



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES PARs EN DOS LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ZYANYA DANIELA GONZÁLEZ SANDOVAL



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. NORMA ALICIA HERNÁNDEZ
RODRÍGUEZ
2009**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<p>1. Datos del alumno González Sandoval Zyanya Daniela 56 58 30 15 Universidad Nacional Autónoma de México Biología 301654155</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Norma Alicia Hernández Rodríguez</p>
<p>3. Datos sinodal 1 Dr. Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>4. Datos sinodal 2 Dra. Alicia de la Peña Díaz</p>
<p>5. Datos sinodal 3 Dr. Jorge Antonio García Álvarez</p>
<p>6. Datos sinodal 4 Biól. Mónica Díaz Coránguez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Modulación de los receptores PARs en dos líneas celulares de cáncer de mama 60p 2009</p>

DEDICATORIAS

A Leonardo

Por ser el motor de mi vida y la persona más valiosa e importante en mi corazón. Todo lo que hago es para ti.

A mis padres, Leonardo y Leticia

Pues a pesar de los errores jamás dejaron de creer en mí, gracias por todo el apoyo que me han brindado. Sin ustedes esto no sería una realidad.

A mis hermanos. Omar y Alan

Gracias por su cariño, por su ayuda en todo momento y por siempre empujarme hacia adelante.

A mis abuelos, Luis, José, María y Macedonia □

Fueron el mejor ejemplo de fuerza, trabajo, perseverancia y cariño. Sin ustedes, la ciencia no habría llegado a mi vida.

A mis amigos, Silvia, Daniel y Carlos

Por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas; gracias por tantos buenos consejos y por toda la ayuda y cariño que me brindaron a lo largo de toda la carrera.

A Rubén

Gracias por todo el apoyo que me brindaste durante la realización de esta tesis, por el amor y las enseñanzas que hemos compartido y sobre todo por no soltar nunca mi mano.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Alicia Hernández Rodríguez

Gracias por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por la paciencia, la enseñanza, los consejos y el impulso.

A Mónica Díaz Coránguez

Por toda la ayuda que me diste durante tu estancia en el laboratorio y por brindarme además una amistad.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, a la Dra. Aurora de la Peña y el Dr. Jorge Antonio García

Por el tiempo dedicado a este trabajo y a sus observaciones que contribuyeron al enriquecimiento de esta tesis.

A Milka Luna

Por compartir el viaje de una tesis y hacer que el tiempo de su realización fuera lo más agradable posible y sobre todo por la gran amistad que surgió de la misma.

.

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción	5
Antecedentes	6
Cáncer de mama	7
Factores de crecimiento	10
Receptores acoplados a proteínas G	12
La hemostasia y la trombina	13
* Características de la trombina	13
* Características de la hemostasia	14
^ Fase vascular	14
^ Hemostasia primaria	15
^ Fase plasmática o coagulación	15
Receptores de la trombina	18
Inhibidores de la trombina	21
PAR1 y la progresión del cáncer de mama	22
Justificación y planteamiento del problema	24
Hipótesis	24
Objetivos	25
Metodología	26
Cultivo Celular	26
Obtención de lisados celulares	26
Cuantificación de proteínas	27
Expresión de los PAR (Western Blot)	28
Expresión de PAR (Inmunofluorescencia indirecta)	30
Análisis estadístico	32

Resultados	32
Control de calidad de proteínas en lisados celulares	32
Perfil de expresión PAR 1-4	33
Regulación de PAR1 en el tiempo inducida por trombina	36
Contribución específica de la trombina en la expresión de PAR1	39
Regulación de PAR4 en el tiempo inducida por trombina	42
Contribución específica de la trombina en la expresión de PAR4	45
Discusión	48
Conclusiones	52
Anexo: Tabla de abreviaciones	53
Referencias bibliográficas	55

RESUMEN

ANTECEDENTES. La trombina factor clave en la cascada de la coagulación, puede estimular la proliferación celular mediante su receptor PAR1; la sobre expresión de este receptor, en líneas celulares de cáncer de mama, se ha relacionado con su mayor grado de invasividad y en pacientes con cáncer de mama con el desarrollo de metástasis; por lo que se piensa, podría estar involucrado en la progresión del tumor. El PAR1 es un receptor acoplado a proteínas G, que pertenece a una familia de cuatro miembros: PAR1-4; el papel que desempeñan los otros miembros de la familia (PAR2-4), en la progresión del cáncer de mama no ha sido estudiada.

OBJETIVO. Con el desarrollo de la presente tesis se planteó establecer si los PAR (1-4) se expresan en forma diferencial en líneas celulares de cáncer de mama con diferente potencial invasivo y determinar si este patrón pudiera ser modulado por la trombina.

MÉTODO. El perfil de expresión basal de los cuatro miembros de la familia PAR, se determinó (immunoblotting e inmunofluorescencia indirecta), en dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231 y MCF-7 de alto y bajo potencial invasivo respectivamente; se evaluó la regulación de dos miembros de la familia (PAR1 y 4), inducida por trombina en el tiempo y se analizó la contribución específica de la trombina a dicha modulación. Las diferencias en el nivel de expresión de los PAR, se evaluaron mediante pruebas de t-student de dos colas; un valor de $P \leq 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS. Se observó un perfil de expresión diferencial de los PAR1-4 en las dos líneas celulares. Además, después de 48 horas de exposición a trombina (10nM), se observó un incremento significativo en la expresión de PAR1 en la línea celular MCF7 ($p < 0.05$); mismo que fue inhibido en un 99.9%, cuando se pre-incubo la trombina con su inhibidor específico: la hirudina (6nM). La línea celular altamente invasiva, mostró una alta expresión de PAR1 independiente de la trombina. Por otro lado, se observó una estimulación de PAR4 en la línea celular MCF-7 después de 24 horas de exposición a trombina

(10 nM). Este efecto fue inhibido en un 55% por hirudina. La línea celular altamente invasiva también mostró una expresión de PAR4 independiente de la trombina.

CONCLUSIÓN.

Nuestros resultados demuestran una expresión diferencial de los PAR1-4 en dos líneas celulares de cáncer de mama con alto y bajo potencial invasivo; los receptores PAR1 y PAR4 se modulan en forma diferente en las dos líneas probadas. En la línea celular altamente invasiva, se observó una sobre expresión de PAR1 independiente de la trombina.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que representa un problema de salud pública. La principal complicación en el tratamiento y principal causa de muerte de las pacientes, es la diseminación del tumor; se sabe que las pacientes con cáncer de mama pueden desarrollar metástasis en diferentes sitios (hueso, pulmón, hígado, sistema nervioso central, etc.). Por lo que a fin de mejorar su diagnóstico y pronóstico es importante investigar los mecanismos celulares en el establecimiento de la metástasis (Reis-Filho, 2006, Ferlay, 2000).

La trombina, un factor multifuncional, induce un incremento en diversos procesos esenciales en el establecimiento de la metástasis (proliferación, angiogénesis, quimiotáxis, etc.); dichas actividades biológicas son mediadas por su receptor PAR1 (por sus siglas en ingles: Protease Activated Receptor); por lo que se le ha propuesto como intermediario de los mecanismos tempranos en el establecimiento de la metástasis. No se conoce completamente su mecanismo de señalización, pero se ha reportado, la sobre expresión de PAR1 en líneas celulares de cáncer de mama humano y en muestras de pacientes con cáncer de mama, lo que correlaciona con la mayor invasividad *in vitro* y la progresión tumoral *in vivo* respectivamente (Kamath L et al, 2001, Hernández-Rodríguez NA, 2009).

PAR1 es un receptor tipo proteína G, el más estudiado de una familia de 4 miembros (PAR1-PAR4); PAR1 *per se* posee un buen potencial para convertirse en un nuevo bio-marcador predictivo del desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer de mama (Booden, 2004); sin embargo, como se desconocen los mecanismos de regulación de su activación (Prenzel N. et. al. 1999), si se estudiara la modulación del resto de los miembros de la familia de los PAR (PAR2, 3 y 4), podría establecerse el papel de cada uno de estos en el desarrollo de la metástasis. Con el desarrollo de la presente tesis, se estudió la expresión basal de los cuatro PAR en dos líneas celulares de cáncer de mama con diferente potencial invasivo y su posible modulación por trombina.

ANTECEDENTES

El cáncer es un conjunto de enfermedades que involucran cambios dinámicos en el genoma; éstos conducen a la desregulación de la señalización y al descontrol de la proliferación celular y la homeostasis. Aunque en los últimos años se han descrito seis alteraciones que conducen a la célula tumoral a desarrollar un potencial ilimitado de crecimiento (autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-proliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión; Hanahan y Weinberg, 2000) y que conllevan al desarrollo de metástasis, nuestro conocimiento de los mecanismos celulares de su establecimiento es muy limitado y es quizá uno de los más preocupantes ya que representa la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer.

Desde el siglo XIX, se sabe que la metástasis es el desarrollo de tumores secundarios en órganos distantes que surgen a partir de un tumor primario (Liotta L, 2001). Sin embargo, se ha documentado que la formación de metástasis es un proceso muy ineficiente y que solo algunas clonas presentes en el tumor primario, serán capaces de pasar por distintas barreras y llegar a establecerse en otro órgano. Algunas de éstas son: superar las interacciones adhesivas que mantienen unidas a las células del tumor (uniones célula-célula y uniones célula-matriz extracelular); sobrevivir al torrente sanguíneo y al paso por los vasos linfáticos y/o capilares (1 de cada 10, 000 células malignas tiene éxito), la evasión del sistema inmune etc. (Foo P, 2002; Ruoslahti, 1996). A la fecha todavía se desconocen los mecanismos exactos que permiten la formación de metástasis y la razón de su desarrollo limitado a sitios específicos, que dependen del tipo del tumor primario.

Al respecto, se han descrito algunos modelos que tratan de explicar el desarrollo de metástasis. El primero de éstos, señala que todas las células tumorales tienen en un principio, bajo potencial metastásico y no es sino hasta etapas avanzadas de la formación del tumor, que algunas células acumulan diversas mutaciones somáticas y adquieren dicha capacidad. El segundo

modelo denominado de heterogeneidad dinámica, propone que aunque las sub-poblaciones celulares con potencial metastásico son generadas en altas tasas, éstas son inestables. Un tercer modelo especula acerca de la dominancia clonal de las células con potencial metastásico. Finalmente el cuarto modelo sugiere que las clonas con alta capacidad metastásica provienen de sub-poblaciones de células tronco y que éstas pueden esparcirse incluso en fases tempranas del desarrollo del tumor primario y permanecer en estado de latencia por largos periodos de tiempo (Weigelt, 2005).

En relación a la predilección de las clonas metastásicas por ciertos órganos para su desarrollo, se han postulado cuatro teorías. La primera de ellas sostiene que las células malignas se distribuyen en la misma proporción a todos los órganos, pero únicamente se establecen en aquéllos que presenten los factores de crecimiento apropiados para su desarrollo; una segunda teoría postula que las células epiteliales del órgano blanco, expresan moléculas de adhesión, que permiten que las células tumorales circulantes permanezcan en dichos órganos, favoreciendo su establecimiento. La tercera teoría, establece que moléculas atrayentes específicas, presentes en determinados órganos, estimulan a las células tumorales a invadir dichos órganos. La cuarta teoría, señala que las células tumorales pueden movilizar a células de la médula ósea provocando su migración a regiones particulares y cambiando el ambiente para favorecer el desarrollo de la metástasis (Liotta L, 2001; Steeg P, 2005). Es importante señalar, que estos modelos y teorías muestran puntos a favor y en contra por lo que hasta el momento, ha sido difícil no sólo identificar el momento justo en que se desarrolla la metástasis, sino también esclarecer las razones por la afinidad a ciertos órganos.

CÁNCER DE MAMA

La complejidad del cáncer se puede ver reflejada al considerar por ejemplo al cáncer de mama; aunque pareciera que solo incluye a un tipo de tumor denominado por su localización específica, este tipo de neoplasia maligna, es una enfermedad heterogénea que engloba a diferentes entidades con diferente pronóstico clínico (Reis-Filho, 2006). Una de las primeras

clasificaciones se realizó en base a la histología del tumor; es decir, se tomaron en cuenta sus características microscópicas: el tipo celular que le dio origen; destacan por su frecuencia: los carcinomas canaliculares, los lobulillares, los mixtos y el tubular-invasivo, entre otros (Weigelt, 2005). Sin embargo, se sabe que tumores con características microscópicas similares, muestran un comportamiento diferente al ser tratados con la misma terapia, por lo que se han considerando otros factores que han dado lugar a otras clasificaciones (Martín M, 2006).

Desde el punto de vista clínico se clasifica al cáncer de mama primeramente como esporádico o hereditario (ligado a mutaciones en los genes BCRA-1, BCRA-2, p53, etc.); además se consideran parámetros clínicos y patológicos para agrupar a las pacientes de acuerdo al mal pronóstico de su enfermedad; algunos ejemplos de éstos son la edad de la paciente (mujeres mayores de 50 años), la exposición de las mujeres a estrógenos endógenos o externos: la edad temprana de menarca y la edad tardía de la menopausia, el uso de anticonceptivos orales, la presencia de ganglios linfáticos inflamados, el tamaño del tumor (>2 cm), el alto grado histológico (poca diferenciación) y su alto índice de proliferación (Okugawa H, 2005). Cabe destacar que en el caso particular de las pacientes con cáncer de mama el problema de desarrollo de metástasis es todavía mayor, ya que se sabe, que éstas pueden presentar hasta 5 diferentes sitios de metástasis, incluyendo: hueso, pulmón, hígado, sistema nervioso central, etc. lo que llega a disminuir la sobrevivencia de las pacientes hasta en un 20% en un periodo de 5 años (Friedel, 2002; Keyomarsi, 2002).

Desgraciadamente la eficiencia predictiva de estos factores clínico-patológicos, para la determinación de grupos de pacientes con cáncer de mama y alto riesgo de desarrollo de metástasis, no es ciento por ciento eficiente; por lo que en los últimos años, se ha incluido la determinación de dos biomarcadores moleculares en el diagnóstico de estas pacientes: el receptor de estrógeno ($RE\alpha$) y el HER-2/neu. En las pacientes con cáncer de mama la detección del $RE\alpha$, en el tumor primario, es fundamental para determinar su tratamiento, ya que establece la susceptibilidad del tumor primario a la terapia

hormonal; en el caso del HER2 se establece un mal pronóstico para la pacientes (Todorovic-Racovic N, 2006). Con base en la determinación de estos biomarcadores y el perfil de expresión génico de cada tumor, se han propuesto cinco subtipos diferentes de cáncer de mama (ver Cuadro 1) siendo los luminal A y B los más comunes (Martin M, 2006).

Cuadro 1. Subtipos de cáncer de mama.

CANCER MAMA SUB-TIPO	BIOMARCADORES	PROGNOSIS
LUMINAL A	RE α (+++), CD1 (+), CTK 8/18 (+), BRCA-2 (+)	Bueno
LUMINAL B	RE α (+), alto grado diferenciación	Muy malo
BASAL*	RE α (-), PgR (-), HER2 (-) CTK 5/6 y 17(+), EGFR (+)	Pobre
HER2 (+++)	RE α (-), Topoisomerasa II α , GATA4	Pobre
	RE α (+)	Pobre

PgR: Receptor de progesterona, CTK: citoqueratina, CD1: ciclina D1, RE α : Receptor de estrógeno α , EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico 2.

(+) Nivel de expresión del receptor; * también denominado triple negativo.

Considerando esta última clasificación, se ha logrado determinar que los tumores que no expresan al RE α son los de peor pronóstico, mientras que los pacientes con cáncer luminal A, presentan mejores expectativas de sobrevivencia (Martín M, 2006). Esta clasificación es la que se emplea en la actualidad, aunque todavía no permite predecir la progresión del tumor en las pacientes con cáncer de mama en forma adecuada; por lo que en los últimos años se ha introducido un método que permite predecir la progresión tumoral en base a la identificación de un perfil de expresión de 21 genes (Oncotype DX; éste aún está a prueba y no se emplea en más del 5% de los casos, solo en los países del primer mundo (Harris L et al, 2007).

Es decir, que aunque en los últimos años se cuenta con clasificaciones de este tipo de neoplasia maligna, que permiten aplicar a las pacientes terapias específicas, dependiendo de las características de su tumor primario (moduladores selectivos del RE y las nuevas terapias blanco molecular que se basan en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el HER2), el cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte en mujeres. Este es un problema de salud pública en México y en el resto del mundo; en el año 2002 se reportaron más de un millón de casos, de los cuales 410, 712 fallecieron (Ferlay J, 2002). Además, en nuestro país donde no prevalecen los métodos de detección temprana, el problema es más importante y se ha observado un aumento en las tasas de mortalidad; en el año 2001 se estimó una tasa de mortalidad de 14.7 por 100 000 en mujeres mayores de 25 años (López-Carrillo L, 2001).

A fin de mejorar el diagnóstico temprano de metástasis en pacientes con cáncer de mama, es de suma importancia seguir investigando los mecanismos celulares en su establecimiento (Welch DR, 2000), lo que nos permitiría establecer nuevos marcadores de diagnóstico, razón de estudio en la presente tesis. Uno de los principales candidatos, propuesto como intermediario de los mecanismos tempranos en el establecimiento de la metástasis es la trombina y su receptor denominado PAR1 (por sus siglas en inglés: "Protease Activated Receptor1"); ambos han sido involucrados en procesos invasivos de diversos tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama (Kamath L, 2001). Debido a que la trombina es un factor multifactorial que funciona como un factor de crecimiento, cuando interactúa con su receptor tipo proteína G, a continuación me permitiré esbozar algunos fundamentos de este tipo de sistemas.

FACTORES DE CRECIMIENTO

La comunicación celular involucra la síntesis y liberación de moléculas de señalización por una célula efectora, su transporte y detección hacia la célula diana; lo que resulta en un cambio en diversas funciones celulares (proliferación, diferenciación, etc.). Este sistema se regula estrechamente e

incluye finalmente la remoción de la señal, lo que generalmente termina con una respuesta celular específica (ver Diagrama 1). Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que actúan como ligandos específicos, que al unirse a su receptor específico, inducen en éste, un cambio en su conformación estructural; lo que a su vez, inicia una serie de reacciones, que permiten activar diversas vías de señalización y que llevan a la estimulación del crecimiento de la célula (Alberts, 2000).

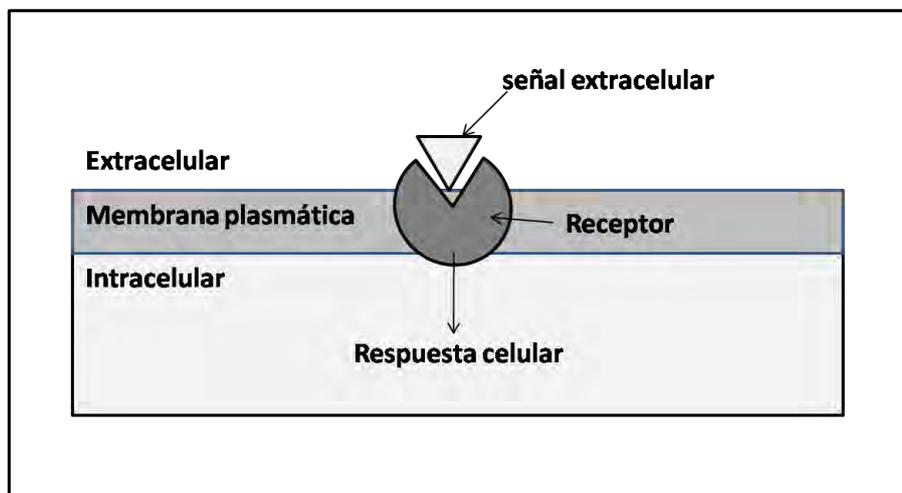


Diagrama 1. Comunicación celular.

Se ejemplifican los elementos esenciales de la comunicación celular. La señalización puede ser autócrina, parácrina o endócrina.

En la progresión del cáncer de mama, se requiere la presencia de determinados factores de crecimiento y sus receptores para estimular la proliferación de las clonas metastásicas. La trombina, ampliamente conocida por su función crítica en la coagulación de la sangre, también puede actuar como un factor de crecimiento, e inducir mediante sus receptores PAR diversos efectos a nivel celular. Los receptores de factores de crecimiento, son proteínas de membrana que poseen cierta actividad intrínseca; está puede ser por mencionar dos ejemplos, del tipo de tirosina cinasa (TK) o bien pueden estar asociadas a proteínas tipo G (GPCR) (Alberts, 2000. Diagrama 2).

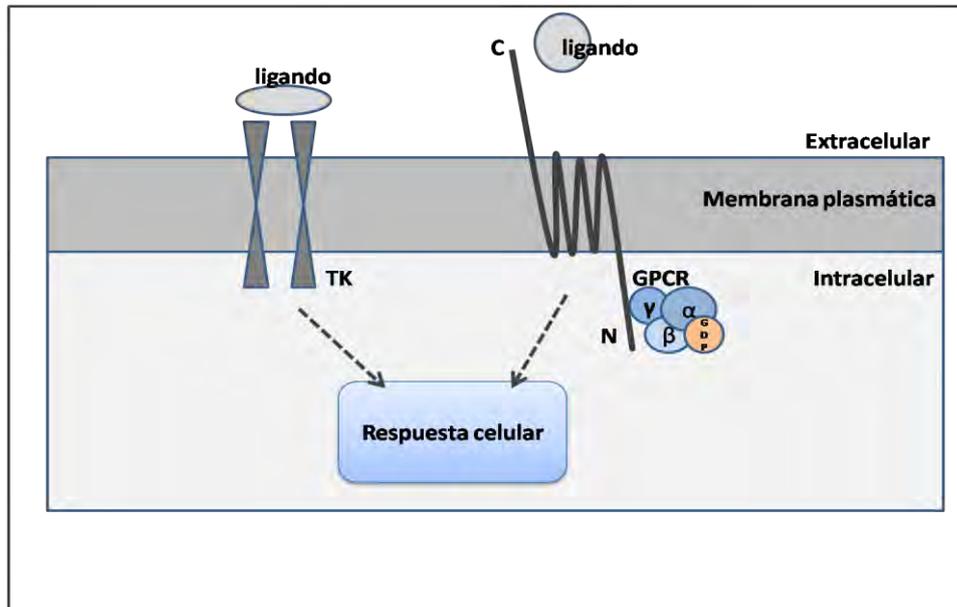


Diagrama 2. Ejemplos de Receptores de factores de crecimiento.

Los receptores tirosina cinasa se dimerizan en presencia del ligando, lo que permite su auto fosforilación y el inicio del proceso de señalización intracelular. Los receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés GPCR) una vez en contacto con su ligando, disociarán a las proteínas G desencadenando la cascada de señalización.

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los GPCR son parte de una súper familia de proteínas capaces de transducir un amplio intervalo de señales a través de la membrana plasmática. Aunque se han clonado más de 800 receptores de este tipo, se sabe que poseen en común, una característica estructural: poseen un dominio que atraviesa la membrana plasmática 7 veces (Penn, 2000). Otra característica importante de este tipo de receptores, es que poseen la habilidad de unirse a más de una de las proteínas hetero-triméricas, localizadas en el citoplasma en forma muy cercana a la membrana plasmática y denominadas proteínas G pequeñas. El cambio en la conformación estructural que sufren los receptores al interactuar con su ligando específico, permite su interacción con las proteínas $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$, $Gq/11$ o bien Gi/Go . La interacción con una u otra subunidad regula su actividad, ya que favorece la desensibilización del GPCR que se ha activado (Prossnitz, 2004).

Aunque se ha reportado que los GPCR estimulan la proliferación celular vía la estimulación de la cascada de las MAP cinasas (Mitogen Activated

Protein Kinases), que culminan en la activación de las Extracellular Regulated Kinases (ERK); translocan a núcleo y activan a factores de transcripción como al c-Jun y el c-fos), su mecanismo de acción no se ha descrito completamente; a la fecha, no se ha logrado demostrar la activación directa de las MAP cinasas por ningún GPCR. Aunque se ha propuesto que este tipo de receptores, activan a las ERK mediante la trans-activación de un receptor del tipo TK (Luttrell, 1999)

LA HEMOSTASIA Y LA TROMBINA

Características de la trombina

La trombina es una proteasa de serina generada a partir de la protrombina y es sintetizada por las células parenquimatosas del hígado (Ashton, 1995) o de otras células como los monocitos y es un factor importante dentro de la hemostasia que permite la transformación de fibrinógeno a fibrina. La conversión de la protrombina a trombina se lleva a cabo en las plaquetas, en presencia de fosfolípidos plaquetarios, Ca^{2+} , el factor Va (co-factor) y el factor Xa (Roberts, 1993). Además, se sabe que a nivel celular, actúa a través de su receptor, como un factor de crecimiento multifuncional que promueve la adhesividad, migración, proliferación y angiogénesis en diversos tipos celulares (cada uno de éstos relevante en el establecimiento de la metástasis; Bar-Shavit R, 1992).

La α -trombina tiene un peso molecular de 37 KDa y consta de dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes di-sulfuro (Fenton, et al. 1993). Además de la α -trombina, existen otros dos tipos de trombina (β y γ), cada una con modificaciones estructurales, caracterizadas por la presencia de cadenas polipeptídicas de menor peso molecular (Fenton, et al. 1993). Es importante mencionar, que la α -trombina posee en su estructura un sitio activo conformado por un sitio catalítico (aminoácidos: aspartato, serina y glicina) y un exosítio; éste último funciona independiente del sitio catalítico y se encuentra involucrado en el reconocimiento del fibrinógeno por la trombina (Fenton, 1991).

Características de la hemostasia

La hemostasia permite el cambio de estado físico de la sangre de líquido a sólido, evita su pérdida y favorece la reparación del tejido endotelial en respuesta a una lesión de un vaso sanguíneo, es un mecanismo fisiológico benéfico que asegura el estado líquido de la sangre; esta se auto-limita en espacio, tamaño y tiempo y la magnitud de la respuesta depende del estímulo nocivo y de las condiciones de las células endoteliales que regulan las condiciones del micro-ambiente en el árbol vascular, lo que en condiciones normales, asegura un balance entre la tendencia pro-coagulante y anti-coagulante. Para su estudio se divide en:

- Fase vascular
- Hemostasia primaria
- Fase plasmática de la coagulación
- Regulación anti-trombótica
- Sistema fibrinolítico

Fase vascular

En esta fase se da la respuesta inmediata a un estímulo brusco nocivo, que es la vasoconstricción. En el endotelio vascular a través de factores relajantes como el óxido nítrico, las prostaglandinas y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio o de factores vasoconstrictores como la endotelina, radicales súper óxido y el tromboxano A₂, se regula el micro ambiente pro- y anti-coagulante del árbol vascular además de que sirve de interfase entre la sangre y los tejidos subyacentes situación que le permite actuar como receptor y transmisor de señales y llevar a cabo funciones como: angiogénesis y apoptosis, controlar la actividad y el tono vasomotor ,transferir sustancias metabólicas entre la sangre circulante y los tejidos, formar una barrera entre las células sanguíneas y las macromoléculas plasmáticas, sintetizar o metabolizar mediadores que regulan la interacción entre la pared vascular y los componentes de la sangre, por ejemplo: factor VIII/ vW, la fibronectina, la colágena, los proteoglicanos y mediadores lábiles del tono vascular. Además de impedir la formación de un coágulo, integrar los procesos vasculares de reparación como migración y proliferación celular, así como participar en la inmunidad celular (Cines DB, 1998).

Hemostasia primaria

Las plaquetas son células que carecen de núcleo que provienen de fragmentos de los megacariocitos de la médula ósea. La trombopoyetina estimula su presencia en la circulación sanguínea y su número puede variar al ser secuestradas por el bazo o por consumo durante la coagulación. En su membrana plasmática se encuentran numerosas glicoproteínas que cumplen funciones de receptores y algunos por ejemplo, permiten su adhesión al endotelio a través del factor von Willebrand (vW) o su agregación entre sí a través del fibrinógeno. Las plaquetas responden a estímulos muy diversos, a colisiones en flujos turbulentos o a la acción de moléculas o neurotransmisores circulantes o de síntesis local como la serotonina, el ADP, la epinefrina o la trombina entre otros.

En el interior de las plaquetas se distinguen diferentes tipos de gránulos: alfa, densos y lisosomas. En el interior de estos gránulos se almacenan enzimas, proteínas, factores de crecimiento y factores de la coagulación que permiten una inmediata respuesta de las plaquetas cambiando de forma, adhiriéndose al endotelio y perdiendo el arreglo de la membrana plasmática. En el mecanismo de activación plaquetaria el ácido araquidónico es blanco de tres enzimas: la fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa C (PLC) y ciclooxigenasa-1 (COX-1). La COX-1 metaboliza al ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxano A2 (TXA2) que es el encargado de la retroalimentación y amplificación las respuestas. De esta forma, las plaquetas que se han activado se adhieren al endotelio, liberan de sus gránulos intracelulares agonistas que reclutan más plaquetas y forman un agregado plaquetario.

Fase plasmática o coagulación

La coagulación tiene varios mecanismos que aseguran el inicio inmediato y la amplificación de las reacciones enzimáticas. La membrana de las plaquetas tiene una bicapa asimétrica de fosfolípidos que recluta a los factores de la coagulación que viajan en la circulación sanguínea portando un ión de calcio divalente en su dominio estructural de gama-carboxi-glutamato. Las reacciones hemostáticas se inician y amplifican hasta formar un acumulo sólido de fibrina

que después de cumplir sus funciones para sellar y reparar el vaso sanguíneo desaparece por un proceso fibrinolítico. Las reacciones hemostáticas se llevan a cabo sobre superficies sólidas que provienen en su fase inicial de la membrana de las células endoteliales, en su fase de amplificación o expansión de la membrana de las plaquetas y en su fase fibrinolítica de los depósitos de fibrina.

Existen varios modelos del sistema de la coagulación, el mejor conocido propone dos vías, la extrínseca y la intrínseca que convergen en la vía común, con la generación de trombina como punto último (Monroe D, 2002. Diagrama 3). El modelo es útil para interpretar los resultados de las pruebas de coagulación que se realizan tanto con fines diagnósticos como de seguimiento farmacológico. Permite relacionar los resultados del tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activado y el tiempo de trombina con, la actividad de los factores que participan en la vía extrínseca, intrínseca y común respectivamente. Este modelo sugiere una secuencia establecida de reacciones en donde se plantean diferentes estímulos para su inicio.

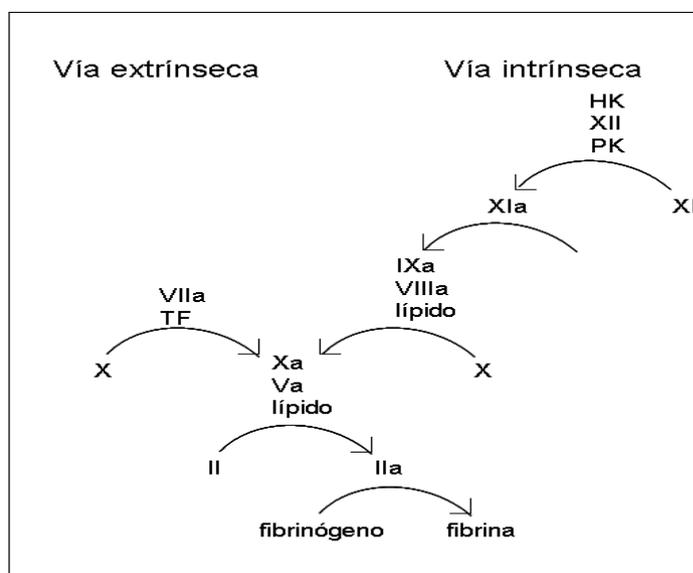


Diagrama 3. Modelo de la cascada de coagulación. Se muestran las dos vías de señalización, donde HK: quinínogeno de alto peso molecular, PK: precalicreina, XII: Factor Hageman, XI: antecedente de la tromboplastina plasmática, IX: compuesto de la tromboplastina plasmática, VII: proconvertina, VIII: factor A antihemofílico, TF: factor tisular, X: factor Stuart-Prower, V: proacelerina, II: protrombina. La forma activada de estos factores se indica con una a y las reacciones que

requieren de una superficie fosfolipídica se indican con la palabra lipido.
Modificado de Monroe D, 2002.

Actualmente se propone un modelo celular (Roberts HR, 1998) que contempla también las características fisicoquímicas de la fase sólida sobre la que interactúan los factores de la coagulación (Monroe D, 2002). El modelo distingue 3 fases que se interconectan y amplifican (iniciación, refuerzo y propagación. ver Diagrama 4). El factor tisular (TF) facilita las reacciones iniciales que se propagan gracias a pequeñas cantidades formadas de Xa y IIa. Las reacciones se amplifican eficientemente sobre la superficie celular porque los factores que se activan son inaccesibles a todos los inhibidores, lo que permite hacer eficiente la incorporación del factor Xa al complejo enzimático de la protrombina. La actividad de la trombina sobre células endoteliales, plaquetas y en la hidrólisis parcial de los factores de la coagulación, permite que el mecanismo se multiplique hasta generar cantidades que aseguran el éxito de la función hemostática.

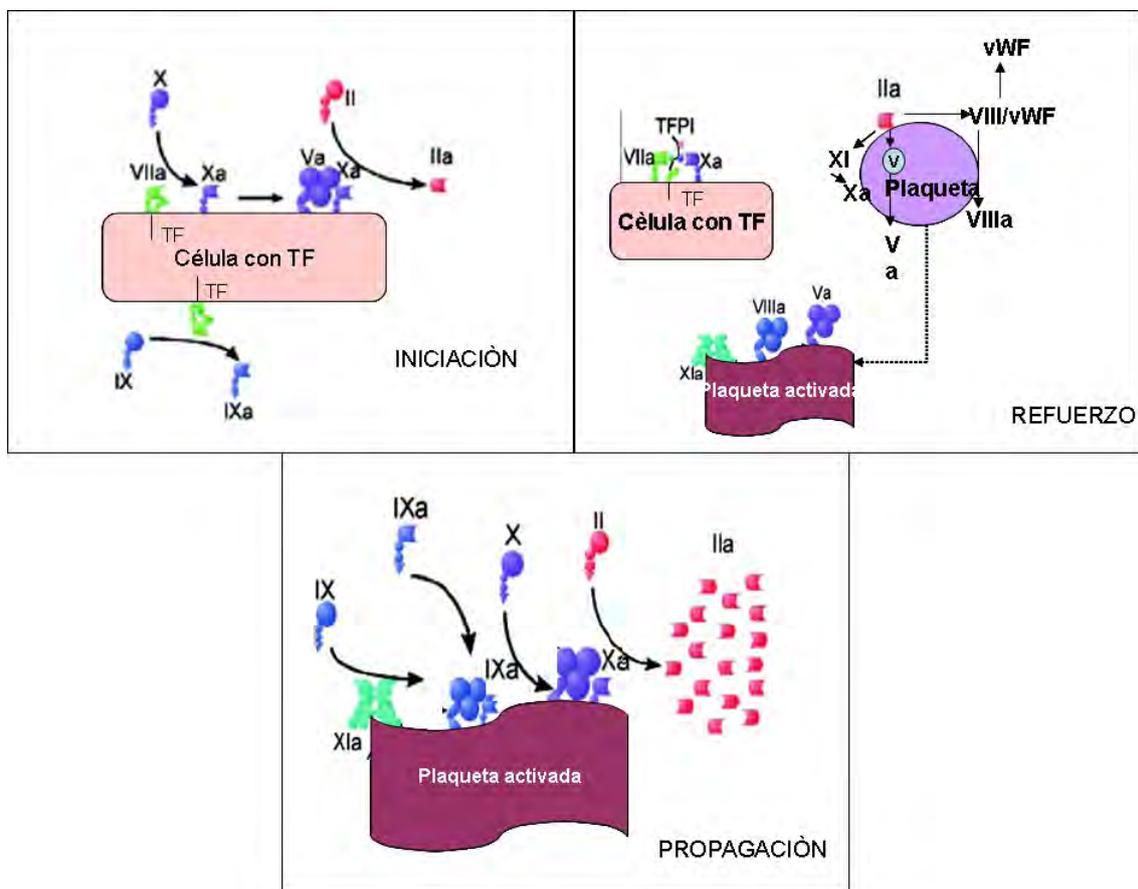


Diagrama 4. Modelo celular de la coagulación. Modificado de Monroe D, 2002

La coagulación, resultante de la generación de trombina, no puede contemplarse como un mecanismo aislado, ya que simultáneamente se inician mecanismos que dan un balance pro y anti-coagulante al entorno y que regulan la inflamación. La trombina no sólo tiene actividades pro-coagulantes, un mecanismo anticoagulante fisiológico muy importante se inicia al unirse con la trombomodulina (T-TM) que, a su vez permite a la proteína C y a su cofactor la proteína S interrumpir la actividad de dos cofactores de la coagulación, el Va y el VIIIa. Otra acción de la trombina-trombomodulina (T-TM) se relaciona con la disminución de la actividad fibrinolítica. T-TM activa la enzima TAFI por sus siglas en inglés (thrombin activable fibrinolysis inhibitor). Esta enzima retira de la fibrina aminoácidos arginina y lisina carboxi-terminales necesarios para atraer sobre la superficie de fibrina al plasminógeno (precursor de la plasmina), de esta forma detiene la fase expansiva de la fibrinólisis, en presencia de TAFI los depósitos de fibrina son resistentes a la lisis.

Como ya se mencionó, la trombina juega un papel importante dentro de estos procesos y aunque a nivel celular no se conoce completamente el mecanismo de acción de la trombina, se sabe su función es mediada por la activación de sus receptores específicos: PAR (Coughlin, 2005). Además de la activación de plaquetas, la trombina participa en algunas otras funciones (síntesis y liberación del tromboxano A₂, movilización de la P-selectina y del ligando CD40 a la superficie de la plaqueta, la activación de la integrina α_{IIb}/β_3), que podrían estar relacionadas con la progresión tumoral (Coughlin, 2001 y 2005; D'Andrea MR, 2001). La mayor adhesión promovida por la trombina entre las células tumorales y la matriz extracelular, podría favorecer la mayor permanencia de la célula tumoral en un microambiente específico, lo que favorece el establecimiento de las metástasis (D'Andrea MR, 2001).

RECEPTORES DE LA TROMBINA.

La señalización inducida por la trombina a nivel celular, es mediada entonces por una familia de receptores acoplados a proteínas G: PAR. A la fecha se han identificado cuatro diferentes: PAR1, PAR2, PAR3 Y PAR4. El

receptor PAR1 es el más estudiado y por lo tanto el prototipo de la familia y fue originalmente descubierto en plaquetas. Aunque es un GPCR, su forma de activación, a diferencia de la mayoría de los GPCRs (activados mediante la unión específica de su ligando), requiere que la trombina procese proteolíticamente un sitio específico de su extremo amino terminal (expuesto en el dominio extracelular -LDPR⁴¹-S⁴²-) y libere una nueva secuencia en su extremo amino terminal: SFFLRN, que sirve entonces, como ligando induciendo la auto activación del receptor y que permite la disociación de las proteínas G hetero-triméricas (G_{12/13}, Gq y Gi/z (Coughlin, 2001; ver Diagrama 5).

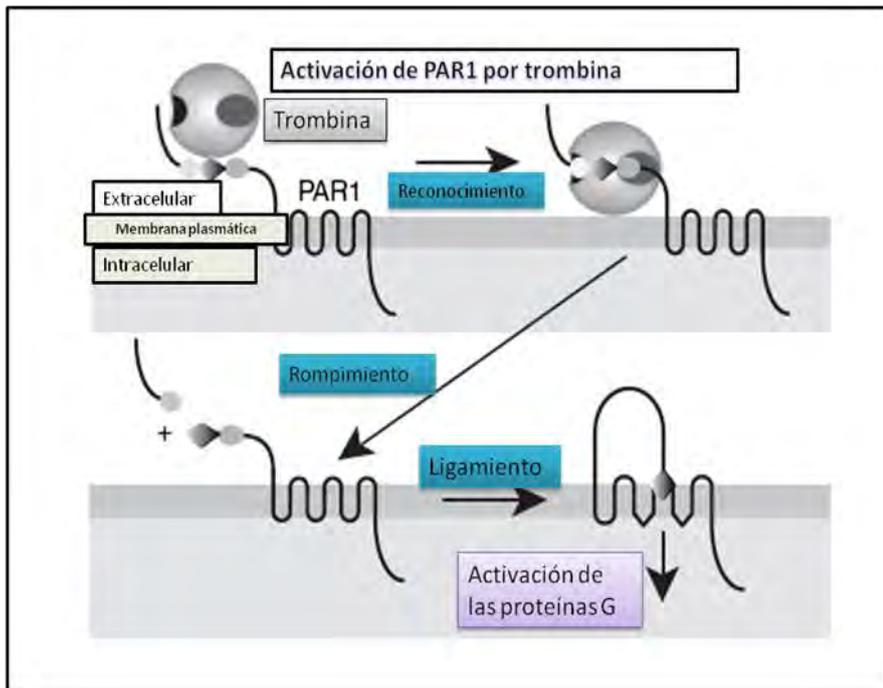


Diagrama 5. Mecanismo de activación de PAR1 por trombina.
Modificado de Coughlin 2005.

Cabe mencionar que en los últimos años, se ha reportado que PAR1 puede ser procesado proteolíticamente no solo por la trombina, sino que además puede ser activado por la proteína C activada (APC) y un miembro de la familia de las metaloproteasas de matriz dependientes de zinc: la MMP-1 (Boire, 2005); El resto de los PAR, son activados por trombina, con excepción del PAR2 (activado por tripsina y triptasa; Kamath 2001; Herbert, 1994). El mecanismo de señalización inducido por la trombina, no se conoce del todo, sin embargo, se sabe que la activación de diferentes subtipos de las proteínas G,

es crucial para dar lugar a respuestas específicas (Diagrama 6). Además, existe evidencia experimental de la comunicación cruzada entre los diferentes receptores PAR; por ejemplo, se sabe que PAR3 ayuda a la activación de PAR4 y la transactivación de PAR1/2 (Arora P, 2007). Cabe mencionar que los receptores PAR3 y PAR4 median la señalización inducida por la trombina en plaquetas de ratón, mientras que PAR1 y PAR4 son los receptores funcionales de la trombina en plaquetas humanas (Arora P, 2007).

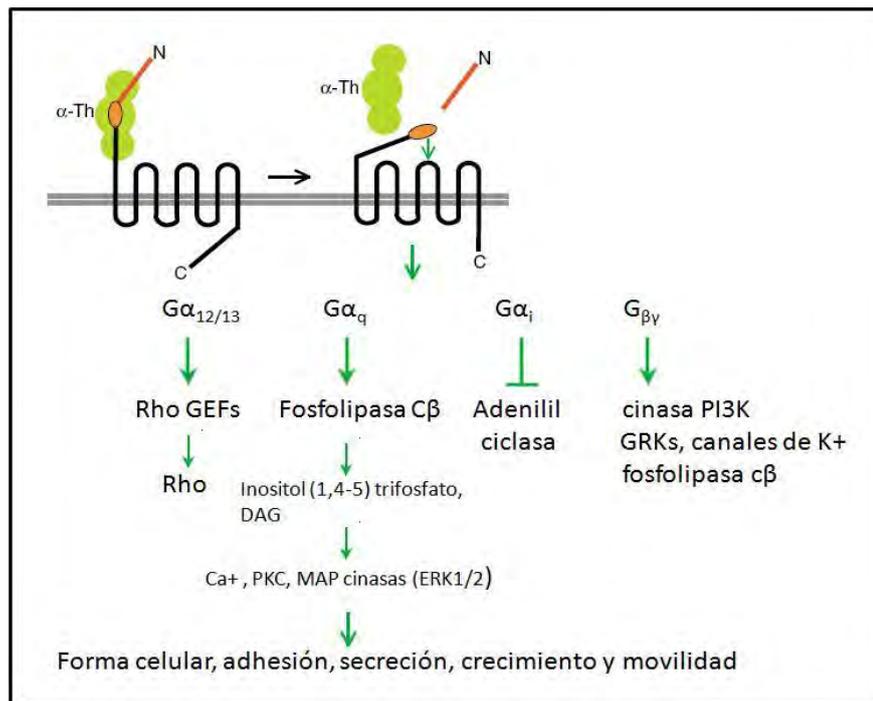


Diagrama 6. Activación de subunidades G por PAR1.
Modificado de Arora P, 2007.

El procesamiento proteolítico de PAR1 es irreversible; el péptido agonista permanece unido al receptor; sin embargo, al igual que otros GPCR, éste receptor es inactivado rápidamente después de iniciada la señalización. Esta inactivación se lleva a cabo mediante su internalización y control de la fosforilación (Coughlin, 2005). Destaca el hecho de que a diferencia de la mayoría de los GPCR, que son reciclados después de su internalización, PAR1 al ser internalizado es dirigido inmediatamente a los lisosomas y es degradado independientemente de las β -arrestinas; este proceso de regulación — internalización y degradación— trae como consecuencia que PAR1 no se

encuentre en contacto con sus efectores y previene su reciclamiento a la superficie celular (Arora P, 2007). En contraste se ha demostrado que la internalización de PAR2 es mediada por β -arrestinas y que su redireccionamiento a los lisosomas es mediado por ubiquitina; los mecanismos para la internalización y degradación de PAR4 no son conocidos y aun está por determinarse si PAR3 se redistribuye por la superficie celular (Arora P, 2007).

INHIBIDORES DE LA TROMBINA

Con el nombre de serpinas por sus siglas en inglés (serine protease inhibitors) se conocen a los inhibidores directos de las serinoproteasas. Las diversas serpinas permiten la regulación de la coagulación y la inflamación y actúan mediante la inducción de cambios en la conformación estructural de la proteasa. Algunos de éstos inhibidores son regulados por heparinas o por glucosaminoglicanos como la anti-trombina (AT), el co-factor de heparina II (Co-HII), la nexina de proteasa-1 (PN1, por sus siglas en inglés), el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y el inhibidor de la proteína C (PCI) (Wei Li, 2008). La AT es el inhibidor endógeno humano por excelencia (Xing Li, 2008).

La AT es un miembro regulado por la heparina que atrae a este inhibidor sobre su superficie, modifica la orientación de sus grupos funcionales facilitando su unión covalente con la trombina. Trombina-AT se separan y liberan a la heparina para favorecer la unión de otras moléculas de trombina y antitrombina. La AT se une también con menor afinidad a otras serinoproteasas.

Otro potente inhibidor de la trombina es la hirudina; éste es un producto anticoagulante, que proviene de las glándulas salivales de la sanguijuela: *Hirudo medicinalis* (Mo W, 2008). Este es muy específico y cuenta con una estructura nuclear (apolar unida por tres puentes disulfuro) y un extremo aniónico. La hirudina actúa mediante la formación de un complejo no covalente (con relación estequiométrica 1:1 con la α -trombina), en donde el grupo apolar de la hirudina se une a las regiones apolares cercanas al sitio catalítico de la

proteasa y su exosito es ocupado por el extremo aniónico del inhibidor, ambos dominios exhiben contribuciones aditivas de unión, es decir que se unen independientemente del otro (Bode W y Huber R, 1992) . De esta forma, además de inhibir la conversión de fibrina a fibrinógeno, inhibe la actividad de los receptores asociados a proteasas (Fenton, 1991).

PAR1 Y SU PAPEL EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Desde hace algunos años se conoce de la importancia de los receptores PAR en la progresión tumoral. Sin embargo, aunque se ha demostrado la sobre expresión de PAR1 en distintas neoplasias malignas (cáncer de mama, melanoma, cáncer de colon y recto, cáncer de pulmón, páncreas y próstata; Bangham J, 2005) y se ha documentado ampliamente que las proteasas de la cascada de la coagulación junto con los PAR, promueven el crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis; su mecanismo de acción, aún no se conoce completamente (Arora P, 2007).

En líneas celulares de cáncer de mama, se ha encontrado una asociación entre la sobre-expresión de PAR1 y su capacidad invasiva; por ejemplo en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231(alto potencial invasivo *in vitro*), se ha reportado la expresión de niveles elevados de PAR1; la inhibición de su expresión, resulta en una reducción de dicho potencial invasivo (Kamath L, 2001; Even-Ram, 1998, 2001; Nierodzik ML, 1998). Por otra parte en modelos experimentales, se ha demostrado que la proteína Gi/PI3K, activada en forma temprana por el receptor PAR1 de la trombina, puede inhibir el proceso de invasión *in vitro*; lo que sugiere que una estimulación selectiva de cada uno de los PAR podría llevar a diferentes eventos migratorios dependiendo del contexto celular (Kamath L, 2001).

Recientemente y también en líneas invasivas de cáncer de mama, se ha demostrado que la activación proteolítica de PAR1 inducida por la trombina conlleva a una transactivación persistente de los receptores: EGFR y HER2 (proceso mediado por $G\alpha_{i/o}$, la actividad de metaloproteasas y la liberación del ligando HB-EGF; Arora P, 2008). Esto confirma la existencia de un nexo entre

PAR1 (un receptor activado por proteasas generadas por el tumor) y la hiperactivación de la señalización inducida por EGFR y HER2, esenciales en el desarrollo de metástasis. La señalización inducida por los receptores HER, culmina en la actividad prolongada de las cinasas ERK-1 y ERK-2; importantes mediadores de la cascada mitogénica de señalización que interviene en la progresión tumoral (ver diagrama 7; Booden, 2004; Arora P, 2008).

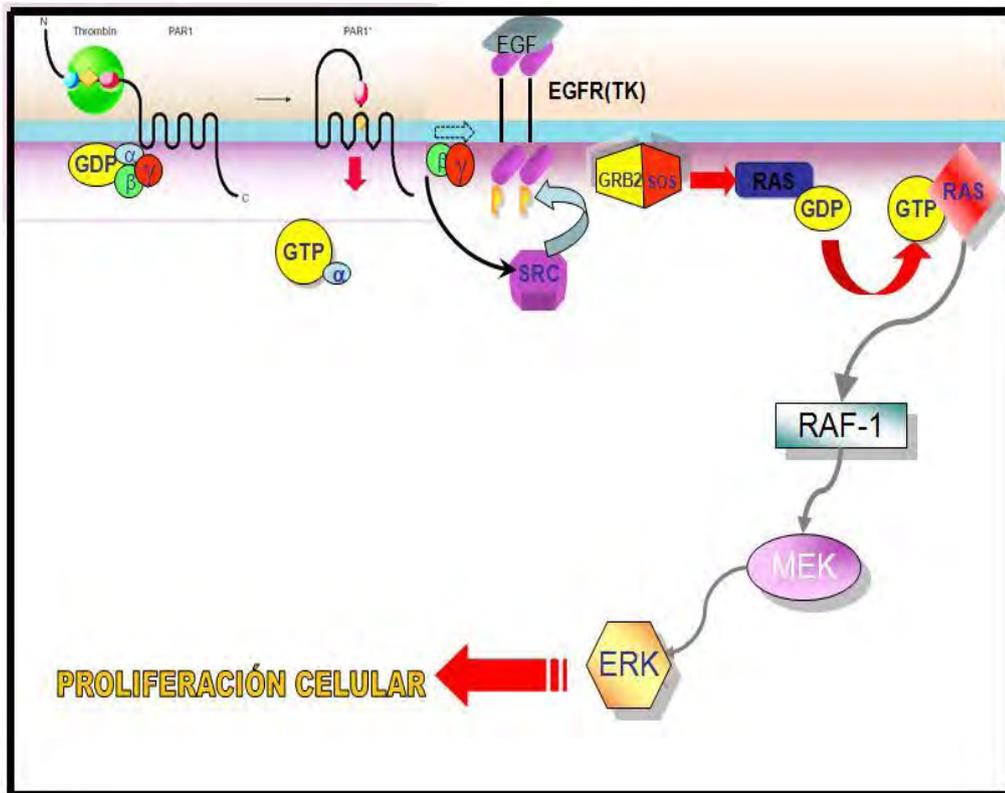


Diagrama 7. Probable mecanismo de transactivación de EGR por medio de PAR1.

Se cree que en el proceso de transactivación interviene la activación de la cinasa src, la cual inicia la cascada de señalización mitogénica. Modificado de Coughlin SR, 2000 y Hernández N, 2009.

Por otro lado, en muestras de pacientes con cáncer de mama, se ha observado el aumento selectivo del mensajero del PAR así como la sobreexpresión de su proteína, en pacientes con cáncer de mama del tipo canalicular infiltrante y de alto grado de diferenciación en comparación con muy bajos niveles detectados en células normales y de hiperplasia pre-maligna atípica intraductal; esta tendencia no se observa en fibroadenomas o mastopatías

fibroquísticas (Even-Ram S, 1998; Henrikson KP, Kamath L, 2001; Hernández-Rodríguez NA, 2009).

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia experimental señala entonces a la trombina y a su receptor PAR1, como mediadores esenciales en el establecimiento de la metástasis en el cáncer de mama. Cabe destacar que esta proteína mediadora de la transducción de señal se activa en los primeros pasos de la cascada de señalización (muy cerca de la membrana celular) y desde el punto de vista espacio-temporal, todavía lejos de su transducción del efecto al núcleo.

Sin embargo, la contribución de los otros miembros de la familia (PAR2-4), si es que esta existe, no se ha evaluado en células de cáncer de mama. Es entonces de importancia fundamental evaluar la presencia de estos receptores y su repercusión en la progresión del cáncer de mama. Con el desarrollo de esta tesis, se pretende conocer el perfil de expresión de los cuatro receptores en dos líneas de cáncer de mama (con alto y bajo potencial invasivo); además se analizará la modulación de PAR1 y PAR4 y la contribución específica de la trombina a su activación (inhibidor específico: hirudina). Debido a que el receptor PAR2 no es activado por trombina, sino por tripsina, éste no será evaluado en el presente trabajo; PAR3 tampoco será analizado ya que hasta el momento, este no ha sido reportado en líneas celulares humanas.

HIPÓTESIS

Se sabe que el receptor PAR1 participa en la progresión del cáncer de mama; se espera encontrar la sobre expresión de éste y al menos otro miembro de la familia de receptores (PAR-4), involucrado en la modulación temporal inducida por trombina en líneas celulares de cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la modulación celular inducida por trombina, a nivel de dos receptores PAR1 y PAR4 en líneas de cáncer de mama con diferente potencial invasivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil de expresión de los diferentes PAR1-4, en dos líneas celulares de cáncer de mama (alto y bajo potencial invasivo *in vitro*).
- Determinar la modulación inducida por trombina en dos de sus receptores: PAR1 y PAR4.
- Determinar la contribución específica de la trombina, en los cambios del perfil de expresión de PAR1 y PAR4

METODOLOGÍA

CULTIVO CELULAR

Se trabajó con dos líneas celulares epiteliales humanas de cáncer de mama, ambas fueron originalmente obtenidas del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma de la glándula mamaria (Cailleau, R 1974). En ambas se ha demostrado "*in vitro*" su alto y bajo potencial invasivo (MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente) (Kamath L. et al. 2001).

Para cultivarlas se utilizó el medio DMEM (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) enriquecido con glutamina (200mM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) y adicionado con antibióticos: penicilina (10 000 U) y estreptomycin (10mg/mL) (Sigma, St. Louis, USA) y suero bovino fetal al 10% (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA). Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora en un ambiente húmedo, (REVCO, México) a 37°C y al 5% de CO₂. Aunque los pases utilizados para ambas líneas celulares fueron diferentes tanto para MDA-MB-231 como para MCF-7 en las distintas etapas del desarrollo del proyecto, las células no presentaron cambios o alteraciones morfológicas o en las respuestas celulares a factores externos.

OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES

1) Confirmación del perfil de expresión de PAR

Todos los ensayos se realizaron a partir de cultivos celulares (MDA-MB-231 y MCF-7) establecidos a una densidad de 72, 000 células/cm² (para el conteo celular se utilizó la cámara de Neubauer; Hausser Scientific, USA) en MEM α suplementado al 5% con SBF e incubados por 24h para permitir su adhesión a placas de cultivo de seis pozos; después se ayunaron por 12-16 horas (para sincronizarlos en fase Go: MEM α suplementado con Insulina, Transferrina y Selenio al 1%). Con ayuda de un gendarme, se recuperaron las células y a los depósitos de células se les agregó buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH=7.8, NaCl 50 mM, Na₄P₂O₇ 40 mM, MgCl₂ 5 mM, Na₃VO₄ 10 μ M, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%, benzamidina 5mM), adicionado con inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina en concentración 1 μ M) y después de una

incubación de 20min a 4°C, se recuperaron los lisado celulares totales (centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a 4°C) empleados para la determinación de la expresión de los PAR por inmunoblot.

Para la inmunotransferencia del receptor PAR3 se trabajó además con un lisado celular comercial, que se empleó como control positivo para la expresión de PAR3: lisado de fibroblastos de ratón NIN-3T3 (Upstate).

2) Modulación de PAR

Para determinar la posible regulación de los Receptores PAR1 y PAR4 inducida por la trombina en el tiempo, se establecieron ensayos como los antes descritos, pero en este caso, una vez sincronizadas las células, estas fueron estimuladas con trombina 10 nM (Sigma, USA) durante 24 y 48 horas; como control negativo se emplearon células incubadas al inicio del experimento (tiempo cero) y a las 24 y 48 horas sin trombina. La obtención de lisados celulares se realizó mediante el procedimiento antes mencionado.

3) Contribución específica de las trombina a la estimulación de PAR1 y PAR4

Se realizaron ensayos celulares semejantes a los antes descritos, pero en este caso, la trombina (10 nM), se pre-incubó durante 30 minutos con hirudina 6nM (inhibidor específico de la trombina; Sigma, USA) antes de agregarlas a los cultivos celulares e incubar a los tiempos indicados (24 y 48 horas); se emplearon controles negativos como los antes mencionados. El método de recuperación de los lisados celulares fue el mismo

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se llevó a cabo mediante el método de Bradford (unión covalente del colorante azul de Coomassie G-250 a las proteínas), que permite evaluar la absorbancia de una coloración azul que es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en el lisado celular. Con el fin de poder cuantificar la cantidad de proteínas presentes en los lisados celulares totales, se realizó una curva estándar empleando una solución de albúmina sérica humana (1.4mg/ml, Sigma, St. Louis, USA: se trabajó con un intervalo de

concentraciones desde 0.125 μ g/ml hasta 1.40 μ g/ml en dobles diluciones); para la determinación se emplearon 5 μ l de cada dilución del estándar o de las muestras de lisado celular (diluido 1:2); se adicionaron 250 μ L del reactivo de Bradford, y después de una incubación de 10 minutos, se leyeron las absorbancias a 620 nm. Se trazó una curva estándar y en ésta se interpolaron las concentraciones de proteínas de los lisados celulares.

EXPRESIÓN DE LOS PAR

SDS-PAGE

Primeramente se llevó a cabo la separación de las proteínas presentes en los lisados celulares (10 μ g de proteína/lisado celular), mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12%. En cada uno de los geles realizados, se empleó un marcador de peso molecular (Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences), que nos permitió correlacionar el peso de las bandas obtenidas por inmunoblot, con el peso específico de los receptores PAR (PAR-1: 66kDa, PAR-2: 54 KDa, PAR-3: 43 KDa y PAR-4: 38 KDa); además se pudo verificar que la transferencia de los geles a las membranas de nitrocelulosa fuera exitosa.

Las electroforesis se realizaron en cámaras CB G-250 (BioRAD, México) a 100V durante aproximadamente dos horas. Para verificar que el porcentaje de degradación proteica en cada lisado no fuera significativo, algunos geles se tiñeron con el colorante azul de Coomasie (reacciona formando un complejo con las proteínas presentes dando así un color azul a cada una de las bandas de proteínas). En el resto de las muestras, se llevó a cabo la transferencia semi-seca (cámaras de BioRAD, México), de las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (12V durante una hora en presencia de buffer de transferencia: Tris, glicina 20mM, metanol).

INMUNOBLLOT

La identificación específica de las proteínas PAR se realizó mediante la técnica de inmunodetección indirecta; en este método se emplea un anticuerpo

primario específico que reconoce a la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, marcado con una enzima: peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) y dirigido contra la especie en la que se ha producido el primero; éste se emplea para reconocer los complejos antígeno-anticuerpo primario. La detección del anticuerpo secundario se logra gracias a la reacción de la enzima HRP, que actúa sobre el sustrato Lumigen TMA-6 y permite la detección de una señal quimioluminiscente, estable por aproximadamente una hora.

Antes de agregar el anticuerpo primario a las membranas de nitrocelulosa, se bloquearon los sitios de unión inespecífica, mediante la incubación de éstas (1h a temperatura ambiente y agitación orbital suave) con caseína al 2% preparada en buffer de Tris adicionado con Tween 20 al 0.05% (TBS-T). Posteriormente, las membranas se incubaron durante un periodo de 16h a 4°C en agitación oscilatoria suave en presencia del anticuerpo primario de acuerdo al caso:

- PAR-1: IgG1 monoclonal de ratón, Santa Cruz, dilución 1:10 000
- PAR-2: IgG2a monoclonal de ratón, Santa Cruz, dilución 1:10 000
- PAR-3: IgG policlonal de cabra, Santa Cruz, dilución 1:10 000
- PAR-4: IgG policlonal de cabra, Santa Cruz, dilución 1:10 000

Todas las diluciones se hicieron en caseína al 2%. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las membranas fueron lavadas en solución TBS-T y se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-mouse 1:20,000 (IgG-HRP; Santa Cruz) o anti-goat 1:20,000 (IgG (H+L), Zymed). Se incubó por una hora a temperatura ambiente, también en agitación oscilatoria suave. Después de retirar los anticuerpos, las membranas se lavaron en TBS-T y con agua destilada y desionizada y se agregaron los reactivos de detección ECL-Advance (Amersham Biosciences, USA); la reacción quimioluminiscente se detectó con la ayuda del equipo automatizado KODAK Image Station.

Aunada a la detección de los PAR, también se llevó a cabo la identificación de las MAP cinasas ERK1 y ERK2 como control de carga para cada blot. Así,

una vez identificados los receptores de trombina, se removió el complejo: anticuerpo primario-secundario y se re usaron las membranas para verificar que la carga total en cada muestra fuera la misma. Para remover los complejos se empleo calor y detergente; las membranas se incubaron (en una solución de 100mM β mercaptoetanol con SDS 2% y 62 mM Tris-HCl pH 6.7) por 30 minutos a 60°C, después se lavaron con solución TBS-T y se repitió el bloqueo de sitios inespecíficos y la incubación con el anticuerpo primario (Anti-MAP cinase 1/2, CT IgG péptido sintético, Upstate, dilución 1:10 000) y posteriormente con el anticuerpo secundario (anti-rabbit, Santa Cruz 1:8000). La detección de la señal quimioluminiscente se realizó tal como se describió previamente.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La detección de los receptores de trombina PAR1-4, también se llevó por el método de inmunofluorescencia indirecta; se emplearon los mismos anticuerpos empleados para el inmunoblot. Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 se crecieron en las mismas condiciones antes descritas (misma densidad celular y también sincronizadas en fase Go) pero ahora en cultivos establecidos en cubreobjetos (slide flask, NUNC, Denmark). Después del las 12-16 horas de ayuno éstas fueron incubadas sin tratamiento o bien en presencia de trombina (10nM) por 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, las células se fijaron (paraformaldehído al 4% en PBS) y se permeabilizaron (Tritón X-100 al 0.25 % preparado en PBS), para posteriormente bloquear los sitios de unión inespecífica (BSA al 6% preparada en PBS). A partir de este procedimiento todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Después de una hora de incubación, se añadió el anticuerpo primario disuelto en solución de BSA preparada al 6% en PBS y se incubó por 1 h. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células con solución PBS para agregarles entonces el anticuerpo secundario (incubado 1h) dirigido contra la especie en la que se produjo el primario (ratón o cabra) y conjugado con el fluoróforo: FITC (isotiocianato de fluoresceína, Upstate). Las células fueron entonces preparadas con el colorante DAPI disuelto en una solución estabilizadora de fluorescencia (anti-

fade reagent; Invitrogen, USA) y observadas bajo el microscopio de epifluorescencia. Como control positivo de la técnica, en cada línea celular se probó en paralelo a los ensayos, una tinción dirigida a tubulina (anticuerpo monoclonal dirigido contra del C-terminal de la isoforma α de la tubulina, Sigma, México).

ANALISIS ESTADISTICO

Se emplearán pruebas de T de Student de dos colas para determinar las diferencias entre la expresión de los receptores PAR en las líneas celulares; un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Control de calidad de proteínas presentes en los lisados celulares totales

Como se mencionó en la sección de métodos, para comprobar cualitativamente que el proceso de obtención de lisados celulares no produjo una degradación significativa en éstos, se verificó su integridad; se tiñeron los geles de poliacrilamida con el colorante de Coomassie. En todos los casos se observó la presencia de proteínas en varios pesos moleculares; no se observó degradación significativa, un ejemplo representativo se muestra en la Figura 1.

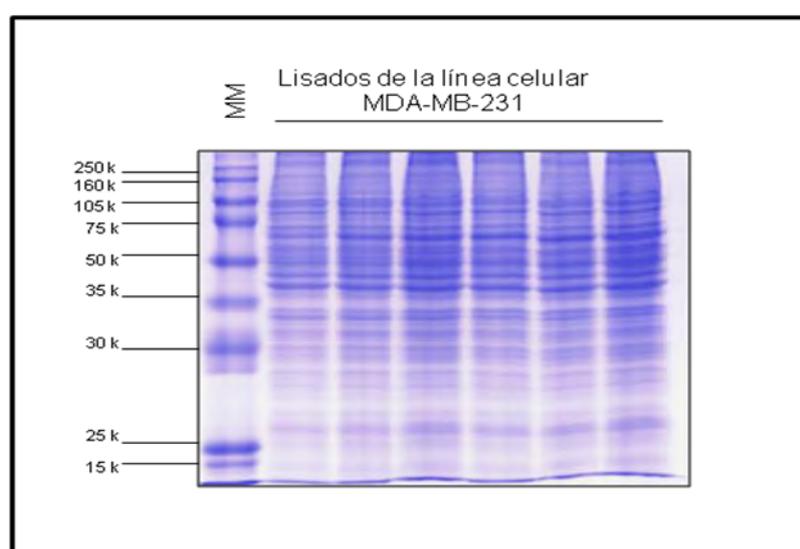


Figura 1. Tinción de Coomassie.

Ejemplo de proteínas presentes en lisados celulares y separadas por electroforesis desnaturizante.

MM: marcador de peso molecular.

En relación a la cuantificación de proteínas presentes en los lisados celulares totales, se realizaron curvas estándar como la que se muestra a continuación (Figura 2); en general se obtuvieron entre 1-2 μ g/ μ L de proteína por lisado celular. En todos los casos, se ajustó la concentración de proteínas para trabajar con 10 μ g de proteína total por muestra.

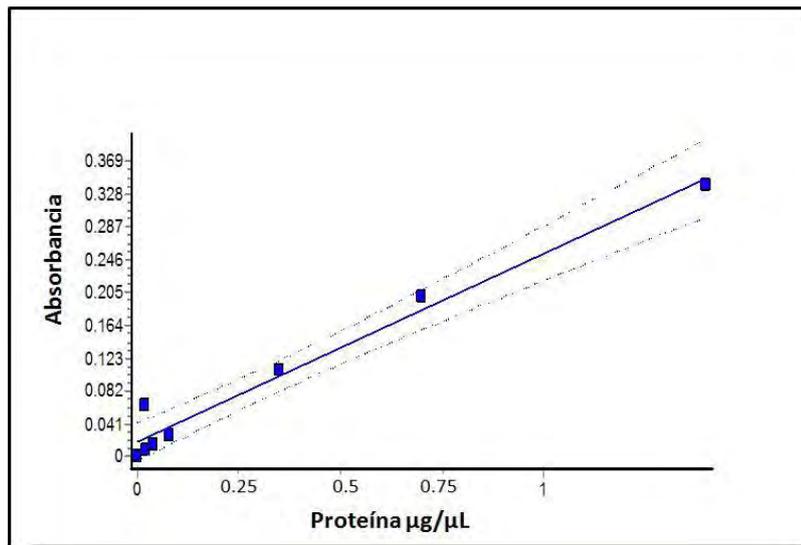


Figura 2. Curva estándar de la cuantificación de proteínas (método de Bradford).

Se observó un coeficiente de correlación $R= 0.97$ ($m= 0.2356$, $b=0.01810$). La línea discontinua muestra el intervalo de 95% de confianza.

Perfil de expresión basal de PAR1-4

Con el fin de evaluar la expresión de cada uno de los cuatro miembros de la familia de PAR (PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4) en las dos líneas celulares de cáncer de mama con diferente potencial invasivo (MDA-MB-231 y MCF-7 alto y bajo potencial invasivo in vitro, respectivamente; Kamath L, et al 2001), se realizaron ensayos de inmunoblot e inmunofluorescencia indirecta, en cultivos celulares sincronizados en fase Go.

Se confirmó la presencia de los cuatro receptores PAR en cada una de las líneas celulares de cáncer de mama probadas; sin embargo, los niveles de expresión fueron diferentes en cada caso (Figura 3a). En la línea celular MDA-MB-231 se observó una mayor expresión de los receptores PAR1 y PAR3 (1657 ± 1262 unidades de intensidad relativas (UIR) y 670 ± 529 UIR respectivamente). Cabe hacer notar que la expresión de PAR1 es 2.4 veces mayor que la de PAR3 en esta línea celular de cáncer de mama altamente invasiva. En contraste la expresión basal de PAR2 y PAR4 en esta línea se encontró en menor proporción (141 ± 190 UIR y 119 ± 67 UIR, respectivamente) lo que representa una expresión de PAR1 11.75 veces mayor que PAR2 y 13.9 veces mayor que PAR4 (Figura 3b).

En el caso de la línea celular MCF-7 se observó una mayor expresión basal del receptor PAR2 (4211 ± 3222 UIR; único receptor no activado por la trombina). Por otra parte, la expresión del resto de los receptores fue muy similar entre sí observando que PAR1 se expresó en 768 ± 763 UIR, mientras que para PAR3 y PAR4 se observó una expresión de 664 ± 28 UIR y 283 ± 336 UIR respectivamente. Esto implica una expresión de PAR2 aproximadamente 5 veces mayor al resto de los receptores PAR en esta línea celular (Figura 3b).

Además, es importante hacer notar que para el receptor PAR1 se observó una expresión 2.1 veces mayor en la línea celular altamente invasiva en comparación con la de bajo potencial invasivo mientras que la expresión de los receptores PAR3 y PAR4 es muy semejante entre ambas líneas celulares. En el caso particular del receptor PAR3, no reportado en líneas celulares humanas por este método de inmunoblot, se realizaron los ensayos de Western blot empleando en paralelo un control positivo (lisado de fibroblastos NIH-3T3); en éste se observó una expresión del receptor PAR3 de 1731 ± 1382 UIR lo que representó una expresión 2.5 veces mayor que la observada en la línea celular MDA-MB-231 y 2.6 veces mayor para MCF-7 (no se muestra en la gráfica); ver figura 3a.

En cuanto a la distribución de los receptores PAR1 y PAR4 que se expresan en forma basal en ambas líneas celulares, después del análisis realizado por inmunofluorescencia indirecta, se observó que PAR1 se expresa en forma de intensos acúmulos en el citoplasma de las células MDA-MB-231; en la línea celular de bajo potencial invasivo: MCF-7, se observa los mismos acúmulos de expresión citoplasmática con mayor tendencia a distribuirse cerca de la membrana celular. En contraste la expresión de PAR4, se observa en menor intensidad y está polarizada hacia un extremo del citoplasma en ambas líneas celulares (Figura 3c).

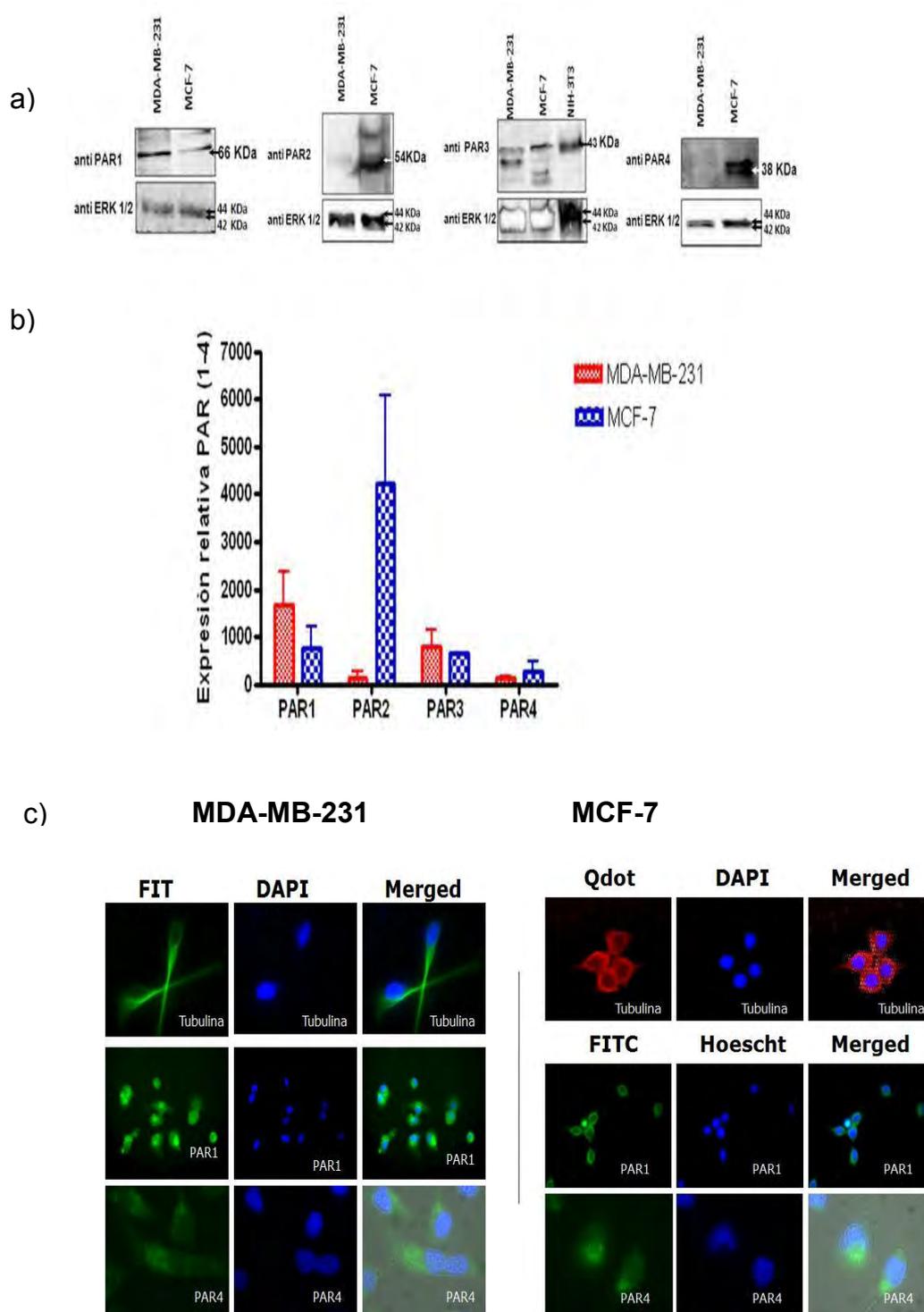


Figura 3. Perfil de expresión basal de los receptores PAR en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. a) Ejemplo representativo de la expresión de PAR1-4 (inmunoblot); b) Expresión relativa de los PAR; se grafica la media de la expresión del receptor (unidades relativas de intensidad) \pm error estándar de la media. c) Ejemplo representativo de la expresión de PAR1 y 4 (Inmunofluorescencia indirecta).

Regulación de PAR1 en el tiempo inducida por trombina

A fin de observar la posible regulación a la que podrían ser sometidos los dos miembros de la familia de los PAR en estudio: PAR1 y PAR4, se realizaron ensayos de estimulación con trombina (dosis previamente estandarizada como óptima para inducción de proliferación celular: 10 nM) a diferentes tiempos y se detectó su expresión por el método de inmunoblot.

Para el caso de la expresión del receptor PAR1 en la línea celular MDA-MB-231, no se encontró ninguna diferencia significativa en su expresión, en relación con la aplicación de trombina al cultivo celular; sin embargo, se observó una reducción independiente de la adición de trombina, en la expresión del receptor PAR1 a las 48h del cultivo, (Figura 4). La expresión de PAR1 a las 24h sin trombina (1.2 ± 0.79 UIR) se disminuyó en solo 0.03% al adicionar trombina al cultivo celular (1.03 ± 0.55 UIR) (ver Figura 4b). Por otra parte, en el cultivo celular que se incubó por 48h con o sin estímulo de trombina, la expresión del receptor PAR1, fue de 0.86 ± 0.9 UIR y 0.7 ± 0.34 UIR (respectivamente; Figura 4b); al comparar los resultados obtenidos mediante la prueba estadística de T-de Student, no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.8203$).

La expresión de PAR1, en la línea celular MCF-7, se moduló positivamente a las 48 h en forma dependiente de la trombina (Figura 5). En este caso, se encontró una expresión relativa de PAR1 a las 24h con y sin estímulo de trombina (10nM) de 1.03 ± 0.55 UIR y 1.2 ± 0.79 UIR respectivamente. En contraste a las 48 horas, se observó una expresión de PAR1 con o sin el estímulo de trombina de 10.9 ± 7.8 UIR y 3.81 ± 1.8 UIR respectivamente; la expresión de PAR1 fue 10 veces mayor que la expresión basal, después de 48 h de exposición del cultivo a trombina (Figura 5b). A pesar de haber observado dicho aumento a las 48h, al realizar el análisis estadístico, no se encontró una diferencia significativa entre los diferentes tiempos de incubación y bajo los dos tratamientos (con/sin trombina), $P = 0.1011$.

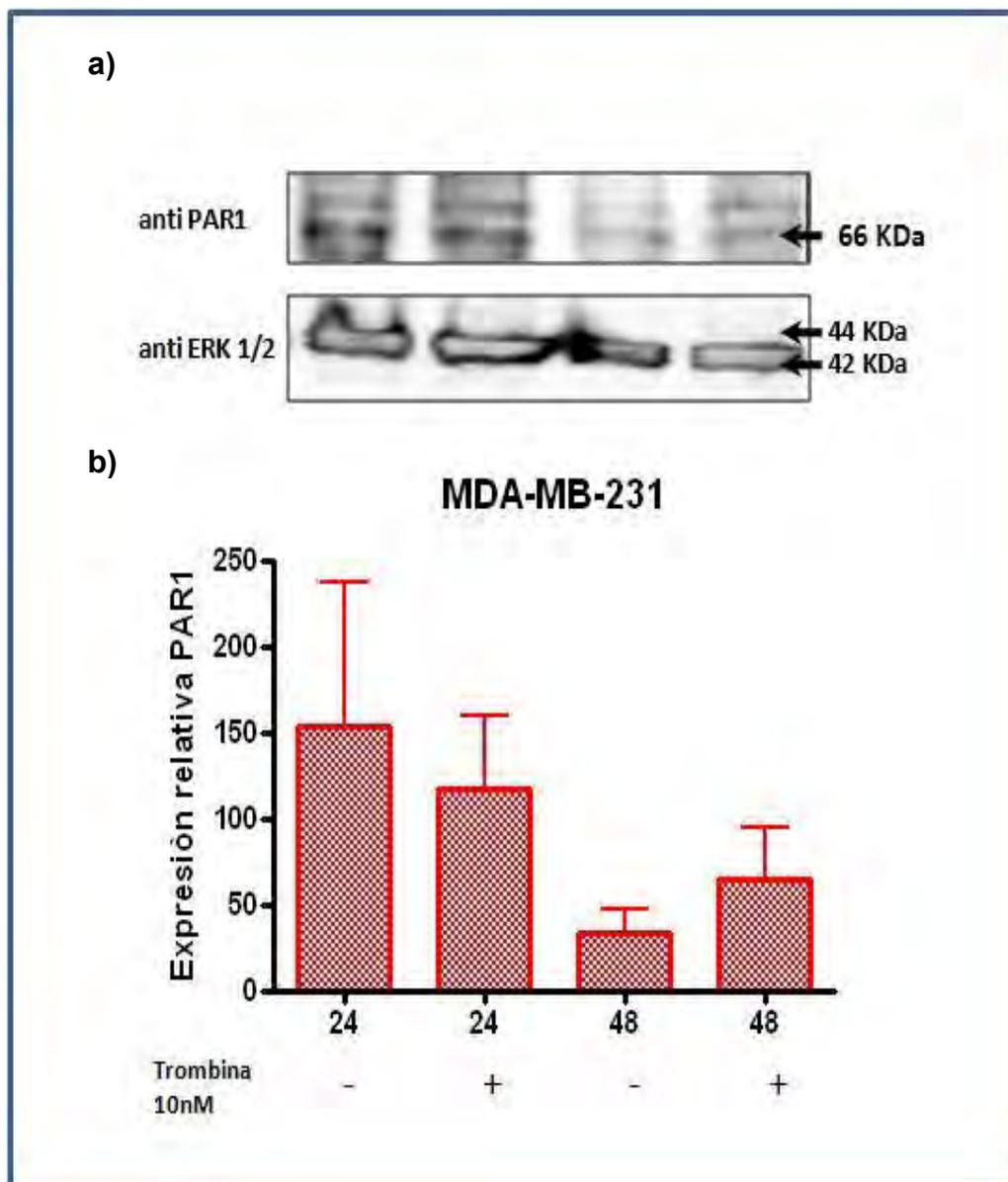


Figura 4. Expresión de PAR1 en la línea celular MDA-MB-231 en el tiempo. a) Inmunoblot representativo de la expresión del receptor PAR1 a las 24 y 48 horas con y sin estímulo de trombina con su correspondiente control de carga (ERK 1/2). b) Expresión relativa de PAR1; se grafica la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes.

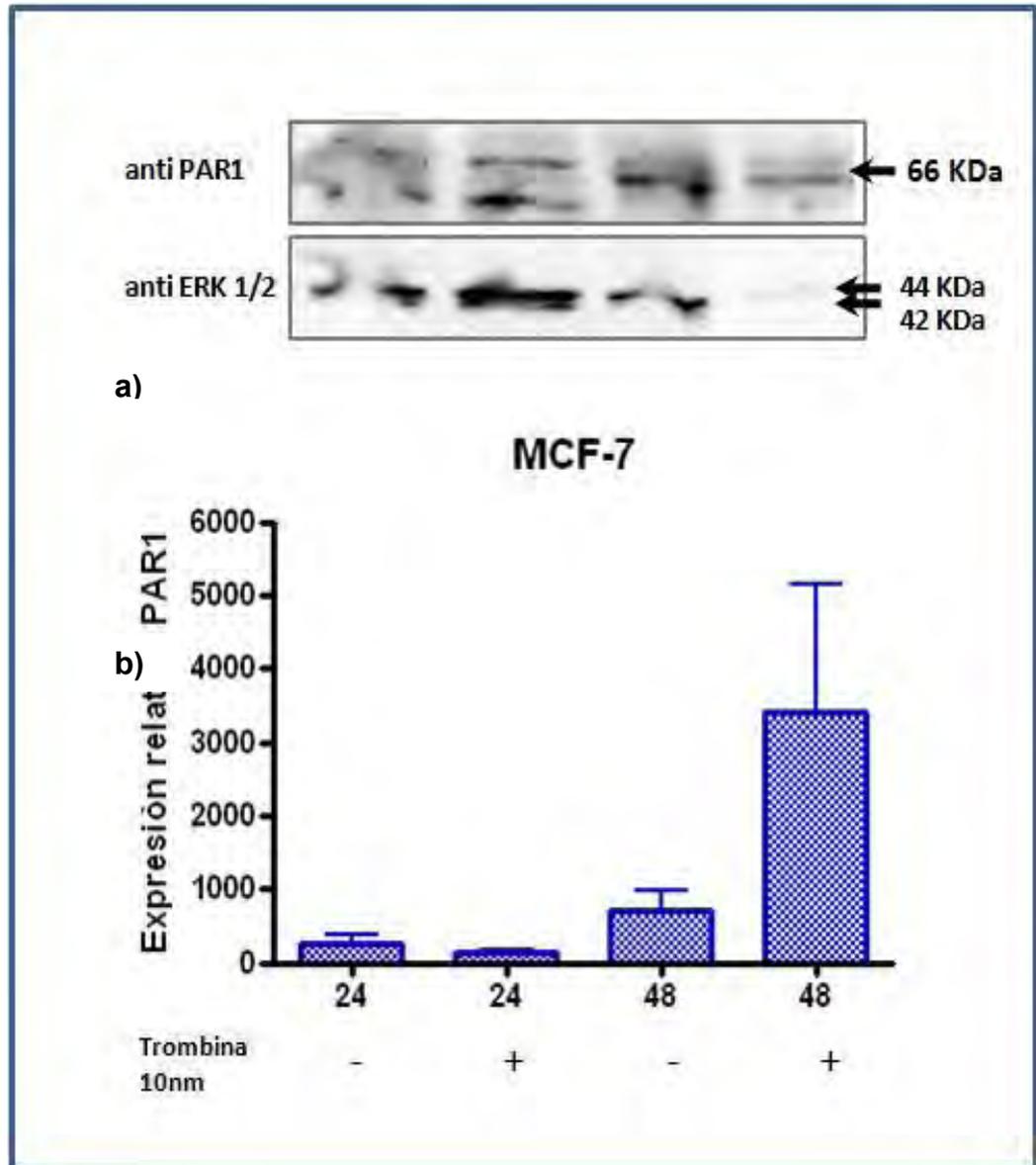


Figura 5. Modulación positiva de la expresión del receptor PAR1 en la línea celular MCF-7, después de 48h de exposición a trombina (10nM). a) Expresión de PAR1 a las 24 y 48 horas con y sin estímulo de trombina con su correspondiente control de carga (ERK 1/2). b) Expresión relativa de PAR1; se grafica media \pm error estándar de la media.

Contribución específica de trombina en la expresión de PAR1

Una vez determinada una modulación positiva de la expresión de PAR1 inducida por la trombina en la línea celular de bajo potencial invasivo: MCF-7, procedimos a determinar si este efecto de estimulación positiva podía atribuirse específicamente a la trombina. Para conocer la contribución específica de la trombina en la modulación de este receptor se determinó la expresión de PAR1 pero ahora en presencia de un inhibidor específico de la trombina: hirudina (dosis previamente estandarizada para proliferación celular: 6 nM). En este caso, solo se realizaron dos ensayos independientes, por lo que no se realizó análisis estadístico, únicamente se ejemplifica la tendencia.

Aunque de antemano sabíamos que el incremento en la expresión del receptor PAR1 en la línea celular MDA-MB-231 era independiente de la trombina, se realizó en forma pre-eliminar el experimento en presencia de hirudina. No se observó una reducción importante de la expresión de PAR1 al agregar la trombina pre-incubada con la hirudina (Figura 6); en éste caso se observó un aumento 1.4 veces mayor, en la expresión relativa de PAR1 a las 48 h de cultivo; estos resultados indican una acción sinérgica de la hirudina con la trombina.

En la línea celular MCF-7, se corroboró la modulación positiva del receptor PAR1 (43070 UIR) después de someter al cultivo a 48h de exposición a trombina (10 nM), el aumento en la expresión de este receptor fue notablemente significativo, al ser 22 veces mayor con respecto al control; cabe destacar que dicho aumento se vio disminuido casi en un 99.9% al agregar la trombina pre-incubada con hirudina (18 UIR); indicando la dependencia del receptor a la trombina en esta línea celular (Figura 7).

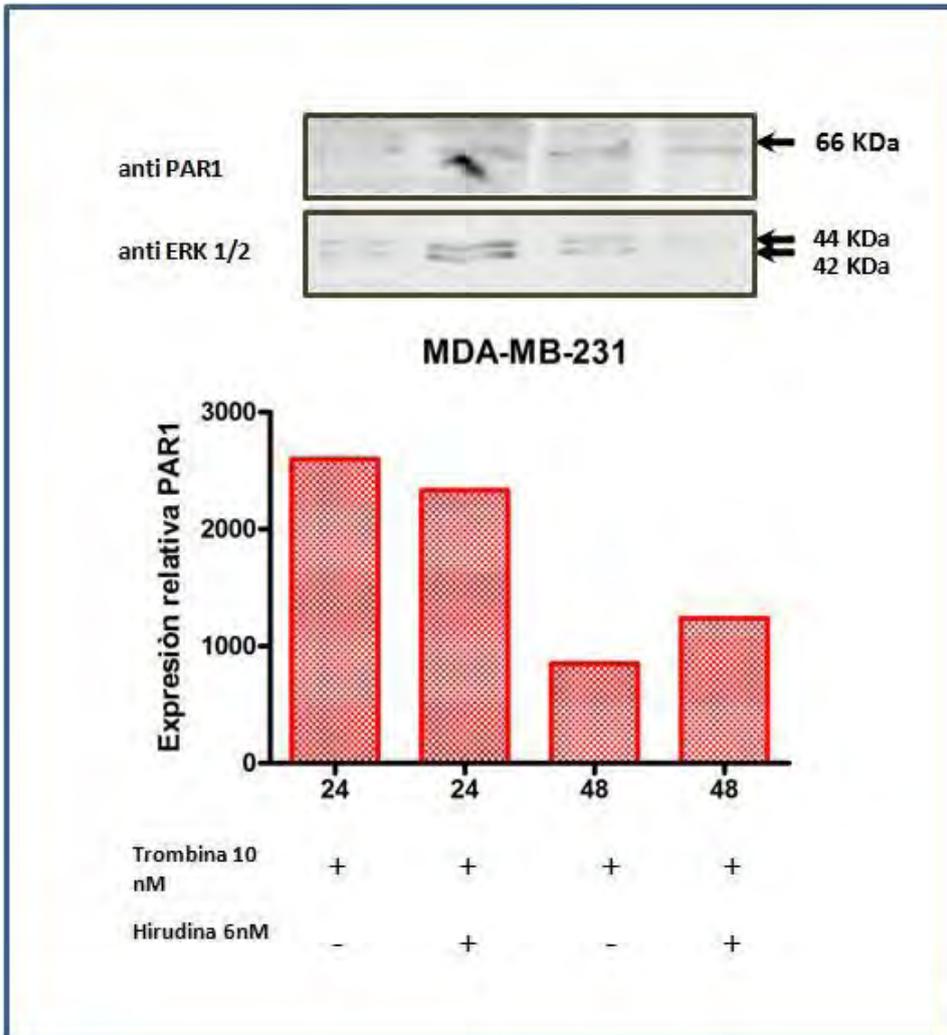


Figura 6. Expresión de PAR1 independiente de la trombina, en la línea celular MDA-MB-231. a) Inmunoblot representativo de la expresión de PAR1 b) Gráfica de la expresión relativa de PAR1 a las 24 y 48 horas.

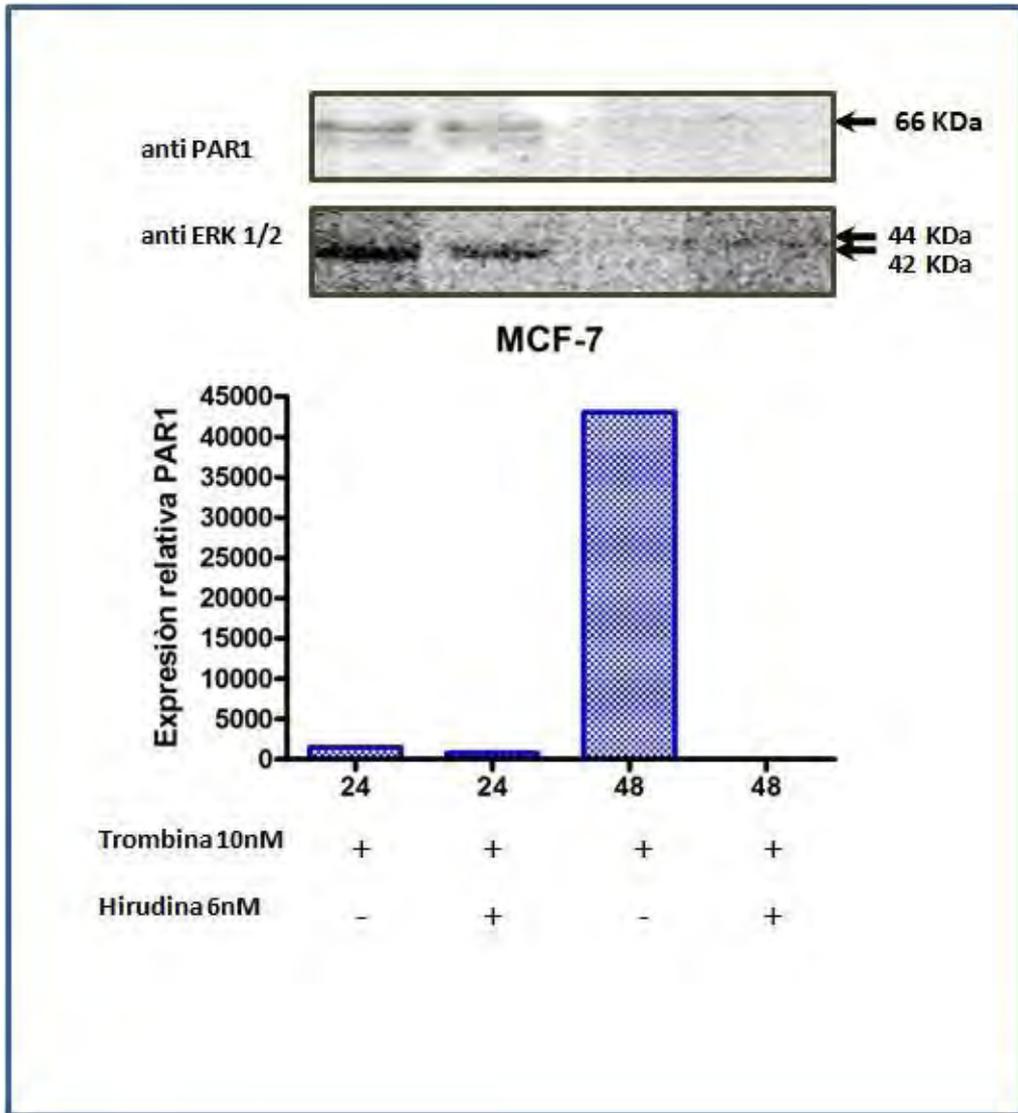


Figura 7. Contribución específica de la trombina a la modulación positiva de la expresión del receptor PAR1 en la línea celular MCF-7. b) inmunoblot representativo de la expresión de PAR1 b) Expresión relativa de PAR1.

Regulación de PAR4 en el tiempo inducida por trombina

Una vez analizada la modulación de PAR1, se prosiguió a observar el comportamiento del otro receptor activado por trombina: PAR4. En esta sección se realizaron también dos ensayos independientes por lo que se muestran únicamente tendencias.

Para el caso de línea celular MDA-MB-231 se observó una disminución (5.5 veces) en la expresión relativa de PAR4 después de un lapso de 24 horas de incubación del cultivo celular en presencia de trombina (10nM; Figura 8). Transcurridas las 48 horas del cultivo celular en presencia de trombina, no se observó cambio significativo en la expresión de este receptor; estos resultados indicaron una regulación de PAR4 independiente de trombina a las 48 h, semejante a la expresión del receptor PAR1 observada en la misma línea.

En contraste para la línea MCF-7, se observó un incremento (3.4 veces) en la expresión del receptor PAR4, después de 24 horas de exposición del cultivo celular a trombina (10nM); a las 48 horas se observa una disminución de la expresión de PAR en forma independiente de trombina (Figura 9). Esto representó un comportamiento contrario al observado para el receptor PAR1 en esta misma línea celular, dónde su expresión aumenta hasta las 48 horas.

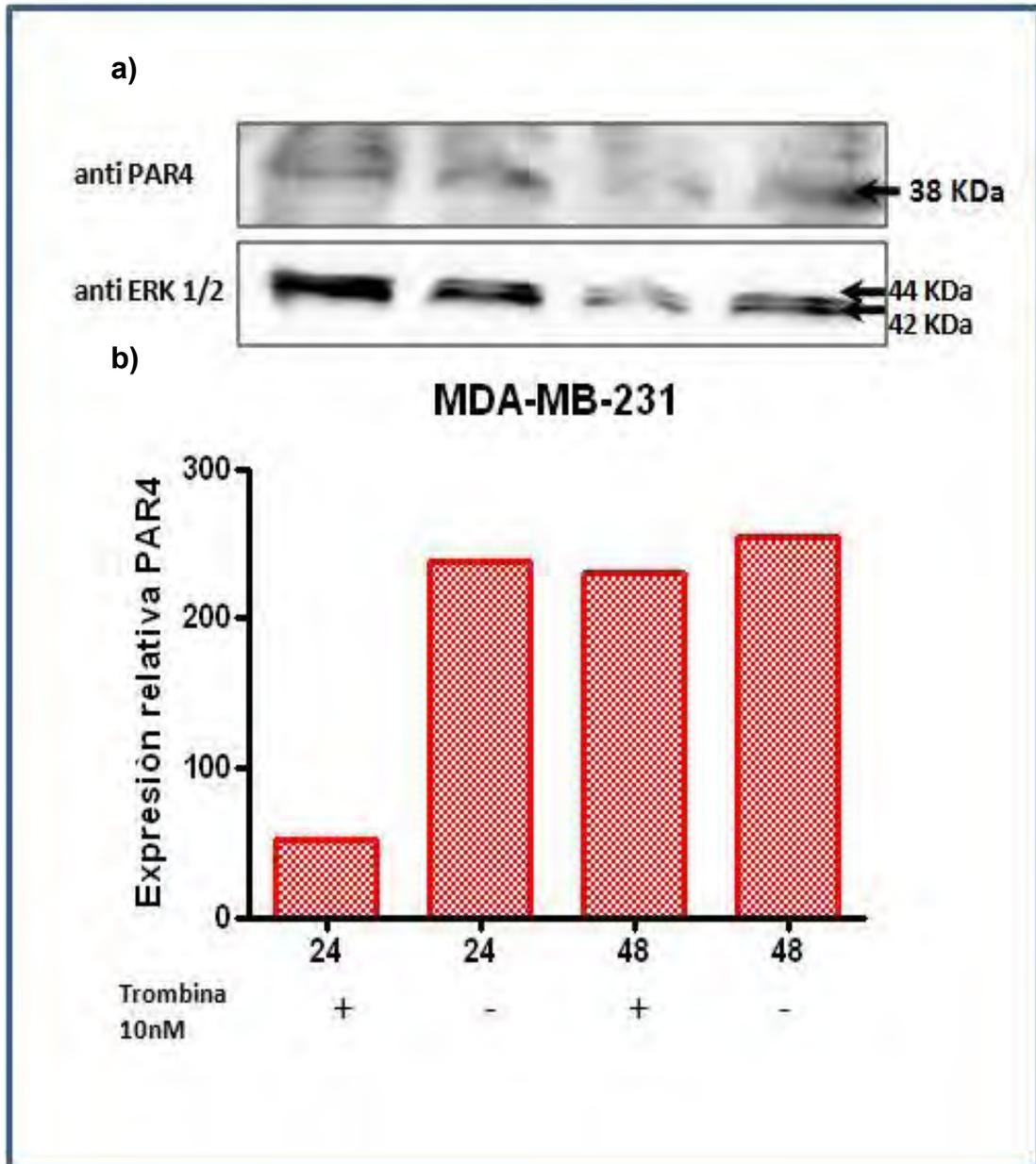


Figura 8. Regulación de PAR4 por trombina en el tiempo en la línea celular MDA-MB-231. a) Ejemplo representativo de la expresión de PAR4 a las 24 y 48 horas con y sin el estímulo de trombina (Inmunoblot) con su respectivo control de carga (ERK1/2), b) Expresión relativa de PAR4 (UIR).

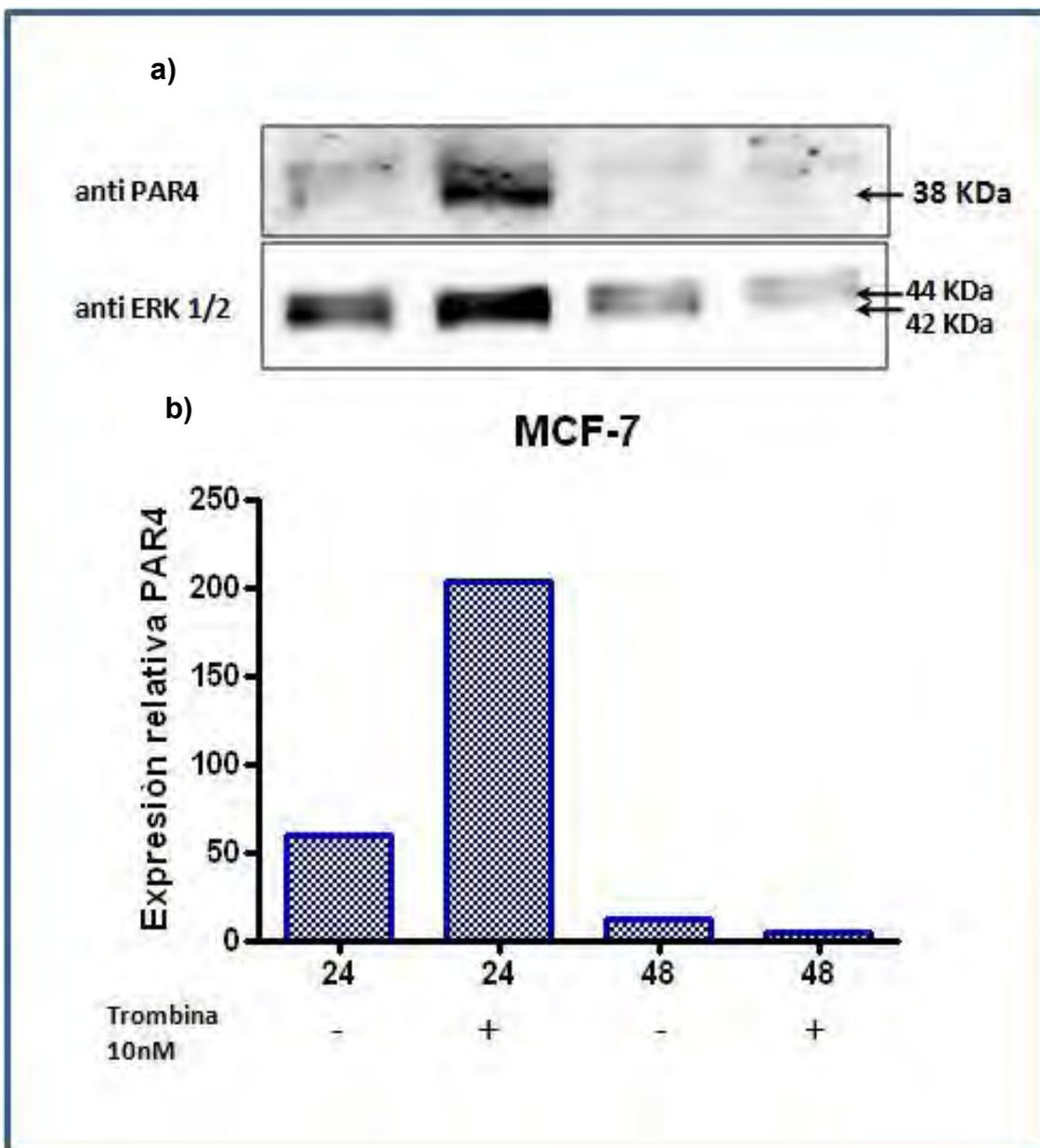


Figura 9. Regulación positiva de la expresión de PAR4, inducida por trombina a las 24 horas en la línea celular MCF-7. a) Ejemplo representativo de la expresión relativa de PAR4 a las 24 y 48 horas con y sin estímulo de trombina (Inmunoblot) con sus respectivos controles de carga (ERK 1/2), b) Expresión relativa de PAR4 se grafican unidades relativas de intensidad (UIR).

Contribución específica de la trombina en la expresión de PAR4

Para determinar la contribución específica de la trombina en la modulación de la expresión de PAR4 (negativa y positiva obtenida en la línea MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente), observada después de 24 horas del estímulo del cultivo celular con trombina (10nM), se empleó al inhibidor específico de la trombina: la hirudina (6 nM). Nuevamente solo se muestra la tendencia de los resultados.

En la línea celular MDA-MB-231, al agregar el estímulo de la trombina pre-incubada con la hirudina, se observó un aumento en la expresión de PAR4 de 3.7 veces (Figura 10). Es decir, que al igual que en el caso del receptor PAR1 se observa una acción sinérgica del inhibidor hirudina con la trombina. No se observó ningún cambio significativo a las 48h del cultivo.

En el caso de la línea MCF-7 se corroboró la modulación positiva de la expresión de PAR4 después de 24h de exposición del cultivo celular a trombina (10nM); este incremento en la expresión de PAR4, se inhibió hasta en un 50% cuando la trombina se pre-incubó en presencia de su inhibidor: hirudina (6 nM; Figura 11). Estos resultados confirmaron que la modulación de la expresión del receptor PAR4 en la línea celular MCF-7 si es dependiente de trombina.

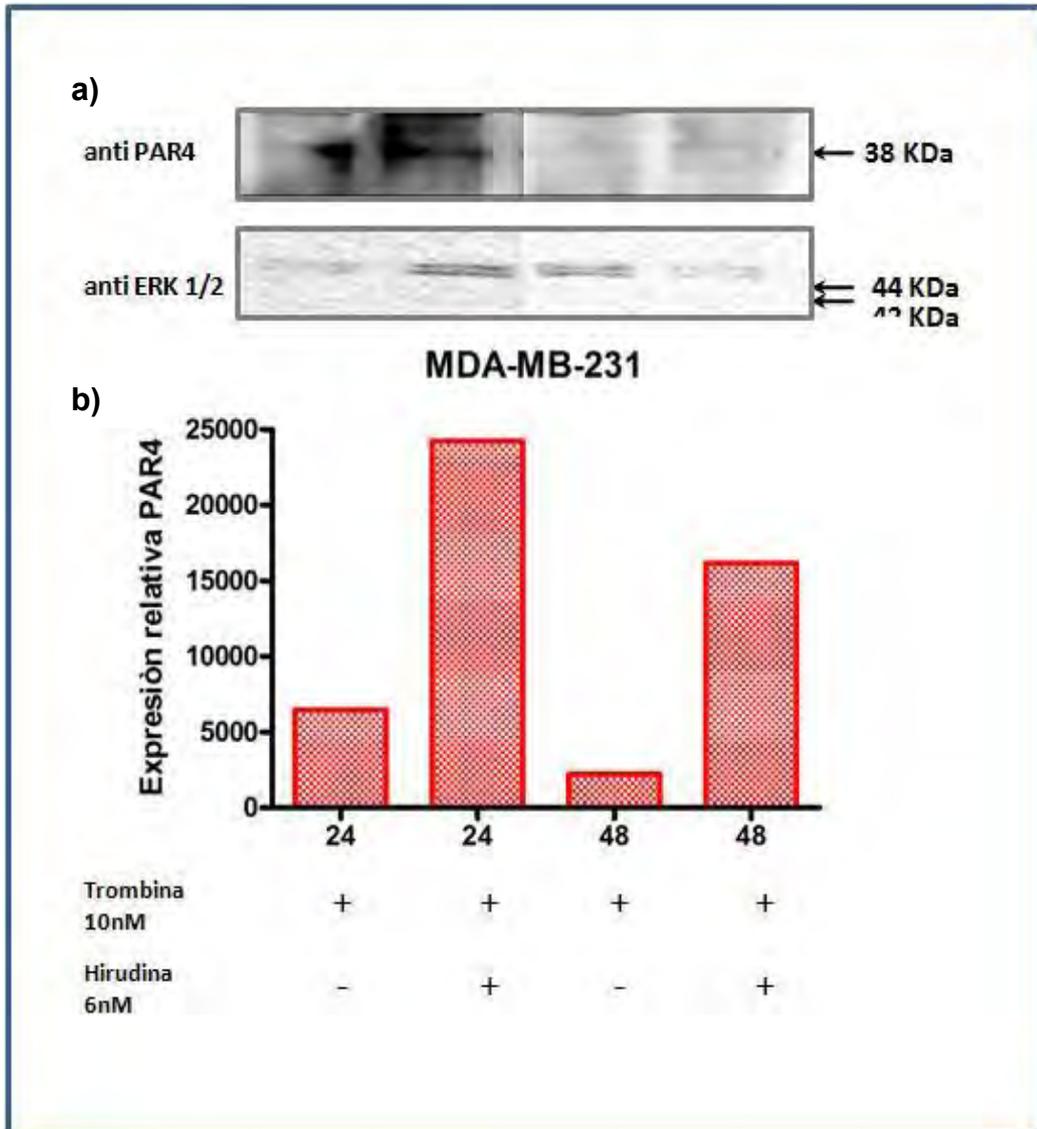


Figura 10. Expresión del receptor PAR4 en la línea celular MDA-MB-231 a) Expresión de PAR4 con sus respectivos controles de carga (ERK 1/2), b) Expresión relativa de PAR4, se grafican UIR.

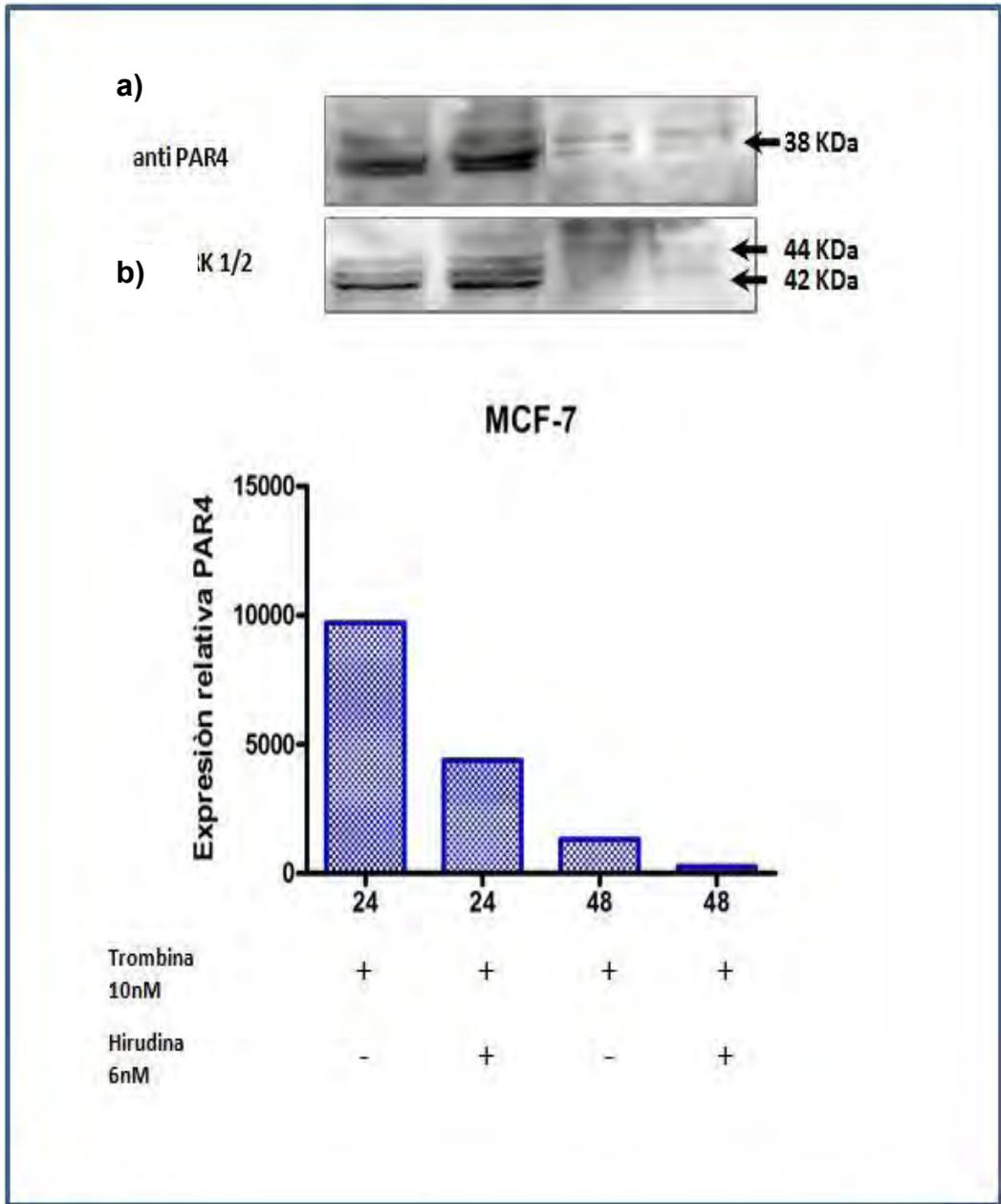


Figura 11. Contribución específica de la trombina en la modulación positiva de la expresión del receptor PAR4 en la línea celular MCF-7. a) Expresión de PAR4 a las 24 y 48h con sus respectivos controles de carga (ERK 1/2), b) Expresión relativa de PAR4, se grafican UIR.

DISCUSION

Con el desarrollo de la presente tesis se demostró un perfil de expresión diferencial de los cuatro receptores PAR en dos líneas celulares de cáncer de mama con alto y bajo potencial invasivo (Figura 3); en la línea celular MDA-MB-231, se observó una sobre expresión de PAR1 (Figura 4 y 6), aparentemente independiente de la trombina y del tiempo; así como también una independencia de PAR4 (Figura 8). En la línea celular MCF-7, se demostró una modulación positiva de los receptores PAR1 y PAR4 inducida por la trombina (Figuras 5 y 7; Figuras 9 y 11 respectivamente).

Una de las diferencias más significativas, fue la mayor expresión de PAR1 observada en la línea celular con alto potencial invasivo: MDA-MB-231; esta sobre expresión fue independiente de la exposición del cultivo celular a trombina y no fue inhibida significativamente por la hirudina (inhibidor específico de la trombina; Figuras 4 y 6). Estos resultados sugieren una desregulación de dicho receptor en la línea celular altamente invasiva y concuerdan con datos reportados previamente en los que específicamente, se demostró para esta línea celular de cáncer de mama, una asociación positiva entre la sobre-expresión de PAR1 y su capacidad invasiva (Kamath L, 2001; Even-Ram, 1998, 2001; Nierodzik ML, 1998). Esta aparente desregulación del receptor PAR1 en la línea celular MDA-MB-231, también se confirmó en el patrón de distribución de PAR1 observado por inmunofluorescencia, ya que la presencia del receptor en forma de acúmulos muy intensos en el citoplasma, implica su sobre expresión y su estado de activación (Arora P, et al 2008).

Respecto a la expresión del mismo receptor PAR1 en la línea celular con bajo potencial invasivo: MCF-7, destaca el hecho de que después de 48 h de exposición del cultivo celular a trombina (10 nM), si se observó una modulación positiva del receptor; misma que fue inhibida significativamente por hirudina (Figuras 5 y 7). Estos resultados que demuestran la modulación diferencial de PAR1 en relación al grado de invasividad en las líneas celulares de cáncer de mama, nos permiten sugerir la urgencia de estudiar el estado de activación del

receptor y no solo la expresión total del mismo; sin embargo, los anticuerpos de PAR1 fosforilado en forma comercial, no están disponibles todavía.

En relación a los posibles mecanismos de activación e internalización del receptor PAR1, cabe mencionar que la sobre expresión de PAR1 en MDA-MB-231, demostrada en forma independiente de trombina y del tiempo, pudiera atribuirse a una señalización que permitiera la expresión constitutiva del receptor, lo que contribuiría en parte al proceso de invasión de las células del carcinoma de mama (Booden, 2004). Esto pudiera ser resultado de tres mecanismos celulares: el primero una internalización lenta del PAR1 activado; lo que permitiría una señalización continua desde la superficie celular; otro mecanismo apunta al reciclamiento del receptor activado, el cual es reciclado rápidamente a la superficie celular y por último a la falta de degradación lisosomal de los receptores activados; lo que permitiría la señalización continua aún estando dentro de algún compartimento endosomal (Booden, 2004).

Esta aparente desregulación del receptor PAR1 observada en la línea celular altamente invasiva, no se observó en la línea celular MCF-7 con bajo potencial invasivo; en esta línea celular, nuestros datos sugieren que todavía existe una dependencia del receptor PAR1 al estímulo de la trombina, lo que indicaría que este sistema se encuentra regulado. Estos hallazgos sugieren que la expresión de PAR1 y su modulación son esenciales en procesos asociados a la progresión tumoral del cáncer de mama como la invasividad *in vitro*.

Por otra parte, en relación a la expresión y modulación del PAR4 en ambas líneas celulares, cabe mencionar que en este caso, también se observó una modulación diferencial de dicho receptor para las dos líneas celulares.

En la línea celular altamente invasiva MDA-MB-231, se observó una modulación negativa de la expresión del PAR4, después de 24 horas de exposición del cultivo celular a trombina (10nM; Figura 8). En este caso no logró determinarse, en forma concluyente, la contribución específica de la trombina a la modulación de PAR4 observada; el efecto sinérgico demostrado

entre la trombina y la hirudina observado en solo un par de experimentos independientes no fue concluyente (Figura 10). Por lo que se sugiere para trabajos futuros: una estandarización previa de la concentración de hirudina o bien realizar los estudios con un inhibidor diferente, por ejemplo la AT. Cabe destacar que este efecto sinérgico entre la hirudina y la trombina está ampliamente documentado (Hernández Rodríguez NA et al 1995).

A pesar de que no se conocen los mecanismos de internalización y regulación del PAR4, si éste comparte similitudes con el receptor PAR1, prototipo de la familia; podría pensarse que la comunicación entre estos receptores (si es que la hay), también se encuentra desregulada y que al estar uno de ellos constantemente activado en la membrana celular (PAR1), el otro (PAR4) en consecuencia, también estaría modulado en forma diferente a consecuencia no únicamente del estímulo externo de trombina, sino también como resultado de la actividad del otro receptor, potencializando de esta forma su actividad y promoviendo entonces la actividad biológica asociada a progresión tumoral (Arora, 2008).

En el caso de la línea celular con bajo potencial invasivo, la MCF-7, se observó una modulación positiva del receptor PAR4 a las 24 horas de exposición del cultivo celular a trombina (10 nM; Figura 9); este efecto de modulación positiva del PAR4, se vio notablemente disminuido bajo la acción de la hirudina, indicando una dependencia a la presencia de la proteasa de serina (Figura 11). Al respecto cabe mencionar que recientemente se ha sugerido que PAR4 pudiera funcionar como un regulador negativo de PAR1 (Arora P, 2007) y los resultados obtenidos en este estudio apoyan esta hipótesis para el caso de estas líneas celulares ya que la expresión observada para PAR1 y PAR4 es contraria entre sí, es decir, que mientras PAR4 se expresa, PAR1 pareciera no mostrar un aumento en su expresión y que cuando el receptor PAR4 empieza a disminuir su expresión es entonces que PAR1 aumenta (Figura 4 y 8).

Otro hallazgo importante en esta tesis fue la presencia de PAR3, otro receptor activado por trombina. Si bien no se encontraron diferencias

significativas en las expresiones basales de este receptor entre ambas líneas celulares, y no fue motivo de estudio en cuanto a su modulación, sería interesante analizar también su activación y regulación para tratar dilucidar las interacciones entre los receptores PAR y la importancia de cada uno o en conjunto en el desarrollo de las metástasis.

Por otra parte, es probable que el receptor PAR2 también sea un importante intermediario de este sistema, ya que como se observó, se encontró una expresión significativamente mayor en la línea celular con bajo potencial invasivo, MCF-7, en comparación con la observada en la línea con alto potencial invasivo (MDA-MB-231) y también sería interesante analizar la contribución de este receptor en la actividad biológica asociada a progresión tumoral. En este caso aunque PAR2 no es activado directamente por la trombina y no se estudio en la presente tesis, cabe mencionar que podría ser susceptible de activación por cualquiera de los otros miembros de la familia de receptores PAR mediante mecanismos de interacción cruzada entre receptores (Arora et al 2008)

Si bien es cierto que aún falta conocer a mejor detalle el mecanismo de señalización de estos receptores PAR, con el desarrollo de este trabajo de investigación, se pudo confirmar que la modulación de estos receptores es de suma importancia, en el proceso de actividad biológica asociada a progresión tumoral (invasividad); el estudio de las interrelaciones entre los miembros de esta familia de receptores, debe llevarse acabo además in vivo para estudiar su potencial como biomarcador lo que permitiría mejorar la clasificación de pacientes con cáncer de mama y alto riesgo a desarrollar metástasis.

CONCLUSIONES

- Se demostró una expresión diferencial de los PAR1-4 en dos líneas celulares de cáncer de mama con alto y bajo potencial invasivo.
- Los receptores PAR1 y PAR4 se modulan en forma diferente en las dos líneas celulares probadas.
- En la línea celular altamente invasiva, se observó una sobre expresión de PAR1, independiente de la trombina; la expresión de PAR4, en cambio, se moduló positivamente después de 24h de cultivo en presencia de trombina.
- En la línea celular de bajo potencial invasivo, se observó una modulación positiva de la expresión de PAR1 y PAR4 (atribuible a trombina), después de 24 h de exposición a dicha proteasa de serina.

ANEXO: TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADP	Adenosin di fosfato
APC	Proteïna C activada
AT	Anti-trombina
BCRA-1	Breast cancer 1
BCRA-2	Breast cancer 2
BSA	Bovine serum albúmina
CD1	Ciclina 1
COX-1	Ciclooxigenasa-1
Co-HII	Cofactor de heparina II
CTK	Citoqueratina
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracelular Regulated Kinases
FITC	Isotiocianato de fluorescenina
GATA4	Factor de transcripci3n GATA4
GPCR	Receptor acoplado a proteïnas G
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HK	Quinin3geno de alto peso molecular
HRP	Peroxidada de r3bano
II	Protrombina
IX	Compuesto de la tromboplastina plasm3tica
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MMP-1	Metaloproteasa de matriz 1
PAI-1	Inhibidor del activador de plasmin3geno

PAR	Protease Activated Receptor
PBS	Buffer de fosfatos
PC1	Inhibidor de la proteina C
PgR	Receptor de progesterona
PI3K	Fosfatidil inositol tri-fosfato
PK	Precalicleina
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PN1	Nexina de proteasa
RE	Receptor de estrógenos
REα	Receptor de estrógenos alfa
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- poliacrylamide gel electrophoresis
TAFI	Thrombin activable fibrynolisis inhibitor
TF	Factor tisular
TK	Tirocina cinasa
TM	Trombomodulina
TXA2	Tromboxano A2
UIR	Unidades de intensidad relativa
V	Proacelerina
VII	Proconvertina
VIII	Factor A antihemofílico
vW	Factor von Willebrand
X	Factor Stuart-Prower
XI	Antecedente de la tromboplastina plasmática
XII	Factor Hageman

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alberts B; Johnson A; Lewis J; et al (2000). Molecular Biology of the cell New York and London. Garland Science.

Arora P; Ricks TK; Trejo J; et al (2007). Protease-activated receptor signaling, endocytic, sorting and dysregulation in cancer. Journal of Cell Science; 120: 921-928.

Arora P; Cuevas BD; Russo A; et al (2008). Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. Oncogene; 27: 4434- 4445

Ashton RW and Sheraga HA (1995) Preparation and characterization of anhidro-thrombin. Biochemistry; 34: 6454- 6463

Bangham J (2005). Moving to PARts Nature Review Cancer; 5:247.

Bar-Shavit R; Benezra M; Sabbah V; Bode W; Vlodaysky I (1992). Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology; 6(2): 123-130.

Boire A; Covic L; Agarwal A; et al (2005). PAR1 is MMP-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells Cell 120: 303-313.

Booden MA; Eckert LB; Der CJ; et al (2004). Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. Molecular Cell Biology; 24(5): 1990-1999.

Cailleau R; Young R; Olivé M, Reeves WJ Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. Journal of National Cancer Institute; 53(3): 661-674.

Cines DB; Pollak ES; Buck CA, et al (1998). Endotelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood*; 91: 3527-61.

Coughlin, SR (2001). Thrombin Signaling and protease-activated receptors *Nature* 407: 258- 664

Coughlin, SR (2005). Protease-activated receptors in hemostasis , thrombosis and vascular biology *Journal of Thrombosis and Hemostasis*. 3: 1800-1814.

D'Andrea MR; Derian CK; Santulli RJ and Andrade-Gordon P (2001). Differential Expression of Protease Activated Receptors-1 and -2 in Stromal Fibroblasts of Normal, Benign, and Malignant Human Tissues. *American Journal of Pathology*. 158(6):2031-2041.

Dirección General de Epidemiología: DGE Compendio de Cáncer 2000: Mex Mortalidad y Morbilidad. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. SS

Even-Ram SC; Uziel B; Cohen P; et al (1998). Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nature medicine*; 4(8): 909-914.

Even-Ram SC; Maoz M; Pokroy E; et al (2001). Tumor Cell Invasion Is Promoted by Activation of Protease Activated Receptor-1 in Cooperation with the $\alpha_v\beta_5$ Integrin. *The Journal of Biological Chemistry*; 276(14): 10952-10962.

Fenton II; Villanueva GB; Ofosu FA; et al (1991). Thrombin inhibition by hirudin: how hirudin inhibits thrombin. *Hemostasis*; 21(1): 27-31.

Fenton II; Ofosu FA; Breznik DV; et al (1993). Understanding thrombin and homeostasis. *Hematology Oncology Clinics of North America*; 7(6): 1107-1119.

Ferlay J, Bray F, Pisanni P, Parkin DM. Globocan 2000 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC, WHO 2001.

Friedel G; Pastorino U; Ginsberg RJ; Goldstraw P; Johnston M; Pass H (2002) International Registry of Lung metastases London England Results of lung metastasectomy from breast cancer: prognostic criteria on the basis of 467 cases of the International Registry of lung metastases. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery; 22: 335-344.

Foo P (2002) Metastasis: A Journey of Mobile Cancer Cells. Harvard Science Review. 30-32.

Hanahan D and Weinberg RA (2000) Hallmarks of Cancer Cell 100: 57-70.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al (2007). ASCO 2007 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. Journal of Clinical Oncology; 25(33): 1-26.

Henrikson KP; Salazar SL; Fenton II; et al (1999). Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. Breast Journal Cancer; 79(3-4): 401-406.

Herbert JM; Dupuy E; Laplace MC; et al (1994). Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non proteolytic pathway. Biochemistry Journal; 303(pt 1): 227-231.

Hernández-Rodríguez NA; Correa E; Avila EP; Vela TA and Pérez VM (2009) PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study. Journal of Translational Medicine; 7: 47.

Hernández-Rodríguez NA; Cambrey AD; Harrison NK; et al (1995). Role of thrombin in pulmonary fibrosis. The Lancet; 346: 1071-1073

Kamath Lakshmi (2001) Signaling from Protease-activated Receptor-1 Inhibits Migration and Invasion of Breast Cancer Cells *Cancer Research* 61:5933-5940.

Keyomarsi K; Tucker SL; Buchholz TA; et al. (2002) Cyclin E and Survival in patients with breast cancer *N Eng J Med* 347: 1566-1574.

Luttrell LM; Daaka Y; Lefkowitz RJ (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein- coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 274(23):15971-15974.

Liotta LA (2001). An attractive force in metastasis. *Nature* 410: 24-25.

Lopez-Carrillo L; Torres-Sanchez L; Lopez-Cervantes M (2001). Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Pública México*; 43:199-202.

Martín Miguel (2006). Molecular Biology of breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 81(1): 7-14.

Monroe D, Hoffman M, Roberts H. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381-89.

Nierodsky ML; Chen K; Takeshita K; et al (1998). Protease-Activated Receptor (PAR-1) is required and Rate-Limiting for Thrombin-Enhanced Experimental Pulmonary Metastasis. *Blood*; 92(10): 3694-3700.

Okugawa H; Yamamoto D; Uemura D; et al (2005). Prognostic factors in breast cancer: The value of the Nottingham prognostic index for patients treated in a single institution. *Surgery Today*; 35(11):907-11.

Penn RB; Pronin AN; Benovic JL (2000) Regulation of G-Protein-coupled receptor kinases. *Trends in Cardiovascular Medicine*; 10(2): 81-89.

Prenzel N; Zwick E; Daub H; et al (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*; 402: 884-888.

Prossnitz ER (2004) Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G-coupled receptors. *Life science*; 75(8): 893-899.

Reis-Filho JS (2006). The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*; 59(3): 225-231.

Roberts HR (1993). Nuevas perspectivas sobre la cascada de la coagulación. *Hospital Practice*; 2: 150-160.

Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M (1998). Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*; 4: 331-4

Rouslahti E (1996). How cancer spreads. *Scientific American*; 275(3): 72-77.

Steeg PS (2005). Emissaries set up new sites. *Nature* 438: 750-751.

Todorovic-Rakovic N; Neskovic-Konstantino Z and Nicolic-Vucosavljevic D (2006). Cross-Talk between ER and HER2 in breast carcinoma. *Archive of Oncology*; 14(3-4):146-150.

Li W and Hungtinton JA (2008). The Heparin Binding Site of Protein C Inhibitor is Protease-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*; 283(51): 36039-45.

Mo W; Zhang YL; Chen HS; et al (2008). A novel hirudin derivate characterized with anti-platelet aggregations and thrombin inhibitors. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*; 28(2): 230.7.

Weigelt B; Peterse JL and van't Veer LJ (2005). Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nature*; 5: 591-602.

Welch DR, Steeg PS, Rinker-Schaefer CW, (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis *Breast Cancer res*; 2: 408-416.

Xing Li; Schneider H; Peters A; et al (2008) Heparin Alters Viral Serpin, Serp-1, Anti thrombolytic Activity to Anti-Thrombotic Activity. *The Open Biochemistry Journal*. 2: 6-15.