



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“LA SEÑALIZACIÓN DE TIMP-4 EN CÉLULAS DE CÁNCER”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:

FRANZ PRUEFER

DIRECTOR DE TESIS: DR JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

Instituto Nacional de Medicina Genómica

COMITÉ TUTORAL:

Dra Martha Robles

Facultad de Medicina UNAM

Dr. Carlos Rosales

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

El trabajo derivado de esta tesis fue producto del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM que realizó Franz Pruefer con beca de Conacyt número 207064.

A Karla Vázquez por su ayuda en experimentos y útiles discusiones científicas.

A mi tutor Dr. Jorge Meléndez Zajgla por su soporte incondicional durante este tiempo, así como a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas.

Agradecemos al Dr. Tom Maniatis de la Universidad de Columbi a por haberme regalado los plásmidos de Ikke y de Ikke-K38A.

A Alejandro López Saavedra por nuestras entretenidas y útiles discusiones científicas.

Dedicatorias:

A los dos grandes amores de mi Vida: Karla y nuestra hija Lena.

A mis Papás

A mis Hermanos y sus Familias

ÍNDICE

	Páginas
Abstract en Inglés y Resumen en Español	6-7
Abreviaturas	8
Introducción	9-23
Hipótesis y Objetivo General	23-24
Materiales y Métodos	24-39
Resultados	40-110
Discusión y Conclusiones	114-132
Agradecimientos	134
Referencias	145
Anexo I Artículo	
ANEXO II	135-146
Proyecto de Doctorado Anterior.	
La tesis Doctoral se cambió debido a que otro grupo publicó lo mismo cuando faltaba mucho tiempo para completar el trabajo (2do Semestre). En esta sección muestro los avances que tenía.	

ABSTRACT

Timp-4 protein is thought to have a protumorigenic role in Breast and other Cancers based on studies with patient samples; however its oncogenic mechanisms are unknown. Our whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-Seq) data of breast cancer cells of luminal phenotype, MCF7 cells, showed that Timp-4 regulates genes involved in cancer stem cells. Mechanisms that promote cancer stem cells are known to be critical for carcinogenesis. Timp-4 cancer stem cell involvement was confirmed with specific protein markers assays. Ikke, a known breast cancer oncogenic kinase, was upregulated by Timp-4, both at transcript and protein levels. Interestingly Ikke overexpression in MCF7 cells increased protein markers of breast cancer stem cells. We further demonstrated that Ikke increases breast cancer stem cells in MCF7 cells by the established breast cancer stem cell methods of mammosphere assays and mammosphere serial transplant. This effect was dependent on Ikke kinase domain, since disrupting its kinase activity with the IKKeK38a mutant, abolished the cancer stem cell increase. We also found that Timp-4 is upregulating Estrogen-Receptor-alpha (ER α), a known downstream positive regulated target of Ikke. In contrast on MDA231, a breast cancer cell line but of basal phenotype, Timp-4 decreased Ikke, and Ikke in MDA231 cells did not increase the cancer stem cell population.

Our results show that Timp4 is upregulating IKKe in MCF7 luminal breast cancer cells, and Ikke through its kinase domain is increasing the number of MCF7 cancer stem cells.

RESUMEN

La proteína Timp-4 es considerada protumorigénica en cáncer de mama, así como en otros cánceres por estudios clínicos con muestras de pacientes. Sin embargo los mecanismos oncogénicos de Timp-4 aún son desconocidos. Mediante experimentos de RNA-Seq (whole transcriptome shotgun sequencing) en células de cáncer de mama tipo Luminal, MCF7, encontramos que Timp-4 regula genes asociados a células troncales de cáncer. Se sabe que la generación de células troncales en cáncer es crítica para la carcinogénesis. La relación entre Timp-4 y células troncales de cáncer de mama fue confirmada mediante ensayos de marcadores específicos. La cinasa IKKe, una proteína con papel oncogénico en cáncer de mama, se encontraba incrementada por Timp-4, tanto a nivel transcripcional como proteico. Interesantemente al sobreexpresar Ikke en las células MCF7, se incrementó la expresión de marcadores de células troncales de cáncer de mama. También demostramos que IKKe incrementa a las células de cáncer de Mama MCF7, mediante ensayos de mamíferas y trasplante serial de mamíferas, los cuales son métodos establecidos para determinar células troncales de cáncer de mama. El incremento de células troncales de cáncer de mama por IKKe depende del dominio cinasa de IKKe, ya que al usar la mutante IKKeK38A que carece actividad cinasa, se eliminó el incremento. También encontramos que Timp-4 aumentó la expresión Receptor de Estrógenos alpha (ERa), el cual se sabe es regulado positivamente por IKKe. En cambio en las células de cáncer de mama tipo Basal, MDA231, Timp-4 redujo a Ikke y esta última no incrementó a las células troncales de cáncer.

Nuestros resultados muestran que Timp4 está incrementando a IKKe en células de cáncer de mama tipo luminal, MCF7, y a través del dominio cinasa de IKKe está aumentando el número de células troncales de cáncer de mama en las células MCF7.

ABREVIATURAS:

Timp: Inhibidor de Metaloproteasas de la Matriz

Timp4: Inhibidor de Metaloproteasas de la Matriz 4

IKKe: Inhibidor de nuclear factor kappa-B kinase subunidad epsilon

Ikke-K38A: Inhibidor de nuclear factor kappa-B kinase subunidad epsilon con substitución de aminoácido Arginina por Alanina en la posición 38 de la proteína

NFKB: Factor Nuclear kappa

TNFa: Factor de Necrosis Tumoral alpha

ERa: Receptor de Estrógenos alpha

RNA Seq: Whole Transcriptome Sequencing

INTRODUCCIÓN

La introducción de la tesis será dividida en dos partes:

- 1) Aspectos generales del cáncer de mama.
- 2) Conocimiento previo de Timp4 y de la familia de Inhibidores de Metaloproteasas.

- 1) Generalidades del Cáncer de mama.

El cáncer de mama es la segunda neoplasia maligna más frecuente del mundo (sin contar el cáncer de piel no melanómico) y la más común en mujeres, con aproximadamente 1 millón de nuevos casos cada año en el mundo . A pesar de que se ha considerado como una enfermedad propia de países de altos ingresos; la incidencia de cáncer de mama ha ido en aumento también en países de ingresos medios así como en países subdesarrollados .

En México, la incidencia de cáncer de mama ha aumentado de forma progresiva durante los últimos 30 años y desde el 2004 es la primera causa de muerte por cáncer, junto con el cáncer cervicouterino, en mujeres mayores de 34 años de edad. Se piensa que este incremento en la incidencia del cáncer de mama en nuestro país es consecuencia de una mayor expectativa de vida, la reducción de la tasa de natalidad, el envejecimiento de la población y los cambios en el estilo de vida, como cambio a una dieta occidental con alta ingesta en calorías provenientes de la llamada comida chatarra, la reducción en la práctica de la lactancia, menor tasa de fertilidad e incremento en el sedentarismo .

En México la mayoría de las pacientes con cáncer de mama se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad donde el factor clave para esto es el retraso dado por ineficiencias del Sistema de Salud en nuestro país .

Historia natural del cáncer de mama

La mama de una mujer adulta está conformada por conductos lactíferos epiteliales que terminan en alvéolos secretores, los cuales se encuentran inmersos en una malla de tejido conectivo y grasa. El crecimiento y desarrollo normales de la mama están regulados por una compleja interacción entre muchas hormonas, factores de crecimiento, citocinas algunos de los cuales son secretados por las mismas células mamarias y otros por otras células del microambiente tumoral. Entre las hormonas más relevantes en el carcinogénesis de mama están los estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides, prolactina, hormona tiroidea

La desregulación celular que ocurre en el cáncer de mama es progresiva, y se puede reflejar microscópicamente en cambios de la histología normal hacia: hiperplasia, displasia con atipias, una neoplasia intraepitelial (carcinoma *in situ*) y finalmente un cáncer invasor (figura 1). Este proceso puede ser relativamente agresivo en algunas circunstancias especiales (sobre todo en personas con mutaciones genéticas) pero generalmente ocurre lentamente a través de años y décadas .

Diagrama de INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Hiperplasia? Displasia Displasia Severa CARCINOMA IN SITU CÁNCER

-----Etapas Precancerosa----->>--Cáncer-->

En general, el cáncer de mama tiene una tasa de crecimiento lento, en comparación con otros tumores. Se estima que para que aparezca un cáncer de mama clínicamente detectable deben de pasar décadas. El estudio más grande con 147 tumores se estimó el tiempo de duplicación del volumen tumoral a través de mamografías seriales. El rango de tiempos de duplicación en ese estudio fue de 44 a 1,800 días, con un promedio de 212 días .

Hasta ahora no es posible determinar la tasa de crecimiento del cáncer de mama (ni de ningún cáncer) en una etapa preclínica (microscópica), pero si uno asume que un cáncer es de origen monoclonal, es decir inicia a partir de una sola célula o clona cancerosa y crece con una tasa constante de duplicación de 200 días, un tumor requeriría aproximadamente unos 20 años de crecimiento para llegar a tener un diámetro de entre 1 y 2 cm , Un tumor con una tasa de duplicación más rápida, de 100 días, requeriría 10 años para ser clínicamente detectable, y un tumor con una tasa de crecimiento extremadamente rápida (20 días) se podría haber originado sólo 2 años antes . A pesar que este modelo extrapola una tasa de duplicación observada en etapas clínicas a las etapas preclínicas, sugiere que un largo periodo (años) de crecimiento preclínico precede a la detección de la mayoría de los tumores malignos de la mama.

Existe una ventana de oportunidad para controlar el cáncer antes de que éste se disemine, la cual es de tiempo incierto en cada paciente . Esta ventana

comienza entre los 0.2 cm de diámetro del tumor, cuando es potencialmente detectable por mastografía y 1 cm de diámetro, cuando es potencialmente detectable por palpación. Para entonces se estima que el tumor ya consta de alrededor de 1×10^9 células . Existe una clara correlación que a mayor tamaño tumoral, mayor riesgo de diseminación a otros órganos (metástasis), pero actualmente es imposible estimar cuándo ocurre la diseminación . La regulación de la transición entre un carcinoma *in situ* a un carcinoma invasor no se conoce bien, debido a los pocos modelos que existen para estudiar este proceso. Sin embargo, se ha encontrado que la expresión de algunas metaloproteasas de la promueve la degradación de la membrana basal . El estímulo para comenzar a degradar la membrana basal y empezar a movilizar a las células neoplásicas epiteliales se sugiere que es una combinación de las células epiteliales del tumor, así como otras células del microambiente, como fibroblastos y macrófagos .

Sin embargo, un estudio hecho con modelos murinos, así como con muestras de pacientes con carcinoma *in situ* de mama ha desafiado este paradigma de una transición lineal entre carcinoma *in situ* y carcinoma invasor. En ese estudio se mostró que incluso en un tumor *in situ*, las células neoplásicas pueden escapar de esta barrera (la membrana basal que limita al epitelio del mesénquima, que consiste de colágena tipo IV entre otras proteínas) y migrar a órganos distantes. La membrana basal se restablece posterior de esta salida de células neoplásicas del epitelio al mesénquima y parece que el tumor siguiera siendo un carcinoma *in situ*. En las pacientes con “carcinoma *in situ*” encontraron células tumorales mamarias que habían migrado a la médula ósea . Hasta ahora la significancia clínica y biológica de este estudio no ha sido determinada, pero si

sugiere que un carcinoma *in situ* se puede convertir en invasor y este regresar aparentemente a uno *in situ*; aún se tendrá que determinar si estas células tumorales diseminadas sistémicamente en un carcinoma *in situ* se pueden generar focos metastásicos años después.

Una vez que aparece un cáncer invasor, la historia natural del mismo se caracteriza por una gran heterogeneidad entre las pacientes. Si se diagnostica la enfermedad oportunamente y se brinda el tratamiento adecuado la mayoría de las mujeres tendrán una larga sobrevida sin presentar recurrencias. Sin embargo, hay casos en los que se presentan recurrencias en mujeres que aparentemente fueron tratadas de manera “oportuna”. En la actualidad, no es posible determinar con certeza el tiempo en el que se pueda asegurar a las pacientes en forma definitiva que están curadas . Existe evidencia de que mujeres con cáncer de mama siempre tendrá una mayor tasa de mortalidad respecto a una población control pareada, incluso después de 20 o 30 años . Los tratamientos hasta ahora disponibles prolongan la supervivencia de las pacientes, pero no eliminan la enfermedad por completo. Es este aumento en la sobrevida lo que puede resultar en muertes por otras causas, lo cual da la apariencia de que estas pacientes se curaron de cáncer de mama . Por lo tanto es crítico continuar desarrollando nuevos tratamientos que sean más efectivos y que produzcan menos eventos adversos.

/ El cáncer de mama puede metastatizar a cualquier órgano . Los cuatro lugares más comunes de metástasis a distancia por cáncer de mama son: hueso, pulmón, hígado y cerebro (en ese orden); pero se han encontrado metástasis de esta enfermedad en una gran variedad de localizaciones. Cuando

existen metástasis, los objetivos del tratamiento ya no son curativos sino de: mejorar o mantener la calidad de vida y prolongar la supervivencia. La evolución clínica de las pacientes con cáncer de mama metastásico es muy heterogénea: algunas fallecen unas semanas después del diagnóstico, otras viven con enfermedad durante muchos años .

Factores de riesgo del cáncer de mama

Entre los múltiples aspectos que se han asociado con un mayor riesgo de presentar cáncer de mama se incluyen factores genéticos, hormonales, dietéticos (gran consumo de grasas), ambientales (exposición a pesticidas y a radiación iónica) y antecedentes de enfermedades benignas de la mama. Aparentemente, los más importantes son el sexo, la edad, los antecedentes hereditarios de cáncer de mama en familiares de primera línea (es decir, madre, hermana o hija), la presencia de mutaciones en genes específicos como BRCA1 y BRCA2, factores asociados con un tiempo prolongado de exposición a estrógenos (ej: primera menstruación temprana, menopausia tardía, no tener hijos, la ingesta de anticonceptivos hormonales), la enfermedad fibroquística con hiperplasia atípica y una alta densidad mamaria medida por mastografía .

La edad es uno de los factores de riesgo más importante para desarrollar cáncer de mama. En los países desarrollados usualmente se trata de una enfermedad de mujeres post-menopáusicas. El riesgo aumenta sustancialmente después de los 40 años de edad (1:25) y alcanza un riesgo de 1:8 para cuando la mujer tiene 80 años de edad . En México existe evidencia que sugiere que el

cáncer de mama se presenta una década antes ; sin embargo esto ha sido debatido que podría ser un artefacto y deberse a el efecto de la inversión de la pirámide poblacional que estamos experimentando como país actualmente .

La *alta densidad mamográfica* es otro importante factor de. La apariencia radiológica de las mamas femeninas varía entre diferentes mujeres de la misma edad, debido a diferencias en la proporción de los componentes del tejido (relación parénquima-estroma y tejido adiposo), . La grasa es radiográficamente lúcida y aparece de color negro en una mamografía, mientras que el tejido epitelial (parénquima) y el tejido conectivo (estróma) son radiográficamente densos y aparecen claros en una mamografía. A esta apariencia clara conformada por los tejidos epitelial y conectivo se le llama densidad mamográfica . El riesgo de cáncer de mama en mujeres con mamas muy densas es de 4 a 6 veces mayor que de las mujeres con mamas menos densas . Las mamas que tienen una mayor densidad mamográfica son con mayor proporción de tejido conectivo y epitelial en comparación con la cantidad de tejido adiposo. A la inversa, las mamas con menor densidad mamográfica son aquellas que tienen mayor proporción de tejido graso en comparación con los tejidos conectivo y epitelial. Variables claramente endócrinas (regulados por estrógenos y progestagenos) tales como el estatus menopáusico, el Índice de Masa Corporal y el número de hijos influyen sobre la densidad mamaria . La densidad mamográfica tiene un fuerte componente hereditario y se han encontrado algunos variantes de genes que se correlacionan con este fenotipo .

Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 son un factor de riesgo importante dado el alto riesgo que conlleva ser portador de una de estas mutaciones: 55 a

85% de riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama . Sin embargo, estas mutaciones hereditarias son poco comunes. Sólo del 5 al 10% de los cánceres de mama se asocian con una predisposición hereditaria, y no todos ellos pueden atribuirse a mutaciones en BRCA1 y BRCA2 . Otros genes que se ha demostrado una asociación en el cancer de mama hereditario son PTEN, p53, ATM, CHEK2, RAD50, BRIP1 y PALB2

En un intento por estimar el riesgo individual de cada mujer de desarrollar cáncer de mama, se han desarrollado modelos predictivos que integran diferentes factores de riesgo. El más conocido de éstos es el modelo de Gail. Consiste en un modelo de regresión logística que combina los riesgos relativos de edad, raza, edad de menarca (primera menstruación), número de biopsias previas, historia de hiperplasia atípica e historia familiar de cáncer en familiares de primer grado para estimar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida . A pesar de ser el modelo más ampliamente utilizado clínicamente, ha sido criticado porque tiende a sobreestimar el riesgo en mujeres que no participan en programas de detección oportuna, ya que fue diseñado pensando en mujeres que lo hacen . Otro modelo que se utiliza principalmente en mujeres con antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama, es el modelo de Claus. Este modelo sólo considera la historia familiar de cáncer de mama y las edades a las cuales fueron afectados dichas parientes para estimar un riesgo. Ninguno de los modelos anteriores consideran los factores de riesgo relevantes de historia de carcinoma *in situ* lobulillar y densidad mamográfica .

Otros factores que más recientemente se han asociado con un aumento en el riesgo del cáncer de mama son el sobrepeso (con una relación directamente

proporcional entre el índice de masa corporal y el riesgo de mortalidad por cáncer de mama), la alta ingesta de carbohidratos y la ingesta de alcohol .

A pesar de todos los factores de riesgo que hoy en día se conocen para desarrollar cáncer de mama es muy importante notar que en el 50% de las mujeres con cáncer de mama no es posible identificar ningún factor de riesgo .

Clasificación molecular del Cáncer de Mama.

En el año 2000 un trabajo seminal logró una subclasificación molecular del cáncer de mama mediante análisis de expresión transcriptómicos. Hoy en día se han encontrado al menos cuatro subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, Basal (Triple Negativo), Her2 .

Las células de cáncer de mama se pueden clasificar en cuatro subtipos: 1) Luminal A, son células que expresan los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) y que a su vez presenta una relativa baja proliferación. Suelen tener mejor pronóstico, sin embargo, aún el pronóstico es heterogéneo por lo que sugiere que este grupo aún incluye otros subgrupos . Este subtipo representa cerca del 40% de las pacientes con cáncer de mama. 2) Luminal B, expresa los receptores ER y PR, sin embargo tiene una proliferación mayor que el Luminal A y usualmente un peor pronóstico; representa aproximadamente el 20% de la pacientes con la enfermedad. 3) Her2 positivo, son células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor Her2. Este subgrupo de pacientes tienen también un mal pronóstico, sin embargo debido a que existe en la clínica un anticuerpo monoclonal recombinante que reconoce e inhibe a Her2 (trastuzumab) el pronóstico de este grupo de paciente ha mejorado discretamente con este

medicamento. 4) Basal o triple negativo, este subtipo carece de la expresión de los receptores ER, PR y Her2. Es el de peor pronóstico este subtipo y representa un 15-20% de las pacientes .

2) TIMP4 y la familia de Inhibidores de Metaloproteasas:

La familia de TIMP (Inhibidores de Metaloproteasas Tisulares)

La familia de TIMP está conformada en los humanos por cuatro miembros, TIMP-1, -2, -3, y -4. Timp-1, Timp-2 y Timp-3 fueron clonados en 1985, 1989 . Timp-4 es miembro de esta familia, clonado más recientemente, su descubrimiento se hizo en 1996 de una biblioteca de cDNA de corazón humano .

Por definición todos los miembros de la familia de Timp mediante su región amino terminal inhiben a las metaloproteasas, las cuales son enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular. Los Timps se ha encontrado que tienen un papel importante en el remodelamiento fisiológico y patológico de los tejidos. Los Timps son proteínas secretadas con un peso molecular que oscila entre los 20 y 30 kDa. La estructura de la familia de los Timps se encuentra conservada , tienen seis asas y doce residuos de cisteína separados de manera similar que producen la formación de seis puentes de disulfuro . A pesar a que se secretan a la matriz

extracelular, se ha encontrado que los Timps se pueden encontrarse intracelularmente . Su papel intracelular aún no se ha establecido.

En los últimos años se ha elucidado que Timp-1, Timp-2 y Timp-3 además pueden tener funciones independientes de su inhibición de las metaloproteasas . Esta función de los Timps es como ligandos a nivel de la membrana celular. Los receptores transmembranales con los que se ha visto que los Timps se unen directamente son CD63, VEGFR1 y FGFR2 . Hasta la fecha no se ha buscado/encontrado un posible receptor transmembranal para Timp-4.

Los Timps se han identificado en especies que van desde el nemátodo *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (Pez cebra) y en mamíferos, lo que sugiere es que estos son genes ancestrales de metazoarios . En los humanos Timp-2 se expresa de manera ubicua en prácticamente todos los tejidos, en cambio TIMP-1, -3 y -4 su expresión es inducible y tejido específico. Timp-1 es expresada principalmente en los órganos reproductivos, Timp-3 en el corazón, riñón y el timo. Timp-4 en el corazón, riñón, páncreas, colon, testículos, cerebro, tejido adiposo, ovario, endometrio y músculo y plaquetas . En la base de datos de Protein Atlas he observado que Timp-4 también se expresa en los macrófagos en la región alveolar de los pulmones (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000157150-TIMP4/tissue>). Los macrófagos alveolares se conoce que son del fenotipo M2 .

Timp-4

Timp-4 es el miembro de la familia clonado más recientemente y el menos estudiado. Es una proteína no glucosilada de 195 aminoácidos, la cual es

secretada al espacio extracelular y también lo hemos logrado observar intracelularmente dentro del compartimento nuclear (Datos preliminares del laboratorio).

Se ha encontrado que Timp-4 induce la muerte celular en fibroblastos transformados, y en células de músculo liso de aorta . En el cáncer de piel tipo melanoma se han encontrado resultados contradictorios usando las misma línea celular MDA-MB-435, en un estudio inhibió la muerte de células de melanoma y aumentó la metástasis , mientras que en el otro estudio redujo el crecimiento tumoral y suprimió las metástasis . Los resultados opuestos podrían deberse a diferencias metodológicas, ya que en uno transfectan a las células con Timp-4 y en el otro inyectan Timp-4 al músculo del ratón en donde posteriormente inyectan las células MDA-MB-435 [NOTA: aunque en los estudios originales mencionaban que eran células de cáncer de mama recientemente se descubrió que esas células que se creía que eran de cáncer de mama son en realidad de melanoma]. Se ha encontrado además que Timp-4 puede tener un papel en la proliferación, ya que esta se encontraba reducida en células del tumor de Wilms (cáncer renal pediátrico) expuestas a Timp-4 .

La expresión de Timp-4 se ha correlacionado con la transición de un carcinoma *in situ* a uno invasor. Un carcinoma *in situ*, se define como un carcinoma en etapas tempranas en el cual las células neoplásicas no han salido del compartimento epitelial y por lo tanto no han invadido el tejido estromal adyacente. Para convertirse en un carcinoma invasor las células epiteliales malignas debe de degradar la membrana basal, formada principalmente por colágena tipo IV, la cual es la barrera que les impide invadir el compartimento tisular adyacente . Además,

las células deben de perder las uniones célula-célula características de los epitelios para poder disgregarse y obtener una morfología tipo mesenquimatosa o fibroblastoide para así poder migrar, un fenómeno conocido como transición epitelio-mesénquima . La expresión de Timp-4 se ha encontrado en tejidos de pacientes que disminuye en el carcinoma invasor respecto al carcinoma *in situ* en cáncer de mama y próstata. A su vez encontraron de manera correlativa un aumento de la metaloproteasa MMP-26 durante esta transición; esta metaloproteasa se sabe que es inhibida por Timp-4 . Sin embargo, MMP-26 no pertenece a las metaloproteasas que *in vivo* promueven la degradación de la membrana basal , por lo que es posible que Timp-4 esté regulando a otros participantes de este proceso.

La regulación de Timp-4 prácticamente no ha sido estudiada. En condrocitos de rata la Osteoprotegerina aumenta la expresión de Timp-4; la inhibición farmacológica de la vía de ERK, suprimió el aumento de Timp-4 inducido por Osteoprotegerina, lo cual sugiere que la vía de ERK puede estar regulando al promotor de Timp-4 .

La expresión de Timp-4 ha sido explorada en los tumores de algunos subtipos de cáncer. En cáncer de mama una muestra de 314 pacientes, la expresión de Timp-4 medida por inmunohistoquímica en los tumores se encontró asociada a un pobre pronóstico . Para el cáncer cervicouterino en una muestra pequeña de 32 pacientes sugiere que Timp-4 se expresa de novo en pacientes con la enfermedad versus aquellas sin enfermedad y que conforme avanza la etapa clínica se incrementan los niveles de mRNA de Timp-4 . En una muestra de 354 astrocitomas (tumores originarios de los astrocitos en el Sistema Nervioso

Central) la sobreexpresión de Timp-4 medido por proteína es un factor de mal pronóstico. La coexpresión de Timp-4y CD63 en ese estudio mostró ser un factor pronóstico independiente para este cáncer .

JUSTIFICACIÓN

Los estudios donde se midieron los niveles de Timp-4 tumoral en muestras de pacientes con cáncer sugieren que Timp-4 tiene un papel oncogénico en diversos cánceres en humanos. Para el caso particular de cáncer de mama su sobreexpresión se correlaciona claramente con un pronóstico adverso para las pacientes. Hasta la fecha no se conocen la(s) cascada(s) de señalización ni los mecanismos mediante los cuales Timp-4 pudiera estar teniendo un papel protumorigénico.

HIPÓTESIS

Timp-4 modula vías de transducción de señales oncogénicas en células de cáncer de mama

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál(es) vía(s) de transducción de señales oncogénicas está modulando TIMP-4 en líneas células de cáncer de mama y el fenotipo biológico que está induciendo en las células de cáncer

Objetivos Específicos

- 1) Determinar cambios Transcriptómicos en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con Timp-4 humano recombinante seguido de análisis bioinformáticos y validación experimental.
- 2) En base a la información obtenida por los análisis transcriptómicos estudiar la(s) vía(s) de señalización que esté modulada por Timp-4 en líneas celulares humanas de cáncer de mama
- 3) Determinar si la activación de la(s) vía(s) de Timp-4 están induciendo algún fenotipo biológico en líneas de cáncer de mama humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular en Monocapa

Las líneas celulares de cáncer de mama, MCF7 y MDA-MB.231 (Abreviadas como MDA231 en toda la tesis) se compraron del repositorio de células del ATTC (American Type Culture Collection, EUA) la línea HeLa (Cáncer cervicouterino) ya había sido comprada previamente al ATCC. Las líneas celulares fueron secuenciadas en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para garantizar su calidad e integridad. Las células fueron cultivadas en monocapa

en un medio DMEM (Dulveco's modified Eagle Médium) que contenía suero bovino fetal (SBF) al 8% (GIBCO, Bethesda, EUA) e incubadas a una temperatura de 37°C con un atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (0.5%+/-) en una incubadora Revco-Thermo Scientific, EUA). Se utilizó material desechable para cultivar las células (Nunc, Thermo Scientific, EUA). Para los ensayos en donde se utilizó proteína recombinantes (TIMP-4, TNF α) se cultivaron las células con 1% de SFB (GIBCO, Bethesda, EUA). En los experimentos se usaron siempre células menores a pase 6 para evitar artefactos causados por nuevas mutaciones y cambios cromosomales ocasionadas la inestabilidad genómica de las líneas de cáncer .

Extracción de RNA:

Se sembraron 500,000 células en cajas de 25 cm² y se incubaron por un periodo de 24 horas en las condiciones previamente mencionadas de Cultivo. Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se raspó con un gendarme limpio para despegar las células y se recolectaron con una pipeta. Las células despegadas Se centrifugaron a 1200 RPM por 1 minuto. El botón se resuspendió con 1 ml de Trizol (ThermoFischer Scientific, Carlsbad California) y se dejó incubar por 10 minutos en hielo. Se agregó 200 ul de cloroformo y se vortexeó. Se centrifug

ó a 8000 RPM a 4°C durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 1 volumen de isopropanol y se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 10,000 RPM por 15 minutos a 4°C. El botón se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 RPM a 4°C por 5 minutos. El botón con RNA finalmente

fue resuspendido con agua con Dietilpirocarbonato (DEPC) y se guardó a una temperatura de -70°C.

Obtención de cDNA por Transcriptasa Reversa y Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Los RT-PCR's se realizaron de acuerdo a lo previamente descrito . La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 μ g de RNA total con hexámeros al azar y con la transcriptasa reversa de acuerdo al manual del fabricante (Invitrogen). Las reacciones químicas comprendían de los siguiente volúmenes: 0.25 μ l de la polimerasa Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 2.5 μ l del buffer de reacción 10X, 0.5 μ l de la mezcla de dNTP's 10 mM, 1 μ l del oligonucleótido sentido a 10 μ M, 1 μ l del oligonucleótido antisentido 10 μ M y 1-2 μ l del cDNA para obtener un volumen final total de 25 μ l. Los oligos o primers fueron diseñados usando los programas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se diseñaron oligos para los siguientes transcritos: Timp-4, Ikke, Bcl3, ESA, Oct4, Sox2, Nanog, Aldh, Cd24, Snail. Como controles se usaron oligos para Gapdh. Se realizaron triplicados de los RT-PCR's para cada oligo y para cada condición. Se utilizó un Termociclador de la marca Eppendorf (Hamburgo Alemania).

Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Para el manejo y desecho del agente carcinogénico bromuro de etidio se tomaron las precauciones sugeridas por la EPA (www.ehso.emory.edu/contentguidelines/EthidiumBromideDisposalGuidelines.pdf)

y se siguieron los lineamientos del Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Nacional de Medicina Genómica donde se realizaron los experimentos. Las imágenes se obtuvieron con un fotodocumentador digital.

Los datos de la expresión obtenidos de los RT-PCRs se les hicieron análisis densitométricos usando el software del Image J (NIH Bethesda EUA) <http://imagej.nih.gov/ij/>.

Proteínas Recombiantes:

Se utilizó la proteína recombinante humana de Timp-4 número de catálogo 974-TSF-010 (R&D SYSTEMS EUA). La fuente de obtención que usaron para obtener Timp-4 fue del metazoario *Spodoptera frugiperda*. Fue validada biológicamente por el laboratorio productor (R&D Systems EUA) al bloquear a la matriz de la metaloproteasa 2 (MMP2), o también conocida como Gelatinasa A . Timp-4 se utilizó a una concentración de 10 nM. También se usó la proteína recombinante humana TNFa, número de catálogo 210-TA-050/CF (R&D SYSTEMS EUA). El TNF fue obtenido por la empresa productora de *E coli*; sus ensayos de validación fueron mediante ensayos de citotoxicidad con actinomicina D. Esta es la proteína recombinante que se ha usado en la mayoría de artículos publicados con proteína recombinante de TNFa. La concentración a la cual se usó TNF en los ensayos fue 10 ng/ml. Las proteínas recombinantes fueron almacenadas a -20°C de acuerdo a los instructivos del fabricante. Los viales en los que venían las proteínas recombinantes los alicuotamos inmediatamente en varios viales para evitar

múltiples ciclos de congelación y descongelación que pudieran dañar la estructura, integridad y funcionalidad de las proteínas.

Vectores y Transfecciones Estables de líneas celulares

Los vectores que utilizamos para transfectar a las células fueron: 1) pHTS-NFKB (P2120 Biomyx Technology) con resistencia a geneticina mediante la expresión del gen de neomicina. La secuencia consenso para detectar a dímeros de NFKB es (TGGGGACTTTCCGC) y el vector reportero contiene 5 sitios de estos en su secuencia. El sistema reportero de este vector es mediante el gene de Luciferasa. 2) pcDNA3-flag IKKe. Este plásmido fue obtenido a un regalo del Dr. Tom Maniatis. pcDNA3-flag IKKe tiene la versión silvestre o wild type del gen que codifica a la proteína Ikk épsilon (Ikke) (Figura 1A). Tiene un sitio de resistencia a geneticina por tener la secuencia del gen de neomicina. 3) pcDNA3-flag IKKe(K38A) (Figura 1B). Este plásmido fue también un regalo del Dr. Tom Maniatis. pcDNA3-flag IKKe(K38A) tiene una substitución en el aminoácido 38 de una Lisina por una Alanina, haciendo que la cinasa de esta proteína quede inactiva. Tiene un sitio de resistencia a geneticina por tener la secuencia del gen de neomicina. 4) Vector vacío PLXSN con resistencia a la geneticina (Clontech).

Las células MCF7 se crecieron al 50% de confluencia en medio de cultivo DMEM con 8% de SBF. Se transfectaron los vectores mencionados previamente con el lípido catiónico Lipofectamina 2000 (Life Technologies) con medio DMEM sin Suero. A las 24 horas se les cambió a medio DMEM con 8% de Suero. A partir de las 48 horas se seleccionaron con Geneticina (800 μ g/mL). Durante un mes se seleccionaron las células con Geneticina a la dosis mencionada previamente. Se

verificó la sobreexpresión de los transcritos específicos mediante RT-PCR como se mencionó anteriormente. Posterior a la selección farmacológica para determinar que células MCF7 se habían transfectado con nuestro vector pHTS-NFKB Luciferasa, se midió la funcionalidad del sistema mediante la proteína recombinante humana TNFa (R&D Systems a una concentración de 10 ng/ml, el cual es un estimulador clásico de la vía de NFKB .

Figura 1 A: Mapa del Vector pcDNA3-flag IKKe (wt)

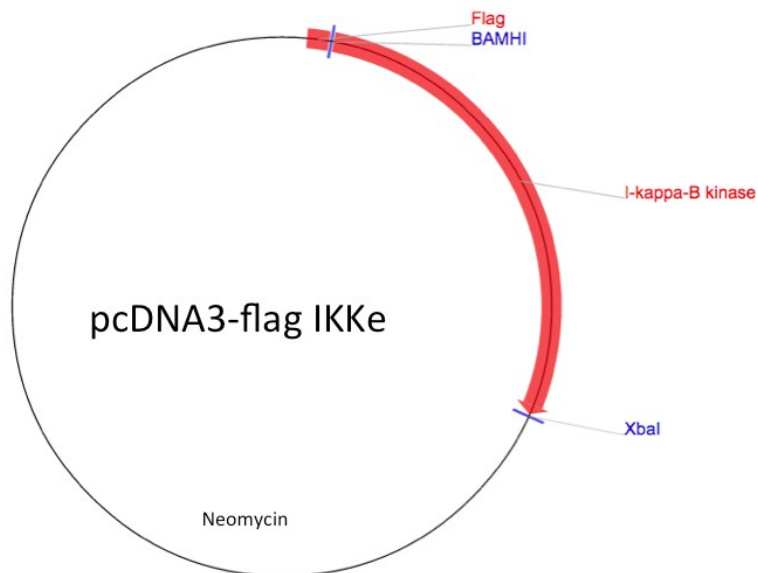
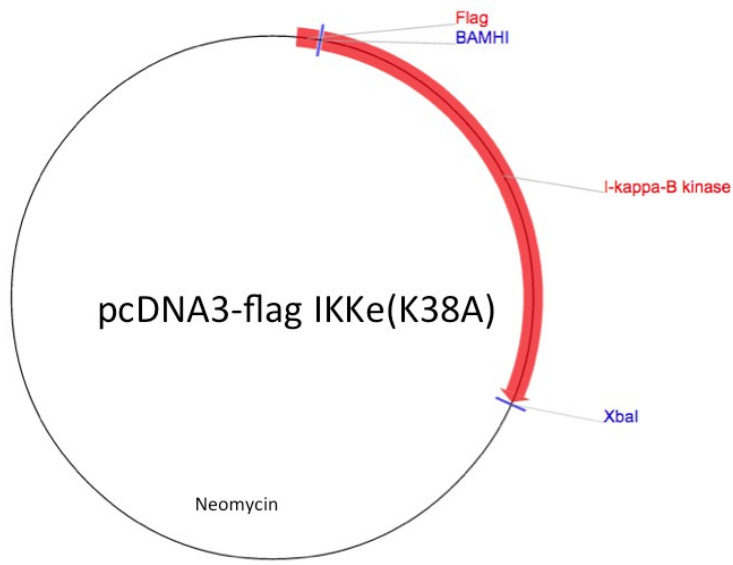


Figura 1 B: Mapa del Vector pcDNA3-flag IKKe(K38A). (IKKe con dominio de cinasa inactiva por la substitución de una lisina por Alanina en el aminoácido 38)



Ensayos de gene reportero con Luciferasa

Se utilizaron células MCF7 transfectadas establemente con la luciferasa como gen reportero para el factor de transcripción NF κ B. El plásmido que se utilizó fue el pHTS-NF κ B (P2120 Biomyx Technology). Este plásmido tiene sitios de unión a NF κ B y cuando se une NF κ B se transcribe la Luciferasa. Las células MCF7 se sembraron en cajas de 96 pozos al 50% de confluencia con medio DMEM con Suero fetal bovino al 8%. Se espero 24 horas a que estas estuvieran adheridas al pozo. Se les cambió el medio DMEM pero ahora Suero fetal bovino al 1%. Se les agregaron las proteínas recombinantes o simplemente el medio extra proporcional para los controles. Para la lectura de la luciferasa se realizó el siguiente procedimiento: Se usó un kit para medir luciferasa (Promega, EUA). Se retiró el medio y enjuagaron dos veces con PBS y se aspiró el PBS residual. Se

añadió el buffer de lisis provisto en el kit a 1x. Se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación leve. Posteriormente, se mezclaron 20 ul de lisado por cada 100 ul de buffer de luciferasa 1x provisto por el fabricante. Las placas se protegieron de la luz con papel aluminio en lo que se incubaban a temperatura ambiente. Los resultados se leyeron con un luminómetro (Microplate reader, Biorad, EUA) a una longitud de onda de 490 nm. Finalmente, se realizó la normalización de las proteínas totales de cada pozo cuantificando las proteínas mediante el método de Bradford.

Extracción de proteínas totales

Se sembraron 500,000 células en cajas de 25 cm² y se incubaron por un periodo de 24 horas en las condiciones previamente mencionadas (Temperatura, Humedad, CO₂). Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se obtuvo la lisis celular mediante buffer de RIPA (NP40 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidores de proteasas y PMSF 1000 [g/mL en PBS a 1X). Se incubaron por diez minutos en hielo seguido de una ultracentrifugación a 10,000 RPM a 4°C (Eppendorf, Alemania). Las proteínas se guardaban a -70°C o a -20°C en un ultracongelador (Revco Thermoscientific , EUA).

Inmunofluorescencia

Las células MCF7 se sembraron en y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se lavaron con PBS 4 veces para retirar el paraformaldehído remanente que hubiera quedado en los pozos. Las células se bloquearon con

buffer específico por 20 minutos, con el fin de reducir las uniones no específicas de los anticuerpos.

Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1 hora. La concentración óptima del anticuerpo se determinó mediante titulación. Los anticuerpos secundarios se usaron de acuerdo a la especie del primario.

Incubar durante 45 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con biotina o fluorocromo conjugado (Anticuerpos Secundarios para Inmunohistoquímica) dilución: 1–5 µg/ml en PBS con 1.5%–3% suero normal de bloqueo. La concentración óptima del anticuerpo, debe ser determinada por titulación. Lavar tres veces con PBS. Se incubó con estreptavidina de fluoresceína durante 15 minutos en una cámara oscura. Se realizaron los lavados con PBS. El cubreobjetos fue montado con medio de montaje acuoso.

Extracción de proteínas con fracciones citosólicas y nucleares.

Para obtener proteínas nucleares y citosólicas, las células fueron colectadas mecánicamente con una espátula. Estas fueron centrifugadas y el sedimento se lavó con PBS. Aproximadamente, 6×10^6 células se resuspendieron en 1 ml de buffer A (10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, PMSF, inhibidores de la proteasa cóctel) durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se añadió 50 µl del detergente NP-40 (Thermo Fischer Scientific) a 10% diluido en agua destilada, se mezcló y la suspensión se centrifugó inmediatamente a $5,000 \times g$ durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó como la fracción citosólica. El sedimento se resuspendió en 330 µl de buffer C (25 mM HEPES pH 7.5, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, PMSF, con un coctel de inhibidores

de proteasas) y se incubaron durante 30 minutos en hielo con agitándolos levemente de una manera manual y finalmente se centrifugó a 5,000Xg durante 5 minutos; el sobrenadante se recogió como la fracción nuclear.

Anticuerpos:

Los anticuerpos dependiendo del ensayo fueron usados para western blots, inmunofluorescencias o Citometría de flujo.

Se utilizaron los siguientes Anticuerpos: anti Timp-4, número de catálogo T8537 (Sigma Aldrich), Ikke número de catálogo sc-376114 (Santa Cruz), ERa FC SC8002 (Santa Cruz). p65 número de catálogo 3034 (Cell Signaling), p52 número de catálogo PC140-100 (Oncogene), p100, Beta Tubulina número de catálogo 2146 (Cell Signaling), Nucleolina (Miltenyi Biotec, Alemania), CD24-FITC (Miltenyi Biotec, Alemania), CD44 Pe (Miltenyi Biotec, Alemania), epCAM-FITC (Miltenyi Biotec, Alemania). Los anticuerpos fueron almacenados en 4°C o -20°C de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

Western Blots

Las proteínas se cuantificaron usando el método de Bradford. Las proteínas, se separaron en un gel de poliacrilamida del 12 al 14% en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5%. Se usaron los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, así como los lavados necesarios en cada paso. La señal se detectó usando quimioluminiscencia en un fotodocumentador.

Ensayos de Mamosferas y Ensayo de Trasplante serial de Mamosferas

Para este ensayo se uso el protocolo descrito para la formación de mamosferas y trasplantes seriados de mamosferas para la determinación de células troncales .

Las células se sembraron en placas de 6 pozos de agarosa que sirve para que las células crezcan en tres dimensiones. Se realizaron los ensayos de dilución limitante de tal forma que solamente una clona (células) quedará en los pozos de y esta (en caso de tener características troncales) creciera en una mamosfera. Las mamosferas se cuantificaron su número y su tamaño.

Para las diluciones seriadas se disgregaron las mamosferas pasándolas en una jeringa estéril con una aguja de un grosor 25G (en 6 ocasiones). Las células fueron resembradas (trasplantes) mediante el método de dilución limitante en placas con agarosa. Las clonas que formaron esferoides se volvieron a disgregar para un segundo trasplante en donde se repitió todo el procedimiento.

Ensayos con Ratones Desnudos

Los ratones desnudos se obtuvieron en el Bioterio de la UAM Xochimilco. Se adquirieron un número de 9 ratones. Todos ellos tenían certificados de calidad y de salud del Jackson Laboratory de los Estados Unidos. La inyección de células tumorales se les realizó en la región subcutánea del dorso. Los ratones estuvieron en un medio ambiente estéril y el aire de donde estaban estaba filtrado con un filtro HEPA.

Método de Análisis *in silico* de Factores de Transcripción que se unen al promotor de Timp-4

Utilizamos el siguiente Flujo de análisis computacional para analizar los factores de transcripción putativos que se unen al promotor de TIMP-4 (Figura 2A). Obteniendo el Promotor de la base de Datos curada de TRED (Transcriptional Regulatory Element Database) de Cold Spring Harbor (Figura 2B) y las matrices y Algoritmos Bioinformáticos de Transfac y Jaspar

Figura 2A: Flujo Bioinformático de Análisis de Factores de Transcripción que se unen putativamente al Promotor de Timp-4

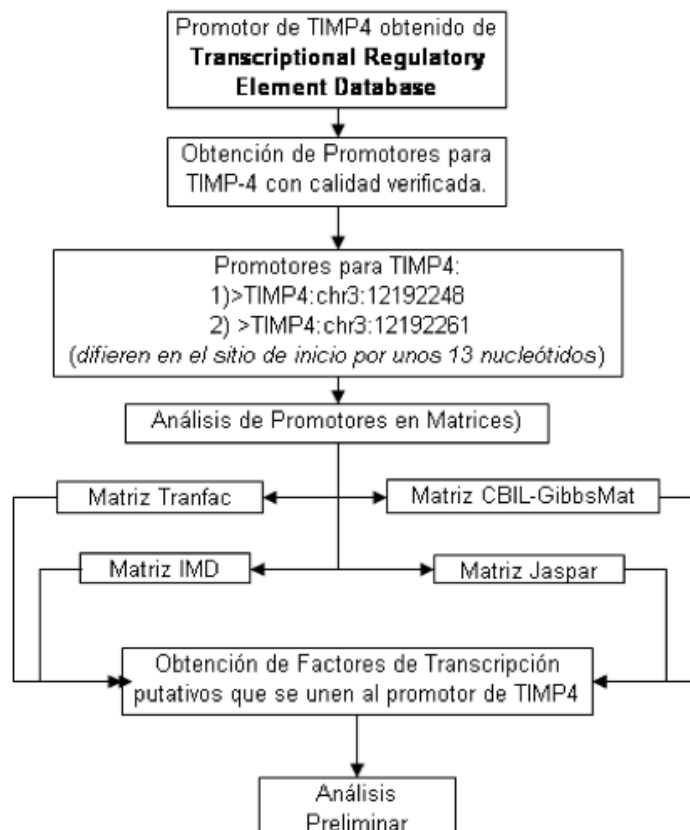


Figura 2 B: Número de Acceso para obtener promotor de Timp-4 en Base de Datos de TRED de Promotores de Cold Spring Harbor

Transcriptional Regulatory Element Database	
http://rulai.cshl.edu/cgi-bin	
Accession Number 31067	Gene TIMP-4
Transcription Start Site:	12192248
GenBank Nucleotide: NM_003256	
Quality 2: known - stated explicitly in GenBank records	

RNA Seq

Las células MCF7 se les extrajo el RNA bajo el método descrito previamente, a las 24 horas de haber recibido el estímulo (Timp4 10nM o Control). Las bibliotecas de RNA Seq fueron construidas usando Illumina TruSeq (Illumina San Diego) con RNA's con una integridad RIN > 8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación de las bibliotecas fue realizada con el equipo GAllx (Illumina). Los Datos de RNA Seq fue analizado con CLC genomics workbench versión 7 (CLC Bio). Los parámetros utilizados fueron: alinear con un máximo de dos mismatches. Todos los transcritos con una expresión relativa menor a 0.2 y menos de 10 lecturas fueron descartados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Illumina). La expresión diferencial fue calculada usando Edge R. Los experimentos fueron realizados con dos réplicas biológicas.

Análisis Bioinformático del RNA Seq:

Se usó a la plataforma de DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discover del National Cancer Institute de los Estados Unidos) para

realizar una anotación funcional y un análisis de términos de Gene Ontology y vías de señalización de KEGG . La significancia estadística fue evaluada con un Fisher Exact test. Para GO y KEGG se consideraron valores de $p < 0.01$ para ser considerados significativos. Se utilizó además la técnica de Master Regulatory Analysis usando el software de IPA, Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Redwood City) . Las vías de transducción de señales que fueron consideradas significativas usando el Master Regulatory Analysis tenían un valor de $p < 0.05$.

Búsqueda de Factores de Transcripción que se unen putativamente a Promotores de Genes regulados Diferencialmente por Timp-4 en el RNA-Seq:

Las Secuencias de Promotores -499 +100 respecto al sitio de inicio de transcripción fueron obtenidos de la base curada Eukaryotic Promoter Database . Las secuencias de los promotores fueran analizadas cada una con el programa Mapper , el cual busca secuencias consenso de unión a factores de transcripción y luego lo combina con Modelos probabilísticos usando cadenas ocultas de Markov. Utilizamos un punto de corte astringente (considerando lo corto de las secuencias de unión a sitios de transcripción) para determinar la validez del factor de transcripción valor $E < 9$ Score > 0 . Para complementar Mapper utilizamos también la herramienta Homer (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment) <http://homer.salk.edu/homer/>. Para obtener los genes aleatorios utilizamos <http://rsat.ulb.ac.be/random-genes.cgi>. Después las secuencias de los promotores los obtuvimos usando Mapper como lo describimos previamente.

Microarreglos de Expresión

Los Microarreglos fueron realizados en el Laboratorio del Dr. Ulises Urzua en la Universidad de Chile Facultad de Biomédicas.

Para los Microarreglos de Expresión usamos 15 mg de RNA de las células HeLa control y de las Células HeLa con Timp4 a una concentración de 10 nM. La integridad de los RNA fue determinada calculando la proporción del RNA 28S y 18 Ribosomal. Solo RNAs con proporciones mayores de 2.5 fueron usadas en los experimentos. La reacción de transcriptasa reversa fue realizada usando 1ug de oligo-dT más 1 ug de random primers hexaméricos en la presencia deL fluorófor CY3 o CY5 (Sigma Aldrich EUA). La reacción fue incubada por 2.5 horas a 42°C. El cDNA obtenido por esta reacción fue colocado en la superficie del microarreglo recubierto con poli-lisina. Se usaron laminillas del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Cáncer de EUA (NCI SAIC-Frederick, Inc, Maryland) y las laminillas tenían impresos en 9961 cDNA amplificado por PCR formando el microarreglo de expresión. La hibridización se realizó a 65°C durante 18 horas. Se hicieron 20 lavados con SDS 2x de 1 minuto cada uno. Los microarreglos fueron secados y escaneados con ScanArray-Lite scanner (Perkin Elmer Boston MA). El fotomultiplicador del scanner fue ajustado para obtener una intensidad de señal máxima con mínima saturación. Las imágenes de Microarreglos fueron guardadas en formato TIFF. La intensidad de la señal fue calculada usando la intensidad media menos el ruido de fondo. Los datos fueron normalizados subsecuentemente por la percentila 50 precalculada.

RESULTADOS

2. Análisis de cambios en el Transcriptoma inducido por la proteína Timp-4 recombinante.

Con el objetivo de iniciar a elucidar vías de señalización que la proteína Timp-4 regula río abajo, decidimos como abordaje inicial conocer que cambios está ocasionando Timp-4 en la transcripción de genes. Para esto realizamos dos experimentos diferentes, uno con microarreglos de expresión (Inciso 2A) y otro mediante RNA Seq también conocida como *whole transcriptome shotgun sequencing* (Inciso 2B). Los Resultados de estos se describen a continuación.

2.B Efectos de Timp-4 sobre el Transcriptoma de Células MCF7 de cáncer de mama medido por RNA Seq (Nota: El inciso 2B e inciso 3 contiene en su totalidad el manuscrito aceptado a publicación: *TIMP4 Modulates ER- α Signalling in MCF7 Breast Cancer Cells. Folia Biol (Praha). 2016;62(2):75-81.*)

Para este experimento se utilizaron la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, la cual de acuerdo a la clasificación molecular de cáncer de mama corresponde a la variante de tipo luminal . Las células MCF7 se les incubó con TIMP-4r a una concentración de 10 nM y se dejó incubar a las células por un periodo de 24 horas. Decidimos usar esta concentración de 10 nM ya que es la concentración que se ha encontrado fisiológicamente en tejidos . Se realizó el procedimiento de RNA Seq también conocido como Whole Transcriptome Shotgun Sequencing. Aquellos transcritos que estuvieran expresados diferencialmente >1.3 o <1.3 se les consideró para la siguiente etapa de análisis. Un total de 3,172 genes estaban aumentados con Timp-4 >1.3 veces respecto al control y 2,858 genes disminuidos. En la Figura 4, se muestra la distribución de los genes expresados diferencialmente por Timp-4.

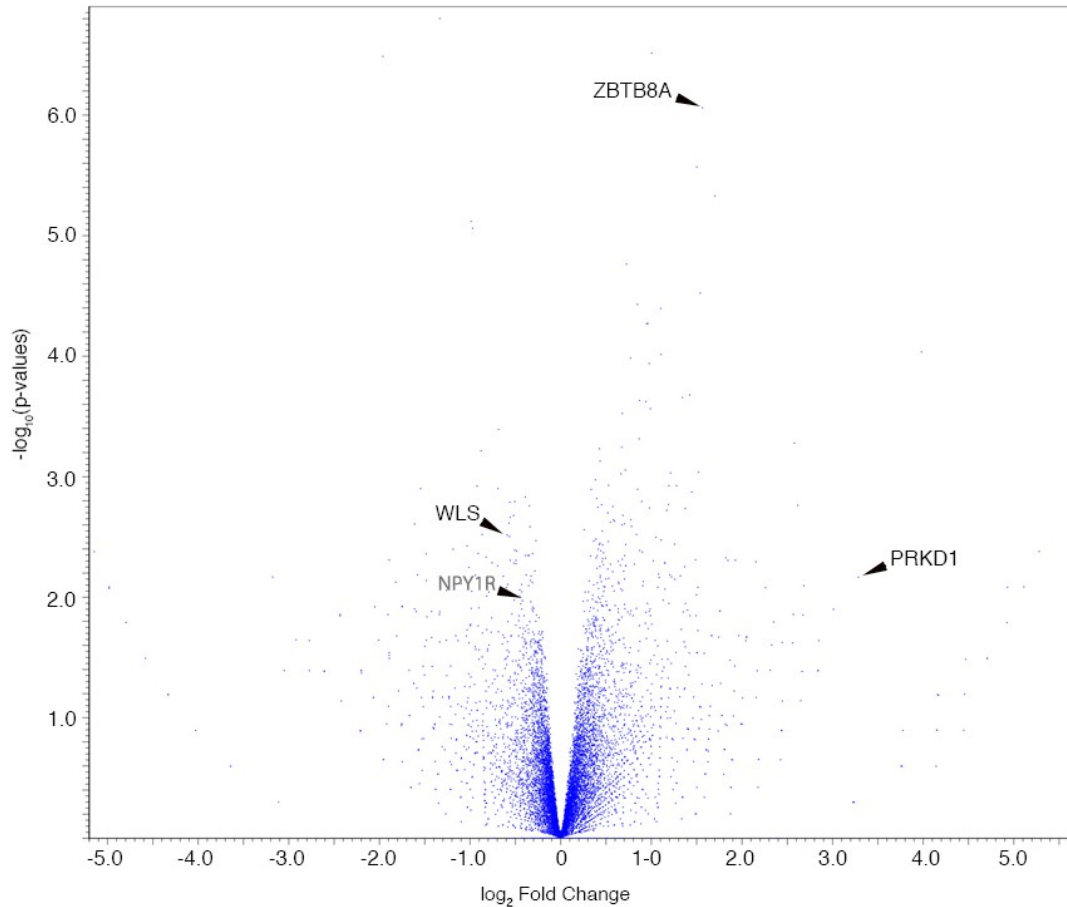


FIGURA 4 Distribución de transcritos en *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing* (RNA-Seq) ante el estímulo de Timp-4.

Las células de cáncer de Mama MCF7 fueron tratadas a 10-nM. Cada punto en la gráfica corresponde a un transcrito. En el eje de las X muestra el cambio en los niveles de expresión de los transcritos (valores negativos aquellos disminuidos, positivos aumentados y en 0 transcritos sin cambios en los niveles de expresión). El eje de las Y muestra el valor de p $-\log_{10}$. Los transcritos expresados diferencialmente son los que se encuentran por fuera del valor de 0 en el eje de las X. Los transcritos que se señalan son aquellos que se validaron por RT-PCR de manera aleatoria.

Finalmente, se filtró a aquellos que aparte de mostrar un cambio de expresión +/- 1.3 veces tuvieran una $p < 0.05$. De estos 341 cumplían con nuestros criterios de

Símbolo De Transcrito	Valor P	Fold Change (Cambio de Expresión)
SLITRK4	0.004182	-35.4398
PATE4	0.008441	-31.6145
RP11-79N	0.00821	-31.6125
CTC-250I1	0.008229	-31.6121
CRB2	0.016243	-27.7861
TFAP2B	0.016242	-27.7861
RP13-131	0.016245	-27.7857
AC093627	0.016313	-27.7853
RP11-22P	0.032154	-23.9594
LIN28A	0.032212	-23.959
LTC4S	0.032408	-23.9585
ARL17B	0.006807	-9.04651
RP11-770	0.04054	-8.29067
CHRNA10	0.022562	-7.57159
RASL10B	0.022881	-6.83485
NBEAP3	0.040674	-6.83397
ROPNIL	0.041343	-6.09862
AC022007	0.040841	-6.09652
MAMSTR	0.040624	-6.09612
WIPF1	0.040623	-6.09612
CACNG6	0.040621	-6.09611
HES7	0.040557	-6.09583
RP11-407	0.013897	-5.40662
RP11-155	0.014264	-5.40492
A2MP1	0.040805	-4.60181
RP11-192	0.040347	-4.59119
FUT9	0.040464	-4.59089
RIMBP3B	0.042584	-4.58802
PABPC1L2	0.012029	-4.14461
RP11-545I	0.022728	-4.02171
RABGEF1	3.26E-07	-3.89798
ATP2B2	0.013935	-3.74761
BFSP2-AS	0.028819	-3.71485
MLLT11	0.00491	-3.71223

selección. La Tabla 2, muestra a los 341 transcritos. Aquellos con valores negativos son los reducidos y aquellos con valores positivos son los aumentados. En la Tabla 3, muestra a aquellos transcritos con los cambios de expresión más representativos.

TABLA 2. Transcritos regulados significativamente por Timp-4 en Experimento de RNA-Seq. La Tabla muestra a aquellos transcritos con un cambio de expresión +/- 1.3 y con una $p < 0.05$ por el efecto de Timp-4 a 10-nM en células MCF7 de cáncer de mama.

TABLA 3. Transcritos regulados significativamente por Timp-4 que presentaron los mayores cambios de

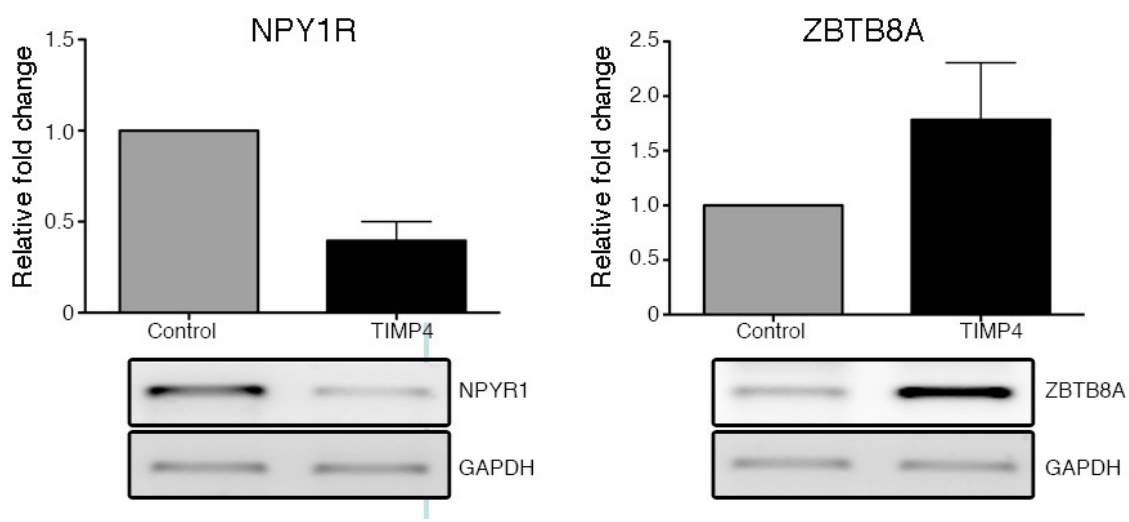
expresión en Experimento de RNA-Seq. La Tabla muestra a aquellos transcritos con un cambio de con un rango de aumento de +51 a +7 veces y un rango de disminución de -35 a -6 veces, bajo el estímulo de . de Timp-4 a 10-nM en células MCF7 de cáncer de mama. Todos con una $p < 0.05$

SLITRK4	-35.4
PATE4	-31.6
RP11-79N23.1	-31.6
CTC-250I14.3	-31.6
CRB2	-27.8
TFAP2B	-27.8
RP13-131K19.2	-27.8
AC093627.9	-27.8
RP11-22P6.3	-24.0
LIN28A	-24.0
LTC4S	-24.0
ARL17B	-9.0
RP11-770G2.5	-8.3
CHRNA10	-7.6
RASL10B	-6.8
NBEAP3	-6.8
ROPN1L	-6.1
AC022007.5	-6.1
MAMSTR	-6.1
WIPF1	-6.1
AC016586.1	7.1
CILP2	7.1
LTB	7.2
RP11-216L13.19	7.2
RP11-834C11.10	7.2
CCDC152	7.2
ASGR1	7.2
EIF4E1B	8.1
PRKD1	9.7
ZFP41_1	15.8
GDPD2	22.1
FOXD4L5	22.1
LAMC3	26.1
BRSK1	26.1
XXbac- BPG252P9.10	26.1
FSCN3	30.4
PCAT1	30.5
C16orf71	34.5
ARMCX2	38.8
CTD-2619J13.9	51.3

Fold Change



Para validar nuestros resultados de RNA Seq realizamos RT-PCR seleccionando aleatoriamente una muestra de cuatro de estos 341 genes. Los genes seleccionados aleatoriamente fueron NPY1R, ZBTB8A, WLS, PKRD1. Estos se encuentran resaltados en la Figura 4. Encontramos concordancia entre los resultados obtenidos por el RNA Seq y por el RT-PCR (transcritos aumentados en RNA Seq están aumentados en RT-PCR; transcritos disminuidos en RNA Seq están disminuidos en RT-PCR), ver Figura 5.



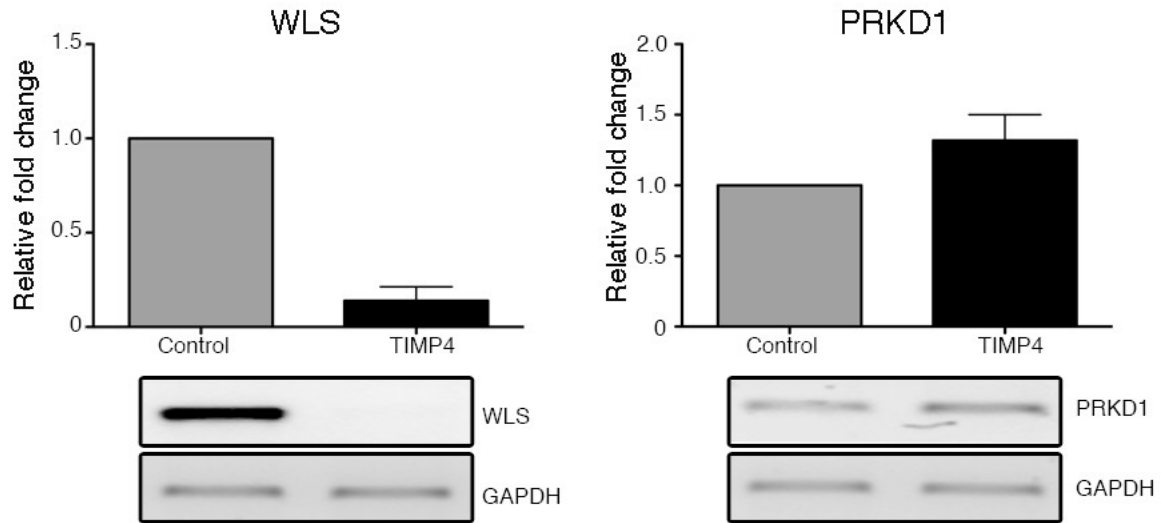


FIGURA 5 Validación del RNA Seq de Timp-4 mediante RT-PCR. Para validar los datos del RNA Seq se eligieron de manera aleatoria transcritos expresados diferencialmente con una p significativa. Se diseñaron los oligonucleótidos específicos. A células MCF7 de cáncer de mama se les trató con Timp4 10-nM y se extrajo RNA a las 24 horas. Se realizaron los RT-PCRs, cuyos resultados son congruentes (si aumentó en RNA Seq transcrito aumentó en RT-PCR y viceversa) con aquellos obtenidos con el RNA Seq por lo que con esto se validó el RNA Seq.

A estos 341 genes regulados significativamente les hicimos análisis bioinformáticos de clustering usando la herramienta David (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) . Los resultados mostraron que las principales categorías funcionales reguladas por Timp-4 fueron comunicación celular, muerte celular, respuesta al Daño de DNA y actividad mitocondrial del metabolismo.

Para determinar vías de señalización reguladas por Timp-4 en nuestros experimentos de RNA Seq utilizamos Master Regulatory Network Analysis de Ingenuity Pathway Analysis. Este análisis sirve para predecir que vías de señalización son activadas o inhibidas ante un estímulo dado . Encontramos que Timp-4 está participando en las células MCF7 en las vías de TGF β , FOXO3, ER α (Receptor de Estrógenos alpha, ESRa) (Figura 6Ay 6B) y secundariamente Wnt y Notch. Es de notar que todas ellas son vías de señalización involucradas en biología del desarrollo y concretamente en la regulación de células troncales .

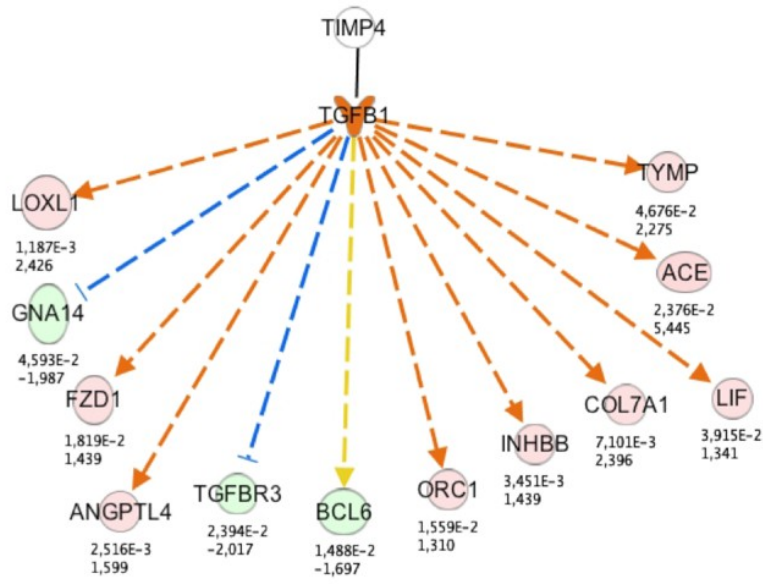
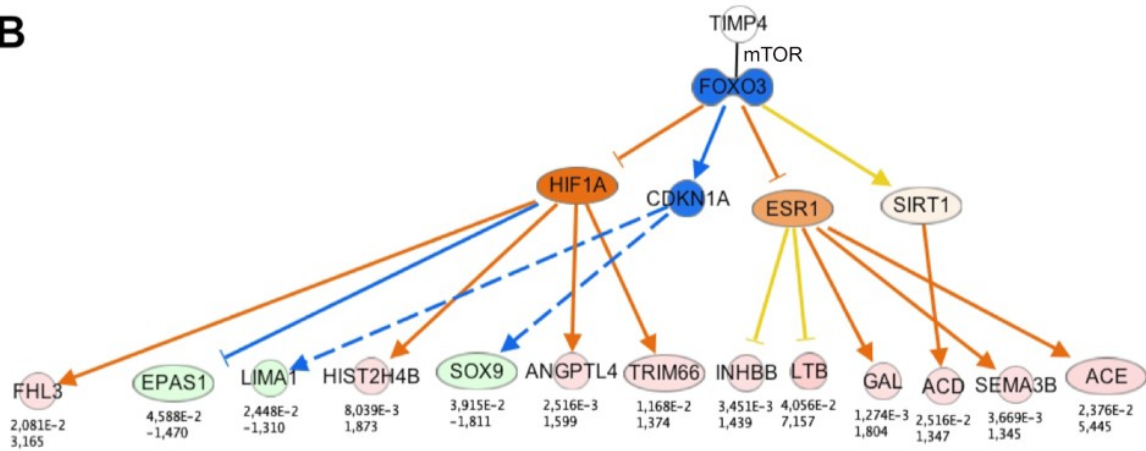
A**B**

FIGURA 6 Master Regulatory Analysis realizado con IPA (*Ingenuity Pathway Analysis Software*) de respuesta Timp4 10n nM en células MCF7.

En el fondo de cada diagrama se encuentran aquellos transcritos expresados diferencialmente por Timp-4. En Verde están aquellos aumentados y en rosa aquellos disminuidos. El valor superior corresponde al “valor de p” y el inferior al cambio de expresión o fold change. En la parte de en medio se muestran a proteínas que se conoce regulan dichos transcritos a lo que llama este sistema “Master Regulator” que están siendo regulados por el estímulo. Y hasta arriba se muestra a Timp-4 como estímulo.

2.A Análisis de un microarreglo de Expresión en células de HeLa de Cáncer Cervicouterino

(Nota: Este experimento lo realicé en la Universidad de Chile para que aprendiera a hacer e interpretar microarreglos de expresión en un programa organizado para estudiantes Latinoamericanos por la European Molecular Biology Organization. El objetivo no era obtener estos resultados para publicación sino como aprendizaje (a diferencia de los experimentos que realicé con RNA Seq). Por el número limitado de muestras que se podían procesar solamente hice los experimentos por duplicado (una réplica del control y una réplica de las condición con tratamiento).

Realizamos microarreglos espoteados de 9,800 genes (en una plataforma Beckton Dickinson) en células HeLa (cáncer cervicouterino). Las condiciones fueron HeLa, Hela control comparando con Hela + TIMP-4 recombinante humana. La concentración que se utilizó fue de 10nM de TIMP-4. Se dejó TIMP-4 por un periodo de 24 horas antes de extraer el RNA. Se escanearon los microarreglos y se obtuvieron los datos crudos, y se normalizaron. En el Heat Map se encuentran los genes (transcritos) disminuidos (Figura 2A) y aumentados (Figura 2B) significativamente.

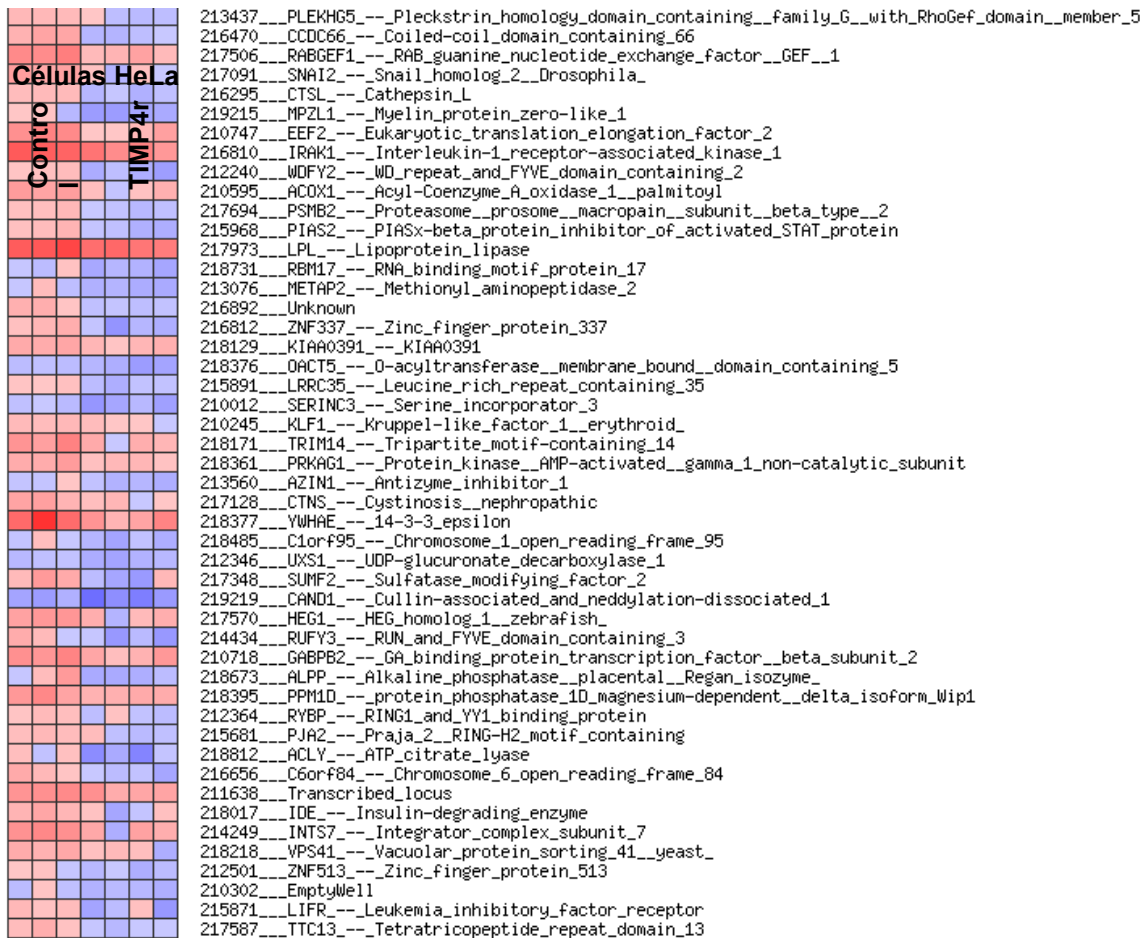
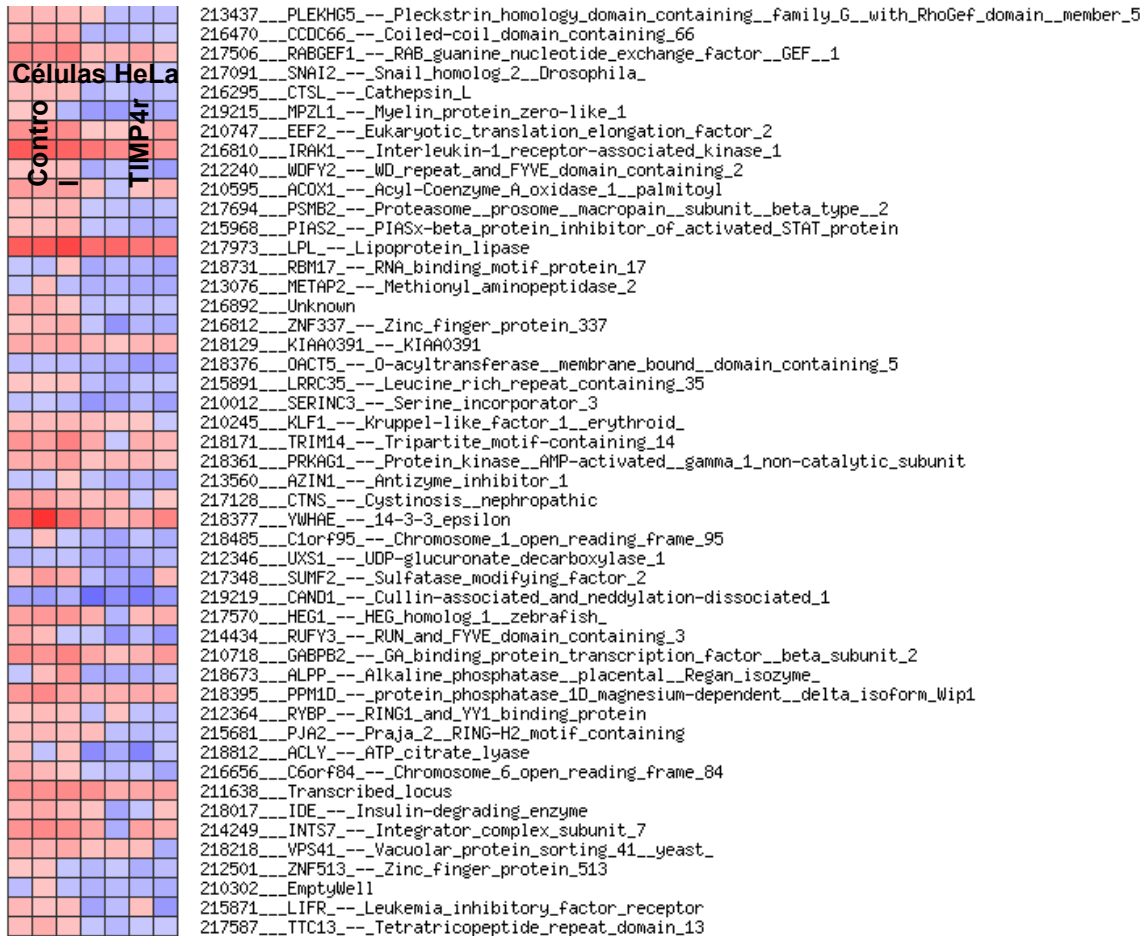


Figura 2A

HeatMap de Transcritos reducidos por Timp-4 10 nM en células HeLa de cáncer de cérvix. Células HeLa fueron tratadas con Timp-4 10nM a las 24 horas se les extrajo RNA para hacer el procedimiento de microarreglos de expresión. En la tabla el número muestra el identificado usado por la plataforma BD de microarreglos, seguido del símbolo y nombre oficial del transcrito. Del lado izquierdo está la condición control y del derecho a aquellas con Timp-4 Los colores rosas denotan aumento de expresión y los azules reducción en la expresión.



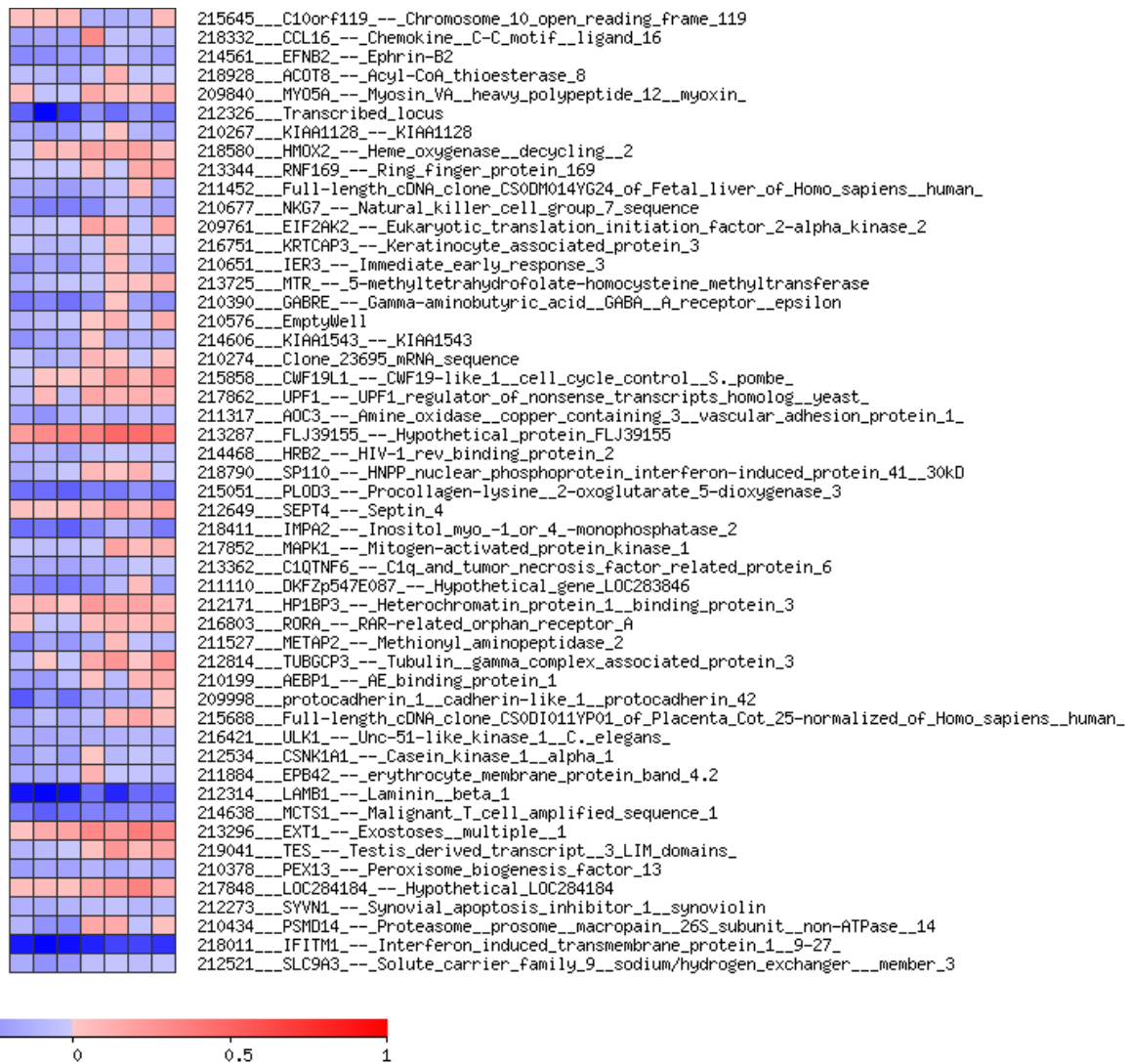


Figura 2B

HeatMap de Transcritos aumentados por Timp-4 10 nM en células HeLa de cáncer de cérvix. Células HeLa fueron tratadas con Timp-4 10nM a las 24 horas se les extrajo RNA para hacer el procedimiento de microarreglos de expresión. En la tabla el número muestra el identificado usado por la plataforma BD de microarreglos, seguido del símbolo y nombre oficial del transcrito. Del lado izquierdo está la condición control y del derecho a aquellas con Timp-4 Los colores rosas denotan aumento de expresión y los azules reducción en la expresión.

Posteriormente, mediante técnicas de minería de datos y análisis de la literatura de los genes regulados diferencialmente se determinó en que procesos biológicos podría estar participando TIMP-4. Los procesos posibles en base a este análisis son producción de células troncales, diferenciación, transición epitelio mesénquima, apoptosis y respuesta al Daño del DNA; todos ellos han resultado ser procesos relevantes en la iniciación y progresión del cáncer .

Es interesante notar que ningún transcrito expresado diferencialmente fue compartido entre los experimentos transcriptómicos por RNA Seq en línea celular de cáncer de mama MCF7 y los experimentos transcriptómicos con microarreglos en las células cervicouterino HeLa. Sin embargo ambos experimentos comparten que putativamente Timp-4 está regulando la expresión de genes involucrados en un fenotipo de células troncales (Figura 3)

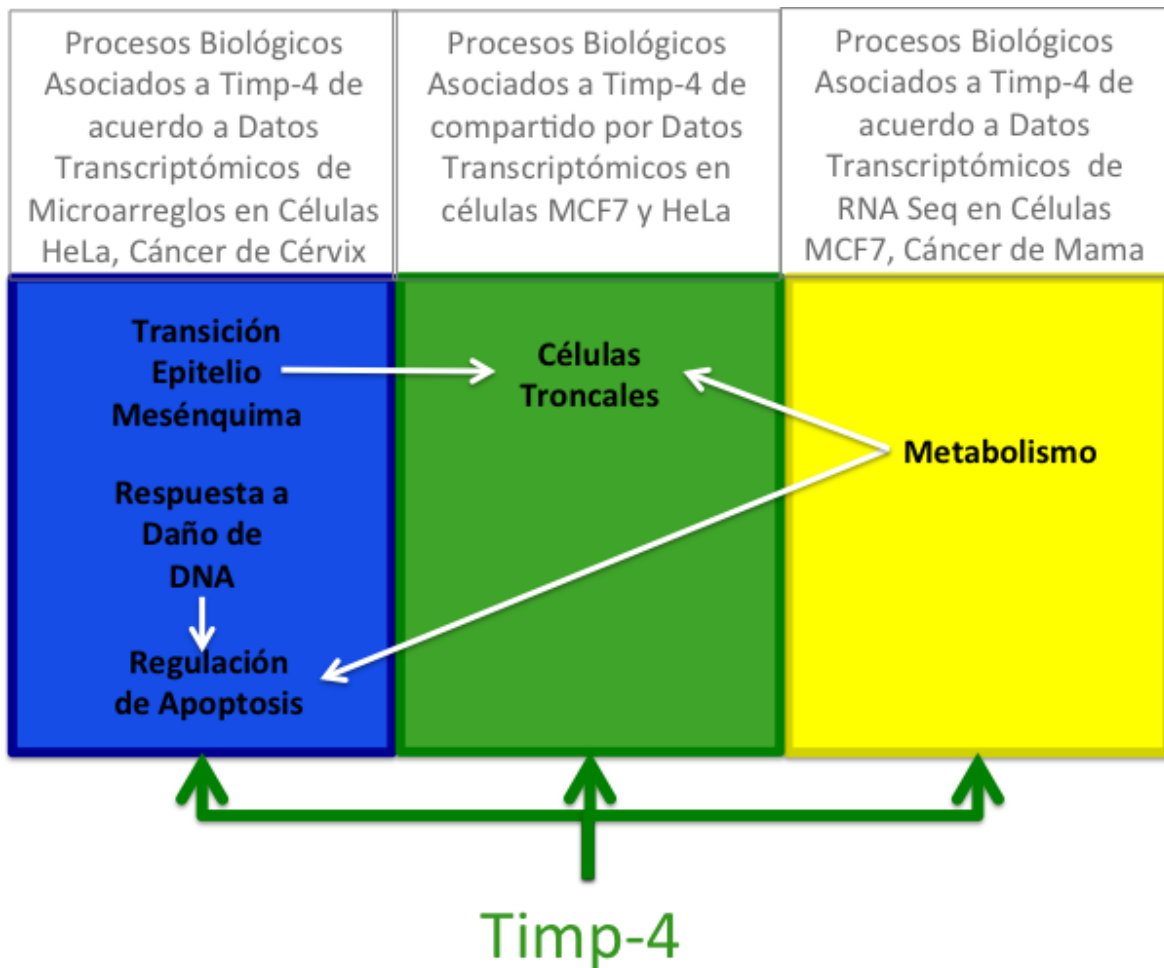


FIGURA 3 Procesos Biológicos en los que participa putativamente Timp-4 en base a nuestros Experimentos Transcriptómicos en células MCF7 de cáncer de mama y HeLa de cáncer de cérvix. El recuadro del lado izquierdo aquellos procesos biológicos observados en datos de microarreglos de expresión en células HeLa. El recuadro del lado derecho aquellos observados en RNA Seq en células MCF-7. En el recuadro de en medio muestra que el fenotipo de células troncales es compartido en los experimentos transcriptómicos tanto en células MCF7 y HeLa expuestas a Timp-4. En ambos grupo experimentales (MCF7 y HeLa), las células fueron expuestas a 10 nM de Timp4 y el RNA fue extraído a las 24 horas del estímulo. Las flechas al interior de los recuadros muestran correlaciones conocidas directas entre los diferentes procesos biológicos. Cambios en el Metabolismo directamente promoviendo un fenotipo de células troncales y regulación de muerte celular. Transición epitelio mesénquima llevando a un fenotipo de células troncales y finalmente Daño al DNA llevando a regulación de muerte celular

3. TIMP-4 modula al Receptor de Estrógenos alfa (ER α) en células MCF7 de Cáncer de Mama

Los genes regulador por Timp-4 en nuestro experimento de RNA Seq en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, mostraron un enriquecimiento significativamente con sitios de unión putativos al Receptor de Estrógenos. De los 341 genes regulados por Timp-4 encontramos que 50 tienen dentro de sus promotores sitios de unión al receptor de Estrógenos (ER α) Tabla 4. Este enriquecimiento de promotores putativamente responsivos a ER α es similar a otras vías y/o procesos que se conocen son regulados por estrógenos y significativamente mayor a promotores de humanos obtenidos aleatoriamente.

TABLA 4 Genes Regulados por Timp-4 que tienen sitios de unión al Receptor de Estrógenos alpha (ER α) en su promotor en células de cáncer de mama MCF7. En las columnas de la derecha aparece el número de sitios de unión a ER α) que tiene cada promotor en particular

Genes Regulados por Timp-	Número de sitios de unión del Receptor ERalpha en promotor del Gen
---------------------------	--

4	
TFAP2B	1
WIPF1	1
RIMBP3B	1
ATP2B2	2
NLRC3	1
PARD3B	3
PI4KAP2	1
HAUS7	2
EIF3CL	1
RFPL1S	1
PEG10	4
CPPED1	4
MTM1	1
E2F5	2
ALDH1L2	4
SEC31B	1
C9orf116	1
SYT17	1
FLRT3	2
PET117	1
CRB3	2
TREX1	4
THAP3	1
SPESP1	1
TRAPPC5	3
SNX22	1
MAMDC4	1
RBAK	1
CARD14	2
DPM3	4
TYMP	3
TMEM191	
A	1
RPSAP58	1
B3GAT3	1
HOXC9	1
GOLGA6L	
5	2
LIN7B	1
CLN3	3

GATSL3	1
LUC7L2	1
FHL3	1
ACE	2
USP44	1
GOLGA8B	1
FCRLB	1
LTB	2
CCDC152	1
ASGR1	1
GDPD2	4
C16orf71	1

Este resultado nos llevó a suponer que Timp-4 pudiera estar regulando al Receptor de Estrógenos (ER α). Para demostrar esto usamos Timp-4 recombinante también a una concentración de 10 nM en células MCF7 y medimos el mRNA de ER α a las 24 horas, donde observamos un incremento del transcrito de ER α (Figura 7A). Posteriormente, medimos la proteína de ER α mediante Western Blot (usando la misma dosis de Timp-4 recombinante) y se midió ER α a los 30 minutos del estímulo y a las 24 horas del estímulo. En ambos tiempos Timp-4 aumentó la expresión de la proteína ER α (Figura 7B). Se usó la proteína TNF α recombinante como control negativo, a una concentración de 20 ng/ml ya que otros trabajos han mostrado que TNF α reduce la concentración de la proteína ER α (Lee and Nam, 2008). A los 30 minutos y a las 24 horas se observó una reducción de ER α ante TNF α como era esperado (Figura 7B). El decremento de ER α inducido por TNF α no pudo ser contrarrestado por Timp4 (Figura 7B). Con estos resultados pudimos determinar que Timp-4 está regulando positivamente a ER α y que un número

importante de los genes regulados significativamente por Timp-4 tiene sitios de unión a ER α lo cual nos sugiere que esta vía es relevante en la respuesta de Timp-4 en las células de cáncer de mama MCF7.

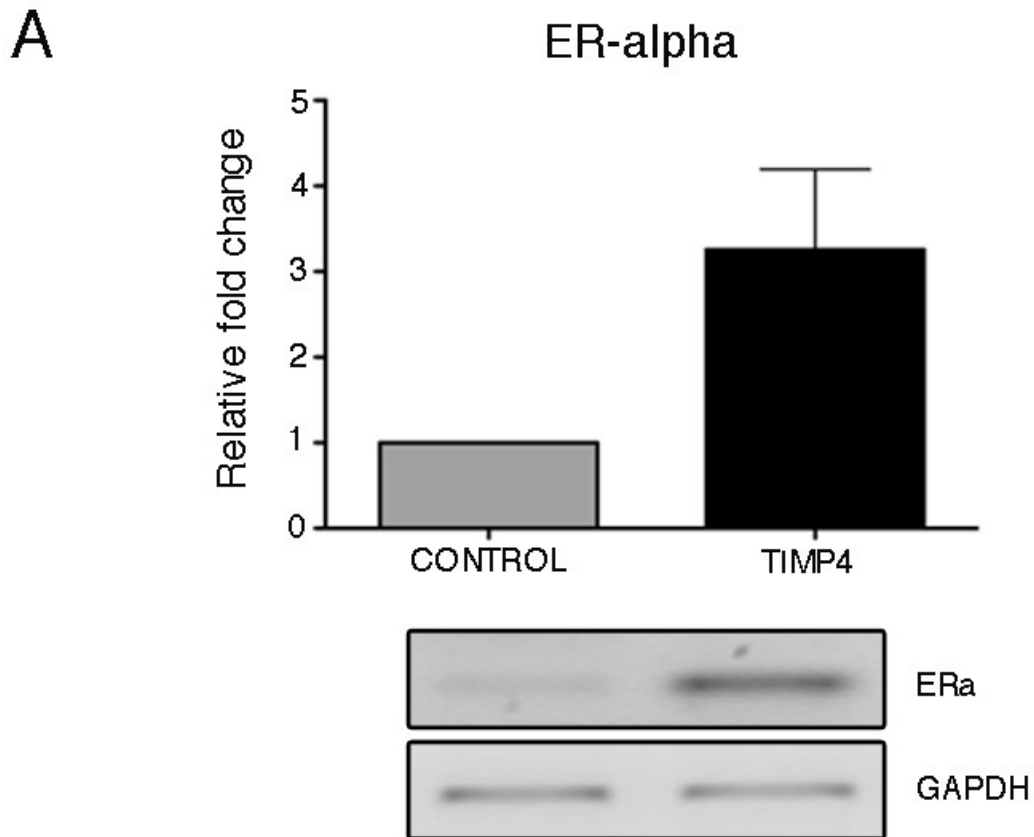
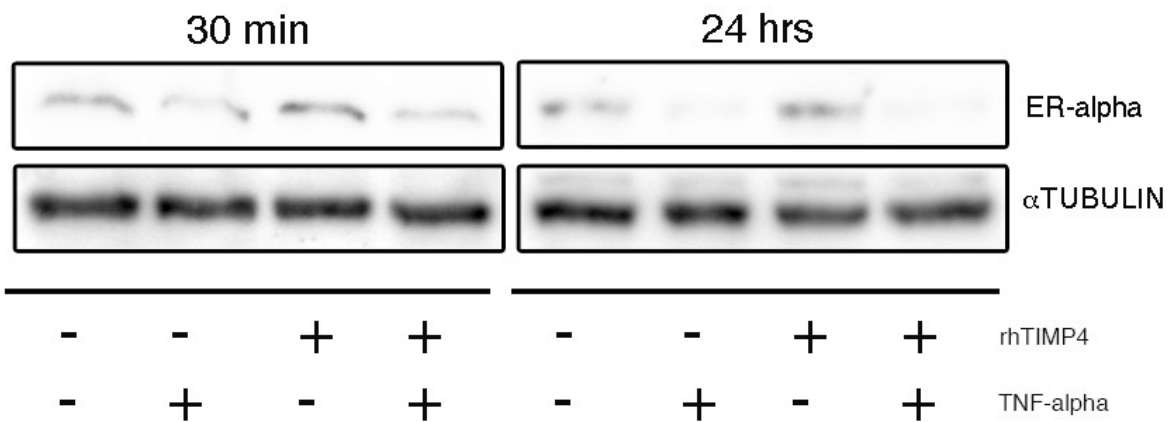


FIGURA 7 A) Timp-4 aumenta el mRNA de ER-alpha. RT-PCR de ER-alpha en células MCF7. Las células fueron expuestas a Timp-4 10 nM por 24 horas.

B



7B) Timp-4 aumenta a la proteína ER-alpha pero Timp-4 no puede rescatar la supresión de ER-alpha inducida por TNFa. Western Blot de ER-alpha en células MCF7. Las células fueron expuestas a Timp-4 10 nM y/o TNFa 20 ng/ml por 30 minutos ó 24 horas. TNFa es un control positivo que suprime a ER-alpha.

4. TIMP-4 modula la Oncoproteína Ikke en células de cáncer de mama

Ikke (IKK ϵ , símbolo oficial IKBKE) es un transcrito que estaba incrementado en el experimento de RNA Seq (Tabla 2) por la proteína Timp-4. El gen Ikke codifica a una proteína con función cinasa que al sobreexpresarse puede actuar como un oncogén en cáncer de mama y participa en la regulación de las vías de NF κ B, Wnt y Jnk las cuales de acuerdo a nuestros resultados están reguladas putativamente por Timp-4. Además Ikke aumenta la transcripción y la estabilidad de la proteína ER α , la cual observamos en los experimentos del inciso previo que esta positivamente regulado por Timp-4. Además, también Ikke fosforila directamente a ER α para aumentar su actividad transcripcional. Por estas razones decidimos corroborar que Ikke efectivamente estuviera regulado por Timp-4.

Para esto usamos las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF7 y en estos experimentos además usamos a la línea MDA231 también de cáncer de mama. Sin embargo, la línea celular MDA231 está clasificada molecular al subtipo basal en lugar del subtipo basal que es la MCF7. Las líneas celulares fueron tratadas con la proteína recombinante humana de Timp-4 (rTIMP-4) a una dosis de 10 nM. A las 24 horas se midió el RNA mensajero (mRNA) de Ikke (Figura 8A) mediante RT-PCR. En MCF7 rTIMP-4 indujo un aumento del mRNA de Ikke confirmando el resultado del RNA Seq. Contrastantemente en MDA231 se observó una reducción del mRNA de Ikke (Figura 8B).

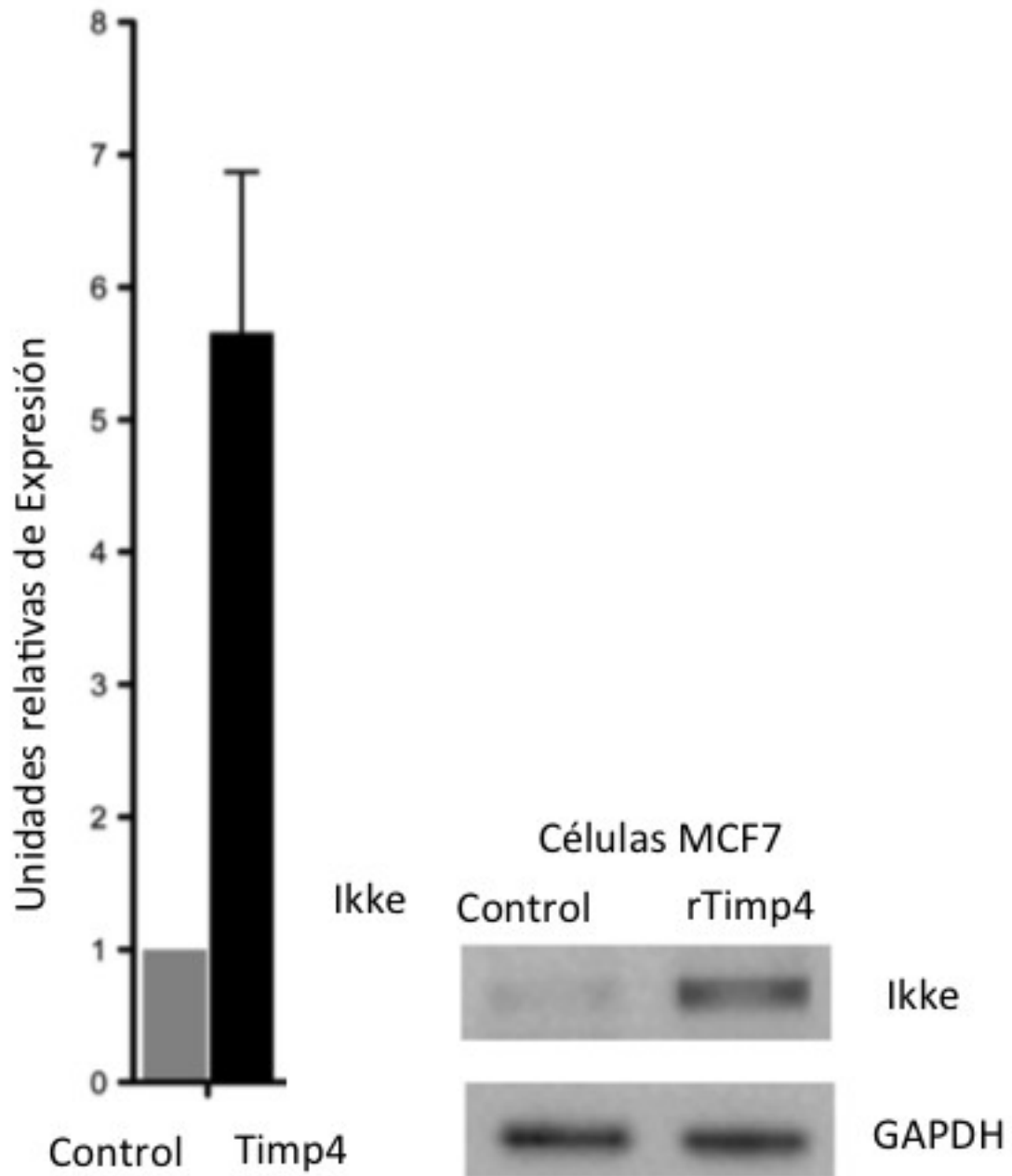


FIGURA 8A Timp-4 aumenta el mRNA de IKKe en células MCF7 de cáncer de mama tipo luminal.

Las células fueron tratadas con Timp-4 a una concentración 10 nM por 24 horas.

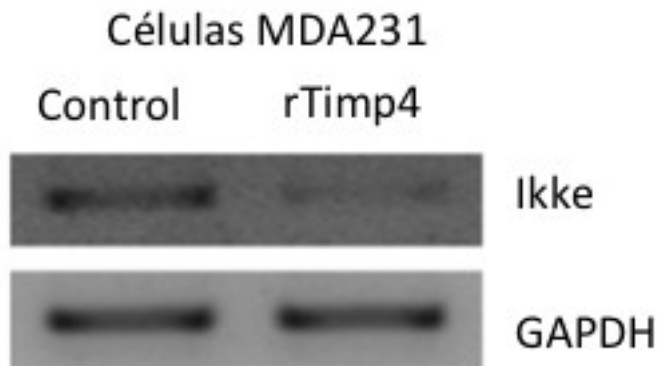


FIGURA 8B Timp-4 reduce el mRNA de Ikke en células MDA231 de cáncer de mama tipo basal.

Posteriormente, se midió el efecto de rTIMP-4 sobre la proteína Ikke con curso temporal de Western Blot en las células MCF7 (Figura 9). A los 20 minutos de haber expuesto a las células a rTimp-4 los niveles de Ikke se redujeron ligeramente. A las 2 horas se observó un importante incremento en Ikke que persiste a las 24 horas. TNFa fue usado para tratar a las células MCF7 y éste se usó a una concentración fisiológica de 20 ng/ml como control positivo. Previamente, se reportó en una línea celular de cáncer de pulmón que TNFa aumenta a Ikke a las dos y a las 24 horas . TNFa desde los 20 minutos incrementó ligeramente los niveles de proteína de Ikke. A las 2 horas y a las 24 horas TNFa induce un incremento de Ikke en esta línea celular, consistente con los resultados previamente publicados . La combinación de Timp-4 y TNFa no presento ningún efecto aditivo sobre la cantidad de Ikke en ninguno de los tiempos (Figura 9).

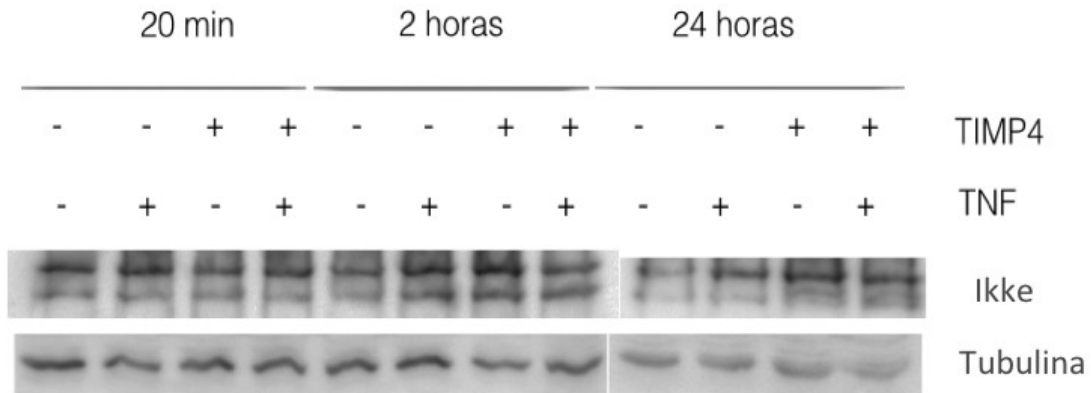


FIGURA 9 Timp-4 aumenta los niveles de la proteína de Ikke a las 2 y 24 horas. El curso Temporal de Ikke ante los estímulos de Timp-4 y ó TNFa en células MCF7. Las células fueron tratadas con Timp-4 10nM y ó TNFa 20 ng/ml en células MCF7 por 20 minutos, 2 horas, 24 horas. Se usó TNFa como un control positivo que aumenta IKKe.

Estos resultados muestran que rTimp-4 aumenta al mRNA y a la proteína de IKKe en células de cáncer de mama MCF7. rTimp-4 reduce a Ikke en células de cáncer de mama MDA231 consistente con los resultados donde se midieron el RNA mensajero de Ikke.

Efectos de Timp-4 sobre la vía y activación de NFkB en células de cáncer de mama

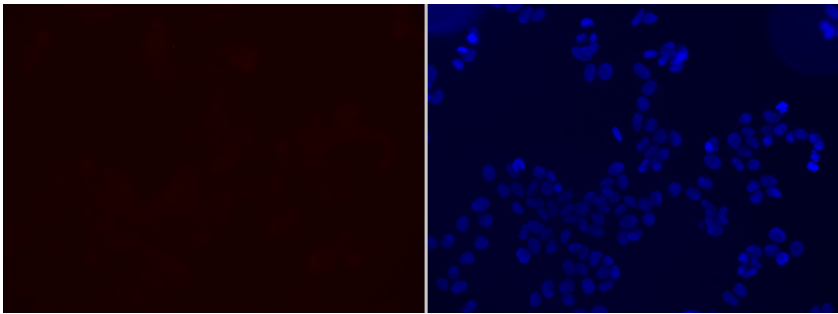
Ikke se ha encontrado que bajo algunos estímulos es un activador de la vía y del factor de transcripción NFκB . Nuestros resultados de RNA Seq sugieren que la vía de NFκB está siendo activada por Timp-4. Debido a esto queríamos determinar si el incremento de Ikke en las células MCF7 inducido por Timp-4 producía también un incremento en la actividad de la vía de señalización de NFκB. Para esto realizamos distintos ensayos para medir la actividad de la vía de NFκB.

El primer ensayo para determinar si Timp-4 estaba aumentando la actividad de NFκB consistió en determinar mediante inmunofluorescencia si la proteína p65 se transloca del citosol al núcleo. La proteína p65 es parte del dímero más frecuente de NFκB, el cual se compone de las proteínas p65 y p50. Este ensayo, translocación de p65 al núcleo es comúnmente usado para determinar actividad de NFκB en su vía canónica ya que p65 debe encontrarse en el núcleo para poder tener actividad transcripcional y cuando se encuentra inactivo está secuestrado por proteínas IκB en el citosol .

Para este ensayo utilizamos como control positivo a TNFα 20 ng/ml el cual activa la vía canónica de NFκB y que está demostrado que transloca a la proteína p65 al núcleo desde los 15 minutos persistiendo el efecto hasta dos horas . En la Figura 10A, se muestran a células MCF7 con tinción nuclear con Dapi con anticuerpos control, en la Figura 10B, se muestran células MCF7 con anticuerpo para p65 donde se observa una distribución principalmente citosólica de p65 como es esperado. En la figura 10C, las células fueron tratadas con nuestro control positivo TNFα en donde observamos que secundario al estímulo p65 se relocaliza al núcleo como es esperado. Sin embargo, en la figura 10D contrario a lo esperado

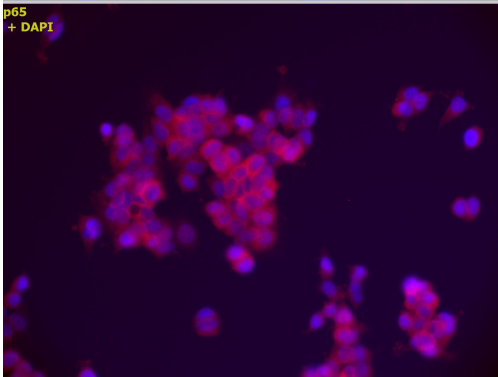
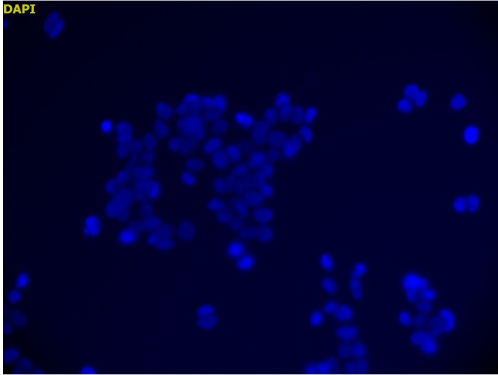
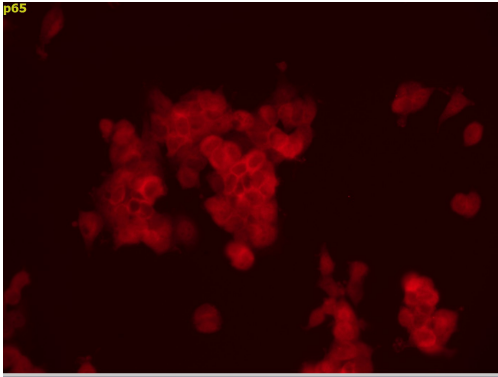
Timp-4 no indujo la translocación del citosol al núcleo de p65. La combinación de Timp-4 y TNFa translocó p65 al núcleo sin mostrar cambios respecto a la de TNFa solo (Figura 10E). Este ensayo nos sugiere que Timp-4 no está activando la vía de señalización de NFkB canónica.

FIGURA 10 Timp-4 no promueve la activación (translocación) de NFkB al núcleo.



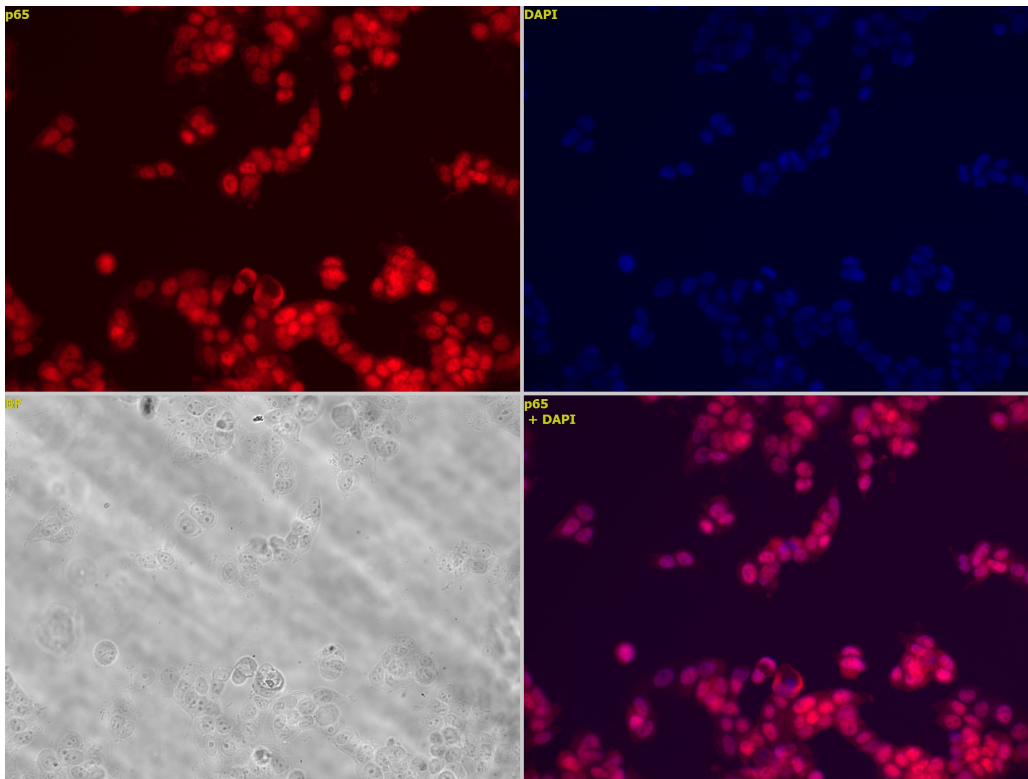
10A MCF7 con Anticuerpos Control de Ratón. Núcleos teñidos con DAPI

MCF7 con Anticuerpos control de Ratón. Imagen izquierda canal para detectar fluorescencia de emisión de 670 nm. Imagen derecha en canal para detectar emisión de longitud de onda 455nm. Núcleos teñidos con DAPI.



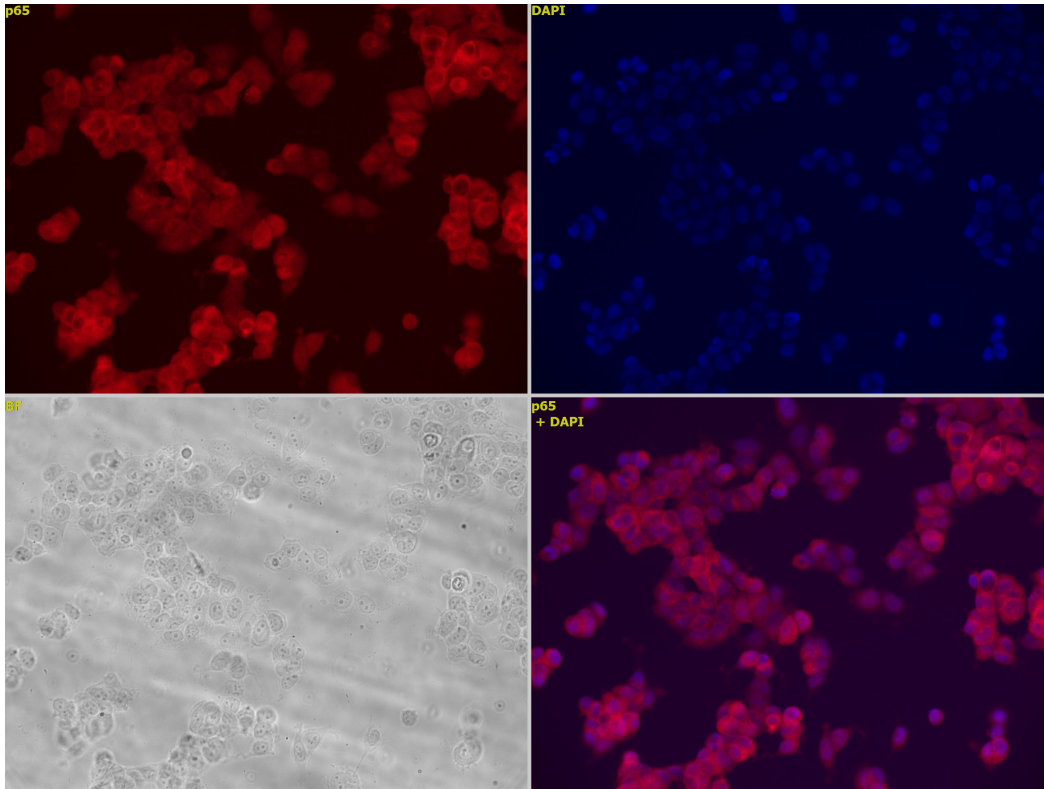
10B: Células MCF7 sin estímulo con Anticuerpos anti-p65-cy5 (NFkB) .

MCF7 con Anticuerpos anti p65-cy5 (NFkB) sin estímulo. Imagen Superior canal para detectar fluorescencia de emisión de 670 nm de anticuerpo anti-p65 con fluoróforo cy5. Imagen de en medio en canal para detectar emisión de longitud de onda 455 nm de Nucleos teñidos con DAPI. Imagen inferior la fusión de las imágenes (merge).



10C MCF7 estimuladas con TNF α . Anticuerpos anti-p65-cy5 (NFkB)

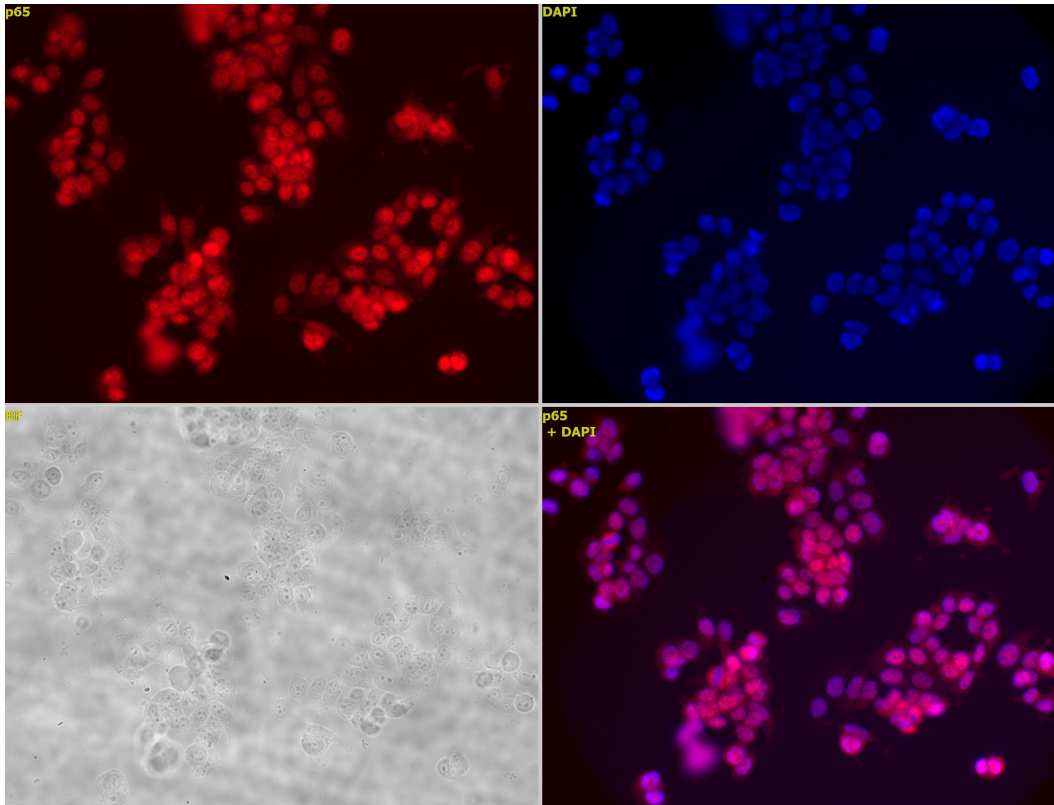
MCF7 con Anticuerpos anti p65-cy5 (NFkB) a los 30 minutos de haber recibido TNF α recombinante 20 ng/ml. Imagen Superior izquierda canal para detectar fluorescencia de emisión de 670 nm de anticuerpo anti-p65 con fluoróforo cy5. Imagen superior derecha en canal para detectar emisión de longitud de onda 455 nm de Nucleos teñidos con DAPI. Imagen inferior izquierda campo claro. Imagen inferior la fusión de las imágenes de fluorescencia (merge).



10D MCF7 estimuladas con Timp-4. Anticuerpos anti p65-cy5 (NFKB)

MCF7 con Anticuerpos anti p65-cy5 a los 30 minutos de haber recibido Timp-4 Recombinante a 10 nM.

Imagen Superior izquierda canal para detectar fluorescencia de emisión de 670 nm de anticuerpo anti-p65 con fluoróforo cy5. Imagen superior derecha en canal para detectar emisión de longitud de onda 455 nm de Nucleos teñidos con DAPI. Imagen inferior izquierda campo claro. Imagen inferior la fusión de las imágenes de fluorescencia (merge).



10D??E MCF7 estimuladas con Timp4 y TNFa. Anticuerpos anti-p65-cy5 (NFKB)

MCF7 con Anticuerpos anti p65-cy5 a los 30 minutos de haber recibido Timp-4 Recombinante a 10 nM y TNFa recombinante 20 ng/ml. Imagen Superior izquierda canal para detectar fluorescencia de emisió de 670 nm de anticuerpo anti-p65 con fluoróforo cy5. Imagen superior derecha en canal para detectar emisió de longitud de onda 455 nm de Núcleos teñidos con DAPI. Imagen inferior izquierda campo claro. Imagen inferior la fusió de las imágenes de fluorescencia (merge).

El segundo ensayo que utilizamos para determinar la actividad de NFKB consistió en un curso temporal de Western Blot donde se midió la translocación de componentes canónicos y no-canónicos del factor de transcripción de NFKB tanto a tiempos cortos como a tiempos largos. Para esto medimos de nuevo a p65, pero también a las proteínas p52 y p100. La translocación del citosol al núcleo de las proteínas de NFKB p52 y p100 proteínas indican la activación de NFKB por vía no canónica. Nuestros controles para determinar que la extracción y separación de

proteínas del citosol y núcleo fuera exitosa fueron Tubulina y Nucleolina respectivamente. TNFa fue usado de nuevo como un control positivo para activar la vía canónica de NFkB. Los tiempos de medición fueron 20 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Nuestro control positivo TNFa aumenta la translocación al núcleo de p65 desde las 2 horas y también se observa que aumenta desde las 6 horas la translocación de p100 y p52 (Figura 11), con lo que sugiere que en la línea celular MCF7, TNFa no solo activa la vía canónica de NFkB sino también vías no-canónicas de NFkB. Se observa que con Timp-4 a los 20 minutos p65 nuclear se reduce mientras p65 citosólica aumenta levemente (Figura 11), sugiriendo que a este tiempo Timp-4 pudiera estar reduciendo la actividad de la vía canónica de NFkB. Timp-4 no cambió la translocación de p65 a los otros tiempos. No se observaron cambios de la fracción nuclear de p100 ó p52 inducidos por Timp-4 (Figura 11). Estos resultados sugieren que Timp-4 podría estar reduciendo la actividad de la vía canónica de NFkB en tiempos cortos, y no está modificando la actividad no canónica de NFkB.

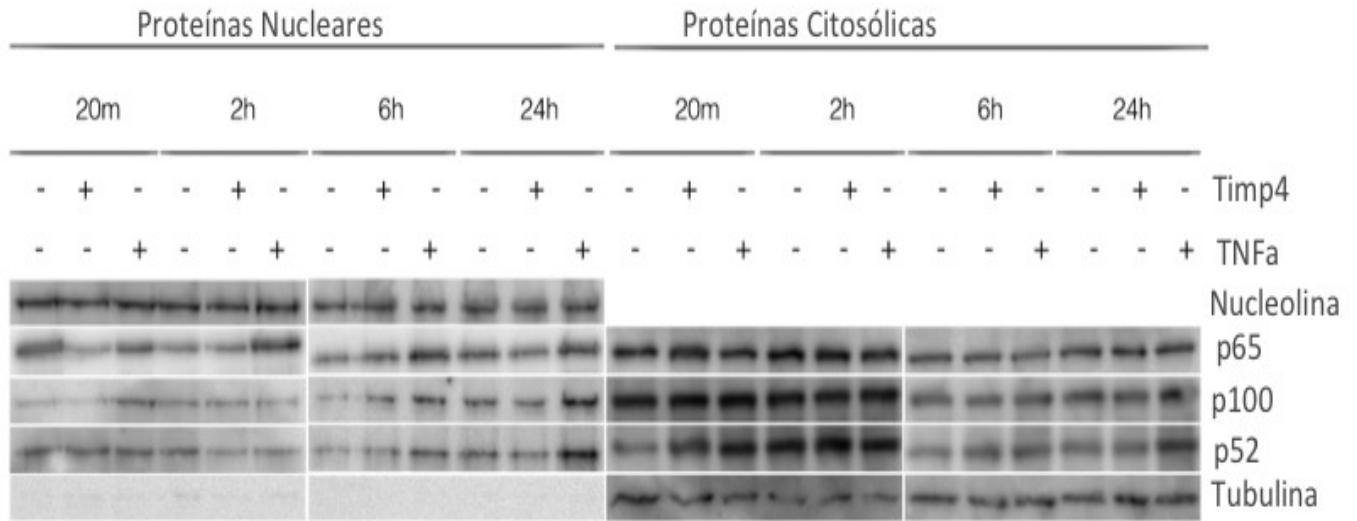


FIGURA 11 Curso temporal de fracciones citosólicas y nucleares de proteínas de la vía de NFκB ante los estímulos de TNFα y Timp-4 en MCF7. Las células fueron expuestas a Timp-4 10 nM y/o TNFα 20 ng/ml. Las proteínas se extrajeron a los 20 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Se obtuvieron y separaron las fracciones proteicas de los compartimentos de citosol y núcleo. Se midieron las proteínas de NFκB p65 (vía canónica NFκB) y p100 y p52 (vía no canónica de NFκB). Las proteínas Nucleolina y Tubulina fueron para demostrar la separación de los compartimentos nuclear y citosólico.

En el resultado pasado mostramos que Timp-4 a tiempos cortos (20 minutos) podría estar reduciendo la actividad de la vía canónica de NFκB (Figura 11), sin embargo, para determinar si este cambio era funcional decidimos medir si Timp-4 estaba modificando la actividad transcripcional de NFκB mediante un ensayo de reportero con Luciferasa. El vector reportero que utilizamos contiene un promotor con sitios consenso de reconocimiento para la proteína de NFκB (p65/p50) y el gen de la luciferasa funciona como su reportero. Esta construcción la ligamos a un vector el cual transfectamos establemente a las células MCF7. Por lo tanto, las células transfectadas que tengan actividad de NFκB expresaban a la luciferasa.

Las células transfectadas con este vector que fueron expuestas a la proteína de rTIMP-4 a una dosis también de 10 nM. TNFa fue usado también como control positivo. rTIMP-4 no modificó la actividad de NFkB medida por luciferasa en ninguno de los tiempos de 20 minutos, 2 horas, 24 horas respecto a sus controles (Figura 12). Nuestro control positivo con TNFa aumentó la actividad de NFkB en los tiempos de 20 minutos, 2 horas, 24 horas (Figura 12) como se había anticipado y por lo tanto demuestra que nuestro sistema para detección de actividad de NFkB funciona. La combinación de TNFa con Timp-4 respecto a TNFa no mostró cambios a los 20 minutos o 2 horas. La combinación de TNFa-Timp-4 a las 24 horas aumentó respecto a TNFa solo, sin embargo el cambio no fue significativo $p=0.78$ (Figura 12).

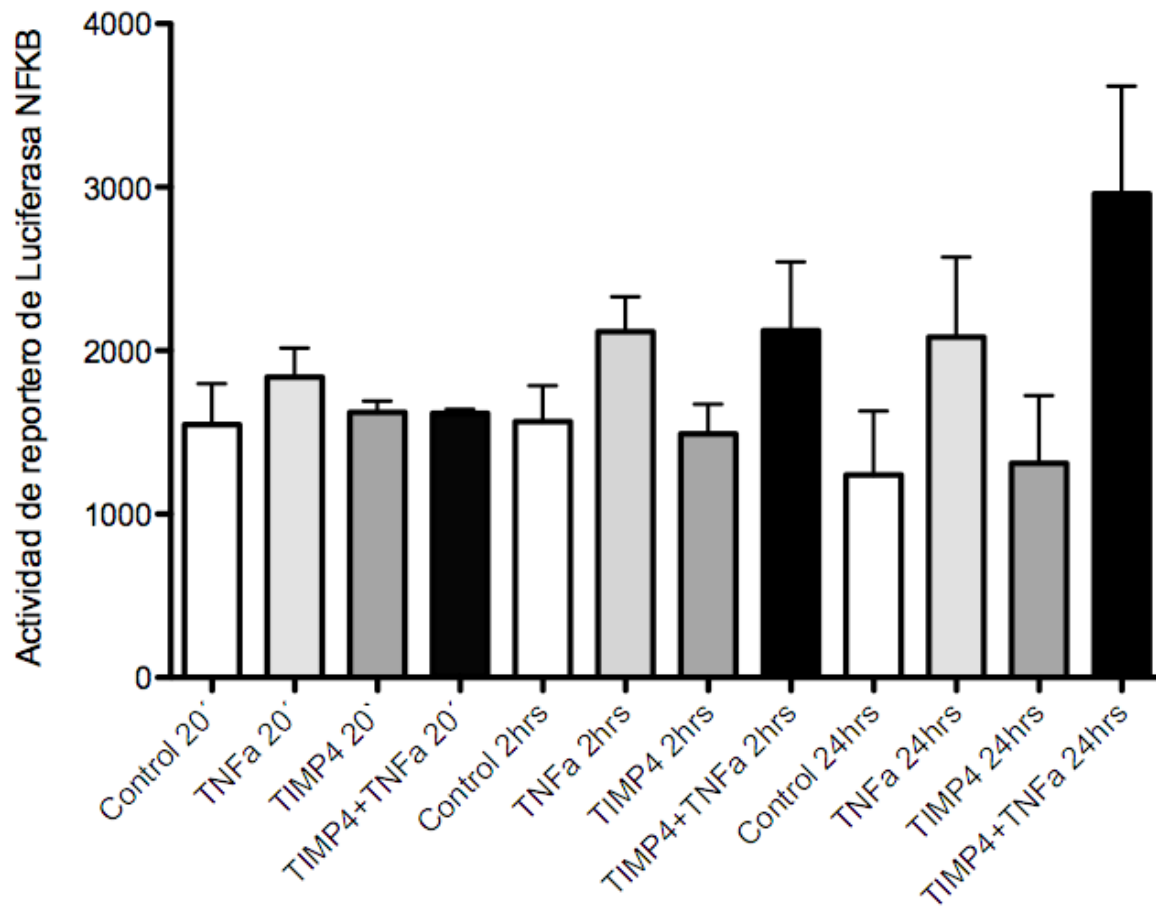


FIGURA 12 *Timp-4* no aumenta la actividad transcripcional de *NFKB*. Se usó un ensayo de gen reportero de que expresa la luciferasa cuando en su promotor se une *NFKB*. Las células fueron expuestas a *Timp-4* 10 nM y/o *TNFa* 20 ng/ml. Se dejó el estímulo por 20 minutos, 2 horas y 24 horas. *TNFa* fue usado como control positivo para la activación de *NFKB*.

Estos ensayos (Figuras 10, 11 y 12) demuestran que contrario a lo esperado *Timp-4* no está modificando la vía de *NFKB* tanto canónica como no canónica en células de cáncer de mama MCF7.

Efectos de Timp-4 sobre marcadores de células troncales de cáncer de mama

Nuestros análisis de microarreglos en células de Cáncer de Cérvix (HeLa) y los de RNA Seq en células de cáncer de mama MCF7 sugieren que Timp-4 está aumentando las células troncales en cáncer. Las células troncales en cáncer son muy relevantes para dicha enfermedad ya que mantienen el crecimiento tumoral y son aquellas que resisten a la quimioterapia. Por esto decidimos explorar si Timp-4 estaba induciendo este fenotipo.

Nuestro primer abordaje fue determinar si Timp-4 estuviera aumentando marcadores enriquecidos en células troncales en las células de cáncer de mama. Algunos marcadores conocidos que se expresan en poblaciones enriquecidas de células troncales de cáncer de mama son Nanog, Oct4, Sox2, Aldh . Al incubar a las células MCF7 con rTIMP-4r incrementaron a las 24 horas los mRNAs correspondientes a marcadores de células troncales. Los marcadores Oct4, Nanog y Aldh se incrementaron en cambio se redujeron los de Sox2 (Figura 13).

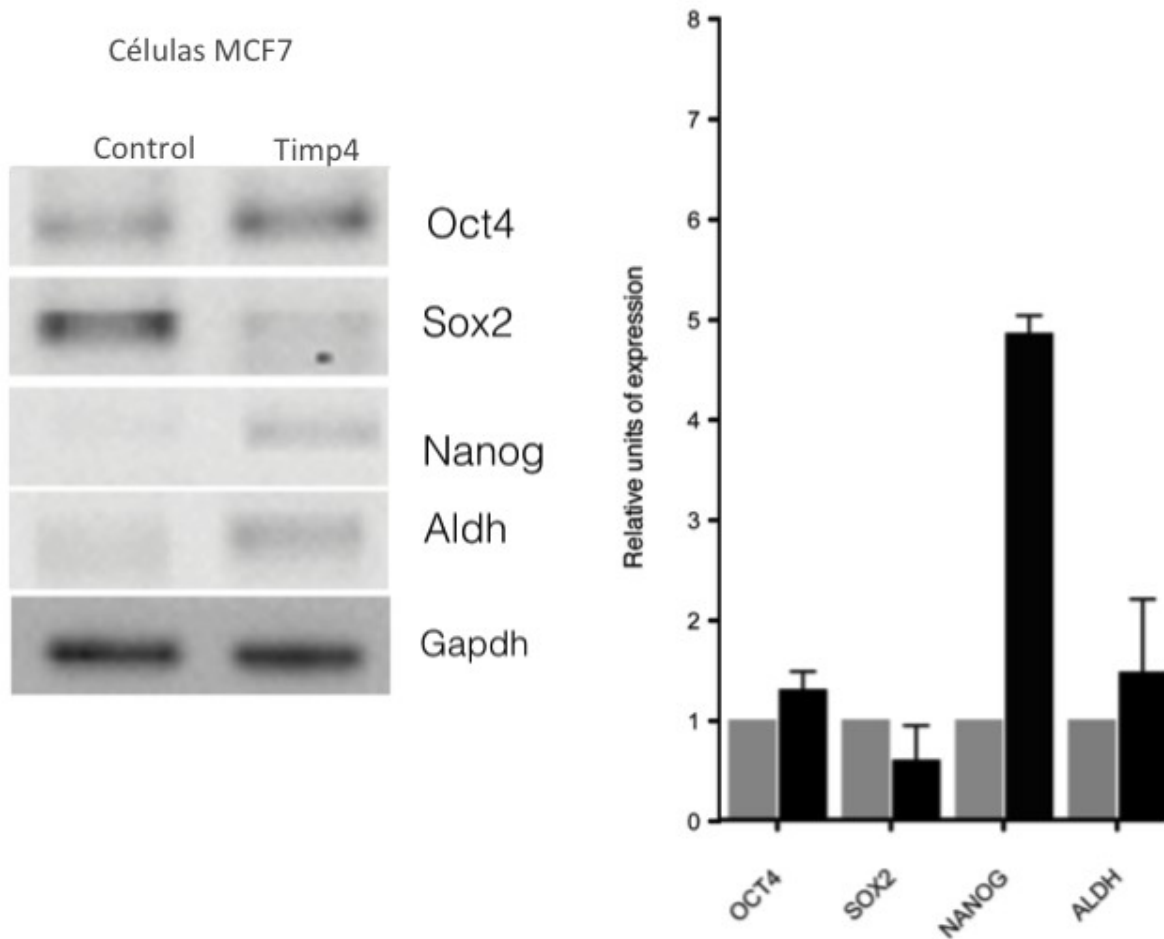


FIGURA 13 RT-PCR de Marcadores de células troncales de cáncer de mama en Células MCF7 expuestas a Timp-4 10 nM.

En las células MDA231 incubadas con Timp-4 10 nM no se encontraron cambios en los marcadores de células troncales (Figura 14). Esto nos sugiere que en la línea celular de cáncer mama tipo basal MDA31, Timp-4 no está induciendo un fenotipo troncal a diferencia de lo que observamos en las línea celular de cáncer de mama tipo Luminal MCF7.

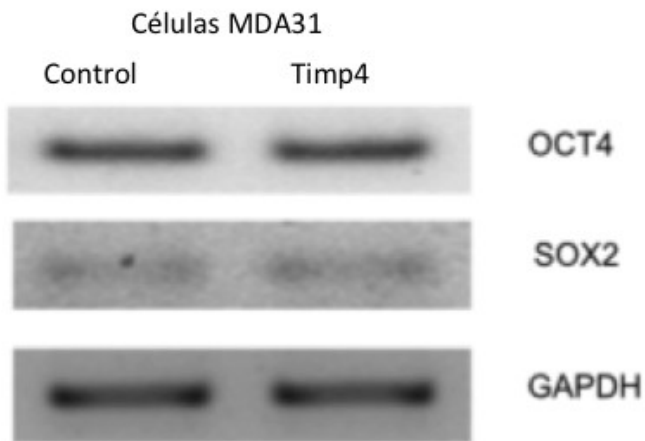


FIGURA 14 RT-PCR de Marcadores de células troncales de cáncer de mama en Células MDA231 expuestas a Timp-4 10 nM.

Efectos de Ikke y el dominio cinasa de Ikke sobre células troncales de cáncer de mama

Efectos de Ikke sobre transcritos reguladores de células troncales

Nuestros experimentos previos del análisis del RNA Seq y Marcadores de células troncales (Figura 13) sugieren que Timp-4 podría estar aumentando a las células troncales de cáncer en la línea MCF7 de cáncer de mama luminal, mas no en la línea celular de cáncer de mama basal MDA 231. Interesantemente, en las MCF7 tanto el transcrito como la proteína Ikke se aumentaban con Timp-4 (Figura 8A y 9). Contrariamente Ikke estaba reducido en las MDA231 tratadas con Timp-4

(Figura 8B). Con esto decidimos explorar si Ikke estaba directamente involucrado en inducir un fenotipo de células troncales.

Las células de cáncer de mama MCF7 y MDA231 fueron transfectadas establemente con vectores de Ikke silvestre (Ikke-wt) y con Ikke con una mutación donde la lisina correspondiente al aminoácido 38 de la proteína se encuentra sustituido por Alanina (Ikke-K38A). Esta mutación hace que Ikke pierda específicamente su actividad de tipo cinasa. El control fue una MCF7 transfectada establemente con un vector que tiene la misma selección (resistencia a geneticina) que los usados para Ikke-wt e Ikke-K38A.

Nuestros resultados donde medimos el mRNA de Ikke muestran que las células MCF7 (Figura 15) y MDA231 (Figura 16) fueron transfectadas establemente tanto con Ikke-wt e Ikke-K38A. Podemos también observar que las células MCF7 transfectadas con nuestro vector control tienen poco Ikke (Figura 15), similar a las células MCF7 sin transfectar (Figura 8A).

En las células MCF7 la transfección con Ikke-wt logró un incremento en los mRNA de los marcadores de células troncales Nanog y de Sox2, pero no de Oct4 (Figura 15). En las células MCF7 control Plxsn (vector vacío) se observa una gran cantidad de Oct4 de manera basal. La transfección con Ikke-K38A eliminó el incremento que se había observado en Nanog y eliminó parcialmente también el incremento observado en Sox2. Los niveles de Oct4 se redujeron con Ikke-K38A respecto a Ikke-wt y del vector vacío (Plxsn), Figura 15. El transcrito de Snail el cual regula la transición epitelio mesénquima y que también mantiene el fenotipo troncal en células de cáncer, aumentó ligeramente con Ikke-wt y mostró una

reducción en las células transfectadas con Ikke-K38A respecto al vector vacío (Plxsn), Figura 15.

En las células MDA231 la transfección con Ikke-wt logró contrario a lo ocurrido en MCF7 una reducción en los mRNA de Nanog, así como una discreta disminución en el transcrito de Sox2. Oct4 en MDA231 no mostró cambios en su expresión en ninguna de las condiciones y también se observa que muestra una alta expresión basal en esta línea celular. La transfección con Ikke-K38A en las células MDA231 no mostró cambios en esta condición respecto a Ikke-wt en Nanog, Sox2 u Oct4 (Figura 16).

Nuestros resultados sugieren que Ikke aumenta a los marcadores de células troncales en la línea celular de cáncer de mama luminal MCF7 y que Ikke depende de su cinasa para este efecto. En cambio en las células de cáncer mama basal MDA231, Ikke no aumenta los marcadores de células troncales.

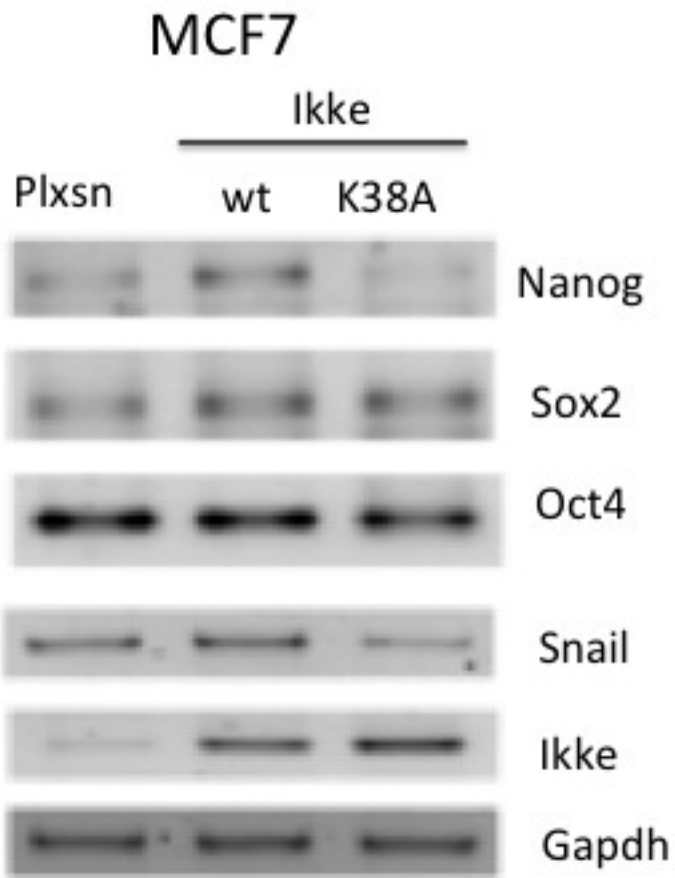


Figura 15 Marcadores de células troncales con Ikke wt / Ikke K38A en células de cáncer de mama luminal MCF7

MDA231

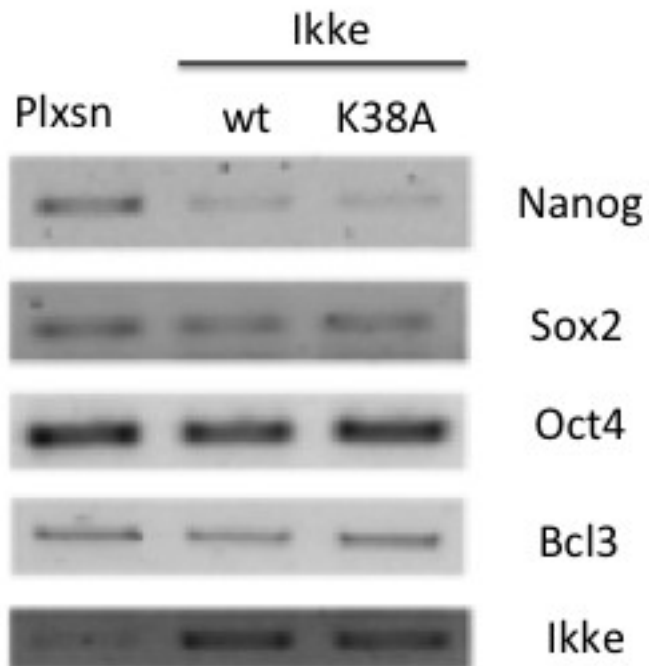


Figura 16 Marcadores de células troncales con Ikke wt / Ikke K38A en células de cáncer de mama basal MDA231

Efectos de Ikke en Células MCF7 en la expresión de las proteínas membranales CD44 y CD24 asociadas a células troncales

Las células MCF7 transfectadas establemente con el vector vacío (Plxsn), Ikke-wt y con Ikke-K38A se les midió mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD24. Todos estas proteínas expresadas en la

membrana celular de la célula son marcadores de células troncales de cáncer de mama. La combinación de la expresión positiva de CD44 y la baja expresión de CD24 (CD44+/CD24low) constituye hasta hoy en día la mejor combinación de biomarcadores para enriquecer/detectar poblaciones troncales de una mezcla heterogénea de células de cáncer de mama .

Para medir este parámetro se deben de medir simultáneamente en la citometría de flujo ambos marcadores CD44 y CD24. Nuestros resultados muestran que las células MCF7 transfectadas establemente con Ikke-wt incrementan significativamente a la población de células CD44+/CD24low y por lo tanto a la población de células troncales de cáncer de mama en la línea MCF7. Las células transfectadas establemente con la versión con cinasa inactiva de Ikke, Ikke-K38A, en cambio no aumentaron la población de células CD44+/CD24low respecto a las células controles transfectadas establemente con el vector vacío (Figura 17). En la Figura 18, observamos también datos de citometría de flujo donde se está midiendo cada marcador (CD44 y CD24) por separado en lugar de combinado como en el experimento previo. Podemos observar como los niveles de CD24 se encuentran más bajos en Ikke-wt, respecto a Ikke-K38A o al vector vacío Plxsn. Para el Marcador CD44 observamos como en las tres condiciones se encuentran positivos para CD44 (Figura 18).

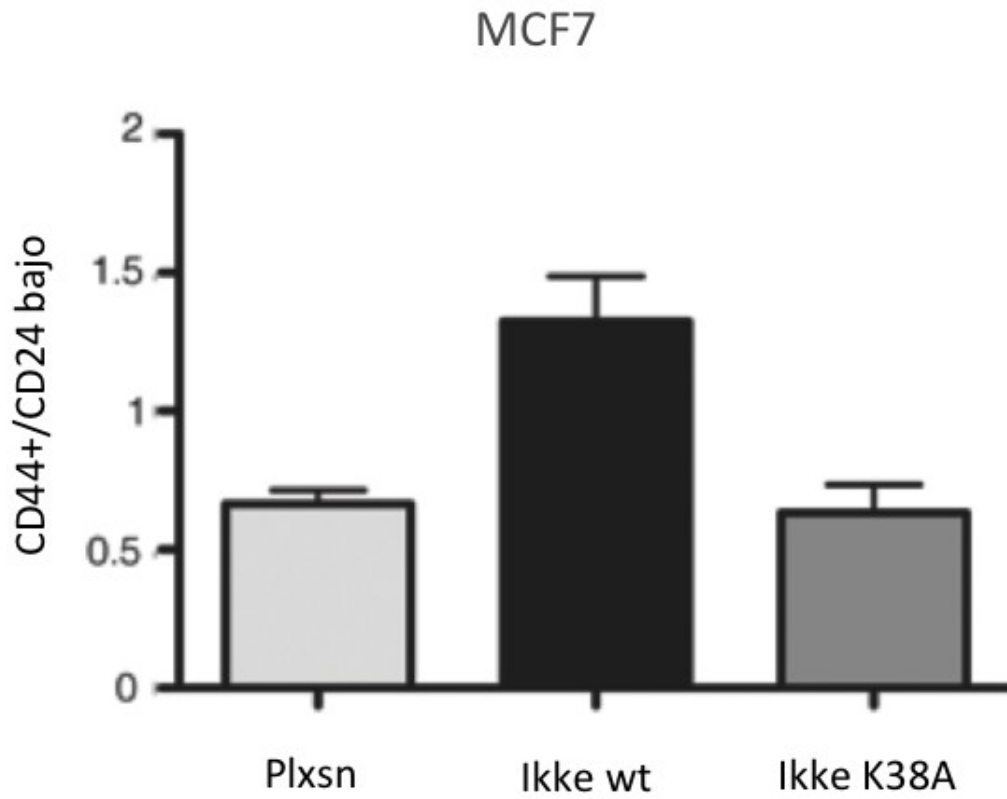
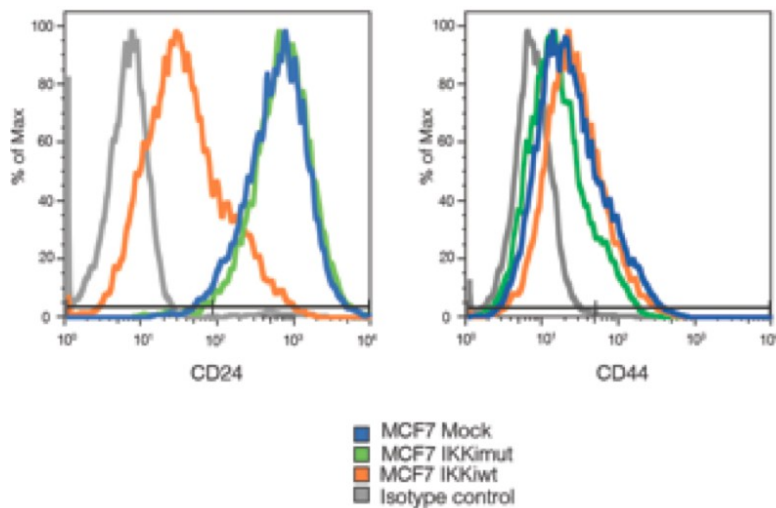


Figura 17 IKKe wt pero no IKKe K38 A con cinasa inactiva aumenta la población de células troncales de cáncer de mama CD44+/CD24^{Low}. Se realizó una Citometría de flujo con marcadores de células troncales CD24 Y CD44 medidos simultáneamente. Medición en células MCF7 con Ikke wt / Ikke K38A.



Nota: En esta figura Ikki=Ikke wt; Ikke mut= Ikke K38A.

Figura 18 IKKe wt pero no IKKe con cinasa inactiva K38A aumenta la población de CD24 en células MCF7. Se realizó una citometría de flujo con marcadores de células troncales CD24 Y CD44 medidos por separado. Medición en células MCF7 con Ikke wt / Ikke K38A.

Efectos de Ikke sobre formación de mamíferas por células troncales

Las formación de mamíferas es un ensayo funcional muy útil para la medición de células troncales en cáncer de mama. Estas consisten en el crecimiento tridimensional (a diferencia de las células de cultivo que crecen en dos dimensiones) de aglomerados provenientes de una sola clona o célula. Cada célula capaz de formar un tumor se le puede considerar una Unidad formadora de Colonia (Tumor) , este es uno de los parámetros que definen a las células troncales de cáncer , el otro es la autorenovación el cual se medirá en experimentos que viene detallados más adelante.

Las células MCF7 transfectadas establemente con Ikke-wt mostraron un incremento significativo de más de dos veces en el número de mamosferas (Figura 19A). Las células transfectadas con Ikke-K38A en cambio no mostraron un incremento tan importante como las Ikke-wt. Posteriormente, se midieron el diámetro promedio de las mamosferas. Ikke-wt incrementó significativamente el tamaño promedio de las mamosferas con respecto a las células control transfectadas con el vector vacío. Aquellas transfectadas con Ikke-K38A no solo no aumentaron respecto a las controles, sino que redujeron su tamaño promedio (Figura 19B). Con estos resultados sugieren fuertemente que Ikke incrementa el número de células troncales de cáncer de mama en la línea celular MCF7.

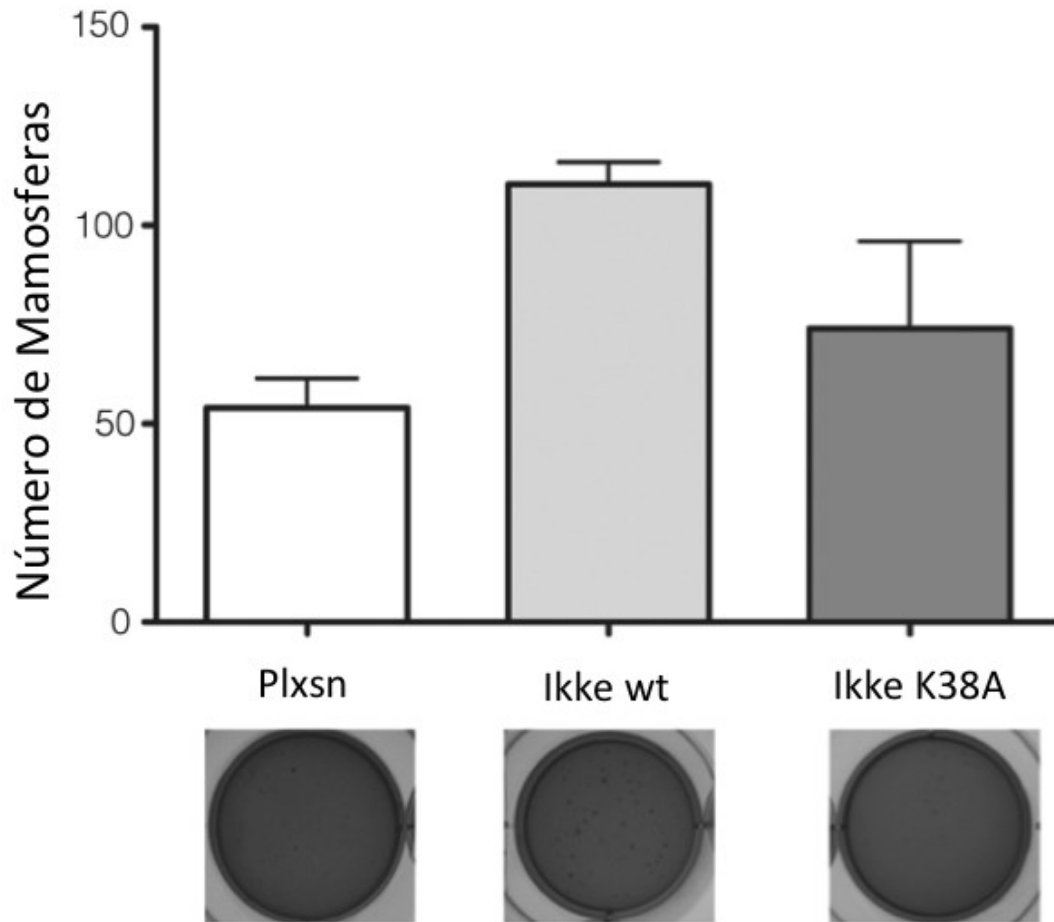


Figura 19 A IKKe wt pero no IKKe con cinasa inactiva aumenta el número de células troncales. Se realizaron ensayos de mamosferas con de MCF7 con Ikke wt / Ikke K38A y se contaron el Número de Mamosferas. Cada mamosfera representa una célula troncal o aquella capaz de reconstituir una mamosfera.

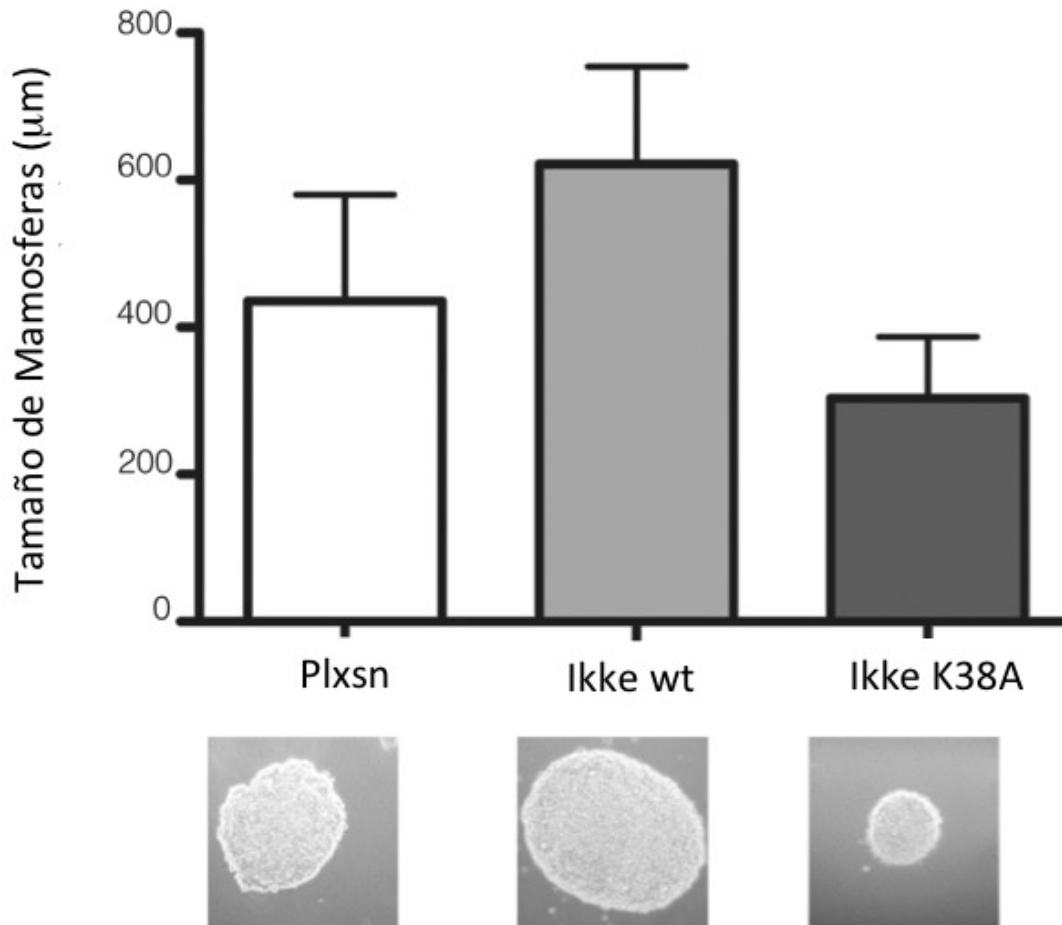


Figura 19 B IKKe wt pero no IKKe con cinasa inactiva aumenta el tamaño de las mamosferas. Se realizaron ensayos de mamosferas con de MCF7 con Ikke wt / Ikke K38A y se midió el tamaño de Mamosferas

Cuando intentamos realizar este experimento de mamosferas para la línea celular MDA231 nunca se formaron las mimos. Una explicación plausible viene de un reporte que establece para poder establecer mamosferas se requiere de la

expresión de Caderina-E y la agrupación de células en epitelios, algo que carece la línea celular MDA231 . Por esto, realizamos en lugar de mamíferas los ensayos de clonogenicidad por dilución limitada (los cuales crecen en dos dimensiones en lugar de las tres dimensiones de las mamíferas) y aunque no son óptimos como las mamíferas para determinar células troncales de cáncer de mama, son una aproximación razonable, debido a que en el ensayo también cada colonia proviene de una sola célula .

Nuestros resultados muestran que en MDA231 la transfección estable con Ikke-wt no muestra cambios significativos respecto al vector vacío en la formación de colonias por el ensayo de clonogenicidad por dilución limitada. A su vez las células con Ikke-K38A tampoco mostraron cambio significativos (Figura 20). Con estos resultados podemos determinar que a diferencia de las células de cáncer de mama MCF7, las células MDA231, Ikke no está aumentando la población troncal de células de cáncer de mama.

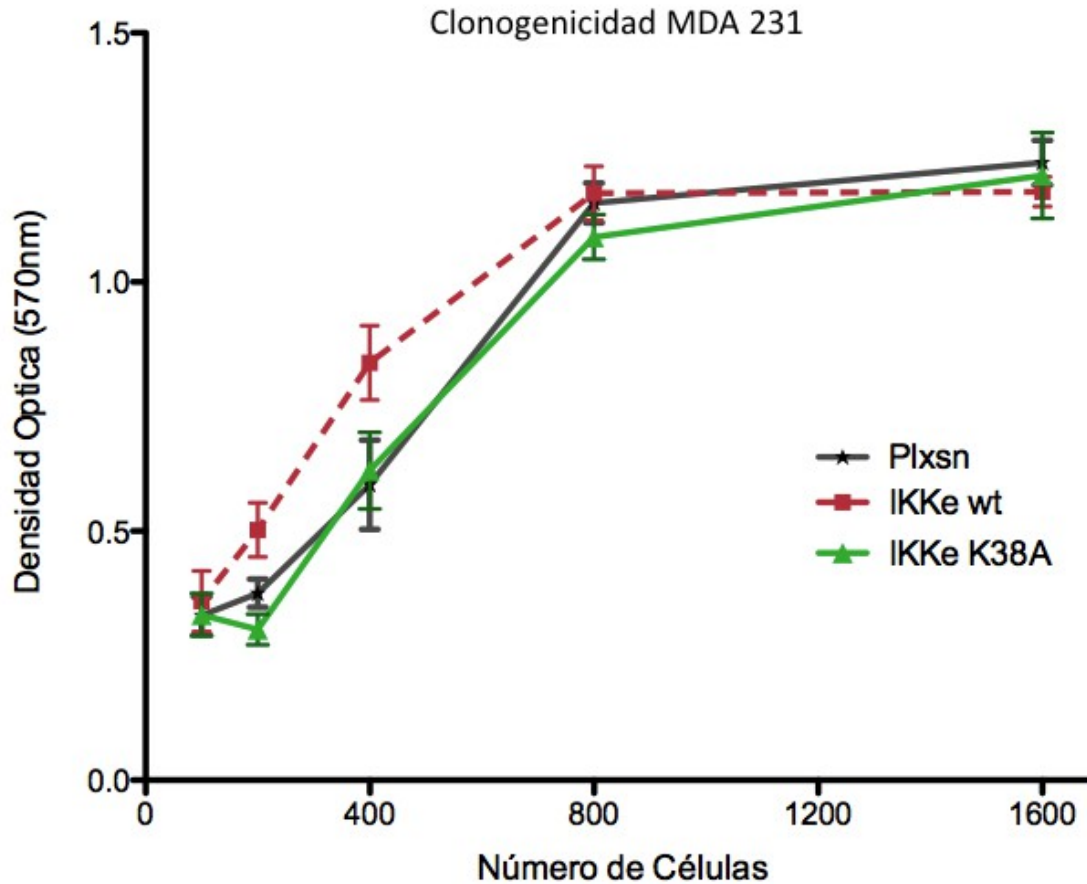


Figura 20 IKKe wt no cambió significativamente la clonogenicidad en células basales de cáncer de mama MDA231 Ensayo de clonogenicidad de células MDA231 con Ikke wt / Ikke K38A

Efectos de Ikke sobre el trasplante serial de mamosferas

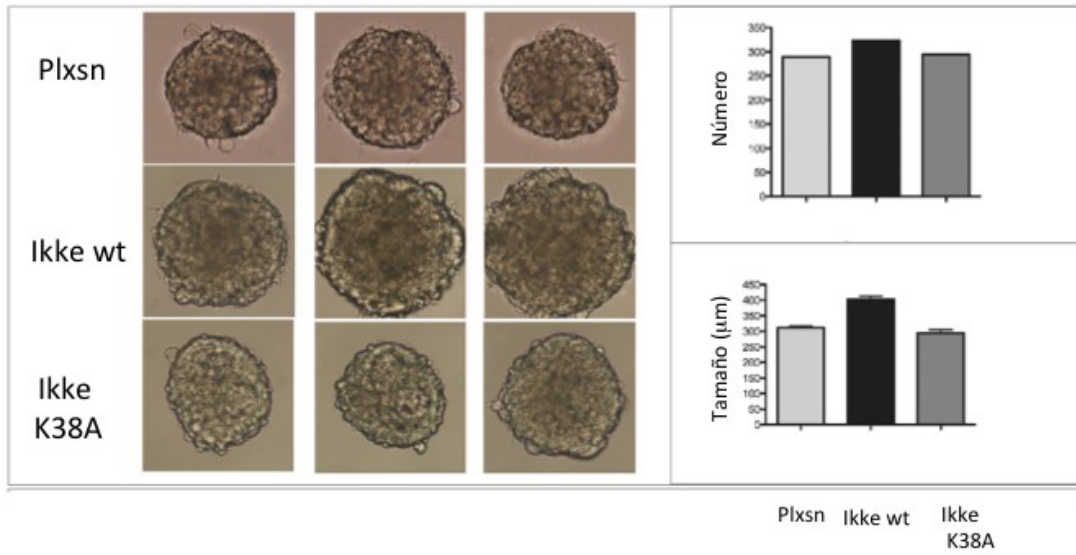
El trasplante serial de mamosferas es un ensayo el cual nos permite demostrar la capacidad de autorenovación de las células troncales que se formaron en las mamosferas. La autorenovación consiste en disgregar las mamosferas que se formaron en células individuales y sembrar (trasplantar) cada célula individualmente para determinar cual vuelve a formar una mamosfera. Este

trasplante se repite hasta una tercera vez para demostrar la autorenovación de las células .

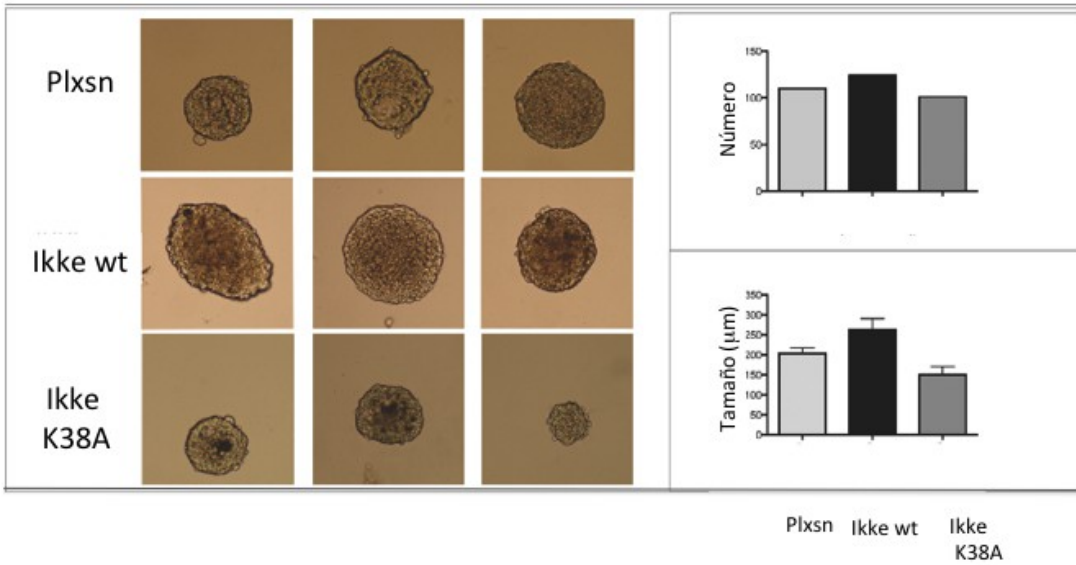
Las células MCF7 transfectadas establemente con Ikke-wt en el primer pase incrementaron el número de mamosferas (Figura 21), a la primer ronda se les conoce como mamosferas primarias, como ya se había mostrado en los experimentos anteriores (Figura 20). En el trasplante producto de la disgregación de las primeras mamosferas, el número de mamosferas (mamosferas secundarias) se mantuvo también mayor respecto al control, lo que nos indica la capacidad de autorenovación de las clonas individuales. También podemos observar que las células MCF7 control ya forman menos número de mamosferas que previo al trasplante. En el trasplante subsecuente la formación de las terceras mamosferas, el número de estas se mantiene incrementado y en los controles el número disminuye aún más. Las células con Ikke-K38A en cambio no mostraron incremento en el número de mamosferas en ninguno de los trasplantes (mamosferas secundarias y mamosferas terciarias) (Figura 21).

El tamaño promedio de las mamosferas fue mayor en aquellas células con Ikke-wt en las primeras mamosferas, así como las mamosferas producto de los trasplantes subsecuentes. Con las células con Ikke-K38A el tamaño de las primeras mamosferas no tuvo cambios respecto al control. Sin embargo, a partir del primer trasplante se observó que el tamaño de las mamosferas comenzaron a reducirse con respecto a las células controles con el vector vacío. En el segundo trasplante (mamosfera tercera) se observa que aquellas con Ikke-K38A el tamaño promedio de las mamosferas se encuentra aún más reducido (Figura 21).

Mamosfera primaria



Mamosfera Secundaria



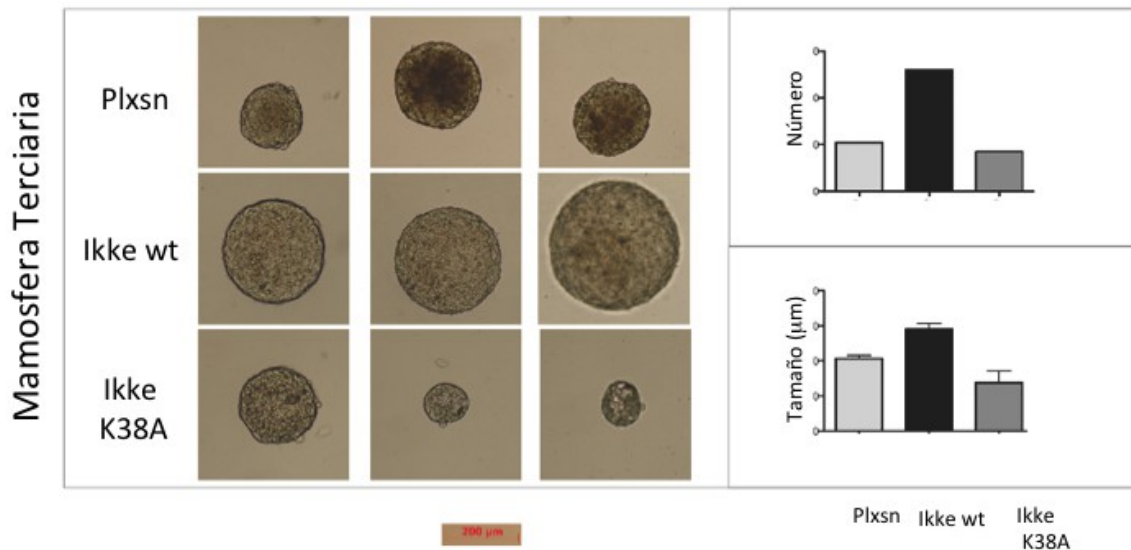


Figura 21 IKKe wt pero no IKKe con cinasa mutada aumentan la autorenovación de células troncales luminales de cáncer de mama MCF7. Se realizaron Ensayos de Mamosferas en donde se Trasplantes seriados en Células MCF7 con Ikke wt / Ikke K38A. La mammosfera se disgregar en células individuales y se siembran sembrar (trasplanta) cada célula individualmente para determinar cual vuelve a formar de nuevo una mammosfera. Se repitió el ensayo por tres generaciones Esta es la prueba funcional de autorenovación es la más relevante de troncalidad.

Efectos de la inyección de células con sobreexpresión de Ikke-wt e Ikke-K38A en ratones Nu/Nu

Se inyectaron a un grupo de 9 ratones inmunosuprimidos células MCF7 con vector vacío, con Ikke-wt e Ikke-K38A de manera subcutánea. Se usaron tres ratones para cada condición. La cepa de estos ratones y estado de salud estaba certificado por el Jackson Laboratory de animales modificados genéticamente (www.jax.org).

Ninguno de los ratones desarrolló un tumor visible en la zona de la inyección cuatro meses posterior a la inyección. Esto se debió muy probablemente aun reporte que menciona que para que las células de cáncer de mama MCF7 formen tumores en ratones desnudos (NuNu) se les tiene que administrar exógenamente Estrógenos .

1. Análisis *in silico* del promotor de TIMP-4

Por último mostramos el análisis del promotor del gen de timp-4 para determinar putativamente por quien está siendo regulado la expresión de este..

Para esto obtuvimos la secuencia del promotor del gen de timp-4 de la base de datos de promotores de Cold Spring Harbor . La secuencia del promotor de timp-4 lo analizamos con las matrices Jaspar y Transfac . Estas matrices mediante secuencias consenso permiten identificar a aquellos factores de transcripción que se unen a una secuencia dada y la localización en la que se unen. Con estas matrices obtuvimos los factores de transcripción que se unen putativamente al promotor de timp-4.

Los factores de transcripción que regulan al promotor del gen de timp4 se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5: Factores de transcripción que se unen putativamente a promotor del gen de
--

Timp4 de acuerdo a análisis bioinformáticos. (En orden alfabético)

c-Myb
C/EBP alpha
C/EBP beta
Elk
Estrogen Receptor Alpha (ER α)
Hen1
IRE-2
Jun
LEF1/TCF
MZF1
NRF1
NRF2
p53
PEA3
PPAR gamma
Retinoic Acid Receptor beta
RXR beta
Smad4
Sp1
Sp1 b
Sp1b
Sp3
YY1

Posteriormente, revisamos la literatura referente a las vías de señalización que río arriba regulan a estos factores de transcripción y construimos una vía de regulación putativa para timp-4 (Figura 1). Entre las vías de señalización destacan Wnt, Notch, E2F1, Erk, YY1, NFKB, vía de respuesta al Daño al DNA y TGF beta (Figura 22).

Es importante notar que estas vías de señalización son relevantes en la biología del desarrollo y están desreguladas en cáncer . La única vía de este resultado que se conoce previamente de manera experimental que regula la transcripción de Timp-4 es la de Erk .

Como mostramos previamente nuestro análisis bioinformático sugiere que el promotor del gen de Timp-4 esta siendo regulado por múltiples vías de

transducción de señales relevantes en biología del desarrollo y cáncer incluyendo regulación de células troncales. Esto está acorde con nuestros resultados experimentales que muestran que Timp-4 promueve el desarrollo de células troncales en la línea celular de cáncer de mama tipo luminal MCF7.

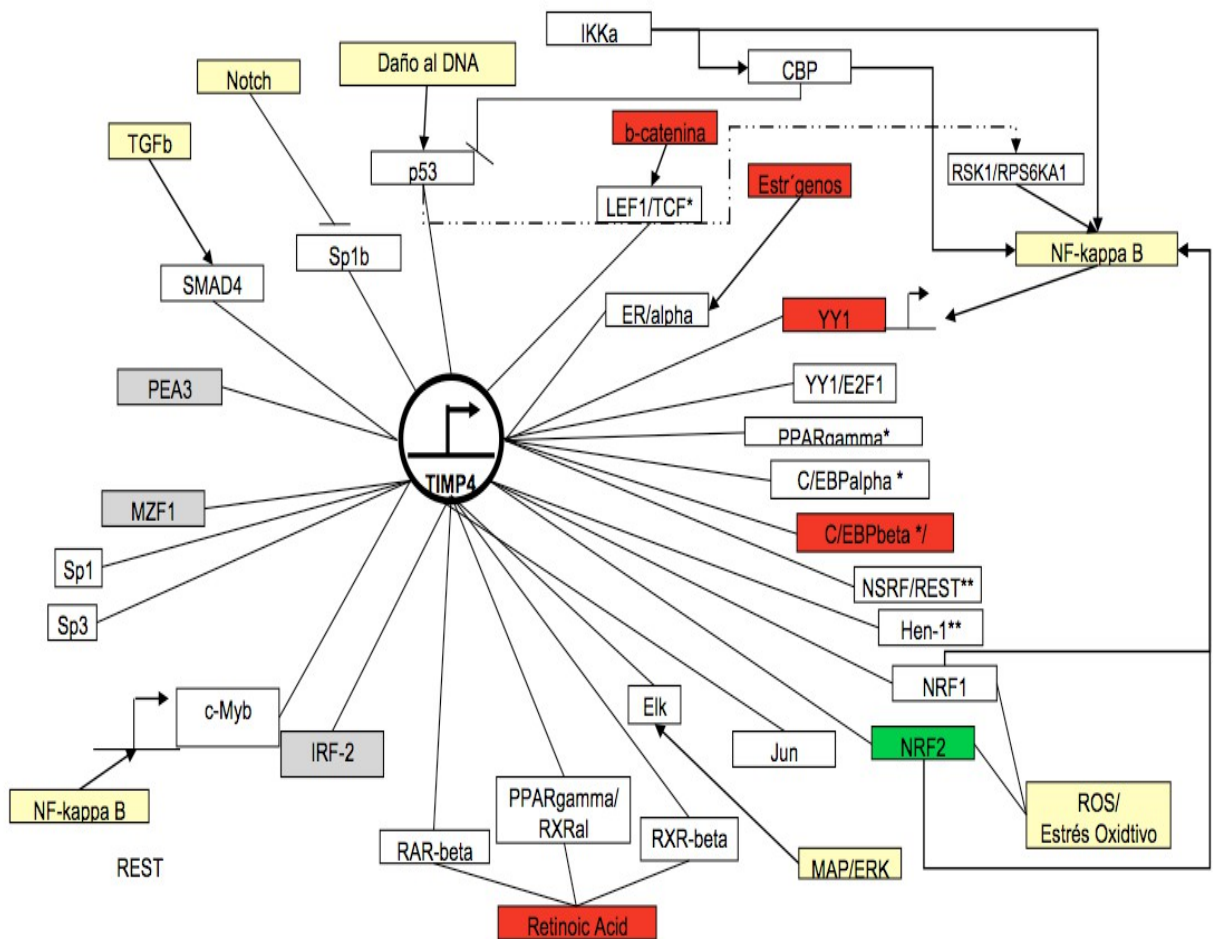
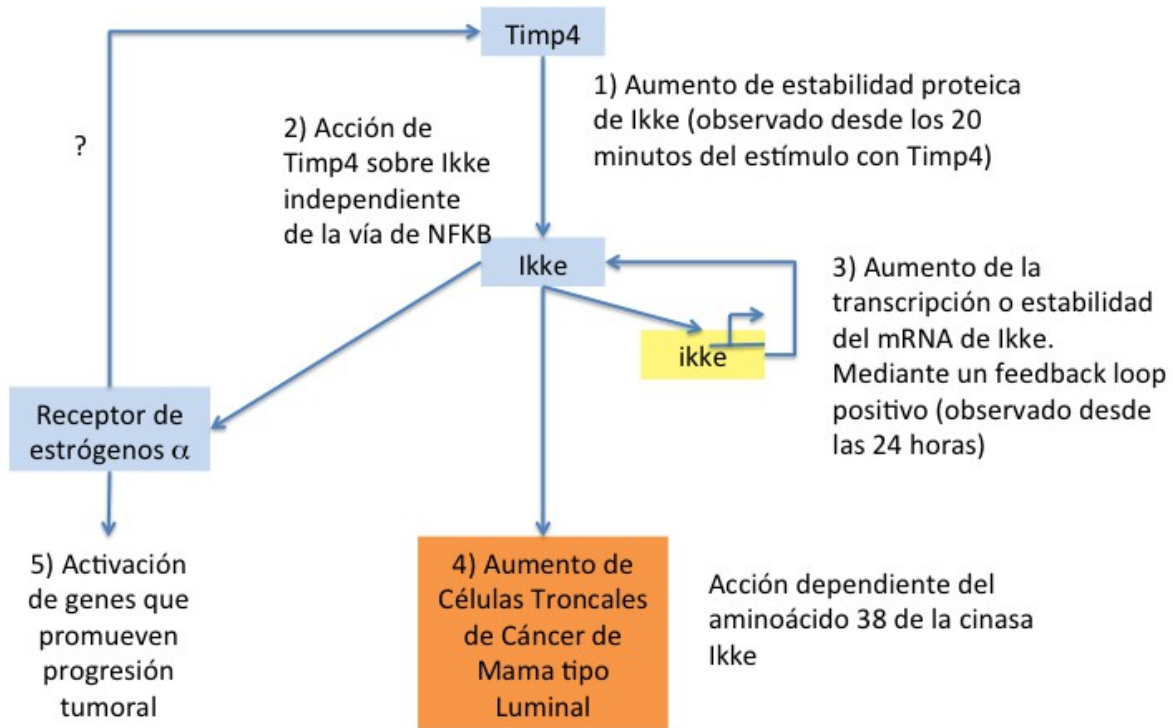


Figura 22. Análisis Bioinformático de factores de transcripción y vías de señalización que regulan putativamente al promotor del gen de timp-4

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diagrama que resume las Conclusiones de los resultados de nuestro trabajo:



Modelo de Acción de Timp4 sobre las células de cáncer de mama tipo Luminal MCF7

1) Timp-4 modula la cascada de señalización del oncogén Ikk-Epsilon (Ikke) en células de cáncer de mama.

Nuestro estudio demuestra que la proteína Timp-4 modula transducción de señales en las células. Esta es la primera vez que se ha descrito que Timp-4 puede activar/inhibir una vía de transducción de señal. Esto es similar a lo que se ha encontrado para otros miembros de la familia de los Timps (Inhibidores de

Metaloproteasas de la Matriz), tales como Timp-1, Timp-2 y Timp-3, donde se ha descrito que independientemente de su actividad inhibidora de metaloproteasas, los Timps pueden directamente activar la transducción de la señal al unirse a receptores transmembranales . Timp-1 puede activar la vía de, PI3k y Stat3, Timp-2 puede activar la vía de NFkB e inhibir la vía de p42/p44 MAPK y Timp-3 puede inhibir la vía de JNK y VEGFR/PI3K .

En nuestro trabajo en células de cáncer de mama pudimos determinar que Timp-4 en la línea celular MCF7 activa la cascada de señalización de la vía de Ikke. La proteína recombinante humana de Timp-4 a una dosis fisiológica de 10 nM aumenta significativamente desde los primeros 20 minutos a la proteína Ikke. Este aumento de la proteína Ikke inducido por Timp-4 se mantiene a las 2 y hasta las 24 horas. Además, Timp-4 promueve a las 24 horas un aumento en el mRNA de Ikke. Este último dato nos sugiere que Timp-4 está induciendo una retroalimentación positiva a Ikke; es decir el aumento de la proteína de Ikke inducido por Timp-4 promueve un aumento en la transcripción de Ikke. Desconocemos si el mecanismo sea mediante el aumento de la transcripción del gen Ikke o mediante un aumento en la estabilidad del mRNA de Ikke.

Ikke es una cinasa del tipo Serina Treonina con un peso molecular de 80 kDa y que se codifica en el cromosoma 1 región larga (q32) . Originalmente la función de esta proteína fue como una cinasa capaz de activar la vía de NFkB . Posteriormente, se ha identificado que además de poder inducir la activación de la vía de NFkB, puede inducir otras vías de señalización relacionadas con la activación de interferones, y las vías de PI3K y Wnt .

Ikke se ha encontrado además que es un oncogén en células de cáncer de mama . Ikke promueve la formación de células tumorales, así como características biológicas propias de las células de cáncer, tales como aumento de la proliferación celular, reducción de la apoptosis, resistencia a la quimioterapia y metástasis . Ikke participa en la activación de múltiples vías tales como NFkB, PI3K, Wnt, ERa. Interesantemente, todas estas vías potencialmente regulan al promotor de Timp-4 de acuerdo a nuestro análisis *in Silico* o computacional.

Nuestro resultado que muestra que Timp-4 aumenta los niveles tanto de mRNA como de proteína de Ikke es muy interesante considerando que un estudio en pacientes con cáncer de mama en etapas iniciales (Etapa 1 de la enfermedad) el aumento de la proteína Timp-4 evaluado mediante inmunohistoquímica confería una importante reducción de la sobrevida de las pacientes . En las pacientes que sobreexpresaban Timp-4 tenían un mayor riesgo de la enfermedad recurriera y de desarrollar metástasis . Por lo tanto, nuestro resultado obtenido con células de cáncer de mama (MCF7) es congruente con los datos de pacientes y con esto nos permite determinar un mecanismo mediante el cual Timp-4 favorece un pronóstico adverso en las mujeres con cáncer de mama.

Interesantemente, cuando determinamos los efectos sobre Ikke con la proteína recombinante Timp-4 administrada exógenamente a otra línea celular de cáncer de mama (MDA 231), nuestra sorpresa fue que en ésta línea celular Ikke disminuía a nivel tanto de mRNA como a nivel de proteína, contrario a lo obtenido con la otra línea celular de cáncer de mama MCF7. Esta divergencia que Timp-4 induzca efectos contrarios en la expresión del oncogén de Ikke puede deberse a la heterogeneidad de las células de cáncer de mama. El cáncer de mama puede ser clasificado molecularmente en varios subtipos. Estos subtipos no fueron identificados sino hasta hace unos 16 años como se mencionó en la Introducción. Esta clasificación molecular fue bien recibida ya que obedecía a la observación heterogénea hecha por los oncólogos y patólogos desde hace más de un siglo que el cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea en cuanto a comportamiento de la enfermedad y pronóstico de las pacientes. Las células de

cáncer de mama se pueden clasificar en cuatro subtipos como se mencionó previamente y que a continuación se resume: 1) Luminal A expresan los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR), suelen tener mejor pronóstico. 2) Luminal B, expresa los receptores ER y PR, sin usualmente una enfermedad más agresiva que la Luminal A. 3) Her2 positivo, son células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor Her2, tienen un mal pronóstico, pero que ha mejorado discretamente trastuzumab el anticuerpo que reconoce e inhibe a Her2. 4) Basal o triple negativo carece de la expresión de los receptores ER, PR y Her2; es el de peor pronóstico.

La línea celular MCF7 corresponde al subtipo Luminal A y la MDA231 corresponde al subtipo Basal o Triple negativo . Otros estudios ya han mostrado que las líneas celulares provenientes de diferentes subtipos de cáncer de mama pueden responder diferente a diversos estímulos.

Nuestros datos muestran que en la línea celular de cáncer de mama MCF7 que corresponde a células luminales Timp-4 induce al oncogén Ikke y en la línea celular de cáncer de mama MDA231 que corresponde a células basales reduce a Ikke. Esto nos lleva a la hipótesis que en pacientes con cáncer de mama tipo luminal aquellas que sobreexpresen Timp-4 tendrán posiblemente un peor pronóstico que aquellas que no sobreexpresen Timp-4. Sin embargo, aquellas pacientes con cáncer de mama subtipo Basal que sobreexpresen Timp-4 podrían tener un mejor pronóstico. Para demostrar esta hipótesis que sugieren nuestros datos tendríamos que hacer un estudio con muestras de pacientes donde se tengan subclasificados sus tumores de mama y medir Timp-4 tumoral y determinar si esto afecta su pronóstico.

2) Timp-4 activa a Ikke independientemente de la cascada de señalización de NFkB en células de cáncer de mama tipo luminales

Ikke es una proteína que activa la vía de NFkB . Con los resultados mostrados previamente, nuestra hipótesis inicial era que en las células de cáncer de mama tipo luminal (MCF7), Timp-4 al activar IKKe, esta última subsecuentemente activaría NFkB y por lo tanto Timp-4 también activaría NFkB.

La vía de NFkB tiene múltiples funciones entre las que destacan un papel inmunológico . En cáncer su relevancia es conocida desde hace más de dos décadas, en donde se ha encontrado que NFkB está constitutivamente activa en células de cáncer. La sobreactivación constante de la vía de señalización NFkB confiere a las células diversos mecanismos que promueven la carcinogénesis. NFkB aumenta la proliferación no controlada, reduce la muerte celular por apoptosis, promueve la formación de células troncales de cáncer, promueve la migración celular, promueve la invasión de las células tumorales a otros tejidos en el proceso conocido como metástasis .

NFkB constituye una familia de factores de transcripción los cuales regulan la transcripción de múltiples genes . La familia consiste de p65, p50, p52 (y su precursor p100), RelB y cRel. Para estar activos estos factores de transcripción que se dimerizan en diversas combinaciones requieren de estar presentes en el núcleo. El mecanismo de regulación principal de la vía de NFkB es mantener a estos factores transcripcionales secuestrados en citosol. Las proteínas Ik-B son las que mantienen inhibido y secuestrado a los dímeros de NFkB; principalmente a los dímeros p50/p65, los cuales constituyen la combinación de dímeros más

frecuentes de NF κ B . Cuando I κ -B es degradada esto permite que NF κ B pueda translocarse al núcleo y poder actuar como un factor Transcripcional . El mecanismo mediante el cual I κ -B es degradado es por el proteasoma; el complejo IKK α /IKK β /Nemo fosforila a I κ -B y esto hace que I κ -B sea reconocido por una Ubiquitin Ligasa específica. La ubiquitinación de I κ -B hará que ésta sea reconocida y degradada por el proteasoma . Interesantemente, se demostró que la sobreexpresión la proteína Ikke es uno de los mecanismos mediante los cuales la vía de NF κ B se encuentra activa constitutivamente en cáncer, por lo que hace que la cinasa Ikke sea crítica en este proceso . Para esto Ikke directamente activa a p65 .

Nuestros resultados muestran que la proteína recombinante humana Timp-4 a dosis fisiológica no llevó a la activación de la vía de NF κ B. Para esto usamos múltiples métodos para evaluar la actividad de la vía de NF κ B. Estos ensayos incluyeron análisis de la actividad transcripcional de NF κ B medido por Luciferasa. También determinamos la actividad de la vía de NF κ B mediante la translocación p65, p52 y p100 del citosol al núcleo mediante Inmunofluorescencia y mediante la determinación por western blots de la proteína a diversos tiempos (20 min, 2 horas, 6 horas, 24 horas) en extractos citosólicos y nucleares. La translocación al núcleo de p65 sirve como indicador de actividad de la vía canónica de NF κ B y la translocación nuclear de p52 es un indicador de la activación de la vía no canónica de NF κ B. Con esto podemos concluir que aunque Timp-4 activa a Ikke en células de cáncer de mama tipo luminal, la vía canónica y no canónica de NF κ B no es

regulado por Timp-4 en estas células. Esto nos sugiere que la activación de Ikke mediada por Timp-4 está modulando vías de señalización independientes a NFKB.

3)

Timp4 aumenta al Receptor de Estrógenos alpha (ER α) y la transcripción de genes regulados por ER α en las células MCF7

Nuestros hallazgos muestran que en las células de cáncer de mama MCF7, Timp-4 aumenta la expresión del RNA mensajero y de los niveles de proteína del Receptor de Estrógenos alpha (ER α). El papel ER α de en la iniciación y progresión del cáncer de mama está bien establecido. ER α promueve la proliferación celular, inhibe la apoptosis y aumenta la motilidad celular e invasión lo que nos indica un mecanismo relevante potencial por el cual la sobreexpresión de Timp-4 en pacientes con cáncer de mama se asocia significativamente a una enfermedad más agresiva y una sobrevida menor.

Además, encontramos mediante nuestro experimento de RNA Seq validado, que la expresión de genes que TIMP-4 modula se encuentran enriquecidos significativamente con sitios de unión a ER α en sus promotores. Esto nos sugiere que TIMP-4 al aumentar ER α éste se une a los promotores de estos genes para modularlos. Interesantemente, genes que ER α regula positivamente su transcripción y que tienen papeles definidos en el cáncer de mama estaban también positivamente regulados por TIMP-4. Los genes prkd1 (proteína cinasa d1) y hes6 regulados positivamente por estrógenos aumentan la proliferación de

células de cáncer de mama, así como la metástasis en pacientes con esta enfermedad , estaban positivamente regulados por Timp-4. Rac3 también positivamente regulado por Estrógenos promueve proliferación y migración de células de cáncer de mama , estaba también positivamente regulado por Timp-4. Micb regulado negativamente por estrógenos , es un componente esencial que promueve la muerte celular por linfocitos tipo Natural Killer a células alteradas, incluyendo a células de cáncer , estaba regulada negativamente por TIMP-4.

Interesantemente, se reportó previamente que el promotor de Timp-4 tiene un sitio de unión a ER α [1] este sitio de unión fue observado de manera bioinformática más no experimentalmente. En nuestro análisis *in silico* nosotros también observamos a un sitio de unión a ER α en el promotor de timp-4 [1] Esto nos sugiere un feedback loop positivo que consistiría de Timp-4-ER α [1] Timp-4. Timp-2 otro miembros de la familia de Timp, se ha encontrado que es regulados por estrógenos .

Nuestros resultados muestran que Timp-4 aumenta a ER α [1] [1] lo que sugieren que este es un mecanismo relevante mediante el cual la sobreexpresión de Timp-4 se asocia a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

4) Timp-4 aumenta la expresión de genes que promueven la formación de Células Troncales en células de Cáncer de mama MCF7

Nuestros resultados con células de cáncer de mama MCF7 (Luminales) tratadas con Timp-4 a dosis fisiológicas (10 nM) promovió el incremento de la expresión de genes que participan en la formación de células troncales medido por el ensayo

masivo de RNA Seq. Nuestros resultados fueron validados mediante PCRs y determinamos que los genes Nanog, Aldh se encuentran elevados en las células tratadas con la proteína recombinante de Timp-4 a dosis fisiológica. Estos genes se han visto fuertemente involucrados en la formación y mantenimiento de células troncales de cáncer .

Las células troncales de cáncer (cáncer stem cells) han emergido como un aspecto clave en la carcinogénesis. Originalmente se creía que la población de las células de cáncer en el tumor era homogénea, esto debido a que el origen de las células neoplásicas provienen de una sola clona celular o célula que se convirtió en una célula neoplásica. Sin embargo, se ha descubierto que dentro de la población de células de cáncer en el tumor existe una gran heterogeneidad . Cuando esta clona que origina el cáncer tiene su expansión clonal, ésta aparentemente crea células que tienen características troncales (*cancer stem cells*) y este grupo de células troncales tumorales serán capaces de expandirse y formar el tumor . Las células troncales se dividirán asimétricamente y una de las células hijas será una célula con características troncales y la otra una progenitora, la cual también proliferará y dará origen a células más diferenciadas sin capacidad de autorenovación . La heterogeneidad es en parte producto de las diversas células troncales, progenitoras y células más diferenciadas que cada tumor tiene . Otro factor que contribuye a la heterogeneidad intratumoral es la inestabilidad genómica presente en las células neoplásicas .

Las células troncales son consideradas actualmente como un blanco terapéutico potencial muy atractivo . Esto es debido a que se ha observado que la resistencia a quimioterapia en los pacientes con cáncer depende en gran parte a la

resistencia de estas células al tratamiento . Más importante aún la evidencia en otros modelos animales muestran que incluso una sola célula puede reconstituir el tumor entero. Esto implica potencialmente que incluso si la quimioterapia o radioterapia dejara una sola célula con fenotipo troncal esta podría generar de nuevo un tumor en el paciente y por lo tanto la enfermedad en el paciente recurriría.

Nuestros resultados muestran que marcadores de células troncales aumentan con Timp-4, esto sugiere que Timp-4 podría estar aumentando la población de células troncales del subtipo luminal en el cáncer de mama. Esto podría ser un mecanismo por el cual un grupo de pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan a Timp-4 tienen un peor pronóstico que las que no la sobreexpresan. Paralelamente nuestro grupo del Dr. Jorge Meléndez encontró que en células de cáncer cervicouterino Timp-4 aumenta el número de células troncales ; lo cual también ya lo sugería los microarreglos que había realizado de Timp-4 en células HeLa de cáncer cervicouterino.

Las células troncales son reguladas por múltiples vías tales como Wnt, Notch, TGFb, NFKB . Interesantemente, todas estas vías regulan al promotor de timp-4 de acuerdo a nuestro análisis *in silico*. La combinación de estos dos resultados sugieren que Timp-4 está participando en la regulación de células troncales.

4) Ikke a través de su dominio cinasa, promueve la formación de células troncales en células luminales de cáncer de mama pero no en células basales de cáncer de mama.

4a) Ikke aumenta la expresión de genes que promueven la formación de células troncales en células de cáncer de mama tipo luminal pero no en células de cáncer de mama tipo basal.

Considerando los resultados que obtuvimos en células de cáncer de mama tipo luminal han mostrado que Timp-4 activa al oncogén Ikke y Timp-4 aumenta marcadores de células troncales de cáncer de mama. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue determinar si Ikke pudiera estar regulando a las células troncales de cáncer de mama.

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de Ikke en células de cáncer de mama tipo luminal aumenta los marcadores de células troncales de cáncer de mama Nanog, Sox2, Aldh, más no así, en el subtipo basal. Los experimentos que realizamos con una substitución puntual de la Lisina 38 por Alanina en la misma posición (Ikke-K38A) hace que Ikke tenga la cinasa inactiva . Ikke-K38A no produjo un aumento en los marcadores troncales, por lo que nos sugiere que el dominio cinasa de Ikke es indispensable para esta función.

4b) Ikke aumenta la expresión de los marcadores troncales de cáncer de mama CD24/CD44 en células de cáncer de mama tipo luminal

Los marcadores CD44/CD24 medidos por citometría de flujo son considerados un buen modelo para determinar la presencia de células troncales de cáncer de mama. La subpoblación CD44 alta y CD24 (CD44+/CD24low) baja son características de las células troncales .

Ikke aumentó significativamente la población de células CD44+/CD24low. Ikke con la cinasa inactiva, Ikke-K38A, no aumentó la población de CD44+/CD24low.

Estos resultados muestran que Ikke está aumentando las subpoblaciones de células con fenotipo troncal en células de cáncer de mama de tipo luminal y que este efecto depende de la actividad cinasa de Ikke.

a) Ikke aumenta la formación de células troncales de cáncer de mama tipo luminal pero no aumenta a células troncales en cáncer de mama tipo basal en ensayos funcionales.

Uno de los métodos para evaluar células troncales en mama es determinar si las células son capaces de formar mamosferas . Las mamosferas son agregados tridimensionales de células de mama. La idea es que una sola célula sea capaz de formar una mamosfera. Este ensayo ha demostrado que tiene una muy alta efectividad similar a los ensayos *in vivo* en ratones para determinar la capacidad troncal (stemness) de una población celular . El número de mamosferas que se formen refleja el número de células troncales y precursoras (progenitoras) en una población dada de células de mama . Las progenitoras son células derivadas de las troncales que están en tránsito a producir células maduras .

IKKe aumenta el número de mamosferas en células luminales (MCF7) de cáncer de mama, la variante Ikke-K38A aumentó aunque en menor grado el número de mamosferas. Esto nos indica que Ikke aumenta la población de células troncales y que este efecto es parcialmente mediado por el dominio cinasa de Ikke. Otro región de Ikke, además de su dominio cinasa, que pudiera estar mediando este efecto es la zona alrededor de la Lisina 30, y 401. Estas Lisina de en Ikke son

ubiquitinadas por los complejos cIAP/cIAP2/TRAF2 . Esta ubiquitinación es independiente al proteasoma, por lo tanto no degrada a Ikke sino que funciona como mecanismo de transducción de la señal. Las ubiquitinaciones en estas Lisinas son indispensable para la tumorigénesis inducida por Ikke . Por lo tanto, es plausible que la Lisina 63?????. También Ikke aumentó el tamaño promedio de cada mamofera, no así el caso con Ikke-K38A donde incluso el tamaño promedio de cada mamofera fue menor al control. Un aumento de tamaño de los esferoides también nos indica mayor potencial troncal de la clona que originó a la mamofera. En MDA 231 no pudimos establecer mamoferas para esta línea celular. Una razón posible se determinó recientemente. Para formar mamoferas se requiere de la presencia de Caderina E . Esta Caderina esta presente en células que forman estructuras epiteliales, en cambio las células MDA231 no se agregan de una manera epiteliales sino que se encuentran separadas y organizadas de una manera mesenquimatosas similar a los fibroblastos . Además se ha demostrado que la MDA231 no expresa Caderina E . Por lo tanto, al no poder hacer mamoferas con MDA231 realizamos experimentos de clonogenicidad, que aunque no son tan poderosos como las mamoferas para células troncales de mama, proporcionan una aproximación . Nuestros resultados mostraron que Ikke en la línea celular de cáncer de mama subtipo basal no modificó significativamente el número de células troncales de cáncer. Esto fue independiente a que el ensayo fuera con la sobreexpresión de Ikke o Ikke-K38A (cinasa inactiva).

b) Ikke aumenta el tamaño y número de mamoferas en células de cáncer de mama tipo luminal producto de trasplantes seriados.

El ensayo de trasplantes seriados de mamíferas nos permite discriminar las células progenitoras (células provenientes de troncales que están en tránsito para formar células más maduras o diferenciadas) de las troncales. El experimento en el primer paso consiste lo mismo que para crear una mamíferas, en sembrar una sola célula y determinar cuáles forman mamíferas. Posteriormente, se disgrega cada mamíferas que se formó y se vuelven a sembrar individualmente cada célula, también por ensayos de dilución limitada y se determina cuáles forman mamíferas; este paso se le conoce como segundo trasplante seriado de mamíferas???. Posteriormente, se repiten de nuevo los pasos anteriores para formar el tercer trasplante de mamíferas. Aquellas células que sean capaces de formar trasplantes seriados segundos y terceros son aquellas que tienen fenotipo troncal. Esto es debido a que en este ensayo las células progenitoras maduran y dejan de formar mamíferas posteriores al primer trasplante seriado.

Nuestros experimentos muestran que Ikke aumenta el número de mamíferas en los trasplantes seriados. Por lo que, podemos concluir con estos experimentos y que Ikke aumenta el número de células troncales de cáncer de mama tipo luminal. Interesantemente, como se había mostrado Ikke con la cinasa inactiva, Ikke-K38A, en las mamíferas iniciales aumenta el número de mamíferas, sin embargo ese efecto es abrogado en los trasplantes seriados segundos y terceros. Este resultado por lo tanto nos sugiere que el dominio cinasa es necesario para formar células troncales de cáncer de mama tipo luminal y que una función de Ikke independiente al dominio cinasa promueve también el aumento de células progenitoras. Con los resultados de los biomarcadores medidos tanto a nivel de RNA mensajero por RT-PCR, como de proteína medidos por citometría de flujo,

así como, los diversos ensayos de mamíferos y trasplantes seriados de mamíferos, podemos concluir que Ikke promueve la formación de células troncales en cáncer de mama tipo luminal y que este efecto depende del dominio cinasa de Ikke. En cambio Ikke no aumenta la población troncal de células de cáncer de mama tipo basal.

Especulando causas posibles por los cuales Ikke promueve la formación de células troncales en células de cáncer de mama tipo luminal MCF7 pero no en células de cáncer de mama tipo basal MDA231 puede venir del grupo que determinó mediante un abordaje muy elegante que Ikke era oncogénico en cáncer de mama. En ese trabajo se usaron 11 líneas celulares de cáncer de mama y mostraron que solo aquellas líneas celulares que tienen una amplificación del brazo corto del cromosoma 1 (1q32) Ikke funciona como oncogen. Aquellas que no tienen amplificada 1q32, Ikke no se comporta como un oncogen. La línea celular MCF7 si tiene la amplificación, en cambio MDA231 se determino que no tiene dicha amplificación cromosómica . En este trabajo no exploran las razones por las cuales la amplificación de 1q32 parece ser un requisito para la oncogenicidad de Ikke. Al buscar que genes se encuentran en esa zona encontramos que son:

MDM4 – Mdm4 p53 binding protein homolog, Retinoblastoma binding protein 5, AVPR1B – arginine vasopressin receptor 1B , IKBKE – inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon, FAIM3 – Fas apoptotic inhibitory molecule 3, CD34 – CD34 molecule, G0S2 – G0/G1switch 2, TRAF3IP3, TRAF3 interacting protein 3, IRF6 – interferon regulatory factor 6, TRAF5 – TNF receptor-associated factor 5, KLF5 – Kruppel-like factor 5 (intestinal) KLF12 –

Kruppel-like factor 12, RIPK5, RAB7L1, CD46, CENPF (obtenidos por Entrez Gene del NCBI). Es interesante notar que el mismo Ikke (IKBKE) se encuentra en esta región. De los genes en esta región que destacan relacionado con carcinogénesis son: G0S2, KLF5 y MDM4 . Sería interesante poder conocer las interacciones que tiene Ikke con los genes de esta región para poder determinar porque aparentemente es necesaria para que Ikke sea oncogénico en células de cáncer de mama.

4) CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que la proteína Timp-4 activa al oncogén Ikke en células de cáncer de mama tipo luminal así como al receptor de estrógenos alpha (ER α), un blanco río abajo de IKKe. En cambio Timp-4 reduce al oncogén Ikke en células de cáncer de mama tipo basal. Timp-4 promueve la expresión de marcadores de células troncales de cáncer de mama en células luminales más no así en células basales. Ikke promueve la formación de células troncales en cáncer en tipo luminal. Con esto podemos sugerir que Timp-4 promueve la formación de células troncales tipo luminales y que esta acción depende de la actividad cinasa de Ikke.

PERSPECTIVAS FUTURAS:

En base a nuestros datos obtenidos nos lleva a la hipótesis que en pacientes con cáncer de mama tipo luminal aquellas que sobreexpresen Timp-4 tendrán posiblemente un peor pronóstico que aquellas que no sobreexpresen Timp-4. Para demostrar esta hipótesis tendríamos que hacer un estudio con muestras de pacientes donde se tengan subclasificados sus tumores de mama molecularmente (luminales, Her2+, basales), y medir Timp-4 tumoral. Finalmente Determinar si esto afecta la supervivencia y periodo libre de enfermedad de las pacientes. Este estudio idealmente debería de ser prospectivo, pero también podría realizarse retrospectivamente.

Además en nuestros datos determinamos que Timp4 aumenta al receptor de estrógenos alpha (ER α), el cual se sabe que es regulado por IKKe. La activación de IKKe se sabe que es un mecanismo para promover resistencia a tratamientos antiestrogénicos en cáncer de mama. ; Por esto pensamos que Timp4 podría promover resistencia a terapias antiestrogénicas a través de IKKe. Este sería otro mecanismo mediante el cual Timp4 pudiera dar un pronóstico adverso a pacientes con cáncer de mama, y concretamente a aquellas con subtipo Luminal que son las que expresan a ER α . Para demostrar esto tendríamos que tratar a células luminales de cáncer de mama (ejemplo MCF7) con Timp-4 y determinar si la tasa de muerte celular inducida por un Antiestrógenos se reduce. Este modelo nos determinaría que Timp-4 promueve la resistencia a antiestrógenos. Otro experimento pero en este caso para determinar si la supresión de Timp-4 reestablece la resistencia a antiestrógenos, sería mediante la obtención de células de cáncer de mama resistentes a antiestrógenos. [Las

células resistentes a antiestrógenos se pueden generar dando por 1 mes dosis diarias bajas de Tamoxifen (el antiestrógeno más usado en la clínica) a células MCF7 . Al final de este tiempo las células que sobreviven ya tienen una resistencia a Tamoxifen. A estas células se les transfectaría con un siRNA de Timp-4 para determinar si esto reestablece la sensibilidad a antiestrógenos.

Finalmente una perspectiva más futurista sería determinar si la supresión de Timp-4 o de IKKe mediante el desarrollo de un agente farmacológico moderadamente específico o algún anticuerpo monoclonal o intracuerpo (anticuerpo intracelular) en modelos preclínicos pudiera reducir el número de células troncales en cáncer de mama tipo luminal y en caso de ser así llevar esto a ensayos clínicos en pacientes.

REFERENCIAS

- Adli, M., and Baldwin, A. S. (2006). IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* *281*, 26976-26984.
- Akbari-Birgani, S., Paranjothy, T., Zuse, A., Janikowski, T., Cieslar-Pobuda, A., Likus, W., Urasinska, E., Schweizer, F., Ghavami, S., Klonisch, T., and Los, M. J. (2016). Cancer stem cells, cancer-initiating cells and methods for their detection. *Drug discovery today* *21*, 836-842.
- Andrews, B. T., and Bates, T. (2000). Delay in the diagnosis of breast cancer: medico-legal implications. *Breast* *9*, 223-237.
- Apte, S. S., Mattei, M. G., and Olsen, B. R. (1994). Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* *19*, 86-90.
- Ardi, V. C., Van den Steen, P. E., Opdenakker, G., Schweighofer, B., Deryugina, E. I., and Quigley, J. P. (2009). Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *The Journal of biological chemistry* *284*, 25854-25866.
- Bacac, M., and Stamenkovic, I. (2008). Metastatic cancer cell. *Annual review of pathology* *3*, 221-247.
- Badve, S., and Nakshatri, H. (2012). Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *The Lancet Oncology* *13*, e43-48.
- Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., and Baldwin, A. S., Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and cellular biology* *13*, 3301-3310.

Bergmann, A. (2006). IKK epsilon signaling: not just NF-kappaB. *Current biology : CB* 16, R588-590.

Beug, H. (2009). Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy? *Cell* 138, 623-625.

Bigg, H. F., Shi, Y. E., Liu, Y. E., Steffensen, B., and Overall, C. M. (1997). Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *The Journal of biological chemistry* 272, 15496-15500.

Blick, T., Hugo, H., Widodo, E., Waltham, M., Pinto, C., Mani, S. A., Weinberg, R. A., Neve, R. M., Lenburg, M. E., and Thompson, E. W. (2010). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 235-252.

Boehm, J. S., Zhao, J. J., Yao, J., Kim, S. Y., Firestein, R., Dunn, I. F., Sjostrom, S. K., Garraway, L. A., Weremowicz, S., Richardson, A. L., *et al.* (2007). Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell* 129, 1065-1079.

Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular immunology* 38, 637-660.

Boyd, N. F., Dite, G. S., Stone, J., Gunasekara, A., English, D. R., McCredie, M. R., Giles, G. G., Trichler, D., Chiarelli, A., Yaffe, M. J., and Hopper, J. L. (2002). Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 347, 886-894.

Brannvall, K., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2002). Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Molecular and cellular neurosciences* 21, 512-520.

Brew, K., Dinakarpanian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta* 1477, 267-283.

Bridoux, L., Etique, N., Lambert, E., Thevenard, J., Sowa, M. L., Belloy, N., Dauchez, M., Martiny, L., and Charpentier, E. (2013). A crucial role for Lyn in TIMP-1 erythroid cell survival signalling pathway. *FEBS letters* 587, 1524-1528.

Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W., and Newman, S. M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 214, 248-257.

Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., and Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501, 338-345.

Campbell, L. L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell cycle* 6, 2332-2338.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.

Celec, P. (2004). Nuclear factor kappa B--molecular biomedicine: the next generation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 58, 365-371.

Celiker, M. Y., Wang, M., Atsidaftos, E., Liu, X., Liu, Y. E., Jiang, Y., Valderrama, E., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2001). Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 20, 4337-4343.

Chang-Liu, C. M., and Woloschak, G. E. (1997). Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer letters* 113, 77-86.

Chariot, A., Leonardi, A., Muller, J., Bonif, M., Brown, K., and Siebenlist, U. (2002). Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects

IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *The Journal of biological chemistry* 277, 37029-37036.

Chavez, K. J., Garimella, S. V., and Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease* 32, 35-48.

Chirco, R., Liu, X. W., Jung, K. K., and Kim, H. R. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer metastasis reviews* 25, 99-113.

Cioce, M., Gherardi, S., Viglietto, G., Strano, S., Blandino, G., Muti, P., and Ciliberto, G. (2010). Mammosphere-forming cells from breast cancer cell lines as a tool for the identification of CSC-like- and early progenitor-targeting drugs. *Cell cycle* 9, 2878-2887.

Ciriello, G., Sinha, R., Hoadley, K. A., Jacobsen, A. S., Reva, B., Perou, C. M., Sander, C., and Schultz, N. (2013). The molecular diversity of Luminal A breast tumors. *Breast cancer research and treatment* 141, 409-420.

Claus, E. B., Risch, N., and Thompson, W. D. (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American journal of human genetics* 48, 232-242.

Clevers, H., Loh, K. M., and Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science (New York, NY)* 346, 1248012.

Cos, S., and Sanchez-Barcelo, E. J. (1995). Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer Lett* 93, 207-212.

Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K., Hicks, J., King, T. A., and Reis-Filho, J. S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Molecular oncology* 7, 859-869.

de Beca, F. F., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C. A., Gomes, M., Paredes, J., and Schmitt, F. (2013). Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *Journal of clinical pathology* 66, 187-191.

Debois, J. M. (2002). *The Anatomy and Clinics o Metastatic Cancer*, (Dordrecht, The Neatehrlands: Kluwer Academic Publishers).

Delude, C. (2011). Tumorigenesis: Testing ground for cancer stem cells. *Nature* *480*, S43-45.

Docherty, A. J., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J., Murphy, G., and Reynolds, J. J. (1985). Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* *318*, 66-69.

Dreos, R., Ambrosini, G., Cavin Perier, R., and Bucher, P. (2013). EPD and EPDnew, high-quality promoter resources in the next-generation sequencing era. *Nucleic acids research* *41*, D157-164.

Egea, V., Zahler, S., Rieth, N., Neth, P., Popp, T., Kehe, K., Jochum, M., and Ries, C. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E309-316.

Esquenet, M., Swinnen, J. V., Heyns, W., and Verhoeven, G. (1997). LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *62*, 391-399.

Feng, Z. Y., He, Z. N., Zhang, B., and Chen, Z. (2013). Osteoprotegerin promotes the proliferation of chondrocytes and affects the expression of ADAMTS-5 and TIMP-4 through MEK/ERK signaling. *Molecular medicine reports* *8*, 1669-1679.

Fillmore, C., and Kuperwasser, C. (2007). Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast cancer research : BCR* *9*, 303.

Fillmore, C. M., Gupta, P. B., Rudnick, J. A., Caballero, S., Keller, P. J., Lander, E. S., and Kuperwasser, C. (2010). Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 21737-21742.

Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* *4*, 491-496.

Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C., and Mulvihill, J. J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute* *81*, 1879-1886.

Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117-122.

Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* *1*, 555-567.

Goss, P. E., Lee, B. L., Badovinac-Crnjevic, T., Strasser-Weippl, K., Chavarri-Guerra, Y., St Louis, J., Villarreal-Garza, C., Unger-Saldana, K., Ferreyra, M., Debiasi, M., *et al.* (2013). Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *The Lancet Oncology* *14*, 391-436.

Goss, P. E., Strasser-Weippl, K., Lee-Bychkovsky, B. L., Fan, L., Li, J., Chavarri-Guerra, Y., Liedke, P. E., Pramesh, C. S., Badovinac-Crnjevic, T., Sheikine, Y., *et al.* (2014). Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia. *The Lancet Oncology* *15*, 489-538.

Green, D. R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science (New York, NY)* *345*, 1250256.

Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L. A., Rosen, C., and Shi, Y. E. (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *The Journal of biological chemistry* *271*, 30375-30380.

Grimshaw, M. J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J. A., Bohnenkamp, H. R., Chiaperostanke, L., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J. M. (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 10, R52.

Guan, H., Zhang, H., Cai, J., Wu, J., Yuan, J., Li, J., Huang, Z., and Li, M. (2011). IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF-kappaB. *The Journal of pathology* 223, 436-445.

Gulen, M. F., Bulek, K., Xiao, H., Yu, M., Gao, J., Sun, L., Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Fox, P. L., DiCorleto, P. E., *et al.* (2012). Inactivation of the enzyme GSK3alpha by the kinase IKKi promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. *Immunity* 37, 800-812.

Guo, J., Kim, D., Gao, J., Kurtyka, C., Chen, H., Yu, C., Wu, D., Mittal, A., Beg, A. A., Chellappan, S. P., *et al.* (2013a). IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 32, 151-159.

Guo, J. P., Coppola, D., and Cheng, J. Q. (2011). IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *The Journal of biological chemistry* 286, 37389-37398.

Guo, J. P., Shu, S. K., Esposito, N. N., Coppola, D., Koomen, J. M., and Cheng, J. Q. (2010). IKKe phosphorylation of estrogen receptor alpha Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer. *The Journal of biological chemistry* 285, 3676-3684.

Guo, J. P., Shu, S. K., He, L., Lee, Y. C., Kruk, P. A., Grenman, S., Nicosia, S. V., Mor, G., Schell, M. J., Coppola, D., and Cheng, J. Q. (2009). Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer. *The American journal of pathology* 175, 324-333.

Guo, J. P., Tian, W., Shu, S., Xin, Y., Shou, C., and Cheng, J. Q. (2013b). IKBKE phosphorylation and inhibition of FOXO3a: a mechanism of IKBKE oncogenic function. *PLoS one* 8, e63636.

Haddad, F., and Baldwin, K. M. (2010). Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods in molecular biology* 630, 261-270.

Hammoud, L., Burger, D. E., Lu, X., and Feng, Q. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits neonatal mouse cardiomyocyte proliferation via EGFR/JNK/SP-1 signaling. *American journal of physiology Cell physiology* 296, C735-745.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hartman, J., Lam, E. W., Gustafsson, J. A., and Strom, A. (2009). Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation. *Breast cancer research : BCR* 11, R79.

Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

Hildebrandt, M. A., Tan, W., Tamboli, P., Huang, M., Ye, Y., Lin, J., Lee, J. S., Wood, C. G., and Wu, X. (2012). Kinome expression profiling identifies IKBKE as a predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Carcinogenesis* 33, 799-803.

Hoesel, B., and Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 12, 86.

Hotary, K., Li, X. Y., Allen, E., Stevens, S. L., and Weiss, S. J. (2006). A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes & development* 20, 2673-2686.

Hu, M., Yao, J., Carroll, D. K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., Richardson, A., Violette, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., *et al.* (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer cell* 13, 394-406.

Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.

Humphrey, L. L., Helfand, M., Chan, B. K., and Woolf, S. H. (2002). Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* *137*, 347-360.

Husemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G., and Klein, C. A. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer cell* *13*, 58-68.

Hussell, T., and Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews Immunology* *14*, 81-93.

Iglesias, J., Beloqui, I., Garcia-Garcia, F., Leis, O., Vazquez-Martin, A., Eguiara, A., Cufi, S., Pavon, A., Menendez, J. A., Dopazo, J., and Martin, A. G. (2013). Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PloS one* *8*, e77281.

Jaggupilli, A., and Elkord, E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical & developmental immunology* *2012*, 708036.

Jeter, C. R., Liu, B., Liu, X., Chen, X., Liu, C., Calhoun-Davis, T., Repass, J., Zaehres, H., Shen, J. J., and Tang, D. G. (2011). NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* *30*, 3833-3845.

Jia, L., Zhou, Z., Liang, H., Wu, J., Shi, P., Li, F., Wang, Z., Wang, C., Chen, W., Zhang, H., *et al.* (2016). KLF5 promotes breast cancer proliferation, migration and invasion in part by upregulating the transcription of TNFAIP2. *Oncogene* *35*, 2040-2051.

Jiang, Y., Wang, M., Celiker, M. Y., Liu, Y. E., Sang, Q. X., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2001). Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer research* *61*, 2365-2370.

Jordan, V. C. (1997). Tamoxifen treatment for breast cancer: concept to gold standard. *Oncology* *11*, 7-13.

Jung, K. K., Liu, X. W., Chirco, R., Fridman, R., and Kim, H. R. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO journal* *25*, 3934-3942.

Jung, Y. S., Liu, X. W., Chirco, R., Warner, R. B., Fridman, R., and Kim, H. R. (2012). TIMP-1 induces an EMT-like phenotypic conversion in MDCK cells independent of its MMP-inhibitory domain. *PloS one* 7, e38773.

Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K. A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A. F., *et al.* (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one* 4, e6146.

Karam, M., Bieche, I., Legay, C., Vacher, S., Auclair, C., and Ricort, J. M. (2014). Protein kinase D1 regulates ERalpha-positive breast cancer cell growth response to 17beta-estradiol and contributes to poor prognosis in patients. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 2536-2552.

Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews Cancer* 2, 301-310.

Kelemen, L. E., Sellers, T. A., and Vachon, C. M. (2008). Can genes for mammographic density inform cancer aetiology? *Nature reviews Cancer* 8, 812-823.

Kelloff, G. J., Lippman, S. M., Dannenberg, A. J., Sigman, C. C., Pearce, H. L., Reid, B. J., Szabo, E., Jordan, V. C., Spitz, M. R., Mills, G. B., *et al.* (2006). Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res* 12, 3661-3697.

Klein, T., and Bischoff, R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids* 41, 271-290.

Koyama, S. (2006). Intracellular localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cultured tumor cell lines: flow cytometric analysis. *Oncology reports* 15, 735-738.

Kramer, A., Green, J., Pollard, J., Jr., and Tugendreich, S. (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 30, 523-530.

Krebs, W., Schmidt, S. V., Goren, A., De Nardo, D., Labzin, L., Bovier, A., Ulas, T., Theis, H., Kraut, M., Latz, E., *et al.* (2014). Optimization of transcription factor binding map accuracy utilizing knockout-mouse models. *Nucleic acids research* *42*, 13051-13060.

Lacroix, M., and Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment* *83*, 249-289.

Langlands, A. O., GebSKI, V., Hirsch, D., and Tattersall, M. H. (2002). Delay in the clinical diagnosis of breast cancer: estimating its effect on prognosis, with particular reference to medical litigation. *Breast* *11*, 386-393.

Lazcano-Ponce, E. (2012). Views Expressed at a Breast Cancer Conference in Mexico. In.

Leco, K. J., Apte, S. S., Taniguchi, G. T., Hawkes, S. P., Khokha, R., Schultz, G. A., and Edwards, D. R. (1997). Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS letters* *401*, 213-217.

Lee, S., Desai, K. K., Iczkowski, K. A., Newcomer, R. G., Wu, K. J., Zhao, Y. G., Tan, W. W., Roycik, M. D., and Sang, Q. X. (2006). Coordinated peak expression of MMP-26 and TIMP-4 in preinvasive human prostate tumor. *Cell research* *16*, 750-758.

Lee, S. J., Tsang, P. S., Diaz, T. M., Wei, B. Y., and Stetler-Stevenson, W. G. (2010). TIMP-2 modulates VEGFR-2 phosphorylation and enhances phosphodiesterase activity in endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *90*, 374-382.

Lee, S. Y., Kim, J. M., Cho, S. Y., Kim, H. S., Shin, H. S., Jeon, J. Y., Kausar, R., Jeong, S. Y., Lee, Y. S., and Lee, M. A. (2014). TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *The Biochemical journal* *459*, 565-576.

Leung, E. Y., Kim, J. E., Askarian-Amiri, M., Joseph, W. R., McKeage, M. J., and Baguley, B. C. (2014). Hormone Resistance in Two MCF-7 Breast Cancer Cell Lines is Associated with Reduced mTOR Signaling, Decreased Glycolysis, and Increased Sensitivity to Cytotoxic Drugs. *Frontiers in oncology* *4*, 221.

Li, Q., and Lozano, G. (2013). Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 34-41.

Li, Q., Sun, H., Zou, J., Ge, C., Yu, K., Cao, Y., and Hong, Q. (2013). Increased expression of estrogen receptor alpha-36 by breast cancer oncogene IKKepsilon promotes growth of ER-negative breast cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *31*, 833-841.

Liss, M., Sreedhar, N., Keshgegian, A., Sauter, G., Chernick, M. R., Prendergast, G. C., and Wallon, U. M. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is elevated in early-stage breast cancers with accelerated progression and poor clinical course. *The American journal of pathology* *175*, 940-946.

Liu, L., Zhao, Y., Xie, K., Sun, X., Gao, Y., and Wang, Z. (2013). Estrogen-induced nongenomic calcium signaling inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor alpha production in macrophages. *PLoS one* *8*, e83072.

Liu, Y. E., Wang, M., Greene, J., Su, J., Ullrich, S., Li, H., Sheng, S., Alexander, P., Sang, Q. A., and Shi, Y. E. (1997). Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *The Journal of biological chemistry* *272*, 20479-20483.

Lizarraga, F., Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Vazquez-Santillan, K., Bahena-Ocampo, I., Schwarz-Cruz, Y. C. A., Vega-Gordillo, M., Garcia Lopez, P., Maldonado, V., and Melendez-Zajgla, J. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) regulates stemness in cervical cancer cells. *Molecular carcinogenesis*.

Lizarraga, F., Espinosa, M., Maldonado, V., and Melendez-Zajgla, J. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 is expressed in cervical cancer patients. *Anticancer research* *25*, 623-627.

Lizarraga, F., Maldonado, V., and Melendez-Zajgla, J. (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-kappa B in

A549 lung epithelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* *36*, 1655-1663.

Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J., and Castellano, L. (2015). Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* *1*, 533-557.

Magee, J. A., Piskounova, E., and Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell* *21*, 283-296.

Manavathi, B., Dey, O., Gajulapalli, V. N., Bhatia, R. S., Bugide, S., and Kumar, R. (2013). Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple. *Endocrine reviews* *34*, 1-32.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704-715.

Margolese, R. G., Hortobagyi, G. N., and Buchholz., T. A. (2003). *Breast Cancer Neoplasms*. In *Cancer Medicine* 6, D.W. Kufe, R.E. Pollock, R.R. Weichselbaum, R.C. Bast, Jr., T.S. Gansler, J.F. Holland, and E. Frei III, eds. (Publication of the American Cancer Society, BC Decker Inc.).

Marinescu, V. D., Kohane, I. S., and Riva, A. (2005). The MAPPER database: a multi-genome catalog of putative transcription factor binding sites. *Nucleic acids research* *33*, D91-97.

Marino, N., Woditschka, S., Reed, L. T., Nakayama, J., Mayer, M., Wetzels, M., and Steeg, P. S. (2013). Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment. *The American journal of pathology* *183*, 1084-1095.

Martin, A. M., and Weber, B. L. (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *92*, 1126-1135.

Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C. Y., Chou, A., Ienasescu, H., *et al.* (2014). JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* *42*, D142-147.

Matikainen, S., Siren, J., Tissari, J., Veckman, V., Pirhonen, J., Severa, M., Sun, Q., Lin, R., Meri, S., Uze, G., *et al.* (2006). Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *Journal of virology* *80*, 3515-3522.

Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M., and Schmitz, M. L. (2006). Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *The Journal of biological chemistry* *281*, 6175-6183.

Mbalaviele, G., Dunstan, C. R., Sasaki, A., Williams, P. J., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (1996). E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer research* *56*, 4063-4070.

McPherson, K., Steel, C. M., and Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* *321*, 624-628.

McTiernan, A. (2003). Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* *8*, 326-334.

Mincey, B. A., and Perez, E. A. (2004). Advances in screening, diagnosis, and treatment of breast cancer. *Mayo Clin Proc* *79*, 810-816.

Mylona, E., Giannopoulou, I., Fasomytakis, E., Nomikos, A., Magkou, C., Bakarakos, P., and Nakopoulou, L. (2008). The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human pathology* *39*, 1096-1102.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* *69*, 562-573.

Napetschnig, J., and Wu, H. (2013). Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annual review of biophysics* 42, 443-468.

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., *et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* 10, 515-527.

Newman, L. A., and Sabel, M. (2003). Advances in breast cancer detection and management. *Med Clin North Am* 87, 997-1028.

Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C. J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews Cancer* 12, 133-143.

Orth, K., Hung, J., Gazdar, A., Bowcock, A., Mathis, J. M., and Sambrook, J. (1994). Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9495-9499.

Oshimori, N., and Fuchs, E. (2012). The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell stem cell* 11, 751-764.

Overmoyer, B. (1999). Breast cancer screening. *Med Clin North Am* 83, 1443-1466, vi-vii.

Pardal, R., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews Cancer* 3, 895-902.

Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., and Polyak, K. (2010). Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 876-887.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer Journal international du cancer* 94, 153-156.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Peters, R. T., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2000). IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Molecular cell* 5, 513-522.

Petersen, O. W., and Polyak, K. (2010). Stem cells in the human breast. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003160.

Pilka, R., Noskova, V., Domanski, H., Andersson, C., Hansson, S., and Casslen, B. (2006). Endometrial TIMP-4 mRNA is expressed in the stroma, while TIMP-4 protein accumulates in the epithelium and is released to the uterine fluid. *Molecular human reproduction* 12, 497-503.

Porter, P. (2008). "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *The New England journal of medicine* 358, 213-216.

Radomski, A., Jurasz, P., Sanders, E. J., Overall, C. M., Bigg, H. F., Edwards, D. R., and Radomski, M. W. (2002). Identification, regulation and role of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) in human platelets. *British journal of pharmacology* 137, 1330-1338.

Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R., and Johnson, M. D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast cancer research and treatment* 104, 13-19.

Ray, G., Banerjee, S., Saxena, N. K., Campbell, D. R., Van Veldhuizen, P., and Banerjee, S. K. (2005). Stimulation of MCF-7 tumor progression in athymic nude mice by 17beta-estradiol induces WISP-2/CCN5 expression in xenografts: a novel signaling molecule in hormonal carcinogenesis. *Oncology reports* 13, 445-448.

Renault, V. M., Rafalski, V. A., Morgan, A. A., Salih, D. A., Brett, J. O., Webb, A. E., Villeda, S. A., Thekkat, P. U., Guilleroy, C., Denko, N. C., *et al.* (2009). FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell* 5, 527-539.

Reuben, J. M., Lee, B. N., Gao, H., Cohen, E. N., Mego, M., Giordano, A., Wang, X., Lodhi, A., Krishnamurthy, S., Hortobagyi, G. N., *et al.* (2011). Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with

ALDH activity and CD44(+)CD24^{lo} cancer stem cell phenotype. *European journal of cancer* 47, 1527-1536.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.

Rodriguez-Cuevas, S., Macias, C. G., Franceschi, D., and Labastida, S. (2001). Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* 91, 863-868.

Romieu, I., Lazcano-Ponce, E., Sanchez-Zamorano, L. M., Willett, W., and Hernandez-Avila, M. (2004). Carbohydrates and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1283-1289.

Rorive, S., Lopez, X. M., Maris, C., Trepant, A. L., Sauvage, S., Sadeghi, N., Roland, I., Decaestecker, C., and Salmon, I. (2010). TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23, 1418-1428.

Rota, L. M., Lazzarino, D. A., Ziegler, A. N., LeRoith, D., and Wood, T. L. (2012). Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 17, 119-123.

Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 volume)* Maniatis.

Savagner, P. (2010). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 7, vii89-92.

Schwartz, M. D., Lerman, C., Brogan, B., Peshkin, B. N., Isaacs, C., DeMarco, T., Halbert, C. H., Pennanen, M., and Finch, C. (2005). Utilization of BRCA1/BRCA2 mutation testing in newly diagnosed breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1003-1007.

Seo, D. W., Kim, S. H., Eom, S. H., Yoon, H. J., Cho, Y. R., Kim, P. H., Kim, Y. K., Han, J. W., Diaz, T., Wei, B. Y., and Stetler-Stevenson, W. G. (2008). TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvascular research* 76, 145-151.

Shaw, F. L., Harrison, H., Spence, K., Ablett, M. P., Simoes, B. M., Farnie, G., and Clarke, R. B. (2012). A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 17, 111-117.

Shostak, K., and Chariot, A. (2011). NF-kappaB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast cancer research : BCR* 13, 214.

Sieburg, H. B., Cho, R. H., and Muller-Sieburg, C. E. (2002). Limiting dilution analysis for estimating the frequency of hematopoietic stem cells: uncertainty and significance. *Experimental hematology* 30, 1436-1443.

Singletary, S. E. (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Annals of surgery* 237, 474-482.

Smith, B. N., Burton, L. J., Henderson, V., Randle, D. D., Morton, D. J., Smith, B. A., Taliaferro-Smith, L., Nagappan, P., Yates, C., Zayzafoon, M., *et al.* (2014). Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. *PloS one* 9, e104987.

Sommer, S., and Fuqua, S. A. (2001). Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in cancer biology* 11, 339-352.

Srojicak, N., and Ponglikitmongkol, M. (2013). 17beta-Estradiol suppresses MHC class I chain-related B gene expression via an intact GC box. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 91, 102-108.

Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling* 1, re6.

Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C., and Liotta, L. A. (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *The Journal of biological chemistry* 264, 17374-17378.

Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79, 329-339.

Surova, O., and Zhivotovsky, B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32, 3789-3797.

Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., and Ivy, S. P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature reviews Clinical oncology* 8, 97-106.

Tarnok, A., Ulrich, H., and Bocsi, J. (2010). Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77, 6-10.

Tavani, A., Giordano, L., Gallus, S., Talamini, R., Franceschi, S., Giacosa, A., Montella, M., and La Vecchia, C. (2006). Consumption of sweet foods and breast cancer risk in Italy. *Ann Oncol* 17, 341-345.

Tovar-Guzman, V., Hernandez-Giron, C., Lazcano-Ponce, E., Romieu, I., and Hernandez Avila, M. (2000). Breast cancer in Mexican women: an epidemiological study with cervical cancer control. *Revista de saude publica* 34, 113-119.

Trask, O. J., Jr. (2004). Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. In *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, N.P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P.W. Iversen, *et al.*, eds. (Bethesda (MD)).

Tsukerman, P., Stern-Ginossar, N., Gur, C., Glasner, A., Nachmani, D., Bauman, Y., Yamin, R., Vitenshtein, A., Stanietzky, N., Bar-Mag, T., *et al.* (2012). MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. *Cancer research* 72, 5463-5472.

Tummalapalli, C. M., Heath, B. J., and Tyagi, S. C. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry* 80, 512-521.

Unger-Saldana, K. (2014). Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World journal of clinical oncology* *5*, 465-477.

Unger-Saldana, K., Miranda, A., Zarco-Espinosa, G., Mainero-Rachelous, F., Bargallo-Rocha, E., and Miguel Lazaro-Leon, J. (2015). Health system delay and its effect on clinical stage of breast cancer: Multicenter study. *Cancer* *121*, 2198-2206.

Vachon, C. M., Kuni, C. C., Anderson, K., Anderson, V. E., and Sellers, T. A. (2000). Association of mammographically defined percent breast density with epidemiologic risk factors for breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* *11*, 653-662.

Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J., Stassi, G., *et al.* (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature reviews Cancer* *12*, 767-775.

Verhelst, K., Verstrepen, L., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2013). IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology* *85*, 873-880.

Vidal, S. J., Rodriguez-Bravo, V., Galsky, M., Cordon-Cardo, C., and Domingo-Domenech, J. (2014). Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene* *33*, 4451-4463.

von Fournier, D., Abel, U., Spratt, J. A., Spratt, J. S., and Anton, H. W. (1994). [Growth rate of breast cancer, implication for early detection and therapeutic effects]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* *54*, 286-290.

Walker, M. P., Zhang, M., Le, T. P., Wu, P., Laine, M., and Greene, G. L. (2011). RAC3 is a pro-migratory co-activator of ERalpha. *Oncogene* *30*, 1984-1994.

Walsh, T., and King, M. C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* *11*, 103-105.

Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., and Renard, P. (2015). Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem cells and development* *24*, 1957-1971.

Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X., Wei, X., Gao, J., Zhao, Z., and Liu, C. (2014). Oct-4 and nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget* 5, 10803-10815.

Wang, J., and Ma, X. (2012). Effects of estrogen and progestin on expression of MMP-2 and TIMP-2 in a nude mouse model of endometriosis. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 39, 229-233.

Wang, M., Liu, Y. E., Greene, J., Sheng, S., Fuchs, A., Rosen, E. M., and Shi, Y. E. (1997). Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 14, 2767-2774.

Wenger, S. L., Senft, J. R., Sargent, L. M., Bamezai, R., Bairwa, N., and Grant, S. G. (2004). Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience reports* 24, 631-639.

Winer, E. P., Morrow, M. M., Osborne, C. K., and Harris, J. R. (2001). Malignant Tumors of the Breast. In *Cancer, Principles and Practice of Oncology* 6th edition, S. Hellman, S.A. Rosenberg, and V.T. DeVita, eds. (Lippincott, Williams & Wilkins).

Wingender, E. (2008). The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Briefings in bioinformatics* 9, 326-332.

Wright, N. A. (2012). Stem cell identification--in vivo lineage analysis versus in vitro isolation and clonal expansion. *The Journal of pathology* 227, 255-266.

Wu, J. D., Atteridge, C. L., Wang, X., Seya, T., and Plymate, S. R. (2009). Obstructing shedding of the immunostimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 632-640.

Xuan, Z., Zhao, F., Wang, J., Chen, G., and Zhang, M. Q. (2005). Genome-wide promoter extraction and analysis in human, mouse, and rat. *Genome biology* 6, R72.

Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell* *14*, 818-829.

Yersal, O., and Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World journal of clinical oncology* *5*, 412-424.

Yim, C. Y., Sekula, D. J., Hever-Jardine, M. P., Liu, X., Warzecha, J. M., Tam, J., Freemantle, S. J., Dmitrovsky, E., and Spinella, M. J. (2016). G0S2 Suppresses Oncogenic Transformation by Repressing a MYC-Regulated Transcriptional Program. *Cancer research* *76*, 1204-1213.

Zhao, Y. G., Xiao, A. Z., Park, H. I., Newcomer, R. G., Yan, M., Man, Y. G., Heffelfinger, S. C., and Sang, Q. X. (2004). Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer research* *64*, 590-598.

Zhou, A. Y., Shen, R. R., Kim, E., Lock, Y. J., Xu, M., Chen, Z. J., and Hahn, W. C. (2013). IKKepsilon-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell reports* *3*, 724-733.

Zhou, W., Lv, R., Qi, W., Wu, D., Xu, Y., Liu, W., Mou, Y., and Wang, L. (2014). Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer. *PloS one* *9*, e87409.

PROYECTO DE DOCTORADO INICIAL

MI PROYECTO DOCTORAL FUE CAMBIADO DEBIDO A QUE OTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN PUBLICÓ ALGO PRACTICAMENTE IDÉNTICO A LO QUE IBA A REALIZAR Y AÚN ME FALTABA MUCHO TIEMPO PARA TENER RESULTADOS PUBLICABLES EN UN PERIODO RAZONABLE (Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, Nakamura R, Tanaka T, Tomiyama H, Saito N, Fukata M, Miyamoto T, Lyons B, Ohshima K, Uchida N, Taniguchi S, Ohara O, Akashi K, Harada M, Shultz LD. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat Biotechnol. 2007 Nov;25(11):1315-21).

INTRODUCCIÓN

- Leucemia Mieloide Aguda (LAM)

LAM se caracteriza por la proliferación y acumulación de células inmaduras hematopoyéticas de la serie mieloide en médula ósea y en la circulación sanguínea. LAM es la causa de cerca del 90% de leucemias en el adulto. El tratamiento actual es a base de los agentes quimioterapéuticos doxorubicina y citarabina. Actualmente la mayor parte de pacientes con LAM presentan recaída en los primeros años posterior al tratamiento y mueren eventualmente a consecuencia de la enfermedad. La falla en el tratamiento es debido a la resistencia a quimioterapia de las células leucémicas (Hoffman 2005).

- Osteoblastos, nicho de células hematopoyéticas y la proteína PTHR1:

Un nicho en el contexto de células troncales se define como un espacio físico bien definido usualmente constituido por algún tipo de célula que interacciona físicamente con las células troncales, y promueve la autorenovación de estas últimas (Wilson 2006). Se ha encontrado que los osteoblastos, las células que forman el hueso, son el nicho para las células troncales hematopoyéticas (Calvi 2003). Uno de los jugadores importantes en este nicho es la proteína PTHR1. Esta proteína es el receptor de la hormona paratifoidea (Goodman 2002); pertenece a la familia de proteínas asociadas a proteínas G, se expresa en osteoblastos (Gardella 2001) y presenta una localización en membrana celular y membrana nuclear. La activación constitutiva de PTHR1 en un modelo murino transgénico produjo un mayor número de células madre hematopoyéticas (Calvi 2003); además la activación de esta proteína en osteoblasto induce que esta célula libere las proteínas Jagged, y al Factor Estimulador de Colonias de Granulocíticos y Macrófagos y (GM-CSF) (Weber 2006; Horowitz 1989). Estas son citocinas necesarias tanto para el mantenimiento de células madre hematopoyéticas como para la diferenciación hacia distintos estirpes celulares (Rattis 2004) Esto explicaría uno de los mecanismos mediante el cual la activación de PTHR1 aumenta el número de células troncales hematopoyéticas normales.

-Leucemias y células troncales leucémicas y resistencia a Quimioterapia

Como se mencionó al inicio de esta introducción el tratamiento actual para las leucemias sigue careciendo de efectividad a mediano y largo plazo (Hoffman 2005). Se ha propuesto que células troncales leucémicas (LSC) son las

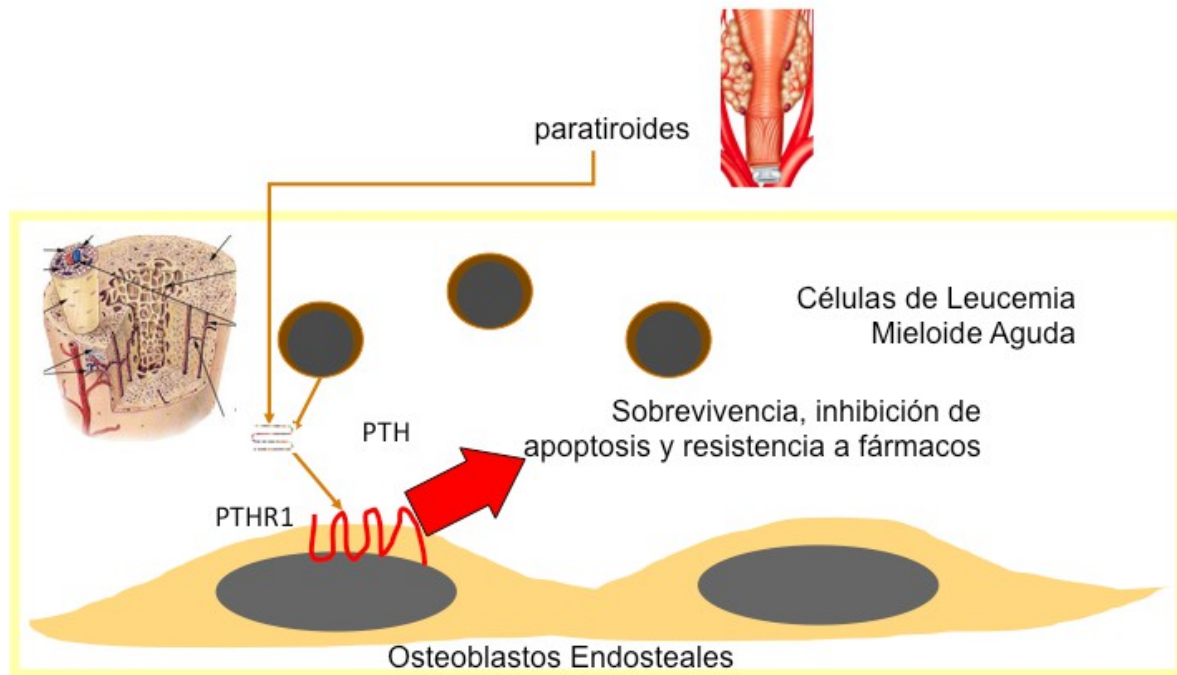
responsables de la resistencia a la quimioterapia en parte por su quiescencia (Ravandi 2006). Se ha encontrado que los fibroblastos y osteoblastos pueden estar contribuyendo a la proliferación de leucemias, ya que los medios condicionados de estas promueven proliferación de las células leucémicas (Bruserud). Muy recientemente se acaba de descubrir que el nicho de células leucémicas son los osteoblastos (Ishikawa 2007), tal como lo sospechábamos. Encontrar cuales son los factores del nicho leucémico de osteoblastos que promueven la clonogenicidad y resistencia a fármacos de leucemia representa una oportunidad para encontrar blancos que eliminen la célula troncal leucémica.

HIPÓTESIS

Los osteoblastos constituyen el nicho de las células troncales de leucemia mieloide aguda y estos promueven su resistencia a la quimioterapia.

La inhibición de los Receptores PTHR1 en osteoblastos promueve la apoptosis y disminuye la clonogenicidad de células de Leucemia Aguda.

Hipótesis



* Una célula clonogénica es una célula que tiene la capacidad de formar colonias. La clonogenicidad a un agente químico se mide por el ensayo de clonogenicidad. Los ensayos de viabilidad convencionales (ejemplo cristal violeta o MTS) nos dicen que cantidad de células está viva en un momento dado. Sin embargo no nos dicen cuáles de las que están vivas tienen aún capacidad mitótica. El ensayo de clonogenicidad si nos da esta información. Este ensayo es de gran importancia para probar agentes terapéuticos en cáncer.

RELEVANCIA

PTHR1 podría ser un blanco terapéutico por sí sólo o en combinación con Quimioterapia para el tratamiento de la Leucemia Aguda.

RESULTADOS

El receptor PTHR1 se expresa en la línea de osteoblastos U20S

Una de los ensayos para validar nuestro modelo *in vitro* era determinar si en nuestras líneas celulares de osteoblasto se expresa PTHR1. Usamos las líneas celulares de osteoblasto U20S y MG63. Se les extrajo RNA total y el RNAm se convirtió a cDNA mediante la Transcriptasa Reversa. Se usaron unos oligonucleótidos para amplificar todo el marco abierto de lectura (ORF) de PTHR1. Logramos observar en el PCR del cDNA de U20S una banda que coincide con el número de pares de bases esperado de PTHR1 (1836), sin embargo también se observaron otras bandas en diferentes pesos moleculares. Actualmente se está continuando la estandarización de este experimento modificando condiciones tales como la temperatura de extensión, concentración de Mg²⁺ etc. En cuanto a la línea celular MG63 observamos múltiples bandas no específicas. No hemos logrado ver una banda que coincida con el número esperado de pares de bases. Diseñamos otros oligonucleótidos que no amplifican todo el ORF para facilitar la amplificación.

Para la detección de la proteína empleamos inmuno-fluorescencia. En las células U20S logramos visualizar a PTHR1 por medio de anticuerpos dirigidos a esta proteína y acoplados con rodamina. La localización subcelular es similar a la reportada para otras líneas celulares. Por lo que la línea U20S un buen modelo para probar la hipótesis. Todavía no se ha hecho el experimento de inmuno-fluorescencia en la línea MG63.

siRNA de PTHR1

Una de las estrategias que emplearemos para inhibir a PTHR1 será por medio de RNA's de interferencia. El RNAi es un mecanismo que controla la expresión a nivel pos-transcripcional . El RNAi se utiliza también como una herramienta para silenciar genes post-transcripcionalmente. Para esto se usan oligonucleótidos de 21 a 23 pares de bases complementarios al transcrito que deseamos inhibir (Tuschl 1999). Una vez transcritos dentro de la célula los siRNAs fosforilados por la enzima DICER. Esta fosforilación promueve la separación de la doble cadena. Ahora ya separados van a hibridizarse mediante complementariedad de sus bases con el transcrito blanco. Una vez que ya se hibridizaron siRNA-RNA blanco se les va a unir el complejo de silenciamiento inducido por RNA, llamado RISC, el cual va a promover el secuestro y/o la degradación específica del mensajero (Agami 2002).

Para diseñar nuestro RNAi seleccionamos una secuencia de 21 nucleótidos complementaria al transcrito de *pthr1* añadiendo sitios de reconocimiento para la enzima Mlu1. Se realizaron digestiones del inserto (RNAi) y del vector y posterior a la digestión se ligó con la T4 ligasa. Se transformaron *E. coli* por medio de choque térmico, y se seleccionaron en medio con ampicilina. Se realizó la extracción del plásmido. Se hizo digestión del plásmido con las enzimas de restricción BamH1 y Mlu1. La primera logró linearizar el plásmido, sin embargo la segunda enzima no. Esto nos sugeriría que el inserto no está dentro del plásmido. Sin embargo la enzima Mlu1 no digirió otros plásmidos (control positivo) donde tenemos la certeza que tiene la secuencia. Por lo que planteamos la posibilidad que la enzima no esté funcionando . Nuestra solución alternativa será mandar secuenciar el plásmido y de esa manera determinar si tenemos el inserto con el RNAi dentro del plásmido.

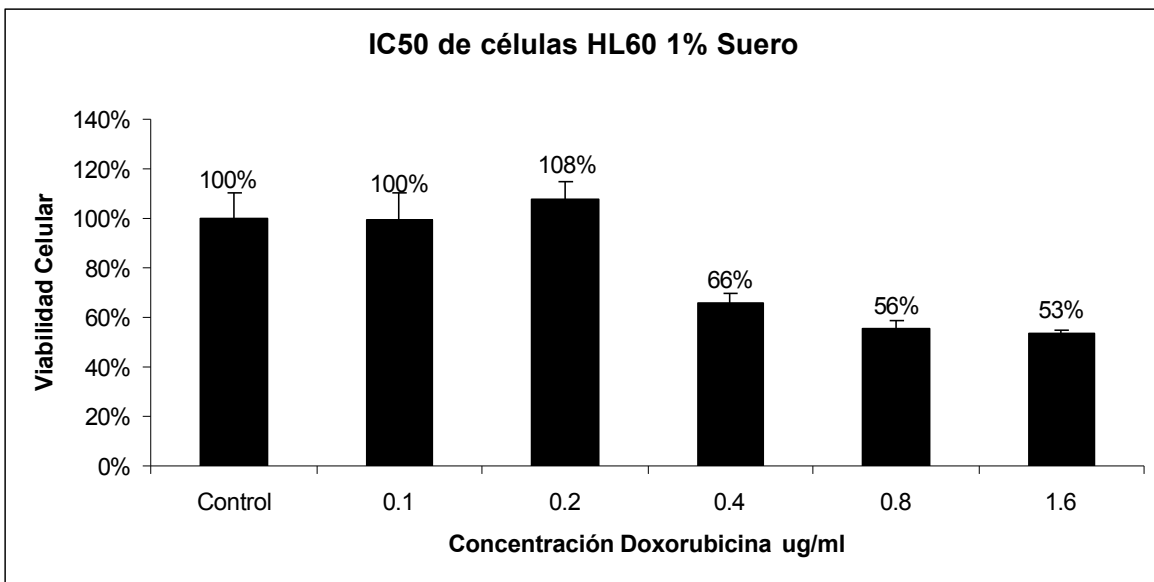
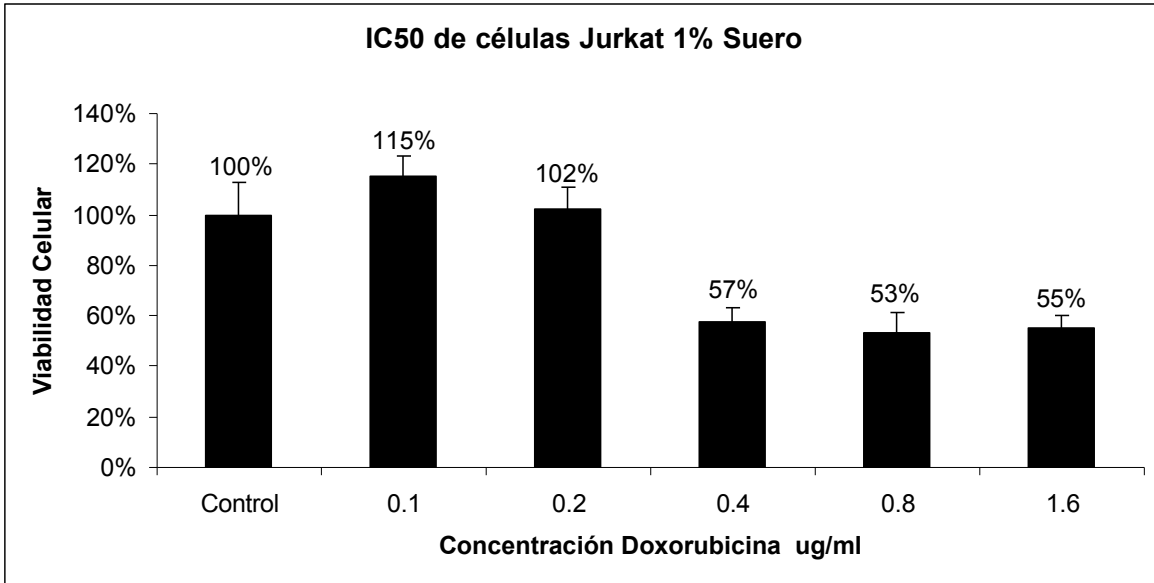
En cuanto a la transfección para U20S la tengo estandarizada desde el semestre pasado cuando logré las condiciones para transfectar a ésta línea por medio de Lipofectamina 2000 usando un vector que en lugar del inserto con RNAi expresaba GFP.

Ensayos de Citotoxicidad

El semestre pasado obtuve el índice de citotoxicidad 50 de doxorubicina (El IC50 es la concentración de quimioterapia que nos lleva a 50% de muerte celular) en células de leucemia. Sin embargo como voy a trabajar con cultivos formados por osteoblastos y células de leucemia era importante determinar si el IC50 de quimioterapia que obtuve para leucemias iba a producir también una disminución en la viabilidad de los osteoblastos. Este semestre determiné que la viabilidad de osteoblastos no disminuye con concentraciones de doxorubicina incluso 2 veces mayores que el IC50 para leucemias.

FIGURAS DE LOS RESULTADOS

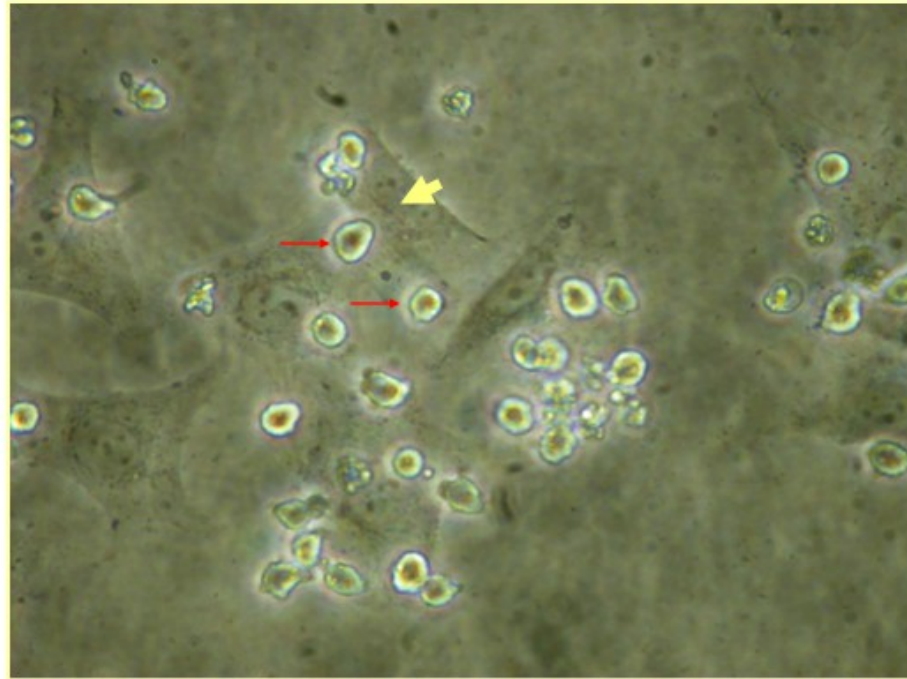
EXPERIMENTOS POR TRIPLICADO



Las Células HL60 de Leucemia se adhieren a los osteoblastos (MG32)

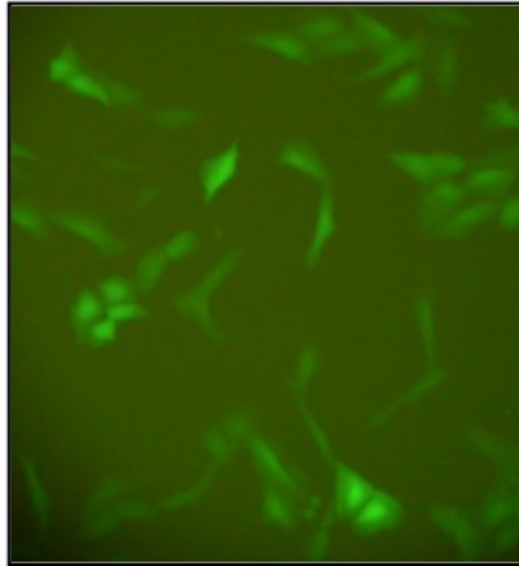
Células de Leucemia HL60 →

Osteoblasto MG32 →



Transfección GFP

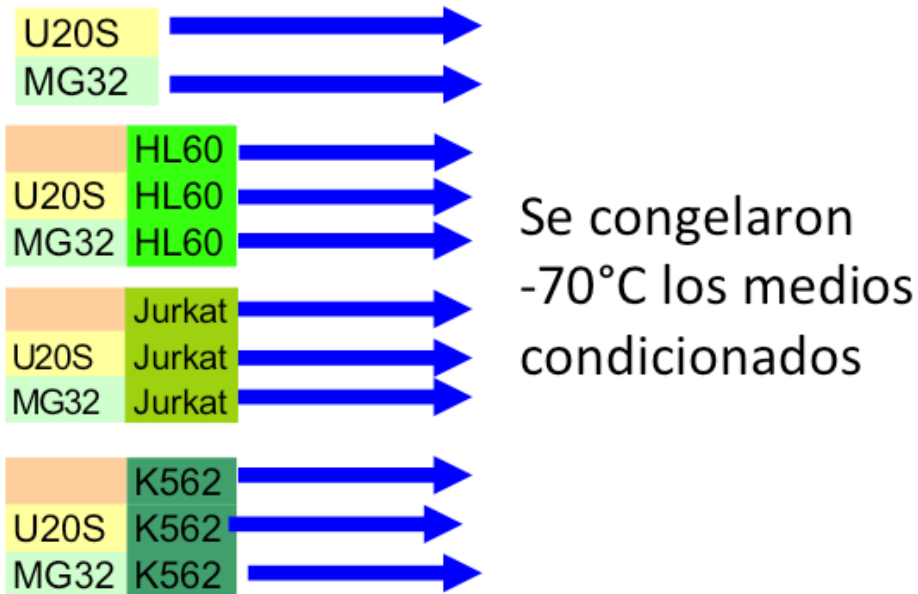
- U2OS transfectada con Lipofectamina 2000 GFP



Diseño de shRNA para PTHR1

- (PARA shRNA vectors con promotor pol III)
- **Blanco RNAi 138-161**
- T G C A G A T G A C G T C A T G A
C T A A A G
- >sentido
- CAGAUGACGUCAUGACUAAAG
- >antisentido
- UUAGUCAUGACGUCAUCUGCA

Se obtuvieron medios con las siguientes condiciones con los Cocultivos de Osteoblastos con diversas líneas de Células de Leucemia Mieloide Aguda:



REFERENCIAS:

Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol.* 2002 Dec;6(6):829-34.

Bruserud Ø et al Osteoblasts increase proliferation and release of pro-angiogenic interleukin 8 by native human acute myelogenous leukemia blasts. *Haematologica.* 2004 Apr;89(4):391-402.

Calvi LM, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):841-6.

Gardella TJ, Jüppner H. Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2001 Jul;12(5):210-7.

Goodman WG, et al New lessons from old assays: parathyroid hormone (PTH), its receptors, and the potential biological relevance of PTH fragments. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Oct;17(10):1731-6.

Hoffman R. Hematology. Capítulo 59 (Pathobiology of Acute Myeloid Leukemia) & Therapy for Acute Myeloid Leukemia Capítulo 60, (2005) Willey Press.

Horowitz MC, et al. Parathyroid hormone and lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest*. 1989 Jan;83(1):149-57.

Ishikawa F, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1315-1321.

Rattis FM, Voermans C, Reya T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol*. 2004 Mar;11(2):88-94.

Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):340-4.

Tuschl T, et al. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 Dec 15;13(24):3191-7.

Weber JM, et al. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells. *Bone*. 2006 Sep;39(3):485-93.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):93-106.