



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL
Y DE LOS NIVELES DE MITOFAGIA EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Tesis que para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Miriam Goyri Aguirre

DIRECTOR (A): Paola Maycotte González



Noviembre, 2016.

Agradecimientos.

Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS

Departamento de Biología Celular

1. Resumen.	6
2. Introducción.	7
3. Cáncer de mama.	8
4. Mitocondrias y cáncer.	10
4. 1. Maquinaria de fusión mitocondrial.	11
4.2. Maquinaria de fisión mitocondrial.	13
5. Mitofagia y cáncer.	15
5.1. Mecanismo molecular de regulación de la autofagia.	16
5.2. El papel de mTOR en la regulación de la autofagia y en la dinámica mitocondrial.	19
6. Objetivo General.	20
6.1. Objetivos específicos.	20
7. Hipótesis.	20
8. Material.	21
9. Metodología.	21
9.1. Evaluación de la morfología mitocondrial.	21
9.1.1. Tinción mitocondrial con Mito Tracker red (MTR).	21
9.1.2. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red, Calceína y Hoechst.	25
9.1.3. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red a células tratadas con azida de sodio (NaN ₃).	26
9.1.4. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red en células tratadas con antimicina A.	26
9.2. Efectos de la fragmentación mitocondrial inducida con Antimicina A.	27
9.2.1. Ensayo de clonogenicidad con antimicina A.	27
9.3. Evaluación de la mitofagia.	28
9.3.1. Células competentes DH5α	28
9.3.2. Transformación de células competentes DH5α con sonda fluorescente EGFP-LC3.	29
9.3.3. Stock de glicerol de células DH5α transfectadas con EGFP-LC3.	30
9.3.4. Maxiprep de células DH5α transfectadas con EGFP-LC3.	30
9.3.5. Lisis alcalina.	30

9.3.6. Purificación de ADN plasmídico por precipitación con polietilenglicol...	31
9.3.7. Transfección de líneas celulares de cáncer de mama con sonda fluorescente de GFP-LC3.	33
10. Análisis estadístico.....	35
11. Resultados	35
11.1. Morfología mitocondrial.....	35
11.1.1. MCF10-A.	37
11.1.2. MCF.7.....	37
11.1.3. T-47D.....	37
11.1.4. MDA-MB-231.	38
11.1.5. BT-549.....	38
11.2. Tinción con MTR, calceína y Hoechst.....	40
11.3. Fragmentación mitocondrial.....	41
11.4. Ensayos de clonogenicidad con antimicina A.	43
11.5. Evaluación de la mitofagia.	45
12. Discusión.....	50
13. Conclusiones.....	54
14. Referencias.....	55
15. Anexos.....	58
15.1. Anexo 1. Soluciones de trabajo.....	58
15.1.1. Cultivo celular:	58
15.1.2. Tinción con MTR.....	59
15.1.3. Stock de Antimicina.	60
15.1.4. Ensayos de Clonogenicidad.	61
15.1.5. Células competentes.	61
15.1.6. Transformación de células competentes.	62
15.1.7. Mini prep.....	62
15.1.8. Maxi prep.....	63
15.2. Anexo 2. Glosario de abreviaturas.....	64
15.3. Anexo 3. Líneas celulares.....	66

15.3.1. MCF-7.....	66
15.3.2. MDA-MB-231.	66
15.3.3. T-47D.....	66
15.3.4. BT-549.	66
15.3.5. MCF-10A.	66

1. Resumen.

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia dentro de la población femenina en países desarrollados y en América Latina. Actualmente es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial y en México. Si bien, los factores de riesgo para esta enfermedad y la población vulnerable son bien conocidos, la falta de un diagnóstico temprano y la agresividad de las estrategias terapéuticas, aunado al incremento de la población y los cambios en el estilo de vida de las mujeres, dificultan la reducción de la mortalidad por cáncer. Por lo tanto, es importante trabajar en nuevos métodos de detección temprana del cáncer de mama. Es decir, el diagnóstico temprano de la enfermedad, antes de que se haya comprometido la función de uno o más sistemas vitales, lo cual será esencial para el diseño de un plan de tratamiento.

Las células cancerosas presentan diversas alteraciones que las llevan a una proliferación descontrolada y a una evasión de la muerte celular. Una de estas alteraciones involucra cambios en el metabolismo celular y en específico, en el metabolismo mitocondrial. Por lo anterior, en este trabajo realizamos estudios de morfología mitocondrial y de mitofagia en líneas celulares de cáncer de mama con el fin de explorar si existe relación con la agresividad tumoral y analizar su potencial como posible marcador pronóstico o de blanco de tratamiento para esta enfermedad. De manera importante, encontramos bajos niveles de mitofagia en general en las líneas celulares de cáncer de mama y una mayor fragmentación mitocondrial en las células de cáncer de mama del tipo triple negativo, el cual no cuenta con una terapia dirigida. Mis resultados sugieren que la fragmentación mitocondrial podría utilizarse como un marcador de malignidad en este tipo de cáncer y que los cambios asociados al metabolismo celular podrían utilizarse como blanco terapéutico en la enfermedad.

2. Introducción.

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia dentro de la población femenina en países desarrollados y esta incidencia es aún mayor en países de América latina. (Amadou et.al, 2014) Actualmente, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial y en México. Desde 2006 se considera la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años en nuestro país y aunado a lo anterior, las mujeres mexicanas en promedio desarrollan cáncer de mama una década antes en comparación con la población oriental. (Hidalgo et.al, 2009)

Si bien las causas del cáncer de mama no están completamente descifradas, diversos estudios en los últimos años han demostrado la existencia de factores tanto genéticos como epigenéticos que juegan un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Entre ellos podemos encontrar la falta de actividad física, problemas de sobrepeso u obesidad, consumo excesivo de alcohol y tabaquismo. (Amadou et.al, 2014) Por otra parte, la producción de estrógenos figura como uno de los principales factores de riesgo en mujeres. Los estrógenos estimulan la proliferación de células epiteliales del tejido mamario, por lo que el riesgo de padecer cáncer de mama se ve aumentado en mujeres con menarca temprana y/o menopausia tardía así como en mujeres nulíparas. Sin embargo, el principal factor de riesgo a considerar es la predisposición genética y la historia familiar puesto que las mujeres con un familiar de primer orden con cáncer de mama presentan un doble de riesgo de desarrollar la enfermedad. A la fecha se han identificado diversas mutaciones en la línea germinal que predisponen al desarrollo del cáncer de mama: BRCA1, BRCA2, P53, PTEN, ATM, NBS1, RAD50, BRIP1, PALB2 y CHECK2. (Sastre Serra, 2012) De manera importante, únicamente el 20% de todos los casos de cáncer de mama se encuentran asociados a una predisposición genética.

Pese a que los factores de riesgo para esta enfermedad y la población vulnerable son bien conocidos, la falta de un diagnóstico temprano y la agresividad de las estrategias terapéuticas, aunado al incremento de la población y los cambios en el

estilo de vida de las mujeres, dificultan la reducción de la mortalidad por cáncer. En México, se estima que el promedio de incidencia para esta enfermedad pasó de ser 5.5 en 1980 a 7.9 en 2010 y se estima que en América Latina existe un retraso en el diagnóstico de la enfermedad de aproximadamente 6 meses entre la primera consulta con un médico hasta que se determina el diagnóstico. En consecuencia, en países como México se calcula que entre el 50 y 60 % de todos los cánceres diagnosticados se encuentran en etapas avanzadas y en promedio general el tiempo que transcurre desde la aparición de los síntomas hasta el tratamiento es aproximadamente de 6 a 8 meses. (Amadou et.al, 2014) Por lo tanto, es importante trabajar en nuevos métodos de detección temprana del cáncer de mama, es decir, antes de que se haya comprometido la función de uno o más sistemas vitales pues el diagnóstico temprano de la enfermedad es esencial para el diseño de un plan de tratamiento.

En este trabajo realizamos estudios de morfología mitocondrial y de mitofagia en líneas celulares de cáncer de mama con el fin de explorar si existe relación con la agresividad tumoral y analizar su potencial como posible marcador pronóstico o de blanco de tratamiento.

3. Cáncer de mama.

La Sociedad Española de Oncología Médica define el cáncer de mama como la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Previo a la conversión de células normales hacia células cancerosas ocurre la aparición de múltiples mutaciones que originan inestabilidad genética. Por tanto, en las células cancerosas se observan comúnmente una variedad de aberraciones cromosómicas como la ploidía anormal y la pérdida de fragmentos de cromosomas (Tume-Farafán, 2014) conllevando a una serie de alteraciones en la fisiología celular hasta la transformación maligna de dichas células. Existen seis alteraciones esenciales que ocurren en el cáncer y que son: la autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, metástasis e invasión del tejido, evasión de la muerte celular programada o apoptosis y adicionalmente se

añade la dependencia en la glucólisis para la generación de ATP conocida como efecto Warburg, del que se hablará más adelante. (Gogvadze et.al, 2008)

En base a la presencia o ausencia de la expresión del receptor de estrógeno (RE), el cáncer de mama se divide en dos grupos principales: los RE+ y los tumores RE- subdivididos en HER2 y tipo triple negativo. (Zepeda et.al, 2008) Los subtipos luminales o RE+ conforman el carcinoma mamario más frecuente, se relacionan con una alta expresión de RE o genes relacionados a su activación y están asociados a un buen pronóstico con terapia dirigida contra este receptor. El subtipo HER2 se relaciona con la sobreexpresión del receptor HER2 así como con la ausencia de receptores hormonales y mutación en p53. Aunque este último cuenta con terapia dirigida, tiene un peor pronóstico que los subtipos RE+. Finalmente, el subtipo triple negativo se distingue por la ausencia en la expresión de RE así como de HER2. Este tipo de cáncer muestra una elevada expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17, así como de genes relacionados con la proliferación celular a la vez que se asocia con mutaciones en p53 y sobre-expresión de EGFR, c-Kit y mutaciones en BRCA1 y BRCA2. Aunque se asocia con un potencial metastásico similar a otros tipos de cáncer de mama es el que cuenta con una mayor frecuencia de recurrencia y menor tiempo de supervivencia. (Gerson et.al, 2007)

Como se mencionó anteriormente, se desconoce el origen del cáncer de mama; sin embargo, se considera como un padecimiento multifactorial que muy probablemente involucre cambios en la bioenergética celular. Las mitocondrias son los orgánulos que proporcionan la mayor parte de la energía en las células y son la principal fuente intracelular y blanco de las especies reactivas de oxígeno (EROS). Además, contribuyen a la homeostasis del calcio intracelular, el crecimiento y la división celular, el metabolismo energético y la apoptosis. Por lo tanto, las alteraciones mitocondriales se vuelven clave en el estudio del cáncer de mama. (Zhao et. al, 2013)

4. Mitocondrias y cáncer.

De manera clásica se describe a las mitocondrias como orgánulos formados por dos membranas. Una membrana externa que presenta porinas, las cuales permiten el paso de una gran cantidad de iones y moléculas además de una membrana interna, impermeable y con transportadores específicos. Esta última se pliega para dar lugar a la formación de las crestas mitocondriales. En esta arquitectura de la célula se pueden distinguir dos espacios, el intermembranal y la matriz mitocondrial. Es específicamente en las crestas mitocondriales en donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, proceso en el que participan los complejos respiratorios I, II, III y IV encargados de transportar los electrones desde el NADH + H⁺ o el succinato hacia el oxígeno, con lo cual se genera un gradiente de potencial electroquímico de protones. En este proceso también interviene la F₁F₀-ATP sintasa, que acopla el flujo de protones con la síntesis de ATP y finalmente intervienen diferentes sistemas de transporte que permiten el flujo de piruvato, citrato, α-cetoglutarato, ATP, ADP y fosfato, entre otras moléculas. (Flores-Herrera et.al, 2014)

Si bien lo anterior es correcto, a partir del siglo XX mediante los avances en la microscopía de campo claro y con la disponibilidad de mejores técnicas de cultivo celular, se ha redescubierto a la mitocondria como un orgánulo altamente dinámico que constantemente se encuentra fusionándose con otras mitocondrias formando una red o retículo mitocondrial que a su vez tiene la capacidad de fragmentarse. (Liesa et.al, 2009) Este proceso de fusión y fisión mitocondrial es esencial para la biogénesis y actividad de las mitocondrias y es sabido que frente a una situación de estrés, el remodelado de la red mitocondrial puede acelerarse mediante un proceso autofágico específico llamado mitofagia. (Zorsano et.al, 2010)

La dinámica mitocondrial se altera en respuesta a cambios del estado fisiológico de la célula y si bien, la fisión del retículo mitocondrial es un proceso que ocurre de manera habitual en todas las células, también se asocia a condiciones de estrés metabólico, autofagia y apoptosis. Por su parte, la fusión se asocia a distintas

ventajas celulares como la de protección al ADN mitocondrial y con ello la disminución en las mutaciones del mismo y menor producción de EROS. (Flores-Herrera et.al, 2014)

4. 1. Maquinaria de fusión mitocondrial.

Las principales proteínas implicadas en la fusión mitocondrial son las GTPasas de la membrana mitocondrial externa llamadas mitofusinas (Mfn1 y Mfn2), así como la GTPasa de atrofia óptica (OPA1) de la membrana mitocondrial interna (Fig. 1). (Wai & Langer, 2015)

La Mfn1 es una proteína con actividad de GTPasa que se encuentra en la membrana mitocondrial externa y muestra dos dominios transmembranales localizados hacia el extremo C-terminal de la proteína cerca del dominio héptada repetitiva (HR2), el cual media el primer paso de fusión mitocondrial. Éste consiste en la interacción e inmovilización de dos mitocondrias adyacentes a través de la formación de un dímero antiparalelo entre dos moléculas de Mfn. Estos complejos diméricos pueden ser homotípicos o heterotípicos entre Mfn 1 y 2. La tasa de fusión mitocondrial depende de los dímeros homo o heterotípicos y la Mfn1 muestra una mayor actividad GTPasa en comparación con Mfn2. Por su parte Mfn2, que también es una proteína integral de la membrana mitocondrial externa, tiene los extremos N-terminal y C-terminal expuestos en el citosol y un dominio héptada repetitiva (HR2) localizado en la región C-terminal de la proteína y la actividad GTPasa localizada en la región N-terminal es crucial para su actividad de fusión mitocondrial. Entre las funciones de Mfn2 se ha descrito que es esencial para el desarrollo embrionario y también juega un papel importante en la interacción entre el retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias. (Zorsano et.al, 2012)

Trabajos recientes han indicado que tanto Mfn1 como Mfn2 se regulan por el sistema del proteasoma, de manera que los inhibidores del proteasoma conducen a un aumento en la expresión de estas proteínas. Aunque esto sólo se ha demostrado para proteínas ortólogas en levaduras, tanto en *Drosophila* como en

mamíferos se han identificado a Mfn1 y Mfn2 como sustratos de la ubiquitina ligasa E3, Parkin. Parkin a su vez promueve la mitofagia a través de la ubiquitinación de proteínas mitocondriales, de modo que la ubiquitinación de Mfn1 y Mfn2 por Parkin pueden conducir a las mitocondrias hacia su degradación por mitofagia, mediante la degradación selectiva de Mfn1 y 2, seguido de la inhibición de la fusión mitocondrial y la segregación de las mitocondrias dañadas. (Gregg et al, 2010)

Finalmente, la proteína OPA1 también esencial para la fusión mitocondrial se localiza en la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembranal y coordina la fusión de las crestas mitocondriales para lo cual hidroliza grandes cantidades de GTP y ATP en comparación con las Mfn. (Van der Bliek et.al, 2013) Además de ello, se conoce la existencia de distintas isoformas de OPA1, mismas que se encuentran reguladas por la actividad de proteasas mitocondriales que reconocen a OPA1 en sitios de corte específicos en respuesta a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la pérdida de ADN mitocondrial o la inducción de la apoptosis. Debido a su procesamiento proteolítico y al empalme alternativo, OPA1 da lugar a formas largas denominadas L-OPA1 (a y b) y formas cortas llamadas S-OPA1 (c, d y e). Recientemente, se ha descrito que la actividad pro-fusión de OPA1 es crucial en el proceso de control de calidad de las mitocondrias, proceso que implica una fusión transitoria entre mitocondrias, de modo que las mitocondrias con baja actividad de OPA1 tendrán una menor capacidad de fusión y por lo tanto serán sometidas a degradación por autofagia. Por otra parte, las mitocondrias con excesiva actividad de OPA1, pueden proteger de forma transitoria a las células ante algunos tipos de estrés, como los provocados por la excesiva producción de EROS y el consecuente daño al genoma mitocondrial mediante la inducción a senescencia. Por último, al igual que las mitofusinas, OPA1 también parece estar regulada negativamente por la ubiquitina ligasa Parkin y la proteína cinasa de serina-treonina Pink1, promoviendo así la fragmentación de las mitocondrias. Lo anterior sugiere que el control estricto de la actividad pro-fusión de las proteínas implicadas en este proceso es crucial

para el mantenimiento de la red mitocondrial y un estado saludable de las células.(Zorsano et.al, 2012)

4.2. Maquinaria de fisión mitocondrial.

Como se había mencionado, el proceso de fisión mitocondrial es necesario para la degradación de mitocondrias viejas o dañadas de la célula a través de un proceso específico de autofagia llamado mitofagia. Además de ello, es común que la tasa de fisión mitocondrial aumente notablemente si las células se encuentran en proceso de apoptosis. En este caso, las alteraciones en la maquinaria de fisión pueden causar una mayor generación de EROS, alteraciones en la producción de ATP y una población heterogénea de mitocondrias con una distribución no uniforme del ADNmt y por tanto una mayor susceptibilidad de las células a inducir apoptosis. (Gogvadze et,al 2008)

Las proteínas encargadas de mediar la fisión mitocondrial son la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1) y la proteína de fisión1 (Fis1) (Fig. 1). Drp1 comparte características estructurales con la familia de las dinaminas como la presencia de un dominio con actividad GTPasa, un dominio efector de GTPasa (GED) y un dominio central. DRP1 se encuentra en el citosol en puntos específicos de la membrana externa mitocondrial actuando como mecano enzima que produce cortes por constricción, facilitando la ruptura de la doble membrana mitocondrial mediante su ensamble en complejos multiméricos en forma de anillo en los sitios de fisión mitocondrial. Estos anillos se constriñen por la hidrólisis del GTP, lo que promueve la división mitocondrial. DRP1 carece de una secuencia de destino mitocondrial por lo que se ha sugerido mediante estudios con la proteína ortóloga Dnm1 en levadura, que DRP1 podría ser reclutada por Fis1. Sin embargo, se han identificado otros posibles receptores y factores de reclutamiento de DRP1 como MFF, MiD49 y MiD51 que ejercen funciones similares, facilitando el auto-ensamblaje de DRP1 en la membrana mitocondrial externa en estructuras multiméricas. (Van der Blik et.al, 2013)

En mamíferos, Fis1 es una pequeña proteína de 17,2 kDa que se expresa y detecta en toda la red mitocondrial. Fis1 está anclada a la membrana mitocondrial externa a través de su extremo C-terminal, que contiene una hélice alfa, un dominio transmembrana y una cola C-terminal expuesta al espacio intermembranal. La parte N-terminal de la proteína contiene cuatro regiones distintas con cinco hélices alfa. La primera hélice alfa parece ser crítica para la oligomerización y su actividad de fisión, mientras que las siguientes cuatro hélices constituyen dos repeticiones de tipo peptídico tetramérico (TPR1 y TPR2) que si bien no son necesarias para la oligomerización de Fis1, sí están implicadas en las interacciones proteína-proteína necesarias para la fisión. (Zorsano et.al, 2012) Finalmente, en mamíferos, se ha observado que Drp1 también se recluta en células con expresión silenciada de Fis1, lo que sugiere la participación de otras proteínas en la fisión mitocondrial como las mencionadas anteriormente. Además de ello, se sugiere una estrecha relación entre los niveles de expresión de Fis1 y la liberación del citocromo C por la mitocondria, asociado al proceso de apoptosis. (Lee Y et al, 2004)

El factor de fisión mitocondrial (MFF) se encuentra anclado a la membrana mitocondrial externa y se ha propuesto que tiene un papel en la fisión mitocondrial independiente de Fis1. MFF se localiza en puntos específicos de las mitocondrias a diferencia de Fis1 y su sobreexpresión provoca la translocación de Drp1 del citosol a las mitocondrias promoviendo la fisión mitocondrial.

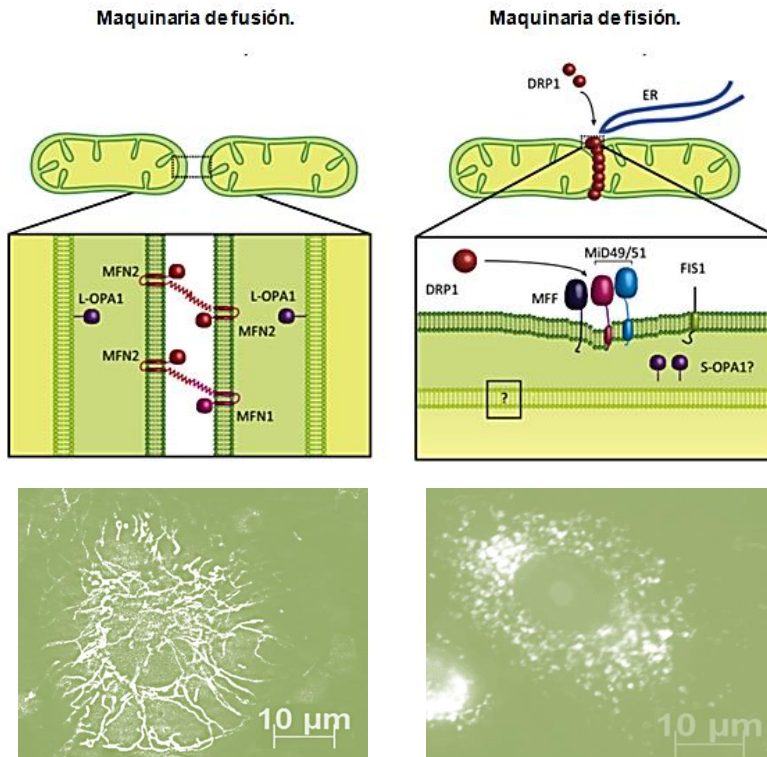


Fig 1. Maquinaria de fusión y fisión mitocondrial con la intervención de las mitofusinas Mfn 1 y 2 así como L y S-OPA1 en la fusión y Drp1, Fis1, MFF y MiD49/51 en la fisión. Modificado de Wai & Langer, 2015.

En la parte inferior se ejemplifica con una célula MCF10A la apariencia de una red mitocondrial elongada y a la derecha una célula T-47D tratada con antimicina A para mostrar la fisión mitocondrial. Ambas células teñidas con MTR.

Como se mencionó anteriormente, en las células cancerosas, las mitocondrias presentan diversas alteraciones entre las que se destaca la sustitución de la fosforilación oxidativa por la glucólisis, aún en condiciones oxigénicas. A esto se le conoce como efecto Warburg, el cual fue descubierto en 1926 por Otto Warburg y hace alusión al hecho de que las células cancerosas producen la mayor parte de su ATP a través de la glucólisis. Se considera que este fenómeno es una propiedad universal de las células malignas y que se relaciona con el cambio de muchas de las funciones mitocondriales en células cancerosas, como la producción de EROS en exceso y la desregulación en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , ambas clave en la regulación de las vías de muerte celular. (Gogvadze et.al, 2008)

5. Mitofagia y cáncer.

El mecanismo de eliminación de mitocondrias dañadas o viejas es la mitofagia, un proceso específico de autofagia de mitocondrias omnipresente en las células eucariotas. Durante la autofagia se lleva a cabo el proceso de degradación

lisosomal de componentes de la misma célula, en este caso mitocondrias. Para ello, porciones del citoplasma se envuelven en una estructura de doble membrana llamada autofagosoma que transporta su contenido al lisosoma para su degradación. La autofagia ocurre a niveles basales como mecanismo de renovación del citoplasma, eliminación de orgánulos dañados y agregados proteicos, pero también suele incrementarse en respuesta a condiciones fisiológicas como la privación de nutrientes, estrés por hipoxia, infecciones, etc. (Fang Tu et.al, 2011)

En el cáncer, la autofagia tiene un efecto dual. Por una parte, se considera un proceso de supresión tumoral en etapas tempranas de cáncer debido a que actúa limitando la inflamación, el daño tisular y la inestabilidad genómica. Por otro lado, en etapas posteriores del desarrollo del cáncer y al ser un mecanismo de supervivencia celular, la autofagia contribuye a la progresión del mismo. (Maycotte et.al, 2014) Debido a lo anterior, se ha propuesto a la inhibición de la autofagia como posible blanco terapéutico contra el cáncer, especialmente para células cancerosas con altos niveles de autofagia, mismas que dependen de ésta para su supervivencia, especialmente bajo estrés metabólico. (Fang Tu et, al 2011 & Maycotte et, al 2014)

5.1. Mecanismo molecular de regulación de la autofagia.

La autofagia ocurre de manera basal en todas las células del cuerpo como mecanismo de conservación del citoplasma para remover proteínas u organelos dañados. Este proceso también puede inducirse a niveles más elevados en condiciones tales como estrés celular o la carencia de nutrientes. El proceso autofágico involucra la formación de autofagosomas, un proceso complejo y altamente regulado que requiere más de 30 proteínas relacionadas a la autofagia (ATG, por sus siglas en inglés) que han sido identificadas a partir de sus ortólogos en levaduras. Estas proteínas ATG forman complejos funcionales que median etapas individuales de autofagia: inicio, inducción, nucleación, elongación de

membrana, reconocimiento de carga y la fusión de autofagosomas con lisosomas. (Maycotte et.al, 2014)

En la primera etapa, se requiere de la activación del complejo de inicio de autofagia o fosfatidilinositol-3.cinasa clase III (PI3K). Dicha activación ocurre mediante la liberación de Beclin-1 (ATG6 en levadura) del complejo Bcl-2-Beclin-1. Luego de su liberación, Beclin-1 es reclutada junto a una serie de moléculas adicionales, una cinasa de serina/treonina miristoilada p150, la proteína vacuolar de clasificación 34 (vps34), ATG14L y la proteína asociada a la resistencia a la radiación ultravioleta (UVRAG) para formar el complejo activo PI3K clase III. La activación de la PI3K clase III permite la movilización de este complejo de inducción al sitio de formación del autofagosoma. (Itakura et al, 2008) El siguiente paso es la nucleación, la cual involucra la movilización del complejo de iniciación al sitio de formación de la membrana limitante. Además de ello en este paso es indispensable la fosforilación del lípido fosfatidilinositol por el complejo PI3K para el reclutamiento de moléculas ATG adicionales para la elongación de la membrana del fagóforo. (Cereceda, 2012)

La elongación de la membrana limitante requiere de dos cascadas de conjugación paralelas, la de la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (LC3-I, ATG8) y las cascadas de conjugación de ATG5 y ATG12. Estos eventos de conjugación son similares al sistema de conjugación de ubiquitina involucrando ligasas para la activación y conjugación enzimática de sustratos con la diferencia de que la conjugación de ATG5-12 es constitutiva e irreversible y este proceso ocurre en la superficie de la membrana limitante. En este paso, la ligasa tipo ubiquitina ATG7 es requerida para la conjugación de ATG5 y ATG12 y de este modo formar el complejo ATG5-12 que posteriormente interactúa con la proteína ATG16. Esta última, une el complejo ATG5-12-16 en un tetrámero por auto-oligomerización y lo une al fagóforo. Este complejo es esencial para la elongación de la membrana autofagosomal pero se disocia del autofagosoma cuando éste se ha formado por completo. Independientemente, la división y activación de LC3-I citosólica ocurre por el corte proteolítico de un residuo de cisteína por la proteasa

ATG4. La LC3-I activada se conjuga a un residuo de fosfatidiletanolamina que luego formará LC3-II asociada a la membrana a través de una reacción que requiere ATG7 además de la actividad tipo E2 de ATG3. Además, LC3 controla el tamaño del autofagosoma y cuando la formación del autofagosoma está completa, LC3 unido a la membrana externa sufre un corte proteolítico, el residuo de fosfatidiletanolamina es cortado y LC3 es liberado nuevamente al citosol. (Mizushima et al, 2007)

Los mecanismos moleculares de las últimas etapas que median el sellado de la membrana limitante para formar autofagosomas y los eventos de fusión que forman autofagolisosomas son todavía poco claros. Sin embargo, se sugiere que las proteínas ATG, proteínas SNARE y proteínas Rab, así como elementos del citoesqueleto pueden estar involucrados en estos eventos de fusión. (Criollo, 2009)

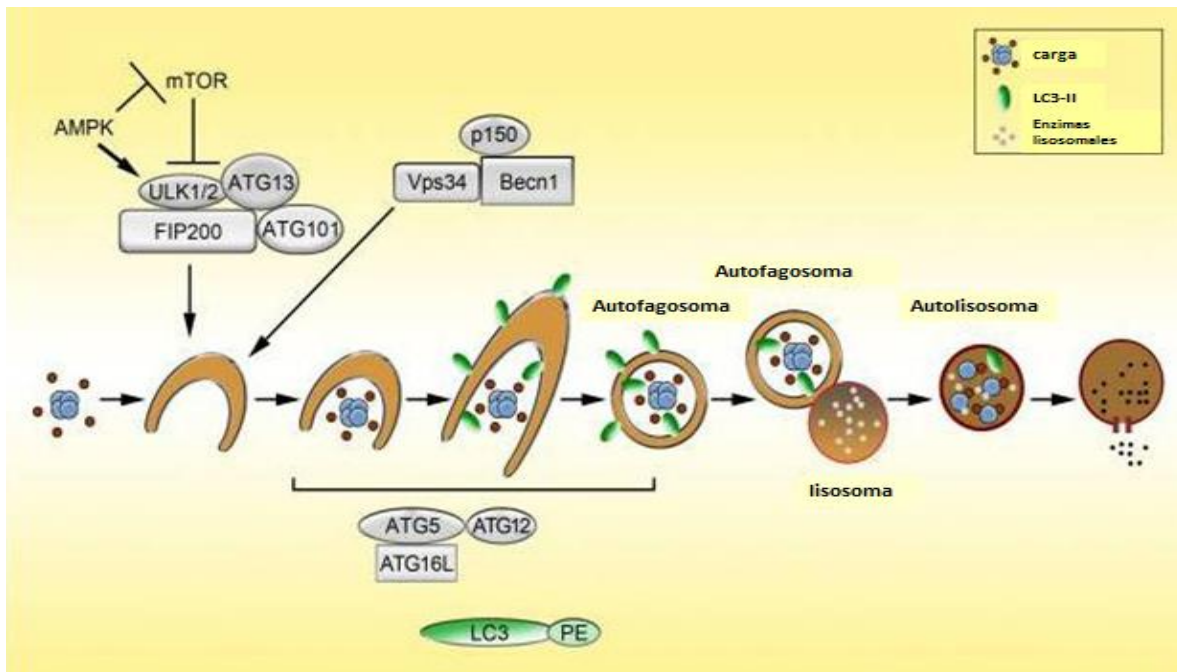


Fig 2. Mecanismo molecular de la regulación de la autofagia con mTORC1 como regulador negativo y AMPK como inductor de la autofagia. Modificado de Kimmelman (2010)

5.2. El papel de mTOR en la regulación de la autofagia y en la dinámica mitocondrial.

Como se mencionó antes, la autofagia ocurre a nivel basal en la célula. Sin embargo, ciertos tipos de estrés conllevan a una significativa inducción de este proceso y la privación de nutrientes es el principal estímulo en la inducción de la autofagia. La proteína cinasa mTOR es uno de los sensores que detecta la disminución de nutrientes, así como los factores de crecimiento (fuentes de carbono, nitrógeno y ATP) permitiéndole regular negativamente el proceso de autofagia. mTOR es una proteína cinasa de serina/treonina que forma parte de dos complejos proteicos, los cuales están formados por TORC1 y TORC2. El complejo TORC1 está constituido por mTOR, MLST8 y Raptor donde mTOR tiene un papel predominante en la regulación autofágica debido a que su actividad de cinasa es sensible a la disminución de nutrientes, nitrógeno, ATP, la actividad de AMPK o al tratamiento con rapamicina (Fig. 2). Este último es un compuesto sintetizado por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* y es comúnmente usada como control positivo en la inducción de autofagia debido a que inhibe fuertemente la actividad de mTOR. Por otra parte, el complejo TORC2 está formado por mTOR, mLST8, Rictor y Protor y a diferencia del complejo TORC1 este complejo no se altera con el tratamiento con rapamicina. (Criollo, 2009)

Por otra parte, se sabe que mTOR influye fuertemente en el control del reciclaje de aminoácidos y recientemente se ha propuesto que mTOR desempeña un papel regulador en la dinámica mitocondrial de modo que tras la inhibición genética o farmacológica de mTOR, la fusión mitocondrial se ve aumentada en condiciones ricas en nutrientes. Sin embargo, hasta el momento no se conocen datos que identifiquen a alguna de las proteínas de fusión o fisión mitocondrial como sustratos de mTOR. (Rambold, et.al 2011)

6. Objetivo General.

Realizar estudios de morfología mitocondrial y de mitofagia en líneas celulares de cáncer de mama con el fin de explorar si existe relación con la agresividad tumoral y analizar su potencial como posible marcador pronóstico o de blanco de tratamiento.

6.1. Objetivos específicos.

- Evaluar la morfología mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama por medio de microscopía de epifluorescencia y compararla con líneas celulares no tumorigénicas.
- Evaluar los niveles de autofagia y su relación con la morfología mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama.

7. Hipótesis.

La morfología mitocondrial se verá alterada en líneas celulares de cáncer de mama con respecto a líneas celulares no tumorigénicas debido a cambios en la función mitocondrial. Se observarán cambios en la red mitocondrial donde la fisión mitocondrial correlacionará con el grado de malignidad. Se encontrará una relación inversa entre los niveles de mitofagia y el grado de fragmentación mitocondrial.

8. Material.

Para el presente trabajo se usaron líneas celulares de distintos subtipos de cáncer de mama, mismas que se compararon contra la línea celular no tumorigénica MCF10A.

Línea celular	Tipo de cáncer	Clasificación	Número de cromosomas	RE	RP	RA
BT-549	CDIP	triple negativo	55	(-)	(-)	(-)
MDA-MB-231	CDI	triple negativo	64	(-)	(-)	(-)
MCF-7	CDI	RE+	88	(+)	(+)	(-)
T- 47D	CDI	RE+	66	(+)	(+)	(-)
MCF-10A	Enfermedad fibroquística no tumoral.		46	(-)	(-)	(-)

AC: adenocarcinoma, CDIP: carcinoma ductal invasivo papilar; CDI: carcinoma ductal invasivo; RE: receptor de estrógenos; RP: receptor de progesterona; RA: receptor de andrógenos.

Tabla 1. Descripción de líneas celulares de cáncer de mama. Modificado de Lacroix y Lecelercq, 2004.

Todas las líneas celulares se cultivaron y mantuvieron en frascos T25 con medio de cultivo, como se muestra en la Tabla 2.

Las células se trabajaron en cuarto de cultivo y se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

9. Metodología.

9.1. Evaluación de la morfología mitocondrial.

9.1.1. Tinción mitocondrial con Mito Tracker red (MTR).

El MitoTracker es un colorante fluorescente comercialmente disponible (Invitrogen/ Molecular Probes) que al igual que otros colorantes como la rodamina 123 y el éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) requiere que las mitocondrias mantengan su potencial de membrana negativo activo. El MitoTracker es químicamente reactivo y une grupos tiol en la mitocondria por lo que el tinte se

llega a unir de forma permanente a la mitocondria y por lo tanto permanece después de que la célula muere o es fijada. (Chazotte, 2011)

En el presente trabajo se realizaron tinciones mitocondriales en todas las líneas celulares estudiadas haciendo uso de Mito Tracker red (MTR) a concentración 100nM. Para ello se usaron alícuotas de trabajo de MTR 10 μ M, es decir 10 μ l de MTR stock original (1 μ M) por 100 μ l de medio de cultivo celular sin suero ya que MTR es sensible a la oxidación por las oxidasas presentes en el suero. Es recomendable usar una alícuota de trabajo nueva para cada experimento debido a que después de una semana en refrigeración, las alícuotas de trabajo pierden su afinidad por las mitocondrias.

Nota: Durante el proceso de estandarización del protocolo se probaron diferentes concentraciones de MTR para hacer la tinción, que van desde 500 nM hasta 50 nM, con ello se comprobó que con 500 nM las tinciones vistas por microscopía de epifluorescencia presentan gran nitidez. Por otro lado, al utilizar un sistema APOTOME de iluminación estructurada en este mismo microscopio la anterior es una concentración demasiado alta por lo que se recomienda hacer uso de concentraciones entre 250 y 100 nM para una buena nitidez. En general, la concentración mínima que funcionó al realizar las tinciones fue 100nm.

Las tinciones fueron realizadas en células crecidas en cubreobjetos convencionales de 20x20mm. Previamente, éstos se limpiaron con etanol al 70% y se esterilizaron en autoclave antes de ser usados. Una vez estériles, se colocaban en platos para cultivo celular de 35 mm donde se sembraban las células con 48hrs de antelación al experimento y se mantenían con 3ml de medio con suero en incubación a 37°C y 5% de CO₂

La cantidad de células sembradas para teñir depende de la línea celular que se esté usando, pues se busca una confluencia aproximada del 80% donde sea fácil visualizar gran cantidad de células en el microscopio y que éstas no se encuentren demasiado cerca para que sea posible delimitar su área.

Línea celular	Cantidad de células cultivadas	Medio de cultivo
BT-549	70 000	RPMI + Ins 0.2U/mL+ P/E 1X + SFB 10%
MCF-7	70 000	RPMI + SFB 10%
MDA-MB-231	90 000	DMEM/F12 + SFB 10%
T-47D	100 000	RPMI + Ins 0.2U/mL + SFB 10%
MCF-10A	50 000	F12+ SC 5%+EGF 20ng/ml+ HC 0.5mg/ml+ TC 100ng/ml +Ins 10µg/ml +P/E 1X

SFB; Suero Fetal Bovino, SC: Suero de caballo, EGF: Factor de crecimiento epidérmico, HC: Hidrocortisona, TC: Toxina colérica, Ins: Insulina, P/E: Penicilina/Estreptomina.

*NOTA: La línea celular MCF-10A se tripsiniza con tripsina EDTA 0.5X, a diferencia del resto que se trabajan con tripsina EDTA 1X. Las especificaciones para la preparación de cada medio se detallan en la hoja de anexos.

Tabla 2. Líneas celulares y sus indicaciones en el cultivo.

Después de 48hrs en crecimiento, las células se tiñeron con MTR, retirando el medio en que se han cultivado y se ajusta el medio a 1ml de medio nuevo con MTR 10µM (100nm final). Para ello, en un micro tubo se diluyen 10µl de la alícuota de trabajo de MTR 10µM en 1ml de medio con suero. Una vez añadido el MTR, las células se incuban durante 45 minutos más bajo las mismas condiciones.

Después de la incubación, el MTR es retirado y se realizan dos lavados. El primero se realiza con medio sin suero y el segundo se hace usando medio con suero. Con este segundo lavado, las células se incuban durante 5 minutos más.

Después del lavado, las células están listas para fijarse con formaldehído, con el que se incubarán durante 15 minutos. Para preparar el fijador, se usa formaldehído al 37%, se diluye 1:10 con PBS 1X para alcanzar una concentración final de formaldehído 3.7% y se ajusta el pH a 7.4

Para usarse en las células, el fijador se diluye en medio fresco son suero. Para cajas de 35mm se usa un volumen total de 1.5ml de los cuales 1200µl corresponden a medio y 300µl al stock de formaldehído 3.7%. Es recomendable preparar la solución de medio y formaldehido en un tubo aparte y volver a medir y ajustar el pH antes de verterlo a las células.

Transcurridos los 15 minutos de incubación con el fijador, las células se lavan dos veces con PBS 1X. Para la mayoría de los experimentos, después del segundo lavado con PBS, las células se tiñeron con Hoechst. Para ello es necesario preparar una alícuota de trabajo de Hoechst de la siguiente forma: 250µl de Hoechst (100 µg/mL stock) más 100µl de PBS 10X más 650µl de agua destilada, esta alícuota (1µg/ml final) se vierte en las células y se incuba a temperatura ambiente aproximadamente de 1 a 3 minutos. La alícuota de trabajo de Hoechst puede re- usarse hasta 5 veces antes de perder su efectividad, para ello se mantiene en refrigeración y protegida de la luz a 4°C.

Para el montaje de las células, se recomienda hacer un lavado ligero de los cubreobjetos ya teñidos con agua destilada y eliminar el excedente de agua colocando uno de los bordes del cubreobjetos sobre una toalla absorbente, una vez realizado lo anterior, los cubreobjetos se montan sobre una gota de 15µl de DMSO y se sellan alrededor del portaobjetos con barniz.

Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia PALM ZEISS equipado con un sistema de iluminación estructurada APOTOME con software ZEN en objetivo de 63x con aceite de inmersión. Se recomienda visualizar las células el mismo día en que fue realizada la tinción y una vez fotografiadas, los portaobjetos se guardan protegidos de la luz en refrigeración.

Para los experimentos de morfología mitocondrial, se tomaron de 5 a 10 fotos por experimento (dependiendo del número de células por campo) y los campos para cada fotografía fueron elegidos al azar para posteriormente clasificar cada célula en función su morfología celular en cualquiera de las siguientes categorías: sólo mitocondrias tubulares, más mitocondrias tubulares que fragmentadas, más mitocondrias fragmentadas que tubulares y sólo mitocondrias fragmentadas. Los conteos fueron promediados y graficados en porcentaje.

Como control de fragmentación para estos experimentos se usaron las mismas líneas celulares bajo tratamiento con antimicina A.

9.1.2. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red, Calceína y Hoechst.

Se trabajó con líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D que fueron cultivadas a densidad óptima (tabla 2) con 48 horas de antelación al experimento.

Como primer paso se realizó tinción mitocondrial con sonda fluorescente MTR, tal y como se describe arriba pero sin llegar a la fijación. De modo que después del segundo lavado (lavado en medio con suero para retirar el MTR de las células), se agrega a las células 1ml de medio sin suero con 0.50 μ l de calceína 0.5nM con la que se incuban durante 30 minutos a 37°C en presencia de CO₂. Posterior a la incubación, se retira la calceína y se agrega 1ml de Hoechst (1 μ g/ml) mismo que se incuba a temperatura ambiente de 1 a 3 minutos.

Finalmente, se retira el Hoechst de las células y se monta el cubreobjetos en una gota de 15 μ l aproximadamente de medio sin suero. Ya que para este experimento las células se mantienen vivas, es necesario visualizarlas en el microscopio inmediatamente para evitar la muerte de las células, así como la fragmentación de sus mitocondrias por estrés y la oxidación de la calceína.

Para este experimento se analizaron las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia en cada línea celular con el programa de análisis de imágenes Image J (NIH), se obtuvieron para cada fotografía el número de píxeles totales de la imagen, número de píxeles verdes (calceína), número de píxeles rojos (MTR) y número de células por imagen (mediante conteo de núcleos marcados con Hoechst), de modo que para cada foto se determinó el porcentaje de color rojo y el porcentaje de color verde mediante la división del número de píxeles de cada color entre el número de células en la imagen, posteriormente se promediaron todos los porcentajes de una misma línea celular para cada color y se graficó el resultado con error estándar para cada línea celular.

9.1.3. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red a células tratadas con azida de sodio (NaN₃).

Se trabajó con las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, cada una cultivada a densidad óptima con 48 horas de anticipación al experimento.

Para el tratamiento se usó azida de sodio (NaN₃) 1M en H₂O almacenada a 4°C. El experimento consistió en sembrar dos pozos independientes por cada línea celular, uno usado como control y el segundo tratado con NaN₃ 10nM. Para ello, en el pozo tratado se añadieron 20µl de NaN₃ 1M por cada 2ml de medio (medio con suero) y permanecieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 minutos.

Una vez transcurridos los 30 minutos en incubación, el medio en que se incubaron se retira y las células son teñidas con MTR 100nM y fijadas con formaldehído 37% para su posterior visualización en microscopio PALM ZEISS con software AXIOVISION.

9.1.4. Tinción mitocondrial con sonda Mito Tracker red en células tratadas con antimicina A.

Se trabajó con las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D que fueron cultivadas a densidad óptima con 48 horas de antelación al experimento.

Para estos experimentos se usó Antimicina A del catálogo sigma A-8674 preparada a una concentración de 40mg/ml diluida en etanol al 96% y almacenada a -20°C.

El experimento consistió en tratar a cada línea celular con antimicina A a una concentración final de 80µg/ml por un periodo de tiempo prolongado. Para ello se trataron las células con 1ml de medio con suero en el que se diluyeron 2µl del stock de antimicina A 40mg/ml con el que se incubaron durante 30 minutos para las líneas MDA-MB-231 y T-47D y 1 hora para la línea MCF-7.

Posterior a la incubación, se retira el medio en que se encuentran las células y se tiñe con MTR red 100nM. Para este experimento, las células fueron fijadas con formaldehído al 37% como se indicó anteriormente y se visualizaron en microscopio PALM ZEISS con software AXIOVISION.

9.2. Efectos de la fragmentación mitocondrial inducida con Antimicina A.

9.2.1. Ensayo de clonogenicidad con antimicina A.

Para la los ensayos de clonogenicidad se usó como fármaco antimicina A del catálogo SIGMA -8674 la cual contiene una combinación de antimicina A₁, A₂, A₃ y A₄ con un peso molecular final de 75.8mM.

Para los experimentos, se trabajó en placas de cultivo de 24 pozos, se sembraron 3000 células por pozo para cada línea celular. Para ello, se siembra por triplicado para cada tratamiento incluyendo al control y las células se incubaron durante 12horas antes de ser tratadas con el fármaco.

Para el tratamiento con antimicina A, se usaron tres concentraciones diferentes 0.5, 1 y 5 μ M (Chi- Tai Yeh et al, 2013). Para minimizar el error al pipetear se recomienda crear dos stocks de trabajo de antimicina A, el primero una dilución 1:100 de antimicina A y PBS 1X, y el segundo una dilución 1:100 entre el stock anterior y PBS 1X (dilución 1:1000 entre antimicina A y PBS 1X). Al momento de ser tratadas, se cambia el medio en que se encuentran las células por 500 μ l de medio fresco con suero en el que se disuelve la antimicina A. Una vez con el fármaco, las células se incuban a 37°C en presencia de CO₂ durante 24hrs. Después, el tratamiento es retirado y lavado con PBS 1X para añadir 1ml de medio fresco con suero y mantenerlas nuevamente en incubación por 7 días (tiempo aproximando en que las líneas celulares usadas alcanzaron una confluencia del 80% en los controles). Durante este tiempo el medio puede ser renovado de ser necesario.

Para cuantificar el ensayo, una vez que los controles alcanzan la confluencia deseada se aspira el medio en que se encuentran y se lavan con PBS 1X (no

necesita estar estéril). Después de ello, se procede a fijar las células, para lo cual se usa una solución de ácido acético 10%, metanol 10% y H₂O 80% y se incuban con 500µl durante 10 minutos a temperatura ambiente. El fijador se retira y se enjuaga con agua destilada para poder añadir 300µl de cristal violeta 0.4% con el que se incuban por 10 minutos más a temperatura ambiente, el cristal violeta se retira y el excedente se enjuaga con agua destilada. Las placas se dejan secar durante 24 horas. En estos experimentos, el cristal violeta (cristal violeta 0.4%, etanol 20%) se reutilizó dos veces sin perder su efectividad.

Para determinar la cantidad de células en las placas, las colonias se solubilizan en 300µl de ácido acético al 30% y se transfieren 100µl en triplicado a una placa de 96 pozos para leer la absorbancia a 540nm utilizando el espectrofotómetro Synergy. En este caso se usó la solución de ácido acético al 30% como blanco y los resultados se normalizaron basándose en los controles (100%).

9.3. Evaluación de la mitofagia.

9.3.1. Células competentes DH5α

Para lograr transfectar las células de cáncer de mamá con una sonda fluorescente de GFP-LC3, un marcador de autofagosomas, el primer paso fue realizar células competentes de *E. coli* DH5α para crecer el plásmido. Para ello se crecieron bacterias DH5α en 10ml de LB líquido en el que se incubaron 3 horas en agitación constante a 37°C.

Después de que las bacterias alcanzaran una densidad óptica suficiente, se repartieron en microtubos, 1ml por cada tubo y se centrifugaron a 4000rpm durante 5 minutos a 4°C. El contenido acuoso se decanta y el pellet es lavado y resuspendido en 350µl de CaCl₂ (0.1M) estéril, a 4°C para centrifugar nuevamente a 4000rpm 5 minutos a 4°C. Para el segundo lavado, se resuspende el pellet en 200µl de CaCl₂ y se incuba por 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifuga en frío a 4000rpm 5 minutos.

Una vez listas las células competentes se pueden transformar inmediatamente o congelar a -80°C . Para ello, el pellet resultante del segundo lavado se resuspende en $100\mu\text{l}$ de CaCl_2 /glicerol al 15% estéril.

En este experimento se corroboró la eficacia de las células competentes transformándolas con un plásmido control p38 (resistente a ampicilina) y sembrándolas en placas de LB con ampicilina $100\mu\text{g/ml}$ para observar su crecimiento después de 12 horas en incubación a 37.5°C . Para el control negativo de transformación se usó TE estéril.

9.3.2. Transformación de células competentes DH5 α con sonda fluorescente EGFP-LC3.

Para la transformación se usaron $50\mu\text{l}$ de células DH5 α que se mezclaron con $3\mu\text{l}$ de plásmido EGFP-LC3 y plásmido P38 para el control positivo así como TE para el control negativo. Se incubaron durante 20 minutos a 4°C .

Después de la incubación, se realizó el choque térmico a 42°C durante un minuto y medio seguido de una incubación a 4°C por 3 minutos. Después de los tres minutos, las células se transfirieron a 1ml de solución SOC para ser incubadas 1 hora a 37°C en agitación a 250rpm . Se recomienda usar tubos de 15ml para este paso ya que permitirán una mayor oxigenación de las colonias de bacterias.

Transcurrida una hora se verifica que la densidad óptica de las colonias sea buena y se centrifuga a 4500rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se elimina, el pellet se resuspende en $100\mu\text{l}$ de LB líquido con antibiótico $100\mu\text{g/ml}$ (El plásmido p38 usado en este experimento presenta resistencia a ampicilina mientras que EGFP-LC3 es resistente a la kanamicina). Finalmente los $100\mu\text{L}$ se usan para estriar en una placa de LB con antibiótico $100\mu\text{g/ml}$. Las placas se incuban por 18 horas a 37°C .

9.3.3. Stock de glicerol de células DH5 α transfectadas con EGFP-LC3.

Para futuros experimentos con células DH5 α con EGFP-LC3, se creó un stock de glicerol usando dos colonias aisladas del cultivo en placa de LB, las colonias se sembraron de manera independiente en tubos con 5ml de LB líquido con kanamicina 100 μ g/ml y se incubaron en agitación constante a 37°C durante 5 horas.

Posteriormente, se tomaron 500 μ l del cultivo líquido y se homogenizaron con 500 μ l de glicerol 50% estéril en un microtubo. El stock de glicerol se almacena a -80°C.

9.3.4. Maxiprep de células DH5 α transfectadas con EGFP-LC3.

Para el maxiprep se usaron dos matraces con 500ml de LB y 500 μ l de kanamicina (100mg/ml) cada uno, en ellos se añadió 1ml de LB con bacterias transformadas (se usó el mismo cultivo líquido que en el stock de glicerol) y se incubaron en agitación constante a 37°C toda una noche.

Ambos matraces se centrifugaron por separado en tubos falcon de 50ml a 10000rpm durante 5 minutos, de modo que de cada matraz se obtuviera un único pellet.

Una vez listo el pellet, éste puede almacenarse congelado a 4°C.

9.3.5. Lisis alcalina.

Cada pellet generado del maxiprep se resuspendió en 5ml de solución de lisis I (Consultar anexo 1) para después añadir 10ml de solución de lisis II preparada al instante (Para 20ml: 4ml de NaOH 10N más 17.5ml de agua desionizada). Cerrar el frasco y mezclar por inversión, en este paso almacenar durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 15ml de solución de lisis III fría, una vez más se mezcla por inversión y se almacena 10 minutos a temperatura ambiente. Es importante cuidar que no queden dos fases líquidas distinguibles. Después de

los 10 minutos se debe formar un precipitado blanco floculento. El precipitado formado consiste de ADN cromosómico, ARN de alto peso molecular, complejos de membrana y complejos de membrana con potasio/SDS/ proteínas.

Transcurridos los 10 minutos, se centrifuga el lisado bacteriano a 3500rpm durante 10 minutos a 4°C. Si no se forma un pellet firme se puede re centrifugar a 3500rpm durante 20 minutos más, luego se transfiere tanto sobrenadante como sea posible a un tubo estéril. Si no se forma el pellet viscoso, es normalmente consecuencia de un mezclado inadecuado con la solución de lisis III.

El sobrenadante se filtra por 3 capas de gasa a una nueva botella de centrifuga y se añaden 0.3 volúmenes de isopropanol (13.4ml), se mezcla bien y se almacena a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente, se recuperan los ácidos nucleicos por centrifugación a 3500rpm, 15 minutos a temperatura ambiente. (Se puede formar un precipitado de sales si se centrifuga a 4°C). El siguiente paso es decantar el sobrenadante e invertir la botella para que goteen los últimos residuos. El pellet y las paredes de la botella se enjuagan con etanol al 70% a temperatura ambiente, el etanol se debe retirar completamente, para ello se puede invertir la botella en una hoja de papel absorbente por algunos minutos a temperatura ambiente hasta que el etanol se evapore.

Finalmente, la pastilla de ácidos nucleicos se disuelve en 3ml de TE con pH 8.0 (en este paso se puede detener el proceso y congelar a -20°C)

9.3.6. Purificación de ADN plasmídico por precipitación con polietilenglicol.

El proceso se inicia resuspendiendo la pastilla de ácidos nucleicos en 3ml de solución de LiCl 5M a 4°C y transferirla a un microtubo de centrifuga para centrifugar a 10 000rpm durante 4 minutos a 4°C. Posteriormente se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se añade un volumen igual de isopropanol, éste se mezcla bien y los ácidos nucleicos se recuperan nuevamente por centrifugación a 10 000rpm a temperatura ambiente.

El siguiente paso es decantar el sobrenadante e invertir el tubo abierto para que escurran las últimas gotas, enjuagar el pellet y las paredes del tubo con etanol al 70% a temperatura ambiente. Esta vez se debe escurrir el etanol y remover cualquier remanente del sobrenadante que se encuentre en las paredes. Colocar el tubo invertido y abierto en una toalla absorbente a temperatura ambiente y dejar que se evaporen las últimas gotas de etanol.

Mientras tanto, se debe preparar un microtubo con 500µl de TE (pH 8.0) que contenga RNAasa pancreática libre de DNAasas (a una concentración final de 20µg/ml) para resuspender el pellet y dejarlo a temperatura ambiente por 30 minutos.

A continuación, se añaden 500µl de NaCl 1.6M con polietilenglicol al 13% (w/v), se mezcla bien y se recupera el ADN plasmídico por centrifugación a 10 000rpm por 5 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante por decantación y disolver el pellet de ADN plasmídico en 400µl de TE (pH 8.0) Es importante considerar que el pellet formado en esta última etapa es translucido y de consistencia gelatinosa. (En este paso se puede detener el proceso y congelar el pellet a -20°C).

En la segunda parte del proceso, una vez descongelado el ADN plasmídico se añaden 400µl de fenol, éste se agita bien y se centrifuga a 10 000rpm 5 minutos a temperatura ambiente. Tomar la capa superior (acuosa) y transferir a un tubo nuevo para agregar 400µl de una mezcla 1:1 de fenol y cloroformo. Agitar y centrifugar a 10 000rpm 5 minutos a temperatura ambiente, nuevamente tomar la capa superior (acuosa) y transferir a un tubo nuevo. Agregar 400µl de cloroformo que se agita bien y se centrifuga a 10 000rpm 5 minutos a temperatura ambiente y recuperar la capa superior.

A continuación se añaden 100µl de acetato de amonio 10M que se mezcla con 900µl de etanol absoluto, se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12 000rpm por 5 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante por aspiración y añadir 200µl de etanol al 70% a 4°C, agitar y centrifugar 2 minutos a 12 000rpm. Finalmente, resuspender en 400µl de TE.

En este experimento se cuantificó la concentración del ADN obtenido, que fue igual a 0.014µg/µl por lo que se decidió hacer una última purificación usando un kit de purificación ZYMO RESEARCH. Finalmente de este experimento se obtuvieron 40µl de ADN a concentración 0.040µg/µl y pureza (A260/ A280) de 1.77.

9.3.7. Transfección de líneas celulares de cáncer de mama con sonda fluorescente de GFP-LC3.

Para la transfección se usaron únicamente las líneas celulares MCF-7 y BT-549 de las que se sembraron dos pozos (en placa de 24), un control y uno tratado a densidad de 150 000 células por pozo.

5 horas después de sembrar las células, una vez que éstas se adhirieron al plato, se les transfectó con la sonda fluorescente de GFP-LC3. Para la transfección se utilizó lipofectamina 3000 de Invitrogen siguiendo el protocolo del comerciante como se describe a continuación.

Para el experimento, se usó un 1µg de ADN por lo tanto en un microtubo se mezclaron 25µl de ADN plásmidico con GFP-LC3 con 2µl de P3000 (2µg/µl de ADN) y 1.5µl de lipofectamina 3000 (Invitrogen, Life Technologies).

Mientras tanto, al cultivo celular se le retira el medio en que se encuentra y se agrega una cantidad mínima de medio fresco para incubarse 24 horas (300µl para cajas de 24 pozos). Una vez realizado esto, todo el contenido del microtubo se deja caer en el medio nuevo de uno de los pozos por goteo mientras que al control sólo se le cambia el medio.

Después de 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, las células transfectadas se tripsinizan y se siembran en cubreobjetos manteniéndose en el mismo medio usado para la transfección y sumándole un volumen mínimo de medio fresco.

Tras 48horas de incubación, las células transfectadas se tiñeron con MT 100nM y Hoechst. Las células se observaron en microscopio PALM ZEISS con software APOTOME en objetivo de 60x con aceite de inmersión.

Para cada línea celular se tomaron un total de 10 fotografías en campos aleatorios en fluorescencia verde y roja. Posteriormente, se contaron el número total de autofagosomas por campo y se dividieron entre el número de células transfectadas por campo para obtener un promedio de autofagosomas por célula. Asimismo se analizó la presencia de autofagosomas con contenido mitocondrial mediante la co-localización del marcaje de MTR y GFP-LC3.

10. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron tres veces de manera independiente. Los resultados se analizaron con programas estadísticos y con pruebas de t de student o de análisis de varianza seguidas por pruebas de Tukey para determinar diferencias significativas entre los grupos estudiados. Se consideraron significativos aquellos datos que mostraron un valor de p menor a 0.05.

11. Resultados

11.1. Morfología mitocondrial.

Tras la evaluación de la morfología mitocondrial de las diferentes líneas celulares se registraron diferencias notables entre la cantidad de mitocondrias por célula, la disposición espacial de éstas en el citoplasma, la longitud de los túbulos y/o los fragmentos, así como la formación de esferas en algunas líneas celulares.

Como se observa en la figura 3, las líneas celulares de más a menos porcentaje de mitocondrias tubulares son MCF10-A, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 y finalmente BT-549. Cada una con una morfología mitocondrial diferente de la otra.

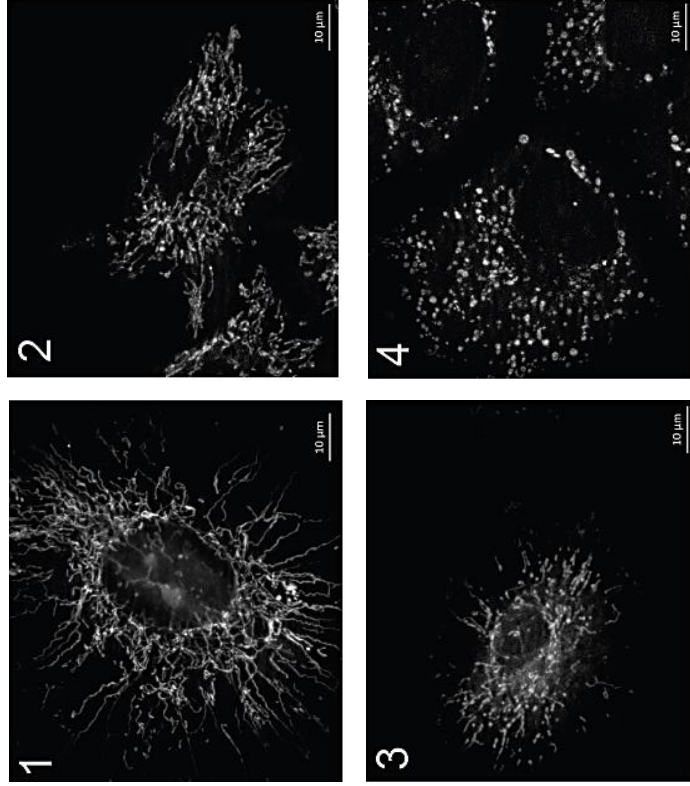
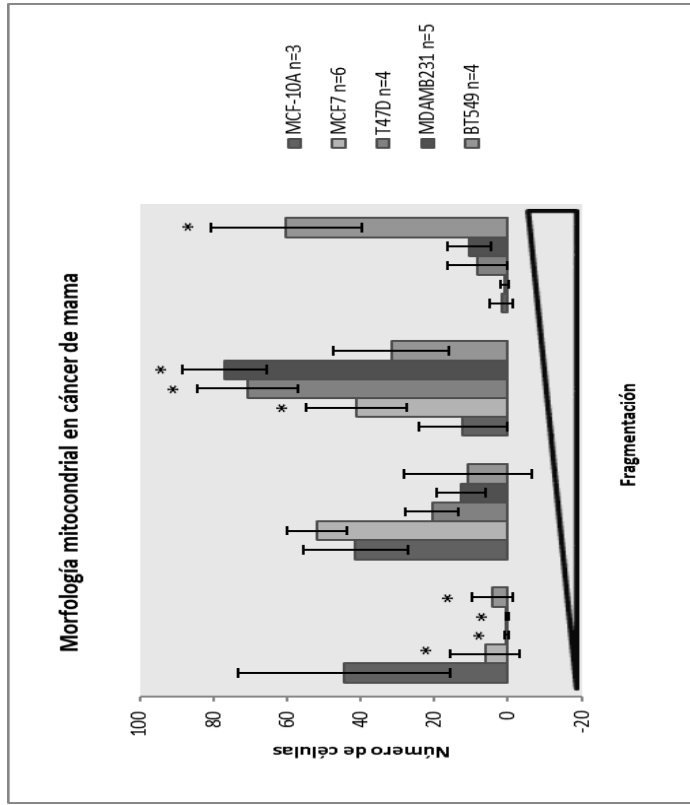


Figura 3. Gráfica de Morfología mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama. Se presentan los resultados de la clasificación de la red mitocondrial en cinco líneas celulares de cáncer de mama; MDAMB 231, MCF7, T47D, BT549 Y la línea control MCF10. A la derecha se presentan fotografías representativas de cada categoría; 1: solo mitocondrias tubulares que fragmentadas, 2: más mitocondrias tubulares que fragmentadas, 3: más mitocondrias fragmentadas que tubulares y 4: solo mitocondrias fragmentadas. La gráfica muestra el promedio +/- desviación estándar de 3 a 6 experimentos independientes donde se evaluaron más de 100 células por experimento. Los asteriscos muestran diferencias significativas contra a línea celular control en cada categoría de morfología mitocondrial con p menor a 0.05.

11.1.1. MCF10-A.

Es una línea celular procedente de enfermedad fibroquística y no tumorigénica cuya disposición mitocondrial muestra un patrón de red en la mayoría de los casos. Estas células son notablemente más grandes en comparación con el resto de las líneas celulares, aunque en el cultivo celular, se pueden distinguir dos poblaciones, la primera conformada por células grandes y alargadas que crecen unitarias y la segunda, conformada por células considerablemente más pequeñas que las anteriores y de crecimiento colonial. Aunque en apariencia muy distintas, en este trabajo no se logró comparar diferencias entre la morfología mitocondrial de estas dos poblaciones.

11.1.2. MCF.7.

Es una línea celular de tipo carcinoma ductal invasivo positiva a receptores de estrógenos y no metastásica cuya morfología mitocondrial revela la presencia de redes bien formadas que ocupan todo el citoplasma aunque es común encontrar algunos fragmentos de la red a lo largo de la célula. En el cultivo, esta línea celular muestra una población homogénea de tamaño intermedio con un rápido crecimiento de tipo colonial.

11.1.3. T-47D.

Al igual que la MCF-7, esta línea celular es de tipo carcinoma ductal invasivo y positiva a receptores de estrógenos, son células de tamaño notablemente pequeño en relación al resto de las líneas celulares, en cultivo tiene un crecimiento lento y forma agregados celulares muy obvios. Muestran poca formación de redes mitocondriales, más bien presenta dispersión de fragmentos mitocondriales a lo largo de todo el citoplasma.

11.1.4. MDA-MB-231.

La línea celular MDA-MB-231 es de tipo carcinoma ductal invasivo y a diferencia de las dos líneas anteriores, ésta pertenece a la clasificación triple negativo y son de gran capacidad metastásica. Esta línea se caracterizó por la baja formación de redes mitocondriales y en general por tener pocas mitocondrias, las cuales tienden a formar agregados en un solo lado de la célula. En el cultivo, estas células son de tamaño comparable a la línea MCF-7, es decir más grande que las T-47D y más pequeñas que las MCF10-A. Forman poblaciones homogéneas y no tienden a la formación de colonias.

11.1.5. BT-549.

Es una línea celular de tipo carcinoma ductal invasivo papilar, del tipo triple negativo con gran potencial metastásico. En cultivo, son células de apariencia grande, comparables a la línea MCF-10A. No muestran crecimiento colonial y aunque en cultivo parecen homogéneas, la morfología mitocondrial revela dos poblaciones con notables diferencias: la primera conformada por células con un gran número de mitocondrias que no forman redes y se dispersan en todo el citoplasma. Estos fragmentos mitocondriales en apariencia de gran tamaño, suelen enroscarse sobre sí mismos formando esferas. Por otro lado, la segunda población, que constituye la minoría de las células tiene menor número de mitocondrias pero éstas se distribuyen a lo largo del citoplasma formando extensas redes mitocondriales, tan elongadas que son comparables a las de la línea control MCF-10A.

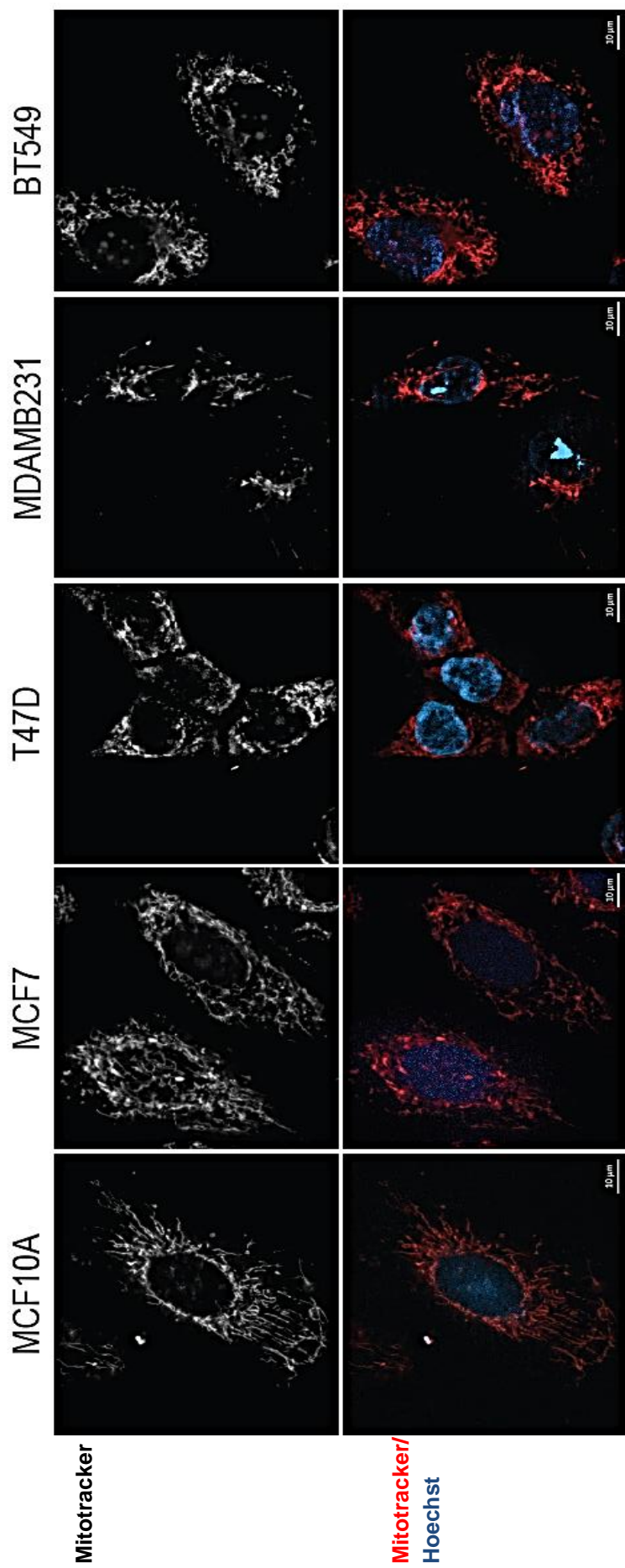


Fig 4. Fotografías tomadas con microscopio PALM ZEISS y APOTOME donde se muestra la morfología mitocondrial de las diferentes líneas celulares de cáncer de mamá teñidas en rojo con sonda MTR y en azul con Hoechst. En el extremo izquierdo se observa la línea control MCF-10A formando largas redes mitocondriales mientras que en el extremo derecho la línea celular BT-549 con escasa formación de redes y tendencia a la formación de esferas.

11.2. Tinción con MTR, calceína y Hoechst

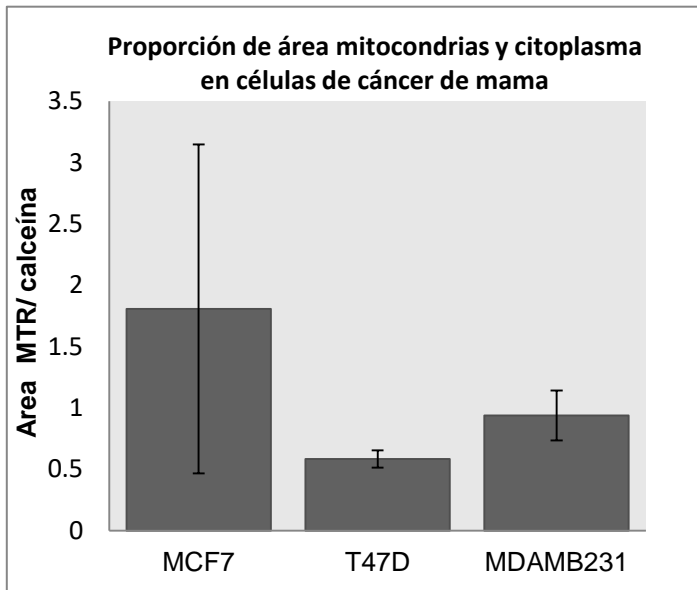
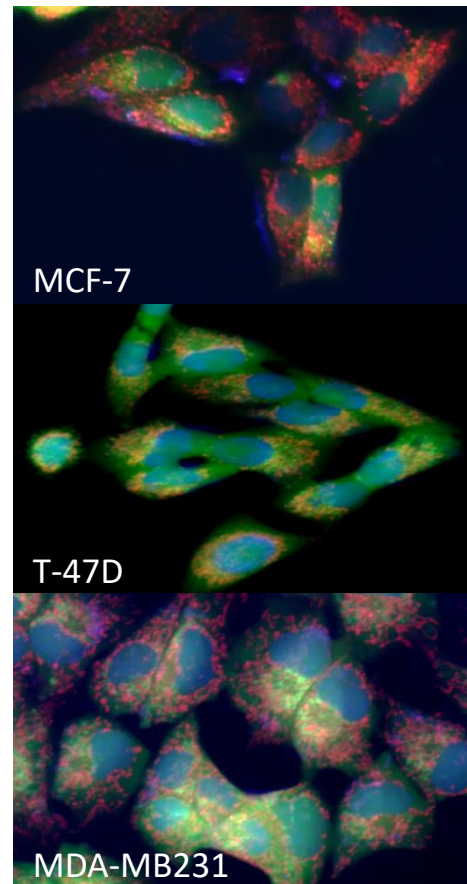


Fig.5. Gráfica de proporción de área de mitocondrias y citoplasma en células de cáncer de mama medida como proporción de marcaje rojo (MTR) y verde (calceína) en fotografías tomadas con microscopia de epifluorescencia. La gráfica muestra el promedio \pm error estándar de un experimento donde se evaluaron aproximadamente 100 de células de cada línea celular.



Se realizaron experimentos de tinción mitocondrial aunado a una tinción citoplasmática con calceína y tinción de núcleo con Hoechst en tres líneas celulares, MCF-7, T-47D y MDA-MB231 para analizar si existe una diferencia significativa en la proporción de área ocupada por las mitocondrias en el citoplasma de las diferentes líneas celulares.

Los resultados nos muestran que existe una diferencia significativa en el área ocupada por las mitocondrias (color rojo) en cada línea celular de manera que la línea celular MCF-7 presenta mayor cantidad de mitocondrias y una alta variabilidad en la cantidad de mitocondrias entre las células respecto a las líneas T-47D y MDA-MB231, mismas que a diferencia de la línea MCF-7 mantienen cantidades constantes de mitocondrias en todas sus células.

11.3. Fragmentación mitocondrial.

Con el objetivo de comparar la morfología mitocondrial de las líneas celulares de cáncer de mama en condiciones normales contra la morfología que se adquiere bajo la inducción del desacople total de sus mitocondrias (control de fragmentación) se usaron dos diferentes fármacos que actúan inhibiendo a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la caída del potencial de membrana mitocondrial y por ende el desacople de la red.

Las líneas celulares usadas en este experimento fueron MCF-7 y MDA-MB-231, ambas de origen CDI, con tamaños y velocidad de crecimientos similares pero una perteneciente al subtipo RE+ y la segunda al triple negativo. Dichas células se sometieron a tratamientos con Antimicina A y azida de sodio (NaN_3).

Tras las diferentes pruebas, se encontró que las células MDA-MB-231 presentan una gran sensibilidad tanto a la antimicina A como a la NaN_3 incluso a concentraciones bajas de tratamiento y periodos cortos de incubación. Por el contrario, la línea celular MCF-7 tuvo una elevada resistencia al tratamiento con NaN_3 y sólo fue sensible a concentraciones elevadas de antimicina con largos periodos de incubación como se muestra en la figura 5.

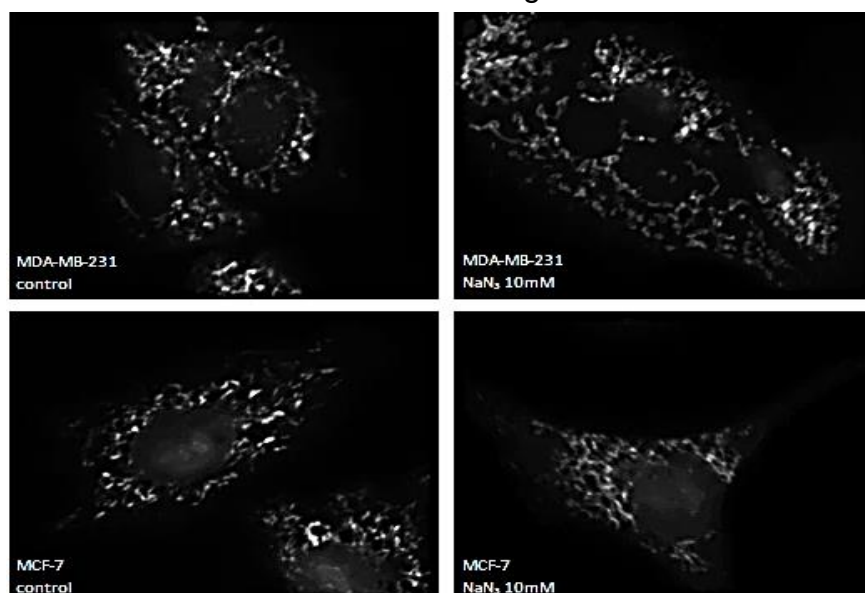


Fig 6. Fotografías representativas de las líneas celulares MDA-MB231 y MCF-7 tratadas con NaN_3 10mM donde se observa que la línea MCF-7 presenta poca sensibilidad al tratamiento con NaN_3 en comparación con la línea MDA-MB231.

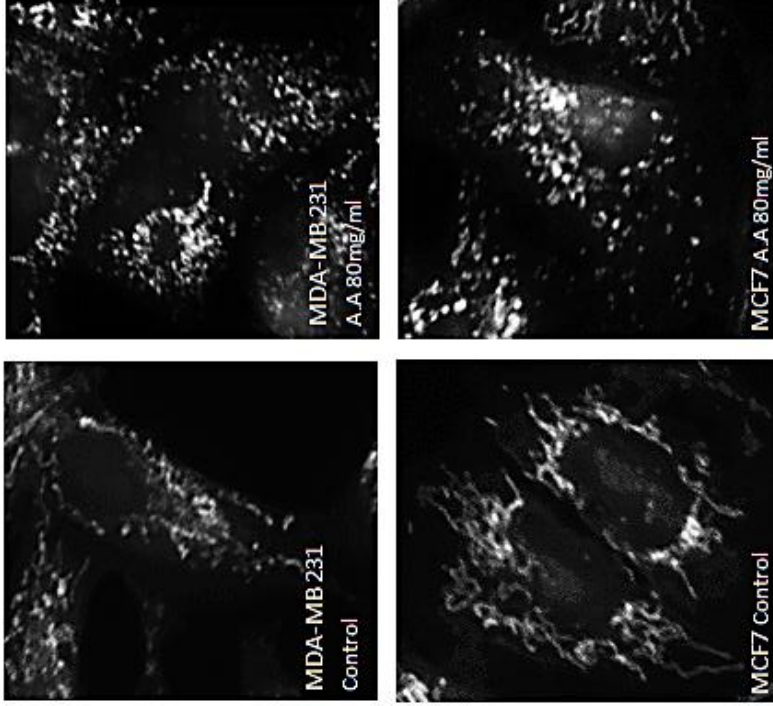
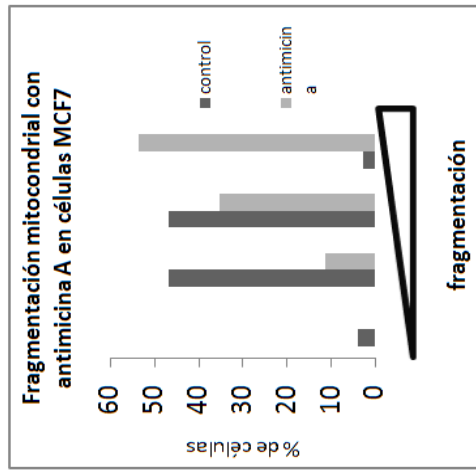
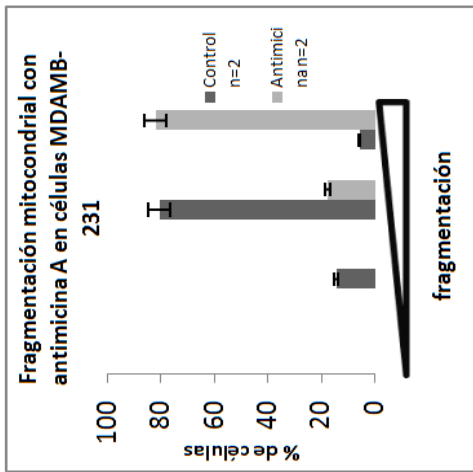


Figura 7. Gráficas de fragmentación mitocondrial por efecto del tratamiento con antimicina A 80mg/ml en líneas celulares MDAMB-231 y MCF7.

11.4. Ensayos de clonogenicidad con antimicina A.

Tras los resultados obtenidos en los experimentos de fisión mitocondrial y debido a las notorias diferencias en la sensibilidad a los distintos fármacos entre líneas celulares con morfología mitocondrial opuesta, se decidió profundizar en el papel de la antimicina A como inhibidor del crecimiento celular en líneas celulares de cáncer de mama. Por lo tanto, se realizaron ensayos de clonogenicidad con diferentes concentraciones de este fármaco a todas las líneas celulares que se tienen de cáncer de mama así como a la línea control MCF-10A.

Los resultados obtenidos arrojan notables diferencias en la sensibilidad de las diferentes líneas celulares al tratamiento con Antimicina A (figura 8A). Como se observa en la gráfica siguiente, las líneas celulares que resultan más susceptibles al tratamiento con antimicina son T-47D, MCF-7 y MDA-MB-231 cuyo nivel de sensibilidad varía dependiendo de la concentración del fármaco a la que se encuentran sometidas, por lo que la línea T-47D resulta más sensible que el resto de las líneas celulares en presencia de bajas concentraciones y tal sensibilidad parece mantenerse a pesar de que se aumente la concentración de antimicina en el medio. Por otra parte, las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 resultan más sensibles al tratamiento con antimicina, mientras mayor sea la concentración de esta en el medio.

Por otro lado, si bien las líneas celulares MCF-10A y BT-549 muestran una disminución en la tasa de supervivencia celular en comparación con el control, los resultados indican que la sensibilidad que presentan dichas células al tratamiento con antimicina es menor en relación con las líneas T-47D, MCF-7 y MDA-MB-231. Esta falta de sensibilidad es consistente aun encontrándose bajo concentraciones altas de antimicina A.

Finalmente, en un segundo gráfico (figura 8B), se comparan las líneas celulares MCF-7 y T-47D ambas de tipo RE+ contra la línea control MCF10-A, encontrando una clara correlación entre el grado de fragmentación mitocondrial y la sensibilidad a la antimicina A.

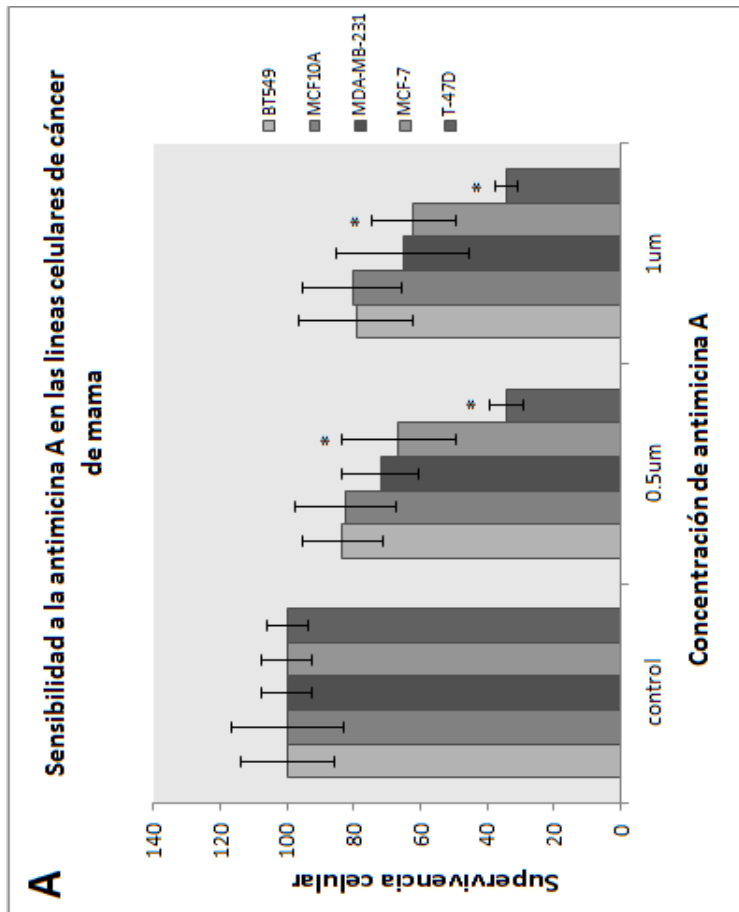
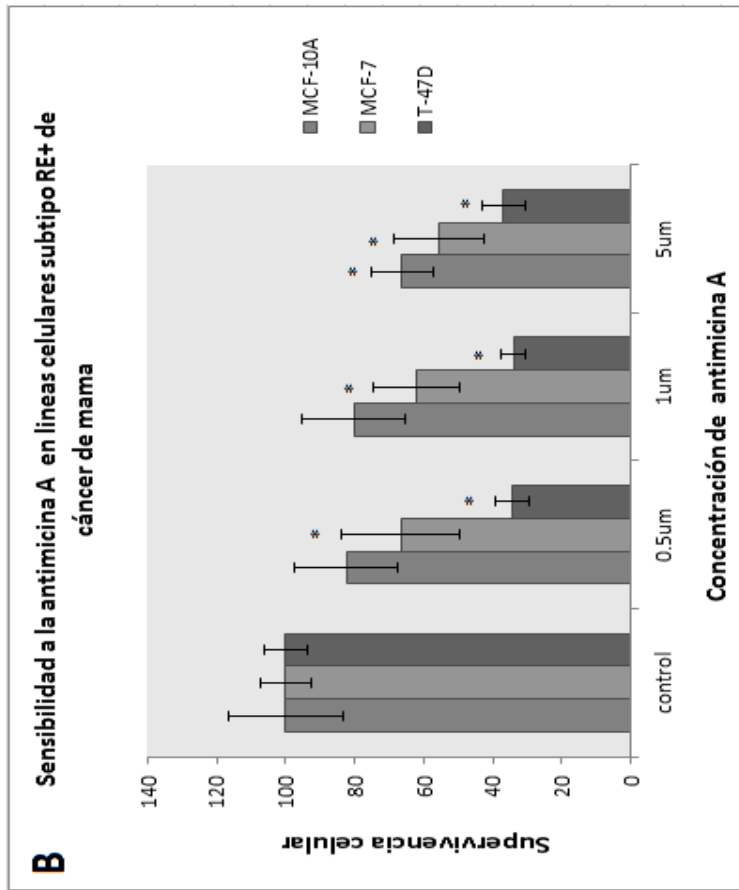
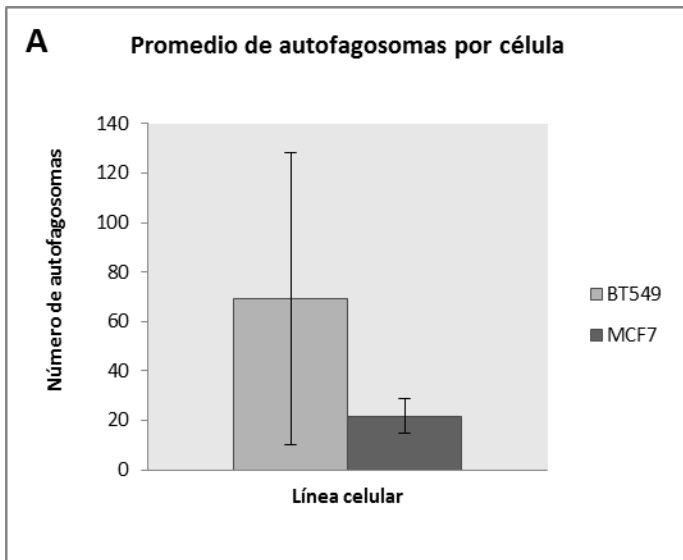


Fig 8. A: Gráfica de supervivencia celular medida como porcentaje de supervivencia respecto al control en un ensayo de clonogenicidad con tratamiento con antimicina A en dos concentraciones diferentes aplicadas a líneas celulares de cáncer de mama. B: viabilidad se determinada en líneas de cáncer de mamá de subtipo RE+ mediante un ensayo de clonogenicidad con tres concentraciones diferentes del fármaco. Las gráficas muestran el promedio +/- error estándar DE 3 experimentos independientes. Los asteriscos muestran diferencias significativas contra el control sin antimicina de cada línea celular con p menor a 0.05.

11.5. Evaluación de la mitofagia.

En el presente trabajo se evaluaron los niveles de mitofagia en dos diferentes líneas celulares de cáncer de mama, la MCF-7 que como se mostró anteriormente, representa la línea celular de cáncer con mayor tendencia a la formación de redes mitocondriales y por otro lado la BT-549 que representa la línea celular con los niveles más altos de fragmentación mitocondrial.

Los resultados obtenidos demuestran que ambas líneas celulares mantienen activo el proceso de autofagia. Sin embargo, los niveles son diferentes para cada una, el nivel de autofagia de cada línea celular fue determinado como número de autofagosomas promedio por célula, lo que arroja como resultado que las células de la línea celular MCF-7 forman alrededor de 20 autofagosomas por célula mientras que las células de la línea BT-549 formaron aproximadamente 70 autofagosomas cada una como, se observa en la figura 9A.



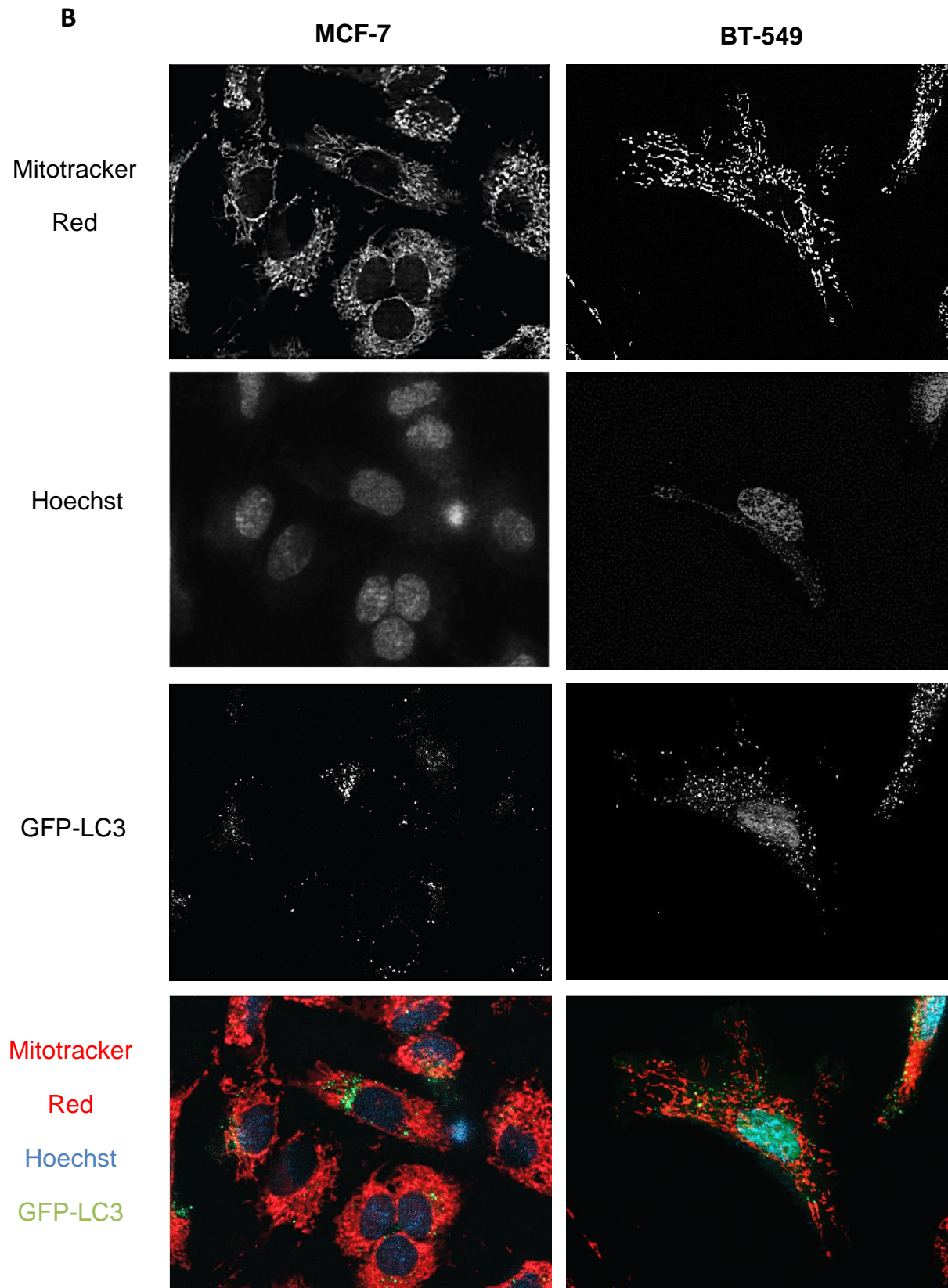


Fig .9A. Gráfica de número de autofagosomas promedio por célula para las líneas celulares MCF7 y BT549 de cáncer de mama. La gráfica muestra el promedio +/- error estándar de un experimento donde se evaluaron +/- 100 células de cada línea celular. En 9.B. Se muestran por separado las tinciones realizadas para evaluar la mitofagia, en la parte superior se muestran ambas líneas celulares con tinción de MTR 100nm, en el centro se observan tinciones con Hoechst 100µm/ml seguida de imágenes de ambas líneas transfectadas con GFP-LC3 y finalmente una imagen con las tres tinciones en el mismo plano.

Como se muestra en la figura 9A, la línea celular BT-549, a diferencia de la línea MCF-7, mostró diferencias en cuanto al número de autofagosomas por célula que va desde cero hasta más de doscientos y debido a que en experimentos anteriores se demostró que dicha línea celular mantiene diferencias significativas en la morfología de sus mitocondrias, se realizó un análisis para conocer si existe una relación entre la morfología mitocondrial de cada célula con el número de autofagosomas formados en ella.

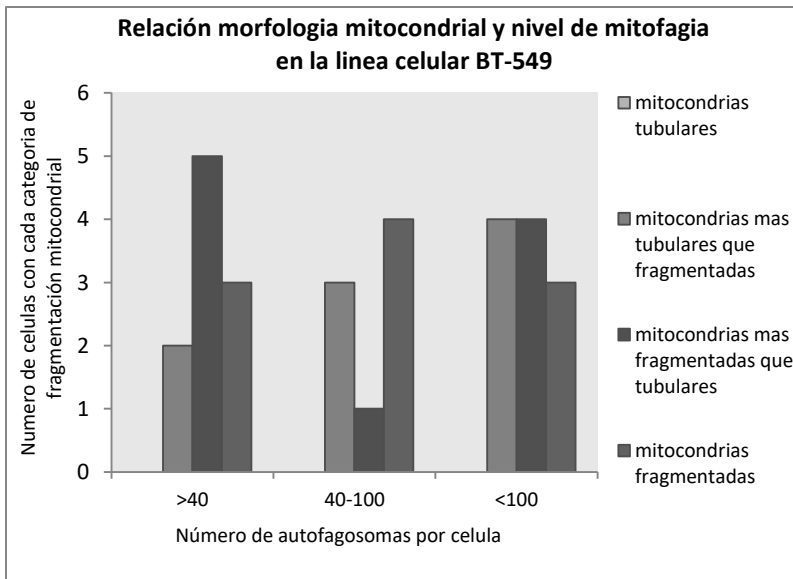


Fig 10. Gráfica de relación entre nivel de fragmentación mitocondrial y el número de autofagosomas contados en cada célula transfectada con GFP-LC3 en la línea celular BT-549 de subtipo triple negativo. Para este experimento se trabajó con aproximadamente 50 células.

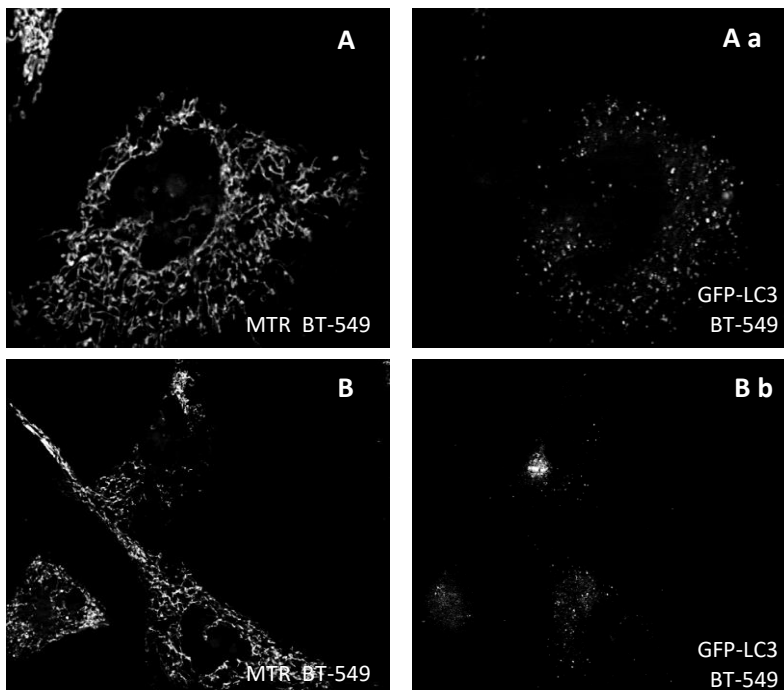


Fig 11. Comparación entre el número de autofagosomas en dos células de la línea celular BT-549 transfectadas con GFP-LC3 y teñidas con MTR, ambas con clasificación 2 (pocos túbulos y muchos fragmentos) en la escala de morfología mitocondrial. Sin embargo la imagen Aa muestra una elevada cantidad de autofagosomas en comparación con Bb.

Los resultados muestran que las células con categoría 3 (algunos túbulos y muchos fragmentos) tuvieron el menor número de autofagosomas. Por el contrario, las células con categoría 2 (muchos túbulos y pocos fragmentos) están enriquecidas en la categoría de más autofagosomas. Las células de categoría 4 (completamente fragmentadas) están distribuidas en las tres categorías de cantidad de autofagosomas y no se observaron células que se clasificaran como categoría 1 (completamente tubulares).

Ahora bien, el número de autofagosomas por célula no representa la única discrepancia entre ambas líneas celulares. Mediante microscopía de fluorescencia fue posible observar diferencias morfológicas entre dichas líneas. Los autofagosomas observados en la línea celular MCF-7 se presentan en forma de grandes esferas completamente verdes mientras que en la línea BT-549 los autofagosomas son de menor tamaño y se observan en muchos casos en forma de aros (figura 11).

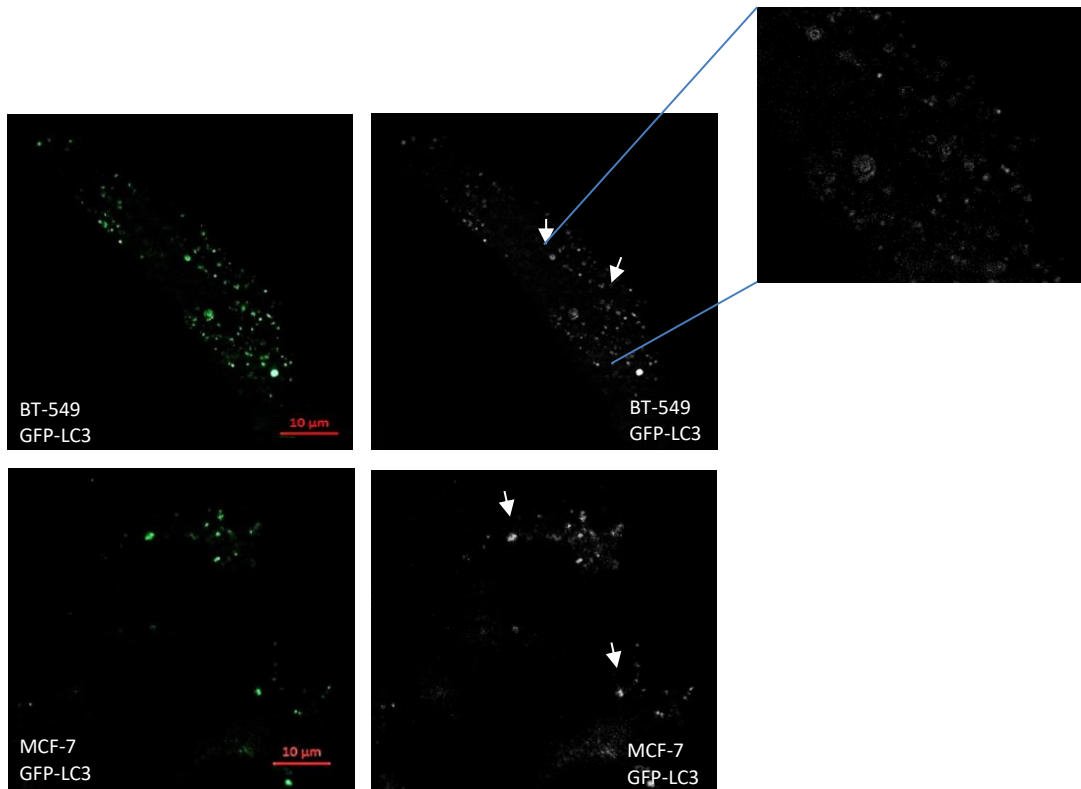


Fig 11. Comparación de la morfología de los autofagosomas formados por la línea celular MCF-7 contra la línea celular BT-549. Acercamiento en autofagosomas de BT-549.

Finalmente, al observar simultáneamente los campos de MTR y GFP no se encontró co-localización de los autofagosomas y las mitocondrias. Por el contrario, la mayor parte de éstos se agregaban en los espacios citoplasmáticos carentes de mitocondrias en el caso de ambas líneas celulares.

12. Discusión.

Tras el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se demuestra que existe una amplia diversidad en la morfología de la red mitocondrial en las distintas líneas celulares de cáncer de mama, de manera que parece existir una correlación entre el grado de fragmentación de la red mitocondrial con la malignidad de la línea celular. En este caso se observó que las líneas celulares correspondientes al subtipo triple negativo presentan en promedio mayor fragmentación en sus redes mitocondriales, en comparación a las líneas positivas a los receptores hormonales.

Esta correlación se puede explicar debido a que la fisión en la red mitocondrial se relaciona con estrés metabólico, mayor producción de EROS y por lo tanto mayor acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial así como un cambio en la reprogramación metabólica (Guaragnella et.al, 2014), todas ellas características de células con niveles elevados de transformación maligna. De manera importante, las células con mayor grado de fragmentación mitocondrial pertenecen al cáncer de mama de tipo triple negativo, el cual no tiene un biomarcador específico para su detección y no cuenta con terapia dirigida.

En el caso particular de la línea BT-549 que en su mayoría carece de formación de redes mitocondriales, los resultados muestran que un mínimo porcentaje de esta línea presenta redes mitocondriales muy semejantes a las de la línea control MCF-10A, es decir altamente fusionadas. En estudios recientes se ha propuesto un tercer estado de la red mitocondrial; el de hiperfusión, el cual se asocia con situaciones de alto estrés celular y está caracterizado por cambios en la morfología mitocondrial indicativos de la fusión como el aumento del potencial de membrana mitocondrial (PMM), aumento de los niveles de ATP, aumento en la producción de superóxido, y aumento de la oxidación de proteínas mitocondriales. Este estado hiperfusionado de la red se ve acompañado por una disminución en la expresión de Fis1, gen responsable de la fisión mitocondrial así como de genes relacionados con la apoptosis, incluyendo Aifm2, Bbc3, y Bid. Otro cambio importante recae en la regulación de Ucp2, Ucp4, y Ucp5, genes encargados de

disminuir el PMM, reduciendo de este modo la fosforilación oxidativa, y promoviendo la glucólisis. Estos efectos, que acompañan colectivamente el estado hiperfusionado de la red mitocondrial, son un mecanismo pro-supervivencia para rescatar a las mitocondrias dañadas y proteger a las células de la apoptosis. (Bahl et.al, 2016 y Youle & van der Bliek, 2012). Si bien esto podría relacionarse con el comportamiento de las redes fusionadas en algunas de las células de la línea BT-549, éstas no revelan haber llegado a la totalidad del estado hiperfusionado, lo cual podría sugerir que si bien las células se encontraban ante elevados niveles de estrés, éste no fue suficiente para llevar a las células que intentaban sobrevivir a la hiperfusión de la red mitocondrial.

Por otra parte, los resultados obtenidos con las tinciones de calceína, MTR y Hoechst nos muestran que la diferencia entre la cantidad de mitocondrias por célula fue significativa entre las distintas líneas celulares de cáncer de mama por lo que sería interesante conocer los resultados para las líneas celulares restantes y posteriormente analizar si existe una correlación entre número de mitocondrias y porcentaje de formación de redes mitocondriales así como su relación con la funcionalidad de las mitocondrias en cuanto a potencial de membrana y capacidad oxidativa.

Al realizar las pruebas con los dos venenos mitocondriales, NaN_3 y antimicina A para visualizar la fragmentación inducida de la red mitocondrial, se encontró una notable diferencia entre la sensibilidad de la red mitocondrial de la línea luminal MCF-7 en comparación con la de la línea triple negativo MDA-MB-231. Estos resultados indicaron que en líneas celulares cuyas mitocondrias no se disponen formando redes y más bien se encuentran unitarias, son más sensibles al efecto de los distintos venenos mitocondriales. Puesto que la acción de tales venenos recae en la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, induciendo así la caída del potencial de membrana mitocondrial y por ende el desacople de la red, es válido inferir que en líneas celulares con tendencia a la formación de redes mitocondriales como es el caso de la línea celular MCF-7, las redes actúan “protegiendo” a las mitocondrias que la conforman de los posibles daños que agentes externos les pudiesen causar. Sin embargo, este efecto

protector disminuye si se somete a las células durante largos periodos de tiempo a altas concentraciones de los venenos mitocondriales y las células con menos mitocondrias tubulares se verían más afectadas, tal como lo demuestran nuestros resultados.

Partiendo de los resultados anteriores, se realizaron ensayos de clonogenicidad con antimicina A en dos diferentes líneas luminales de cáncer de mama, dos líneas triple negativo y una línea control. Se eligió la antimicina A debido a que en los experimentos previos mostró tener un efecto más pronunciado en comparación con la azida de sodio. Si bien, se sabe que la azida de sodio suele ser un veneno mitocondrial muy potente, con mecanismo de acción muy semejante al cianuro, en este trabajo no se realizaron curvas dosis respuesta para este fármaco.

Los resultados de dicho experimento arrojaron un comportamiento como el predicho, en las líneas celulares RE+ así como en la línea control de modo que los gráficos exponen una correlación inversa entre el nivel de fragmentación mitocondrial y la susceptibilidad al efecto de la antimicina A.

Sin embargo, en las líneas triple negativo esta correlación no se presentó, cabe destacar que durante el experimento, la línea BT-549 mostró un crecimiento más lento que el del resto de las líneas. Por lo tanto, es probable que el experimento en esta línea celular en particular se haya detenido antes de que el efecto de la antimicina A se hiciera notorio de modo que consideramos necesario repetir los experimentos para estas células antes de poder concluir cuál es verdaderamente su susceptibilidad ante la antimicina A.

Finalmente, puesto que se conoce que las células cancerosas presentan diferencias en los niveles de macroautofagia basal, se intentó determinar si existe una correlación entre la morfología mitocondrial y los niveles de autofagia, en líneas celulares de cáncer de mama comparando el subtipo triple negativo representado por la línea BT-549 con mitocondrias altamente fragmentadas y comparando contra una línea celular de subtipo RE+ MCF-7 con disposición mitocondrial en forma de redes.

Los resultados indicaron que existe un porcentaje de más del doble de autofagosomas formados en la línea triple negativo en relación con la línea RE+, sugiriendo un mayor grado de autofagia en las células BT549. Sin embargo, en dicho experimento no se logró comprobar para ningún caso que estuviesen ocurriendo niveles detectables de mitofagia.

Por otra parte, la línea MCF-7 presentó un número homogéneo de autofagosomas por célula, presentando +/- 20 autofagosomas por célula mientras que en la línea BT-549 se encontraron células que van desde 10 autofagosomas hasta las que presentan más de 200. Por lo tanto, se decidió hacer un segundo recuento en esta línea celular con la finalidad de conocer si existe una relación entre la morfología mitocondrial de cada célula y el número de autofagosomas formados en ella, nuestro resultado muestra que existe relación entre la morfología mitocondrial de cada célula y el número de autofagosomas, es decir cuanto mayor es la fragmentación mitocondrial, mayor es el número de autofagosomas formados por célula sugiriendo que los niveles de autofagia están determinados por la morfología mitocondrial de la célula. Esta relación morfología mitocondrial y número de autofagosomas se muestra clara solo para las categorías intermedias de morfología mitocondrial. Sin embargo, ya que se realizó un único experimento de transfección con GFP-LC3 en cada línea celular recomendamos la realización de por lo menos dos repeticiones más para concluir adecuadamente este experimento.

Del mismo modo, se encontró diferencia entre la morfología de los autofagosomas presentes en la línea MCF-7 y los de la línea BT-549. Sin embargo, es poca la información con la que se cuenta por lo que es necesario ampliar el número de repeticiones por experimento así como las líneas celulares con las que se trabajó para obtener resultados más concluyentes.

La línea BT-549 demuestra que existe una relación inversa entre la morfología mitocondrial de cada célula y el número de autofagosomas por célula sugiriendo que los niveles de autofagia están determinados por la morfología mitocondrial de la célula.

13. Conclusiones.

Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron una morfología mitocondrial muy diversa, siendo el tipo RE+ (menos agresivo) el que presentó menor fragmentación mitocondrial a diferencia del tipo triple negativo (mayor agresividad), el cual presentó las mitocondrias más fragmentadas. Estos resultados sugieren la utilización de la morfología mitocondrial como un posible marcador de malignidad en este tipo de cáncer.

Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron diferencias significativas en la cantidad de mitocondrias por célula de modo que será interesante comparar estos datos contra la línea control y otras líneas celulares de cáncer de mama para poder inferir si existe una relación entre número de mitocondrias por célula y capacidad de formación de redes.

Las líneas celulares del tipo RE+ de cáncer de mama presentaron una relación de mayor sensibilidad a la antimicina A a mayor grado de fragmentación mitocondrial. Estos resultados sugieren que la inhibición del metabolismo mitocondrial podría sugerirse como blanco terapéutico en cáncer de mama. Se necesitan realizar experimentos adicionales para determinar específicamente el subtipo de cáncer de mama con mayor susceptibilidad a estos tratamientos.

Las líneas celulares de cáncer de mama presentaron diferencias en los niveles de autofagia basal y muy bajos niveles de mitofagia en general. Será interesante comparar los niveles de mitofagia en células normales para determinar si los niveles de mitofagia son bajos en general en el cáncer de mama y si existe potencial para utilizar biomarcadores asociados a este proceso biológico en el diagnóstico o tratamiento de la enfermedad.

14. Referencias.

1. Amadou A, Torres-Mejía G, Hainaut P, Romieu I.(2014) Breast cancer in Latin America: global burden, patterns, and risk factors. *Salud Publica Mex*; 56:547-554.
2. Bahl, V. Johnson, K. Phandthong, R. Zahedi, A. Schick, SF & Talbot P. (2016) Thirdhand Cigarette Smoke Causes Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion and Alters the Transcriptional Profile of Stem Cells. *Society of Toxicology*. DOI:10.1093/toxsci/kfw102.
3. van der Bliek AM, Shen Q, and Kawajiri S. (2013) Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 5(6).
4. Cereceda Solis K. (2012) cloruro de litio induce autofagia en células del túbulo seminífero. Tesis de grado Universidad Austral de Chile.
5. Chazotte Brad. (2011) Protocol Labeling Mitochondria with Mito Tracker Dyes. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; doi:10.1101/pdb.prot5648.
6. Criollo Caspedes Alfredo G.(2009) Regulación de la autofagia por el receptor del inositol trifosfato (IP₃R) Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
7. Fang Tu, Y. Kaiparettu, A.B. Ma, Y & Wong, L.C (2011) Mitochondria of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 exhibits increased autophagic properties. *Elsevier*. doi:10.1016/j.bbabbio.2011.04.015
8. Flores-Herrera O, Pardo JP, Esparza-Perusquía M, Olvera-Sánchez S, Guerra-Sánchez G y Martínez F. (2014) Dinámica de la red mitocondrial: un recorrido por los fenómenos de fusión-fisión, la arquitectura de las crestas y los supercomplejos respiratorios. Mensaje Bioquímico, Vol. XLI, 201-238, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. *ISSN-0188-137X*
9. Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.W. (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics*; 19:4861-4870.

10. Gerson R, Alban F, Villalobos A y Serrano A. (2007) Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple-negativo. *Salud Pública Mex.*
11. Gogvadze V, Orrenius S and Zhivotovsky B. (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. *Trends in Cell Biology*; doi:10.1016/j.tcb.
12. Guaragnella, N. Giannattasio & S. Moro, L. (2014) Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance. *Elsevier. Biochemical Pharmacology* 92 62–72.
13. Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. (2009) Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Publica Mex*; 51 supl 2:S197-S207.
14. Itakura, E. Kishi C, Inoue K y Mizushima N. (2008). "Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG." *Mol Biol Cell* 19(12): 5360-5372.
15. Kimmelman AC (2011) The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes* doi:10.1101/gad.17558811.
16. Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, Opa1 in apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*; 15:5001-5011.
17. Liesa M, palacin M, and zorzano A. (2009) Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiol Rev*; 89: 799–845.
18. Marc Lacroix and Guy Leclercq. (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*; 83: 249–289.
19. Maycotte P, Gearheart CM, Barnard R, et al. (2014) STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Res*; 74(9):2579-90.
20. Maycotte P & Thorburn (2014) Targeting autophagy in breast cancer. *World Clin Oncol*. ISSN 2218-4333.
21. Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." *Genes Dev* 21(22): 2861-2873.

22. Rambold S, A. Kostecky B & Lippincott-Stewart J. Together we are stronger. (2011) Fusion protects mitochondria from autophagosomal degradation. *Landes Bioscience*; 108:10190.
23. Sastre Serra J. (2012) Importancia de los receptores estrogénicos en el estrés oxidativo y el cáncer. Función, biogénesis y dinámica Mitocondrial. Tesis doctoral. Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la salud. Palma, Esp.
24. Tume – Farfán L. (2014) Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer. *CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 45, No. 3, pp. 200-209.
25. Wai Timothy & Langer Thomas. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. (2015) *Trends in Endocrinology & Metabolism*; 12:001 105.
26. Yeh C, Su C, Huang CF, Lin JK, Lee W, Chang PM, Kuo Y, Liu Y, Wang L, Wu C, Shieh Y, Jan Y, Chuang Y, Hsiao M and Wu ATH. (2013) A Preclinical Evaluation of Antimycin A as a Potential Antilung Cancer Stem Cell Agent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 910451, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/910451>
27. Youle R.J & van der Bliek A.M (2012) Mitochondrial fission, fusion and stress. *Science*. doi:10.1126.
28. Zepeda-Castilla, Recinos-Money, Cuéllar-Hubbe, Robles-Vidal, Maafs-Molina. (2008) Clasificación molecular del cáncer de mama. *Salud Pública Mex*; 76:87-93
29. Zhao J, Zhang J, Yu M, Xie X, Huang H, Wolff D, Abel PW, Tu Y. (2013) Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*; 32(40): 4814–4824. doi:10.1038/onc.2012.494.
30. Zorsano A, Liesa M, Sebastian D, Segles J, Palacin M. (2010) Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*; 21(6):566-74.
31. Zorzno A, Segalés J, Hernández-Alvarez I, y Sorianello E. (2012) Mitochondrial Signaling in Health and Disease. *CRC Press*; ISBN 1439880026, 9781439880029.

15. Anexos.

15.1. Anexo 1. Soluciones de trabajo.

15.1.1. Cultivo celular:

PBS 10X Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a TA o a 4°C	Para 500ml: 40g de NaCl 1g de KCl 5.74g de Na ₂ HPO ₄ 1.2g de KH ₂ PO ₄ diluir en agua destilada y aforar a 500ml
PBS 1X Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a 4°C	Dilución 1:10 de PBS 10X en agua destilada, concentraciones finales: 137mM de NaCl 10mM de de fosfatos 2.1mM de KCl
Tripsina EDTA 10X Nota: Almacenar a -20°C	Para 20ml: 0.5g de tripsina 200µl de EDTA a 0.5M 2ml de PBS 10X Aforar a 20ml de agua desionizada
Medios de cultivo Nota: protocolo realizado en campana de cultivo, al finalizar los medios deben esterilizarse con filtro de campana. Almacenar a 4°C	A) Diluir un sobre para 1L de DMEM (CAISSON) en 1L de agua estéril y agregar 3.7g de NaHCO ₃ B)) Diluir un sobre para 1L de RPMI (CAISSON) en 1L de agua estéril y agregar 2g de NaHCO ₃ C) Diluir un sobre para 1L de DMEM/Ham's F12 1:1 (CAISSON) en 1L de agua estéril y agregar 1.2g de NaHCO ₃

<p>Medio F12 para células MCF10-A</p> <p>Nota: EGF, Hidrocortizona e Insulina se almacenan a -20°C. F12, SC, TC, y P/E se almacenan a 4°C. Finalmente el medio listo para usarse se almacena a 4°C.</p>	<p>Para 100ml:</p> <p>100ml de medio DMEM/Ham's F12</p> <p>5ml de suero de caballo (5% final)</p> <p>20µl de EGF (100µg/ml stock), (20ng/ml final)</p> <p>50µl de Hidrocortizona (Sigma #H-0888) (1mg/ml stock), (0.5mg/ml final)</p> <p>10µl de Toxina Colérica (Sigma #C-8052) (1mg/ml stock), (100ng/ml final)</p> <p>100µl de insulina (Sigma #I-1882) (10mg/ml stock), (10µg/ml final)</p> <p>1ml de penicilina/estreptomicina (solución 100x, Invitrogen #15070-063)</p>
--	--

15.1.2. Tinción con MTR.

<p>Stock MTR 10µM</p> <p>Nota: almacenar a -20°C protegido de la luz</p>	<p>Para 100µl:</p> <p>1µl de MTR stock original</p> <p>100µl de medio (RMPI, DMEM o F12) sin suero.</p>
<p>Stock Hoechst (100 µg/mL)</p> <p>Nota: almacenar a 4°C protegido de la luz</p>	<p>Para 1ml:</p> <p>100µg de Hoechst</p> <p>1ml de PBS1X ó H₂O</p>
<p>Fijador de formaldehído.</p> <p>Nota: Ajustar el pH a 7.4 , almacenar a TA.</p>	<p>Para 10ml.</p> <p>5ml de PBS 10X</p> <p>5ml de folmadehído al 37%</p>

15.1.3. Stock de Antimicina.

<p>Stock Antimicina 40mg/ml (75.8nm)</p> <p>Nota: La antimicina A SIGMA A-8674 es una combinación de Antimicinas A1, A2, A3 y A4 todas con distinto peso molecular.</p> <p>La antimicina 40mg/ml se esteriliza con filtro de campana y se almacena en alícuotas de 20µl a -20°C.</p>	<p>Para 1ml:</p> <p>Se diluyen 40mg de Antimicina A catálogo SIGMA A-8674 en 1ml de etanol al 90%.</p>
<p>Stock de trabajo para MTR</p> <p>Antimicina 80µg/ml</p>	<p>Para un pozo de 35mm:</p> <p>Las células se tratan con 2µl de antimicina 40µg/ml en 1ml de medio de cultivo con suero justo después de haber sido teñidas con MTR, el tratamiento de Antimicina A se incuba durante 45 minutos para células MCF7 y 20 para MDA-MB231 y T-47D. La Antimicina A se enjuaga con PBS y se montan normalmente.</p>
<p>Stock de trabajo para ensayo de clonogenicidad</p>	<p>Stock 1 (1:100): 99µl de PBS 1X más 1µl de Antimicina A 40mg/ml</p> <p>Stock 2 (1:1000): 90µl de PBS 1X más 10µl de Stock 1.</p> <p>Tratamiento 5µM: 6.6µl de stock 1 en 1ml de medio de cultivo con suero.</p> <p>Tratamiento 1µM: 13.2µl de stock 2 en 1ml de medio de cultivo con suero.</p> <p>Tratamiento 0.5µM: 6.6µl de stock 2 en 1ml de medio de cultivo con suero.</p>

15.1.4. Ensayos de Clonogenicidad.

Fijador de ácido acético Nota: usar cubre bocas y almacenar bien cerrado a TA.	Para 500ml: 50ml de ácido acético glacial 50ml de metanol 400ml de agua destilada.
Cristal violeta 0.4% Nota: almacenar a TA.	Para 100ml: 0.4g de cristal violeta 20ml de etanol al 70% 80ml de agua destilada.
Ácido acético 30% Nota: almacenar a TA.	Para 100ml: 30ml de ácido acético glacial Aforar a 100ml de agua destilada.

15.1.5. Células competentes.

LB líquido 1X Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a TA	Para 500ml: 500ml de agua desionizada 5gr de triptona 2.5gr de levadura 2.5gr de NaCl
Glicerol 80% Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a TA	Para 100ml: 80ml de gliserol 100% 20ml de agua estéril (solución inyectable)

15.1.6. Transformación de células competentes.

<p>LB agar</p> <p>Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a 4°C</p>	<p>Para 10 placas:</p> <p>170ml de LB liquido</p> <p>2.55g de agar</p> <p>1.7g de NaCl</p> <p>170µl de antibiótico (ampicilina o kanamicina 10mg/ml)</p>
--	--

15.1.7. Mini prep

<p>Solución de lisis I</p> <p>Nota: esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a 4°C</p>	<p>Para 100ml:</p> <p>50ml de glucosa o sacarosa</p> <p>2.5ml Tris-HCL 1M</p> <p>4ml de EDTA 0.25M</p> <p>Aforar a 100ml con agua</p>
<p>Solución de lisis II</p> <p>Nota: preparar la solución un momento antes de usarse, Se utiliza en relación 1:1</p>	<p>1 volumen de NaOH 0.4N</p> <p>1 volumen de SDS al 2%</p>
<p>Solución de lisis III</p> <p>Nota: el pH debe ajustarse a 5.2 con ácido acético glacial por lo que es recomendable disolver el acetato de sodio con sólo la mitad del volumen final de agua antes de ajustar el pH. Esterilizar a 120°C Y 1.2 atm durante 15 minutos. Almacenar a 4°C</p>	<p>Para 10ml:</p> <p>0.2460g de Acetato de sodio 3M a pH 4.6</p> <p>Aforar a 10ml con agua.</p>
<p>Lisozima</p>	<p>10mg/ml de lisozima en Tris 10mM a pH 8.0 (incubaciones de 45 seg a 37°C)</p> <p>2mg/ml de lisozima en Tris 10mM a pH 8.0 (incubaciones de 5 min a 37°C)</p>
<p>TE 10X pH. 8.0</p>	<p>Tris-Cl (pH 8.0) 100mM</p> <p>EDTA (pH8.0) 10mM</p>

15.1.8. Maxi prep.

Solución de lisis I Nota: almacenar a 4°C	Para 100ml: 50ml de glucosa o sacarosa 2.5ml Tris-HCL 1M 4ml de EDTA 0.25M Aforar a 100ml con agua
Solución de lisis II Nota: Preparar al instante	Para 20ml: 400µl de NaOH 10N 4ml de SDS 5% 17.5ml de agua desionizada
Solución de lisis III Nota: Almacenar a 4°C	Para 10ml: 0.2460g de Acetato de potasio 3M a pH 4.6 Aforar a 10ml con agua.
Buffer de Fenol Nota: Alicuotar y almacenar a -20°C para conservarse por largo periodos o a 4°C para un máximo de 3 meses.	Para 250-500ml: 250ml de fenol 500ml de TE 10X 500ml de TE 1X

15.2. Anexo 2. Glosario de abreviaturas.

- AC: adenocarcinoma.
- AR: receptor de andrógenos.
- BT-549: Breast Tumor- 549.
- CaCl: Cloruro de Calcio.
- CDIP: carcinoma ductal invasivo papilar.
- DCI: carcinoma ductal invasivo
- DMEM: Dulbecco,s Modified Eagle Medium.
- DMEM/F-12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
- EDTA: Ethylenediaminetetraacético acid
- EGFP-LC3: Green Fluorescent Protein- light chain 3 of the microtubule-associated protein 1
- EGF: Epidermal Growth Factor.
- ER: receptor de estrógenos.
- HC: Hidrocortisona.
- KD: Kilo Dalton.
- LB: Luria Bertani caldo.
- LiCl: Cloruro de Litio.
- MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7
- MCF-10A: Michigan Cancer Foundation-10A
- MDA-MB-231: MD Anderson - metastásico de mama-231
- MTR: Mitotracker Red.
- NaCl: Cloruro de Sodio.
- NaN₃: Azida de Sodio.
- NaOH: Hidróxido de Sodio.
- PBS: Phosphate-buffered saline.
- PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial.
- PR: receptor de progesterona
- rpm: revoluciones por minuto.
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium.

- SC: Suero de Caballo
- SDS: Sodium Dodecyl Sulfate.
- STOCK: Solución que posee una concentración alta de uno o varios compuestos o reactivos químicos conocidos.
- TC: Toxina Colérica.
- TE: Solución amortiguadora Tris-EDTA.

15.3. Anexo 3. Líneas celulares.

15.3.1. MCF-7.

MCF-7 es una línea celular aislada en 1970 a partir del tejido de la mama de una mujer de raza caucásica de 69 años de edad en Detroit por Herbert Soule y colaboradores.

Presenta sensibilidad a estrógenos y citoqueratinas. Son poco receptivas a la desmina, endotelina, GAP, y vimentina.

El crecimiento de esta línea se puede inhibir usando el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa).

15.3.2. MDA-MB-231.

MDA-MB-231 es una línea celular aislada a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en el Anderson Hospital. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973.

15.3.3. T-47D.

T-47D es una línea celular aislada a partir de una muestra de derrame pleural de una mujer de 54 años. Es una línea celular con crecimiento adherente al igual que las anteriores.

Es de tipo carcinoma ductal y presenta sensibilidad a estrógenos.

15.3.4. BT-549.

La línea celular de cáncer de mama humano BT549 fue obtenida por el Dr. EW Thompson en el Vincent T. Lombardi Cancer Research Center, Georgetown University Medical Center, Washington, DC.

Fue obtenida de la glándula mamaria de una mujer caucásica de 72 años, es de crecimiento adherente y de tipo carcinoma ductal.

15.3.5. MCF-10A.

La línea celular MCF-10A es un modelo muy útil para el estudio de factores de crecimiento que señalizan a través de vías como Ras / ERK y PI3K / Akt. Estas células se obtuvieron a partir del tejido del pecho de un paciente sano. Normalmente se cultivan en la presencia tanto de EGF e insulina para mantenerlos en proliferación a un ritmo elevado.