



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA**

**INGENIERÍA DE CÉLULAS CANCEROSAS DE
MAMA PARA LA SOBREPRODUCCIÓN DEL
RECEPTOR III DEL TGF-BETA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

ALICIA GÓMEZ MÉNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
PATRICIA JUÁREZ CAMACHO
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA 2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.



Alicia Gómez Méndez

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Regulo Méndez López, mi abuelo, que gracias a él fue que comencé a interesarme en los libros y en lo que en ellos encontraba.

Sé que estarías muy feliz de verme realizar mis sueños.

A mis padres y hermanas por apoyarme en todo momento y creer en mí siempre, sobre todo durante el transcurso de mi carrera Universitaria.

Alicia Gómez Méndez

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron en mi formación académica, amigos y profesores de la Licenciatura en Nanotecnología de la UNAM. Pero sobre todo a la UNAM por proporcionarme educación gratuita y de calidad durante mis estudios superiores.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho por impulsarme en el área de la investigación y por permitirme contribuir con esta tesis en su proyecto de terapias dirigidas para el tratamiento de metástasis en hueso. Le agradezco también ser una guía para mí todo este tiempo, por su comprensión y entusiasmo siempre. Al M.C. Fernando Guerra por introducirme en las técnicas que necesitaba comprender para este trabajo y ayudarme, por su tiempo, conocimiento y sus siempre francos comentarios. Al Dr. Pierrick Fournier por su apoyo técnico en el uso del citómetro de flujo. Agradezco también al laboratorio del Dr. Fernando López Casillas por permitirme realizar parte de mi trabajo en el Instituto de Fisiología celular, especialmente al M.C. Valentín Mendoza por su invaluable ayuda técnica en Western Blots.

A mi papá por apoyarme en mis estudios siempre y creer en mí, a mi mamá por sus consejos y cariño. A mis hermanas Tatiana y Gabriela por siempre estar presentes en los momentos más difíciles y hacer de ellos algo más llevadero, por el amor, las ocurrencias y los momentos divertidos. A mis tíos y a mi abuelita por sus amables consejos y apoyo siempre.

A mis amigas: Fernanda, Ashley y Angélica, por estar presentes siempre que las necesitaba, por sus consejos, cariño y risas en cada una de las etapas que vivimos juntas desde la prepa.

Contenido	Página
1. Introducción.....	9
1.1 Cáncer y cáncer de mama.....	9
1.1.1 Factores de riesgo del cáncer de mama.....	10
1.1.2 Clasificaciones del cáncer de mama: histológica y molecularmente.....	11
1.1.3 La vía de señalización del TGF- β	14
1.1.4 La vía del TGF- β y el cáncer.....	16
1.2 Antecedentes.....	17
1.2.1 El betaglicano.....	17
1.2.2 El betaglicano como inhibidor de la vía de señalización del TGF- β con potencial terapéutico en cáncer.....	18
1.2.3 Uso de lentivirus para modificar el material genético de las células cancerosas.....	19
1.3 Justificación	20
1.4 Hipótesis	20
1.5 Objetivos.....	21
1.5.1 General	21
1.5.2 Específico	21
2. Metodología.....	21
2.1 Verificación de las clonaciones de betaglicano	23
2.2 Plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral.....	24
2.3 Cultivo celular	25
2.4 Generación de células estables por medio del sistema lentiviral	26
2.4.1 Transfección de células 293T y transducción de células MDA-MB-231.....	26
2.4.2 Selección de clonas estables con puromicina	28
2.5 Caracterización de las células transducidas.....	28

2.5.1	Estimación de la eficiencia de la transducción por citometría de flujo.....	28
2.5.2	RT-qPCR.....	29
2.5.3	Western Blot.....	29
2.6	Ensayos celulares.....	31
2.6.1	Ensayo de proliferación celular.....	31
2.6.2	Ensayo de migración celular.....	32
3.	Resultados	32
3.1	Análisis de la restricción del las clonas pLJM1-sBG y pLJM1-mBG.....	32
3.2	Transfección de células 293T y transducción de células MDA-MB-231.....	33
3.3	Evaluación de la eficiencia de la transducción.....	35
3.4	Estabilización de las células en selección de puromicina.....	37
3.5	Caracterización de las células transducidas.....	38
3.5.1	RT-qPCR.....	38
3.5.2	Identificación de las proteínas de interés mediante Western Blot.....	41
3.6	Ensayos celulares.....	43
3.6.1	Ensayo de proliferación.....	43
3.6.2	Ensayo de migración celular.....	45
4.	Discusión	46
5.	Conclusiones	53
6.	Bibliografía	54

Lista de figuras y tablas

Figura	Página
1. Gráficas del cáncer de mama con datos de la GLOBOCAN 2018 a nivel mundial y en México.....	10
2. Vista lateral de los carcinomas ductal y lobular invasivo.....	11
3. Subtipos moleculares de cáncer de mama y acción de fármacos hormona-positivo.....	14
4. Vía de señalización del TGF- β	15
5. Estructura del betaglicano.....	18
6. Proceso de proteólisis del betaglicano membranal.....	19
7. Diagrama general del proceso de generación de células MDA-MB-231 estables.....	22
8. Construcciones de plásmidos de betaglicanos y proteína control.....	23
9. Sistema lentiviral de tercera generación para la producción de partículas lentivirales.....	25
10. Verificación de la identidad de los plásmidos de betaglicano.....	33
11. Microscopía de fluorescencia de las células 293T transfectadas con eGFP, mBG y sBG.....	34
12. Células MDA-MB-231 transducidas con el sistema lentiviral.....	35
13. Diagramas de densidad para los parámetros de granularidad, tamaño celular e intensidad de fluorescencia en las células transducidas con eGFP.....	36
14. Determinación de la eficiencia de la transducción de células MDA-MB-231.....	37
15. Células MDA-MB-231 en proceso de selección de puromicina a los 17 días de selección	38
16. Curvas de amplificación del RT-qPCR.....	39
17. Curvas de desnaturalización del RT-qPCR.....	40
18. Identificación del dominio extracelular del betaglicano mediante Western Blot.....	42

19.	Ensayo de proliferación celular de las células MDA-MB-231 transducidas con mBG y sBG	44
20.	Ensayo de migración celular.....	45

Tablas

Página

I. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama..... 12

1. Introducción

1.1 Cáncer y cáncer de mama

El cáncer es considerado como un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un desbalance entre la proliferación celular y la apoptosis, debido a la pérdida de homeostasis del organismo [1]. Además, el cáncer puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo, por lo que cada tipo celular da origen a un cáncer distinto [2].

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que se forma en los tejidos de las mamas. El tipo más común es el carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento de los ductos de leche. Otro tipo es el lobular, el cual se origina en los lóbulos de los senos, específicamente en las glándulas productoras de leche [3].

De acuerdo con datos estadísticos por GLOBOCAN 2018 (Figura 1), el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo, representando el 11.6% (~2.08 millones) de todos los casos de cáncer reportados el mismo año. En mujeres ocupa el primer lugar con un estimado de 2.08 millones de casos nuevos diagnosticados, cifra que abarca el 24.2% de todos los cánceres en mujeres [4]. Y en hombres aunque no es común, pueden darse casos, aunque son minoría comparados con las mujeres, pues se estima que 1 en 833 hombres tienen riesgo de contraer cáncer de mama durante su vida. La Asociación Americana de Cáncer estimó que en el año 2018 en Estados Unidos se diagnosticarían 2,550 casos nuevos de cáncer de mama invasivo en hombres, además de 480 casos de muerte [5].

En México se estima que el cáncer de mama representa el 26% (27,283 casos), colocándose como el más común en la población femenina. Este tipo de cáncer no sólo es el más frecuente, también es la primera causa de muerte en mujeres en el país, representando el 16% (6,884 decesos) del total de muertes reportadas en 2018 [4].

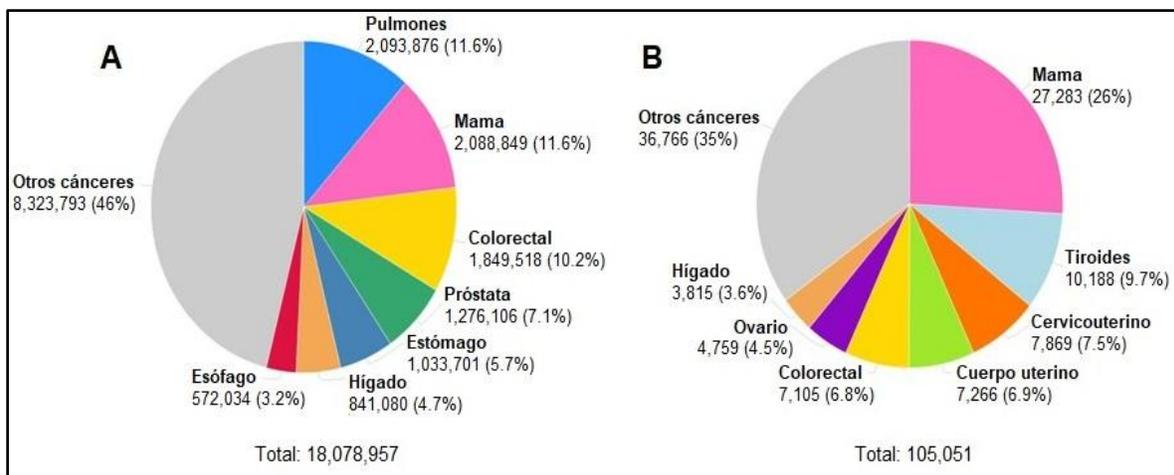


Figura 1. Gráficas del cáncer de mama con datos de la GLOBOCAN 2018 a nivel mundial y en México. A) En 2018 el cáncer de mama ocupó el segundo lugar de todos los casos incidentes de cáncer, en la población en general, y solamente superado por el cáncer de pulmón. B) En México esta enfermedad ocupa el primer lugar tanto en casos nuevos en mujeres. Imagen modificada de GLOBOCAN 2018 (<http://gco.iarc.fr>).

1.1.1 Factores de riesgo del cáncer de mama

Existen diversos factores de riesgo que propician el desarrollo del cáncer de mama. Factores como la ingesta de alcohol y la obesidad son algunos de ellos, así como la exposición a la radiación y terapias de reemplazamiento hormonal con estrógenos y progesterona. Entre los factores fisiológicos de riesgo, se mencionan a mujeres cuyo primer periodo menstrual fue antes de los 12 años de edad o que presentaron una menopausia después de los 55 años de edad [6].

Por otro lado, las mujeres que no tuvieron hijos o embarazos después de los 30 años de edad tienen predisposición a padecer cáncer de mama, así como aquellas mujeres con antecedentes de neoplasias o hiperplasias en los senos. El factor genético tiene un peso importante, sobre todo en aquellas personas que tienen antecedentes familiares con la enfermedad, o bien, mutaciones genéticas en los genes de cáncer de mama 1 y 2 (o *BRCA1* y *BRCA2*, por sus siglas en inglés, *breast cancer 1* y *2*) [6].

1.1.2 Clasificaciones del cáncer de mama: histológica y molecularmente

Histológicamente, el cáncer de mama puede categorizarse ampliamente en carcinoma *in situ* e invasivo o de infiltración, los cuales son básicamente un grupo de tumores formados por tejidos epiteliales. El tipo *in situ* puede subclasificarse en ductal y lobular, siendo más común el carcinoma ductal *in situ*. Por otro lado, los carcinomas invasivos son considerados un grupo heterogéneo de tumores que se diferencian en subtipos histológicos que se filtran en tejidos adiposos circundantes, los más comunes son el carcinoma ductal invasivo y lobular invasivo (Figura 2). El 70-80% de todas las lesiones invasivas corresponden al carcinoma ductal invasivo [7].

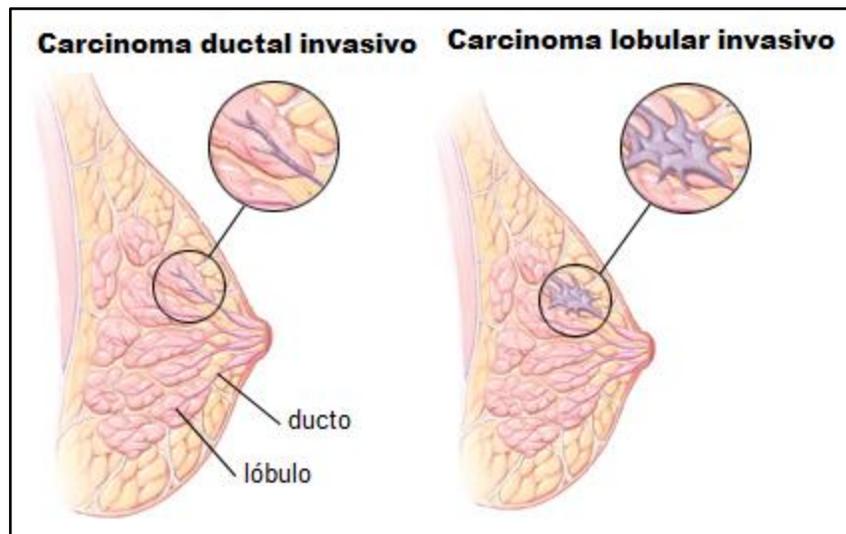


Figura 2. Vista lateral de los carcinomas ductal y lobular invasivo. El tipo ductal (izquierda) es más común con un ~80% de todos los cánceres de mama. Tan sólo el 10% de los casos es del tipo lobular (derecha), es decir, que se genera en las glándulas productoras de leche. Imagen modificada de Harvard Health Publishing (<https://www.health.harvard.edu>).

Asimismo, el cáncer de mama puede ser clasificado de acuerdo a cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, triple negativo, HER2/neu enriquecido (neu viene de neural, pues HER2 fue derivado de una línea celular de glioblastoma de roedor) [8]. Cada subtipo responde a tres biomarcadores: receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2),

véase Tabla I. No obstante, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) carece de cada uno de estos receptores, la línea celular MDA-MB-231 es ejemplo de este tipo de cáncer [9]. El CMTN tiene una tasa alta de recurrencia y una pobre supervivencia en las mujeres que lo padecen. Cabe mencionar que es considerado el cáncer más común en mujeres jóvenes. Algunos estudios sugieren que la prevalencia del CMTN en comparación con los otros subtipos moleculares, abarca el 23.1% de los casos totales de cáncer de mama en la población mexicana e hispana. Mientras que la prevalencia del CMTN en la población caucásica es tan sólo del 10-13%, siendo menor que a la de la población mexicana e hispana, pero parecida a la reportada en la afroamericana, la cual oscila entre el 23-30% [10].

Tabla I. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama. Los subtipos moleculares se clasifican de acuerdo a la presencia (+) o ausencia (-) de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En el caso de luminal B, puede encontrarse HER2 o bien, tenerse un índice de proliferación celular (Ki-67) mayor al 13% [11].

Subtipo molecular	Receptor de estrógenos (RE)	Receptor de Progesterona (RP)	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+/Ki-67>13%
HER2/neu	-	-	+
Triple negativo	-	-	-

Debido a que el CMTN carece de blancos moleculares, el tratamiento más efectivo es la quimioterapia convencional. La quimioterapia consiste en un conjunto de fármacos antineoplásicos sistémicos de administración intravenosa u oral que destruyen células activas, es decir, células en rápido crecimiento y división. Sin embargo, las células cancerosas no son las únicas activas, también lo son algunas células sanas como las que revisten la boca e intestinos, así como las responsables del crecimiento del cabello. El

daño a estas células es lo que produce los efectos secundarios de la quimioterapia, tales como llagas en la boca, náuseas y caída del pelo [12, 13].

Los tratamientos actuales para el cáncer de mama, además de quimioterapia, incluyen la radioterapia y cirugía. Ambos de carácter invasivo, en el caso de la radioterapia todavía se requieren estudios para encontrar las dosis necesarias para los tumores sin afectar los tejidos circundantes. El caso de la cirugía se trata de una opción que requiere tiempo de recuperación, no garantiza la extirpación total del tumor y no es opción para todos los tipos de cáncer (sobre todo en casos de metástasis y leucemias). Sin mencionar el hecho de que en la mayoría de las cirugías se requiere retirar tejido sano circundante al área del tumor [14].

En algunos casos las terapias convencionales van acompañadas de fármacos complementarios para el tratamiento del cáncer de mama, entre los más comunes se encuentran: tamoxifeno, herceptin (nombre genérico: trastuzumab), anastrozol, exemestano, letrozol, sólo por mencionar algunos [15]. No obstante, estos fármacos están diseñados para tratar tumores con RE, RP o HER2, por ejemplo el tamoxifeno bloquea la actividad del estrógeno sobre los RE y herceptin identifica a HER2 en la célula cancerosa para después ser destruida por el sistema inmune (Figura 3). Debido a la importancia que representa buscar fármacos más específicos sobre las células de cáncer para el tratamiento del CMTN, actualmente se están evaluando compuestos como taxanos, agentes de platino, agentes antiangiogénicos, inhibidores de EGFR, inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa e inhibidores de Src-Abl, entre otros [16].

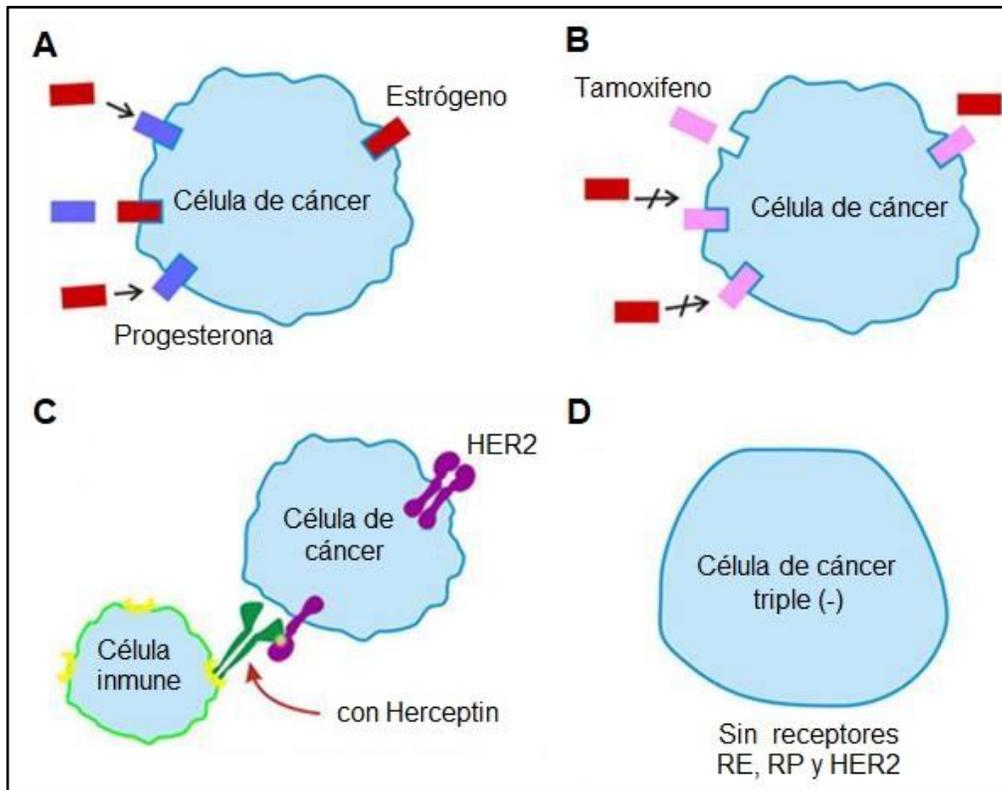


Figura 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama y acción de fármacos hormona-positivo. (A-C) Células cancerosas de mama hormona-positivo, en las cuales (A y B) se presentan receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP). Fármacos como el tamoxifeno son empleados como terapias de estos tipos de cánceres. (C) Las células cancerosas expresan receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Algunos agentes terapéuticos anti-HER2 emplean anticuerpos monoclonales comerciales como el Herceptin (Trastuzumab). (D) Imagen representativa de una célula cancerosa triple negativo, llamada así por la carencia de los tres receptores (RE, RP y HER2). Imagen modificada de Breast Care Center Miami (<http://www.bccmiami.com>).

1.1.3 La vía de señalización del TGF- β

El factor de crecimiento y transformación beta (o TGF- β , por sus siglas en inglés, *transforming growth factor beta*) pertenece a una diversa familia de citocinas altamente conservadas, cuya función además de actuar en respuestas inflamatorias e inmunes incluye el regular la homeostasis de tejidos [17]. El TGF- β participa en procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, apoptosis, así como la motilidad debida a la transición epitelio-mesenquimal (o MET, por sus siglas en inglés, *mesenchymal-epithelial*

transition), así como el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos [18,19]. Como molécula el TGF- β es un factor polipeptídico dimérico que tiene preferencia de afinidad por ciertas proteínas membranales. En cuanto a la vía de señalización, que recibe el mismo nombre que la molécula TGF- β (Figura 4), se encuentra compuesta por diversos receptores membranales: Receptor I (53 kDa), II (70-85 kDa) y III (200-400 kDa) del TGF- β . En donde son sólo necesarios los dos primeros para transmitir al interior de la célula la señal de la molécula del TGF- β . No obstante, la importancia del receptor tipo III del TGF- β (TGF β RIII), o también conocido como betaglicano (BG), reside en su papel como co-receptor, regulando el acceso del TGF- β a los receptores señalizadores [19].

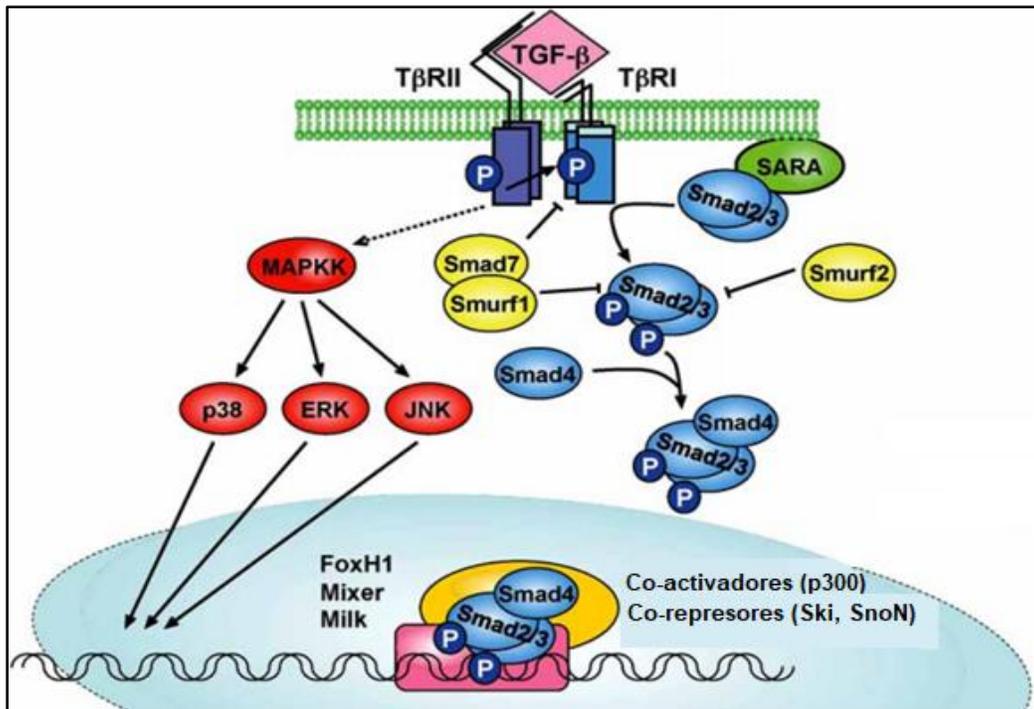


Figura 4. Vía de señalización del TGF- β . La unión del TGF- β al receptor II (TGF β RII) fosforilado forma un complejo con el receptor I (TGF β RI) a partir de su fosforilación. El TGF β RI, posteriormente desencadena una activación de mediadores intracelulares como las proteínas R-Smads (Smad2 y Smad3). La liberación de las proteínas R-Smad del complejo SARA (anclaje a Smad para activación de receptor) se da al fosforilarse Smad2 y Smad3. Posteriormente forman complejos con una Co-Smad (Smad4) y se translocan al núcleo celular para interactuar con moléculas co-activadoras y co-represoras, encendiendo y apagando genes TGF- β y Smad. TGF- β puede afectar otras vías de señalización, entre las que se incluyen las MAPKs, tales como la p38, ERK y JNK. Smurf2 y el complejo Smad7/Smurf1 son capaces de marcar componentes de la vía TGF- β para su degradación mediante ubiquitinización. Imagen modificada de Juarez & A. Guise, 2010.

Tanto el receptor I, como el tipo II presentan un pase transmembranal, una porción extracelular con la capacidad de unir al TGF- β y una intracelular compuesta por cinasas para la fosforilación de residuos serina y treonina. La vía de señalización comienza con la unión del TGF- β al receptor II, lo cual induce la formación de un complejo con el receptor tipo I. Para ello la cinasa del receptor II fosforila a la región GS del receptor I, llamada así por su alto contenido de glicinas y serinas. Una vez que el receptor I se encuentra fosforilado, experimenta un cambio de conformación que le confiere más afinidad a sus sustratos, las proteínas Smad [20].

Existen distintas variedades de proteínas Smad, pero las que son fosforiladas por el receptor I son las R-Smads (Smad2 y/o Smad3), lo cual continúa con la asociación de una R-Smad activa con una Co-Smad (Smad4). El complejo resultante culmina en su translocación al núcleo celular, en donde interactúa con otros reguladores transcripcionales para modular positiva o negativamente la expresión de los genes relacionados al TGF- β [21-23].

1.1.4 La vía del TGF- β y el cáncer

En los últimos años se ha buscado el desarrollo de nuevas terapias más efectivas y específicas contra las células cancerosas, tales como el uso de moléculas dirigidas o blancos moleculares que bloqueen el crecimiento y diseminación de la enfermedad. Para ello es necesario conocer las principales vías de señalización que se ven afectadas en el progreso de la enfermedad, tal es el caso de la vía de señalización del TGF- β , la cual se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento y proliferación celular [17].

Una de las observaciones más importantes es que el TGF- β se encuentra en cantidades bajas en tejidos normales. Contrariamente, esta citocina se encuentra elevada cuando hay tejidos dañados, tumores y una desregulación del BG [24, 25]. Asimismo, se sabe que

el TGF- β tiene efectos distintos sobre las células dependiendo de la fase del cáncer en la que se encuentren, por ejemplo, en la fase premaligna inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis y diferenciación. En etapas avanzadas el TGF- β actúa como promotor de invasión celular, angiogénesis, inmunosupresión, proliferación y metástasis [23, 26].

Por ello, una de las propuestas es enfocarse en blancos moleculares que regulen esta ruta de señalización, tal es el caso del BG. De esta manera, en el presente trabajo se pretende generar células cancerosas que sobreexpresen este receptor, caracterizar su expresión y efecto en funciones celulares como proliferación y migración celular.

1.2 Antecedentes

1.2.1 El betaglicano

Además de los receptores I y II en la vía de señalización existen co-receptores, tales como el betaglicano (BG) y la endoglina. No obstante, BG es el receptor que se expresa en una amplia variedad de tejidos epiteliales, mesenquimales y neuronales, tanto en la etapa fetal como en la edad adulta [27]. Por otro lado, el BG en comparación con su homólogo de endoglina, es capaz de unir tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) [28].

El BG es una glicoproteína integral de un solo paso formada por 851 aminoácidos, tiene una región extracelular extensa y otra citoplasmática corta de 42 residuos rica en serinas y treoninas. Asimismo, esta es un homodímero cuyos monómeros se encuentran unidos por interacciones no covalentes [18]. En su región extracelular presenta dos sitios de unión a TGF- β , llamados dominios de unión distal y proximal a membrana (Figura 5) [29].

Otra característica representativa del BG es que presenta dos sitios de unión a cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) del tipo sulfatos de heparano y condroitina, debido a la presencia de estas cadenas su peso molecular puede encontrarse en el rango de 280-330

kDa. Cabe mencionar que la ausencia de estas cadenas no afectan la unión del TGF- β al BG [27].

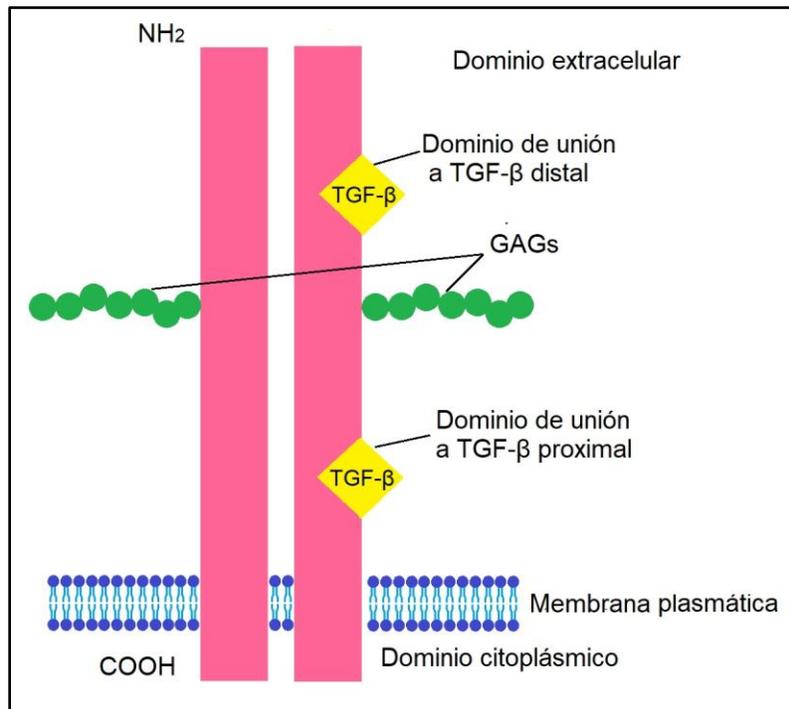


Figura 5. Estructura del betaglicano. La proteína betaglicano está compuesta por un dominio extracelular y uno citoplásmico. Su parte extracelular tiene dos dominios de unión a TGF- β y presenta sitio de unión a cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) de heparano y condroitina, por lo que su peso molecular oscila entre 280-330 kDa.

1.2.2 El betaglicano como inhibidor de la vía de señalización del TGF- β con potencial terapéutico en cáncer

Uno de los aspectos más característicos del BG es que su dominio extracelular puede sufrir proteólisis (Figura 6), lo cual genera una versión soluble de 120 kDa en el medio. Misma que puede encontrarse de manera normal en el suero, leche y matriz extracelular [30]. La porción soluble del betaglicano (sBG) es capaz de secuestrar la molécula del TGF- β , actuando como un inhibidor de los efectos del TGF- β , contrario a su contraparte membranal (mBG) [31]. Una observación importante de este proceso es que la acción de inhibidor del sBG se mantiene tanto en procesos *in vivo*, así como *in vitro* [29, 30].

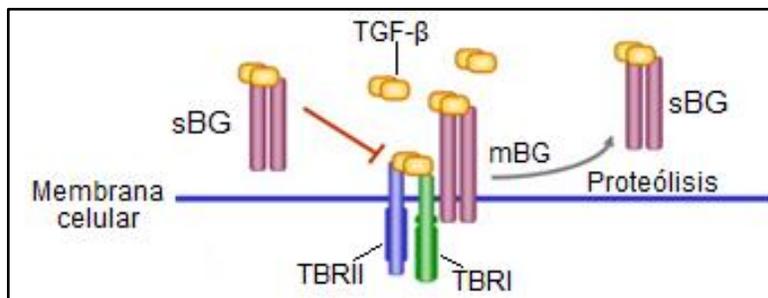


Figura 6. Proceso de proteólisis del betaglicano membranar. El dominio extracelular del betaglicano membranar (mBG) sufre de hidrólisis, produciendo una forma soluble de éste (sBG). Una vez soluble en la matriz extracelular, el betaglicano es capaz de mantener afinidad por la molécula del TGF- β en sus dos sitios de unión, actuando como un inhibidor de la vía de señalización del TGF- β . Imagen modificada de Bernabeu *et al.*, 2009.

Los altos niveles de TGF- β en la carcinogénesis ha llevado a observar otro tipo de alteraciones que se dan en la vía de señalización del TGF- β , muchas de las cuales se dan en los receptores del TGF- β y moléculas Smads [32, 33]. No obstante, la pérdida de la expresión y baja regulación es a menudo muy frecuente en varios tipos de carcinomas, entre ellos el cáncer de mama, por ejemplo en la línea celulares MCF7 y MDA-MB-231 se reportan bajos niveles de expresión del BG [34]. Se ha visto que la sobreexpresión del BG en MDA-MB-231 disminuye su capacidad de formación de tumores (tumorigenicidad) *in vivo* en ratones desnudos, además de la angiogénesis y metástasis [22]. Otros trabajos demuestran que la restauración de la expresión del BG *in vitro* inhibe la invasividad de las células cancerosas de mama [35].

1.2.3 Uso de lentivirus para modificar el material genético de las células cancerosas

Una de las formas más comunes para la sobreexpresión de proteínas usadas en la investigación es el empleo de sistemas lentivirales. Estos son capaces de incorporar genes exógenos mediante el uso de vectores virales en células de mamíferos, a dicho proceso se le conoce como transducción. Una de las ventajas de usar sistemas lentivirales es que permiten transducir células en proceso de división y aquellas que no lo están, sin causar una respuesta inmune [36, 37]. Además, se ha reportado que el uso de

lentivirus permite una alta sobreexpresión de los genes exógenos, y que estos permanezcan estables en el genoma de las células, generando líneas celulares de mamífero conocidas como "células estables" [38].

1.3 Justificación

El cáncer de mama es uno de los cánceres más comunes a nivel mundial y en la actualidad son limitados los tratamientos existentes. Es de interés desarrollar terapias menos invasivas, más eficientes y dirigidas a cánceres agresivos como lo es el CMTN.

Una de las vías de señalización que se encuentra desregulada en cáncer es la vía de señalización del TGF- β . Esta citocina se encuentra en concentraciones elevadas en tejidos dañados y en enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, una de las estrategias propuestas es disminuir esta citocina, la cual está involucrada en diversos procesos celulares como proliferación, migración, diferenciación, etc. Para determinar el mecanismo básico de TGF- β y la respuesta de las células de cáncer de mama a diferentes tratamientos anticancerosos, en este trabajo se desarrollaron células cancerosas que sobreexpresan un inhibidor del TGF- β para caracterizar en futuros trabajos el papel del BG en la metástasis ósea.

Para esto, se empleó un sistema lentiviral de tercera generación para producir células de CMTN (MDA-MB-231) estables que sobreexpresen las proteínas mBG y sBG. Este sistema es una forma novedosa y segura para obtener líneas celulares estables y con una sobreexpresión alta de las proteínas de interés.

1.4 Hipótesis

Las células cancerosas MDA-MB-231 transducidas con la secuencia del ADN codificante del BG utilizando un sistema lentiviral, producirán establemente al BG, e inhibirán al TGF- β generando una disminución de la tasa de proliferación y migración celular *in vitro*, así como una

alteración del gen de expresión de BG.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Generar células estables de cáncer de mama que sobreproduzcan BG y estudiar el efecto de esta molécula inhibidora en la vía del TGF- β .

1.5.2 Específico

1. Verificar vectores lentivirales con secuencias de BG (mBG y sBG), empleando una digestión enzimática para la obtención de los fragmentos de los insertos y del vector.
2. Transducir células de cáncer de mama utilizando un sistema lentiviral de tercera generación para el establecimiento de las secuencias de mBG y sBG en el genoma de las células cancerosas.
3. Producir células estables de cáncer de mama mediante selección de puromicina para elegir las células expresen establemente las proteínas mBG y sBG durante cuatro semanas.
4. Estudiar la sobreexpresión de sBG en las células transducidas con las secuencias mBG y sBG, haciendo uso de las técnicas de RT-qPCR y Western Blot para determinar su estabilidad en las células generadas.
5. Estudiar el efecto de las células transducidas con mBG y sBG en presencia de TGF- β en procesos celulares de proliferación y migración.

2. Metodología

El trabajo experimental para generar y caracterizar las células estables se llevó a cabo en diferentes etapas:

1. Verificar vectores lentivirales con las secuencias de mBG y sBG.
2. Transducción de células MDA-MB-231 mediante el uso de un sistema lentiviral de tercera generación.

3. Producir células estables que sobreexpresen las proteínas mBG y sBG mediante selección de puomicina.
4. Evaluación de la estabilidad de la sobreexpresión del gen de expresión de BG (RT-qPCR), así como de la proteína de sBG (Western Blot) en las células transducidas con las secuencias mBG y sBG.
5. Evaluación del comportamiento de las células generadas a nivel celular: proliferación y migración.

A continuación se presenta en la Figura 7 el diagrama general de la estrategia experimental del trabajo.



Figura 7. Diagrama general del proceso de generación de células MDA-MB-231 estables. El proceso comienza con la generación de las clonas de BG, posteriormente con la transducción de las células MDA-MB-231 mediante el uso de un sistema lentiviral de tercera generación. La producción de células estables se hará a partir de una selección con puomicina. Para la caracterización de la proteína sBG y la evaluación de la expresión del gen de expresión de BG se utilizarán las técnicas de Western Blot y RT-qPCR. Se realizarán ensayos de proliferación y migración para observar el efecto de las células transducidas con las proteínas mBG y sBG.

2.1 Verificación de las clonaciones de betaglicano

Los plásmidos conteniendo la secuencia de las dos versiones de BG utilizados en esta tesis, fueron obtenidos de la tesis de maestría de la M. C. Elva Alejandra Gárate Carrillo, quien realizó la clonación en el vector lentiviral pLJM1. En la Figura 8 se muestran las construcciones realizadas de los plásmidos de BG. El vector comercial pLJM1-eGFP (9,000 pb) sirvió de control en los procesos de transfección y transducción, pues contiene el gen codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (o eGFP, por sus siglas en inglés, *enhanced green fluorescent protein*) y uno de resistencia al antibiótico puromicina. Para realizar las construcciones de BG se removió la secuencia codificante de eGFP mediante restricción enzimática. El vector linealizado se empleó para la subclonación de sBG y mBG utilizando el kit Gibson Assembly™ (New England Biolabs (NEB)).

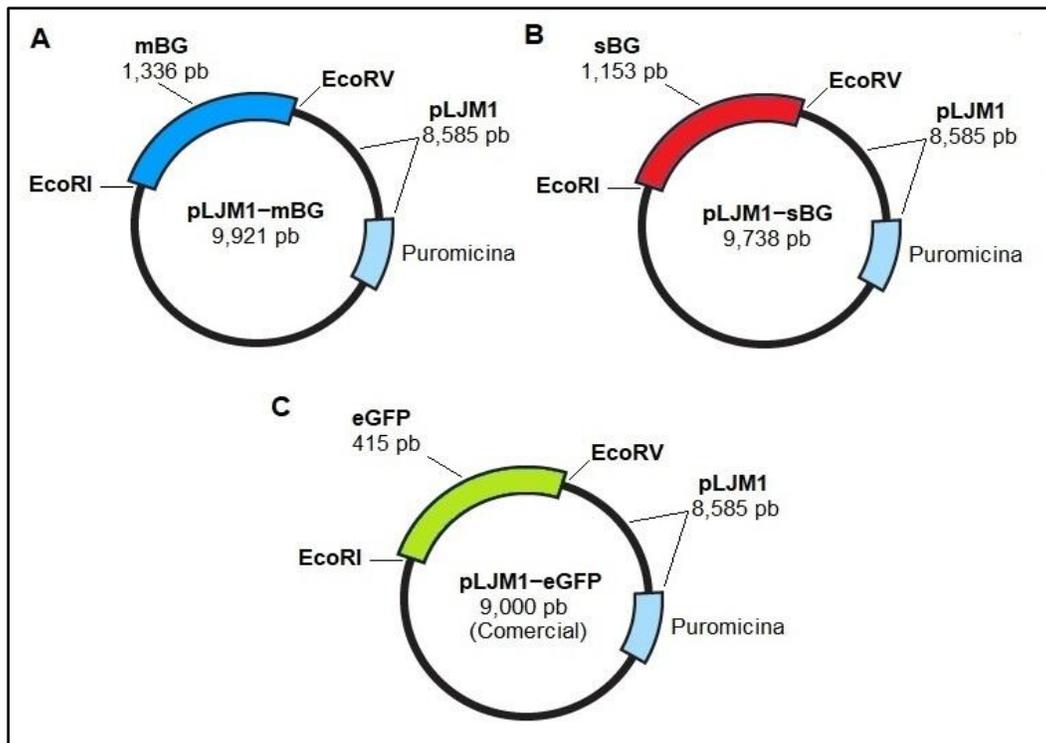


Figura 8. Construcciones de plásmidos de betaglicanos y proteína control. (A) Construcción de betaglicano membranar (mBG), (B) soluble (sBG) y (C) de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP). Todos los plásmidos emplean un vector lentiviral (pLJM1), tienen dos sitios de corte para las enzimas EcoRI y EcoRV, así como un gen de resistencia a puromicina.

Las construcciones presentan un gen de resistencia al antibiótico puromicina y tienen sitios de restricción para las enzimas EcoRI y EcoRV, las cuales se emplearon para la verificación de la identidad de las construcciones. Para la digestión enzimática se colocaron 500 ng de plásmido, agua destilada, Buffer 3.1 10x (NEB), así como las enzimas EcoRI y EcoRV. La reacción total se llevó a cabo en un volumen de 15 µl, se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción al elevar la temperatura a 80 °C, a las reacciones se añadió buffer de carga y se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 30 minutos.

2.2 Plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral

Los plásmidos empleados para el sistema lentiviral son cuatro: pLP1, pLP2, pMD2.G y pLJM1-gen de interés. En la Figura 9 se muestra el proceso en la formación del lentivirus, en donde pLP1 con genes *gag* y *pol* codificantes de las poliproteínas de la nucleocápside. El gen *rev* del plásmido pLP2 sirve para producir la enzima transcriptasa reversa, misma que sintetiza ARNm de la proteína del vector de interés (pLJM1-gen de mBG y sBG). El cuarto plásmido necesario para crear la envoltura del lentivirus es pMD2.G, este plásmido codifica para la cápside del virus de estomatitis vesicular (VSV-G) [38].

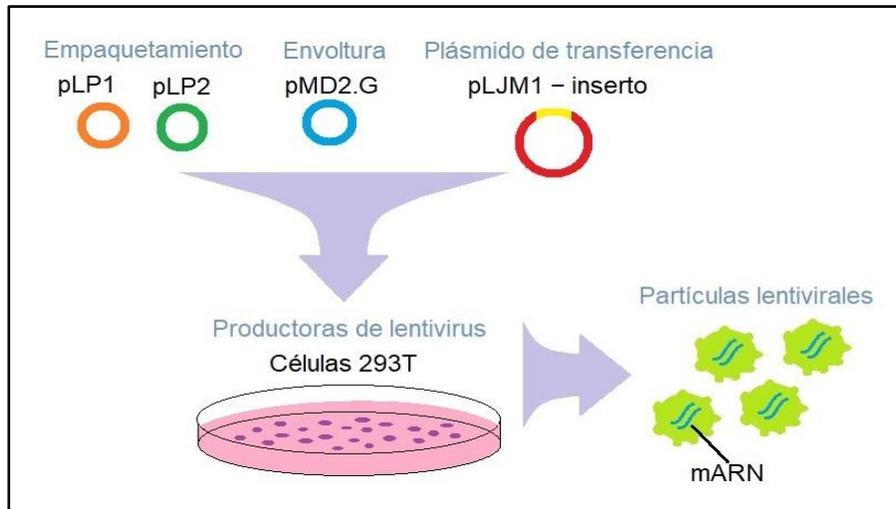


Figura 9. Sistema lentiviral de tercera generación para la producción de partículas lentivirales. Las células 293T de riñón embrionario son productoras del lentivirus, para ello requieren de cuatro plásmidos: el plásmido a empaquetar (pLJM1-inserto de interés), dos necesarios para el empaquetamiento del plásmido de interés (pLP1 y pLP2) y otro (pMD2.G) para crear la envoltura o cápside del virus de estromatitis vesicular (VSV-G).

2.3 Cultivo celular

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: células 293T, para producir el lentivirus debido a su alta eficiencia de transfección. Estas células son de riñón embrionario, fueron transformadas con el antígeno SV40 y presentan una morfología epitelial. Y células MDA-MB-231, las cuales son células de cáncer de mama triple negativo de humano, fueron aisladas de un derrame pleural y con regulación autócrina por factores de crecimiento. Tanto las células 293T como las MDA-MB-231 fueron obtenidas del ATCC y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 µg/ml de antibiótico penicilina-estreptomicina. Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y a 37 °C y se mantuvieron en cultivo en diluciones 1:5 o 1:10. La confluencia óptima para los experimentos fue del 80-85%.

2.4 Generación de células estables por medio del sistema lentiviral

2.4.1 Transfección de células 293T y transducción de células MDA-MB-231

Para el proceso de transfección se realizaron dos experimentos de manera independiente, cada cual con el objetivo de integrar el plásmido de: mBG y sBG. En cada experimento se colocó un control del plásmido pLJM1-eGFP para medir la eficiencia de la transfección mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

El proceso de transfección de las células 293T se llevó a cabo en varios días, al día cero del experimento se sembraron ~90,000 células por pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 500 μ l de medio DMEM suplementado con SFB. Se sembraron pozos por triplicado para cada reacción, tres para el control negativo, tres para el control positivo con eGFP, tres para mBG y tres para el sBG. Al día uno se revisó mediante microscopía óptica que las células estuvieran saludables y a una confluencia entre el 50-60%.

Posteriormente se procedió a realizar una mezcla equimolar de los cuatro plásmidos a concentración final de 20 ng/ μ l en DMEM basal: tres de empaquetamiento y uno de la proteína de interés (eGFP, mBG o sBG), considerando un volumen total de 40 μ l de la mezcla de plásmidos por pozo de células a transfectar. De manera simultánea se preparó otra mezcla de volumen igual (40 μ l) de Lipofectamina 2000 y DMEM basal, colocándose 1 μ l de Lipofectamina por cada 25 μ l de medio. Finalmente, se utilizaron las dos preparaciones para hacer una sola en proporción 1:1 de lipofectamina y plásmidos. La nueva mezcla se homogeneizó y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente antes de colocar 75 μ l de la solución por pozo.

El día dos se retiró el medio con plásmido sin transfectar y se colocaron 250 μ l de DMEM suplementado por pozo. Para el día tres se revisó la fluorescencia de las transfectadas con eGFP para determinar si se había realizado correctamente el proceso. En caso de

fluorescencia se procedió a recolectar el sobrenadante con partículas lentivirales producidas durante las primeras 24 horas y se almacenó a 4 °C para evitar su degradación. Para la transducción de las células MDA-MB-231 con el sobrenadante de las partículas lentivirales, ese mismo día se realizó el sembrado de ~20,000 células en 500 µl por pozo de placas de 24 pozos. Se empleó medio DMEM suplementado y se sembró un pozo por cada condición a probar, excepto para la de eGFP. Para esta se sembraron dos pozos: uno para citometría de flujo para evaluar la eficiencia de la transducción del control de eGFP, y otro para seleccionar con puromicina las células estables que expresen mBG o sBG y el gen de resistencia a este antibiótico.

El día cuatro se revisó la fluorescencia de las células y se colectó la última cosecha de partículas lentivirales. El sobrenadante se reservó con el recuperado el día anterior, obteniéndose un volumen final de 1.5 ml por cada tres pozos transfectados con el mismo plásmido.

Para la transducción de las células MDA-MB-231, se centrifugaron las colectas de los días tres y cuatro a 1,000 g por cinco minutos a temperatura ambiente. Esto con la finalidad de remover los residuos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente se le añadió bromuro de hexadimetrina (Polibreno) a una concentración final de 8 µg/ml. Se removió el medio de los pozos y se reemplazó por 1 ml de la suspensión lentiviral por pozo y se incubó. El día cinco sólo se removió el sobrenadante para retirar las partículas lentivirales en suspensión y se reemplazó por medio suplementado. Las células permanecieron en incubación y se monitorearon los días seis y ocho del experimento.

2.4.2 Selección de clonas estables con puromicina

Para generar células estables se seleccionaron las células transfectadas mediante el uso del antibiótico puromicina. Por el lapso de una semana se mantuvo a las células en DMEM suplementado antes de adicionar la puromicina. El antibiótico se empleó a una concentración final de 0.25 µg/ml y las células se expandieron paulatinamente a placas de 10 cm. Se realizó mantenimiento de las células y al día 20 después de la transducción se comenzó a criopreservar viales de las células transducidas cada semana hasta completar un mes, esto con la finalidad de analizarlas en diferentes tiempos y evaluar la estabilidad de la expresión de las proteínas de interés. Cada muestra de células transducidas con mBG y sBG se etiquetó del uno al cuatro, identificándolas de acuerdo a la semana de expresión durante el proceso de selección de puromicina.

2.5 Caracterización de las células transducidas

2.5.1 Estimación de la eficiencia de la transducción por citometría de flujo

El día ocho del experimento de transfección y transducción se tripsinizó un pozo del grupo de células control positivo a eGFP, se centrifugaron a 800 g por cinco minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en una solución 1:10 de DMEM suplementado y PBS en un volumen de 700 µl. La muestra se mantuvo en hielo y se analizó en el citómetro de flujo (Attune® acoustic focusing cytometer de Applied Biosystems). En el citómetro se registraron los siguientes parámetros: tamaño, granularidad e intensidad de fluorescencia de las células, así como el porcentaje de fluorescencia en función del número de células. Para detectar una señal fluorescente en el citómetro de flujo, las células transducidas con eGFP se excitaron a una longitud de onda de 488 nm, observándose una emisión a 509 nm.

2.5.2 RT-qPCR

Para la evaluación de los transcritos de las proteínas sBG y mBG, se sembraron en placas de 24 pozos ~80,000 células en un volumen de 500 µl y se incubaron por 24 horas. Para la extracción de ARN se empleó el kit de extracción GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) y se cuantificaron las muestras por Nanodrop (Thermo Scientific). Para obtener cDNA de las muestras mediante la reacción de transcripción reversa, se utilizó el kit SuperScript II (Invitrogen). Para ello se utilizaron 130 ng de ARN por muestra en un volumen total de reacción de 20 µl. Se utilizó el gen constitutivo *HRPT1*, que codifica para la proteína hipoxantina fosforribosiltransferasa 1, para normalizar las curvas de amplificación del gen *TGFBR3* que expresa a la proteína BG. Para rastrear el progreso de la amplificación del ADN, la reacción fue preparada en 10 µl de volumen utilizando SYBRgreen 2x (Qiagen) como tinte fluorescente de unión al ADN. Cada grupo se evaluó por triplicado en el termociclador (Applied Biosystems 7500).

2.5.3 Western Blot

Para la identificación de las proteínas sBG y mBG se sembraron ~650,000 células por pozo en placas de seis pozos y en un volumen de 2 ml de medio, se dejaron incubar por 24 horas. Previo al lisado de las células, se recolectaron 500 µl de su medio y se guardó a -80 °C. Para romper mecánicamente las células se utilizaron 125 µl de buffer de lisis por pozo (NaCl 150 mM , NP40 (IGEPAL) 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Inhibidor de proteasas Roche 1x y agua). Se colectaron los lisados, se centrifugaron por 15 minutos a 15,100 g, se rescató el sobrenadante y almacenó a -80 °C.

Las muestras fueron cuantificadas por la técnica de Bradford (Sigma-Aldrich) y se cargaron entre 30 y 40 µg de proteína en geles de acrilamida al 16% y se separaron por electroforesis a 250 V por 30 minutos. Además de las muestras de proteína, se corrieron 20 µl de las muestras tomadas del medio de las células y se colocó un control negativo de

lisado de células MDA-MB-231 sin transducir. Posteriormente los geles se electrotransfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en una cámara semi-húmeda a 400 mA y a 20 V constantes por una hora. Las membranas se bloquearon con leche semidescremada al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 25 mM pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se utilizó anti-sBG generado en el laboratorio del Dr. Fernando López-Casillas y nombrado como 822, a una concentración 1:2,000 y se incubó por dos horas. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate) a 1:20,000 por una hora. Cabe mencionar que las diluciones de todos los anticuerpos se realizaron en leche semidescremada al 5%. Las proteínas de interés se detectaron por un método quimioluminiscente utilizando el reactivo de Millipore Sustrato inmobilon quimioluminiscente de HRP para transferencias "Western" (Immobilon western chemilum hrp substrate). Las lecturas de las membranas se realizaron en un cuarto oscuro y se emplearon soluciones de revelado y fijado, esto tras colocar las membranas sobre películas de autorradiografía hasta conseguir las imágenes deseadas de revelado.

Como proteína control se utilizó la tubulina, para identificarla se les retiró los anticuerpos anti-sBG a las membranas (stripping), para ello se incubaron con solución de stripping (glicina 1.5%, SDS 0.1%, Tween 1% y pH 2.2) por 30 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados de las membranas con TBS-Tween y se bloquearon con leche. Se utilizó anti- α -tubulina producida en ratones (Sigma-Aldrich) como anticuerpo primario a una concentración de 1:4,000 y se incubó toda la noche. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-ratón (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, horseradish peroxidase conjugate) a 1:40,000 por dos horas. Las membranas se revelaron empleando el mismo método quimioluminiscente.

Finalmente, se utilizó el sistema de documentación de geles (Bio-Rad) para hacer las lecturas de las membranas, tomando imágenes cada dos segundos de un total de cinco minutos de exposición total con los reactivos quimioluminiscentes.

2.6 Ensayos celulares

2.6.1 Ensayo de proliferación celular

Se sembraron ~15,000 células en 100 µl por pozo en placas de 96 pozos, se colocaron cuadruplicados por cada línea celular a evaluar con y sin tratamientos de TGF-β. Las líneas celulares que se evaluaron fueron: MDA-MB-231 sin modificar, así como las MDA-MB-231 modificadas con los genes sobreexpresados de las proteínas mBG y sBG. Para ello se emplearon las células transducidas a la semana tres (mBG3 y sBG3) de selección de puromicina, las cuales corresponden al pase celular 12.

Las células fueron dejadas en inanición por 12 horas pre tratamiento, es decir, libre de SFB, para ello a las células únicamente se les colocó medio DMEM basal. La inanición se realizó con la intención de sincronizar el ciclo celular de las células y para observar un efecto debido al TGF-β, no del SFB. Posteriormente, al grupo de células sin tratamientos (S/T) sólo se les reemplazó el medio basal por medio DMEM. Por otro lado, al grupo de células con tratamiento se les añadió DMEM suplementado con una concentración final de 50 pg/ml de TGF-β. Los tratamientos se detuvieron a las 24 y 48 horas, se les añadió 20 µl de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a concentración 5 mg/ml y se dejó incubar por cuatro horas. Esto con la intención de que el MTT (color amarillo) formara precipitados de sales de formazan (forma reducida del MTT y color morado/azul oscuro) en el interior de las células. Finalmente se les adicionó 100 µl de buffer de lisis (0.01 M HCl, 10% SDS) para disolver los precipitados y se incubó por 20 horas más. Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro (Epoch™ Microplate

Spectrophotometer de BioTek) a 570 nm, longitud de onda correspondiente a la cual absorben los productos solubilizados de las sales de formazan [39].

2.6.2 Ensayo de migración celular

Se partió sembrando ~100,000 células en 500 μ l de medio en placas de 24 pozos, sembrándose células MDA-MB-231 sin transducir y las transducidas con los genes de expresión de mBG y sBG. Se dejó en inanición a las células por 12 horas, posteriormente se les realizó la herida a las células con una punta estéril. Se marcaron tres sitios en la herida para observar la progresión del cierre de ésta, se lavó con PBS antes de colocar DMEM suplementado en el caso de las células sin tratamiento, mientras que para las tratadas se les colocó DMEM suplementado a concentración final de 50 pg/ml de TGF- β . Se tomaron fotos a las 24 y 48 horas después de colocados los tratamientos con la intención de monitorear una disminución en el área de la herida.

3. Resultados

3.1 Análisis de la restricción del las clonas pLJM1-sBG y pLJM1-mBG

Con la finalidad de identificar las construcciones de betaglicano membranal (mBG) y soluble (sBG) en un vector lentiviral (pLJM1), se realizó una digestión enzimática con las enzimas EcoRI y EcoRV.

En la Figura 10, se puede observar que en los resultados de la digestión enzimática de las construcciones se tienen los dos fragmentos esperados: el del vector y su inserto. Siendo la banda en 8,585 pb la correspondiente al vector, mientras que las localizadas en 1,336 pb y 1,153 pb pertenecen a los insertos de mBG y sBG, respectivamente. Por lo tanto, el patrón de bandas del gel confirma la identidad de las clonaciones con las que se prosiguió a realizar las transfecciones.

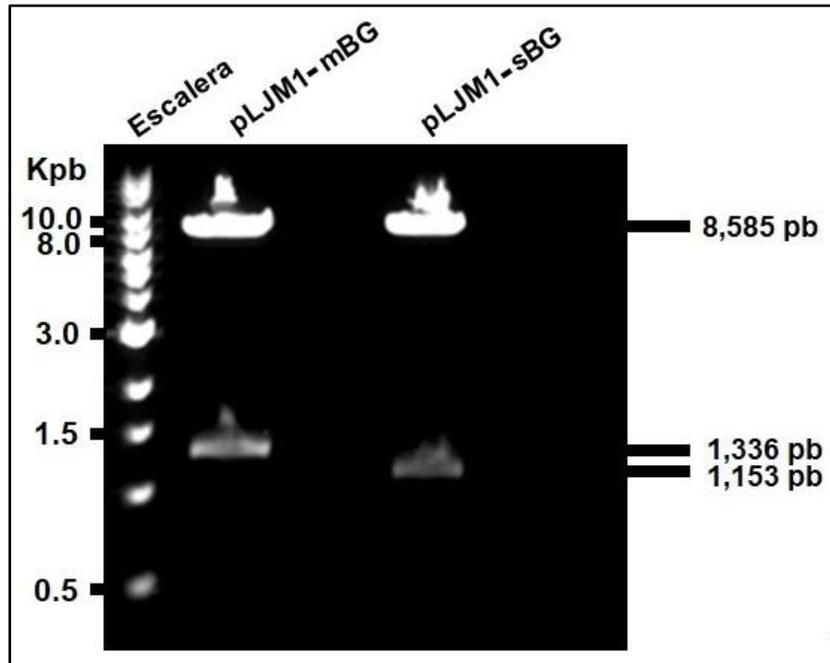


Figura 10. Verificación de la identidad de los plásmidos de betaglicano. Digestión de los plásmidos con las enzimas EcoRI y EcoRV a los 30 minutos. Se pueden identificar los fragmentos esperados de las construcciones pLJM1-mBG (8,585 pb vector y 1,336 pb inserto) y pLJM1-sBG (8,585 pb vector y 1,153 pb inserto).

3.2 Transfección de células 293T y transducción de células MDA-MB-231

Tras el proceso de transfección de las células productoras de lentivirus o 293T, se capturaron imágenes de fluorescencia para confirmar la expresión de la eGFP en las células control. En la Figura 11 pueden observarse algunas imágenes tomadas en los días tres y cuatro del experimento, en ellas se confirma una transfección exitosa en el grupo control y una producción de partículas lentivirales. Aunque no es visible un efecto fluorescente en los grupos mBG y sBG, la fluorescencia del control de eGFP indica que la técnica de transfección se realizó correctamente en eGFP y de manera indirecta en los grupos de BG.

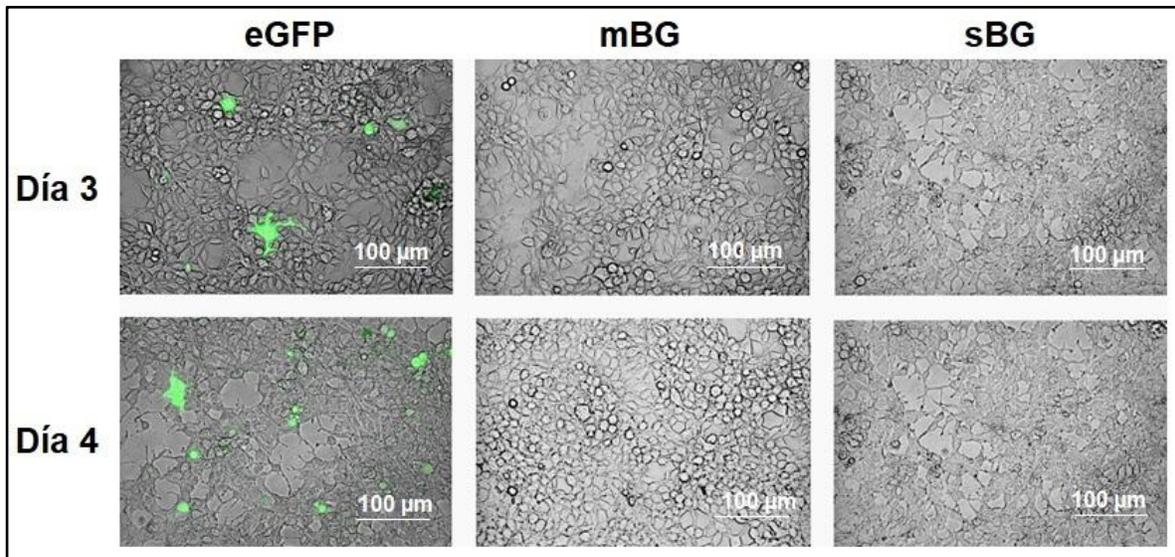


Figura 11. Microscopía de fluorescencia de las células 293T transfectadas con eGFP, mBG y sBG. Puede observarse fluorescencia en los días tres y cuatro en las células transfectadas con eGFP, confirmando la sobreexpresión de la proteína control y la producción de partículas lentivirales. Las células transfectadas con las construcciones de betaglicano no exhiben fluorescencia, pero sí producen lentivirus con el ARN codificante para mBG y sBG.

Para el proceso de transducción de las células MDA-MB-231, se puede observar en la Figura 12 que la fluorescencia es dependiente del tiempo y que al igual que en la Figura 11, el proceso de transducción se llevó a cabo de manera exitosa.

Las células se continuaron creciendo y se transfirieron a placas de cultivo más grandes para expandir las células y evitar el espacio limitado de los pozos y el incremento de la confluencia, lo cual resulta perjudicial para las células.

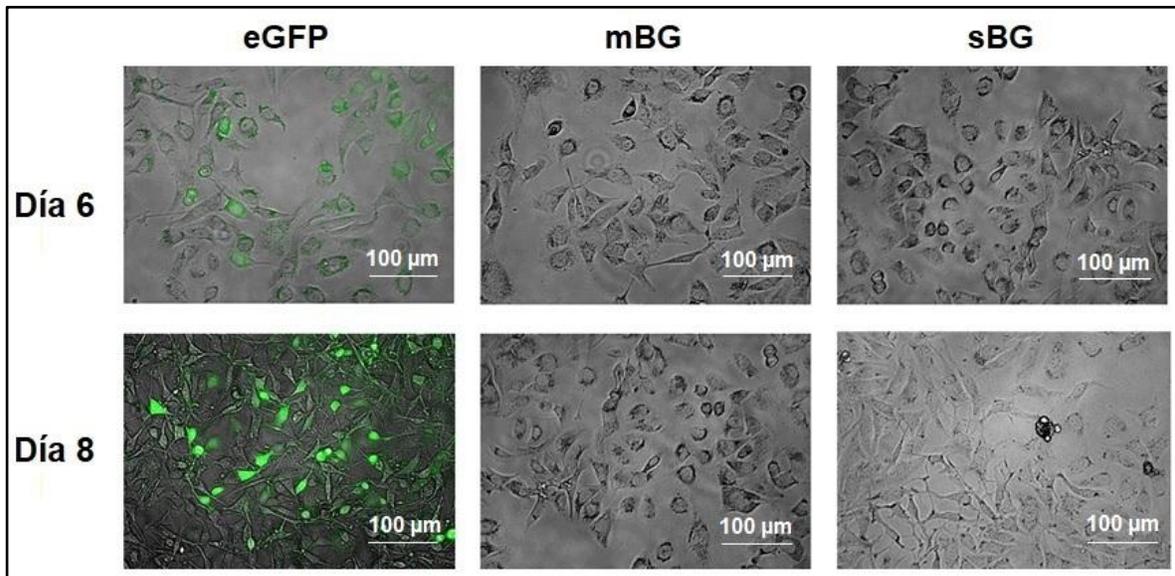


Figura 12. Células MDA-MB-231 transducidas con el sistema lentiviral. A la izquierda se muestran las células que expresan eGFP, al centro las de mBG y a la derecha las de sBG. La fluorescencia de eGFP incrementa con los días de incubación, siendo el día ocho el recomendado para la evaluación de la eficiencia de transducción.

3.3 Evaluación de la eficiencia de la transducción

Para la evaluación de la eficiencia de transducción de las células MDA-MB-231 se revisaron varios parámetros celulares mediante citometría de flujo, tales como la granularidad y tamaño de las células, así como la intensidad de la fluorescencia de las células control (eGFP). La Figura 13-A se observa que hay una zona muy densa (verde-rojo) correspondiente a restos celulares, por ser de menor tamaño y complejidad celular (granularidad) baja. La región morada-azul es donde se ubican las células, que en este caso son las de la muestra de GFP, mismas que van de lisas a granulosas y de tamaños variables.

En la Figura 13-B se muestra la dispersión de las células en cuanto a su granularidad e intensidad de fluorescencia. Las eGFP+ presentan fluorescencia en el rango de intensidad 10^3 - 10^5 , las eGFP- se localizan por debajo de este rango. Ambos grupos celulares tienen

un rango amplio de granularidad y se puede ver que ambos grupos abarcan alrededor de un 50% del total de células de la muestra

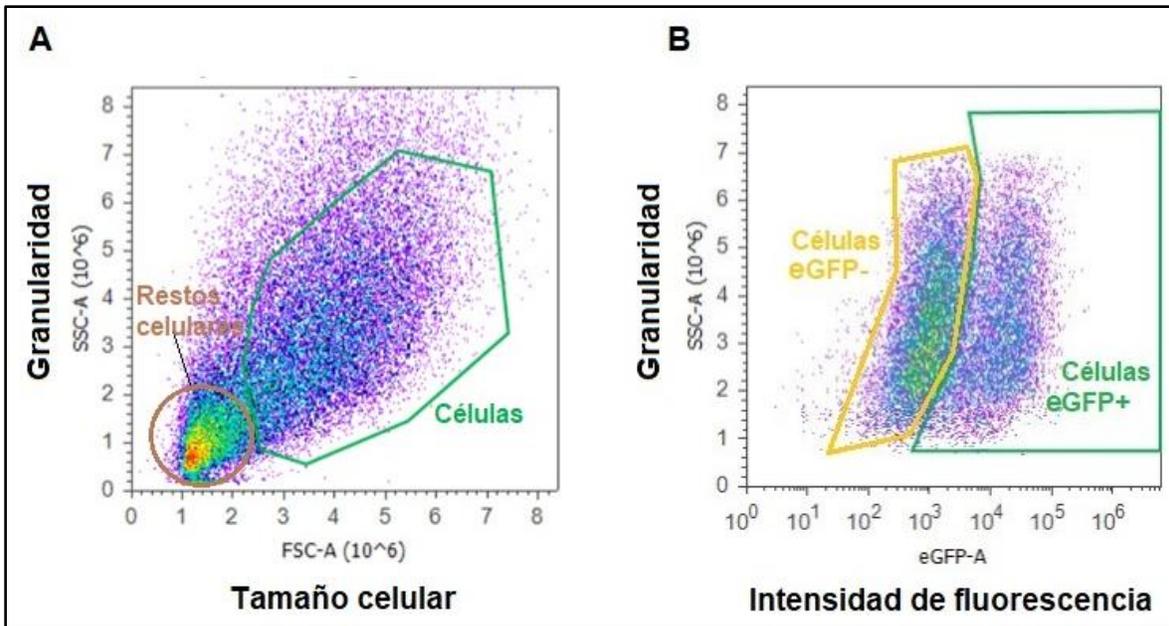


Figura 13. Diagramas de densidad para los parámetros de granularidad, tamaño celular e intensidad de fluorescencia en las células transducidas con eGFP. A) Los datos muestran que las células de la muestra presentan una morfología de lisa a granulosa y tamaño variable, además se observa una zona densa de restos celulares. B) El rango de granularidad de las células eGFP+ es amplio, no obstante, presentan fluorescencia en el rango de intensidad 10³-10⁵, debajo este valor se encuentran las no transducidas (eGFP-).

El empleo de la citometría de flujo permitió documentar la fluorescencia del control de eGFP. Como puede observarse en la Figura 14, se alcanzó un porcentaje de fluorescencia del 41.24% de todas las células en la muestra procesada por el citómetro de flujo. Esto indica que los procesos de transfección y transducción se realizaron de manera correcta en el control, por lo que se espera que las células transducidas con los plásmidos de BG también se hayan transducido (aunque no con la misma eficiencia).

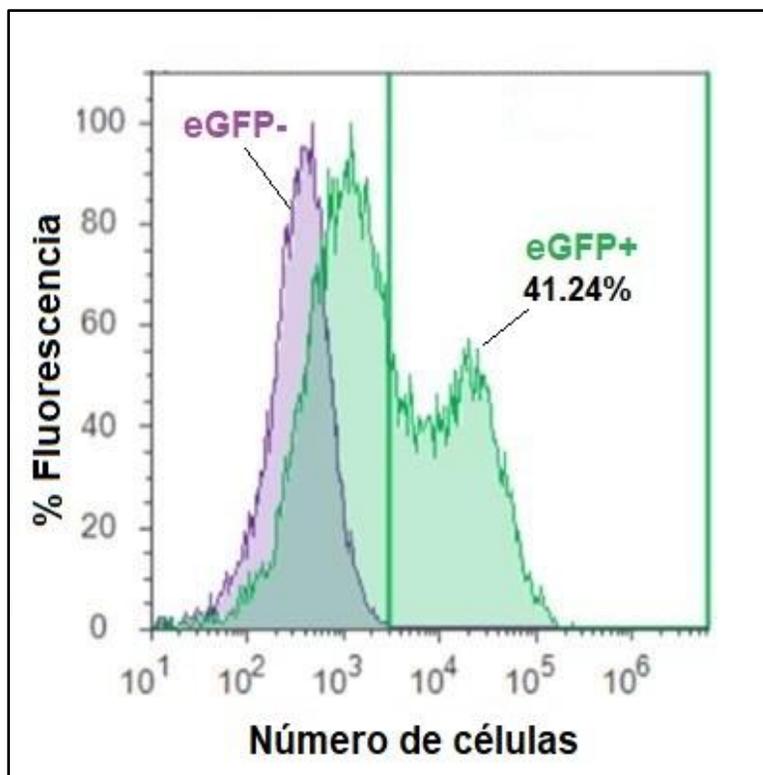


Figura 14. Determinación de la eficiencia de la transducción de células MDA-MB-231. La gráfica de fluorescencia muestra células sin transducir o eGFP- (morado) y transducidas o eGFP+ (verde). Estas últimas presentaron una eficiencia del 41.24% de todas las células.

3.4 Estabilización de las células en selección de puomicina

Este proceso permitió seleccionar células con clones estables que expresan tanto la proteína de interés, así como el gen de resistencia a puomicina. La selección tuvo una duración de un mes, durante el cual se criopreservaron viales cada semana. La primera semana posterior a la transducción se mantuvo a las células en medio sin puomicina, debido a que estas tenían un crecimiento muy lento y el objetivo era expandirlas. Una vez que tuvieron una confluencia mayor al 50% se comenzó a hacer la selección. Cabe mencionar que las células que presentaron un crecimiento más lento y una alta tasa de muerte celular fueron las transducidas con el plásmido de sBG, comportamiento contrario a las células con sobreexpresión de eGFP. Las células con el vector de expresión de mBG mostraron un comportamiento intermedio.

En la Figura 15 pueden visualizarse diferentes campos de las células que muestran su confluencia, siendo las más de eGFP las más confluentes y con menos muerte celular. Aunque las células que sobreexpresan sBG y mBG no muestran una diferencia aparente de la confluencia en las imágenes, son células con diferente ritmo de crecimiento celular y tasa de muerte celular. Todas las imágenes fueron tomadas al día 17 de selección de puromicina.

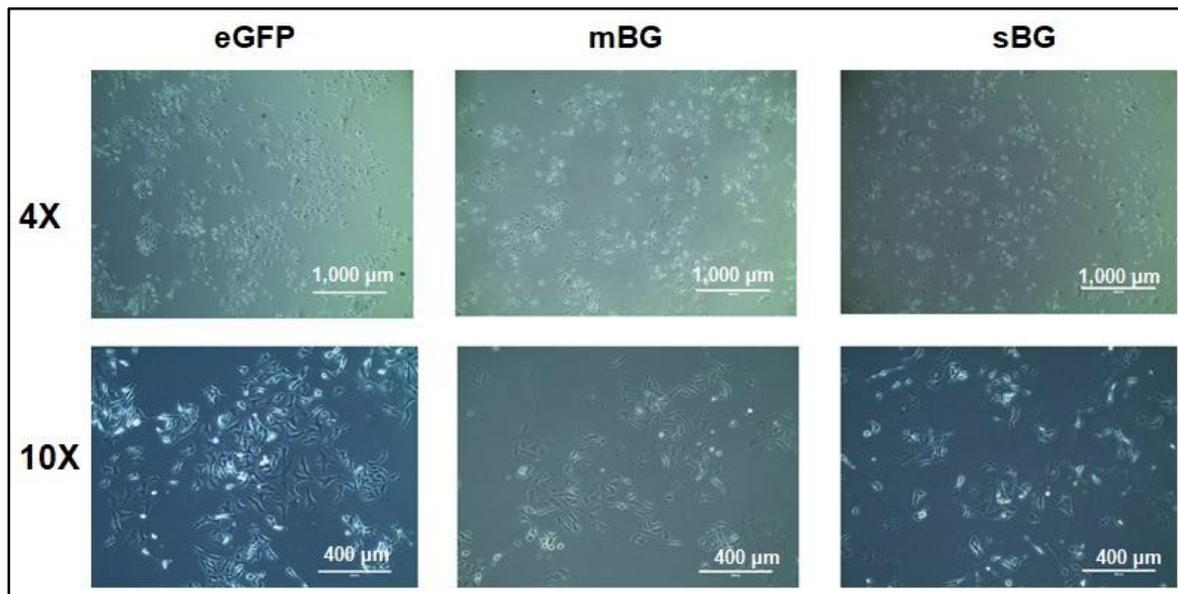


Figura 15. Células MDA-MB-231 en proceso de selección de puromicina a los 17 días de selección. Se muestran algunas imágenes representativas de las células transducidas con eGFP (izquierda), mBG (centro) y sBG (derecha) a 4x y 10x. Las células con más muerte celular y crecimiento lento durante la selección fueron las modificadas con sBG, caso contrario a las de eGFP y mBG.

3.5 Caracterización de las células transducidas

3.5.1 RT-qPCR

Para la identificación de la presencia de gen del betaglicano membranal, o bien *TGFBR3*, en las células transducidas, se llevó a cabo un RT-qPCR a partir del cDNA de las muestras. Se empleó a *HRPT1* como gen de referencia. A continuación se muestra en la Figura 16 los resultados obtenidos de las curvas de amplificación.

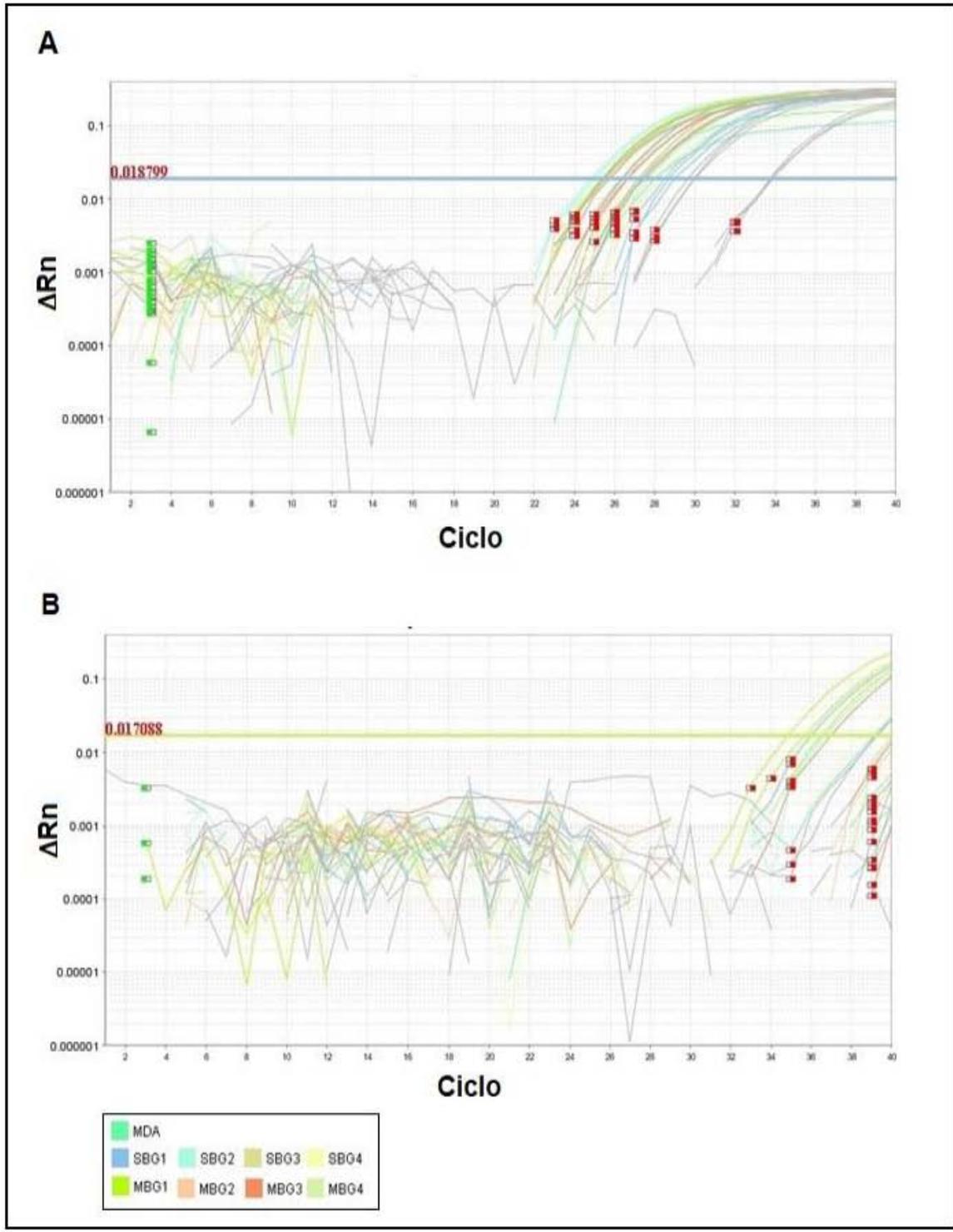


Figura 16. Curvas de amplificación del RT-qPCR. A) Amplificación del gen de referencia *HRPT1* y B) amplificación del gen de *TGFBR3* en las células no transducidas y las transducidas con mBG y sBG.

La curva de amplificación del gen de referencia (Figura 16-A) muestra que todas las células, tanto las no transducidas (MDA-MB-231) como las transducidas con mBG y sBG, tienen buena amplificación del gen control endógeno. Se puede observar que la amplificación del gen comienza alrededor del ciclo umbral (C_T) 23, de acuerdo a lo esperado.

No obstante, las curvas de amplificación de la Figura 16-B muestran poca amplificación de la secuencia del gen de betaglicano membranar, alcanzan el valor del umbral de fluorescencia en ciclos tardíos ($C_T=33-39$). Lo que nos indica que el mensajero de betaglicano/*TGFBR3* es poco abundante.

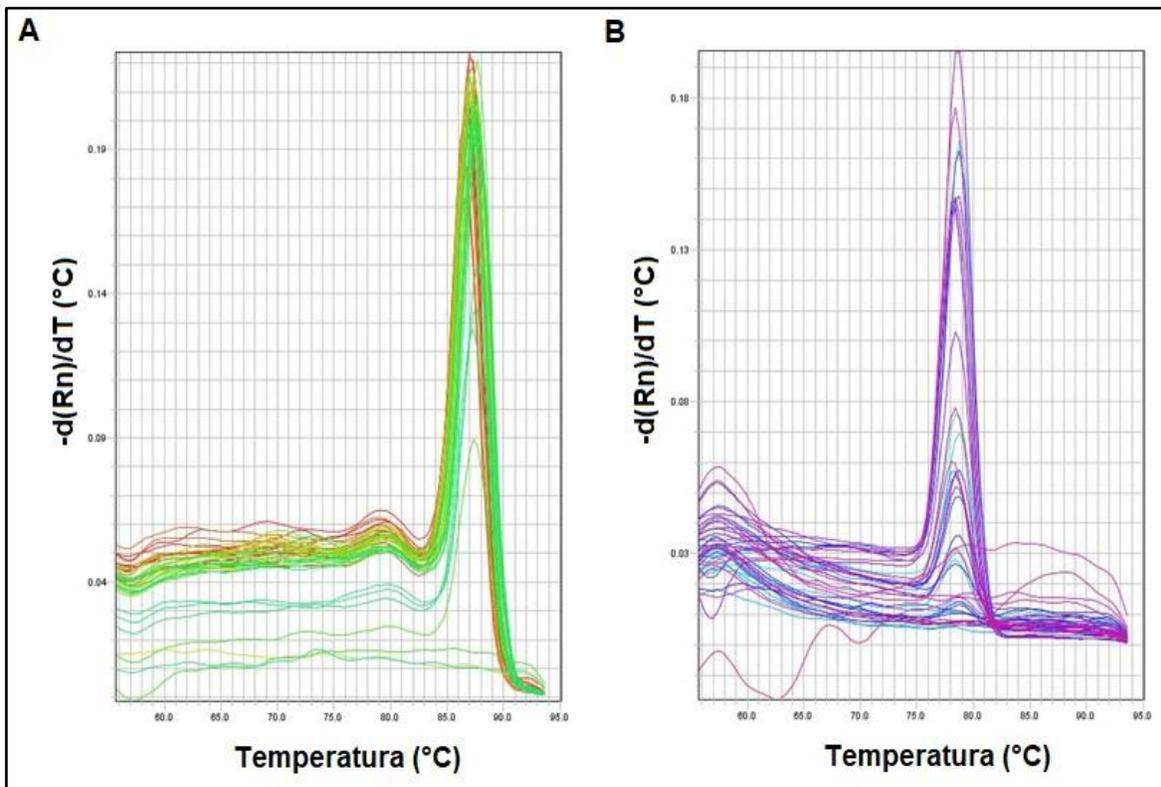


Figura 17. Curvas de desnaturalización del RT-qPCR. A) Gráfica del gen de referencia *HRPT1* y B) amplificación del gen betaglicano/*TGFBR3* en las células no transducidas y las transducidas con mBG y sBG.

Por otro lado, para confirmar la especificidad de los productos amplificados, y no de productos no específicos y dímeros de cebadores durante el PCR, se obtuvieron las gráficas de desnaturalización, véase Figura 17. Como se observa, en ambos casos de A y B se obtiene un sólo pico en una temperatura de desnaturalización específica (T_m) dada para cada par de cebadores empleados para la identificación de las secuencias de los genes de *HRPT1* y *TGFBR3*. Para el gen de referencia se obtuvo una $T_m = 87.2$ °C, mientras que para *TGFBR3* en 78.5 °C. Asimismo, pueden observarse unos picos secundarios en ambas gráficas, pero de menor altura que los mencionados anteriormente, indicando la amplificación de productos no-específicos y dímeros de cebadores.

3.5.2 Identificación de las proteínas de interés mediante Western Blot

Para analizar la producción del sBG en las células transducidas con las secuencias de mBG y sBG y determinar si la expresión se mantiene a lo largo de cuatro semanas en selección de puromicina, estudiamos la producción de proteína por Western Blot. Esta técnica permite mediante el empleo del anticuerpo 822 el reconocimiento de sBG entre un conjunto de proteínas. Las cuales fueron obtenidas de los lisados celulares y de los sobrenadantes tomados directamente del medio de cultivo, esto con la intención de observar sBG liberado por las células al exterior.

En la Figura 18 se presentan las imágenes obtenidas del Western Blot, en ellas se puede identificar al sBG en la banda de 120 kDa, tanto para las células transducidas con mBG, así como las de sBG en las cuatro semanas de selección (en la Figura 18 se indica el número de pase semanal numerado del uno al cuatro).

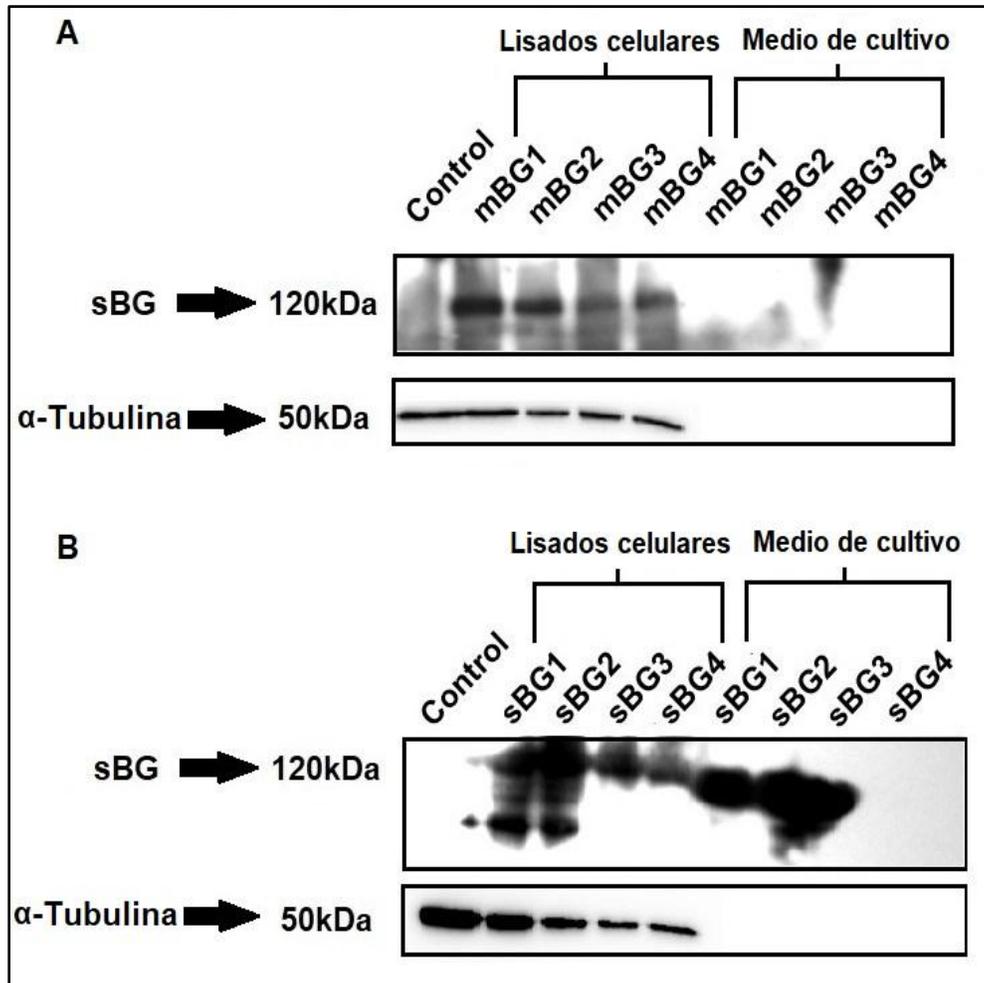


Figura 18. Identificación del dominio extracelular del betaglicano mediante Western Blot. Las muestras de proteína fueron obtenidas a partir de células MDA-MB-231 transducidas con las secuencias codificantes de mBG y sBG. Las células se mantuvieron en medio de selección de puomicina (concentración 0.25 µg/ml) por cuatro semanas, identificando cada semana del uno al cuatro en las muestras. Para este experimento se mantuvo en medio de selección a las células. A) Membrana corresponde a las células transducidas con mBG, se observa la presencia del sBG en todos los lisados, exceptuando al control y los medios. B) Membrana corresponde a las células transducidas con sBG, todas las muestras de lisados celulares y medios exhiben una señal alta de la proteína (excepto en el medio de sBG4 y el control). La α-Tubulina indica que las dos membranas presentan la misma cantidad de proteína, excepto en el control y en la primera muestra de B, en las cuáles se observa más proteína.

Se utilizó la proteína α-Tubulina como control de carga del gel, la cual es una proteína ubicada en la banda de 50 kDa y que no es excretada al medio, es por eso que no podemos detectarla en el medio celular. Sin embargo, el grosor de la banda de esta proteína indica si se cargó la misma cantidad de proteína entre las muestras.

En la Figura 18-A podemos ver la expresión del sBG en las células transducidas con mBG, puede verse que la señal en los lisados celulares es más abundante en la muestra mBG1 correspondiente al pase 6, que en el pase 12 del mBG3, indicando que la proteína disminuye con el paso del tiempo y no se produce de manera estable. En cuanto a los medios celulares no se detectó señal alguna del sBG.

En la Figura 18-B se muestra la expresión de la proteína sBG en las transducidas con la misma secuencia de sBG. Interesantemente la expresión de sBG se mantiene estable a través de los diferentes pases de las células, tanto en los lisados celulares como en los medios celulares. No obstante, se observa una señal más remarcada en los medios (con excepción de la muestra sBG4, en donde no se observa señal alguna. Nuestros resultados indican que las células transducidas con mBG y sBG son capaces de producir sBG, y que éste puede ser procesado y secretado al medio (exclusivamente en el caso de las células transducidas con la secuencia de sBG).

3.6 Ensayos celulares

3.6.1 Ensayo de Proliferación

Para caracterizar el efecto de la sobreexpresión del BG en la proliferación de las células cancerosas. Se evaluó el crecimiento y proliferación de células MDA-MB-231 (control), así como sus versiones transducidas con las proteínas mBG y sBG. Se emplearon las células en selección de puromicina de la semana tres, es decir, las muestras rotuladas como mBG3 y sBG3 correspondientes al pase 12. El número de muestra se eligió de manera arbitraria, pues en general todas las muestras expresan sBG en abundancia y no existe mucha variación entre ellas. A continuación, se muestran en la Figura 19 las gráficas obtenidas de las células tratadas con la citocina TGF- β y sin tratar (S/T). El ensayo muestra el efecto del TGF- β en la proliferación celular posterior a 24 y 48 horas.

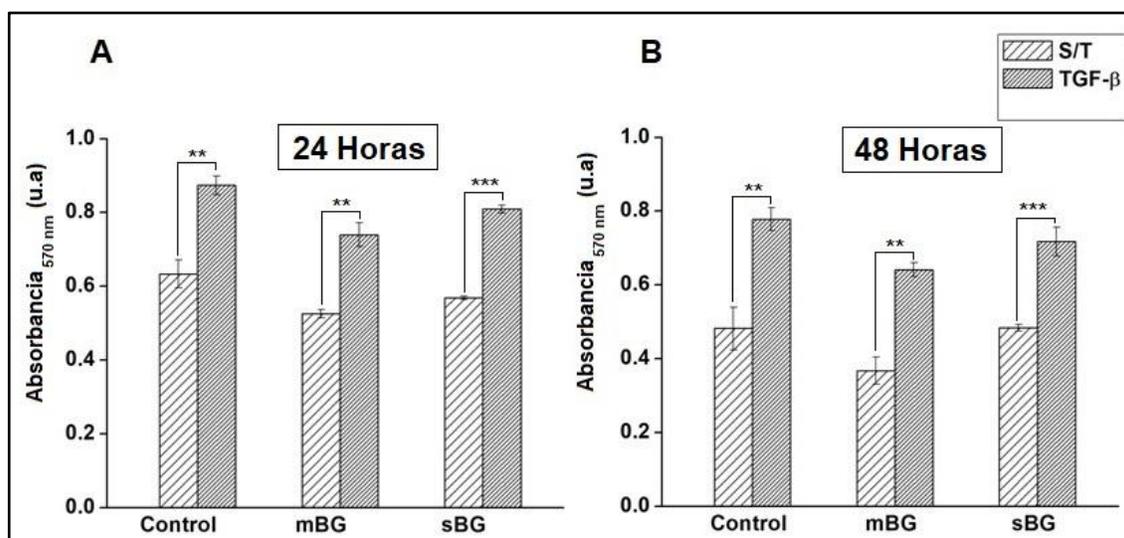


Figura 19. Ensayo de proliferación celular de las células MDA-MB-231 transducidas con mBG y sBG. Pre tratamiento las células fueron puestas en inanición por 12 horas, luego de colocárseles TGF- β (50 pg/ml) a las células con tratamiento y sólo medio suplementado a las células sin tratamiento (S/T). A) Resultados obtenidos tras 24 horas y B) 48 horas de exposición de TGF- β . Los datos de las gráficas representan la media \pm error estándar de la media, el análisis estadístico se realizó empleando t-Student de dos colas para comparación de pares pertenecientes a un mismo grupo (ej. S/T y TGF- β del grupo control). Datos significativos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Primeramente, puede verse que todas las células tratadas por 24 horas con TGF- β (Figura 19-A) presentan una mayor absorbancia del reactivo reducido del MTT (sales de formazan), en comparación con las células sin tratar (S/T). El MTT reducido es de color azul y es generado por deshidrogenasas mitocondriales de células con mitocondrias funcionales, y por lo tanto vivas. Es entonces que la viabilidad celular es medida en relación a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en solución [39].

En la Figura 19-A puede verse que el tratamiento con TGF- β de las células sin transducir (control) incrementó su proliferación, mientras que las células que sobreexpresan mBG tratadas con TGF- β presentaron una proliferación disminuida en comparación con el control. Sin embargo, el tratamiento con TGF- β no tuvo efecto en las células que sobreexpresan sBG. Resultados similares se obtuvieron en las células S/T, sugiriendo

que la disminución en la proliferación observada en las células que sobreexpresan mBG no es completamente dependiente de TGF- β .

A las 48 horas de tratamiento (Figura 19-B), las células mantuvieron la misma relación de proliferación que a las 24 horas. Pronunciándose más la disminución en la proliferación de las células cancerosas que sobreexpresan mBG comparadas con el control en ambos grupos tratadas y S/T.

3.6.2 Ensayo de migración celular

Con la intención de evaluar los efectos de la sobreexpresión del BG en la migración de las células cancerosas, se realizó un ensayo de migración o de la herida en presencia y ausencia de TGF- β . En la Figura 20 se muestra la gráfica obtenida de las células control y de la modificadas con las proteínas mBG y sBG a las 0, 24 y 48 horas.

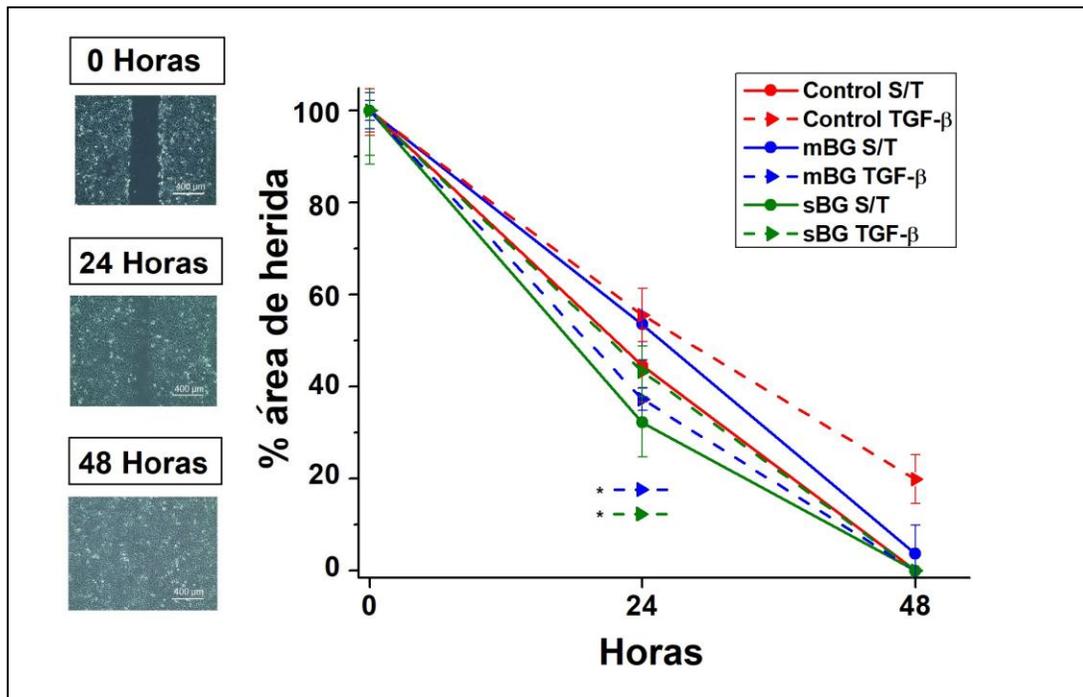


Figura 20. Ensayo de migración celular. En la gráfica se muestra el progreso del cierre de la herida realizada a las 0, 24 y 48 horas en las células con y sin tratamientos de TGF- β (S/T). El área de la herida va cerrando y disminuyendo a través del tiempo. Los datos de las gráficas representan la media \pm error estándar de la media, el análisis estadístico se realizó empleando t-Student de dos colas para comparación de pares pertenecientes a un mismo grupo (ej. S/T y TGF- β del grupo control). Datos significativos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En la gráfica de la Figura 20 se observa que a las 24 horas y comparando todas las células S/T, que las que expresan mBG tienen una capacidad de migración menor al control. Mientras que las que expresan sBG tienen una capacidad mayor de migración que el control. Este mismo efecto se mantiene a las 48 horas, pues puede verse que las células mBG continúan con un porcentaje de herida abierta y por encima de las células control y sBG. No obstante, ya no se puede distinguir el mismo comportamiento entre estas dos últimas, pues alcanzaron su confluencia total a las 48 horas (aunque muy probablemente se hubiera observado el mismo comportamiento que a las 24 horas).

Por otro lado, comparando todas las células que recibieron tratamientos con TGF- β , se observa que a las 24 horas las células control son las que mantienen una migración menor, seguido de las que expresan sBG y las mBG. El mismo efecto se mantiene a las 48 horas, pero al igual que en el caso de las células S/T algunas células alcanzan su confluencia total (en este caso las sBG y mBG), mientras que las control se mantuvieron con un ~20% de área de herida sin cerrar.

Cabe mencionar que los datos de la gráfica de la Figura 20 indican diferencias significativas de la migración entre el grupo mBG S/T y con TGF- β , así como entre el sBG S/T y con TGF- β .

4. Discusión

El cáncer de mama actualmente ocupa un lugar importante a nivel mundial y a nivel nacional, esto debido a su alta tasa de recurrencia entre las mujeres. Especialmente el CMTN es uno de los subtipos moleculares más agresivos, pues los tratamientos hormonales existentes no tienen efecto sobre las células cancerosas [8, 9].

Es por ello que como objetivo de esta tesis se llevó a cabo la modificación genética de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 para que sobreexpresaran

establemente al betaglicano. Se eligió trabajar con éstas células ya que son del subtipo molecular CMTN y carecen de receptores hormonales [9]. Por otro lado, se conoce que en el cáncer existe una desregulación de la vía de señalización del TGF- β , una citocina que mantiene un papel dual en cáncer como regulador y promotor de varios tipos de cánceres. Particularmente, en el cáncer de mama, los pacientes mantienen niveles altos de esta citocina en circulación y el estudio de agentes que bloqueen la señalización de esta citocina puede resultar en un tratamiento para el establecimiento y progresión del cáncer de mama [23-26].

El betaglicano es un receptor de membrana que actúa como un co-receptor en la vía canónica de señalización del TGF- β , el cual presenta a la citocina TGF- β a los otros receptores membranales (receptores I y II). Recientemente, se ha establecido una relación directa entre los bajos niveles de betaglicano y la alta invasividad de las MDA-MB-231. Y en pacientes con cáncer se ha reportado una pérdida de la expresión del betaglicano, sugiriendo que este receptor juega un papel relevante en la regulación y progresión del cáncer [33].

Uno de los procesos naturales del betaglicano es su proteólisis, que ocurre cuando el ectodominio de la proteína membranal es cortado enzimáticamente y libera una región soluble antagonista del TGF- β que le impide llevar a cabo su señalización [30, 31]. Esta propiedad del betaglicano puede aprovecharse como agente terapéutico para disminuir los niveles del TGF- β en las células cancerosas y ha sido utilizado con éxito en modelos de diversas enfermedades en donde el TGF- β juega un papel primordial [22, 35].

La estrategia que se siguió en el presente trabajo fue la modificación de las células cancerosas utilizando un sistema lentiviral, así como su caracterización para observar la estabilidad de la sobreexpresión de las proteínas mBG y sBG.

Primeramente se eligió la transfección con lipofectamina 2000 de las células 293T con los vectores lentivirales de las secuencias codificantes de mBG, sBG y los vectores de empaquetamiento del lentivirus, pues se trata de una herramienta que permite la expresión transiente (o de limitado tiempo) que no se integra en el genoma. Por lo tanto, esta técnica no puede emplearse como un medio para la expresión estable del material genético introducido, sea ARN o ADN, pues éste puede ser perdido por factores ambientales y al dividirse las células [40]. No obstante, la ventaja de emplearlo como un paso para la producción de partículas lentivirales, es debido a que la transfección no tiene un límite para el tamaño del inserto, pues se recordará que además de los insertos de las proteínas de BG cada vector viral contenía una secuencia con un gen de resistencia a puromicina [41].

Cabe mencionar que el tiempo de expresión en transfecciones transientes va de 24 a 72 horas. En cuanto al reactivo lipofectamina 2000, se trata de liposomas catiónicos cargados positivamente y que permiten la formación de complejos con las moléculas de ADN negativas. Posteriormente los liposomas debido a su composición lipídica, son capaces de fusionarse con las membranas celulares, lo cual le confiere una alta eficiencia de transfección [42]. Además del empleo de liposomas catiónicos, existen otros métodos químicos transientes como el uso de fosfato de calcio y polímeros catiónicos, pero presentan eficiencias bajas y son citotóxicos para algunas células, respectivamente. Asimismo, existen métodos físicos para transfección transiente como la electroporación, microinyección y biobalística, pero estos requieren equipo especial, son laboriosos, y generalmente tienen eficiencias de variables a bajas. En particular la electroporación genera una alta muerte celular debida a los campos eléctricos que se emplean, por lo que debe tenerse especial cuidado en la intensidad de estos [40, 43].

En referencia al paso más importante del presente trabajo para la generación de células estables, se eligió una transfección empleando un sistema lentiviral de tercera generación con la ayuda del reactivo polibreno. Particularmente al empleo de sistemas virales para el establecimiento de material genético se le conoce como transducción, la cual ocurre con una alta eficiencia de incorporación del gen de interés en el genoma del huésped que se conserva posterior a la división celular [40].

Las altas eficiencias de transducción se deben al polibreno, el cual es un polímero catiónico que incrementa la difusión de las partículas lentivirales en la células blanco al contrarrestar los efectos repulsivos entre las membranas lipídicas de las células y las del virus, al igual que la lipofectamina. Experimentalmente se ha demostrado que en ausencia del polibreno el proceso de difusión ocurre de manera lenta y muchas de las partículas lentivirales terminan inactivas antes de alcanzar su blanco celular. No obstante, el mecanismo preciso por el cual ocurre este mejoramiento de la difusión, específicamente con el polibreno, permanece desconocido [44].

Por otro lado, en comparación con otros métodos virales como el uso de vectores virales asociados a adenovirus, el uso de sistemas de tercera generación lentivirales permiten disminuir el riesgo de que la integración aleatoria del material genético en el genoma ocasione fenotipos secundarios adversos como la oncogénesis. Otras ventajas incluyen el tamaño del inserto, mientras que en los vectores virales asociados a adenovirus se permiten insertos de hasta 4.5 kb, los vectores lentivirales permiten insertos de hasta 10 kb [40, 41].

Posterior a la transducción de las células MDA-MB-231 con los plásmidos de BG, la selección con puromicina fue realizada una semana después debido a la alta muerte celular que se tenía. No obstante, lo ideal es permitir que las células se recuperen de la transducción por 24 a 72 horas antes de su selección. Este tiempo es necesario para que

estas puedan expresar la enzima de resistencia, que en este caso se trata de puromicina acetiltransferasa de *Streptomyces alboniger* codificada del gen *puro* (de 0.6 kb). La acción de la puromicina, al tratarse de un antibiótico aminoglicosidado, es inhibir la síntesis proteica al unirse a alguna proteína ribosomal. De manera específica la puromicina se une al sitio "A" de la subunidad grande del ribosoma, substituyendo al aminoacil-ARNt e impidiendo la elongación de la cadena y su terminación [45, 46].

En cuanto a los datos obtenidos de la eficiencia de la eGFP vía citómetro de flujo, otros trabajos reportan eficiencias más altas de ~80% en células MDA-MB-231 empleando un sistema lentiviral. Se atribuye esta diferencia a las diversas variables que hubieran podido ocurrir en el proceso de transducción como lo son las mismas contribuciones debido al tipo celular, pero también otras de tipo técnico. Por otro lado, a pesar del uso de la eGFP como reportero de la expresión, se ha demostrado que esta proteína genera cambios en el plegamiento de proteínas, la organización del citoesqueleto y en la respuesta inmune [47-49].

Respecto a la expresión de los mensajeros de BG medidos mediante qRT-PCR, no se obtuvo una expresión de estos, pero sí se logró confirmar la calidad y amplificación del mensajero de la proteína codificada por el gen *HRPT1*. Por lo tanto, estos datos indican que el mensajero de BG no es tan abundante en las células, contrario a lo observado para el gen *HRPT1*. Este último codifica para la proteína hipoxantina fosforribosiltransferasa 1, que tiene como papel la generación de nucleótidos de purinas. Debido a que las células constantemente requieren material genético para replicarse, es normal observar una producción abundante de su mensajero [50].

A pesar de los resultados obtenidos del RT-qPCR, pudimos detectar la producción de la proteína sBG por Western Blot en las células modificadas con las secuencias mBG y sBG. La manera más eficiente de obtener sBG, tanto en lisados como en el medio, resultó en

aquellas células transducidas para expresar sBG directamente. Con excepción de la muestra sBG4, en donde no se pudo detectar señal de la proteína en su medio, pero sí en el lisado. Se atribuye lo anterior a errores técnicos en el manejo de la muestra.

En tanto a las células transducidas con mBG, estas fueron capaces de generar la sBG en los lisados celulares, pero no de liberarlo en el medio. El hecho de no detectar el mensajero de BG, pero sí la proteína soluble, indica que no es abundante y que muy poco se requiere para su sobreproducción. Esto tiene implicaciones positivas, ya que a pesar de que la eficiencia de la eGFP no es tan alta, y por lo tanto indicándonos que muy probablemente las eficiencias de las transducciones con BG's tampoco lo fueron, aún así se obtiene una buena expresión de la proteína sBG.

La presencia de sBG en las muestras modificadas con la misma secuencia señala un incremento en el proceso de proteólisis del mBG, misma que se mantiene a lo largo de las semanas evaluadas. Hasta ahora se ha identificado vía experimentos *in silico* algunas regiones mutantes en las secuencias codificantes de la sBG, que esencialmente hacen al ectodominio más propenso a cortes proteolíticos por enzimas. Resultados preliminares indican dos posibles sitios de consenso para las enzimas metaloproteinasa de matriz 9 y elastasa, sin embargo, todavía no se explora si estas enzimas están involucradas o no en el corte proteolítico del BG [51].

El estudio de la sobreexpresión de sBG se llevó a cabo evaluando la estabilidad por un mes, que sería el tiempo requerido para realizar un estudio *in vivo* utilizando un modelo murino de metástasis de cáncer de mama a hueso. Las células modificadas con las secuencias de BG podrían emplearse para inocular ratones. Esto debido a que las células MDA-MB-231, inyectadas vía intracardiaca, por si solas son capaces de formar lesiones óseas osteolíticas en los huesos largos, columna vertebral y mandíbula en cuestión de dos a tres semanas [52].

Un ensayo *in vivo* nos permitiría evaluar la capacidad que tienen las células modificadas genéticamente con las secuencias de BG de invadir tejidos, si existe una disminución de esta o no. Algunos análisis que se podrían sugerir para observar la evolución de la metástasis son una microtomografía computarizada de alta resolución para la evaluación de la destrucción ósea. Podrían embeberse los huesos con parafina para disección y teñirse con hematoxilina/eosina (H&E) para obtener el área tumoral en los huesos. Además se podría analizar el suero para observar la presencia de factores de crecimiento de interés, como el TGF- β y los efectos del sBG sobre éste [52].

El tratamiento con TGF- β en los ensayos de proliferación de las células transducidas no afectó su comportamiento, pues los resultados muestran una ligera disminución como se reporta en algunos estudios, por lo que creemos que esta función no es completamente regulada por TGF- β . Posiblemente otras vías de señalización estén involucradas, pues además del TGF- β , el BG es capaz de unir a la inhibina A, al factor de crecimiento fibroblástico básico (o bFGF, por sus siglas en inglés, *basic fibroblast growth factor*), así como la señalización de la proteína morfogénica ósea 2 (o BMP-2, por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic protein 2*) [51, 53, 54].

En cuanto a la migración de las células cancerosas que sobreexpresan mBG o sBG, en ambos casos se observó que la expresión de BG's en presencia de TGF- β incrementa la migración de las células comparada con el controles, contrario a lo que se reporta en la literatura. Pues estudios de migración de células MDA-MB-231 estables sobreexpresando mBG o sBG, indican que el TGF- β estimula la migración de las células sin transducir. Mientras que las que sobreexpresan mBG no son responsivas al TGF- β y tienen más capacidad de motilidad que aquellas que sobreexpresan sBG [51].

5. Conclusiones

Se generó una línea celular estable usando un sistema lentivirus para sobreexpresar las proteínas mBG y sBG en células MDA-MB-231. Nuestros datos señalan que las células transducidas con la secuencia de sBG sobreproducen la proteína sBG de forma estable durante cuatro semanas. Contrario a lo observado en células transducidas con la secuencia mBG, las cuales no fueron capaces de producir sBG de manera estable.

Se demostró que la proliferación de células cancerosas se reduce en las células cancerosas que sobreexpresan mBG en comparación con las sBG, manteniendo esta inhibición en presencia de TGF- β . La migración de células cancerosas también se vio afectada en las células transducidas con las secuencias de BG, incrementándose en presencia de TGF- β , contrario a lo que se esperaba para estas células.

En estudios futuros se pretende realizar ensayos *in vitro* que demuestren si las células transducidas con BG regulan genes responsivos de TGF- β , pues en el presente trabajo sólo se evaluó el mensajero del gen de BG. Así como inocular las células transducidas de BG en un modelo de metástasis ósea de cáncer de mama. Esto con la intención de observar el efecto que tienen estas células en la progresión de la metástasis *in vivo*. Asimismo se propone generar células estables para probar el posible efecto de las cadenas de GAG's del BG en la proliferación, migración y metástasis *in vivo*.

6. Bibliografía

- [1] Lodish, H., *et al.*, (2007). *Molecular cell biology*. (6th ed). New York. Freeman y Company. (pp. 668-670).
- [2] World Health Organization [WHO]. (2012). *Topics cancer*. Recuperado el 14 de abril de 2018 de <http://www.who.int>
- [3] American Cancer Society [ACS]. (2018). *What Is Breast Cancer?* Recuperado el 14 de abril de 2018 de <https://www.cancer.org>
- [4] World Health Organization [WHO]. (2012). Cancer fact sheets. Recuperado el 19 de septiembre de 2018 de <http://gco.iarc.fr>
- [5] American Cancer Society [ACS]. (2018). About breast cancer in men? Recuperado el 18 de noviembre de 2018 de <https://www.cancer.org>
- [6] Singletary, S. (2003). Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals Of Surgery*, 237(4), 474-482.
- [7] Malhotra, G., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955-960.
- [8] BreastCancer.org. (2018). Molecular Subtypes of Breast Cancer. Recuperado el 14 de abril de 2018 de <http://www.breastcancer.org>
- [9] Chavez, K., Garimella, S., & Lipkowitz, S. (2011). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1-2), 35-48.
- [10] Lara-Medina *et al.* (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. *Cancer*, 117(16), 3658-3669.
- [11] Bonilla-Sepúlveda OA, Matute-Turízo G, Severiche C. (2015). Clasificación en subtipos intrínsecos de los carcinomas de mama analizados en un centro de patología de Medellín en el año 2011. *Rev CES Med*. 289(1), 35-46.

- [12] Nahleh, Z., Botrus, G., Dwivedi, A., Badri, N., Otoukesh, S., & Diab, N. *et al.* (2018). Clinico-pathologic disparities of breast cancer in Hispanic/Latina women. *Breast Disease*, 1-8.
- [13] Cancer.Net (2018). Efectos secundarios de la quimioterapia. Recuperado el 25 de noviembre de 2018 de <https://www.cancer.net>
- [14] National Cancer Institute at the National Institutes of Health [NIH]. (2018). El cáncer. Recuperado el 25 de noviembre de 2018 de <https://www.cancer.gov>
- [15] National Cancer Institute at the National Institutes of Health [NIH]. (2018). Drugs Approved for Breast Cancer. Recuperado el 14 de abril de 2018 de <https://www.cancer.gov>
- [16] Anders, C. and Carey, L.A. (2008). Understanding and Treating Triple-Negative Breast Cancer. *Oncology* (Williston Park). 22(11): 1233–1243.
- [17] Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J., & Quintanilla, M. (2009). The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease*, 1792(10), 954-973.
- [18] Bilandzic, M., & Stenvers, K. (2011). Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 339(1-2), 180-189.
- [19] Massagué, J., Attisano, L., & Wrana, J. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends In Cell Biology*, 4(5), 172-178.
- [20] López-Casillas, F., Massagué, J. (2003). TGF- β : receptores, señales y acciones. *Gac Méd Méx*, 139(2) : 139-143.
- [21] Harvey, A. (2013). Cancer cell signalling. John Wiley & Sons. (pp. 45-48).
- [22] Dong, M., How, T., Kirkbride, K., Gordon, K., Lee, J., & Hempel, N. *et al.* (2007). The type III TGF- β receptor suppresses breast cancer progression. *Journal Of Clinical Investigation*, 117(1), 206-217.

- [23] Juárez, P., & A. Guise, T. (2010). TGF- β ; Pathway as a Therapeutic Target in Bone Metastases. *Current Pharmaceutical Design*, 16(11), 1301-1312.
- [24] Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215-230.
- [25] Hempel, N., How, T., Cooper, S., Green, T., Dong, M., Copland, J., Wood, C. and Blobel, G. (2008). Expression of the type III TGF- β receptor is negatively regulated by TGF- β . *Carcinogenesis*, 29(5), pp.905-912.
- [26] Stover, D., Bierie, B. and Moses, H. (2007). A delicate balance: TGF- β and the tumor microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), pp.851-861.
- [27] Vilchis-Landeros M., Juárez, P., López-Casillas F. (2003). El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales. *Gac Méd Méx*; 139(2) : 126-134.
- [28] Villarreal, M., Kim, S., Barron, L., Kodali, R., Baardsnes, J., & Hinck, C. *et al.* (2016). Binding Properties of the Transforming Growth Factor- β Coreceptor Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling. (2016). *Biochemistry*, 55(49), 6880-6896.
- [29] Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villarreal, M., & Hinck, A. *et al.* (2009). Betaglycan has Two Independent Domains Required for High Affinity TGF- β Binding: Proteolytic Cleavage Separates the Domains and Inactivates the Neutralizing Activity of the Soluble Receptor. *Biochemistry*, 48(49), 11755-11765.
- [30] Velasco-Loyden, G., Arribas, J., & López-Casillas, F. (2003). The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(9), 7721-7733.
- [31] Attisano, L., Wrana, J., López-Casillas, F., & Massagué, J. (1994). TGF- β receptors and actions. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1222(1), 71-80.

- [32] Elliott, R., & Blobe, G. (2005). Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 23(9), 2078-2093.
- [33] Xie, W., et al. (2002). Alterations of Smad Signaling in Human Breast Carcinoma Are Associated with Poor Outcome. *American Association For Cancer Research*, 62(2), 497-505.
- [34] Zhang, S., Sun, W., Wu, J., Gu, Y., & Wei, W. (2016). Decreased expression of the type III TGF- β receptor enhances metastasis and invasion in hepatocellular carcinoma progression. *Oncology Reports*, 35(4), 2373-2381.
- [35] Gordon, K., Dong, M., Chislock, E., Fields, T., & Blobe, G. (2007). Loss of type III transforming growth factor β receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis*, 29(2), 252-262.
- [36] Addgene. (2018). Lentiviral Plasmids. Recuperado el 11 de diciembre 2018 de <https://www.addgene.org>
- [37] ThermoFisher Scientific. (2018). Validation of Gene Transfection/Transduction. Recuperado el 11 de diciembre de 2018 de <https://www.thermofisher.com>
- [38] Khan, K.H. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 257–263.
- [39] Khattak, S., Spataro, M., Roberts, L., & Roberts, S. (2006). Application of Colorimetric Assays to Assess Viability, Growth and Metabolism of Hydrogel-Encapsulated Cells. *Biotechnology Letters*, 28(17), 1361-1370.
- [40] Kim, T., & Eberwine, J. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178.
- [41] VECTALYS by Flash Therapeutics. (2018). Lentiviral vectors essentials. Recuperado el 15 de diciembre de 2018 de <https://www.vectalys.com>

- [42] Recillas-Targa, F. (2006). Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337-354.
- [43] Shi, B., Xue, M., Wang, Y., *et al.* (2018). An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 10(2), 95–104
- [44] Davis, H., Morgan, J., & Yarmush, M. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical Chemistry*, 97(2-3), 159-172.
- [45] ThermoFisher Scientific. (2018). Stable transfection. Recuperado el 20 de diciembre de 2018 de <https://www.thermofisher.com>
- [46] Izquierdo Rojo, M. (2014). Curso de Genética Molecular e Ingeniería Genética. *Madrid: Pirámide*. (p. 212).
- [47] Lin, S., Lv, Y., Mao, G., Chen, X., & Peng, F. (2018). The effect of centromere protein U silencing by lentiviral mediated RNA interference on the proliferation and apoptosis of breast cancer. *Oncology Letters*.
- [48] Hines, W., Yaswen, P., & Bissell, M. (2015). Modelling breast cancer requires identification and correction of a critical cell lineage-dependent transduction bias. *Nature Communications*, 6(1).
- [49] Coumans, J., Gau, D., Poljak, A., Wasinger, V., Roy, P., & Moens, P. (2014). Green fluorescent protein expression triggers proteome changes in breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 320(1), 33-45.
- [50] GeneCards® (human gene database). (2018). *HPRT1* Gene. Recuperado el 3 de enero de 2019 de <https://www.genecards.org>.
- [51] Elderbroom, J., Huang, J., Gatzka, C., Chen, J., How, T., & Starr, M. *et al.* (2014). Ectodomain shedding of TβRIII is required for TβRIII-mediated suppression of TGF-β

signaling and breast cancer migration and invasion. *Molecular Biology Of The Cell*, 25(16), 2320-2332.

[52] Wright, L., Ottewell, P., Rucci, N., Peyruchaud, O., Pagnotti, G., & Chiechi, A. et al. (2016). Murine models of breast cancer bone metastasis. *Bonekey Reports*, 5.

[53] Blair, C., Stone, J., & Wells, R. (2011). The type III TGF- β receptor betaglycan transmembrane–cytoplasmic domain fragment is stable after ectodomain cleavage and is a substrate of the intramembrane protease γ -secretase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(2), 332-339.

[54] Esparza-López, J., Montiel, J., Vilchis-Landeros, M., Okadome, T., Miyazono, K., & López-Casillas, F. (2001). Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor- β Superfamily. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(18), 14588-14596.