



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

“LPS INDUCE LA EXPRESION DE IL-8, MANTENIENDO EL
FENOTIPO MESENQUIMAL Y EXACERBANDO LA CAPACIDAD
METASTÁSICA DE LA LÍNEA TUMORAL MDA-MB 231”

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

AARÓN GERARDO SÁNCHEZ BRITO

Director de Tesis:

D. EN C. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN

Abril, 2018

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis representa, para mi, un gran logro tanto personal como profesional en mi vida, en el cual se ve reflejada mi deseo por enorgullecer a mis seres queridos y, sobre todo, mi deseo de superación personal. De igual forma, me gustaría mencionar a las personas cuyo aporte resulto indispensable para iniciar y concluir mi satisfactoriamente este proyecto.

A mi familia, le agradezco todo el apoyo que me han brindado desde niño, mostrando un profundo cariño y compromiso cuando lo he necesitado, en especial a mi madre, cuyo cariño, apoyo y ejemplo me han impulsado día con día a dar lo mejor de mi. Superándome, para que algún día se sienta tan orgullosa de mi, como yo me siento por ella. Sé que con mucho trabajo, dedicación y esfuerzo, algún día me convertiré en alguien como ella.

A mi hermano Eric y a mi hermano Toño, con los cuales he crecido aprendiendo de ellos y han sido parte fundamental en mi vida, demostrando que a pesar de las diferencias, siempre estarán allí para mi y yo estaré para ellos.

A Jimena , por todo el cariño, apoyo y, sobre todo, alegría, que ha brindado a mi vida. Al ser una persona de quien he aprendido mucho y demostrar ser alguien en quien puedo confiar plenamente y con la cual he compartido muchos bellos momentos de mi vida, que estoy seguro, serán más.

Al Dr. Eduardo Monjaraz por haberme permitido ser parte de su laboratorio, del cual me llevo muchas experiencias enriquecedoras que me permitirán continuar con mi vida profesional satisfactoriamente, y por todo el apoyo que recibí en todo momento para la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, los cuales son bastantes. Kary July, Evelin, Ruben, Rafa , Mary , Scarlett, Miri, Max etc... con quienes pase momentos muy agradables y de los cuales aprendí mucho tanto profesional como personalmente, en especial a Lupita y Toño cuya amistad valoro mucho y siempre recordare con gran cariño.

A mis sinodales, los Drs. Jorge Cebada y Everado Avelino, por haberme apoyado como revisores de esta tesis, aportando de su conocimiento para enriquecerla.

A la Benemerita Universidad Autonoma de Puebla (BUAP) por abrirme las puertas de la ciencia y seguir así, con mi realización personal.

GRACIAS!!

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	6
ANTECEDENTES.....	7
ANTECEDENTES GENERALES	7
Datos Epidemiológicos del Cáncer	9
Tipos de cáncer	10
Cáncer de mama	11
Cáncer de mama en México	12
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	13
Tipos de Cáncer de Mama.....	15
Fenotipo mesenquimal en células tumorales	16
Citocinas en el desarrollo y progresión del cáncer	17
Interleucina-8 (IL-8).....	19
Receptor a LPS, TLR-4.....	24
JUSTIFICACION	27
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
METODOLOGIA	30
Cultivo de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231	31
Ensayo de expresión génica	31
a) Extracción de ARN	31
b) Cuantificación de ARN.....	32
c) Transcripción Reversa con Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	32
d) Electroforesis.....	35
ELISA	36
a) Preparación de Placas.....	36
b) Inmunoensayo.....	36
Ensayo de Proliferación Celular.....	37
Ensayo en cámara Transwell	37
Análisis estadístico.....	38

RESULTADOS	39
La expresión de IL-8 es directamente proporcional al grado de malignidad del tumor	39
.....	39
LPS estimula la expresión de IL-8	40
IL-8 exagera la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231	43
IL-8 aumenta la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231	44
IL-8 ayuda a mantener el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB 231	45
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Acido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BrEt: Bromuro de Etidio

CD14: Cluster de diferenciación 14

ADNc: ADN complementario

dNTP: deoxinucleotidos

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

IL-8: Interleucina-8

KDa: Kilodaltones

LPS: Lipopolisacarido

LBP: proteína de unión a LPS

µg: microgramos

µL: microlitro

ml: mililitro

nM: nanomolar

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NF-κB: Factor de transcripción nuclear kappa B

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNasa: Ribonucleasa

rpm: revoluciones por minuto

RT: Transcripción inversa

SFB: Suero Fetal Bovino

TLR4: Receptor Tipo Toll

TLR4: Receptor Tipo Toll 4

TEM: Transición Epitelio-Mesenquima

TNF- α: Factor de Necrosis Tumoral Alpha

RESUMEN

En la actualidad, el cáncer es un mal que ataca a un gran porcentaje de la población mundial, convirtiéndose en una de las primeras causas de defunción en países tanto desarrollados como subdesarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas, cuyas características en común son: una rápida proliferación y diseminación descontrolada de células malignas inmortalizadas para después invadir tejidos circundantes. A pesar de que, hasta el día de hoy, la comunidad científica ha invertido grandes esfuerzos y recursos en el combate de esta patología, aún queda un largo camino para encontrar una cura, o en su defecto, un método de diagnóstico temprano y oportuno para dicho mal. Esto es debido a que las células tumorales se ven beneficiadas por un sinnúmero de elementos encontrados en el microambiente tumoral.

Trabajos recientes, han demostrado que el microambiente tumoral es un factor determinante en el desarrollo y progresión del cáncer. La Interleucina-8 (IL-8), es una de las moléculas que se encuentran de manera elevada en dicho microambiente sin conocerse a detalle que señal induce su expresión y cuál es su efecto biológico en el desarrollo tumoral. De igual forma, antecedentes directos de nuestro laboratorio muestran que la activación de TLR-4 por LPS induce la expresión de IL-6 y TNF- α que incide positivamente sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Por lo que la pregunta a resolver en el presente trabajo es si el LPS induce la expresión de IL-8 en este mismo tipo celular, y si afecta su capacidad proliferativa y migratoria.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES GENERALES

Hoy día, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial; según la OMS (Organización Mundial de la Salud), el cáncer es un conjunto de enfermedades en donde el proceso de crecimiento y proliferación de células anormales se encuentra descontrolado debido a mutaciones que sufre en su genoma.

En condiciones fisiológicas, las células humanas crecen y proliferan para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita; cuando las células normales envejecen o sufren daño alguno, mueren y son remplazadas por células nuevas (NCI, 2016). Sin embargo, en el cáncer, este proceso se encuentra alterado. A medida que las células adquieren un mayor número de mutaciones, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, de esta forma, células nuevas anormales se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden proliferar sin interrupción alguna, tendiendo a formar masas, comúnmente llamadas “tumores”. A medida que se va desarrollando el tumor, dichas células suelen adquirir ciertas propiedades que le permiten invadir tejidos vecinos o distantes, proceso conocido como: “metástasis”, provocando a corto, mediano o largo plazo la muerte de la persona (OMS, 2015).

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifactorial que consiste en la progresión de una lesión precancerosa a tumor, mediante la acumulación de diversas alteraciones genéticas y la subsecuente adquisición de características específicas que son comúnmente conocidas como “*marcadores oncológicos*”, representados en la Figura 1 (Hanahan & Weinberg, 2011). Las alteraciones que presentan las células tumorales son el resultado de la interacción de factores genéticos y epigenéticos.



Figura 1. Características de las células tumorales (Hannahan & Weinberg, 2011).

Alteraciones Genéticas

Los factores genéticos involucrados en dichas alteraciones involucran tres tipos principales de genes:

- Los proto-oncogenes, que son los encargados de estimular el crecimiento y la división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes son sobre-expresados o son más activos de lo normal, pueden convertirse en genes causantes de cáncer, por lo que son llamados oncogenes, permitiendo a las células, una replicación y supervivencia exacerbada.
- Los genes supresores de tumores, al igual que los proto-oncogenes, se encargan de inhibir el crecimiento y la división celular. Las células con algunas alteraciones en la expresión de genes supresores de tumores pueden dividirse de manera descontrolada.
- Los genes reparadores del ADN, se dedican a restaurar fragmentos de ADN dañado, si esto no es posible, la célula entra en apoptosis. Las células con mutaciones en estos genes

tienden a formar mutaciones adicionales en otros genes, por lo que, la conjunción de éstas mutaciones, pueden causar que las células se transformen a células tumorales.

Alteraciones Epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas son las que ocurren a lo largo de la vida del individuo debido a la exposición a diversos agentes externos, ya sea físicos, químicos y biológicos, por ejemplo: consumo de tabaco, sobrepeso, obesidad o inactividad física, consumo excesivo de alcohol, infecciones por virus (papiloma humano transmitido por vía sexual y hepatitis B y C) y agentes cancerígenos presentes en el entorno laboral (OMS, 2016).

Datos Epidemiológicos del Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En países desarrollados se encuentra solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta misma tendencia en países en vía de desarrollo y de ingresos medio (Figura 2, OMS 2016).

En el año 2012, se le atribuyó al cáncer, alrededor de 8.2 millones de muertes a nivel mundial, y resulta lamentable saber que este número aumentará un 45% al año 2030 (pasando de 8.2 millones a 13.2 millones de defunciones), esto debido principalmente, al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población, entre otros factores (Figura 3) (UICC, 2016).

En general, la tasa de incidencia de cáncer es aproximadamente un 25% más alta en hombres que en mujeres, con tasas de 205 y 165 por cada 100,000 personas respectivamente. La tasa de incidencia de cáncer en las mujeres puede variar hasta cinco veces, dependiendo de la región del mundo en el que se encuentre, por ejemplo, puede ir desde 79 por cada 100,000 mujeres en el Oeste de África a 365 por cada 100,000 mujeres en Australia/Nueva Zelanda (GLOBOCAN, 2012 (IARC)).

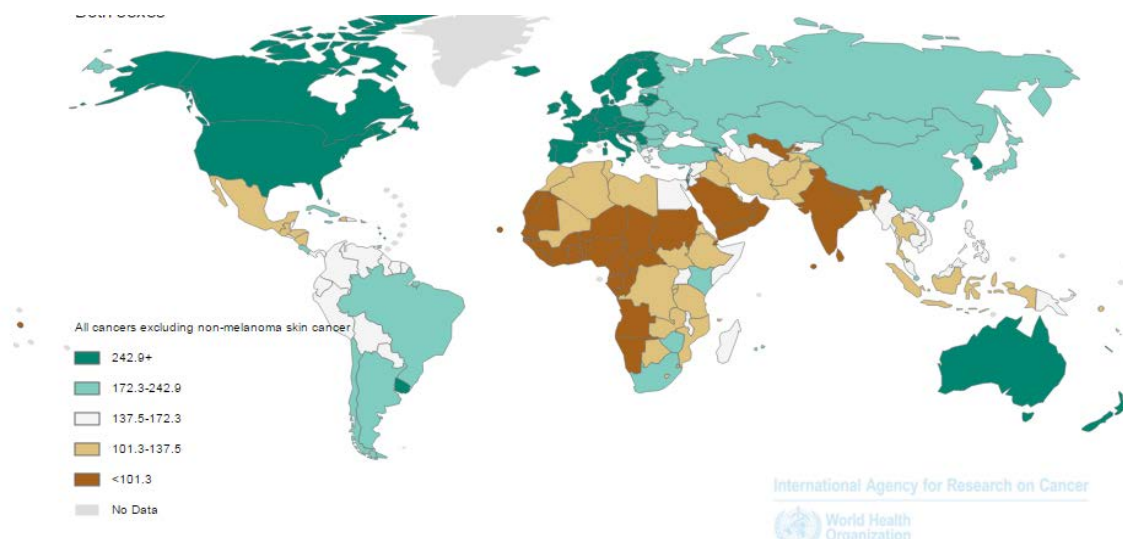


Figura 2. Incidencia del cáncer a nivel mundial, exceptuando el melanoma para ambos sexos (GLOBOCAN, 2012).

En términos de mortalidad, en hombres la tasa de mortalidad, es más alta en Centro y Este de Europa (173 por cada 100,000) y más baja en el Oeste de África (69 por cada 100,000). En contraste, la mortalidad más alta para mujeres se halló en Melanesia y Este de África, y la más baja en América Central y Centro-Sur de Asia (GLOBOCAN, 2012).

Tipos de cáncer

Hasta la fecha, han sido descritos más de 100 tipos de cáncer, los cuales, reciben por lo general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se originó. De igual manera, el cáncer puede también describirse según el tipo de célula que le forma, como célula epitelial o célula escamosa (NCI, 2016). Siendo el más común el cáncer de tipo epitelial, aproximadamente el 90% de los casos, encontrándose una mayor incidencia y mortalidad en cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon, próstata y glándula mamaria (GLOBOCAN, 2012). En el presente trabajo haremos referencia al cáncer de mama, por ser el principal tipo de cáncer que aqueja a la población femenina a nivel mundial.

Cáncer de mama

“1 de cada 8 mujeres tendrá cáncer de mama a lo largo de su vida.” (AECC, 2014)

El cáncer de mama, es el cáncer más común en las mujeres adultas a nivel mundial. Se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública, que puede provocar además de incapacidad de la persona, su muerte (INSP, 2009).

La OMS informó que en el año 2012, se detectaron un total de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados de cáncer de mama, representando el 25% de todos los tipos de cáncer. Este cáncer, es el más frecuente en mujeres de regiones tanto desarrolladas como subdesarrolladas, existiendo un ligero incremento en las menos desarrolladas, 883,000 casos, con respecto a las más desarrolladas, 794,000 casos; paralelo a esto, el mayor número de decesos se registra en regiones de bajos ingresos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a información oportuna, servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección precoz (OMS, 2015).

El cáncer de mama, constituye la quinta causa de muerte por cáncer, aproximadamente 522,000 muertes, presentándose el mayor número de muertes en las regiones con menores ingresos (324,000) con respecto a las regiones más desarrolladas (194,000 muertes). Los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama son el aumento en la esperanza de vida, la urbanización y cambios en el modo de vida (OMS, 2015).

El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI), señala que la incidencia de cáncer de mama en las mujeres caucásicas, se puede presentar a cualquier edad, mientras que en las mujeres afroamericanas, hay una mayor incidencia antes de los 40 años de edad y presentan los índices de mortalidad más altos que las mujeres de cualquier otro grupo étnico o racial (NCI, 2014).

Cáncer de mama en México

La tasa de mortalidad de cáncer de mama en México, presenta un importante aumento en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de 2 a 4 muertes por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años. Posteriormente, esta cifra se elevó de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por cada 100,000 para mediados de la década de 1990 (INSP, 2009). Actualmente, el promedio nacional para la tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres de 20 años en adelante, se ubica en 14.05 mujeres por cada 100,000 mostrando los valores más altos el Distrito Federal (20.55), Chihuahua (20.71) y Baja California Sur (19.08), mientras que las entidades con menor tasa de mortalidad son Quintana Roo (5.96), Oaxaca (7.18) y Campeche (8.18) (Figura 3) (INEGI, 2014).

El cáncer de mama en varones es poco frecuente, aproximadamente el 1% del total de casos. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 60 a 70 años, aunque puede afectar a hombres de cualquier edad (American Cancer Society, 2013).

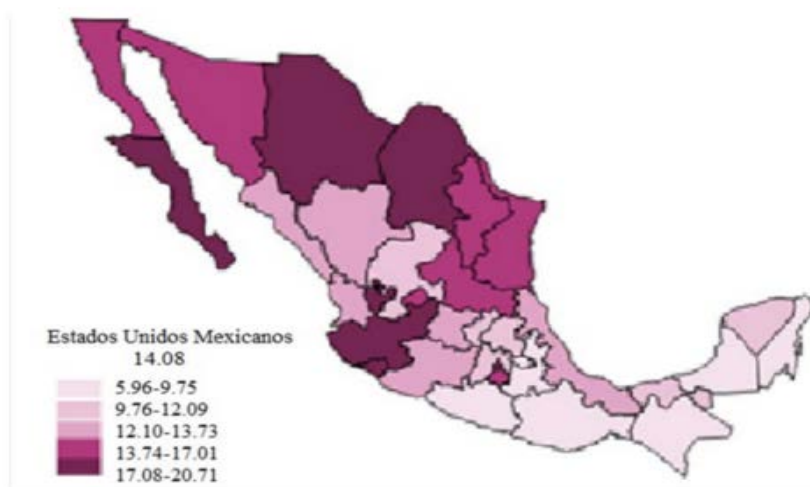


Figura 3. Tasa de mortalidad de cáncer de mama 1984-2013 (INEGI, 2014).

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

La mama o glándula mamaria, constituye la característica fundamental de los mamíferos, quienes alimentan a sus crías con el producto de su secreción, la leche. Dichas glándulas se encuentran presentes en ambos sexos. En el caso del varón, se mantienen rudimentarias toda su vida, sin embargo, en la mujer, al inicio están poco desarrolladas, una vez llegada la pubertad, es cuando comienza su proceso de maduración. El desarrollo máximo de las glándulas ocurre durante el embarazo y especialmente durante la lactancia (EHAS, 2001).

La mama está constituida por múltiples lóbulos (15 a 20), éstos, a su vez están conformados por lobulillos, los cuales contienen grupos de células glandulares, responsables de la producción de leche. Los lóbulos y lobulillos están unidos por una serie de ductos o conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón durante la lactancia; tanto el tejido conectivo como el graso rodean y llenan el espacio entre ductos y lóbulos, otorgando volumen y consistencia a la mama (Figura 4) (National Cancer Institute, 2012; American Cancer Society, 2013).

De igual forma, la mama contiene vasos sanguíneos cuya función es proporcionar nutrientes y oxígeno a la glándula; y vasos linfáticos que son los encargados de recoger la linfa para después confluir en pequeñas formaciones redondeadas denominadas ganglios linfáticos; los más cercanos se encuentran en la axila y a los lados del esternón (AECC, 2016).

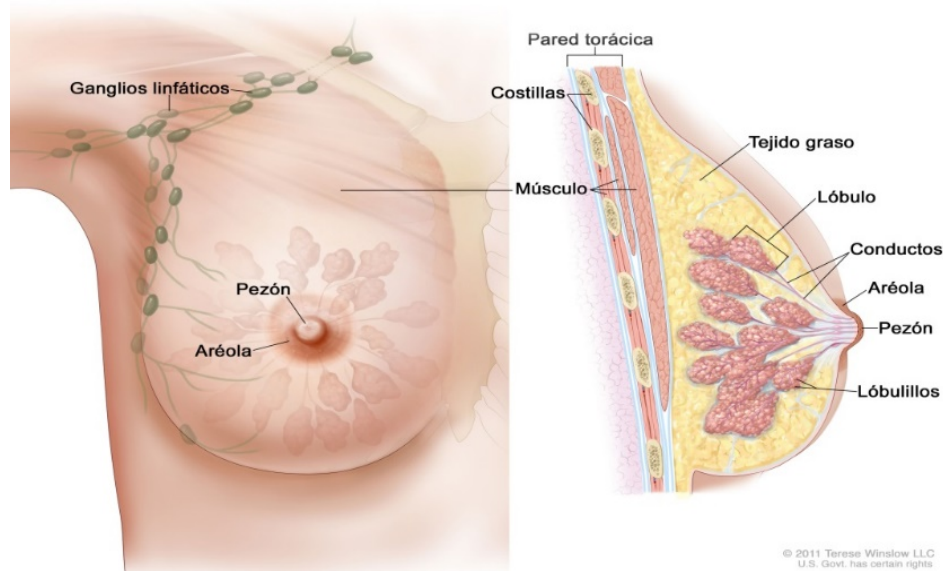


Figura 4. Representación anatómica de la glándula mamaria (Terese Winslow,2011)

Durante la pubertad, las mamas sufren más cambios que ningún otro órgano. La actividad endocrina del ovario se incrementa, presentándose un aumento en los niveles de producción de hormonas esteroideas femeninas (estrógenos y progesterona), las mamas crecen durante la pubertad y se ven influenciadas en la edad reproductiva por los ciclos menstruales.

Cuando estos mecanismos comienzan a actuar de manera anómala en una sola célula, ésta y su progenie inician una división incontrolada que, con el tiempo, dará lugar a un tumor o nódulo. Estas células benignas en un inicio, no son perjudiciales, rara vez invaden tejidos adyacentes, no se disemina y una vez extirpados no suelen volver a crecer, sin embargo, pueden llegar adquirir la facultad de invadir tejidos circundantes (infiltración), trasladarse y proliferar en otras partes del organismo, metástasis, denominándosele tumor maligno (American Cancer Society, 2013). Cuando las células tumorales se originan de la glándula mamaria y tienen capacidad de invadir tejidos periféricos sanos y de alcanzar órganos alejados por medio del torrente sanguíneo y la linfa, e implantarse en ellos, hablamos de *cáncer de mama* (AECC, 2013).

Se ha considerado a la lactancia y a la menarca temprana como factores protectores contra el cáncer de mama, mientras que la menopausia tardía, nuliparidad y una edad avanzada para el primer embarazo, son considerados factores de riesgo (Malone et al., 2000).

Tipos de Cáncer de Mama

Son tres, los principales tipos de cáncer de mama; clasificados según su lugar de origen:

- el carcinoma ductal
- el carcinoma lobulillar
- el mixto

El carcinoma ductal *in situ* es aquel en el que proliferan células anormales en el revestimiento de los conductos, pero no se diseminan fuera del conducto. Por otro lado, el cáncer de mama que se extiende desde su sitio de origen (conductos o lobulillos) a los tejidos circundantes se conoce como cáncer de mama invasivo (NCI, 2014).

El desarrollo normal del cáncer de mama involucra varios estadios, comenzando por una marcada proliferación epitelial descontrolada, seguida de una evolución y transformación de las células anormales, desarrollo del carcinoma *in situ*, y finalmente la adquisición de un fenotipo invasivo (Place et al., 2011).

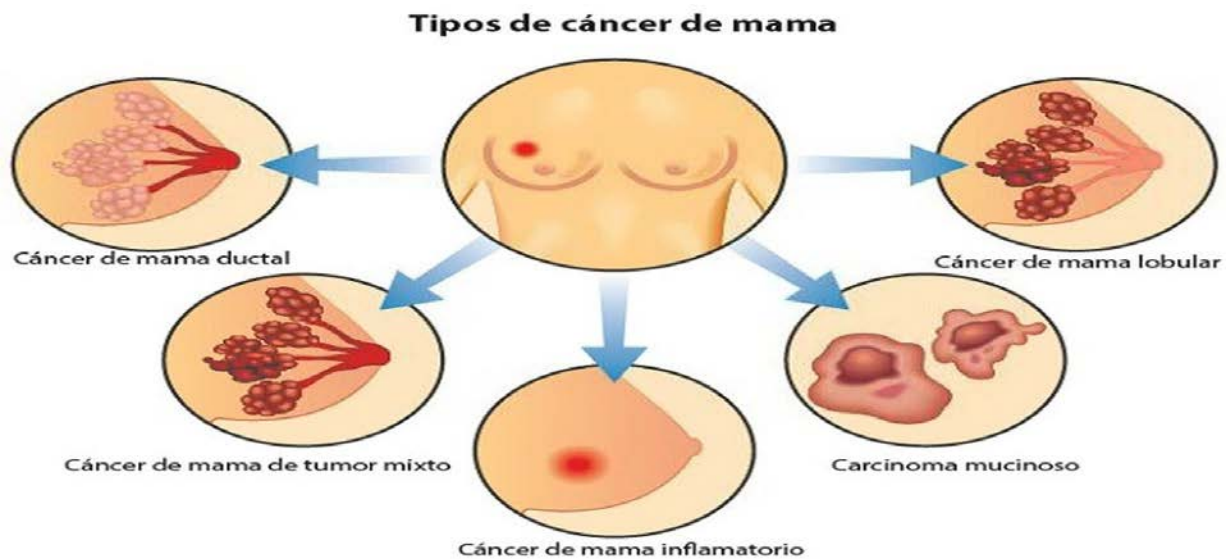


Figura 5. Tipos de cáncer de mama (GLOBOCAN; 2012)

Una vez que las células cancerígenas han obtenido el fenotipo invasivo (también llamado “mesenquimatoso”) suelen diseminarse lejos de su lugar origen, viajando a través del torrente

sanguíneo y/o los vasos linfáticos para llegar a órganos periféricos, siendo sus tejidos diana secundarios de invasión: hueso, pulmón y cerebro (Polyak, 2007).

Actualmente, existen diversas opciones de tratamiento en función del desarrollo del tumor, entre los que destacan: la terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia y extirpación quirúrgica. Es importante mencionar que no existe un tratamiento de manera general para combatir el cáncer, ya que debe ser uno de manera individual y específica para cada paciente, puesto que la prognosis depende de factores como: etapa del cáncer de mama, salud general del paciente, hormono-dependencia de las células tumorales y la presencia de la proteína HER2, entre otros factores. La enfermedad en sus etapas iniciales es 100% curable; no obstante, si existe evidencia de recurrencia o metástasis, el pronóstico es malo (American Cancer Society, 2013).

Fenotipo mesenquimal en células tumorales

La célula tumoral de fenotipo epitelial, adquiere un conjunto de capacidades que le permiten migrar e invadir tejidos circundantes, favoreciendo así, la diseminación del cáncer. Para que este esto ocurra, es necesario que la célula tumoral de fenotipo epitelial adopte un fenotipo mesenquimal, a través de un proceso conocido como: “Transición Epitelio-Mesenquima” (EMT, por sus siglas en ingles). La EMT se caracteriza porque las células tumorales pierden sus uniones celulares, tanto célula-célula y célula-matriz, su polaridad celular, facilitando la migración e invasión. (Thiery et. al. ,2006, Thiery JP, 2009). En las células tumorales con el fenotipo mesenquimal hay una sobre-expresión de N-cadherina, vimentina, y factores de transcripción asociados a la EMT como son: Snail-1, Snail, 2, Zeb-1 y Twist, los cuales reprimen la expresión de E-cadherina y ocludina, proteínas características del fenotipo epitelial (Figura 6) (Savagner P, 2001).

Se ha desarrollado una amplia línea de investigación encaminada a identificar qué señales del microambiente tumoral y mediante qué vías de señalización es inducida la EMT, proponiéndose la participación de componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en ingles), factores de crecimiento, citocinas entre otras moléculas de señalización

(Li et al., 2016; Song et al., 2016). De esta múltiple lista de inductores de EMT, sobresale la participación de citocinas pro-inflamatorias, ya que se ha visto un incremento sustancial en sus niveles en el microambiente tumoral y su efecto estimulador en el potencial metastásico de las células tumorales (Giannini et al., 1998).

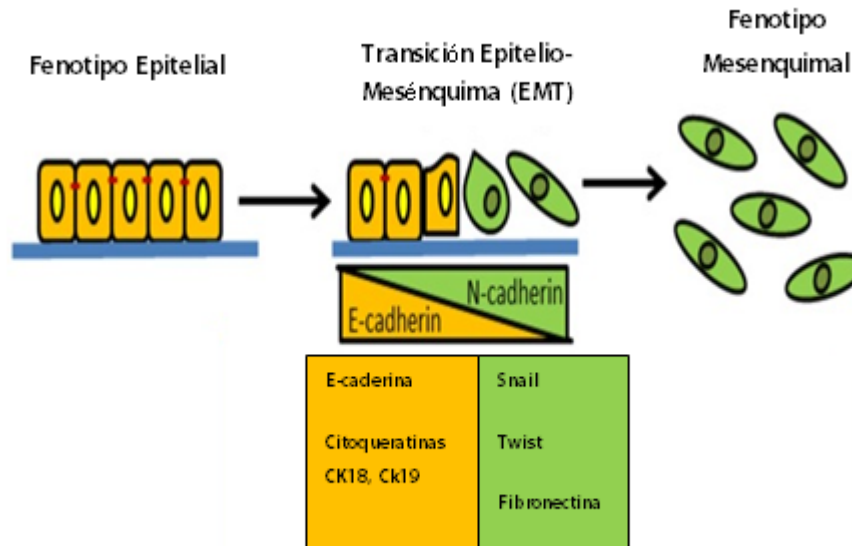


Figura 6. Esquematación de la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) (Wu et al., 2016)

Citocinas en el desarrollo y progresión del cáncer

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular, sintetizadas y secretadas, principalmente por células del sistema inmune, aunque se ha descrito que las propias células tumorales pueden sintetizar citocinas, tales como: Interleucinas (IL), interferones (IFN) y Factores Estimuladores de Colonias (Freund A. et. al. 2003).

Las interleucinas actúan de manera autócrina modulando la actividad celular, o de manera paracrina, al inducir la producción de otras citocinas por parte de otros linajes celulares (Paul WE, 1989). Las citocinas son producidas de manera transitoria y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta inmune, mediando la comunicación entre células inmunes

e inflamatorias al promover el crecimiento, diferenciación y activación celular (Schieperes et al., 2005).

Las citocinas se pueden clasificar en dos grupos, según su participación en los procesos de infección y/o inflamación: a) Citocinas pro-inflamatorias, estas proteínas favorecen, ya sea de manera directa o indirecta, la respuesta inflamatoria, siendo sus representantes clásicos: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, interferón gamma y el Factor de Necrosis Tumoral alfa); y el segundo grupo, b) Citocinas anti-inflamatorias, estas suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias, representadas por IL-4, IL-10 e IL13 (Schieperes et al., 2005).

Las citocinas son sintetizadas y secretadas en respuesta a una amplia variedad de estímulos, tales como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, inflamación o infección. De esta forma, las citocinas controlan la respuesta del huésped al estrés y mantienen la homeostasis celular (Salud Pública México, 2005).

Hasta el momento, se han propuesto dos probables mecanismos que tratan de explicar la participación de las citocinas en el desarrollo y progresión del cáncer (Nash et al., 1999):

- 1) Las citocinas favorecen el desarrollo tumoral al interactuar con factores de proliferación, inducir angiogénesis del tumor, y promover la metástasis al alterar la adhesión celular.
- 2) Las citocinas como mediadores de la respuesta inmune, inhiben la expresión de receptores así como de sus ligandos, tanto en las células del sistema inmune como en las células tumorales, previniendo la identificación y destrucción de la célula tumoral, por parte de las células de la respuesta inmune.

Las citocinas poseen funciones pleiotrópicas, por lo que determinar la participación de una citocina en específico en el desarrollo y progresión del cáncer, es una tarea complicada, debido a la relación que tiene con otras citocinas, factores de crecimiento, hormonas y otras moléculas, que actúan simultáneamente en el microambiente tumoral (Nash et al., 1999). En el microambiente tumoral los niveles de IL-8 están elevados, y parece que actúa sobre el potencial metastásico de las células tumorales, aunque se desconoce con precisión el efecto y el mecanismo involucrado.

Interleucina-8 (IL-8)

La Interleucina -8 (IL-8) es una citocina pro-inflamatoria que pertenece a la familia CXC de las quimiocinas, también conocida como (CXCL8); está conformada por 99 aminoácidos (Modi et. al., 1990). Esta citocina es sintetizada y secretada por monocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y una gran variedad de células epiteliales normales y malignas. Su principal función es actuar como agente quimiotáctico de los leucocitos (principalmente neutrofilos), en los cuales propicia su migración y desgranulación; además, se le atribuyen funciones tumorigénicas, pro-angiogénicas, pro-inflamatorias y pro-aterogénicas (Rauci et al., 2013). El efecto biológico de la IL-8 es mediado por la activación de dos receptores acoplados a proteína G: CXCR1 (IL-8RA) y CXCR2 (IL-8RB). Estos receptores presentan un 77% de homología en su secuencia de aminoácidos (Holmes WE, 1991).

El receptor CXCR1 es activado por IL-8 y la proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2)/CXCL6, mientras que el CXCR2 es activado por un mayor número de ligandos: oncogenes reguladores del crecimiento (GRO)- α /CXCL1, GRO- β /CXCL2, GRO- γ /CXCL3, CXCL5, GCP-2, y proteína activadora de neutrófilos 2 (NAP-2)/CXCL7 (Ahuja & Murphy, 1996). Los dos receptores están acoplados a una proteína G α estimuladora, resultando activadas algunas vías de señalización: a) PI3K/AKT; b) PLC/PKC, y c) Jak2/Stat5 (Cohen-Hillele et al., 2006).

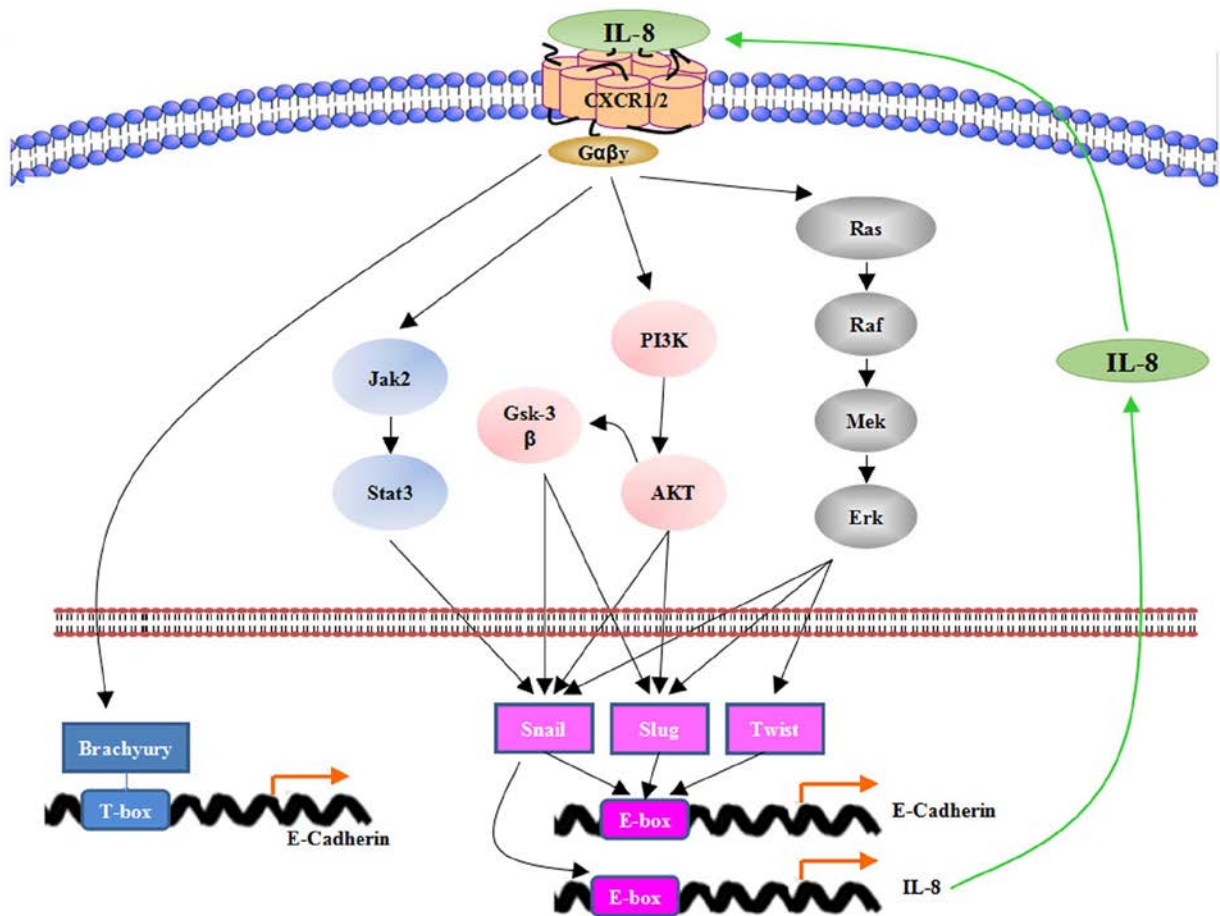


Figura 7. Esquema de las diferentes vías de señalización activadas por IL-8 a través de los receptores CXCR1/2 (Xinxin Long, 2005).

Diversos tumores son capaces de sobre-expresar IL-8 para su posterior secreción al microambiente tumoral, por ejemplo: cáncer de estómago, páncreas, piel, próstata y mama, entre otros, promoviendo probablemente su progresión y desarrollo (Kuai et al., 2012). Benoy y colaboradores en el año 2014, evaluaron los niveles plasmáticos de IL-8 en tres grupos experimentales: a) mujeres sanas; b) mujeres con cáncer de mama no maligno, y c) mujeres con cáncer de mama invasivo, encontrando en éste último grupo altos niveles plasmáticos de IL-8, sugiriendo la probable participación de esta interleucina en la progresión tumoral (Figura 8).

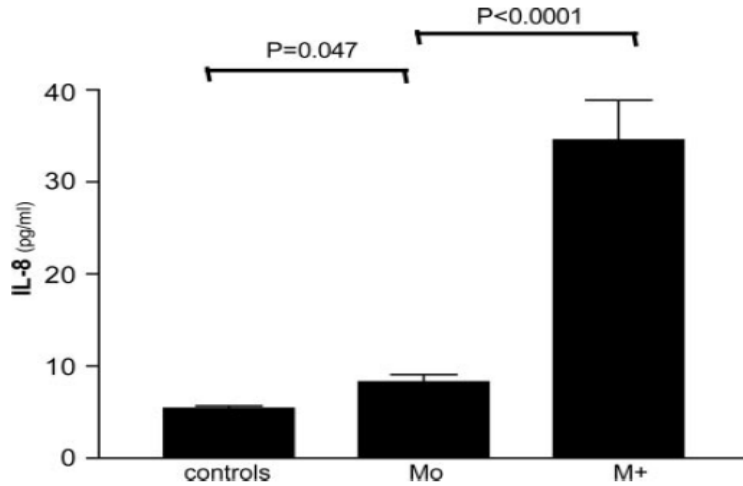


Figura 8. Determinación de niveles plasmáticos de IL-8 en pacientes sanas (*controls*), pacientes con cáncer de mama no invasivo (*Mo*) y pacientes con cáncer de mama con metástasis progresiva (*M+*) (Benoy et al., 2014).

Estudios recientes muestran que las células tumorales de mama sobre-expresan IL-8 y su receptor específico con respecto a las células epiteliales normales de mama, asociándolo con la quimiorresistencia y metástasis que presentan los pacientes (Milovanovic et al., 2013). Por otra parte, estudios *in vitro*, demostraron que la expresión de IL-8 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231, que son de alta invasividad, es claramente mayor al nivel de expresión que presentan las células MCF-7, que son de baja invasividad (Figura 9) (Freund et al. 2003).

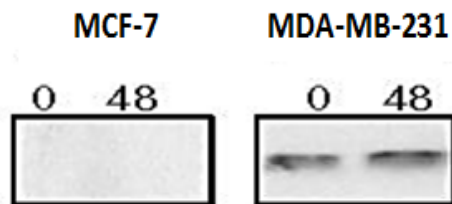


Figura 9. Expresión de IL-8 en líneas tumorales de mama, MDA-MB 231 de alta invasividad y MCF-7 de baja invasividad (Freund et al., 2003).

Por su parte, Yao y colaboradores en el año 2007, demostraron que a partir del silenciamiento del gen que codifica para IL-8, la capacidad invasiva de las células MDA-MB 468 resultaba disminuida (Figura 10).

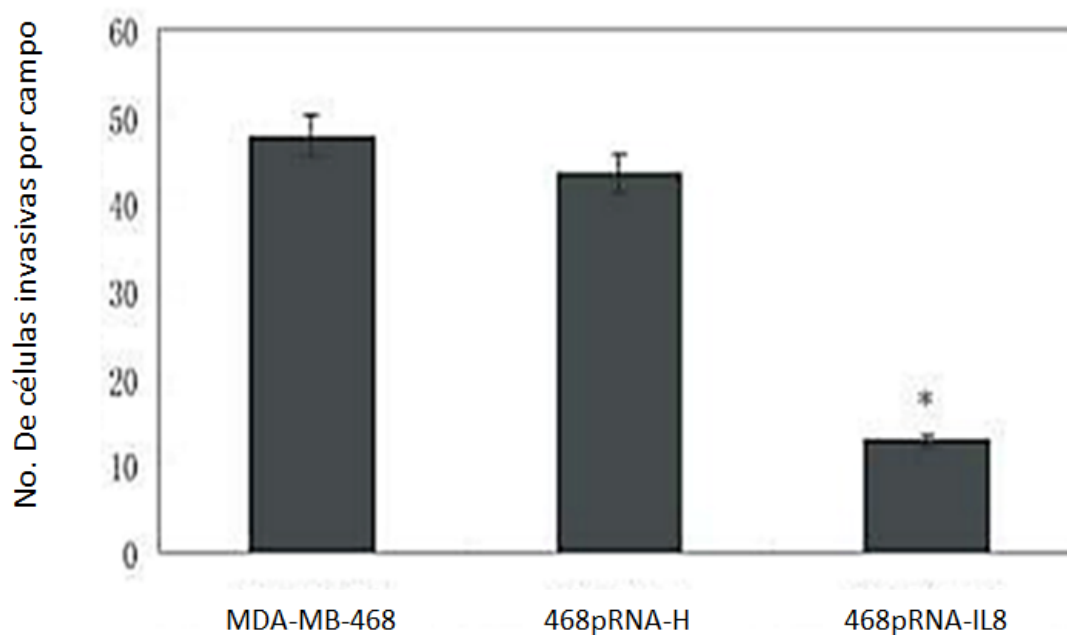


Figura 10. Reducción de la capacidad invasiva de las células MDA-MB-468 debido al silenciamiento del ARNm que codifica para IL-8. De izquierda a derecha: células MDA-MB-468 control, sRNA aleatorio, sRNA específico para IL-8 (Modificado de Yao et al., 2007).

Además, en nuestro laboratorio, un trabajo previo realizado por Ramírez en el 2014, mostró que la presencia de IL-8 a una concentración de 5 nM era suficiente para aumentar de manera significativa la capacidad migratoria de las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

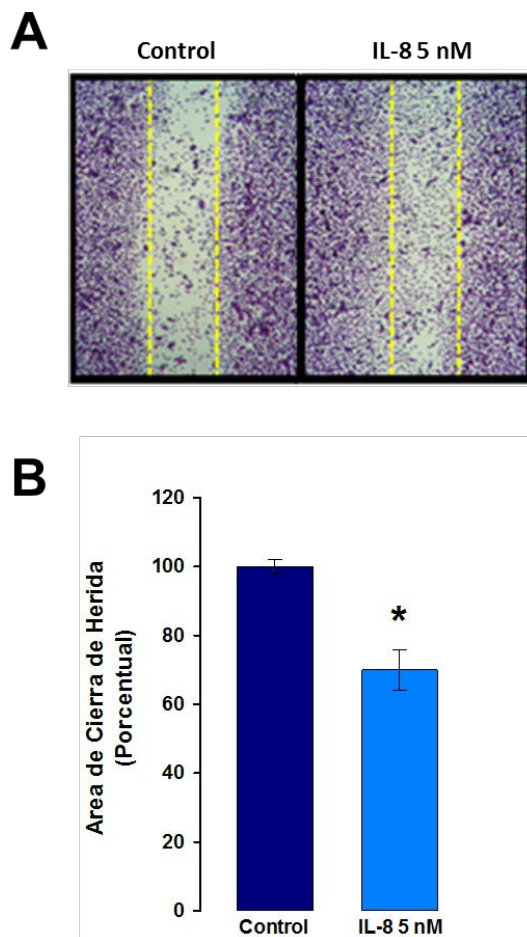


Figura 11. Ensayo de cierre de herida, las células MDA-MB-231 fueron tratadas con 5 nM de IL-8. Se evaluó el cierre de herida a las 16 horas de incubación (Ramirez D, 2014).

Aunque aún no se encuentran completamente dilucidados los mecanismos por los cuales IL-8 funciona como promotor de quimioresistencia, proliferación, migración e invasión de células tumorales; resulta interesante suponer que una supresión en los niveles de IL-8 podría resultar benéfico para futuros tratamientos contra el cáncer de mama (Freund et al., 2003).

Resultará interesante investigar que señal extracelular puede ser la responsable del incremento en la expresión de IL-8 en las células tumorales. Las células del sistema inmune, que son las principales productoras de IL-8 son estimuladas por la presencia de LPS, mediante la activación de un receptor tipo Toll 4 (TLR-4). De igual forma, trabajos previos de nuestro laboratorio, muestran por RT-PCR e inmunocitoquímica que las células expresan TLR-4 (Ruiseco K, 2015),

por lo que es posible sugerir que LPS pudiera incidir sobre la expresión de IL-8 en las células MDA-MB 231 a través de la activación de TLR4.

Receptor a LPS, TLR-4

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

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

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

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

La activación de TLR-4 induce dos tipos de respuesta (Figura 12), la primera es dependiente de MyD88, llamándosele la vía canónica, y la segunda vía que es independiente de MyD88. La vía

dependiente de MyD88 tiene como resultado la activación de NF- κ B y la subsecuente transcripción de sus genes relacionados, que se traducen en la expresión de citocinas, tales como IL-6, IL-1 β y TNF- α (Kawai & Akira 2005; Akira et al., 2006; O' Neill, 2006). Mientras que la vía no canónica, culmina con la secreción de interferón tipo 1 como una respuesta anti-viral (Figura 12) (Pandey & Agrawal, 2006; Lu et al., 2008).

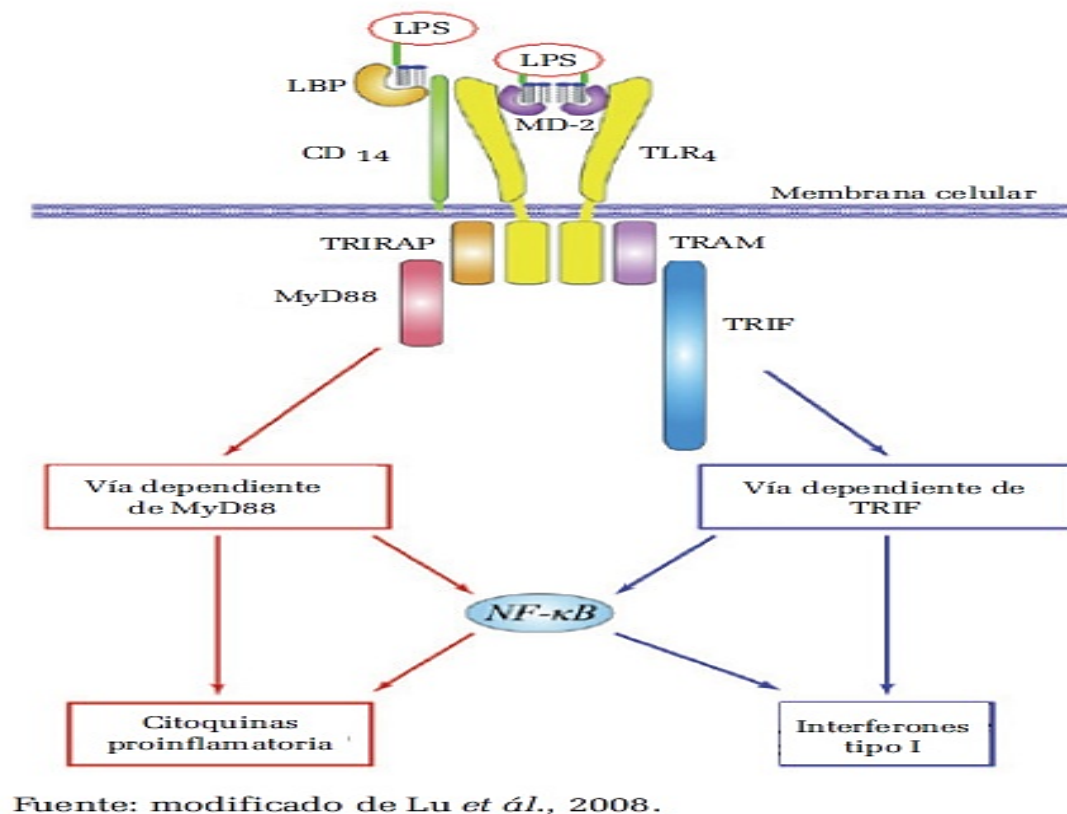


Figura 12. Vía de señalización de TLR-4 (Lu et al., 2008).

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

interferencia para TLR-4 en líneas celulares se observa una reducción en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales provenientes de cáncer de próstata (Hua et al., 2009).

En pacientes de cáncer de mama se ha demostrado la presencia a nivel de ARN mensajero y de proteína de TLR-4 en tejido tumoral, además se ha encontrado correlación entre los niveles de expresión y metástasis, considerándose un indicador de agresividad (González-Reyes et al., 2010). El tratamiento con LPS en una línea celular de cáncer de mama triple negativa (MDA-MB-231) incrementa la capacidad migratoria e invasiva de este tipo celular, debido al aumento en la expresión de una integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ por la activación del factor NF- κB , lo que resulta en un incremento de la capacidad de adhesión, aumento en la polimerización de actina y la producción de MMP-9 en respuesta a la matriz extracelular (Liao et al., 2012). Además de LPS y DAMPs se ha demostrado, en dos líneas celulares de cáncer de mama HCC1806 y MDA-MB-231, que fármacos utilizados como línea de tratamiento en CaM (específicamente Paclitaxel,) activan a TLR-4, en este estudio también se describió que la sobreexpresión de este receptor provoca un incremento en la quimiorresistencia, además de aumentar la expresión de citocinas y sus respectivos receptores, sirviendo como primer evidencia de que estas podrían estar actuando por mecanismos autócrinos (Rajput et al., 2013).

La unión de LPS a su receptor específico, TLR-4, estimula la activación y translocación del NF- κB al núcleo, el cual induce la expresión de genes específicos que codifican para moléculas proinflamatorias, como es el caso de IL-6, IL-8 y TNF- α , las cuales son las responsables de propagar la respuesta inflamatoria localizada y probablemente incidir sobre el potencial metastásico de las células tumorales (Li et al., 2012). Por ejemplo, Ruiseco en el año 2015, mostró que células MDA-MB-231 al ser tratadas con LPS por 48 horas, incrementaban su capacidad migratoria (Figura 13).

De esta forma, resulta claro suponer a LPS como un agente inductor de la producción de citocinas que favorecen un microambiente proinflamatorio y, consecuentemente, un aumento de las propiedades malignas en células tumorales.

JUSTIFICACION

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común que presentan las mujeres adultas a nivel mundial, ocupando el primer lugar de incidencia por genero y el segundo lugar por muertes provocadas, principalmente por metástasis.

La metástasis depende de un proceso de transición que sufren las células tumorales en el que pierden su fenotipo epitelial, y adquieren un fenotipo mesenquimal, condición que asegura la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales para llegar a tejidos y órganos circundantes, a este proceso se le denomina: Transición Epitelio-Mesénquima (TEM). Se sabe que hay muchas señales extracelulares presentes en el microambiente tumoral que pueden estimular la TEM, que van desde factores de crecimiento, citocinas, entre otras moléculas. La condición inflamatoria presente en el tumor, caracterizada por altos niveles de IL-6 e IL-8, es un detonante de la TEM, sin que se conozca a detalle el mecanismo molecular activado por dichas citocinas pro-inflamatorias. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que las células MDA-MB 231, provenientes de cáncer de mama triple negativo, en presencia de IL-6, exacerba su capacidad proliferativa y su capacidad migratoria, y mantiene su fenotipo mesenquimal. Además, se puso en evidencia, que estas células son capaces de producir IL-6 cuando son estimuladas con LPS y se activa el receptor TLR-4, tal y como si fuera un macrófago.

Se ha asociado el nivel de expresión de IL-8 con el grado de malignidad del tumor, la insensibilidad a la quimioterapia y la recurrencia, lo que hace suponer un papel importante de esta citosina en el desarrollo y progresión tumoral.

Las células MDA-MB 231, además de IL-6, también expresan IL-8, desconociéndose hasta el momento que señal del microambiente tumoral puede estimular su síntesis y secreción, y cómo esta citocina incide en el potencial metastásico de las células tumorales. Por lo que el propósito del presente trabajo es dilucidar el efecto que ejerce la IL-8 sobre el potencial metastásico de

las células MDA-MB 231 y determinar si LPS a través de la activación de TLR-4 estimula la producción de IL-8, tal y como lo hace para la IL6.

Es un hecho que la IL-8 ejerce un importante efecto sobre la progresión y desarrollo del cáncer; desconociéndose, a detalle, los mecanismos moleculares involucrados. Por esto, es crucial determinar las vías de señalización involucradas, con el fin de proponer herramientas farmacológicas que pudieran ser empleadas a corto, mediano y largo plazo en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

Con base en lo anterior, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿La sobre-expresión de IL-8 inducida por LPS está directamente relacionada con los procesos de migración y proliferación de una línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231? y ¿cuál sería el mecanismo molecular involucrado?

HIPOTESIS

La sobre-expresión de IL-8 inducida por LPS, exagera la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa en las células de cáncer de mama MDA-MB 231, a través de la activación del receptor CXCR1.

OBJETIVO GENERAL

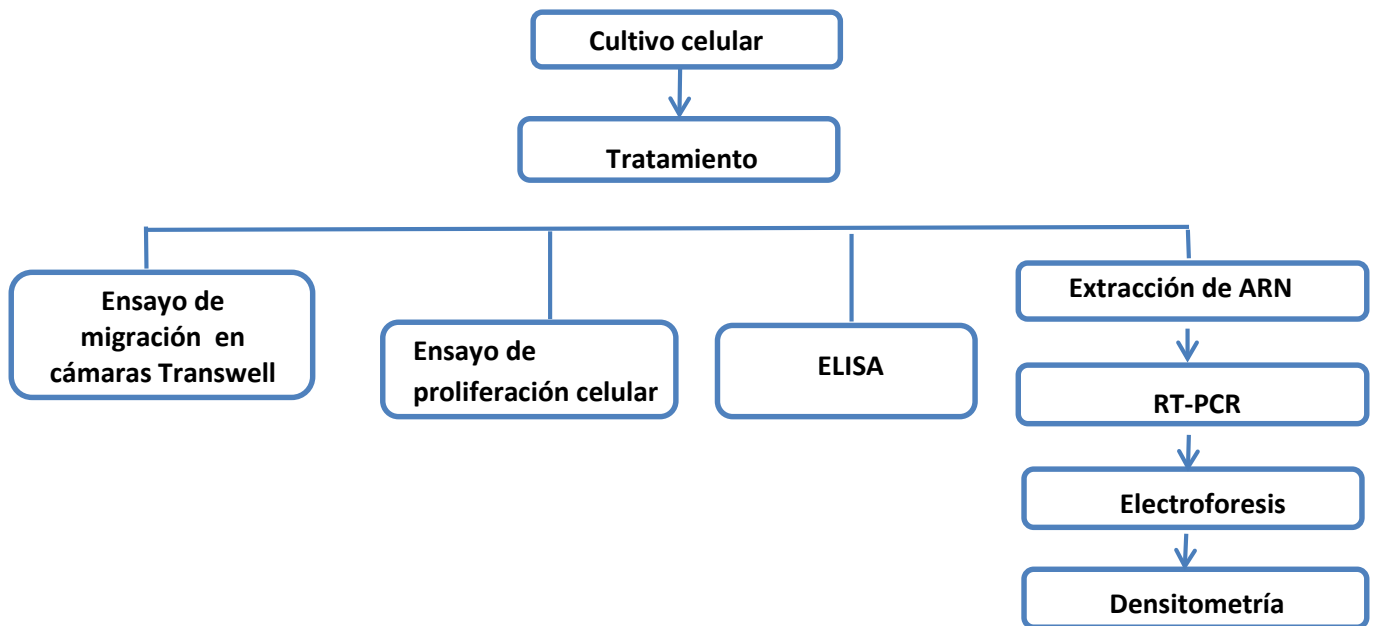
Investigar si la presencia de LPS induce la sobre-expresión de IL-8, y cómo esta citocina pro-inflamatoria mantiene el fenotipo mesenquimal y exagera la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa de la línea tumoral MDA-MB 231.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de expresión génica de IL-8 en líneas celulares de mama con diferente potencial metastásico.
- Determinar si la expresión del RNAm que codifica para IL-8 se encuentra correlacionado con el grado de malignidad de diferentes líneas células de mama con distinto potencial metastásico.
- Investigar si la presencia de LPS modifica los niveles de expresión de IL-8 en la línea celular MDA-MB 231, tanto a nivel de ARNm como de proteína.
- Determinar el nivel de expresión génica del receptor para IL-8 (CXCR1), en la línea celular MDA-MB-231, en ausencia y presencia de LPS.
- Estudiar el efecto que ejerce IL-8 sobre la capacidad migratoria de la línea celular MDA-MB 231.
- Definir el efecto que ejerce IL-8 sobre la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB231.

METODOLOGIA

Las técnicas y procedimientos empleados en este trabajo de investigación son mostrados de manera general en el siguiente esquema:



Cultivo de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 231

Las células de la línea celular MDA-MB-231 crecen en la modalidad de monocapa, las cuales fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno con un área de 25 cm², se les suministro medio de cultivo Advanced-RPMI1640 suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L- glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico. Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂, el medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Cada cinco días aproximadamente (según el comportamiento del crecimiento de las células), las células fueron cosechadas mediante un proceso llamado tripsinización, que se describe a continuación: se retiró el medio de cultivo y se realizó dos lavados consecutivos con buffer de fosfatos (PBS) estéril; con el fin de despegar las células del sustrato del matraz, se les añadió 2 ml de tripsina al 0.25%, tras cinco minutos de reposo, se adicionó 4 ml de medio de cultivo y se re-suspendieron de forma mecánica. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugo a 1,200 rpm durante 5 minutos; por último, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue re-suspendida en medio de cultivo fresco, a partir de la cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células para experimentos posteriores.

Ensayo de expresión génica

El ensayo de expresión génica se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa de los transcritos expresados mediante análisis de RT-PCR, la manipulación del ARN en todo momento se realizó en condiciones libres de ARNasas.

a) Extracción de ARN

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placa de 35 mm, una vez alcanzada una confluencia aproximada del 80% y, siguiendo las instrucciones del kit comercial para extracción de ARN “ZR RNA MiniPrep (Zymo Research)”, se aspiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1x no estéril; al terminar los lavados, se agregó 500 µl de buffer de lisis y,

tras dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente, el contenido fue transferido a una columna contenida en un tubo colector. La columna se centrifugó durante 3 minutos a 12,000 g, al finalizar se desechó el contenido del tubo colector; con el objetivo de purificar el ARN, la muestra fue sometida a lavados independientes con las soluciones del kit en el orden siguiente: buffer de prelavado, buffer de lavado (dos veces); tras cada lavado, la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos y se desechó el contenido del tubo colector en todo momento. Por último, la columna se transfirió a un tubo de 1.5mL estéril y se agregó 50 µl de agua libre de ADNAsas y RNAsas para eluir el ARN contenido en el filtro de la columna, la muestra se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos, la columna se desechará y el filtrado obtenido fue evaluado por medio de la cuantificación de ARN.

b) Cuantificación de ARN

La concentración de ARN total, obtenido del cultivo celular, se determinó por medio de un espectrofotómetro “Biophotometer (Eppendorf)”. Para ello, se realizó una dilución de 4 µl de la muestra con 196 µL de agua para PCR para obtener un volumen final de 200 µl. La dilución fue evaluada a una longitud de onda de 260 nm para determinar la concentración en µg/ml. La integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A260/A280). Resulta imprescindible destacar que el valor mínimo de la concentración tiene que ser mayor de 118 µg/ml y el valor del cociente ubicarse en el rango 1.6 - 2 para ser considerada como una muestra integra.

c) Transcripción Reversa con Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Con el fin de sintetizar la primera cadena del ADNc se empleó el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)”, y siguiendo las indicaciones del fabricante:

Se elaboró un “master mix” (mezcla madre de reactivos), el cual, contuvo los reactivos (mostrados en la tabla) para cada reacción. De esta solución, se añadió 9 µl de forma común a todas las muestras.

Tabla 1. Reactivos utilizados para RT-PCR.

Reactivo	Volumen
Buffer RT	2 μ l
dNTP's	0.8 μ l
Iniciadores aleatorios	2 μ l
Transcriptasa Reversa (MultiScribe™)	1 μ l
Agua	3.2 μ l
Total :	9 μl

A los 9 μ l de reacción ya obtenidos, se agregó un volumen restante de 11 μ l, que fue completado con el ARN de la muestra más agua. Para determinar el volumen de la muestra de ARN y de agua que se requería para cada tubo de reacción, se calculó mediante una “regla de tres”. De tal forma que a cada uno de ellos se agregó un volumen tal de muestra y agua para tenerlo a una concentración de 2 μ g/ml.

Una vez obtenido un volumen final de 20 μ l por condición, y con los reactivos ya mencionados, se empleó un termociclador *Mastercycler gradiente (Eppendorf)* para realizar al siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C. Finalmente la temperatura de los tubos se llevará 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su requerimiento.

El ADNc obtenido en la RT, se amplificó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) semi-cuantitativa, a fin de cuantificar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) codificante para alguno de los diversos elementos de interés. Dicho proceso requirió de la utilización de pequeños fragmentos de ácidos nucleicos monocatenarios, específicos (oligonucleótidos) para una secuencia de pares de bases, que se muestran en la Tabla 2.

Oligonucleótidos (humanos)	Dirección	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
SNAIL-1	Forward	CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTT	388
	Reverse	GGCACTGGTACTTCTTGACATC	
SNAIL-2	Forward	CTCTCTCCTCTTTCCGGATACTC	235
	Reverse	CAGTGCAGCTGCTTATGTTTG	
TWIST	Forward	AGCTGAGCAAGATTCAAGACCCTCA	452
	Reverse	AGAATGCAGAGGTGTGAGGATGGT	
ZEB-1	Forward	TTCAGCATCACCAGGCAGTC	736
	Reverse	GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG	
Vimentina	Forward	AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT	877
	Reverse	CTCCATTTACGCATCTGGCGTT	
IL-8	Forward	TATTGTGTGGGTCTGTTGTAGG	487
	Reverse	GTGAGGTAAGATGGTGGCTAAT	
CXCR1	Forward	CGTGTACCTCCTACACTTCTTC	466
	Reverse	TCAGCCCTGTTCTCTCATCTA	
β -actina	Forward	CAGTCCCTGTTCTCTCATCTA	452
	Reverse	GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG	

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para ensayos de PCR.

Para dicha técnica, se utilizó la enzima *Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)*, se prepararán tubos de reacción (uno por condición) que incluye además los reactivos mencionados en la Tabla 3, cuyo volumen final será de 20 μ L.

Tabla3. Lista de reactivos utilizados para ensayo de PCR.

Reactivo	Volumen
Dream Taq	10 μ L
Primer Forward	1 μ L
Primer Reverse	1 μ L
Agua	6 μ L
ADNc	2 μ L
TOTAL:	20 μL

La técnica de PCR consta de las siguientes fases:

1. Desnaturalización del ADNc: esta fase consistió en elevar la temperatura del tubo de reacción a 95°C durante 30 segundos, para lograr que las cadenas de ADNc se separaran.
2. Alineación: la temperatura descendió a tal grado que los oligonucleótidos (sentido y antisentido) pudieran alinearse con sus secuencias complementarias. La temperatura requerida dependió, de la cantidad y el tipo, de bases nitrogenadas que conformen al oligonucleótido. La duración de esta etapa fue de 30 segundos.
3. Extensión: la temperatura aumentó hasta 72°C por un minuto. Permitiendo así, que la enzima Taq polimerasa se una a cada iniciador, y se sintetice una nueva cadena de ADNc.

Estos pasos constituyen un ciclo, el cual se repitió de 30 a 40 veces, dependiendo de la muestra a evaluar.

4. Elongación final: Para asegurar que cualquier ADN monocatenario restante, fuera completamente amplificado, se llevó a una temperatura de 72 °C durante 10 minutos.
5. Conservación: hubo un descenso en la temperatura, hasta los 4 °C, durante tiempo indefinido para mantener y conservar los productos de la reacción.

d) Electroforesis

Ya concluida la reacción PCR, se procedió a la separación electroforética de los productos (dependiendo su peso molecular) que se obtuvo por medio de un gel de agarosa al 1.2%. La preparación del gel de agarosa se describe a continuación: 0.6 gr de agarosa fueron diluidos en 50 ml de buffer Tris -EDTA (TAE) al 1x, la solución fue calentada durante 1 minuto con 30 segundo en un horno de microondas, previamente, se añadió a la solución 4 µl de bromuro de etidio (BrEt), el cual, una vez que ha sido diluido completamente en el TAE; se dejó gelificar dentro de la cámara de electroforesis por un lapso de 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez solidificado, se agregó a la cámara un volumen suficiente de buffer Tris -EDTA (TAE) al 1X, cubriendo completamente el gel. El contenido con la muestra y marcador se colocó de la siguiente manera: Se realizó una dilución de 8µl de la muestra más 15µl de buffer de carga; posteriormente, la mezcla fue agregada a un pozo del gel (un pozo para cada muestra).

* Como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial “6x DNA Loading (Thermo Scientific)”.

La separación electroforética se llevó a cabo a 65 V durante 90 minutos. Asegurándonos de que la muestra corriera del polo negativo al positivo. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a la captura de imágenes por medio de un foto- documentador de geles (“ChemiDoc, Bio-Rad”). El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas se realizó a través del software Image J.

ELISA

El kit para ELISA (Human IL-8 ELISA development, fabricado por Preprotech,EUA) se empleó para realizar una medición cuantitativa de IL-8 humana. Fue realizado a través del medio condicionado, obtenido de células pre tratadas por 48 horas con 0.1µg/ml de IL-8, siguiendo las indicaciones del fabricante.

a) Preparación de Placas

Se realizó una dilución del anticuerpo de captura de IL-8 en PBS, con la finalidad de llevarlo a una concentración final de 0.1µg/ml. Se agregaron 100 µl de la dilución en cada pozo de una placa de 96, se cubrió e incubó dicha placa a temperatura ambiente, toda la noche. Posteriormente, la dilución fue removida y se realizaron 4 lavados con 300 µl de solución amortiguadora (indicada por el fabricante). A continuación, se agregó 300 µl de solución bloqueadora, y se dejó incubar a temperatura ambiente, durante 1 hora. Finalmente, se realizaron 4 lavados con la solución amortiguadora.

b) Inmunoensayo

Fueron preparadas diluciones del estándar de IL-8 de 1000 a 12.5 pg/ml, se adicionaron 100 µl de las soluciones estándar y de las muestras problema a cada uno de los pozos (se realizó por triplicado) y se incubó a temperatura ambiente por un lapso de 2 horas. Transcurridas las 2 horas, cada pozo fue cuidadosamente aspirado para, seguidamente, realizar 4 lavados con PBS. Finalizados los lavados, se adiciono 100 µl del anticuerpo de detección, y se dejó incubando 4 horas a temperatura ambiente, se realizaron 4 lavados con PBS, se adicionó 100 µl del conjugado Avidina-HRP (dilución 1:2000) en cada pozo y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura

ambiente. Después, cada pozo fue nuevamente aspirado, y lavado por 4 veces. Finalmente, se agregó 100 μ L de sustrato (ABTS), y se dejó incubar a temperatura ambiente, hasta que emitiera una coloración. La densidad óptica se determinó con la ayuda de un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

Ensayo de Proliferación Celular

La técnica de proliferación celular fue realizada por medio de un análisis semicuantitativo de los niveles de Ki-67 para cada condición. Ki-67 es un marcador nuclear de proliferación, que alcanza sus niveles máximos de expresión durante la mitosis y, desaparece cuando las células se encuentran en la fase estacionaria o G₀.

Ensayo en cámara Transwell

Para el ensayo de migración se utilizaron Cámaras Transwell® con membranas de policarbonato y poros de 8 μ m de diámetro. Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos bajo condiciones de cultivo estándar, una vez que las células alcanzaron la confluencia requerida se inició el tratamiento con IL-8 durante el tiempo establecido. Una vez terminado el periodo de incubación se obtuvo de cada condición experimental una suspensión celular a una concentración final de 3×10^5 células/ml en medio de cultivo libre de suero. Se agregaron 750 μ l de medio de cultivo completo en la parte inferior de la cámara transwell, suplementado con IL-8 para mantener la condición experimental, y en la parte superior de la membrana de policarbonato del inserto de la cámara transwell se sembraron 30,000 células en un volumen de 300 μ l. Las células se incubaron a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO₂ por 12 horas. Al finalizar el tiempo, las células que permanecen sobre la membrana del inserto fueron retiradas con un hisopo de algodón. Las células que migran quedaron adheridas en la membrana interna de la membrana del inserto, las cuales fueron fijadas con una solución metanol/acetona (dilución 1:1) durante 20 minutos y teñidas con cristal violeta (0.05%) por 20 minutos. Para poder contar las células se tomaron microfotografías de 5 campos aleatorios con el objetivo 10x en un

microscopio de campo claro y una cámara modelo c10 plus Jenoptick empleando el programa pro 2.1, estas se analizaron por medio del programa Image J.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software SigmaPlot 11.0.

Debido a que los resultados obtenidos cumplían con los siguientes requisitos:

- Son independientes.
- Se efectúan en universos poblacionales que se distribuyen de manera normal.
- Las mediciones se elaboraron en una escala de intervalo.
- Las varianzas de los grupos deben ser homogéneas.

se utilizó la prueba *t de Student* para muestras independientes comparando las medias (\bar{x}) y desviaciones estándar (σ) de los grupos de datos obtenidos para cada placa de cultivo y se determinó si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo fueron diferencias aleatorias, tomando como parámetro de significancia, un valor menor de 0.05 ($p < 0.05$). Las gráficas muestran el valor promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

La expresión de IL-8 es directamente proporcional al grado de malignidad del tumor

Estudios recientes mostraron que IL-8 está ampliamente expresada en un gran número de tipos de cáncer como: gástrico, próstata, ovario, pulmón, mama, entre otros, por lo que resulta natural suponer que IL-8 pudiera estar favoreciendo los procesos de proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis de las células tumorales (Xie, 2001). Decidimos inicialmente investigar si el nivel de expresión de IL-8 depende del potencial metastásico de las células de cáncer de mama, para lo cual empleamos el ensayo de RT-PCR de punto final, para evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-8 en tres diferentes líneas celulares: MCF-10A, células normales de mama; MCF-7, células tumorales de mama con bajo potencial metastásico; y MDA-MB 231, células tumorales con alto potencial metastásico. La Figura 13 muestra claramente que las células MDA-MB 231 sobre-expresan el ARNm que codifica para IL-8 con respecto a las células MCF-7 y MCF-10A, lo cual confirma que la expresión de IL-8 se correlaciona positivamente con el grado de malignidad de las células tumorales.

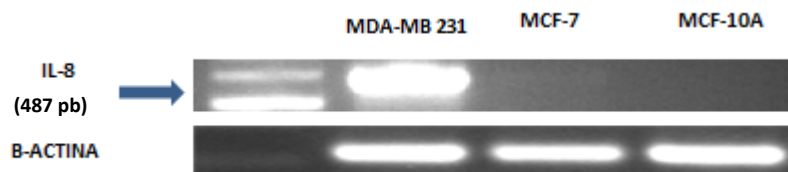
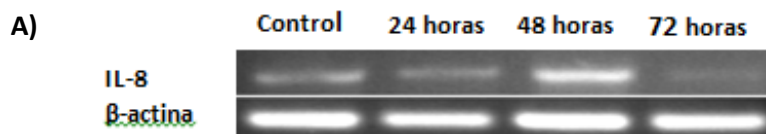
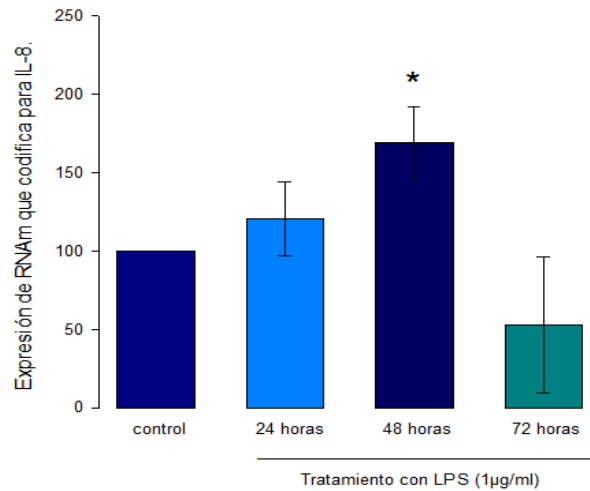


FIGURA 13. El nivel de expresión de IL-8 se correlaciona con el potencial metastásico de las células tumorales. Las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB 231 fueron mantenidas en condiciones de cultivo control por 72 horas. Al finalizar la incubación se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final.

LPS estimula la expresión de IL-8

Estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la activación de TLR-4 por LPS induce un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6 y TNF- α , citosinas pro-inflamatorias en las células MDA-MB 231. Decidimos investigar si la presencia de LPS inducía un cambio en el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-8, por lo que las células fueron mantenidas en presencia de LPS por 24, 48 y 72 horas a una concentración de 1 μ g/ml. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de RT-PCR de punto final se evaluó su nivel de expresión, observando que a las 48 horas el LPS induce un incremento significativo del 80% con respecto a la condición control. Por otra parte, a las 24 horas de tratamiento, a pesar de que existe una tendencia a la alta, el efecto no resulta significativo con respecto a la condición control. Caso contrario es a las 72 horas, donde se puede apreciar una clara disminución de ARNm, lo cual podría ser causado por una degradación del mismo, sugiriendo que a las 48 horas de tratamiento, es el pico máximo en su efecto y después este decae. Por ello, se determinó que 48 horas es el tiempo óptimo de incubación con LPS (Figura 14A). De manera complementaria, cuantificamos los niveles de IL-8 secretada al medio extracelular cuando las células MDA-MB 231 fueron estimuladas con 1 μ g/ml de LPS por 24, 48 y 72 horas. Se recolectó el medio de cultivo de nuestras condiciones experimentales y se sometieron a un ELISA. La figura 14B muestra que las células MDA-MB 231 secretan de manera basal IL-8, y conforme se incrementa el tiempo de cultivo la secreción incrementa, las 24 horas: 95 pg/ml; 48 horas: 150 pg/ml y 72 horas: 300 pg/ml. El tratamiento con LPS induce claramente un incremento de IL-8 secretada a las 48 y 72 horas de tratamiento, alcanzando 370 pg/ml y 600 pg/ml respectivamente, muy por arriba de los niveles detectados en la condición control de 48 y 72 horas, 150 pg/ml y 300 pg/ml respectivamente. Resulta evidente que LPS estimula la expresión de IL-8 tanto a nivel de ARNm como de proteína.





B)

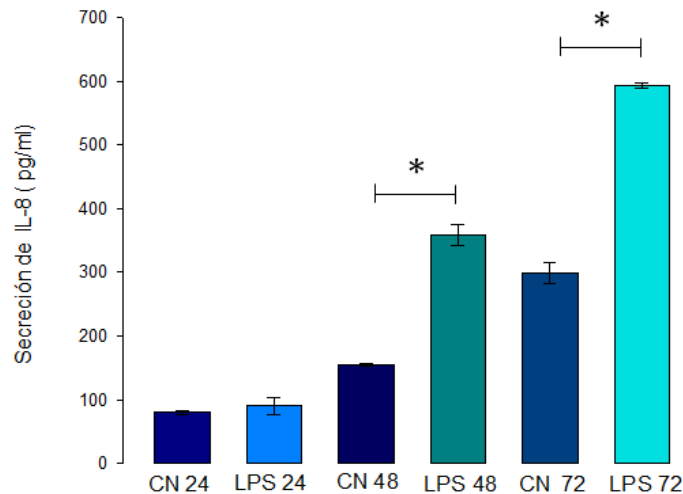


FIGURA 14. LPS induce la expresión de IL-8, tanto a nivel de ARNm como de proteína. **A)** Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas hasta por 72 horas en presencia de 1 µg/ml de LPS. Al finalizar el tratamiento se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una 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 $*p \leq 0.05$. **B)** Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas hasta por 72 horas sin recambio de medio en presencia de 1 µg/ml de LPS. Al finalizar cada uno de los tiempos de incubación, se recolectó el medio de cultivo y se congeló hasta el día del ensayo del ELISA. Se cuantificaron los niveles secretados de IL-8 siguiendo las indicaciones del proveedor del kit comercial. El ensayo se realizó por sextuplicado, la diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de $*p \leq 0.05$.

Las células MDA-MB 231 expresan CXCR1, receptor para IL-8

IL-8 ejerce su efecto biológico a través de una familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), específicamente CXCR1 y CXCR2. En un trabajo publicado por Aceto y colaboradores en 2012, mostraron que las células de mama, tanto normales como tumorales, expresan de manera preponderante CXCR1. Por este antecedente, decidimos evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para CXCR1 en condiciones control para tres líneas celulares de mama con distinto potencial metastásico: MCF10A, MCF-7 y MDA-MB 231. Los resultados preliminares obtenidos por RT-PCR de punto final mostraron que existe una correlación positiva entre el nivel de expresión del ARNm que codifica para CXCR1 con el potencial metastásico de las líneas celulares de mama: MDA-MB 231 > MCF-7 > MCF-10A (Figura 15). La existencia del binomio IL-8 y CXCR1, nos dan indicios de su probable papel en el potencial metastásico de las células tumorales de mama, MDA-MB 231.

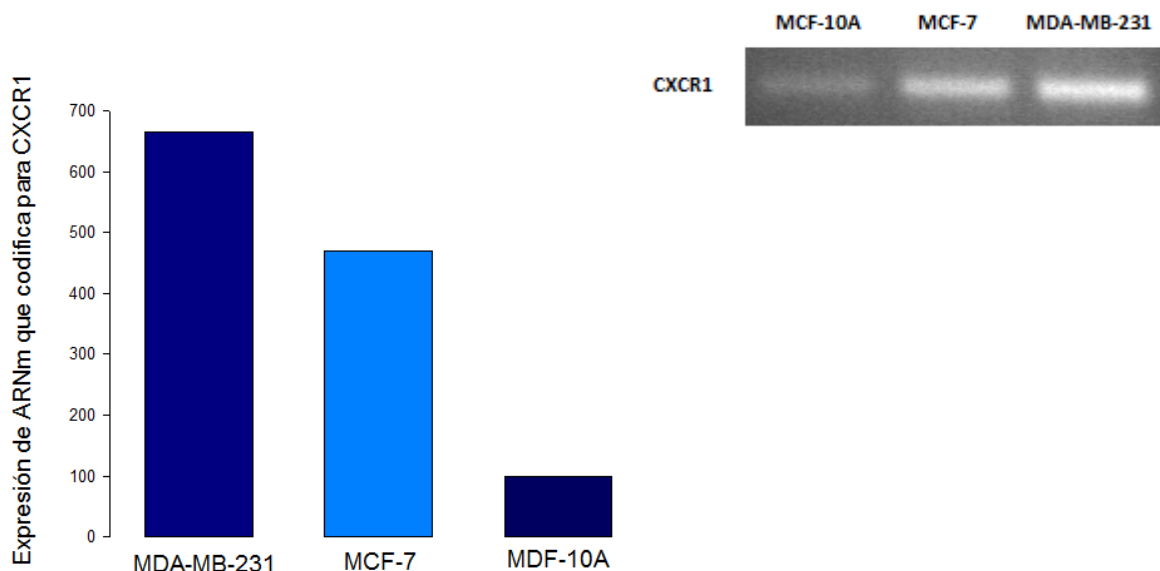


FIGURA 15. El nivel de expresión de CXCR1 se correlaciona con el potencial metastásico de las células tumorales. Las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB 231 fueron mantenidas en condiciones de cultivo control por 72 horas. Al finalizar la incubación se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía del gel, normalizando los valores con respecto a la condición control.

IL-8 exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231

Uno de los principales efectos biológicos de IL-8 es estimular la proliferación celular, y considerando a esta como un elemento clave en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, decidimos evaluar si la IL-8 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 hasta por 72 horas con 5 nM de IL-8. La Figura 16 muestra claramente que IL-8 induce un incremento significativo en el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67 a partir de las primeras 24 horas de tratamiento, observándose un incremento del 50% a las 48 horas y del 75% a las 72 horas de tratamiento con respecto a la condición control. Este resultado deja en claro que IL-8 exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231.

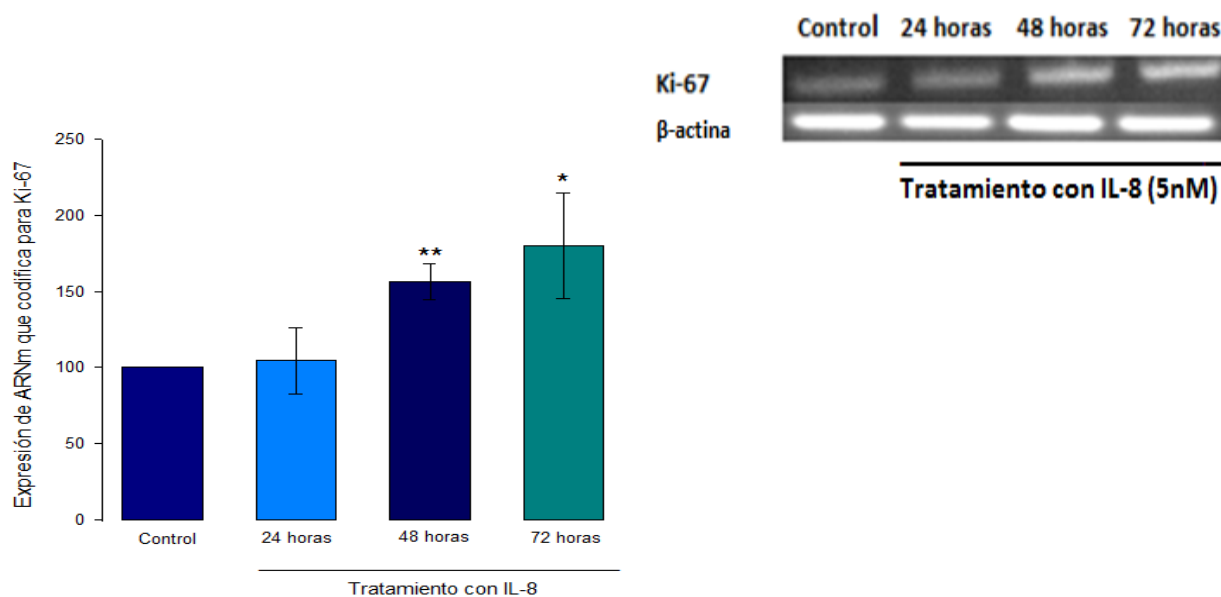
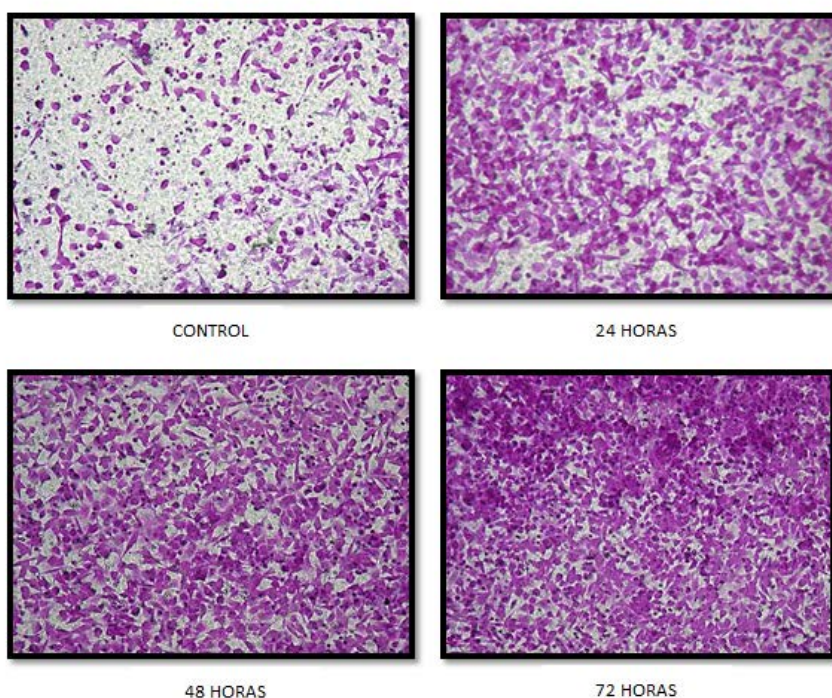


Figura 16. IL-8 induce un incremento en los niveles de expresión de Ki-67. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas hasta por 72 horas en presencia de 5 nM de IL-8. Al finalizar el tratamiento se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final. Se realizó una densitometría a partir 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 * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$.

IL-8 aumenta 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 hasta por 72 horas con 5 nM de IL-8. La Figura 17A muestra una serie de microfotografías donde observamos que IL-8 exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 en función de la duración del tratamiento con la citocina. El efecto estimulador de la IL-8 sobre la capacidad migratoria de las células se instala de manera relativamente rápida, ya que a las primeras 24 horas de tratamiento, se observa un incremento de tres veces con respecto a la condición control, a las 48 horas el valor alcanza cuatro veces más, y a las 72 horas, el valor es de cinco veces, con respecto a la condición control (Figura 17b). Definitivamente, IL-8 exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.



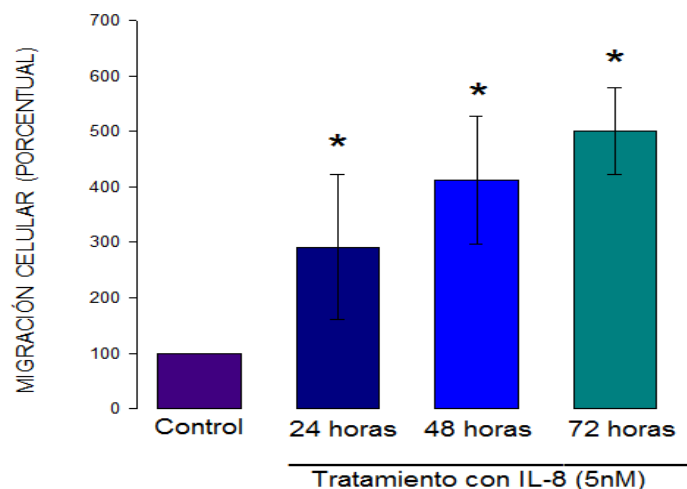
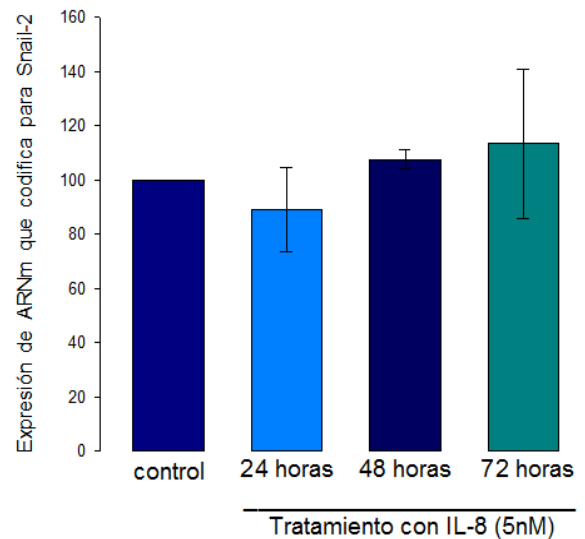
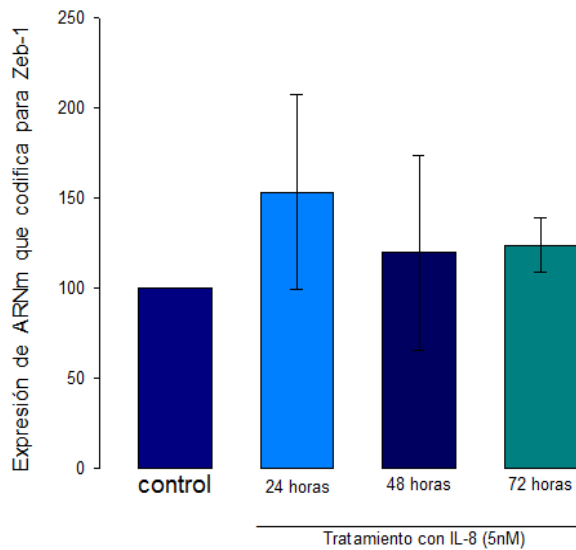
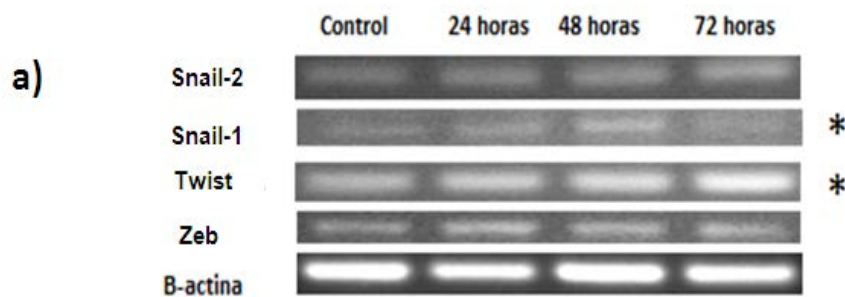


FIGURA 17. IL-8 estimula la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas hasta por 72 horas en presencia de 5 nM de IL-8. Al finalizar el tratamiento las células fueron cosechadas, y sembradas en los insertos de las cámaras Transwell, ajustando a 30,000 células por inserto por condición experimental, la parte inferior de la cámara se llenó con medio de cultivo completo (como quimioatrayente) y se adicionó 5 nM de IL-8, y la parte superior de la cámara con medio de cultivo libre de suero fetal bovino suplementado con la misma concentración de IL-8, 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 $*p \leq 0.01$.

IL-8 ayuda a mantener el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB 231

La capacidad migratoria de las células se asocia positivamente con el fenotipo mesenquimal, por lo que decimos investigar si el incremento en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 se correlaciona con un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal, tal es el caso de Snail-1, Snail-2, Zeb-1 y Twist. Las células se mantuvieron en presencia de 5 nM de IL-8 hasta por 72 horas, observando que la presencia de IL-8 exacerba el nivel de expresión del ARNm que codifica para

Snail-1 y Twist a partir de las primeras 24 horas de tratamiento, alcanzado un incremento del 100% para Snail-1 y del 50% para Twist con respecto a la condición control, manteniéndose estos niveles hasta las 72 horas de tratamiento. Con respecto a los otros dos factores de transcripción, Snail-2 y Zeb-1, solamente se observa una tendencia de incremento en sus niveles de expresión, sin lograr una diferencia estadísticamente significativa (Figura 18).



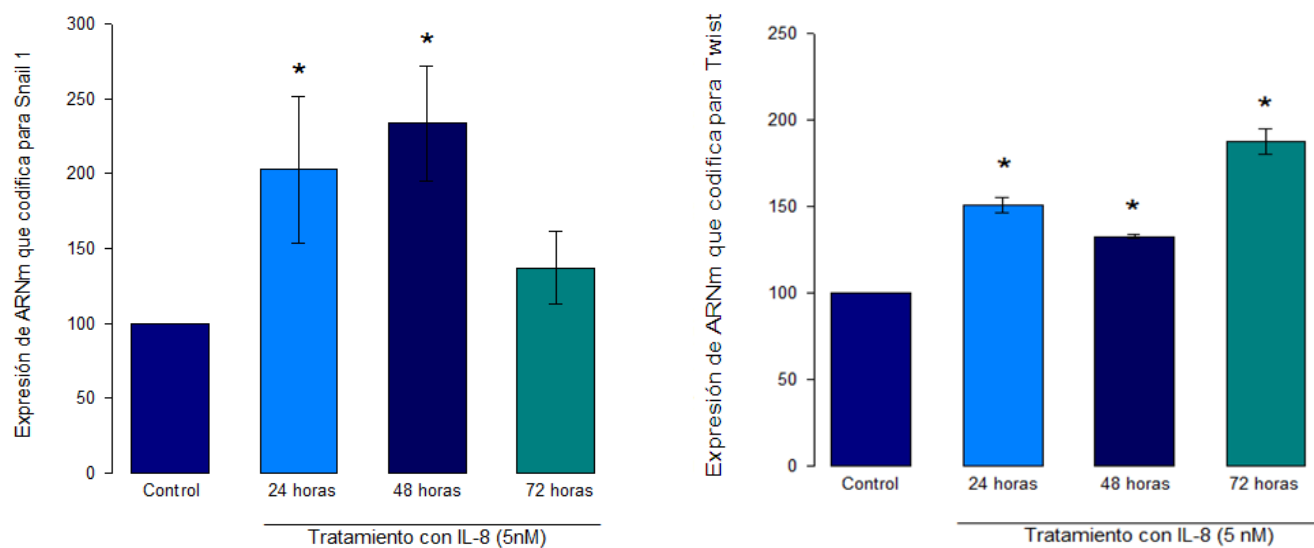


FIGURA 18. IL-8 induce un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para factores de transcripción asociados al fenotipo mesenquimal. Las células MDA-MB 231 fueron mantenidas en un curso temporal hasta por 72 horas en presencia de 5 nM de IL-8. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARN total y se utilizó para el ensayo de RT-PCR de punto final, utilizando diferentes oligonucleótidos específicos para diferentes factores transcripcionales relacionados con el fenotipo mesenquimal, como: Snail-1, Snail-2 Twist y Zeb-1. Se realizó una densitometría a partir de la fotografía tomada al gel, mediante el software Image J, normalizando los valores con respecto a la condición control. El ensayo se realizó por triplicado. Se realizó una prueba t-Student para determinar si existía una diferencia significativa en los datos obtenidos. La diferencia estadísticamente significativa fue considerada a partir de un valor de $*p \leq 0.01$.

DISCUSIÓN

El problema de salud pública que representa el cáncer, tiene severas repercusiones sobre la población mundial, debido a que todavía no se han desarrollado, de manera precisa, métodos de detección temprana y, mucho menos, tratamientos eficaces capaces de controlar o erradicar dicha enfermedad. Según cifras de la OMS, tan solo para el año 2016, se diagnosticaron más de 16 millones de nuevos casos y se presentaron 9.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en la población femenina adulta.

Un amplio número de trabajos científicos han demostrado que el microambiente tumoral desempeña un papel crucial en el desarrollo del cáncer, favoreciendo no solo funciones básicas de supervivencia celular, sino procesos aún más complejos como lo es la “Transición Epitelio-Mesenquima” (TEM), la capacidad migratoria e invasiva, lo cual está estrechamente relacionado con la rápida y agresiva diseminación de células malignas a tejidos circundantes, es decir con la “metástasis”.

La presencia de agentes pro-inflamatorios en el microambiente tumoral, contribuyen de manera sustancial a la progresión del cáncer (Ina et al., 2004). De igual manera, la presencia de quimiocinas que derivan no solo de las células tumorales, sino también de células del estroma, células endoteliales y células de la respuesta inmune; son determinantes para el desarrollo de la neoplasia (Daniel et al., 2015).

Una de esas quimiocinas, es la Interleucina-8 (IL-8), la cual ha sido identificada por su efecto quimiotáctico en los procesos inflamatorios desde hace muchos años. Recientemente, se ha implicado su participación en la progresión y diseminación del cáncer, sin conocer a detalle los mecanismos moleculares implicados (Xie, 2001).

En el presente trabajo, se discute sobre la participación de la IL-8 en procesos neoplásicos, así como la influencia que ejerce dicha molécula en el grado de malignidad celular. Por medio de técnicas de RT-PCR, se demostró que la IL-8 se encuentra directa y positivamente relacionado con el potencial metastásico de las células; prueba de ello está en el hecho de que tanto su grado

de expresión a nivel de ARNm , como el de su receptor (CXCR1)el cual, se encuentran exacerbados en aquellas líneas celulares de mama de mayor malignidad. Estos resultados sugieren que la presencia de IL-8 está involucrado con el fenotipo mesenquimal, sin saber con certeza si dicho aumento es una consecuencia del fenotipo, o a la inversa, un aumento en la IL-8 propicia un fenotipo mesenquimal.

Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio (Ruiseco Flores Karina, 2016) demostraron que la presencia de LPS exógeno, como señal proinflamatoria en el microambiente tumoral, era capaz de exacerbar las capacidades migratorias e invasivas de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231. Dicho efecto sería a partir de la unión de LPS al Receptor tipo toll-4 (TLR4), consecuentemente, dicho acople permitiría la activación de la cascada rio abajo del receptor, la cual, desencadenara en la fosforilación de IKKB, liberando así la proteína NF- κ B del complejo IKKB-NF- κ B. Posteriormente, el NF κ B será capaz de viajar al núcleo, translocar y permitir la sobre expresión de citocinas proinflamatorias.

Con base en esto, nos permitimos suponer que una de las citosinas sobre expresadas por la activación del TLR4 es la IL-8.En este trabajo, demostramos que la presencia de LPS exogeno, en el medio celular, si era capaz de inducir una sobre expresión de IL-8; tanto a nivel de ARNm como de proteína, a partir de las 48 horas posteriores al tratamiento. Suponemos que esta sobre expresión de IL-8 no se ve reflejada a las 24 horas debido a la participación de algún mecanismo genómico.

Para desestimar que los efectos observados en ensayos posteriores estuvieran sujetos a la presencia de otras moléculas inducidas por LPS, decidimos agregar de manera exógena IL-8. De esta manera, los resultados obtenidos estarían influenciados directamente por la presencia de la IL-8, sin embargo, no descartamos que pudiera existir un sinergismo entre dichas moléculas.

En 2014, Ina H. Benoy et al., confirmaron que pacientes con una mayor presencia de IL-8, a nivel sistémico, presentaban un pronóstico más desalentador ya que habían sido diagnosticados con metástasis progresiva, con respecto a pacientes con niveles mucho menores de esta citosina, los cuales, eran candidatos para solo remoción quirúrgica. Esto nos llevó a suponer que la IL-8

estaba implicada en procesos que favorecieran directamente la metástasis, como es el caso de la migración y proliferación celular.

Para el caso de la proliferación celular, evaluamos de manera cualitativa por medio de un marcador genómico, el Ki-67, involucrado en la expresión de otras proteínas que favorecen la proliferación celular, tales como: proteínas del índice mitótico y receptores tirosin-cinasa (RTK). En dicho ensayo pudimos observar que la IL-8, agregada al medio de manera exógena, induce una mayor proliferación en células previamente tratadas, cabe destacar que este efecto es dependiente del tiempo, ya que únicamente se ve reflejado a partir de las 48 horas posteriores al tratamiento.

De igual forma, al evaluar la capacidad de migración de nuestras células pre-tratadas con IL-8, pudimos determinar que existía un aumento más próximo de dicha capacidad. Ya que a tan solo 24 horas pos-tratamiento; las células aumentaban su potencial migratorio hasta casi 3 veces, encontrando un pico máximo de este efecto hasta las 72 horas en donde fue 5 veces mayor. Esto nos lleva a suponer que la IL-8 promueve la progresión del tumor al aumentar la tasa replicativa y capacidad migratoria de células tumorales.

La IL-8, como ya lo demostró Holmes WE et al., en 1991, ejerce su efecto por medio de sus receptores acoplados a proteína G activadora (CXCR1 y CXCR2, preponderantemente el primero) los cuales activan múltiples vías intracelulares, como son: la PI3K/Akt, la PLC/PKC y la Jak2/Stat5 facilitando así, la expresión de ciertos marcadores mesenquimales implicados en la diseminación del cáncer. Por este motivo, al analizar si la IL-8 modificaba los niveles de ARNm que codifica para ciertos indicadores mesenquimales (Snail-1 , Snail-2, Zeb, Twist) descubrimos que para el caso de Snail-2 y Zeb, bajo nuestras condiciones experimentales, IL-8 no ejercía algún cambio significativo con respecto a su control, sin embargo, para el caso de Snail-1 y Twist, los niveles de expresión de su ARNm codificante se encontraban significativamente aumentados a partir de las 24 horas, manteniendo su efecto hasta las 48 y 72 horas, respectivamente. No obstante, no desechamos la idea de que IL-8 este modificando la expresión de otros marcados mesenquimales o, incluso, algunos epiteliales.

Cabe mencionar que Snail-1 fue reportada por Vyomesh Patel et al., como un factor transcripcional que promueve la represión de moléculas de adhesión celular como: E-cadherina

regulando así la Transición Epitelio-Mesenquima (TEM) tanto en el desarrollo embrionario como en el cáncer. Por otra parte Twist, ha sido relacionado con procesos que favorecen la diferenciación celular y, de manera más reciente, con la proliferación (Song N, 2016). Debido a esto, suponemos que la IL-8 modifica de manera las capacidades tanto migratorias como proliferativas de las células MDA-MB-231, a través de factores transcripcionales como Snail-1 y Twist.

Es imprescindible mencionar que la búsqueda de nuevos elementos moleculares que participen en los procesos de migración y proliferación de las células tumorales, supone un importante campo de estudio debido a que terapias capaces de inhibir o retrasar dichos blancos; representaría una mejor calidad y pronóstico de vida en pacientes diagnosticados con cáncer.

Con base en los resultados obtenidos, nos permitimos suponer que al exponer el receptor tipo Toll-4 (TLR4) a un estímulo proinflamatorio, como LPS, las células MDA-MB-231 aumentan su expresión de IL-8, por medio de la vía NF- κ B. De esta manera, la IL-8 al ser secretada, ejerce su efecto de manera autócrina y/o parácrina a través de su receptor (CXCR1), el cual es capaz de activar múltiples vías de señalización capaces de aumentar la expresión de factores transcripcionales como: de Snail-1 y Twist implicados en proceso de migración y proliferación celular, respectivamente, sin mencionar algunos otros ya reportados por en los cuales, se le atribuye a IL-8 un papel primordial en la angiogénesis y quimioresistencia.

Por este motivo, nos atrevemos a proponer un estudio, con mayor detalle, sobre la participación de la IL-8 y su receptor (CXCR1) en la progresión tumoral, ya que en la actualidad, se le siguen atribuyendo cada vez más propiedades en las que favorece al tumor, como es el caso de la quimiorresistencia y recurrencia del tumor, entre otras.

CONCLUSIONES

1. Las células MDA-MB-231 sobre-expresan de manera constitutiva el ARNm que codifica para IL-8 y su receptor (CXCR1), con respecto a otras líneas celulares de mama.
2. LPS induce un incremento en los niveles de expresión de IL-8, tanto a nivel de ARNm como de proteína secretada, y que este efecto es dependiente de la duración del tratamiento.
3. IL-8 exagera la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.
4. IL-8 ayuda a mantener el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB 231, favoreciendo la expresión de Snail-1 y Twist.

BIBLIOGRAFÍA

Aceto N, Duss S, MacDonald G, Meyer DS, Roloff TC, Hynes NE, et al.,(2012). Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. *Breast Cancer Res* ;14:R131.

American Cancer Society. (2013). Breast cancer.

Asociación Española Contra el Cancer, 2016.

Ahuja SK, Murphy PM: The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem* 1996, 271:20545-20550.

Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M and Stassi G. 2013: Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Semin Cancer Biol.* 23B:522–532

C.E. Bryant, D.R. Spring, M. Gangloff, N.J. Gay (2010), The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide *Nat Rev Microbiol*, 8 .pp. 8–14.

Daniel J. Brat, Anita C. Bellail, and Erwin G. Van Meir (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis, *Neuro-Oncology* 7, 122–133, 2005 (Posted to *Neuro-Oncology* [serial online], Doc. 04-106, March 2, 2005.

Dobrev I, Waeber G, James RW, Widmann C. (2006) Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure. *J Biol Chem* 2006;281:199–205. [PubMed: 16251188]

Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, Vignon F and Lazennec G: IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 22: 256-265, 2003.

Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998;113:183-189.

Globocan 2012, IARC.

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253:1278-1280

Hsu M, Wu SY, Chang SS, Su IJ, Tsai CH, Lai SJ, Shiao AL, Takada K and Chang Y.(2008): Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Virol.* 82:3679–3688

- Kujm nX. Xu, P. Yin, C. Wan, X. Chong, M. Liu, P. Cheng, et al. (2014), Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF- κ B activation *Inflammation*, 37 pp. 956–965.
- Lane HC, Anand AR, Ganju RK. (2006) Cbl and Akt regulate CXCL8-induced and CXCR1- and CXCR2-mediated chemotaxis. *Int Immunol* 2006;18:1315–25. [PubMed: 16798838]
- Li Y, Li Y, Zhang J, Zheng C, Zhu H, Yu H, L Fan L (2016): Circulating Insulin-Like Growth Factor-1 Level and Ovarian Cancer Risk. *Cell Physiol Biochem*;38: 589-597.
- Mamuya, F. A., & Duncan, M. K. (2012). α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), 445–455.
<http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01419.x>
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA *Cell*.(2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. 2008 May 16; 133(4):704-15.
- McPherson K, Steel CaMa, Dixon JM. (2008) ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321:624-628. 5. Beaver EF, Holt VL, Malone KE, et al. Reproductive factors, age at maximum height, and risk of three histologic types of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3427-3434.
- Milovanovic J, Todorovic-Rakovic N and Abu Rabi Z (2013): The prognostic role of interleukin-8 (IL-8) and matrix metalloproteinases-2 and -9 in lymph node-negative untreated breast cancer patients. *J BUON* 18: 866-873
- M. Rossol, H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M.J. Sweet, et al. (2011): LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages *Crit Rev Immunol*, 31 pp. 379–446.
- Nash MA, Ferrandina G, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:93-107.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Cáncer de mama: prevención y control*.
- Organización mundial de la salud [OMS]. (2014). *Cáncer. Nota descriptiva N° 297*.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2011). *Health Situation in the Americas Basic Indicators*.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2012). *El cáncer de mama en las Américas*.
- Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 1989;57:521-524

Place, A. E., Jin Huh, S., & Polyak, K. (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(6), 227. doi:10.1186/bcr2912

Polyak, K. (2007). *Science in medicine Breast cancer : origins and evolution*, (November).doi:10.1172/JCI33295.group

Salud pública Méx vol.47 no.6 Cuernavaca nov./dic. 2005

Savagner P: Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001;23: 912-923.

Song N, Liu H, Ma X, Zhang S: Placental Growth Factor Promotes Ovarian Cancer Cell Invasion via ZEB2. *Cell Physiol Biochem* 2016;38: 351-358.

Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7: 131-142.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial- mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139: 871-890.

Todorović-Raković N and Milovanović J, (2013). : Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res* 33: 563-570

W. Ren, L. Hu, F. Hua, J. Jin, Y. Wang, L. Zhu (2011) : Myeloid differentiation protein 2 silencing decreases LPS-induced cytokine production and TLR4/MyD88 pathway activity in alveolar macrophages *Immunol Lett*, 141 pp. 94–101.

Wu, Y., Sarkissyan, M., & Vadgama, J. V. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 13. <http://doi.org/10.3390/jcm5020013>

Xie, K. (2001) Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 375–391.

Xinxin Long, Yingnan Ye, Lijie Zhang, Pengpeng Liu, Wenwen Yu, Feng We, Xiubao Ren. (2005) IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways. November 6, 2015. 5-12 <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3234>

Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J, Li W, Zhu YF, Wang SM ,*Int J Cancer*. 2007 Nov 1; 121(9):1949-57. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. 121(9):1949-5.

