



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA



LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y DE ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS) SOBRE EL POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS TUMORALES DE MAMA, MDA-MB 231

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Por

Q.F.B. Osiris Evelyn Aparicio Carrillo

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán

Noviembre 2017

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroendocrinología del instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo la dirección del D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado, para la realización del proyecto mediante la beca como alumna de Maestría (709589).

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla especialmente a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por el apoyo brindado para la conclusión de tesis, mediante la beca con Oficio No. 3035.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Flora Teresa Carrillo Benavides y Jesús Aparicio Cenobio, por siempre estar presentes y apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado, por su amor y cariño en especial a mi madre por su amor y apoyo incondicional, por ser mi razón de ser y la mujer que más amo en este mundo.

A mi tía María Eugenia Carrillo Benavides por ser mi confidente y amiga por estar siempre presente, al igual que mi tío Pedro Rojas Huerta y mi primo Eduardo Rojas Carrillo.

A mis sobrinas Sandra, María Fernanda y Daniela por su ternura y cariño, y por sacarme siempre una sonrisa a pesar del estrés y cansancio.

A toda mi familia por estar presentes en cada objetivo logrado, por su apoyo y enseñarme que todo se puede cumplir en la vida, si realmente lo deseas.

Al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán por todo el apoyo brindado, por su paciencia y por responder siempre con una sonrisa cada una de las preguntas que le hacía. Por ser un gran ejemplo a seguir y por guiarme en todo el proceso de la realización de este proyecto.

A Rubén Avalos López, por su amor, ternura y apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado en buenos y malos momentos, por ser mi soporte y por no dejar que abandone cada una de mis metas y sueños. Además por ser un gran compañero y amigo durante la maestría y en todo este tiempo que hemos estado juntos. Te amo.

A Karina Ruiseco Flores por enseñarme algunas de las técnicas utilizadas, por sus buenos consejos para mejorar los procesos y por su amistad brindada.

A Guadalupe Mendoza Castallega por ser una gran amiga, por cada momento divertido a su lado y por ser mi cómplice incondicional.

A Scarlett Gallardo Arriaga, por su gran amistad y apoyo.

A Alain, Juan Manuel y Zuleyma por su amistad y apoyo que siempre me han brindado.

Y con mucho amor y cariño a todos los compañeros del laboratorio, por su amistad, consejos y momentos compartidos. Los que aún se encuentran Rubén, Scarlett, Karina, Lupita, Juan Manuel, Alain, Aron, Zuly, Maximiliano, Miriam, Selene, Mariana, Eliud y Julieta. Los que estuvieron Rafael y Antonio.

A mi comité revisor, Dra. Amira del Rayo Flores Urbina, Dra. Bertha Alicia León Chávez y Dr. Rubén Antonio Vázquez Roque, por sus observaciones y comentarios durante el desarrollo de este proyecto, que siempre fueron objetivos para poder mejorar el trabajo realizado.

INDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
CÁNCER.	12
Etiología y Epidemiología del cáncer	12
CÁNCER DE MAMA	15
Epidemiología.	15
Factores de riesgo implicados en el cáncer de mama.	17
a) Predisposición Genética.	17
b) Tener el primer parto a edad madura o Nuliparidad.	17
c) Toma de Anticonceptivos Orales y Tratamientos de sustitución hormonal.	18
d) Inicio temprano de la menstruación, Menopausia tardía y Niveles elevados de estrógenos	18
e) Tabaco y Alcohol	18
f) Dieta alta en grasas animales y trans, Obesidad.	19
g) Estratificación y Clasificación del Cáncer de mama.	19
METÁSTASIS Y OXIDO NITRICO (NO).	21
NO y su relación con el cáncer de mama.	22
Vías de señalización del NO implicadas en el cáncer.	24
El Efecto dual del NO con respecto a la concentración.	25
NO/ RNS y su implicación en la carcinogénesis.	27
S-nitrosilación de proteínas.	28
Lipoperoxidación y Cáncer de mama.	29
JUSTIFICACION	31
HIPOTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
METODOLOGIA	33
Cultivo celular de la línea tumoral MDA-MB 231	33
Tratamiento con NOC-18 y ODQ.	33
Ensayo de Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	34
a) Extracción de ARN total	34
b) Síntesis de ADN complementario (ADNc)	34
c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
d) Separación electroforética de los productos de PCR	35
e) Densitometría	36
Ensayo de migración cámaras <i>Transwell</i> .	36
Ensayo de quimiorresistencia con MTT	37
Determinación de Nitritos (NO ₂).	38

Determinación de MDA (lipoperoxidación).	38
Ensayo de Western Blot.	39
Ensayo de Western Blot para proteínas <i>s</i> -nitrosiladas.	39
Análisis Estadístico.	40
RESULTADOS	41
NOC-18 produce altas concentraciones de Nitritos (NO ₂).	41
NO exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.	43
NO reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.	44
La capacidad de quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a Doxorubicina resulta reducida por el NO.	46
NO exacerba la condición inflamatoria en las células MDA-MB 231, incrementando los niveles de expresión de IL-6 e IL-8.	48
La expresión de IL-6 es dependiente de la translocación del NF-κB al núcleo, mientras que para IL-8 es independiente.	50
NO exacerba los niveles de expresión de proteínas involucradas en la migración e invasión celular.	52
NO exacerba los niveles de expresión de proteínas involucradas en la angiogénesis.	54
Las Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS) no producen lipoperoxidación en la membrana plasmática de las células MDA-MB 231.	57
NOC-18 y el bloqueo de la GCs inducen <i>s</i> -nitrosilación de proteínas en las células MDA-MB 231.	59
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68
MATERIAL SUPLEMENTARIO	80

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

Bcl-2: Linfoma de células B tipo 2

BRCA1: Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1 (de sus siglas en inglés).

BRCA2: Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2 (de sus siglas en inglés).

cDNA: Cadena de ácido desoxirribonucleico.

cNOS: Sintasa de Óxido Nítrico constitutiva.

c-Src: Src quinasa celular

DCIS: Carcinoma ductal in situ (de sus siglas en inglés).

DOXO: Doxorubicina

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eNOS: Sintasa de Óxido Nítrico endotelial.

ER: Receptor a estrógenos

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

GCs: Guanilato Ciclasa soluble

GMPc: Guanosin Monofosfato cíclico

HCl: Ácido clorhídrico

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HIF-1 α : Factor inducible de hipoxia subunidad uno alpha

HR: Receptor hormonal

IL-6: Interleucina seis

IL-8: Interleucina ocho

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico inducible

KCl: Cloruro de Potasio

kDa: Kilodaltons

KH₂PO₄: Fosfato de Potasio monobásico

LCIS: carcinoma lobular in situ

MDA: Malonil-dialdehído

MTT: Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide

MKPs: Proteína fosfatasa activada por mitógenos

MMP9: Metaloproteinasa nueve

MMTS: Metanotiosulfonato de Metilo

mV: Milivoltios

N₂O₃: Trióxido de dinitrogeno

Na₂HPO₄: Hidrogeno fosfato de sodio

Na₂Se₃: Selenito de Sodio

NaCl: Cloruro de Sodio

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

Nav 1.5: Canal de sodio dependiente de voltaje Nav 1.5

NED: N-naftilendiamina dihidroclorada

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

nNOS: Sintasa de Óxido Nítrico neural

NO: Óxido Nítrico

NO₂⁻: Nitritos

NO₃⁻: Nitratos

NOC-18: 2,2'- (Hydroxynitrosohydrazino) bis-etanamina

NOS: Sintasa de Óxido Nítrico

O₂: Oxígeno

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

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO⁻: Peróxido de Hidrogeno

pb: Pares de bases

PBS: Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (de sus siglas en ingles)

PHD: Prolil hidroxilasas (de sus siglas en ingles)

PKG: Proteína Quinasa G

PR: Receptor a progesterona

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno

RT-PCR: Retrotranscripción- Reacción en cadena de la Polimerasa

SFB: Suero Fetal Bobino

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina

TNM: Tumor Nódulos Metástasis

TTX: Tetradoxina

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (por sus siglas en ingles)

RESUMEN

El cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia a nivel mundial en la población femenina adulta, y es la segunda causa de muerte en el mismo segmento poblacional. Un alto porcentaje de las muertes provocadas por el cáncer de mama, son debido al desarrollo de metástasis. Ha resultado sumamente importante estudiar las bases moleculares de la metástasis, con el fin de identificar biomarcadores para ser considerados como blancos farmacológicos para inhibir la progresión tumoral. Esto resulta de sumo interés para el caso del cáncer de mama triple negativo, ya que hasta el momento se carece de un tratamiento farmacológico eficaz. Diversos estudios reportados en la literatura científica, muestran que el NO funcionaría como una señal extracelular capaz de incidir en el potencial metastásico, se ha correlacionado ampliamente la sobre-expresión de iNOS, enzima que sintetiza NO, con el grado de malignidad del tumor.

En el presente trabajo evaluamos el papel del NO sobre el potencial metastásico de las células MDA-MB 231, modelo celular del cáncer de mama triple negativo, a través de la vía independiente de la actividad de la GCs. Para el desarrollo del trabajo experimental utilizamos NOC-18, que es un donador estable y eficiente de NO, y ODQ, un inhibidor específico de la GCs. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por lo menos 72 horas en presencia de NOC-18, ODQ y NOC-18 + ODQ, para evaluar algunas de las características del potencial metastásico como son proliferación, migración y quimiorresistencia.

Los resultados obtenidos muestran que el NO liberado por el NOC-18, reduce el número de células y la capacidad migratoria en una subpoblación significativa de la línea celular MDA-MB 231, mientras que en otra subpoblación de células MDA-MB 231 sobreviviente al efecto del NO, induce un incremento en los niveles de expresión de un marcador nuclear de proliferación celular (Ki-67), así como de proteínas asociadas a la migración e invasión celular, Nav 1.5 y MMP9. La capacidad de quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a la Doxorubicina no resulta afectada de manera significativa por la presencia de NOC-18. Por su parte, la presencia de NO induce un incremento en la expresión de IL-6, IL-8, HIF-1 α y VEGF, proteínas asociadas positivamente a la migración celular y angiogénesis.

El incremento de los niveles de NO y el bloqueo de la actividad de la GCs, provocan un incremento en los niveles de RNS, por lo que investigamos si estos altos niveles de RNS inciden sobre la lipoperoxidación de la membrana plasmática o la nitrosilación de proteínas, los resultados obtenidos muestran que la presencia de RNS no altera los niveles de lipoperoxidación de la membrana plasmática, pero si el nivel de proteínas nitrosiladas. El conocimiento de que el NO a través de la vía independiente de GCs, pueda ser una señal extracelular que exacerbe el potencial metastásico de las células tumorales, hace posible proponer a la iNOS como un blanco farmacológico para reducir el desarrollo y progresión tumoral.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un amplio número de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (OMS, 2017). El cuerpo humano está formado por trillones de células. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas o tumores (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). Una característica muy importante en el cáncer es la rápida multiplicación de las células anormales que se reproducen sin control, invadiendo los tejidos cercanos y diseminándose hacia otros órganos distantes produciendo metástasis (OMS, 2017; Gupta & Massagué, 2006). La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer, en el año 2015 se atribuyeron 8.8 millones de defunciones (OMS, 2017).

Etiología y Epidemiología del cáncer.

La etiología del cáncer puede ser multifactorial, dentro de estos factores destacan su origen genético o epigenético. El origen genético es el responsable de aproximadamente el 10%, y el otro 90% corresponde a los factores epigenéticos (Siegel et al., 2014). Las alteraciones que sufren las células son el resultado de la interacción entre los factores génicos y los epigénicos como:

- Carcinógenos físicos: radiación ultravioleta e ionizante.
- Carcinógenos químicos: asbesto, aflatoxinas, arsénico.
- Carcinógenos biológicos: infecciones causadas por algunos virus, bacterias, el envejecimiento.

Aproximadamente el 30% de las defunciones por esta enfermedad se deben a cinco factores de riesgo relacionados con estilos de vida y de alimentación como lo son un elevado índice de masa corporal, falta de actividad física, bajo consumo de frutas y verduras, tabaquismo y

alcoholismo. Infecciones como el virus del papiloma humano, hepatitis B y C (INEGI, 2017; OMS, 2017). Los factores de riesgo se van acumulando con la edad, combinándose con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder su eficiencia (OMS, 2017). Las células de cáncer presentan alteraciones en varios de sus circuitos reguladores, responsables entre otros, de la proliferación celular y la homeostasis (Hanahan & Weiberng, 2000). Es un principio, en el año 2000, Hanahan y Weiberng, consideraron solo 6 circuitos regulatorios alterados, pero en el 2011, agregaron cuatro más (obsérvese en la Figura 1):

1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento.
3. Evasión de la respuesta inmune
4. Potencial replicativo ilimitado.
5. Inflamación promotora de tumor.
6. Invasión y metástasis.
7. Angiogénesis sostenida.
8. Inestabilidad del genoma y mutación.
9. Evasión de la apoptosis.
10. Desregulación de energéticos celulares

(Hanahan & Weiberng, 2011).

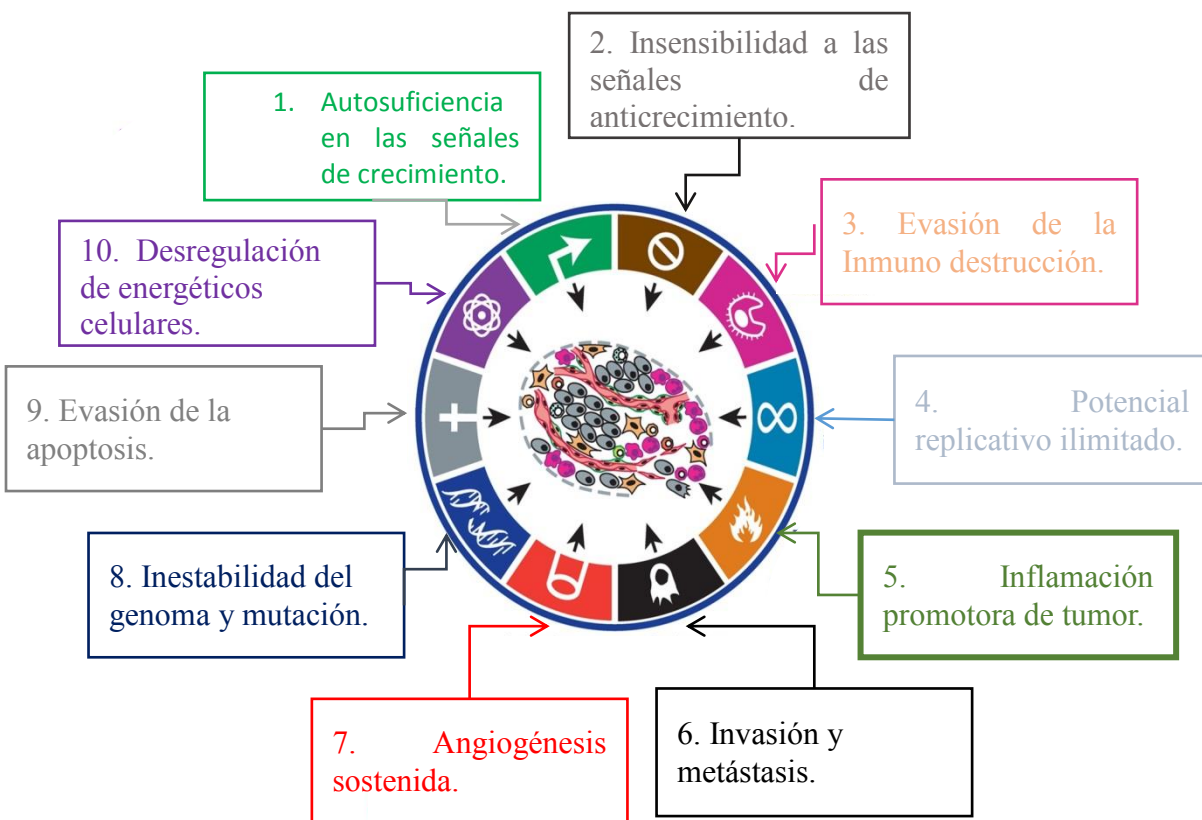


FIGURA 1. Características de las células tumorales (Imagen tomada y modificada Hanahan y Weiberg, 2011).

Datos epidemiológicos indican que la incidencia de nuevos casos de cáncer va en aumento, en el año 2008 se reportaron 12.7 millones de casos nuevos y 7.6 millones de muertes (De Martel C et al., 2012). En el año 2012 la OMS reportó 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes, en el 2015 8.8 millones de muertes ocasionadas por esta enfermedad, convirtiéndose así en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y prevé que el número de nuevos casos aumente a 22 millones de nuevos casos en los próximos 20 años (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). Asimismo, destaca que aproximadamente 70% de las muertes por cáncer se presentan en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2017). En los Estado Unidos de América, se diagnosticaron en el año 2016, 1,685 210 nuevos casos de cáncer y murieron 595,690 personas por dicha enfermedad (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). En México, durante el año 2014, se observó que dos de cada 10 casos de cáncer en varones de 20 años y más se deben a cáncer de órganos

digestivos, mientras que en las mujeres pertenecientes al mismo grupo de edad, 3 de cada 10 presenta tumores malignos de cáncer de mama, convirtiéndose estos dos tipos de cáncer, en las principales neoplasias malignas para cada sexo, seguido del cáncer en órganos genitales (INEGI, 2017).

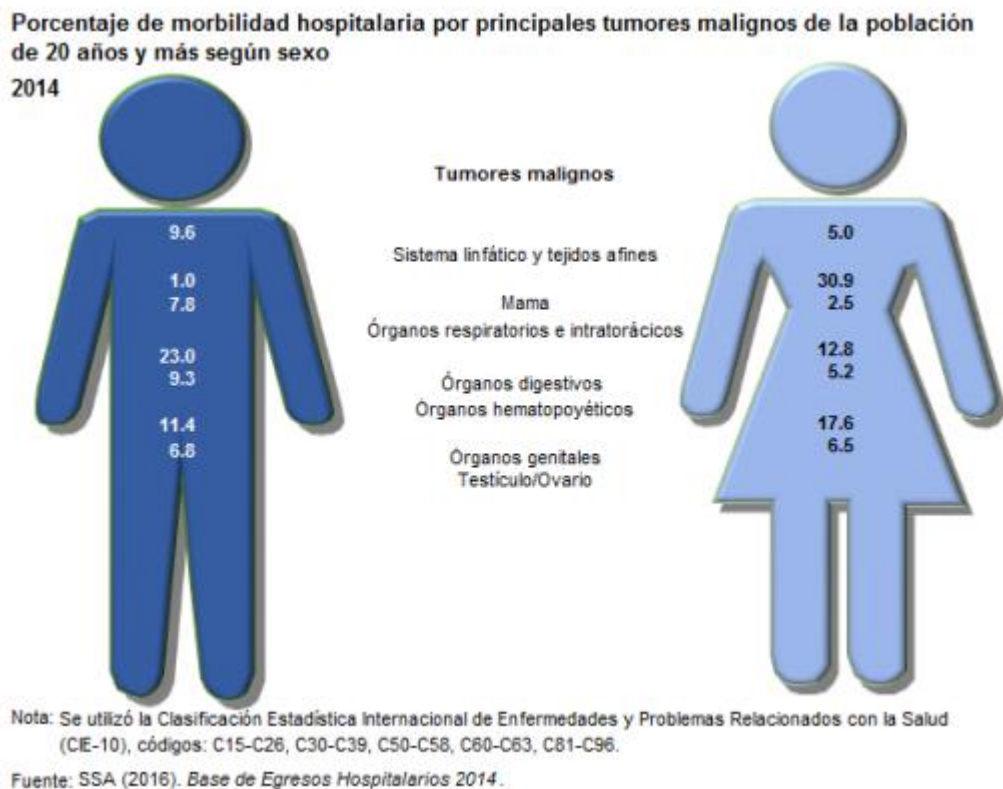


FIGURA 2. Datos estadísticos de los tipos de cáncer más frecuentes, que se presentan en hombres y mujeres de 20 años y más. Tomados de INEGI, 2017.

CÁNCER DE MAMA.

Epidemiología.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres adultas a nivel mundial (Jemal et al., 2011; Ham M., y Moon A., 2013). La mortalidad por esta enfermedad ocurre con mayor frecuencia en países de bajos ingresos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección temprana. La Organización

Mundial de la Salud señala que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad (INEGI, 2016; Organización Mundial de la Salud, OMS, 2016b). En México durante 2014, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria, entre los tumores malignos para la población mexicana de 20 años y más, representando el 19.4%, por lo que tres de cada diez mujeres son hospitalizadas por dicha causa, y aunque en los varones apenas representa 1% de los ingresos hospitalarios por tumores malignos, desmitifica la creencia de que esta enfermedad sea exclusiva de las mujeres (INEGI, 2016). En el año 2014 se presentó la incidencia más alta, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil, mientras que en 2015 la incidencia disminuyó un poco con un 27.90 por cada 100 mil mujeres de 20 años y más (INEGI, 2016). En el estado de Puebla la incidencia aproximada es de 30.01 a 40.00 casos por cada 100 mil mujeres, y con respecto a la tasa de mortalidad la tasa es de 10.01 a 13.50 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más (INEGI, 2016).

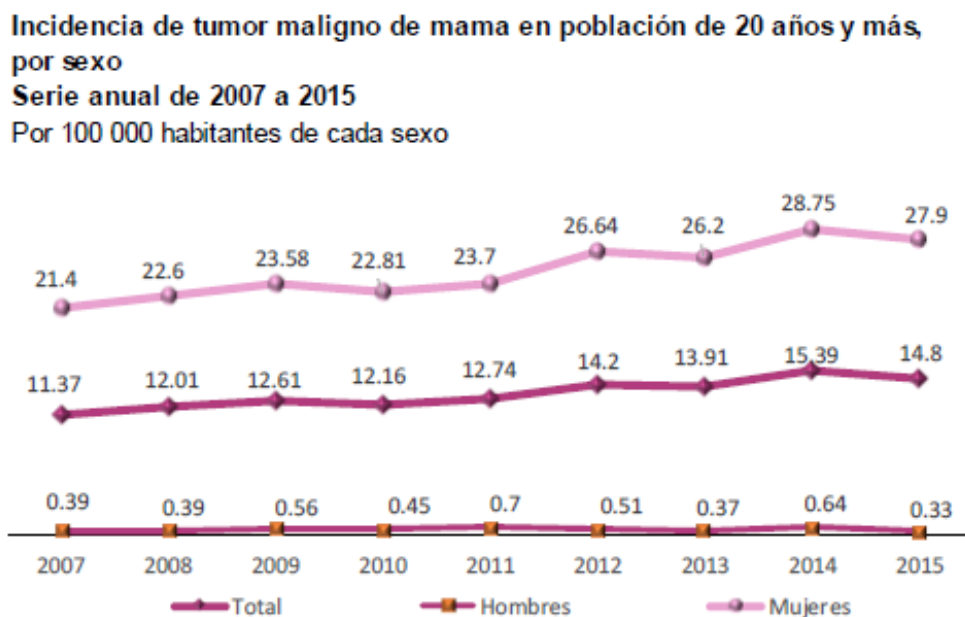


FIGURA 3. Datos estadísticos tomados de INEGI, 2016.

Factores de riesgo implicados en el cáncer de mama.

Al igual que el resto de los diferentes tipos de cáncer, el origen del cáncer de mama es multifactorial, sobresaliendo una serie de factores que contribuyen directamente a su desarrollo:

- Tener el primer parto a una edad madura.
- No tener hijos.
- Toma de anticonceptivos orales y tratamientos de sustitución hormonal
- Niveles elevados de estrógenos.
- Inicio temprano de la menstruación.
- Menopausia tardía.
- Tabaquismo.
- Consumo de alcohol.
- Dieta alta en grasas animales y trans, Obesidad.

Todos estos factores de riesgo combinados con factores ambientales y genéticos como la herencia de mutaciones BRCA1, BRCA2 y p53 (alteraciones génicas), contribuyen al desarrollo del cáncer de mama (INEGI, 2016; OMS, 2016a; IMSS, 2015).

a) Predisposición Genética.

Las mutaciones génicas o alteraciones genéticas, en genes como BRCA1 y BRCA2 representan aproximadamente el 5% - 10% de los cánceres de mama femeninos, del 5% - 20% de los masculinos y del 15% - 20% del total de los cáncer de mama (Turnbull & Rahman, 20008; Tung et al., 2016; American Cancer Society, 2017). Este tipo de mutaciones son muy raras se encuentran presentes aproximadamente en el 1% de la población (American Cancer Society, 2017).

b) Tener el primer parto a edad madura o Nuliparidad.

Tener un primer hijo después de los 35 años se asocia a una predisposición de padecer cáncer de mama, así como el no tener hijos. En contraste se asocia un menor riesgo en mujeres que tiene hijos antes de los 35 y un mayor número de hijos (American Cancer Society, 2017)

c) Toma de Anticonceptivos Orales y Tratamientos de sustitución hormonal.

Los anticonceptivos orales combinados como estrógenos y progesterona se asocian con un pequeño aumento con riesgo de cáncer de mama, particularmente entre las mujeres que comienzan a usarlos antes de los 20 años o antes del primer embarazo, riesgo que parece disminuir cuando se dejan de utilizar (Bassuk y Manson, 2015; American Cancer Society, 2017). En la terapia hormonal o terapia de remplazo hormonal en la menopausia, incrementa el riesgo de cáncer de mama, debido al uso combinado de estrógenos con progesterona. Este riesgo se asocia aún más, cuando las mujeres comienzan a usar estos tratamientos inmediatamente después de la aparición de la menopausia en comparación con las que inician el tratamiento más tarde (Chlebowski et al., 2013; Manson et al., 2013; American Cancer Society, 2017).

d) Inicio temprano de la menstruación, Menopausia tardía y Niveles elevados de estrógenos

El riesgo es aproximadamente un 20% más alto entre las niñas que comienzan a menstruar antes de los 11 años de edad en comparación con los que comienzan a la edad de 13 años. Asimismo, las mujeres que experimentan menopausia a la edad de 55 años o más tienen un riesgo un 12% más alto en comparación con los que lo hacen entre las edades 50-54, el aumento del riesgo puede deberse a una mayor exposición a la vida reproductiva (Anderson et al., 2014; American Cancer Society, 2017). Las mujeres posmenopáusicas con niveles naturalmente altos de ciertas hormonas sexuales endógenas tienen aproximadamente el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres con los niveles más bajos, los niveles altos de hormonas circulantes se asocian y pueden reflejar los efectos de otros factores de riesgo de cáncer de mama, como la obesidad posmenopáusica (Key et al., 2011; American Cancer Society, 2017).

e) Tabaco y Alcohol

La Sociedad Americana del Cáncer indicó que las mujeres que iniciaron el hábito de fumar antes del nacimiento de su primer hijo tuvieron un riesgo 21% mayor de cáncer de mama que las mujeres que nunca fumaron, algunos estudios sugieren el humo puede aumentar el riesgo, particularmente para el cáncer de mama premenopáusico. Fumar puede aumentar el

riesgo particularmente a largo plazo (Macacu et al., 2015). Por otro lado, numerosos estudios han confirmado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de cáncer de mama en las mujeres en un 7% -10% por cada 10g (aproximadamente una bebida) de alcohol consumido por día en promedio. Las mujeres que tienen 2-3 bebidas alcohólicas al día un 20% más alto riesgo de cáncer de mama en comparación con los no bebedores (Liu et al., 2015). También existe evidencia de que el consumo de alcohol antes del primer embarazo puede afectar particularmente al riesgo. Uno de los mecanismos por los cuales el alcohol aumenta el riesgo es incrementando los niveles de estrógeno y andrógenos (Singletary y Gapstur, 2001; American Cancer Society, 2017).

f) Dieta alta en grasas animales y trans, Obesidad.

A pesar de que los estudios iniciales sobre la dieta y el cáncer de mama se centraron en la ingesta de grasas, estudios recientes concluyeron que no había asociación. Pero si hay correlación positiva, entre el desarrollo de cáncer de mama con el sobrepeso, en mujeres obesas se reporta el padecimiento de cáncer de mama 2 veces más que en mujeres delgadas (La Vecchia et al., 2011; American Cancer Society, 2017). Se cree que esto se debe a que el tejido graso es una fuente rica de estrógenos, también se ha relacionado los niveles altos de insulina con el desarrollo de cáncer de mama en las mujeres obesas. La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar diabetes tipo II, la cual también se considera como un factor de riesgo en mujeres postmenopáusicas (American Cancer Society, 2017). En contraste, los estudios han encontrado que la obesidad protege contra el cáncer de mama premenopáusicas. Un gran meta-análisis reveló que las mujeres entre 40 y 49 años de edad, el riesgo de desarrollar cáncer de mama era un 14% menor en las mujeres con sobrepeso y un 26% menor en las mujeres obesas en comparación con las mujeres que tenían peso normal (Nelson et al., 2012; American Cancer Society, 2017).

Estratificación y Clasificación del Cáncer de mama.

Para la estadificación del cáncer de mama existen dos sistemas la clasificación TNM: donde T se refiere al tamaño y la extensión del tumor principal o primario, N se refiere a la extensión de cáncer que se ha diseminado a los nódulos linfáticos cercanos y M que indica si el cáncer ha producido metástasis. Una vez determinado el TNM, se asigna una etapa de 0, I, II, III y IV, estando la etapa 0 in situ (las células anormales no han penetrado en los

conductos o las glándulas de las que se originaron), la etapa I de cáncer invasivo en estadio temprano y la etapa IV la enfermedad más avanzada (Giuliano et al., 2017).

Estadio 0: corresponde al estadio *in situ* se refiere a la presencia de células anormales que no han invadido tejidos cercanos.

Estadio I y II: Etapa local se refiere a los cánceres confinados a la mama.

Estadio II y III: Etapa regional se refiere a tumores que se han diseminado al tejido circundante o a ganglios linfáticos cercanos.

Estadio IV: Etapa distante se refiere a los cánceres que se han extendido a órganos lejanos o ganglios linfáticos por encima de la clavícula (American Cancer Society, 2017).

El cáncer de mama, generalmente se desarrolla en los conductos lactíferos o en los lobulillos (carcinoma ductal y lobulillar), en los lobulillos es donde se produce la leche y los conductos por donde se transporta hasta el pezón (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). Estos dos tipos principales de cáncer de mama *in situ*: carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y carcinoma lobular *in situ* (LCIS), también conocido como neoplasia lobular, representan el 83% y el 13% respectivamente del total de los casos de cáncer de mama (American Cancer Society, 2017). La mayoría de los cánceres de mama son invasivos o infiltrados, existen 21 subtipos histológicos distintos y al menos cuatro subtipos moleculares diferentes que difieren en términos de factores de riesgo. La expresión génica y las técnicas de perfiles han permitido una mejor comprensión de los subtipos moleculares de los cánceres de mama. Las aproximaciones de los subtipos moleculares se han identificado utilizando marcadores biológicos evaluados de forma rutinaria, incluyendo la presencia o ausencia de receptores hormonales (estrógeno o progesterona) (HR + / HR-) y niveles excesivos de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2,) y / o copias adicionales del gen HER2 (HER2 + / HER2 -) (Cheang et al., 2015). Los subtipos moleculares son:

- Luminal A (HR + / HER2-) (71%). Estos cánceres tienden a ser de crecimiento lento y menos agresivos que otros subtipos. Los tumores Luminal A se asocian con el pronóstico más favorable (Blows et al., 2010)
- Triple negativo (HR- / HER2-) (12%). Dichos cánceres son dos veces más comunes en las mujeres negras que en las mujeres blancas en los Estados Unidos y también

son más comunes en las mujeres premenopáusicas. Los cánceres de mama triple negativos tienen un peor pronóstico a corto plazo que otros subtipos, en parte porque actualmente no hay terapias dirigidas para estos tumores (Blows et al., 2010; Haque et al., 2012)

- Luminal B (HR + / HER2 +) (12%). Al igual que los cánceres luminal A, los cánceres luminales B son ER + y / o PR + y se definen adicionalmente por ser altamente positivos para Ki67 (indicador de una gran proporción de células que se dividen activamente) o HER2. Los cánceres de mama Luminal B tienden a ser de grado más alto y se asocian con una supervivencia más pobre que los cánceres luminal A (Bianchini et al., 2016)
- HER2-enriquecido (HR- / HER2 +) (5%). Los cánceres enriquecidos con HER2 tienden a crecer y propagarse más agresivamente que otros subtipos y se asocian con un peor pronóstico a corto plazo en comparación con los cánceres de mama HR⁺. Sin embargo, el reciente uso generalizado de terapias dirigidas contra el cáncer HER2⁺ ha mejorado los resultados para estos pacientes (Haque et al., 2012; Bianchini et al., 2016).

Una característica común que presentan las células tumorales de mama es que conforme va ocurriendo su transformación maligna va incrementándose de manera simultánea su potencial metastásico, representado por un aumento en su capacidad proliferativa, migratoria y quimiorresistente, lo cual le permite a corto, mediano y largo plazo invadir tejidos y órganos cercanos y distantes al tumor primario del cual se originaron. Los datos clínicos revelan que la principal causa de muerte por cáncer de mama se debe a la presencia de metástasis, por lo cual resulta de gran importancia entender a detalle dicho proceso, así como la identificación de los factores extrínsecos e intrínsecos inductores de la metástasis.

METÁSTASIS Y NO.

La metástasis es el estado más crítico de la tumorigenesis, más del 90% de la mortalidad por cáncer es causada por la metástasis. El proceso de metástasis puede ser dividido en cuatro etapas, la primera es la transición epitelio-mesénquima, la segunda es la invasión de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos, la tercera es que las células

cancerosas sobrevivan y viajen a través de la circulación y la última etapa es la extravasación de las células tumorales y su infiltración a nuevos tejidos y órganos (Grivennikov et al., 2010).

La transición epitelio-mesénquima es un proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren características fenotípicas mesenquimales, pierden la interacción célula-célula, aumentan su movilidad, degradan componentes de la matriz extracelular y la lámina basal, lo que les permite llegar a vasos sanguíneos o linfáticos (Kalluri y Weinberg, 2009). Las células tumorales de mama muestran gran afinidad por invadir médula ósea, pulmón e hígado. La migración de las células tumorales comparte algunas similitudes con la migración de los macrófagos que se presenta cuando ocurre un proceso infeccioso, una coincidencia es la participación del NO como segundo mensajero (Müller et al., 2001), por ejemplo, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, que son generados por infiltración de células inflamatorias inducen un aumento en la proliferación de las células tumorales (Gupta & Massagué, 2006).

Una característica adicional que presentan las células tumorales, es su resistencia a la apoptosis, ya que estas células requieren de una defensa adicional frente a las condiciones adversas que se presentan en el microambiente tumoral, como es la falta de nutrientes y oxígeno, que en su momento pudieran llevar a la muerte celular. Las células tumorales presentan una sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas y una reducción o estabilización de proteínas apoptóticas, estos eventos están relacionados con un aumento en los niveles de especies reactivas de nitrógenos (NRS), generadas a partir de la producción de NO (Mehlen & Puisieux, 2006).

NO y su relación con el cáncer de mama.

El NO (NO) es una molécula de señalización biológica, que además de participar en el funcionamiento del sistema cardiovascular, sistema nervioso y sistema inmune, regula la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo y progresión del cáncer, estimulando la expresión de oncogenes o inhibiendo la expresión de genes supresores de tumores (Förstermann et al., 1986; Rapoport et al., 1983; Khan et al., 1996; Akhand et al.,

1999; Liu et al., 2002). El NO es sintetizada por la enzima sintasa de NO (NOS) a partir de L-arginina y oxígeno (Zhu et al., 2015). En el humano, se han caracterizado tres isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS ó NOS1), NOS inducible (iNOS ó NOS2) y NOS endotelial (eNOS ó NOS3). Las isoformas eNOS y nNOS son consideradas constitutivas, ya que su expresión depende de las concentraciones de calcio intracelular, mientras que la isoforma inducible, iNOS, se expresa fundamentalmente en células expuestas a endotoxinas y a diversas toxinas pro-inflamatorias (Burke et al., 2013; Vannini et al., 2015). Las NOS constitutiva (cNOS), cuando se activa sólo producen concentraciones nanomolares de NO durante segundos o minutos. Sin embargo, iNOS la isoforma inducible genera mayores cantidades de NO, en el rango micromolar y por intervalos más largos, como por horas o días (Michel & Feron, 1997; Vannini et al., 2015).

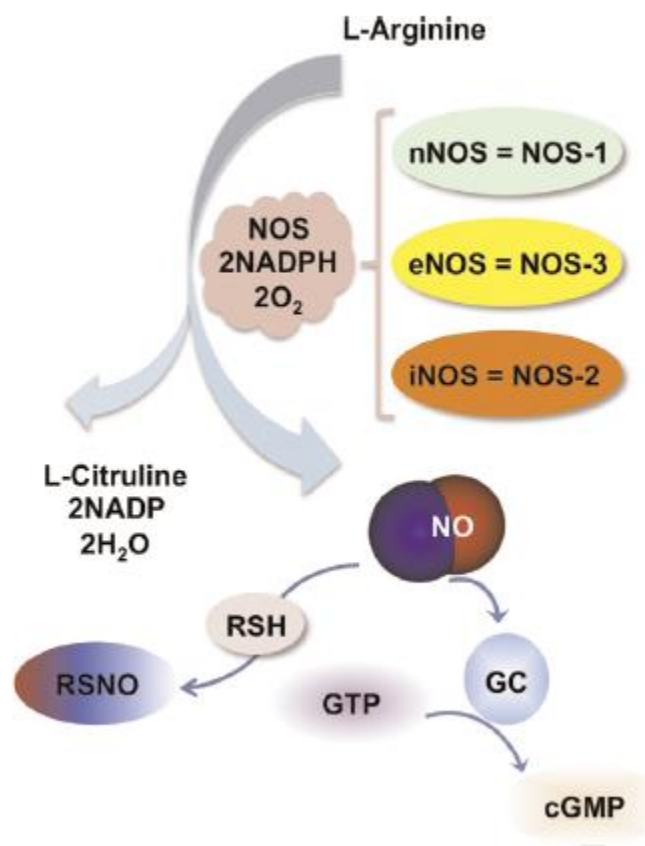


FIGURA 4. Vía de síntesis del NO (Tomada y modificada de Vannini et al., 2015).

Una desregulación en la producción de NO y variaciones en los niveles de expresión de la iNOS han sido implicados en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama, relacionándolos tanto con la progresión tumoral y metástasis, como con la supresión del tumor (Hickok & Thomas, 2010). El NO ejerce diferentes efectos en la carcinogénesis, como es el daño al ADN, activación de oncogenes, inhibición de las enzimas responsables de la reparación del ADN y de genes supresores de tumores, así como la modulación de la apoptosis y metástasis (Vannini et al., 2015; Wink et al., 1998). Durante varios años, se ha demostrado un efecto dual del NO sobre el cáncer, tomando en cuenta dos características, la primera que el NO producido puede funcionar como anti-tumoral, y la segunda que la sobreexpresión de las enzimas productoras de NO (NOS), tienen efectos pro-tumorales (Weiming et al., 2002).

En varios tipos de cáncer se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de expresión de iNOS y el grado de malignidad del tumor, por ejemplo, en cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, glioblastoma y el cáncer de mama (Granados et al., 2015). Se han realizado múltiples estudios donde se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles de expresión de iNOS, en etapas más desarrolladas del cáncer de mama (estadio III), que en etapas menos desarrolladas (estadio I) (Ranganathan et al., 2016). En cultivos celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB231, Jin y colaboradores en 2015, sugirieron que los niveles altos de iNOS/NO están asociados con una menor efectividad a la quimioterapia en el cáncer triple negativo. Por lo que la expresión incrementada de iNOS se ha postulado recientemente como un factor de mal pronóstico para la supervivencia en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Granados et al., 2015; Jin et al., 2015).

Vías de señalización del NO implicadas en el cáncer.

El NO posee dos vías de señalización, una de ellas es la dependiente de la Guanilato Ciclasa soluble (GCs) con la consecuente generación de Guanosin Monofosfato cíclico (GMPc) y la otra vía, que es independiente de la GCs, también conocida como la vía Oxidativa. En la vía dependiente de GCs (NO-GCs-GMPc), el NO reacciona con el sitio activo de la GCs y produce GMPc; el GMPc activa a proteínas cinasas dependientes de dicho nucleótido cíclico (PKG), las cuales fosforilan diferentes sustratos proteicos

relacionados con el potencial metastásico de las células tumorales. Existen otros elementos que pueden ser activados por GMPc como canales iónicos y proteínas dependientes de fosfodiesterasas (Friebe & Koesling, 2003; Vannini et al., 2015).

La vía independiente o vía oxidativa, por su parte, puede provocar modificaciones postraduccionales en las proteínas, así como también en la transcripción, al inducir alteraciones del ADN. Algunas de los factores que pueden sufrir cambios o alteraciones en la transcripción son el NF- κ B y HIF-1 α , debido a reacciones oxido-reducción que está regulado por S-nitrosilación (Hess et al., 2005; Liu et al., 2005). El NO reacciona con los radicales de oxígeno O_2 para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es un agente fuertemente nitrosante y que junto con los nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y trióxido de dinitrogeno (N_2O_3) pueden S-nitrosilar proteínas de señalización.

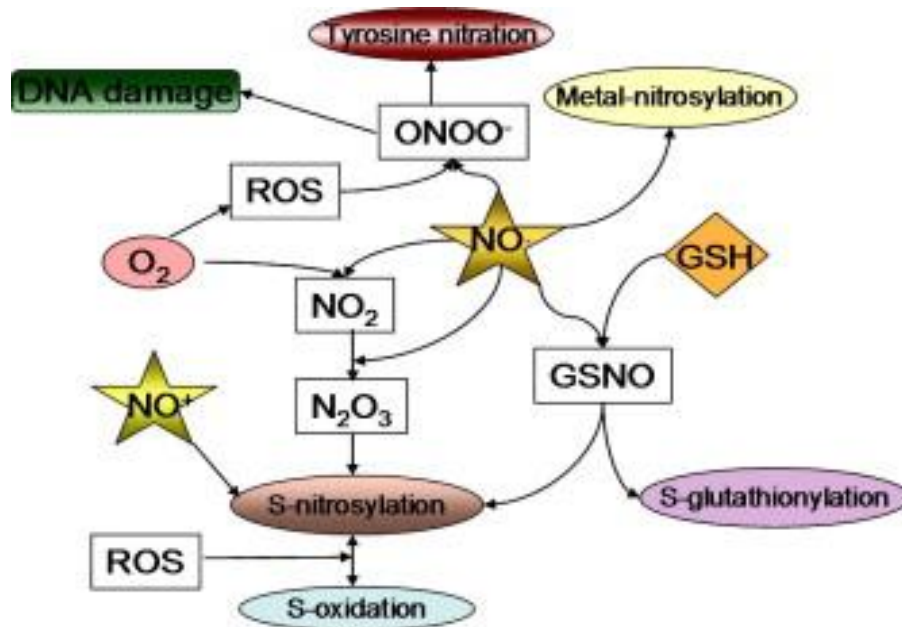


FIGURA 5. Vía metabólica del NO (Tomado y Modificado de León et al., 2008).

El Efecto dual del NO con respecto a la concentración.

La función fisiología del NO depende principalmente de la concentración. A concentraciones bajas, el NO actúa como una molécula de señalización que regula la relajación del músculo liso y el flujo sanguíneo, la neurotransmisión, la actividad

plaquetaria, la homeostasis del hierro, la supervivencia celular y la proliferación celular tanto en células normales como cancerígenas, mientras que a altas concentraciones se cree que modula las actividades antitumorales mediadas por el sistema inmune (Wink y Mitchell, 1998; Vannini et al., 2015). Basándose en varios informes de mediciones de NO en tejidos y de donadores de NO exógenos, se han establecido concentraciones de NO en dosis bajas (50-100 nM), dosis altas (400-1000 nM) o dosis intermedia (100-400 nM) (Ridnour et al., 2005; Isenberg et al., 2005). A bajas concentraciones (1-100nM), actúa como una molécula de señalización que favorece el potencial metastásico de células tumorales, mientras que a altas concentraciones (400-1000nM), induce apoptosis (Vannini et al., 2015).

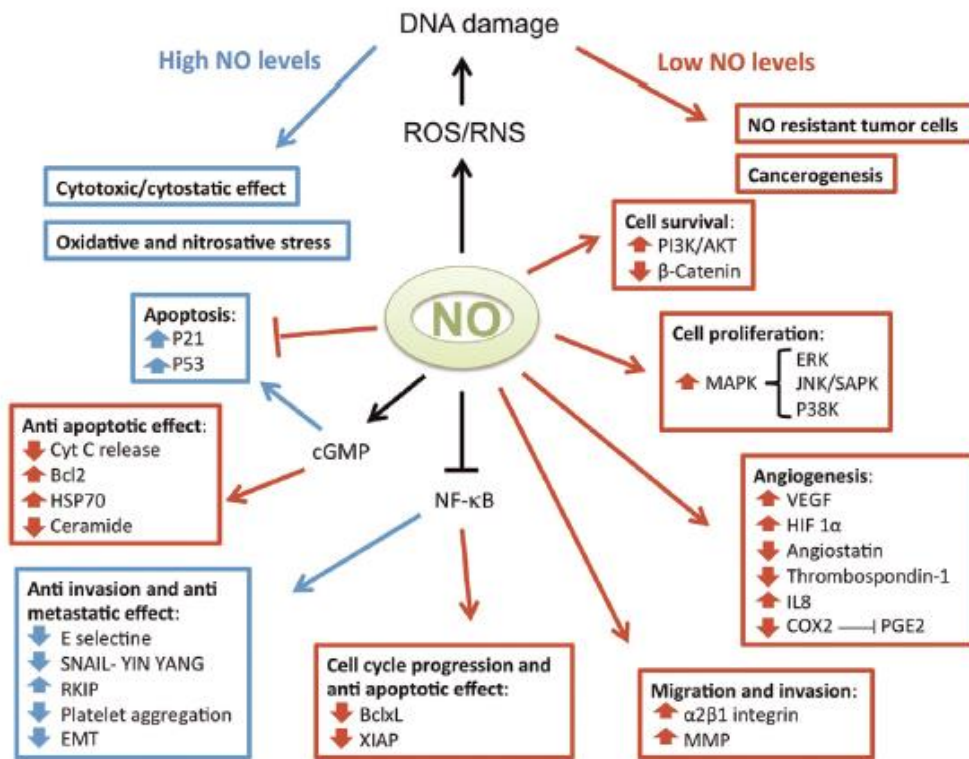


FIGURA 6. Efectos fisiológicos del NO (Tomada y Modificada de Vannini et al., 2015).

En algunos estudios realizados en cultivos celulares, utilizando donadores de NO como los DETA-NONOATOS y NONOATOS, se observó que dosis bajas de NO (10 a 300nM) se induce un incremento de la proliferación, debido a la fosforilación de ERK, y la

estabilización de HIF-1 α .; y que a altas concentraciones por encima de 300nM, induce la fosforilación de p53, proteína involucrada en la inducción de la apoptosis (Thomas et al., 2004).

El NO, además de regular la expresión de genes específicos, es capaz de tener un efecto postraduccional sobre diversas proteínas, como la S-nitrosilación de los residuos de cisteína, afectando drásticamente la función de las proteínas (Stamler et al., 2001). Un ejemplo de proteínas que se nitrosilan son las caspasas, inhibiendo su actividad y por lo tanto la apoptosis (Li et al., 2007; Rössig et al., 1999; Tenneti et al., 1997). El NO cuando reacciona con el anión superóxido (O₂⁻), se forma peroxinitrito (ONOO⁻), un potente oxidante, capaz de causar daño oxidativo, nitración y S-nitrosilación de biomoléculas, tanto proteínas como lípidos y ADN (Mikkelsen & Wardman, 2003). Por lo tanto, debido a su potente reactividad química y a su alta difusibilidad, la producción de NO está finamente regulado para dictar la especificidad de su señalización y limitar la toxicidad a otros componentes celulares.

NO/ RNS y su implicación en la carcinogénesis.

En varios tipos de cáncer se ha encontrado un incremento significativo en los niveles de NO, y por ende un aumento en la expresión de iNOS, por ejemplo, en el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga y cáncer de la cavidad oral (Choudhari et al., 2013). El NO tiene la capacidad para reaccionar con el ion superóxido (O⁻²), para producir especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Martínez-Ruiz & Lamas, 2004; Wiseman & Halliwell, 1996; Wink et al., 1996). En condiciones normales, los niveles de RNS se mantienen bajos, ya que las células poseen sistemas antioxidantes que regulan su estado redox, limitando la acción oxidativa de RNS y con ello algún daño celular (León et al., 2008).

Las RNS han mostrado tener una participación específica en diferentes funciones celulares, actuando como segundos mensajeros en mecanismos como muerte celular programada, transcripción y activación de proteínas cinasas y fosfatasas, activación de proteínas G y de canales iónicos, así como en la señalización mitocondrial (Forman et al., 2002; West &

Marnett, 2006). También se ha involucrado a las RNS con la progresión del cáncer por su participación en la *s*-nitrosilación de proteínas (Fukumura et al., 2006).

Se ha detectado la presencia de una gran cantidad de proteínas nitrosiladas en el desarrollo y progresión del cáncer, tales como p53, caspasas, MKPs, Bcl-2, Fas, c-Src tirosina y actina, entre otras, las cuales regulan de manera directa o indirecta los siguientes procesos celulares: proliferación, apoptosis, angiogénesis, migración, invasión y metástasis (Thom et al., 2012).

***S*-nitrosilación de proteínas.**

La *s*-nitrosilación de proteínas es una modificación post-traducciona reversible que sufren los residuos de cisteínas contenidos en las proteínas, el grupo tiol de la cisteína se combina con una especie reactiva de nitrógeno (RNS) para formar un *s*-nitrosotiol (Numajiri et al., 2011; Ghezzi et al., 2005). La *s*-nitrosilación de proteínas regula una gran variedad de funciones celulares y eventos de señalización, incluyendo la tumorigénesis (Hess et al., 2005). La especie reactiva de nitrógeno predominante en el sistema celular es el N_2O_3 , por lo que se le atribuye ser el principal agente de *s*-nitrosilación en el ambiente intracelular (Handy & Loscalzo, 2006). Algunas de las proteínas sensibles a sufrir *s*-nitrosilación participan en la apoptosis, como es el caso de la caspasa-3, que al ser *s*-nitrosilada inhibe su actividad bloqueando la vía apoptótica (Thomsen & Miles et al., 1998). La proteína Bcl-2, con actividad anti-apoptótica, al ser *s*-nitrosilada aumenta la estabilidad de la membrana mitocondrial, previniendo la liberación del citocromo C y con ello la muerte celular (Green & Reed, 1998; Azad et al., 2010; Azad et al., 2006). El potencial oncogénico de la proteína Bcl-2 ha sido demostrado en cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colon-rectal, donde existe una sobre-expresión de esta proteína (Buolamwini, 1999; Oxford et al., 2004). La proteína *c-Src* es una subunidad accesoria de los receptores tirosina cinasa, resulta importante su participación en la activación de la cascada de señalización iniciada por factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular, regulando múltiples funciones celulares, tales como proliferación, migración y transformación celular (Pellman et al., 1985; Mayer & Gupta, 1998; Pawson, 1995). La *c-Src* posee cuatro residuos de cisteína en su estructura primaria, los cuales son sensibles de ser *s*-nitrosilados afectando

positivamente su actividad (Rahman et al., 2010), alterando la reorganización del citoesqueleto y por lo tanto la migración celular (Huertas Fernández, 2014).

El HIF-1 α es un factor transcripcional, que bajo condiciones de normoxia se degrada fácilmente mediante las proteínas prolin-hidroxilasas (PHD), pero en condiciones hipóxicas, se estabiliza provocando cambios a nivel transcripcional de ADN. Estudios realizados por Li y colaboradores en 2007, demostraron que la estabilización de HIF-1 α está altamente regulada a través de la *s*-nitrosilación mediada por NO (Li et al., 2007). Este factor de transcripción se une a una región específica del ADN conocida como Elemento Responsivo a HIF, el cual está contenido en la región promotora de varios genes implicados en la angiogénesis como VEGF y el Factor de Crecimiento Fibroblástico (Feoktistov et al., 2003).

Lipoperoxidación y Cáncer de mama.

Las membranas celulares están formadas principalmente por ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de la familia de los fosfolípidos. En presencia de NO, estos ácidos grasos pueden ser oxidados debido a la acción de las RNS, proceso conocido como peroxidación lipídica o lipoperoxidación (Almeda-Valdés, 2008). Las especies reactivas de nitrógeno atacan los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, afectando principalmente los sitios con doble enlace y grupos metil (CH₃) (Hybertson et al., 2011; Grimsrud et al., 2008). El Malonil-dialdehído (MDA) es un metabolito final de la lipoperoxidación de ácidos grasos, y se utiliza como marcador de daño y estrés oxidativo (Block et al., 2002; Gil et al., 2006; Carbonell et al. 2007).

En varios estudios realizados tanto en pacientes como en líneas celulares de cáncer de mama, se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de lipoperoxidación mediante la producción de MDA y el grado de malignidad del tumor. Estudios realizados en pacientes de cáncer de mama HER2 positivo y negativo, Victorino y colaboradores en el 2014, informaron que las pacientes HER2 positivo, presentan menor lipoperoxidación es decir los niveles de MDA se encuentran disminuidos en comparación con las HER2 negativo, lo que sugiere que HER2 protege de la lipoperoxidación. En las líneas celulares

MCF-7 consideradas de bajo potencial metastasico, y las MDA-MB 231 consideradas de alto potencial metastasico, también se realizaron estudios de determinación de lipoperoxidación donde se observó que las MCF-7 presentan un mayor grado de lipoperoxidación, en comparación con las MDA-MB 231(Mahéo et al., 2005).

JUSTIFICACION

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo, cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad, en México en el 2014 se presentó la incidencia más alta, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer de mama, el patrón metastásico más frecuente involucra los ganglios linfáticos regionales, medula ósea, pulmón e hígado.

El NO ha sido involucrado en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, ya que se ha detectado una correlación positiva entre los niveles de NO e iNOS con respecto al grado de malignidad del tumor. El mecanismo por el cual, el NO incide positivamente en el desarrollo del cáncer de mama no ha sido descrito a detalle, por lo que el propósito general del presente proyecto es investigar si el NO a través de la formación de RNS con la consecuente lipoperoxidación de lípidos y *s*-nitrosilación de proteínas exacerban el potencial metastásico de las células tumorales MDA-MB 231.

HIPOTESIS

El NO a través de la formación de Especies Reactivas de Nitrógeno exacerba el potencial metastásico de las células tumorales de mama, MDA-MB 231.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo molecular a través del cual el NO y las Especies Reactivas de Nitrógeno exacerbaban el potencial metastásico de las células tumorales de mama, MDA-MB 231.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la eficiencia de NOC-18 como donador de NO, determinando los niveles de nitritos.

Analizar si la presencia de NOC-18 y de ODQ modifican la capacidad proliferativa, migratoria y quimiorresistente de las células MDA-MB 231.

Evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6, IL-8, Nav 1.5 y MMP9 como un indicativo del incremento en la migración e invasión celular.

Analizar si cambios en los niveles de expresión de IL-6 e IL-8 requiere de la participación de NF- κ B.

Evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, VEGF y HIF-1 α como un indicativo del incremento proliferativo y angiogénico.

Evaluar si la presencia de NOC-18 y ODQ modifican los niveles de lipoperoxidación de la membrana plasmática.

Investigar si la presencia de NOC-18 y ODQ modifica los niveles de *s*-nitrosilación de proteínas totales.

METODOLOGIA

Cultivo celular de la línea tumoral MDA-MB 231

Las células MDA-MB 231 son una línea celular de cáncer de mama proveniente de adenocarcinoma de mama grado IV. Las células crecen en modalidad de monocapa y fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm² de superficie, con medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico, y se mantuvieron en una incubadora a 37⁰C en una atmosfera húmeda y una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 5 días se sometieron las células a un proceso de tripsinización, el cual consiste en los siguientes pasos: 1) retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con 5 ml de PBS estéril (contiene NaCl, KCl, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄), 2) adicionar 2ml de una solución de tripsina al 0.25% disuelta en 453 mM de EDTA, con el fin de despegar las células del piso del matraz, 3) adicionar al matraz 4 ml de medio de cultivo, y con ayuda de una pipeta serológica despegarlas mecánicamente, la suspensión celular se transfiere a un tubo cónico y se centrifuga a 1,500 rpm por 5 minutos se elimina el sobrenadante y la pastilla celular se resuspende en medio de cultivo fresco, a partir del cual se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células en placas de seis pozos para los experimentos propuestos en el proyecto.

Tratamiento con NOC-18 y ODQ.

El NOC-18 es una molécula pequeña de diolato diacenio (DETA-NONOato) que libera NO de manera más lenta y constante que otros donadores, tiene una vida media de 20 horas. La liberación lenta NO permite su uso de manera eficaz en los experimentos donde se desea observar los efectos de manera prolongada y constante. Para determinar el efecto del NO (NO), y las especies reactivas de nitrógeno (RNS producto de la oxidación de NO), sobre el potencial metastásico de las células MDA-MB 231, los cultivos celulares se mantuvieron en la presencia de NOC-18 a una concentración de 300μM, esta concentración fue tomada

por bibliografía revisada, en la cual se demostró que se obtienen concentraciones adecuadas de NO, alrededor de 400 nM.

El ODQ es un inhibidor selectivo e irreversible de Guanilato Ciclasa soluble (GCs), este agente químico inhibe a la GCs en un tiempo mínimo de 10 minutos a una concentración de 10 μ M, por lo que utilizamos esta concentración en nuestros experimentos.

En nuestros cultivos celulares, en las placas de seis pozos manejamos las siguientes condiciones experimentales: Control, ODQ, NOC-18 y ODQ+NOC-18, la duración del tratamiento fue por 72 horas.

Ensayo de Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

a) Extracción de ARN total

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos, utilizando el medio de cultivo Advanced-DMEM, suplementado con 3% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico (25 μ g/ml de anfotericina B, 10,000 μ g/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Una vez que alcanzaron la confluencia de aproximadamente 60%, se empezó el tratamiento con ODQ y NOC-18. Los tratamientos fueron por 72 horas, al finalizar el tratamiento se procedió a realizar la extracción de ARN por medio del kit comercial FavorPrepTM, Tissue total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp., China) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez concluida la extracción se determinó la concentración por espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, Alemania) a una longitud de onda de 260nm y la integridad de del ARN total aislado se evaluó como cociente obtenido entre la absorbancia a 260nm y 280nm, para considerarse una muestra de calidad, el valor de este cociente debió estar entre 1.6 y 2.

b) Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La retro-transcripción se llevó a cabo empleando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), para lo cual se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante. Posteriormente los tubos de reacción se colocaron en un

termociclador marca Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) y se aplicó el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 min a 85° y finalmente a 4°C.

c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

Oligonucleótidos	Dirección	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)
IL-6	Forward Reverse	GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	343
IL-8	Forward Reverse	CTGCGCCAACACAGAAATTAT CAGACTAGGGTTGCCAGATTTA	555
N _{av} 1.5	Forward Reverse	ACGGCACCTCTGATGTGTTACTGT TGAGGGCCTCGTGTTCCTTCTTGA	346
MMP9	Forward Reverse	TAC CAC CTC GAA CTT TGA CAG CGA AAA GGC ACA GTA GTG GCC GTA GAA	358
Ki-67	Forward Reverse	AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA CTGCACTGGAGTTCCCATAAA	415
VEGF	Forward Reverse	CTGAGCCTCTCTACCCCAGG GAGCAGGAAGAGGATGAGGG	289
HIF-1 α	Forward Reverse	CTCAAAGTCGGACAGCCTCA AATGAGCCACCAGTGTCCTCA	310
β -actina	Forward Reverse	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA	234

d) Separación electroforética de los productos de PCR

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética según su tamaño, se utilizaron geles de agarosa al 1.2%. La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 65 V por 80 minutos. La imagen del gel fue digitalizada en un

documentador de geles, Chemidoc (Bio Rad, EUA) empleando el programa Quantitive One 4.2.0 (Bio Rad, EUA).

e) Densitometría

Esta se realizó mediante el programa *Image J* que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (de sus siglas en inglés, NIH).

Ensayo de migración cámaras *Transwell*.

El ensayo de migración se realizó en los soportes permeables *Transwell* que contienen una membrana de Tereftalato de polietileno con poros de 8 μ m de diámetro. Las células fueron sembradas en placas de seis pozos y después de llegar a la confluencia requerida se pre-trataron con NOC-18 y ODQ a una concentración de 300 μ M y 10 μ M respectivamente, 16 horas antes de cumplir las 72 horas de tratamiento, las células fueron cosechadas y se preparó una suspensión celular de 300,000 células/ml por cada condición experimental. A partir de esta suspensión celular, se agregó a cada inserto de las cámaras *Transwell*, una alícuota de 100 μ l de suspensión celular (30,000 células) y 200 μ l de medio libre de suero fetal bovino pero suplementado con NOC-18 y ODQ, mientras que en la parte inferior de la cámara se agregaron 800 μ l de medio de cultivo completo igualmente suplementado con NOC-18 y ODQ, para mantener el tratamiento de las células 16 horas más, para cumplir con un tratamiento final de 72 horas. Una vez que termino el tratamiento, se retiró el medio de cultivo de la cámara superior y con un hisopo de algodón se eliminaron las células adheridas en la membrana. Las células que migraron y están adheridas en el lado interno de la membrana fueron fijadas con metanol-acetona (dilución 1:1) y teñidas con cristal-violeta. Se tomaron microfotografías de 8 campos diferentes con el objetivo de 20x en un microscopio de campo claro para contar las células. Las imágenes fueron posteriormente analizadas con el programa *Image J*.

Ensayo de quimiorresistencia con MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que nos permitió evaluar la capacidad de quimiorresistencia que pueden presentar las células MDA-MB-231 al ser tratadas con algún agente quimioterapéutico. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se considera que la acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimientos subcelulares, las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT a formazan. El MTT es un sustrato amarillo pálido que es escindido por células vivas para producir formazan que es de color violeta, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas puede ser usado para ensayos de proliferación o de citotoxicidad.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 6 pozos, al alcanzar un aproximado de 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con NOC-18 y ODQ a una concentración de 300 μM y 10 μM respectivamente por 72 horas. Al terminar el tiempo de tratamiento, las células fueron cosechadas siguiendo el protocolo anteriormente descrito, y se procedió al posterior sembrado en una placa de 96 pozos a una densidad de 5,000 células/pozo. A las 48 horas después de haber sembrado las células en las placas de 96 pozos, se procedió adicionar Doxorubicina a una concentración de 5 μM , manteniendo el tratamiento con ODQ y NOC-18. Después de 48 horas de tratamiento con el fármaco oncológico y las condiciones con ODQ y NOC-18, se recambió el medio de cultivo y a cada pozo se le adicionaron 10 μL de reactivo MTT y se dejó incubando por 4 horas. Al haber transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 μL de isopropanol con HCl 0.1N a cada pozo para disolver los cristales de formazan, posteriormente se llevó a un espectrofotómetro para ser leído a 570 nm. Los resultados se obtuvieron en unidades de absorbancia para después ser analizados y ser mostrados como porcentaje de supervivencia celular.

Determinación de Nitritos (NO₂).

La determinación de nitritos se obtuvo a partir del medio de cultivo de cada una de nuestras condiciones experimentales. Nuestros tratamientos fueron por 72 horas, con un recambio de medio cada 24 horas, por lo que tomamos cada 24 horas muestras del medio de cultivos de todas las condiciones, se tomó una alícuota de 1.5ml de medio de cultivo, se centrifugo a 13,200 rpm por 5 minutos y se tomó 1ml de sobrenadante, las muestras se almacenaron a 0 °C.

Se determinó la concentración de nitritos por el método de Griess, por lo que se prepararon dos soluciones de trabajo: a) NED (N-1-naftil-etilendiamina) y b) Sulfanilamida al 1%. Se preparó una curva estándar utilizando como diluyente medio de cultivo y en tubos eppendorf de 1.5 ml se agregaron 100 µl de la muestra, 50 µl de la solución NED, 50 µl de la solución de sulfanilamida al 1% y 800µl de agua desionizada. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 550 nm, a partir de las cuales se obtuvieron las concentraciones.

Determinación de MDA (lipoperoxidación).

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 6 pozos, al alcanzar aproximadamente un 60% de confluencia, se dio inicio al tratamiento con NOC-18 y ODQ a una concentración de 300µM y 10µM respectivamente por 72 horas. Posteriormente fueron lisadas con PBS al 1% con la ayuda de un sonicador por 10 minutos, manteniendo una cadena de frío con hielo seco, se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C en una centrifuga (Labnet International, Inc). Se realizó la determinación de proteínas por el método BCA utilizando el kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Thermo Scientific). Finalmente se utilizó el método de 1 metil 2 fenil indol de Gerard Monnier de 1998. Donde se añadió en un tubo eppendorf 350 µl de la solución I diluida, 200 µl de la muestra y 50 µl de agua, se agitaron durante 3-4 segundos, se incubaron a 45°C durante 60 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 7 minutos a 2,500rpm, se recuperó el sobrenadante y se leyó en un espectrofotómetro a 586 nm. Este ensayo lo realizamos en el

Laboratorio de la Dra. Bertha Alicia León Chávez de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Ensayo de Western Blot.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 6 pozos, al alcanzar un aproximado de 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con NOC-18 y ODQ a una concentración de 300 μ M y 10 μ M respectivamente por 72 horas. Se obtuvieron lisados celulares con Buffer RIPA, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante y las muestras se guardaron a -20⁰C. Se realizó determinación de proteínas utilizando un kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Thermo Scientific). Se prepararon las muestras para Western Blot a una concentración de 100 μ g/1 μ l. Posteriormente se cargaron las muestras en un gel de electroforesis, y se separaron las proteínas a no más de 120 mV. Se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF a 20 mV por 16 horas a 4⁰C. Se realizó el bloqueo de la membrana con leche al 5% durante 2 horas, posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario para HIF-1 α (1:500) por 16 horas en refrigeración. La membrana fue lavada y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realizó el revelado de la membrana de PVDF mediante el reactivo TMB (3,3', 5,5'-Tetrametil bencidina; Sigma-Aldrich, T0565).

Ensayo de Western Blot para proteínas s-nitrosiladas.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 6 pozos, al alcanzar un aproximado de 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con NOC-18 y ODQ a una concentración de 300 μ M y 10 μ M respectivamente por 72 horas. Se obtuvieron lisados celulares con Buffer HENS, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante y las muestras se guardaron a -20⁰C. Se realizó determinación de proteínas utilizando un kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Thermo Scientific). Se prepararon las proteínas de 1-2 μ g/ μ l en al menos 100 μ l para tener de 100-200 μ g por condición. Las diluciones se realizaron con Buffer HENS. En los 100 μ l de muestra se agregó el reactivo MMTS, se mezcla y se deja incubar por 30 min a temperatura

ambiente. Después se agregó acetona, para eliminar los MMTS libres, las muestras se centrifugaron a 10,000rpm por 10 minutos a 4 °C. Se eliminó la acetona y se resuspendió el pellet en 100 µl de Buffer HENS, se agregó el ascorbato de sodio y se dejó la reacción por 2 horas, posteriormente se centrifugaron a 10,000rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 40 µl de HENS y se agregaron 10 µl de buffer de carga, se incubaron las muestras a 95 °C por 5min. Posteriormente se cargaron las muestras en un gel de electroforesis, y se separaron las proteínas a no más de 120 mV. Se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF a 20 mV por 16 horas a 4°C. Se realizó el bloqueo de la membrana con leche al 5% durante 2 horas, posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti- TMT (1:1000) por 16 horas en refrigeración. La membrana fue lavada y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realizó el revelado de la membrana de PVDF mediante el reactivo TMB (3,3', 5,5'-Tetrametil bencidina; Sigma-Aldrich, T0565).

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software Sigma Plot 11.0. Se utilizó la prueba *t* de Student para evaluar la diferencia entre grupos, con un valor de significancia menor de 0.05 ($p < 0.05$). Las gráficas muestran el valor promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

La bibliografía reporta que el NO ejerce un doble efecto sobre la progresión y desarrollo del cáncer, dependiendo de la concentración de NO utilizada, por ejemplo, a bajas concentraciones (rango nM), el NO estimula la tumorigénesis, mientras a que a altas concentraciones (rango μM), induce apoptosis (Stepnik, 2002; Siegert et al., 2002). El NO recurre a dos vías de señalización, una es dependiente de la GCs y la otra es independiente a la actividad de dicha enzima, esta última vía es conocida como la vía oxidativa por la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS). En un estudio realizado por Switzer y colaboradores en el año 2012, cuantificaron que 100 μM de NOC-18 libera aproximadamente entre 100-150 nM de NO, mientras que 300 μM libera aproximadamente 400 nM de NO (Switzer et al., 2012).

El propósito del presente trabajo es investigar si el NO a través de la vía independiente de GCs es capaz de exacerbar el potencial metastásico de las células MDA-MB 231, evaluando tres de sus indicadores: capacidad proliferativa, capacidad migratoria y capacidad de quimiorresistencia. En todas las series experimentales, las células MDA-MB 231 fueron tratadas con 10 μM de ODQ, un inhibidor específico de la GCs, y con NOC-18, donador de NO, a una concentración de 300 μM , para que genere una concentración aproximada de 400 nM de NO (Switzer et al., 2012).

NOC-18 produce altas concentraciones de Nitritos (NO_2).

El NO es un radical libre, el cual puede reaccionar con múltiples moléculas químicas, debido a que se convierte en un catión nitrosonio (NO^+) o anión nitroxilo (NO^-) donando o aceptando electrones. El NO puede también reaccionar con O_2 para formar especies reactivas de nitrógeno, como lo son el peroxinitrito (ONOO^-), trióxido de dinitrogeno (N_2O_3), nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2), moléculas que pueden causar daño a las células, a nivel de ADN, nitración y *s*-nitrosilación de proteínas, lo cual podría modificar la expresión o la funcionalidad de proteínas implicadas en el potencial metastásico de las células tumorales. El NO tiene una vida media corta, rango de segundos, por lo que es difícil detectar las concentraciones de este gas, pero gracias a las múltiples reacciones químicas en que está involucrado, es posible determinar de manera indirecta su presencia. Inicialmente

decidimos evaluar si el donador de NO que elegimos para nuestro trabajo experimental, NOC-18, es un donador de NO efectivo, para lo cual evaluamos los niveles de nitritos presentes en el medio de cultivo en presencia y ausencia de NOC-18. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas por 72 horas a una concentración de 300 μ M de NOC-18. Mediante la determinación de nitritos por el método de Griess, se observa claramente que el NOC-18 induce un incremento significativo en los niveles de nitritos, casi 70 veces con respecto a la condición control, lo cual lo confirma como un donador de NO efectivo (Figura 1).

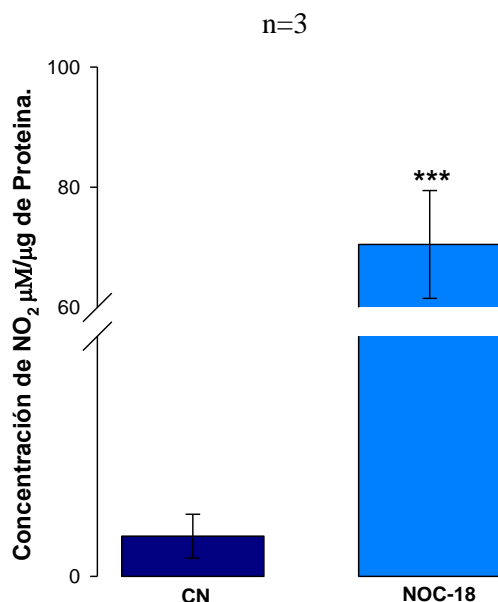


FIGURA 7. Determinación de los niveles de Nitritos por el método de Griess. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas en presencia de NOC-18 por 72 horas, no se realizó recambio de medio de cultivo, pero cada 24 horas se adicionó NOC-18 para mantener constante la concentración final de 300 μ M durante todo el tratamiento. Al finalizar el tratamiento se recuperó el medio de cultivo, a partir del cual se realizó la determinación de nitritos por el método de Griess. El experimento se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de *** $p \leq 0.001$.

NO exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.

Inicialmente decidimos evaluar si el NO influye sobre la capacidad proliferativa de nuestra línea celular de cáncer de mama, por lo que evaluamos por RT-PCR de punto final el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, que es un marcador nuclear de proliferación celular altamente utilizado. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas por 72h con ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18 (ODQ 10 μ M, NOC-18 300 μ M). La Figura 8 muestra claramente que el NO, representado por la condición experimental de NOC-18, induce un incremento significativo en el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, y que éste efecto es además, es independiente de la activación de la GCs, ya que el NOC-18 aún en presencia de ODQ, mantiene su efecto estimulador sobre el nivel de expresión de Ki-67. Este resultado deja en claro que NO exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.

n=3

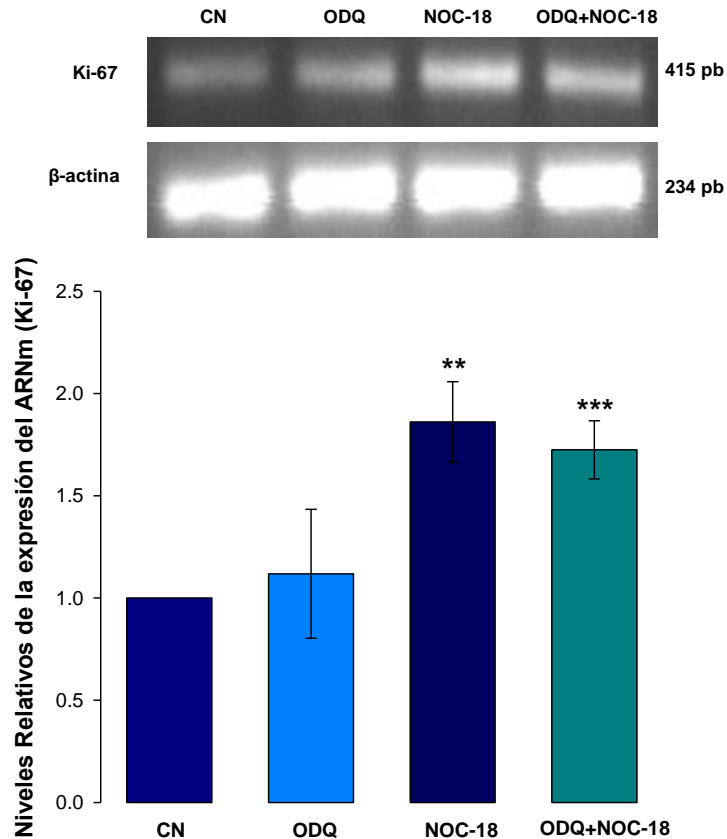


FIGURA 8. NOC-18 induce un incremento en los niveles de expresión de Ki-67. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control. El ensayo se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

NO reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

Una segunda propiedad del potencial metastásico que investigamos en nuestro modelo experimental es su capacidad migratoria, la cual fue evaluada de manera cuantitativa mediante ensayos de migración en cámaras Transwell. Las células MDA-MB 231 fueron

tratadas por 72h con ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18 (ODQ 10 μ M, NOC-18 300 μ M). La Figura 3a y 3b, muestra una serie de microfotografías donde observamos que las células tumorales tienen preferencia por irse a los bordes de la membrana, y que al realizar el conteo celular observamos que el NO afecta negativamente la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y que este efecto es independiente de la activación de la GCs, ya que el NOC-18 aún en presencia de ODQ, mantiene su efecto inhibitorio sobre la migración celular.

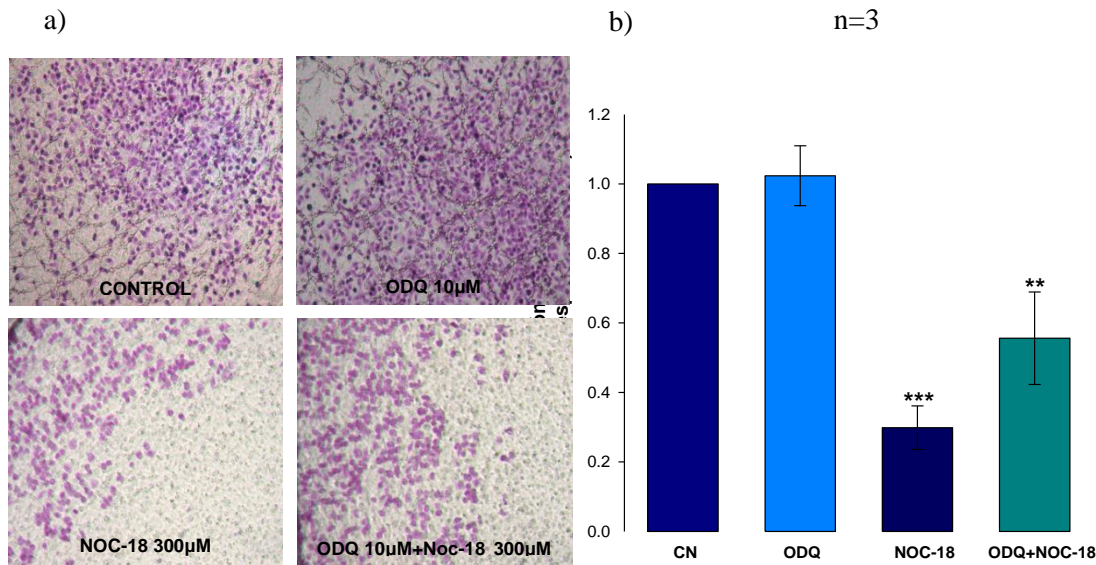


FIGURA 9. NOC-18 reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento las células fueron cosechadas, y sembradas en los insertos de las cámaras Transwell, ajustando a 30,000 células por inserto por condición experimental, la parte inferior de la cámara se llenó con medio de cultivo completo y se adicionó ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18, y la parte superior de la cámara con medio de cultivo libre de suero fetal bovino suplementado con los mismos compuestos, con el fin de mantener concentraciones equimolares en ambos compartimientos. Se incubaron las células por 16 horas, al finalizar dicho periodo de tiempo, se retiró el medio de cultivo de la cámara superior, se eliminaron las células ubicadas en el lado externo de la membrana del inserto, las células que migraron a lado interno de la membrana fueron fijadas y teñidas con violeta de cresilo. Se tomaron de manera aleatoria microfotografías en un microscopio vertical de campo claro con el objetivo 20X. A partir de las imágenes adquiridas se realizó el conteo celular empleando el software Image J. Los datos fueron normalizados con respecto a la condición control. El ensayo se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

La capacidad de quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a Doxorubicina resulta reducida por el NO.

Las células MDA-MB 231 provienen de un cáncer de mama triple negativo, que se caracteriza por presentar quimiorresistencia a diferentes fármacos oncológicos, lo cual reduce la efectividad de la quimioterapia en su tratamiento. Uno de los principales fármacos oncológicos empleados en la quimioterapia es la Doxorubicina, por lo que decidimos explorar si el NO es capaz de modificar la quimiorresistencia que presentan las células MDA-MB 231 a la Doxorubicina, ya que el NO o los donadores de NO, se han sugerido como coadyuvantes para una terapia combinada y así poder eliminar las células tumorales más rápidamente, incrementando la sensibilidad de estas células a la acción citotóxica de los fármacos. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas por 72 horas con ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18 (ODQ 10 μ M, NOC-18 300 μ M), después del tratamiento, las células se cosecharon y se sembraron en placas de 96 pozos, donde se continuo el tratamiento por 48 horas más, ahora con la presencia adicional de 5 μ M de Doxorubicina. Al finalizar las 120 horas de tratamiento, se realizó el ensayo de supervivencia celular por MTT. El gráfico de la Figura 4 muestra que Doxorubicina por sí misma, reduce aproximadamente 65% la supervivencia celular, y si las células se mantienen en presencia de NO, el efecto citotóxico de la Doxorubicina es mayor, pasando de un 35% de supervivencia celular a un 26% aproximadamente, esta diferencia no es estadísticamente significativa, pero si marca una tendencia. Este resultado apoya la posibilidad de que el NO pueda coadyuvar al efecto citotóxico de la Doxorubicina para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de mama triple negativo.

n=3

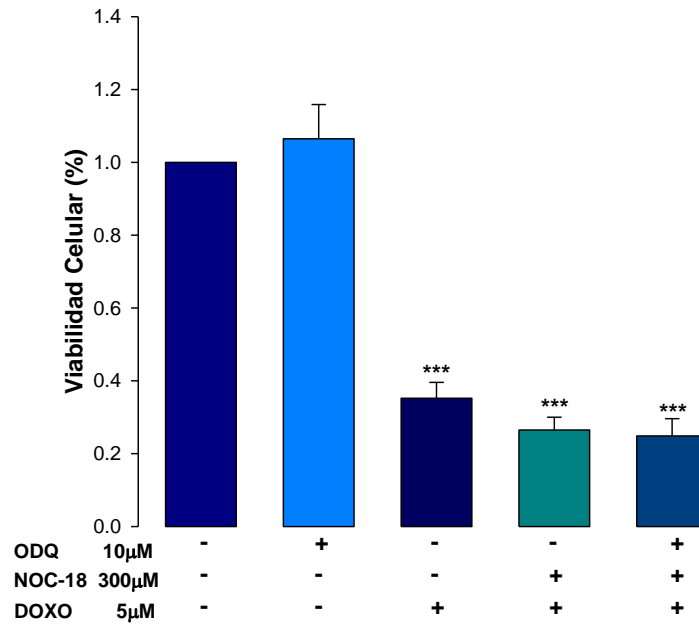


FIGURA 10. NOC-18 incrementa la quimiosensibilidad de las células MDA-MB 231 a Doxorubicina. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar este tiempo, las células fueron cosechadas, y resembradas en placas de 96 pozos ajustando a 5,000 células por pozo por condición experimental. Las células se mantuvieron 24 horas en presencia de ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18, una vez transcurridas las 24 horas, se adicionó al medio de cultivo 5 μ M de Doxorubicina. Se incubaron las células por 48 horas más, al finalizar dicho periodo de tiempo, las células fueron sometidas a un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad o supervivencia celular. Los datos fueron normalizados con respecto a la condición control. El ensayo se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de *** $p \leq 0.001$.

NO exacerba la condición inflamatoria en las células MDA-MB 231, incrementando los niveles de expresión de IL-6 e IL-8.

Un factor de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer, es la existencia de una condición inflamatoria crónica. Diversos estudios han puesto en evidencia que un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias, favorece el potencial metastásico de las células tumorales. Decidimos investigar por RT-PCR de punto final si el NO era capaz de modificar los niveles de expresión del ARNm que codifican para IL-6 e IL-8, dos citocinas proinflamatorias. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas por 72 horas con ODQ y NOC-18, después del tratamiento se realizó el ensayo de RT-PCR. La Figura 5a muestra que en todas nuestras condiciones experimentales, ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18, hay un incremento significativo en los niveles del ARNm que codifica para IL-6. Observándose un efecto mayor en la condición de ODQ + NOC-18, un cambio de 2.3 veces con respecto a la condición control, mientras que en presencia solamente de NOC-18, el cambio es de 2.1 veces, y para la condición de ODQ, es de 1.4 veces. Este resultado nos permite sugerir que la expresión del ARNm que codifica para IL-6 depende del NO, condición de NOC-18, pero que la vía empleada es independiente de la actividad de la GCs, ya que al mantener permanente el suministro de NO y bloquear la actividad de dicha enzima, el efecto se ve potenciado con respecto a la condición control. Para el caso de la segunda citocina proinflamatoria, IL-8, el resultado obtenido se muestra en la Figura 5b. La presencia de NOC-18 induce un incremento significativo del 30% en el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-8 con respecto a la condición control. Cuando las células son mantenidas en presencia de ODQ, el NOC-18 es incapaz de ejercer su efecto estimulador, lo cual hace suponer que es necesaria la participación de la GCs.

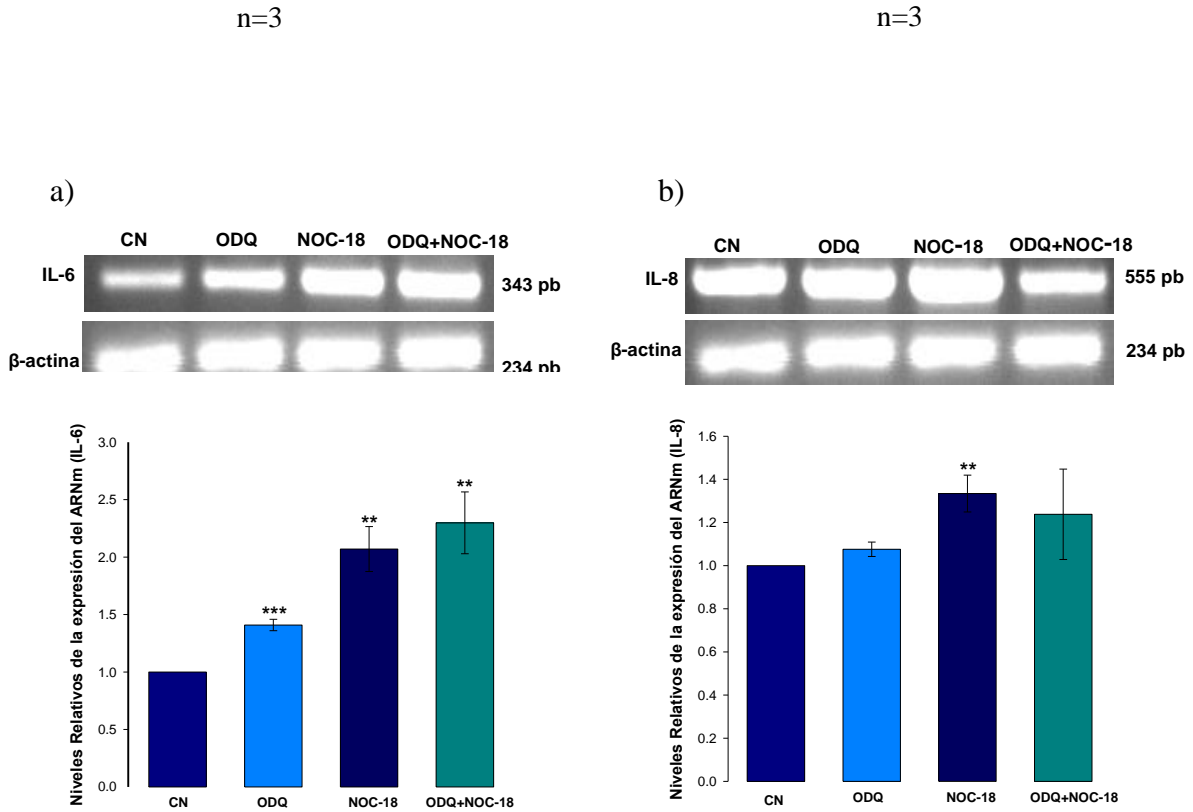


FIGURA 11. NOC-18 induce un incremento en los niveles de expresión de IL-6 e IL-8. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control. **a)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-6; **b)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-8. Los ensayos se realizaron por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

La expresión de IL-6 es dependiente de la translocación del NF-κB al núcleo, mientras que para IL-8 es independiente.

El NO estimula la actividad de los macrófagos, induciendo un incremento en los niveles del ARNm que codifica para las interleucinas 6 y 8. La expresión de estas citocinas proinflamatorias es mediada por la activación del NF-κB, el cual al ser translocado al núcleo, se une a la región promotora del ADN de dichos genes para estimular su expresión. Decidimos investigar si el incremento observado en los niveles del ARNm para IL-6 e IL-8 en presencia de NOC-18 en las células MDA-MB 231, depende de la activación del NF-κB, al igual como ocurre en los macrófagos. Las células MDA-MB 231 antes de iniciar el tratamiento respectivo con ODQ y NOC-18, fueron pretratadas durante 1 hora con 20 μM de Na₂Se₃, compuesto que inhibe la activación del NF-κB. Al finalizar el tratamiento con ODQ y NOC-18 por 6 horas, se extrajo el ARN total y por ensayo de RT-PCR de punto final determinamos el nivel de expresión del ARNm para IL-6 e IL-8 en las diferentes condiciones experimentales. La Figura 6a y 6b muestran que el Na₂Se₃ inhibe la expresión basal del ARNm que codifica para IL-6, sin afectar la expresión de IL-8. El pretratamiento con Na₂Se₃ reduce de manera significativa el efecto estimulador que ejerce el NOC-18 sobre los niveles del ARNm que codifica para IL-6, y cuando se combina con ODQ, no hay un cambio significativo con respecto a la condición control, estos resultados nos hacen sugerir la participación del NF-κB en la transcripción del ARNm que codifica para IL-6 en presencia de NOC-18. Para el caso de IL-8, se observaron resultados completamente diferentes, a pesar de ser también una citocina proinflamatoria, por ejemplo, el Na₂Se₃ no afecta su expresión basal, a diferencia de lo que observamos para la IL-6. Además, el efecto de NOC-18 sobre la expresión de IL-8 no resulta afectado por la presencia de Na₂Se₃, sugiriendo que el NO induce un incremento en la expresión de IL-8 por una vía independiente del NF-κB, lo cual se ve apoyado en la condición de ODQ + NOC-18, que presenta un incremento en los niveles del ARNm que codifica para IL-8 aún en presencia de Na₂Se₃, será necesario realizar otros experimentos con el fin de identificar esa vía independiente.

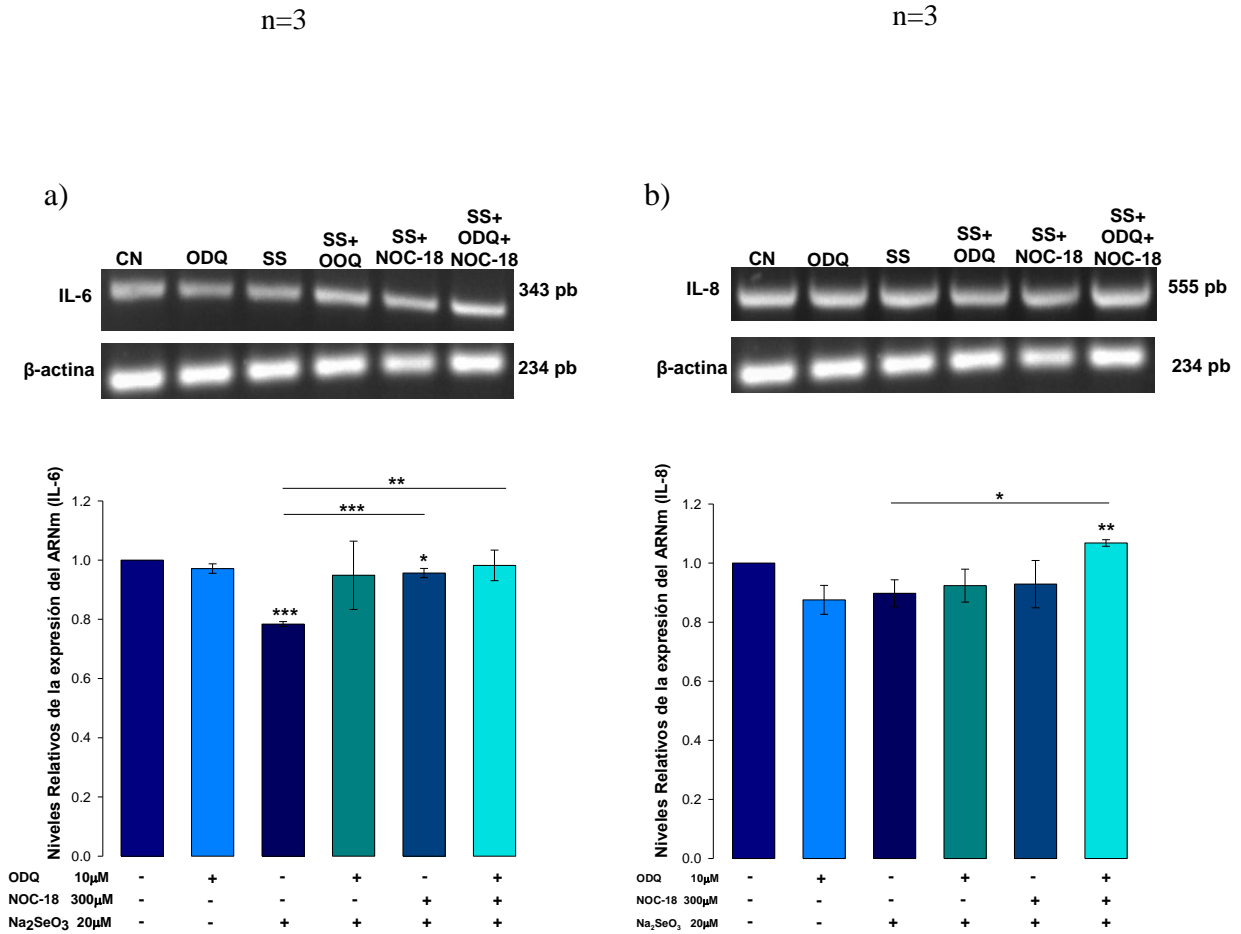


FIGURA 12. Participación del NF- κ B en la transcripción del gen que codifica para IL-6 e IL-8. Las células MDA-MB 231 fueron pretratadas con Na₂Se₃ por 1 hora antes de iniciar el tratamiento de 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar se aisló el ARN total y se utilizó para los ensayos de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control. **a)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-6; **b)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-8. Los ensayos se realizaron por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ y $***p \leq 0.001$.

NO exacerba los niveles de expresión de proteínas involucradas en la migración e invasión celular.

En varios modelos celulares de cáncer, se ha observado la participación del canal de sodio Nav 1.5 en la capacidad migratoria de las células, ya que al bloquear su actividad con altas concentraciones de TTX, se ve reducida la migración celular. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, correlacionan la presencia del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 con el incremento en la migración celular. Por lo que decidimos evaluar, si el NO afecta los niveles de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5. Las células fueron tratadas por 72 horas con ODQ y NOC-18, y posteriormente se realizó una RT-PCR de punto final. La Figura 7a muestra claramente que la expresión del Nav 1.5 depende de NO, y que es independiente completamente de la GCs, ya que en la condición de ODQ, se presenta un incremento del 22% con respecto a la condición control, en presencia de NOC-18, hay un aumento del 40%, y si se combina ODQ con NOC-18, se eleva aún más, alcanzando un 52% más que la condición control.

La capacidad invasiva de la célula tumoral está asociada con un incremento en la expresión de metaloproteinasas, enzimas responsables de degradar los elementos proteicos de la matriz extracelular, facilitando así la invasión de células tumorales a otros tejidos y órganos. Una de las metaloproteinasas asociadas a la invasión tumoral es la MMP9, por lo que decidimos evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para la MMP9. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas bajo las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas, posteriormente se realizó una RT-PCR de punto final. La Figura 7b muestra que el NO, induce un incremento significativo en los niveles del ARNm que codifica para MMP9, y que este efecto es independiente de la GCs, ya que el ODQ es incapaz de modificar la expresión basal del ARNm para MMP9, y que tampoco previene el efecto estimulador de NOC-18.

n=3

n=3

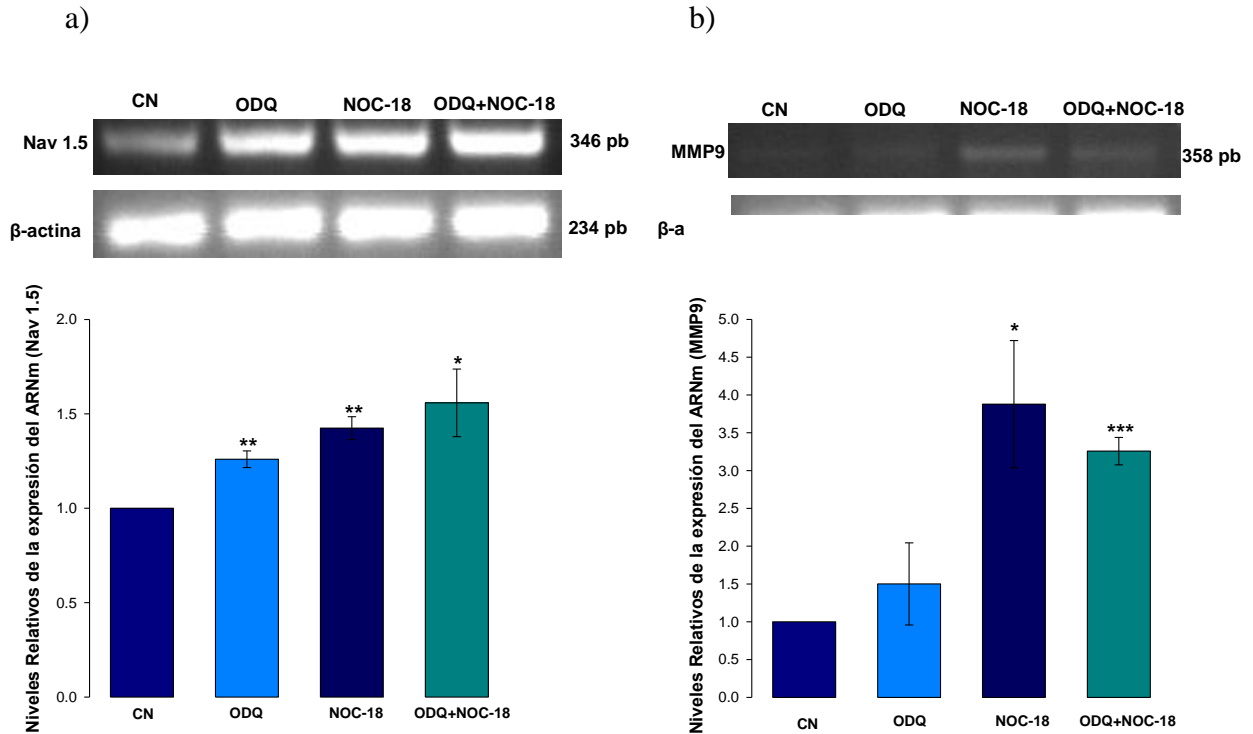


FIGURA 13. NOC-18 induce un incremento en los niveles de expresión de la subunidad *a* del canal de sodio Nav 1.5 y de la MMP9. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control. **a)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para el canal de sodio Nav 1.5; **b)** Nivel de expresión del ARNm que codifica para MMP9. Los ensayos se realizaron por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

NO exacerba los niveles de expresión de proteínas involucradas en la angiogénesis.

La angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos, es una condición necesaria para el desarrollo y progresión del cáncer. El crecimiento de un tumor sólido genera una condición de hipoxia, bajo esta condición, como mecanismo de supervivencia, las células tumorales expresan HIF-1 α , el cual funciona como factor de transcripción para estimular la expresión de VEGF, factor angiogénico clásico, de esta manera, se asegura que las células tumorales reciban el aporte apropiado de oxígeno y nutrientes, favoreciendo la progresión tumoral. Hay antecedente que muestran que el NO a nivel endotelial, estabiliza el HIF-1 α , favoreciendo la expresión de VEGF y por consecuencia la angiogénesis. Con esta información, nos propusimos investigar si el NO influye en la expresión del ARNm que codifica para HIF-1 α y VEGF, así como en la expresión de la proteína HIF-1 α en las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas por 72 horas con ODQ y NOC-18, posteriormente realizamos el ensayo de RT-PCR para VEGF y HIF-1 α . La Figura 8a y 8b ilustran claramente que el NOC-18 induce un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para HIF-1 α (50%) y para VEGF (18%) con respecto a la condición control. El efecto estimulador del NO depende de la actividad de la GCs, ya que en presencia de ODQ, se observa una reducción significativa al efecto estimulador del NOC-18, incluso por debajo del valor de la condición control. De manera complementaria, realizamos un Western-Blot para detectar los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α . De manera preliminar se puede observar en la Figura 9, que en las tres condiciones experimentales hay una tendencia a incrementarse los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α . Deberán realizarse un mayor número de experimentos para corroborar si hay efectos significativos.

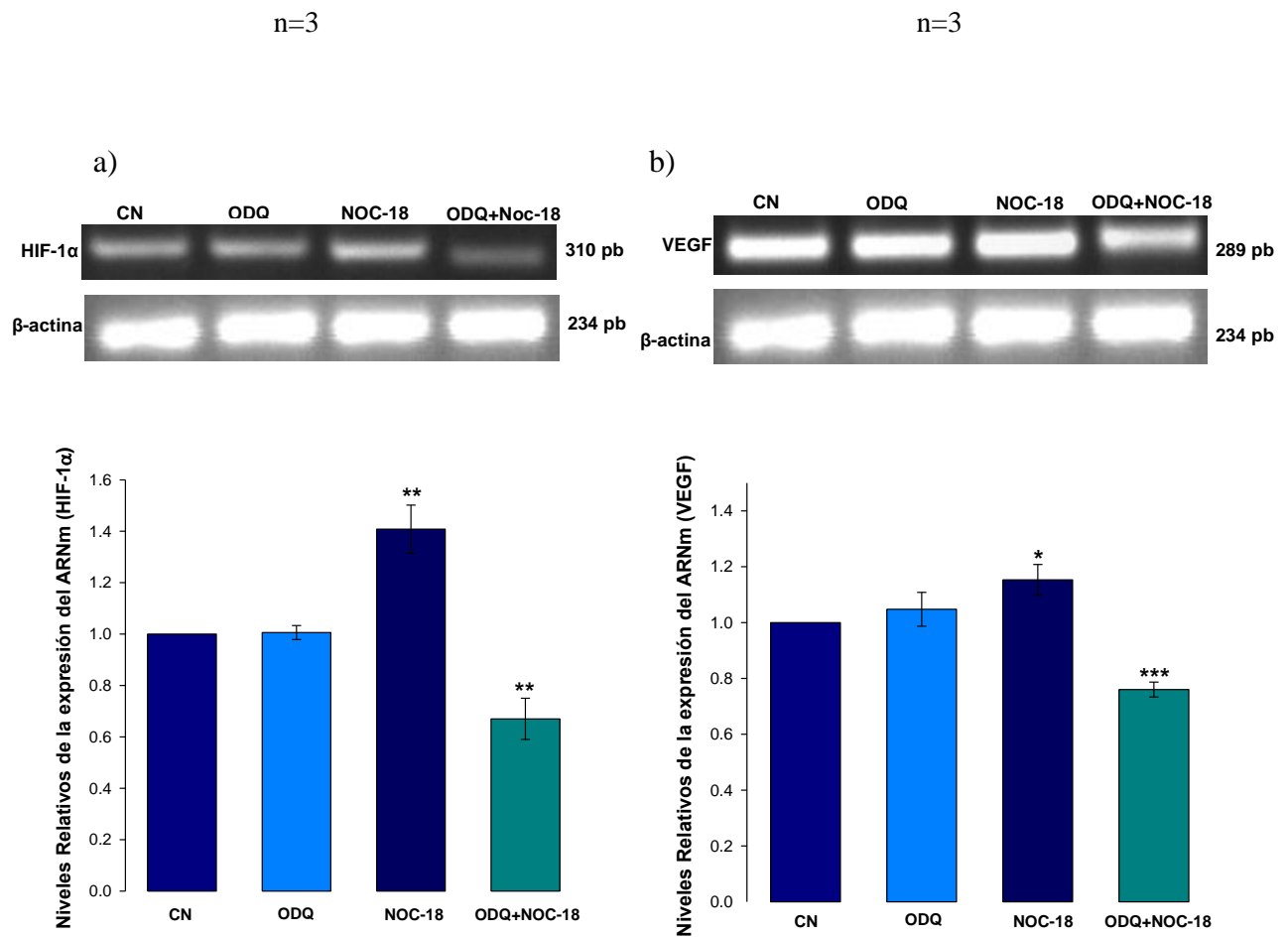


FIGURA 14. NOC-18 induce un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para HIF-1α y de VEGF, proteínas angiogénicas. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μM), NOC-18 (300 μM) y ODQ + NOC-18 (10 μM y 300 μM respectivamente). Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control. a) Nivel de expresión del ARNm que codifica para HIF-1α; b) Nivel de expresión del ARNm que codifica para VEGF. Los ensayos se realizaron por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

n=3

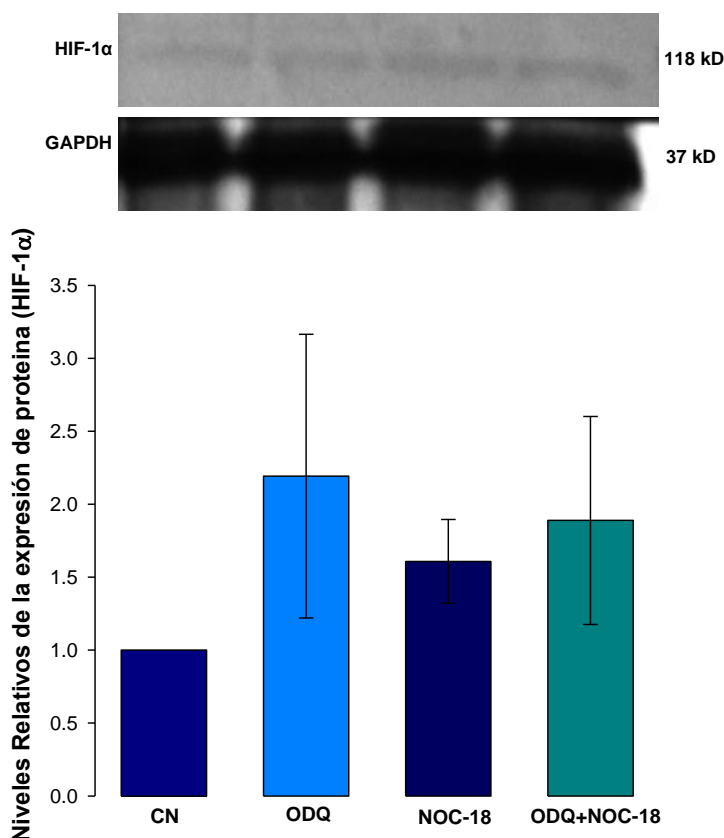


FIGURA 15. NO induce un incremento no significativo en los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α , a través de la vía dependiente e independiente de la GCs. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento, las células fueron homogenizadas, se determinó la concentración de proteínas empleando el método BCA. Se realizó la separación electroforética de las proteínas en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se procedió a realizar la inmunodetección de HIF-1 α . La membrana fue bloqueada con una solución de leche al 5%, posteriormente se incubó toda la noche en presencia de un anticuerpo policlonal primario a una dilución 1:2000, al finalizar la incubación, se lavó la membrana y se adicionó un anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1:5000 y se incubó por 2 horas, se reveló la membrana con TMBS, un sustrato específico de la HRP. Se adquirió la imagen de la membrana en un fotodocumentador y se realizó. Se realizó una densitometría normalizando los valores con respecto a la condición control.

Las Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS) no producen lipoperoxidación en la membrana plasmática de las células MDA-MB 231.

Las RNS, pueden causar daño a los fosfolípidos que componen a la membrana celular, este proceso se conoce como Oxidación Lipídica o Lipoperoxidación. Las RNS tienen como blanco los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados produciendo daños en la estructura membrana celular, y de esta forma producir apoptosis. Durante la lipoperoxidación de ácidos grasos, se producen metabolitos característicos, uno de estos metabolitos, es el Malonil-dialdehído (MDA), el cual es el producto final de la lipoperoxidación. Hasta el momento hemos observado que NOC-18 eleva los niveles de ARNm que codifica para Ki-67, marcador nuclear de proliferación celular, por lo que evaluamos si la presencia de NOC-18, que conduce probablemente a la generación de RNS, ya que la actividad de CGs está inhibida con ODQ, es capaz de inducir lipoperoxidación, cuantificando los niveles de MDA. Las células fueron tratadas por 72 horas, posteriormente se obtuvieron homogénados celulares de cada condición experimental para determinar la concentración de MDA mediante el método de Gerard Monnier. La Figura 10 muestra como la presencia de NOC-18 reduce los niveles de MDA de manera significativa, con respecto a la condición control. Esto quiere decir, que el NO no produce lipoperoxidación y por ende daño a la membrana celular, favoreciendo con esto la proliferación celular, tal y como observamos cuando se evaluó Ki-67.

n=3

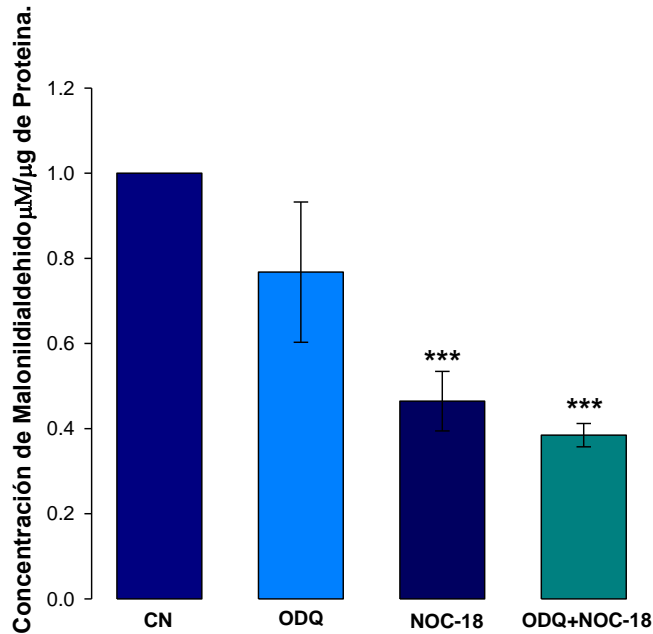


FIGURA 16. El NOC-18 no incrementa los niveles de MDA en las células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μM), NOC-18 (300 μM) y ODQ + NOC-18 (10 μM y 300 μM respectivamente). Al finalizar el tratamiento, las células fueron homogenizadas, se determinó la concentración de proteínas empleando el método BCA. El homogenado celular fue empleado para realizar la cuantificación de MDA. Se normalizaron los valores con respecto a la condición control. La diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de *** $p \leq 0.001$.

EL NOC-18 y el bloqueo de la GCs inducen *s*-nitrosilación de proteínas en las células MDA-MB 231.

La *s*-nitrosilación de proteínas es una modificación post-traducciona que se da en los residuos de cisteína de las proteínas, que ocurre cuando el grupo tiol de la cisteína reacciona con una RNS y se forma un *s*-nitrosotiol. Estas modificaciones que sufren las proteínas pueden regular una gran variedad de funciones celulares por diferentes vías de señalización, impactando en el potencial metastásico de las células tumorales, inhibiendo la apoptosis, incremento de la invasión, migración, angiogénesis y quimiorresistencia.

Las células fueron tratadas por 72 horas con ODQ, NOC-18 y ODQ + NOC-18, al finalizar el tratamiento, las células fueron lisadas, se cuantificaron proteínas y se realizó un western-blot para detectar proteínas totales *s*-nitrosiladas. La Figura 17 ilustra claramente que existe la *s*-nitrosilación de tres grupos de proteínas en función de su peso molecular (75, 55 y 43 kDa), y que esta nitrosilación es dependiente de NOC-18 e independiente de la actividad de la GCs, ya que se presenta el incremento en nuestras tres condiciones experimentales. El resultado que se presenta es preliminar, y deberán realizarse un mayor número de experimentos para investigar cuáles son las proteínas *s*-nitrosiladas, y si estas están relacionadas con el incremento del potencial metastásico.

n=3

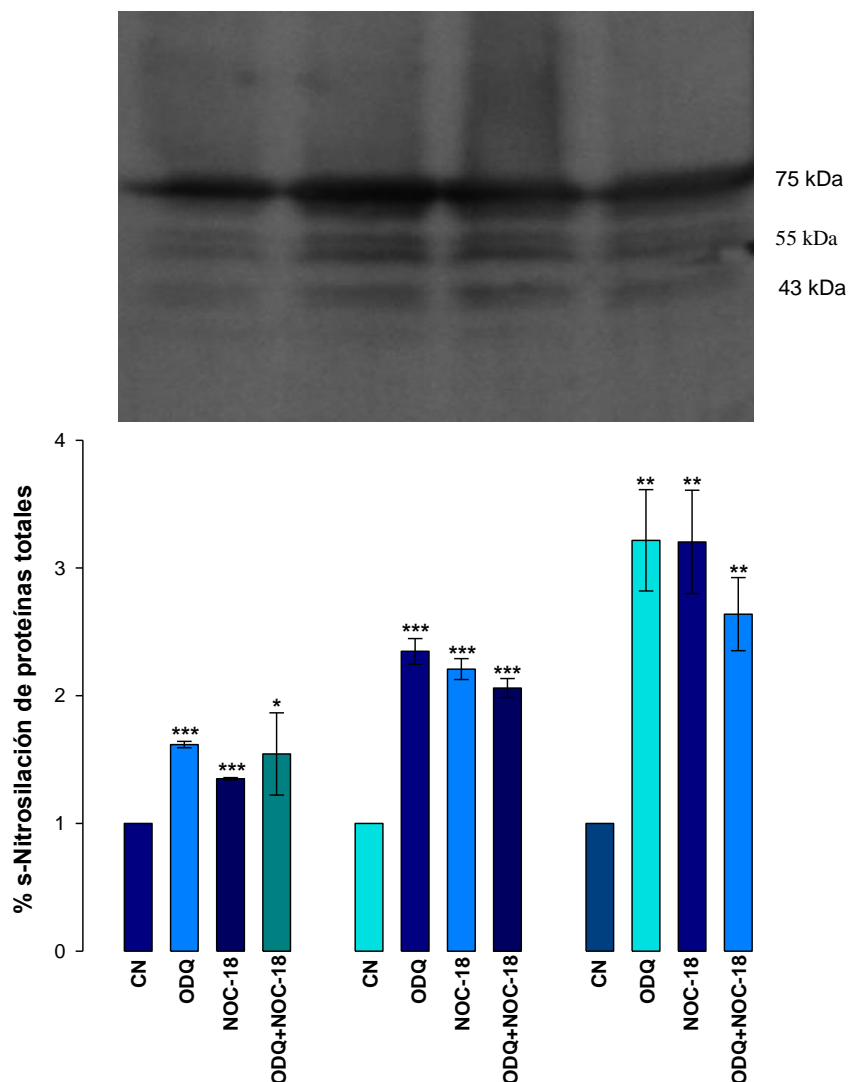


FIGURA 17. NOC-18 y ODQ inducen la n-nitrosilación de proteínas totales en las células MDA-MB 231, a través de la vía independiente de GCs. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μ M), NOC-18 (300 μ M) y ODQ + NOC-18 (10 μ M y 300 μ M respectivamente). Al finalizar el tratamiento, las células fueron homogenizadas, se determinó la concentración de proteínas empleando el método BCA. Se realizó la separación electroforética de las proteínas en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas n-nitrosiladas. Se adquirió la imagen de la membrana en un fotodocumentador y se realizó una densitometría normalizando los valores con respecto a la condición control, para cada grupo de proteínas. La diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista clínico, la metástasis es responsable de más del 90% de las muertes ocasionadas por cáncer, ya que las personas sufren alteraciones sistémicas irreversibles. Con respecto al cáncer de mama, la OMS ha reportado la detección de 1.38 millones de nuevos casos cada año, y la muerte de 458 mil personas por esta enfermedad. En México, el INEGI reportó que durante 2015 se detectaron 27.90 nuevos casos por cada 100 mil habitantes. El cáncer de mama triple negativo, representa del 15 al 20% del total de casos de cáncer de mama detectados, es el subtipo más agresivo, posee un alto potencial metastásico, y presenta alta recurrencia, ya que no se cuenta actualmente con un tratamiento farmacológico apropiado (Blows et al, 2010).

Se ha determinado que en el microambiente tumoral existe una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, las cuales provienen de los macrófagos infiltrados, así como de las propias células tumorales. La activación de macrófagos estimula la expresión de iNOs, cuya actividad genera NO, el cual a través de la vía dependiente e independiente de GCs, incide directamente en el potencial metastásico de las células tumorales (Gupta & Massagué, 2006). Estudios realizados en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, se ha correlacionado de manera positiva, la sobreexpresión de iNOS con el grado de malignidad del tumor, así como con la baja probabilidad de supervivencia de los pacientes (Granados et al, 2015; Ranganathan et al, 2016). Se ha observado que el NO ejerce su efecto sobre la fisiología celular dependiendo de su concentración (Vannini et al, 2015).

El propósito del presente trabajo fue investigar si el NO a través de la vía independiente de GCs es capaz de exacerbar el potencial metastásico de las células tumorales de mama MDA-MB 231, provenientes de cáncer de mama triple negativo. Debido a la breve vida media del NO, es complicado evaluar sus niveles reales, por lo que determinamos el NO de manera indirecta cuantificando los niveles de nitritos, mediante la reacción de Griess. Bajo nuestras condiciones experimentales utilizamos el NOC-18, como donador de NO, compuesto insensible a la luz, y que libera NO de manera constante con una vida media de 20 horas. La concentración utilizada de NOC-18 en nuestros experimentos fue de 300µM, que según el estudio realizado por Switzer en el año 2012, liberaría aproximadamente 400

nM de NO, y se utilizó además ODQ para bloquear la actividad de la GCs, dejando únicamente activa la vía independiente de GCs.

Inicialmente evaluamos el efecto del NO sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, obteniendo dos resultados que pudieran ser considerados como contradictorios. Al mantener las células MDA-MB 231 por 72 horas en presencia de NOC-18, se observó en un microscopio de campo claro, que el NO reducía de manera drástica la población celular, hecho confirmado al realizar el conteo celular con un citómetro de flujo portátil. Este primer dato coincide con estudios realizados por 89. Switzer y colaboradores realizados en 2012, donde observaron que NOC-18 o DETA-NONOATO produce apoptosis a una concentración de 300 μ M en la misma línea celular, por su parte, Laudanski y colaboradores en el 2001, demostraron que otro donador de NO, Glyco-2-SNAP, reduce la capacidad proliferativa de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231, para lo cual evaluaron por inmunocitoquímica la inmunoreactividad que presenta el anticuerpo que reconoce Ki-67, marcador nuclear de proliferación. De manera complementaria al conteo celular, evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, observando que contrario a lo que esperábamos, un incremento en los niveles de expresión de Ki-67 en las células tratadas con NOC-18. Estos datos experimentales contradictorios en un principio, nos sugieren que la exposición al NO hace una selección de una subpoblación celular de la línea tumoral MDA-MB 231 con alta capacidad proliferativa, la cual pudiera representar las llamadas *stem-cell like*, que pudieran ser las responsables de la progresión y desarrollo del cáncer de mama. Una manera de comprobarlo es aislar y expandir esta subpoblación celular e identificar la presencia de marcadores moleculares específicos de las *stem-cell like*, tales como CD24, CD44 entre otros.

El NO en nuestras condiciones experimentales reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, según los ensayos realizados en cámaras transwell. Este resultado contrasta con lo reportado en la literatura, por ejemplo, Jadeski y colaboradores en 2003, mostraron que en células de cáncer de mama en modelo murino (CH3), la migración celular se ve favorecida por la expresión de iNOS y la producción de NO, o con el uso de un donador de NO, nitropusiato de sodio, y que este efecto era dependiente de la actividad de la GCs, ya que en presencia de ODQ se redujo la migración celular; por su parte, Zhao y colaboradores

en 2017, demostraron que las células MCF-7 y MDA-MB231, incrementan su potencial migratorio mediante la activación y sobreexpresión de iNOS; en células de glioma, U87 y C6, se observa un efecto similar (Shen et al, 2014). El resultado que obtuvimos puede deberse a varias causas, la primera, es la duración del tratamiento, en los casos previamente reportados, no fue mayor a las 24 horas, en nuestra condición fue de 72 horas; segunda causa, el tipo de donador de NO para la concentración efectiva de NO liberado; el NOC-18 ha sido considerado recientemente como un donador estable y efectivo de NO. Consideramos que el NO a mayor duración de tratamiento, puede llegar a estimular la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, ya que en las primeras 72 horas de tratamiento, observamos un incremento significativo en los niveles del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 y de la MMP-9. Se ha descrito ampliamente en la literatura que estas dos proteínas se encuentran ampliamente involucrados en la capacidad migratoria (Nav 1.5) y en la capacidad invasiva (MMP9) de las células tumorales (Vázquez et al., 2015). Entonces probablemente lo que está ocurriendo en las primeras 72 horas de tratamiento, es que el NO está capacitando a la célula para incrementa su potencial migratorio e invasivo.

Las células tumorales son capaces de producir citocinas proinflamatorias, las cuales pueden actuar de manera autocrina o paracrina con el fin de exacerbar su potencial metastásico. Las células MDA-MB 231 al ser expuestas crónicamente a la presencia de NO incrementa los niveles de expresión del ARNm que codifica para dos citocinas proinflamatorias, IL-6 e IL-8, las cuales hemos observado en trabajos previos del laboratorio que exacerban el potencial metastásico de las células MDA-MB 231 (Vazquez M, 2015; Ruiseco K, 2015). El uso de Na_2Se_3 nos permitió proponer que el efecto inductor de NO sobre la expresión de estas citocinas proinflamatoria es diferencial, para la expresión de IL-6 es dependiente de la activación del NF- κ B, mientras que para la expresión de IL-8 es independiente, lo cual nos lleva a una nueva interrogante, cuál será la vía de señalización involucrada.

Una característica de las células de cáncer de mama triple negativo, es que presentan quimiorresistencia a Doxorubicina, de ahí su alta recurrencia y pobre pronóstico de vida del paciente. Decidimos evaluar si la exposición prolongada a NO, influye sobre la quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a la Doxorubicina, observamos que el NO

no afecta de manera significativa la quimiosensibilidad de las células MDA-MB 231 en presencia de Doxorubicina, manteniéndose el mismo porcentaje de supervivencia celular (datos no mostrados). Algunos trabajos han propuesto al NO como un coadyuvante para el tratamiento quimioterapéutico y otros como un factor inductor de quimiorresistencia, por ejemplo, Ren y colaboradores en 2016, mostraron que el NO, puede colaborar con la inhibición de la resistencia a fármacos, de manera independiente de los transportadores ABC, mediante la vía de regulación de HIF-1 α , AKT, ERK, NF- κ B y la *s*-nitrosilación de proteínas; por su parte, Sharma y colaboradores en el 2015, demostraron que en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, tratadas con donadores de NO, producen resistencia a un agente toxico (Kumar et al, 2016).

La angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos es una condición necesaria para el desarrollo y progresión del cáncer, que depende entre otros factores de VEGF y de HIF-1 α . En nuestras condiciones experimentales el NO influye positivamente en la expresión del ARNm que codifica para HIF-1 α y VEGF, así como en la expresión de la proteína HIF-1 α en las células MDA-MB 231. Este efecto estimulador del NO depende de la actividad de la GCs, ya que en presencia de ODQ, se observa una reducción significativa al efecto estimulador del NOC-18, incluso por debajo del valor de la condición control. A nivel de proteína, se observa que hay una tendencia a incrementarse los niveles de expresión de la proteína HIF-1 α . Las RNS como ONOO⁻, N₂O₃, NO₃ y NO₂, pueden producir *s*-nitrosilación de proteínas específicas, por ejemplo, la nitrosilación de los residuos de cisteína Cys800, estimula la actividad transcripcional de HIF-1 α (Yasinska & Sumbayev, 2003), así como su estabilización en condiciones de normoxia, lo que se reflejaría como un incremento a nivel de proteína y en los niveles de expresión de VEGF.

Estudios realizados por otro grupo de investigadores, mostraron que en condiciones de hipoxia los macrófagos presentan una elevada expresión del receptor a adenosina A₂B, debido a que HIF-1 α funciona como factor de transcripción para ADORA2B (Poth et al, 2013). Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraron que las células MDA-MB 231 sobre-expresan el ARNm que codifica para el receptor de adenosina A₂B y que este receptor se relaciona ampliamente con un incremento en la proliferación (Fernandez et al, 2016). En nuestros resultados suplementarios observamos que la presencia de NO induce

un incremento en los niveles proteicos del receptor A2B, lo que estaría indicando que el NO estuviera estabilizando la proteína HIF-1 α .

Dos de los principales efectos que inducen las RNS son: el primero, daño a la membrana celular, como es la lipoperoxidación de ácidos grasos, los cuales resultan en la consecuente muerte celular o apoptosis. Se ha sugerido que en la línea celular MDA-MB 231 incrementa los niveles de Malonil-dialdehído (MDA), después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos como Doxorubicina para incrementar la apoptosis (Mahéo et al., 2005). Nuestros resultados en la medición de la concentración de Malonil-dialdehído sugieren que las membranas celulares de las células tratadas con NOC-18, no sufren lipoperoxidación, lo cual indica que las células que están vivas se encuentran en perfectas condiciones para poder incrementar su potencial metastásico. La segunda característica, es la *s*-nitrosilación de proteínas, la cual también se encuentra ampliamente relacionada con el incremento del potencial metastásico de las células tumorales. Se ha reportado una gran variedad de proteínas susceptibles a ser *s*-nitrosiladas, tal es el caso de las caspasas 3 y 9 que al sufrir esta modificación inhiben su actividad y por lo tanto la apoptosis (Thomsen & Miles et al, 1998), otra proteína es la Bcl-2, la cual tiene efectos antiapoptóticos, la c-Src implicada en la migración y el HIF-1 α implicado en el proceso angiogénico (Feoktistov et al, 2003; Buolamwini, 1999; Oxford et al, 2004; Huerta-Fernández, 2014). En nuestros resultados de Western-Blot para proteínas totales *s*-nitrosiladas, detectamos un incremento en los niveles de proteínas nitrosiladas cuando la GCs es inhibida o en presencia de NOC-18.

En resumen, podemos decir que el NO liberado por el NOC-18, reduce el número celular y la capacidad migratoria en una subpoblación significativa de la línea celular MDA-MB 231, mientras que en otra subpoblación de células MDA-MB 231, probablemente con características de *stem-cell like*, induce un incremento en los niveles de expresión de un marcador nuclear de proliferación celular (Ki-67), así como de proteínas asociadas a la migración e invasión celular, Nav 1.5 y MMP9. La presencia de NO induce un incremento en la expresión de IL-6, IL-8, HIF-1 α , VEGF, ADORA2B, proteínas asociadas positivamente al potencial metastásico de las células tumorales, incluyendo las células MDA-MB 231. La presencia de RNS no altera los niveles de lipoperoxidación de la membrana plasmática, pero si el nivel de proteínas nitrosiladas. El conocimiento de que el

NO a través de la vía independiente de GCs, pueda ser una señal extracelular que exacerbe el potencial metastásico de las células tumorales, hace posible proponer a la iNOS como un blanco farmacológico para reducir el desarrollo y progresión tumoral.

CONCLUSIONES

1. El NO estimula la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, mediante un mecanismo independiente de GCs.
2. La quimiorresistencia de las células MDA-MB 231 a la Doxorubicina, se ve reducida con NO.
3. El NO disminuye la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y este efecto es independiente de la vía mediada por GCs.
4. Los niveles de expresión del ARNm que codifica para el canal de sodio Nav 1.5 y la MMP9, proteínas relacionadas positivamente con la migración e invasión celular se encuentran incrementadas, después de la presencia crónica de NO. Lo que nos sugiere que las células tumorales de mama MDA-MB 231, podrían estar sintetizando proteínas que le ayude a incrementar su capacidad migratoria e invasiva.
5. El NO incrementa la condición inflamatoria al estimular la expresión de IL-6 e IL-8, donde la expresión de IL-6 es dependiente de la activación del NF- κ B, mientras que es independiente para el caso de IL-8.
6. El NO favorece la expresión de factores angiogénicos, en células MDA-MB 231, incrementando los niveles de expresión de HIF-1 α y VEGF, siendo este efecto dependiente de la activación de la vía de señalización de GCs.
7. El NO reduce el nivel de lipoperoxidación de la membrana plasmática en las células MDA-MB 231, e incrementa la nitrosilación de proteínas totales.

BIBLIOGRAFIA

A. Martinez-Ruiz, S. Lamas. (2008). Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 423:192–199.

Akhand, A. A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., & Nakashima, I. (1999). Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25821-25826.

Almeda-Valdés, P., Cuevas-Ramos, D., & Aguilar-Salinas, C. A. (2009). Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 8(Suppl 1), S18-S24.

American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018*. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.

Anderson, K. N., Schwab, R. B., & Martinez, M. E. (2014). Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast cancer research and treatment*, 144(1), 1-10.

Azad, N., Iyer, A. K. V., Wang, L., Lu, Y., Medan, D., Castranova, V., & Rojanasakul, Y. (2010). Nitric oxide-mediated Bcl-2 stabilization potentiates malignant transformation of human lung epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(5), 578-585.

Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S. S., & Rojanasakul, Y. (2006). S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation a novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34124-34134.

Bassuk, S. S., & Manson, J. E. (2015). Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. *Annals of epidemiology*, 25(3), 193-200.

Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(11), 674.

Block, G., Dietrich, M., Norkus, E. P., Morrow, J. D., Hudes, M., Caan, B., & Packer, L. (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. *American journal of epidemiology*, 156(3), 274-285.

Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M.c., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L.A., Bégin, L.R., Foulkes, W.D., Couch, F. J., Olson, J. E., Baglietto, L., Giles, G.G., Severi, G., McLean, C.A., Southey, M.C., Rakha, E., Green, A.R., Ellis, I.O., Sherman, M.E., Lissowska, J., Anderson, W.F., Cox, A., Cross, S.S., Reed, M.W.R., Provenzano, E., Dawson, S.J., Dunning, A.M., Humphreys, M., Easton, D.F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P., & Huntsman, D. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*, 7(5), e1000279.

Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., & Heikkilä, P. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long-term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*, 7(5), e1000279.

Buolamwini, J. K. (1999). Novel anticancer drug discovery. *Current opinion in chemical biology*, 3(4), 500-509.

Buolamwini, J. K. (1999). Novel anticancer drug discovery. *Current opinion in chemical biology*, 3(4), 500-509.

Burke, A. J., Sullivan, F. J., Giles, F. J., & Glynn, S. A. (2013). The yin and yang of nitric oxide in cancer progresión. *Carcinogénesis*, 34(3), 503-512.

Carbonell, L. F., Díaz, J., Hernández, I., Cuevas, S., Valero, F., Quesada, T., & Salom, M. G. (2007). N-acetylcysteine exerts protective effects and prevents lung redox imbalance and peroxynitrite generation in endotoxemic rats. *Medicinal Chemistry*, 3(1), 29-34.

Cheang, M. C., Martin, M., Nielsen, T. O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., & Calvo, L. (2015). Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The oncologist*, 20(5), 474-482. Chlebowski, R. T., Manson, J. E., Anderson, G. L., Cauley, J. A., Aragaki, A. K., Stefanick, M. L., Lane, D.S., Johnson, K. C., Wactawski-Wende, J., Chen, C., Qi, L., Yasmeen, S., Newcomb, P. A., & Prentice, R. L. (2013). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(8), 526-535.

Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol*, 11, 118.

De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*, 13(6), 607-615.

Feoktistov, I., Ryzhov, S., Goldstein, A. E., & Biaggioni, I. (2003). Mast Cell-Mediated Stimulation of Angiogenesis. *Circulation research*, 92(5), 485-492.

Forman, H. J., Torres, M., & Fukuto, J. (2002). Redox signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234(1), 49-62.

Förstermann, U., Mülsch, A., Böhme, E., & Busse, R. (1986). Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation research*, 58(4), 531-538.

Friebe, A., & Koesling, D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research*, 93(2), 96-105.

Fukumura, D., Kashiwagi, S., & Jain, R. K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 521-534.

- Ghezzi, P., Bonetto, V., & Fratelli, M. (2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(7-8), 964-972.
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., & Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free radical research*, 40(5), 495-505.
- Giuliano, A. E., Connolly, J. L., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S., Solin, L. J., & Hortobagyi, G. N. (2017). Breast Cancer—Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: A Cancer Journal for Clinicians.
- Granados-Principal, S., Liu, Y., Guevara, M. L., Blanco, E., Choi, D. S., Qian, W., & Zhao, H. (2015). Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 25.
- Granados-Principal, S., Liu, Y., Guevara, M. L., Blanco, E., Choi, D. S., Qian, W., & Zhao, H. (2015). Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 25.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309.
- Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., & Bernlohr, D. A. (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32), 21837-21841.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
- Ham, M., & Moon, A. (2013). Inflammatory and microenvironmental factors involved in breast cancer progression. *Archives of pharmacal research*, 36(12), 1419-1431.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2006). Nitric Oxide and Posttranslational Modification of the Vascular Proteome S-Nitrosation of Reactive Thiols. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(6), 1207-1214.
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2006). Nitric Oxide and Posttranslational Modification of the Vascular Proteome S-Nitrosation of Reactive Thiols. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(6), 1207-1214.
- Haque, R., Ahmed, S. A., Inzhakova, G., Shi, J., Avila, C., Polikoff, J., & Press, M. F. (2012). Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 21(10), 1848-1855.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(2), 150-166.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 150-166.
- Hickok, J. R., & Thomas, D. D. (2010). Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Current pharmaceutical design*, 16(4), 381-391.
- Huertas Fernández-Espartero, C. (2013). Mecanismos moleculares que regulan la migración celular colectiva.
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular aspects of medicine*, 32(4), 234-246.
- Instituto Mexicano del Seguro Social [IMSS]. (2015). Octubre “Mes de sensibilización del cáncer de mama”. Recuperado el 2 de septiembre de 2015, de: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI). Febrero 2017.
http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI). Octubre 2016.
http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf

Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 10, noviembre de 2015, de
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es#tipos>

Jadeski, L. C., Chakraborty, C., & Lala, P. K. (2003). Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *International journal of cancer*, 106(4), 496-504.

Janakiram, N. B., & Rao, C. V. (2015). Nitric oxide: immune modulation of tumor growth. In *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy* (pp. 159-175). Springer International Publishing.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

Jin, Z., Wang, W., Jiang, N., Zhang, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, Y. (2015). Clinical Implications of iNOS Levels in Triple-Negative Breast Cancer Responding to Neoadjuvant Chemotherapy. *PloS one*, 10(7), e0130286.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420.

Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. (2013) Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* (14) 1009-1019.

Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., & Medford, R. M. (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9114-9119.

Kumar, A., Ehrenshaft, M., Tokar, E. J., Mason, R. P., & Sinha, B. K. (2016). Nitric oxide inhibits topoisomerase II activity and induces resistance to topoisomerase II-poisons in

human tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(7), 1519-1527.

La Vecchia, C., Giordano, S. H., Hortobagyi, G. N., & Chabner, B. (2011). Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *The oncologist*, 16(6), 726-729.

Laudański, P., Dziecioł, J., Anchim, T., & Wołczyński, S. (2001). The influence of glyco-nitric oxide conjugate on proliferation of breast cancer cells in vitro. *Folia histochemica et cytobiologica*, 39, 87.

Leon, L., Jeannin, J. F., & Bettaieb, A. (2008). Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide*, 19(2), 77-83.

Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., & Li, C. Y. (2007). Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Molecular cell*, 26(1), 63-74.

Liu, X. B., Hill, P., & Haile, D. J. (2002). Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 29(3), 315-326.

Liu, Y., Nguyen, N., & Colditz, G. A. (2015). Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's Health*, 11(1), 65-77.

Macacu, A., Autier, P., Boniol, M., & Boyle, P. (2015). Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 154(2), 213-224.

Mahéo, K., Vibet, S., Steghens, J. P., Dartigeas, C., Lehman, M., Bougnoux, P., & Goré, J. (2005). Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(6), 742-751.

Mahéo, K., Vibet, S., Steghens, J. P., Dartigeas, C., Lehman, M., Bougnoux, P., & Goré, J. (2005). Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: a role for lipoperoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(6), 742-751.

Manson, J. E., Chlebowski, R. T., Stefanick, M. L., Aragaki, A. K., Rossouw, J. E., Prentice, R. L., & Wactawski-Wende, J. (2013). Menopausal hormone therapy and health

outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *Jama*, 310(13), 1353-1368.

Mayer, B. J., & Gupta, R. (1998). Functions of SH2 and SH3 domains. In *Protein Modules in Signal Transduction* (pp. 1-22). Springer Berlin Heidelberg.

Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 449-458.

Michel, T., & Feron, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *Journal of Clinical Investigation*, 100(9), 2146.

Mikkelsen, R. B., & Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22(37), 5734-5754.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., & Barrera, J. L. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 50-56.

Nelson, H. D., Zakher, B., Cantor, A., Fu, R., Griffin, J., O'meara, E. S., & Mandelblatt, J. S. (2012). Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49

Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., & Uehara, T. (2011). On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10349-10354.

Organización Mundial de la Salud. Fact Sheet. No. 297. Octubre 2017.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Organización Mundial de la Salud. Fact Sheet. No. 297. Octubre 2016b.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Oxford, S. M., Dallman, C. L., Johnson, P. W., Ganesan, A., & Packham, G. (2004). Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells. *Current medicinal chemistry*, 11(8), 1031-1040.

Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373(6515), 573-580.

Pellman, D., Garber, E. A., Cross, F. R., & Hanafusa, H. (1985). An N-terminal peptide from p60src can direct myristylation and plasma membrane localization when fused to heterologous proteins.

Poth, J. M., Brodsky, K., Ehrentaut, H., Grenz, A., & Eltzschig, H. K. (2013). Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease. *Journal of molecular medicine*, 91(2), 183-193.

Rahman, M. A., Senga, T., Ito, S., Hyodo, T., Hasegawa, H., & Hamaguchi, M. (2010). S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3806-3814.

Ranganathan, S., Krishnan, A., & Sivasithambaram, N. D. (2016). Significance of twist and iNOS expression in human breast carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 412(1-2), 41-47.

Ranganathan, S., Krishnan, A., & Sivasithambaram, N. D. (2016). Significance of twist and iNOS expression in human breast carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 412(1-2), 41-47.

Rapoport, R. M., Draznin, M. B., & Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation.

Ren, Z., Gu, X., Lu, B., Chen, Y., Chen, G., Feng, J., & Peng, H. (2016). Anticancer efficacy of a nitric oxide-modified derivative of bifendate against multidrug-resistant cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(6), 1095-1105.

Rössig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mülsch, A., & Dimmeler, S. (1999). Nitric Oxide Inhibits Caspase-3 by S-Nitrosation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6823-6826.

Sharma, N. K., Kumar, A., Kumari, A., Tokar, E. J., Waalkes, M. P., Bortner, C. D., & Sinha, B. K. (2015). Nitric oxide down-regulates topoisomerase I and induces camptothecin resistance in human breast MCF-7 tumor cells. *PloS one*, 10(11), e0141897.

- Shen, S. C., Wu, M. S., Lin, H. Y., Yang, L. Y., Chen, Y. H., & Chen, Y. C. (2014). Reactive Oxygen Species-Dependent Nitric Oxide Production in Reciprocal Interactions of Glioma and Microglial Cells. *Journal of cellular physiology*, 229(12), 2015-2026.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64,9-29.
- Siegert, A., Rosenberg, C., Schmitt, W. D., Denkert, C., & Hauptmann, S. (2002). Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion. *British journal of cancer*, 86(8), 1310-1315.
- Singletary, K. W., & Gapstur, S. M. (2001). Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Jama*, 286(17), 2143-2151.
- STEPNIK, M. (2002). Roles of nitric oxide in carcinogenesis. Protumorigenic effects. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 15(3), 219-227.
- Switzer, C. H., Glynn, S. A., Cheng, R. Y. S., Ridnour, L. A., Green, J. E., Ambs, S., & Wink, D. A. (2012). S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Molecular Cancer Research*, 10(9), 1203-1215.
- Tenneti, L., D'Emilia, D. M., & Lipton, S. A. (1997). Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neuroscience letters*, 236(3), 139-142.
- Thom, S. R., Bhopale, V. M., Milovanova, T. N., Yang, M., & Bogush, M. (2012). Thioredoxin reductase linked to cytoskeleton by focal adhesion kinase reverses actin S-nitrosylation and restores neutrophil $\beta 2$ integrin function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30346-30357.
- Thomsen, L. L., & Miles, D. W. (1998). Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 107-118.
- Thomsen, L. L., & Miles, D. W. (1998). Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 107-118.

Thomsen, L. L., & Miles, D. W. (1998). Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 107-118.

Tung, N., Lin, N. U., Kidd, J., Allen, B. A., Singh, N., Wenstrup, R. J., & Garber, J. E. (2016). Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(13), 1460-1468.

Turnbull, C., & Rahman, N. (2008). Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 321-345.

Vannini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, 6, 334-343.

Vazquez., R. M. (2015). La presencia de citosinas pro-inflamatorias exacerban l capacidad proliferativa y migratoria de células provenientes de cáncer de mama.

Victorino, V. J., Campos, F. C., Herrera, A. C., Simão, A. N. C., Cecchini, A. L., Panis, C., & Cecchini, R. (2014). Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumor Biology*, 35(4), 3025-3034.

Weiming, X. U., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., & Charles, I. G. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell research*, 12(5), 311-320.

West, J. D., & Marnett, L. J. (2006). Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chemical research in toxicology*, 19(2), 173-194.

Wink, D. A., Grisham, M. B., Mitchell, J. B., & Ford, P. C. (1996). Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods in enzymology*, 268, 12-31.

Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W., & Mitchell, J. B. (1998). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*, 19(5), 711-721.

Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(Pt 1), 17.

Yasinska, I. M., & Sumbayev, V. V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters*, 549(1-3), 105-109.

Zhao, T., Guo, D., Gu, Y., & Ling, Y. (2017). Nifedipine stimulates proliferation and migration of different breast cancer cells by distinct pathways. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 2259-2263.

Zhu, W., Yang, B., Fu, H., Ma, L., Liu, T., Chai, R., & Li, G. (2015). Flavone inhibits nitric oxide synthase (NOS) activity, nitric oxide production and protein S-nitrosylation in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 458(3), 590-595.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

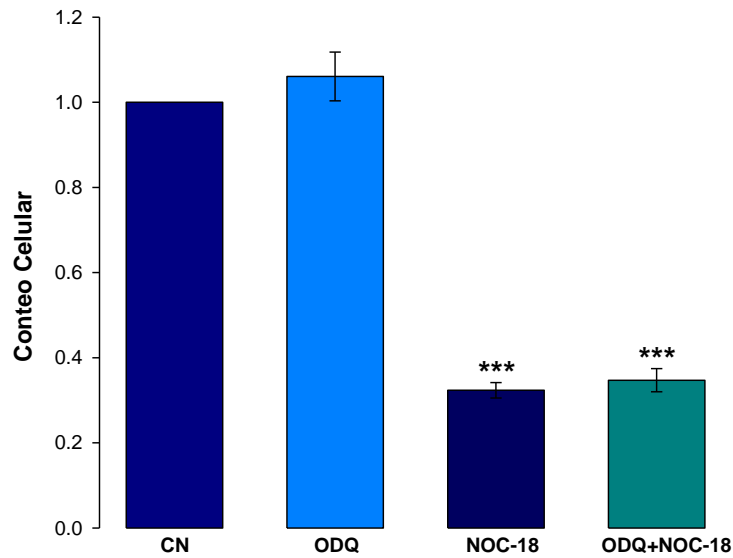


FIGURA 17. NOC-18 induce una disminución en el número de células. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas por 72 horas en presencia de ODQ (10 μM), NOC-18 (300 μM) y ODQ + NOC-18 (10 μM y 300 μM respectivamente). Al finalizar el tratamiento se realizó el conteo celular con un clitómetro de flujo portátil Scepter 2.0. El ensayo se realizó por triplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de $***p \leq 0.001$.

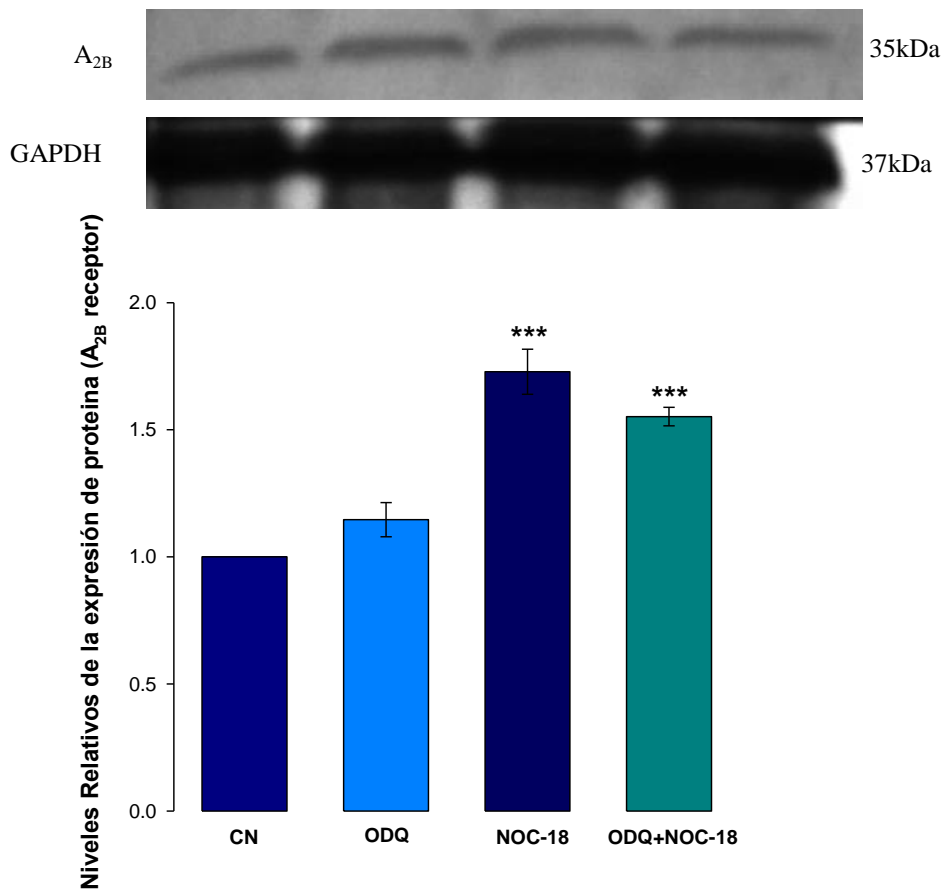


Figura 18: Western Blot para proteínas implicadas en la angiogénesis, después del tratamiento con ODQ y Noc-18 por 72 horas. a) Microfotografía de la expresión proteica del receptor de adenosina A_{2B}, en células MDA-MB231, tratadas con ODQ 10 μ M y NOC-18 300 μ M. b) Análisis densitométrico cuantitativo donde se observó un incremento, en las células tratadas con Noc-18 y ODQ+ Noc-18 con un valor de ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.001$) respectivamente. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

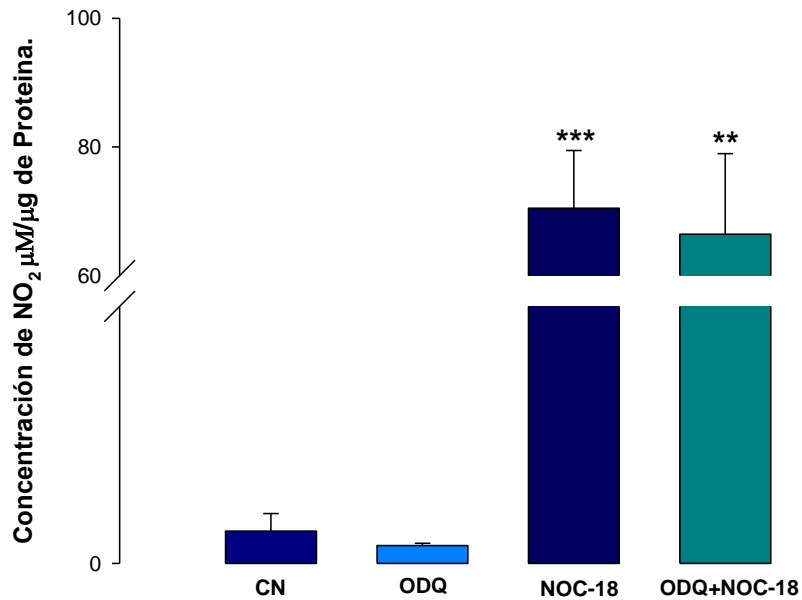


Figura19: Determinación de Nitritos por método de Gries, en células Tratadas con ODQ y Noc-18 por 72horas. a) Se realizó la determinación de la concentración de Nitritos (NO₂), del medio de cultivo celular de nuestras células tratadas con ODQ y Noc-18. Se encontró un incremento de la concentración con respecto al control en las células tratadas con NOC-18 y ODQ+NOC-18, con diferencias estadísticamente significativas con un valor de ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.006$) respectivamente. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.