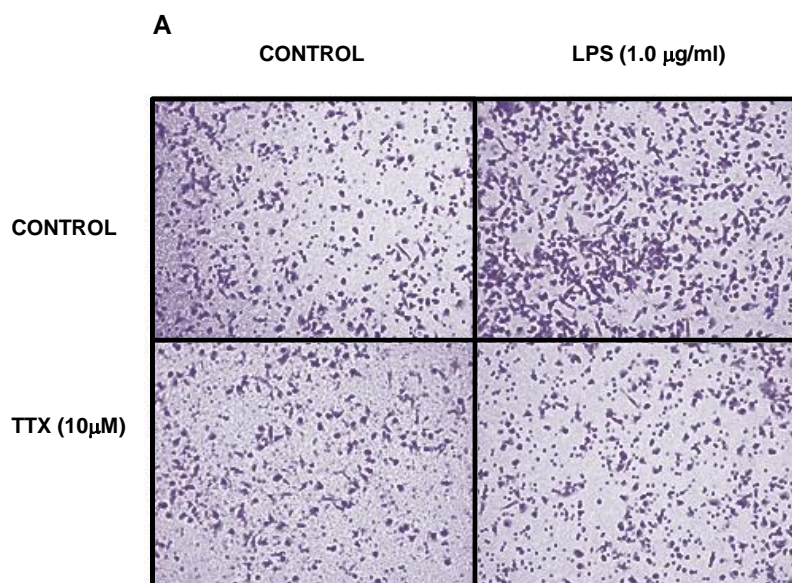
**A)** Se aprecia la señal del amplicado del ARNm que codifica para  $\text{Na}_v$  1.5 (393 pb). **B)** Microfotografías en 40x, representativas donde se observa señal inmunorreactiva para  $\text{Na}_v$  1.5 en células control. Fueron marcadas con anticuerpos específicos  $\text{Nav}$  1.5 (rojo) y Hoescht (azul) para visualizar los núcleos.

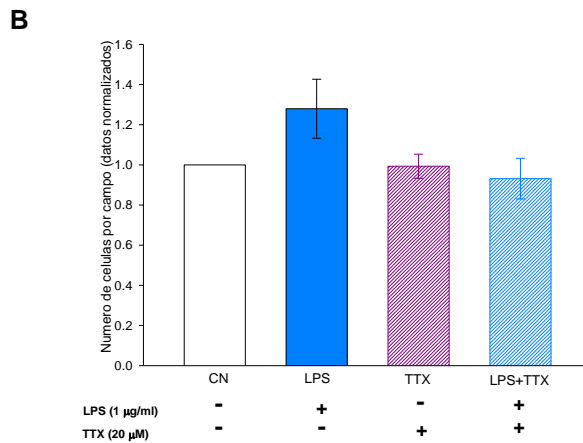
La capacidad migratoria en las células tumorales es regulado al menos en parte por un aumento en los niveles de expresión funcional del canal de sodio  $\text{Nav}$  1.5. Con estos antecedentes, decidimos examinar la posibilidad de que el efecto estimulador del LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 se deba al menos parcialmente a un aumento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\text{Na}_v$  1.5. La presencia de LPS (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) incrementa los niveles del ARNm que codifica para el  $\text{Na}_v$  1.5, requiriéndose un mínimo de 24 horas para observarse un efecto significativo, alcanzando un valor máximo a las 96 horas de tratamiento, más de 3 veces con respecto a la condición control (Figura 20, A y B).



**Figura 20. LPS estimula la expresión de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje  $Na_v$  1.5.** PCR punto final utilizado para observar los niveles de expresión de ARN mensajero de  $Na_v$  1.5. **A)** Gel de agarosa, RT-PCR tiempo final. **B)** Graficas representativas de las densitometrías de RT-PCR para  $Na_v$  1.5. Se realizó tratamiento tónico con 1.0  $\mu$ g/ml de LPS y este induce aumento gradual de la expresión de  $Na_v$  1.5 dependiente de tiempo. La máxima intensidad de banda se encuentra a las 96 horas. (N= 3, normalización con respecto a  $\beta$ -actina, significancia \*\*\* $p \leq 0.001$ )

El bloqueo de la actividad de los canales de sodio por TTX reduce de manera significativa la capacidad migratoria de las células tumorales MDA-MB 231 estimulada por LPS (Figura 21, A y B). Estos resultados dejan en claro la participación del canal de sodio en la efecto inducido por LPS sobre la capacidad migratoria de las células tumorales de mama.





**Figura 21. El bloqueo de  $Na_v$  1.5 con TTX inhibe la migración celular mediada por la activación de TLR-4.** Se trataron células MDA-MB-231 12 horas con  $10\mu\text{M}$  y  $1.0\mu\text{g/ml}$  LPS (microfotografías  $10\times$ , tinción con cristal violeta.). **A)** Se observa una reducción de la capacidad migratoria en el ensayo de Transwell al inhibir con TTX la entrada de sodio a través de la subunidad  $\alpha$   $Na_v$  1.5. **B)** Grafico representativo de la cuantificación celular de cada serie experimental, donde se aprecia que la migración estimulada por la activación de TLR-4 se ve disminuida de manera importante por la acción de tetradoxina sobre el canal de sodio. Los datos mostrados representan la media ( $\pm$  error estándar) de cuatro experimentos independientes; ( $p=0.056$ ).

## DISCUSIÓN

La condición clínica más agresiva del cáncer es la metástasis, ya que más del 90% de las muertes ocasionadas por cáncer se deben a dicha complicación. Entre los diversos tipos de cáncer, el cáncer de mama se ha convertido en un problema de salud pública tanto en México como en el resto del mundo, ya que este padecimiento ocupa el primer lugar de incidencia y el segundo lugar como causal de muerte en la población femenina adulta. La progresión del cáncer se ha relacionado positivamente con la prevalencia de un microambiente inflamatorio, donde la activación de receptores, como el TLR-4, reconocen la presencia de patrones moleculares de agentes patógenos, estimulando la producción de citocinas pro-inflamatorias, las cuales inciden positivamente en la capacidad metastásica de las células tumorales. En el presente trabajo describimos que no solamente las células del sistema inmune presentes en el microambiente tumoral son las únicas responsables en la producción de citocinas, sino también las propias células tumorales, llegando a establecerse una comunicación autocrina y paracrina entre las células tumorales, células del estroma circundante y células del sistema inmune.

El receptor tipo Toll 4 (TLR-4) fue descrito inicialmente en la respuesta inmune innata, pero a través de múltiples estudios experimentales, clínicos, epidemiológicos se ha correlacionado con el fenotipo maligno de células de cáncer, particularmente en cáncer de mama (Ahmed A. 2013). La activación de TLR-4 y su vía de señalización, ha sido estudiada en diferentes líneas celulares utilizando al lipopolisacárido como su ligando exógeno.

La expresión de TLR-4 en tumores y líneas celulares de cáncer de mama ha sido previamente reportado (González-Reyes, et al., Yang et al, 2010, Rajput et al., 2013), consistente con esta información, confirmamos la presencia a nivel de ARN mensajero y de proteína de este receptor en la línea celular MDA-MB 231. Un dato importante que obtuvimos y que no había sido reportado fue que el nivel de expresión de TLR-4 es directamente proporcional al grado de malignidad de las células epiteliales de mama, ya que en ensayos de RT-PCR mostramos que las células MDA-MB 231 presentan un alto nivel de expresión de TLR-4, en comparación a una línea tumoral poco invasiva, MCF-7, y una línea epitelial de mama inmortalizada, MCF10A.

En diferentes modelos de cáncer se ha observado que la activación de TLR-4 por LPS genera efectos contrarios en la proliferación celular. Por ejemplo, en cáncer de ovario, adenocarcinoma de colon y carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello, se ha correlacionado positivamente la activación del TLR-4 con el aumento en la capacidad proliferativa de las células (Helly et al., 2006; Fukata et al. 2006, Sczepanski et al., 2009); en apoyo a estas evidencias, Yang y colaboradores en el año 2010, mostraron que el silenciamiento del ARNm que codifica para TLR-4 (*knockdown*), inhibe de manera importante el crecimiento y proliferación de las células MDA-MB-231. En contraparte a estos estudios, Bauer y colaboradores en el año 2005, demostraron que la activación de TLR-4 inhibe el desarrollo de cáncer pulmonar. Además, existen también evidencias de que la activación de TLR-4 por LPS no produce cambios en la capacidad proliferativa en líneas celulares de cáncer de páncreas (Panc-1, AsPC-1), y en la línea murina de cáncer de mama 4T1 (Ahmed et al., 2013). Ante esta diversidad de probables efectos y bajo nuestras condiciones experimentales (determinación del número celular y de la concentración de proteínas), observamos que la presencia de LPS, a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, no afecta la capacidad proliferativa de las

células MDA-MB 231, coincidiendo con los resultados reportados por Ahmed y colaboradores en el año 2013.

La activación de TLR-4, se ha relacionado positivamente con la capacidad migratoria de las células tumorales, característica fundamental que determina el potencial metastásico de los tumores primarios, incluyendo el de mama. Nuestros resultados muestran claramente que LPS al unirse a TLR-4 estimula de manera significativa la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y que este efecto depende de la concentración empleada y de la duración del tratamiento. Esto mismo fue observado en otras líneas celulares de cáncer de mama (Liao et al., 2012; Yang et al., 2014), aunque se desconoce hasta el momento el mecanismo molecular responsable. Un dato importante que obtuvimos fue que es necesario mantener a las células por lo menos 24 horas en presencia de LPS para observar un cambio significativo en la capacidad migratoria, esto sugiere la participación de un mecanismo genómico. La transición epitelio-mesénquima no solamente implica la pérdida de expresión de los marcadores epiteliales y la ganancia en la expresión de los marcadores meséquimales, proceso regulado por diferentes factores de transcripción (*SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST* y *ZEB-1*), sino también un cambio sustancial en la expresión de algunas proteínas integrales de membrana, asociadas a regular el flujo iónico, como son los canales dependientes de voltaje e intercambiadores.

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de LPS induce un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para tres diferentes factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima, *SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1*, y que además hay una diferencia en el curso temporal con el cual se están expresando, siendo *Snail-2*, el factor de transcripción que más tempranamente se expresa, seguido por *Zeb-1* y finalmente *Snail-1*. Los trabajos reportados por el grupo de la Dra. Angela Nieto, muestran que la expresión de los factores de transcripción no es simultánea, sino en cascada.

Al unirse LPS con TLR-4, activa la vía de señalización canónica, vía dependiente de MyD88, que culmina con la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo, el cual regula positivamente la expresión de genes relacionados a la respuesta inflamatoria, la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ . En el presente trabajo, demostramos no solamente que la activación de TLR-4 induce un aumento en los niveles de producción de IL-6 y de TNF- $\alpha$  en las células MDA-MB 231, tal y como ocurre en las

células del sistema inmune, sino también hay un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para tres diferentes factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima, *SNAIL-1*, *SNAIL-2* y *ZEB-1*, y que todo depende de la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo de la célula (Grivennikov & Karin, 2008; Karin, 2006; Szlosarek & Balkwill, 2003; Wu & Zhou, 2010).

El NF- $\kappa$ B regula directa e indirectamente otros genes que están relacionados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal de las células tumorales, tales como vimentina y E-cadherina respectivamente (Jeong et al., 2012; Karihtala et al., 2013).

Consideramos que la expresión de los factores de transcripción y la citocinas inflamatorias estimulada por LPS mantienen y exacerbaban de manera autocrina y paracrina la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y que esto dependen fundamentalmente de la activación del NF- $\kappa$ B, ya que al incubar las células en presencia de selenito de sodio, el efecto estimulador de LPS no se presenta.

A partir de los trabajos de Roger et al., 2003; Fraser et al., 2005, entre otros, queda demostrada la participación del canal de sodio Nav 1.5 en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Por lo que decidimos tratar de responder si el efecto estimulador de LPS sobre la capacidad migratoria se debe a un cambio en la expresión funcional del canal de sodio Nav 1.5. Nuestro trabajo es el primero que describe la correlación positiva que se da entre la activación de TLR-4 con un aumento en la expresión del canal de sodio Nav 1.5. La presencia de TTX en el medio de cultivo previene el efecto estimulador de LPS sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

En el microambiente inflamatorio, durante el desarrollo y progresión del cáncer de mama, no se ha reportado la presencia de microorganismos o productos derivados de ellos, por lo que la vía de señalización desencadenada por la activación de TLR-4, se debe muy probablemente a la participación de ligandos endógenos (Yu et al., 2012). Entre las moléculas endógenas que han demostrado ser mediadores de la activación de este receptor se encuentra HMGB1 (cáncer de piel y cáncer de mama); HSP60, HSP70 y HSP90 (melanoma); S100A8, S100A9 (cáncer de colón, linfomas y sarcomas); PAUF (cáncer de páncreas); proteína amiloide A sérica (cáncer de pulmón) y fragmentos de ácido hialurónico (Termeer et al., 2002; Voelcker et al., 2008). De igual manera, los ácidos

grasos saturados, abundantes en la condición de obesidad y factor de riesgo del cáncer de mama, tales como ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico son capaces de estimular la actividad de TLR-4 e incrementar los niveles de expresión de proteínas con actividad pro-inflamatoria (Lee et al, 2001; Liu et al., 2014). Adicionalmente existen agentes quimioterapéuticos, como el paclitaxel que activan el TLR-4, contribuyendo a la quimioresistencia que presentan las células tumorales a la familia de los taxanos (Rajput et al., 2013; Szajnik et al., 2009).

La identificación de los elementos moleculares responsables de la capacidad migratoria de las células tumorales representa una excelente oportunidad para el uso de antagonistas específicos que inhiban o reduzcan de manera efectiva la capacidad metastásica de las células tumorales, asegurando un mejor pronóstico de vida de los pacientes afectados por cáncer de mama. La elección del blanco farmacológico debe considerar entre otros aspectos la relación beneficio/riesgo.

## CONCLUSIONES

- ❖ La activación del receptor TLR-4 no provoca cambios en la proliferación de las células MDA-MB- 231, sin importar la concentración y el tiempo de exposición.
- ❖ LPS estimula la migración evidenciado a través de ensayos de migración (Cierre de herida y Transwell) de manera dependiente de la concentración usada y del tiempo de exposición. Las condiciones óptimas para observar el efecto fisiológico son incubación por 48 horas con una concentración de 1µg/ml.
- ❖ El tratamiento de células MDA-MB-231 con LPS a una concentración de 1µg/ml regula de manera positiva la expresión del ARN mensajero que codifica para las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ , tal como se ha descrito en macrófagos y otros modelos experimentales de cáncer. Además se puede observar aumento en la expresión y secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  al tratar por 48 horas con 20 y 40 µg/ml de LPS.

- ❖ La estimulación con lipopolisacárido a tiempos cortos regula positivamente los niveles de expresión de factores de transcripción y marcadores moleculares relacionados a la TEM: SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1 y Vimentina.
- ❖ La vía de señalización responsable del aumento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesenquimal involucra al factor NF- $\kappa$ B, tal como se observa en los experimentos en los que se utilizó un inhibidor de esta vía, selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>).
- ❖ El nivel de expresión de ARNm de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio Nav 1.5 se incrementa significativamente al activar el receptor TLR-4 con LPS, este aumento es dependiente del tiempo de tratamiento.
- ❖ La subunidad  $\alpha$  del canal de sodio Na<sub>v</sub> 1.5 en las células MDA-MB-231 es funcional y participa directamente en la exacerbación de la capacidad migratoria en este modelo celular.
- ❖ Se necesitan más estudios para determinar la forma en que se van activando los factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo menenquimal, así como la interacción entre NF- $\kappa$ B y el sitio de unión consenso que codifica para estos, ensayos *in silico* podrían utilizarse para un primer acercamiento. Además es necesario a diseccionar el mecanismo por el cual la activación de TLR-4 aumenta los niveles de expresión y la actividad de Na<sub>v</sub> 1.5.
- ❖ La comprensión de la vía de señalización de TLR-4 puede ser de gran utilidad para establecer biomarcadores y dianas farmacológicas que sirvan como apoyo para disminuir la capacidad metastásica de los tumores de cáncer de mama, sobre todo de tipos tan agresivos como lo es el cáncer triple negativo, cuya única opción terapéutica es la quimioterapia. La elección del desarrollo de fármacos tomando en cuenta estas bases moleculares debe ser minuciosamente evaluado con respecto a las funciones de cada uno de los elementos en el contexto general y no solo en la patología; para que el balance beneficio –riesgo sea aceptable y mejore las perspectivas de vida del paciente con cáncer de mama.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Akira, S., Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4,499–511.
2. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124,783-801.
3. Asgeirsson, K.S, Olafsdottir, K., Jonasson, J.G., Ogmundsdottir, H.M. 1998. The effects of IL-6 on cell adhesion and E-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 10:720–728
4. Bäckhed, F., Hornef, M. Toll-like receptor 4 mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? 2003. *Microbes Infect.* 5, 951–959.
5. Badache, A., Hynes, N.E.. 2001. Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res* 61:383–391.
6. Basith S., Manalavan B., Yoo T. H., Kim S. G, Choi, S. 2012. Roles of Toll-like Receptors in Cancer: A Double-edged Sword for Defense and Offense. *Arch Pharm Res* 35, 1297-1316.
7. Bertucci, F., P. Finetti, D. Birnbaum, and P. Viens. 2010. Gene expression profiling of inflammatory breast cancer. *Cancer* 116: 2783–2793.
8. Chang Z.L. 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.* 59, 791-808.
9. Chatterjee, S. N., Chaudhuri, K. 2012. Inner and Outer Membrane Vesicles of Bacteria: Gram-Negative Bacteria: The cell Membranes. *SpringerBriefs in Microbiology*.IX, 15-34.
10. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. 2009. Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer link to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
11. Condeelis, J., Pollard, J. W. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.
12. Dave, N. Guaita -Esteruelas S, Gutarra S, et al.2011. Functional cooperation between snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition . *J Biol Chem*,286(14):12024-12032.
13. De Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24–37.
14. DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., Coussens, L.M. 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16, 91–102.
15. DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
16. Edge, D.R., Byrd, S.B., Compton, C.C. et al. (eds.). 2010. *AJCC Cancer Staging manual*, 7th ed, 347–376. New York: Springer.
17. Elgert, K.D., Alleva, D.G., Mullins, D. W. 1998. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J. Leukoc. Biol.* 64, 275–290.
18. Fearon, E.R. 1997. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature Of Cancer. *Science*.278, 1043-1050
19. Gallager, H.S., y J.E. Martin. 1970. An orientation to the concept of minimal breast cancer. *Cancer* 28: 1505–1507.
20. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S.,

- Scheller, J. Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis associated cancer. *Cancer Cell* 15,103–113.
21. Grivennikov, S.I., Greten F.R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883-899.
  22. Ham, M., Moon, A. 2013. Inflammatory and microenvironmental factors involved in Breast cancer progression. *Arch. Pharm. Res.* 36:1419–1431.
  23. Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70.
  24. Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. The hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell.* 144, 646-747.
  25. Gonzalez-Reyes S, Marin L, Gonzalez L, Gonzalez LO, del Casar JM, Lamelas ML, Gonzalez-Quintana JM, Vizoso FJ. 2010. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer*, 10:665.
  26. Hankinson, S.E., Willett, W.C., Manson, J.E., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Longcope, C., Speizer, F.E.. 1995. Alcohol, height and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 87; 1297-1302.
  27. Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch, C. Bouchier-Hayes, 2002. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer.*, 101(5):415-22.
  28. Hehlhans, T., Pfeffer, K. 2005. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20.
  29. Hua, D., Liu, M.Y., Cheng, Z.D., Qin, X.J., Zhang, H.M., Chen, Y., Qin, G.J., Liang, G., Li, J.N., Han, X.F., Liu, D.X. 2009. Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Mol Immunol* 46, 2876-2884.
  30. Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C. 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3,276–285.
  31. Ikebe, M., Kitaura, Y., Nakamura, M., Tanaka, H., Yamasaki, A., Nagai, S., Wada, J., Yanai, K., Koga, K., Sato, N., Kubo, M., Tanaka, M., Onishi, H., Katano, M. J. 2009. Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Surg Oncol.* 8,725-731.
  32. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2013. Recuperado el 9 de julio de 2013, de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/mama0.pdf>
  33. Jing, Y.Y, Han, Z.P, Sun, K., Zhang, S.S., Hou J., Liu, Y., Li, R., Gao, L., Zhao, X., Zhao, Q.D., Wu M. C., Wei, L.X. 2012. Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide. *BMC Medicine.* 10:98 doi: 10.1186/1741-7015-10-98
  34. Kalluri, R., Weinberg, R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 June 1; 119(6): 1420–1428.
  35. Karnoub, A.E., Weinberg, R.A. 2006–2007. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26, 75–85.
  36. Kawai, T., Akira, S., 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 338-344.
  37. Kishimoto, T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 23,1–21.
  38. Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K. et al. 2000 Lipopolysaccharide increases cyclo

- oxygenase-2 in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Oncogene* 19,1225-1231.
39. International Agency for Reserch on Cancer. 2013. Latest world cancer statistics. Global cancer burdens rise to 14.1 million cases in 2012. Marked increase in breast Cancer must be addressed. Press Release N° 223.
  40. Langowski, J.L., Kastelein, R.A., Oft, M. 2007. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. *Trends Immunol.* 28, 207–212.
  41. Lee, J., Hahm, E.R., Singh, S.V. 2010 Withaferin A inhibits activationof signal transducer and activator of transcription 3 in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31:1991–1998
  42. Leslie K, Gao SP, Berishaj M, Podsypanina K, Ho H, Ivashkiv L, Bromberg J (2010) Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation. *Breast Cancer Res* 12(5):R80
  43. Lewis, C. E., Pollard, J. W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66,605–612.
  44. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q, Wang Y, Lai YJ, LaBaff AM, Wu TJ, Lin BR, Yang MH, Hortobagyi GN & Hung MC.2012. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.*72, 1290-1300
  45. Liao S-J, Zhou Y-H, Yuan Y, Li D, Wu F-H, et al. 2012. Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes alpha v beta 3-mediated adhesion and invasive migration. *Breast Cancer Research and Treatment* 133: 853–863.
  46. Liotta, L.A., y W.G. Stetler-Stevenson. 1991. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Research* 51: 5054s–5059s
  47. Lin, W.W., Karin, M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183.
  48. Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki ,K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343, 78-85.
  49. Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104,487–501.
  50. Luo, J.L., Tan, W., Ricono, J.M., Korchynskyi, O., Zhang, M., Gonias, S.L.,Cheresh, D.A., Karin, M. 2007. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Masp1. *Nature* 446,690–694.
  51. Manavalan, B., Basith, S., Choi, S. 2011. Similar structures but different roles – an updated perspective on TLR structures. *Front. Physiol.* 2, 41
  52. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
  53. Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami T, Taga M, Yamada K, et al. 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 8, 124.
  54. McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. 2000. ABC of Breast Disease, Clinical review. *BMJ.* 9; 32:624-628.
  55. Mukaida N., Baba T. 2012. Chemokines in tumor development and progression. *Experimental Cell Research* 318, 95-102.
  56. Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi h. et al. 2006. Nuclear factor $\kappa$ B contributes to Hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 66, 7041–7049.
  57. Nieto MA. The snail superfamily of zinc –finger transcription factors. 2002. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol, 3(3):155-166.
58. O'Neill, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol* 18, 3-9.
  59. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Recuperado el 16 de julio 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np31/en/>
  60. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Recuperado el 28 de febrero 2014, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
  61. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2012. El cáncer de mama en las Américas. Recuperado el 19 de agosto de 2013, de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=17926&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=17926&Itemid)
  62. Pandey, S., Agrawal, D. K. 2006. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell Biol.* 84, 333-341.
  63. Pfitzenmaier, J., Vessella, R., Higan, C. S., Noteboom, J. L., Wallace, D. Jr., Corey, E. 2003. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer* 97, 1211–1216.
  64. Posner, M.C., y N. Wolmark. 1992. Non-invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 21: 155–164.
  65. Qian, B.Z., Pollard, J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
  66. Rajput, S., Volk-Draper, L. D., Rans, S. 2013. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer, *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8): 1676–1687.
  67. Rattigan, Y., Hsu, J.M., Mishra, P.J., Glod, J., Banerjee, D. 2010. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp. Cell Res*, 316:3417–3424.
  68. Richie, R.C., Swanson, J.O. 2003. Breast Cancer: A Review of the Literature. *J Insur Med.* 35:85-101
  69. Rose, D.P., Vona – Davis, L. 2014. Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic inflammation, and breast cancer. *Bio. factors.* 40:1-12
  70. Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W. J., Cobbs, C. S. 2003. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J. Urol.* 170, 998–1002
  71. Sasser, A.K., Sullivan, N.J., Studebaker, A.W., Hendey, L.F., Axel, A.E., Hall, B.M. 2007. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J* 21:3763–3770.
  72. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64,9-29.
  73. Smyth, M.J., Dunn, G.P. y Schreiber, R.D. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 90, 1–50.
  74. Srikrishna, G., Freeze, H.H. 2009. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. *Neoplasia*, 11(7):615-28.
  75. Sullivan, N.J., Sasser, A.K., Axel, A.E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T.M., Hall BM. 2009. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28:2940–2947

76. Tamm I, Cardinale I, Krueger J, Murphy JS, May LT, Sehgal PB. 1989. Interleukin 6 decreases cell-cell association and increases motility of ductal breast carcinoma cells. *J Exp Med* 170: 1649-1669
77. Varfolomeev, E. E., Ashkenazi, 2004. A. Tumor necrosis factor: An apoptosis JunKie? *Cell* 116, 491-497.
78. Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K, Bando Y, Kudo E, Shimada M., Sano T. 2010. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *BrJ Cancer* 102, 908-915.
79. Wang, Y, Zhou, B.P. 2011. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin J Cancer.*, 30(9):603-611.
80. Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X. Shen, H., y Zhu, X. 2010. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* 29:92.
81. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., et al. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7):927-939.
82. Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798-809.
83. Zabalegui, N., Zárate, R., Catalán, V., Honorato, B., García, F., Bandrés, E., Hernández, J.L., García-Foncillas, J. 2003. Susceptibilidad genética en cáncer de colon. *Rev. Med. Navarra* 47, 20-23.