



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EL SIGNIFICADO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE
CD70 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA
MDA-MB-231 EN UN MEDIO HIPERGLUCÉMICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA
P R E S E N T A:
NADIA FERNANDA BOCARDO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2023





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.

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología del Desarrollo**, de la **Unidad de Morfología y Función**, de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** de la **UNAM**, con la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

Investigación realizada gracias al Programa **UNAM-PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica)**, proyecto **IN223121** “Regulación de la activación de NFκB por diabetes mellitus e hiperglucemia y su contribución a la progresión del cáncer de mama”.

Agradezco a la **DGAPA UNAM** la beca recibida durante el desarrollo de éste proyecto.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi madre, que siempre me dió su cálido amor y motivación para que no me diera por vencida a pesar de las adversidades.

A mi padre, por el sustento que siempre nos brindó para que no nos faltara nada y el cual me permitió alcanzar mis metas académicas a lo largo de los años.

A mis hermanos, que incluso sin tener la obligación han sido como mis padres y me han brindado todo; a **Osi**, que siempre me ha hecho sentir apoyada, y ha sido de mis mejores ejemplos a seguir desde que era niña, a **Edson** que me ha enseñado que debo ser autosuficiente e independiente, a **César** que me demostró que a pesar de los problemas siempre encontraremos una solución.

A mi tutor, **Dr. Luis Arturo Baiza**, gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y por transmitirme esa pasión por la ciencia. Le estoy muy agradecida porque a pesar de las dificultades (COVID-19) estuvo para ayudarme y enseñarme muchas cosas. De verdad muchas gracias.

A la **Dra. Lupita**, por enseñarme técnicas del laboratorio, por corregirme y por tenerme mucha paciencia. A la **Dra. Rubí**, por sus observaciones y aclaraciones cuando lo necesitaba, al **Mtro. Uriel** por estar siempre atento a mi proceso, y darme las mejores clases de Biología del Desarrollo, al **Dr. Alexander** que me inspiró para trabajar en un futuro inmunología, muchas gracias al comité asesor por aceptar ser mis sinodales.

A mis amigos del 52; **Ana, Iván, Anthony, José**, me hicieron muy agradable mis momentos en la facultad desde primer semestre, gracias.

A **Oswaldo**, por todo el apoyo que me has dado; por las crisis que me ayudaste a calmar, por los temas que me llegaste a explicar y por tu compañía que siempre me dio calma muchas gracias por todo.

*“Hay tres frases que nos impiden avanzar:
tengo que hacerlo bien, me tienes que tratar bien
y el mundo debe ser fácil.”*

-Albert Ellis

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Cáncer de mama triple negativo (TNBC).....	10
1.2. Impacto del cáncer de mama en México y el mundo.....	11
1.3. Diabetes en México y su relación con el cáncer.....	11
1.4. Miembro 7 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF7) o CD70.....	12
2. ANTECEDENTES	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVOS	17
6.1. Objetivo general.....	17
6.2. Objetivos particulares.....	17
7. METODOLOGÍA	17
7.1. Estudio bibliográfico y análisis bioinformático.....	17
7.2. Efecto de la alta concentración de glucosa sobre la concentración de CD70 en células MDA-MB-231.....	19
7.3. Evaluación de proteínas por “Western blot”.....	19
8. RESULTADOS	20
8.1. Interacciones con CD70.....	20
8.2. Genes interactuantes con CD70 y su papel en el cáncer.....	21
8.3. Importancia de CD70 en cáncer de mama en mujeres.....	25
8.3.1. Expresión de CD70 y genes interactuantes en cáncer de mama de pacientes diabéticas.....	25
8.3.2. Correlación entre la expresión de CD70 y genes que codifican para proteínas interactuantes.....	25
8.3.3. Análisis de supervivencia de pacientes con baja y alta expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a CD70.....	28
8.4. Determinación de CD70 por “Western blot” en células MDA-MB-231.....	32
9. DISCUSIÓN	33
9.1 Participación de CD70 en la promoción del cáncer de mama.....	34
9.2 Valor pronóstico de CD70 y genes asociados.....	37
10. CONCLUSIONES	40
11. REFERENCIAS	41

ABREVIATURAS

AARS2: Alanil - tRNA sintetasa 2, mitocondrial

AKT: Proteína cinasa B / AKT Serina/Treonina Cinasa 1

ATCC: Colección Americana de Cultivos, del inglés American Type Culture Collection

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutada / ATM Serina/Treonina Cinasa

BC: Cáncer de mama, del inglés Breast Cancer

BRCA1: Reparación de ADN BRCA1 asociada / Proteína 1 de susceptibilidad al cáncer de mama y de ovario

BSA: Albúmina de suero bovino

B7-H3: Molécula CD276, de la familia de las inmunoglobulinas

CAR-T: Receptor quimérico de antígenos de células T, del inglés chimeric antigen receptor T-cell

CCLE: Enciclopedia de líneas de células cancerosas, del inglés Cancer Cell Line Encyclopedia

CD27: Molécula CD27 / Miembro 7 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 7

CD70 (TNFSF7): Miembro 7 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral

CD8: Glicoproteína de superficie de células T CD8

CHK2: Cinasa de punto de control 2, del inglés Checkpoint Kinase 2

CHPT1: colina fosfotransferasa 1

CIP1 (CDKN1A): Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A, del inglés Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

c-Jun: Protooncogén Jun, subunidad del factor de transcripción AP-1, del inglés Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit

CSE1L: Proteína similar a la segregación cromosómica 1, del inglés Chromosome segregation 1-like protein

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco, del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DM: Diabetes Mellitus

EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés Epidermal Growth Factor

ER: Receptor a estrógenos

ERK-MEK: Cascada de señalización ERK

EXTL3: Glicosiltransferasa 3 similar a exostosina, traducido del inglés Exostosin-like glycosyltransferase 3

FBS: Suero fetal bovino, traducido del inglés Fetal Bovine Serum

GA: Glucosa alta

GN: Glucosa normal

GBM: Glioblastoma

GEO: Gene Expression Omnibus

GGCX: Gamma-glutamyl carboxilasa

HER2 (ERBB2): Receptor Erb-B2 Tirosina Cinasa 2

HNSCC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello del inglés Head and neck squamous cell carcinoma

IL4: Interleucina 4

kDa: Kilodalton

KIR2DL4: Receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios Ig y cola citoplasmática larga 4

LGG: Glioma de bajo grado del inglés Low-grade glioma

MDA-MB-231: Línea de células de cáncer de mama triple negativas

MAPK14: Proteína cinasa 14 activada por mitógenos, traducido del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase 14

MAP2K3: Proteína cinasa cinasa 3 activada por mitógenos, traducido del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3

NBS1 (NBN): Nibrina (gen)/ del inglés Nijmegen Breakage Syndrome 1 (Nibrin)

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

NK: Células asesinas naturales (Natural killer)

NFKB: Factor nuclear Kappa B, traducido del inglés Nuclear Factor Kappa B	r : Coeficiente de correlación de Pearson	SLC39A7 (ZIP7): Familia de transportadores de solutos 39 miembro 7 (Solute Carrier Family 39 Member 7)
NPC: Complejos de poros nucleares, traducido del inglés Nuclear pore complexes	RAD17: Componente de cargador de abrazadera de punto de control, traducido del inglés RAD17 Checkpoint Clamp Loader Component	TBS: Solución salina tamponada con Tris (TRIS-buffered saline)
PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos (Phosphate Buffered Saline)	RAD9: Abrazadera de punto de control RAD9 Componente A	TCGA: Atlas del Genoma del Cáncer (Cancer genome atlas)
PPARA: Proliferador de peroxisomas activado receptor alfa, traducido del inglés Peroxisome proliferator activated receptor alpha	RAN (GTPasa): Miembro de la familia de oncogenes RAS	TNBC: Cáncer de mama triple negativo
PR: Receptor a progesterona	RIPA: Ensayo de radioinmunoprecipitación traducido del inglés Radio-Immunoprecipitation Assay	TNFα: Factor de necrosis tumoral α
PVDF: Difluoruro de polivinilideno	SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, del inglés Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	TRAF: Factor asociado al receptor de TNF
p53: Proteína tumoral P53		XPOT: Exportina para tRNA (Exportin for tRNA)
		XPO7: Exportina 7
		μg: Microgramos

RESUMEN

La diabetes mellitus involucra un aumento de los niveles de glucosa en sangre asociada con un aumento del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y citocinas inflamatorias, lo que influye directa e indirectamente en la proliferación, migración e invasión de células cancerosas. Con el empleo de un arreglo de expresión encontramos que el gen de CD70 se sobreexpresa en células de cáncer de mama MDA-MB-231 cuando se cultivan con una concentración alta de glucosa. CD70 o el miembro 7 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF7) está involucrado en la respuesta inmune y novedosamente en el desarrollo y progresión del cáncer. Al interactuar CD70 con su receptor (CD27) activa las vías del factor nuclear kappa B (NFkB) y c-Jun, lo que lleva a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. CD70 se expresa en células B y T activadas, y se encuentra sobreexpresado en células tumorales de varios cánceres sólidos de manera aberrante. El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios en la expresión del gen de CD70 (TNSF7) y de genes que codifican para proteínas que interactúan con CD70 en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 e inferir cómo está implicado en la supervivencia y actividad migratoria de las células tumorales en cáncer de mama en condiciones hiperglucémicas (glucosa 30 mmol/L). Mediante las bases de datos “Pathway Commons”, “Biogrid” y “STRING” se determinaron las interacciones entre CD70 y otros genes codificantes, seleccionando aquellos cuya expresión fue modificada por la acción de alta glucosa en células MDA-MB-231. Con base a los datos de expresión GSE136277 depositados en Gene Expression Omnibus de NCBI (GEO) inferimos las posibles vías implicadas en la acción de este gen, analizando la información de bases de datos y publicada en artículos científicos. Adicionalmente, se evaluó la expresión de CD70 en células MDA-MB-231 en un medio hiperglucémico mediante “Western blot” y por último, analizamos la coexpresión de CD70 con otros genes y cómo influían en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama empleando “R2 genomics analysis and visualisation platform” y la plataforma “KM-Plot”, respectivamente. El mRNA de CD70 se expresó 3 veces más en las células MDA-MB-231 en condiciones de hiperglucemia; sin embargo,

no se encontraron cambios en la concentración de la proteína respectiva. Al evaluar la expresión de genes codificantes que interactúan con CD70 en células MDA-MB231 expuestas a alta glucosa, se encontraron 5 genes que se regularon a la alta (EXTL3, XPOT, ATM, SLC39A7 y KIR2DL4) y 8 que se regularon a la baja (XPO7, PPARA, IL4, MAP2K3, CHPT1, GGCX, CSE1L y AARS2). CD70 interactúa con genes que probablemente en conjunto promueven la acción protumoral en condiciones de hiperglucemia mediante las vías de ERK-MEK, PI3K/Akt, NFkB y reparación del daño al DNA mediado por la cinasa ATM, así como vías de transporte de zinc (SLC39A7/ZIP7) y de aminoacil-tRNA (XPOT) al citoplasma. Con esta evidencia podemos decir que CD70 promueve el cáncer de mama mediante múltiples vías de señalización involucradas en la proliferación y supervivencia celular, llevando a cabo una acción directa en las células tumorales en un mecanismo independiente de su interacción con su receptor cuando este no se encuentra y su acción posiblemente dependa de su oligomerización y asociación a la membrana celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

El cáncer es una enfermedad crónica degenerativa de origen multifactorial que se caracteriza por la división anormal de las células de ciertos tejidos, que adquieren la capacidad de diseminarse hacia otros órganos (metástasis), esto puede llegar a terminar con la vida del paciente dependiendo de su agresividad y la respuesta al tratamiento. En cuanto al cáncer de mama, este se asocia con la proliferación celular anormal que puede comenzar en los distintos tejidos de la glándula mamaria. Las mamas constan de tres partes principales: lobulillos, conductos y tejido conectivo (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2022).

Los carcinomas de seno, por lo general son adenocarcinomas; que comienzan en las células epiteliales de los conductos (de leche) o los lobulillos (glándulas productoras de leche). El tipo de cáncer de mama puede referirse a si el cáncer se ha propagado o no, es decir, si es metastásico, si es inflamatorio, o de acuerdo con sus receptores hormonales (clasificación molecular) (American Cancer Society, 2019).

En las pacientes con cáncer de mama se evalúa de forma rutinaria la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y la amplificación del receptor al factor de crecimiento epidérmico HER-2. Los tumores que no expresan ER, PR y no tienen amplificación de HER-2 se les conoce como cáncer de mama triple negativo (TNBC), debido a la falta de estos tres marcadores moleculares y se dice que son de tipo basal. En general, los cánceres de mama que expresan receptores hormonales tienen un pronóstico más favorable que aquellos con amplificación de HER-2 o los que son triple negativo. Los TNBC representan aproximadamente el 10-15% de todos los cánceres de mama y confieren a los pacientes un peor pronóstico en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama (Chávez et al., 2010).

1.2. Impacto del cáncer de mama en México y el mundo

El cáncer es un problema importante de salud pública y es considerado de las principales causas de muerte en el mundo. Cerca del 70% de las defunciones asociadas al cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México, en el año 2019 se registraron 747 784 defunciones, de las cuales 12% (88 683) correspondieron a tumores malignos y en el periodo de enero-agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% (60 421) se debieron a tumores malignos (INEGI, 2021).

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente y de mayor mortalidad en mujeres; en 2020 el número de casos aumentó un 11.7% siendo 2 261 419 nuevos casos de cáncer de mama, y el número de muertes por este tipo de cáncer fue de 684 996 (GLOBOCAN, 2020). En México, en el año 2015 se registraron 6 273 muertes por cáncer de mama en mujeres, lo que representó el 14.3% del total de muertes en ellas (Bargalló et al., 2019).

De acuerdo con el INEGI, el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos entre la población mayor de 20 años, con 24 de cada 100 egresos hospitalarios para este grupo de edad; en las mujeres, estos tumores malignos representan 37 de cada 100 egresos y en los hombres, 1 de cada 100 egresos (INEGI, 2021).

1.3. Diabetes en México y su relación con el cáncer

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que provoca un aumento de los niveles de glucosa en sangre caracterizada por una glucemia en ayunas mayor a 126 mg/dl, y una tolerancia oral a la glucosa mayor a 200 mg/dl después de una carga ingerida de glucosa (Eketunde, 2020). En México, durante 2018 de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del INEGI, había 82 767 605 personas en un rango de edad mayor a 20 años, de las cuales 10.32% (8 542 718) contaban con un diagnóstico médico previo de DM. En el 2020, 151 019 personas fallecieron a causa de esta enfermedad, lo que representó el 14% del total de defunciones (1 086 743) ocurridas en el país en ese año. En el 2020 la diabetes

mellitus pasó a ser la tercera causa de muerte, superada por el COVID 19 y las enfermedades del corazón (INEGI, 2021).

En relación con el cáncer, se ha observado un vínculo de la DM tipo 2 (DM2) con el desarrollo de algunas neoplasias como son: mama, hígado, páncreas, cáncer ginecológico, vejiga, colon y recto, entre otros. También, el pronóstico de dichas neoplasias puede ser influenciado por la DM y se ha asociado a un incremento en la mortalidad. Incluso las personas con cáncer y DM previa tienen una mayor tasa de mortalidad (Gárciga y Licea, 2012).

De acuerdo a un metaanálisis realizado en 2020 se encontró una fuerte asociación entre la diabetes y el cáncer de mama encontrando que el 10 % y el 20 % de los pacientes con cáncer de mama tienen DM. Los factores de riesgo significativos para la DM2 son la edad avanzada y la obesidad, que también son factores de riesgo para el cáncer de mama. Por tanto, existe un ligero aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama entre las mujeres con DM2; debido a que un nivel reducido de estrógeno, como resultado de la resistencia a la insulina, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer en cualquier órgano con altos niveles de receptores de estrógeno, incluidos los senos, el endometrio y los ovarios (Eketunde, 2020)

Se han postulado tres mecanismos para asociar la diabetes con el cáncer de mama: la activación de la vía de la insulina, activación de la vía del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la regulación de las hormonas sexuales endógenas; todos ellos pueden ser afectados por la hiperglucemia crónica. Además de que la hiperglucemia se asocia con un aumento del IGF-1 específicamente y citocinas inflamatorias, lo que influye directa e indirectamente en la proliferación de células cancerosas, la apoptosis y la metástasis (Ryu et al., 2014; Wolf et al., 2005; Eketunde, 2020).

1.4. Miembro 7 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF7) o CD70

TNFSF7 ó CD70 es una molécula coestimuladora involucrada en la respuesta inmune. Es una glicoproteína transmembrana de tipo II, compuesta por 193 aminoácidos cuya masa molecular varía dependiendo de su polimerización y

grado de glicosilación y se ha descrito de 50 kDa (Jacobs et al., 2015), o bien de 20.9 kDa en su forma monomérica, 42 kDa dimérica y 63 kDa trimérica (Jilaveanu et al., 2012), aunque también se han reportado formas de 27, 54, 75, 81 y 95 kDa (Murphy y Weaver, 2017; Cell Signaling Technology, 2023). CD70 es miembro de la familia del TNF α , identificado en humanos y roedores y se ha caracterizado funcionalmente como el ligando de CD27 (García et al., 2004). Tras la interacción con CD27, los residuos citoplasmáticos de este se unen a los factores asociados al receptor de TNF (TRAF), como TRAF2 y TRAF5, lo que activa las vías de NF κ B y c-Jun, conduciendo a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Jacobs et al., 2015). La expresión de CD70 normalmente está restringida a un pequeño subconjunto de linaje linfoide que incluye células B y T altamente activadas, células dendríticas maduras y células NK. Por esto, CD70 no se expresa en tejido normal no linfoide, pero se ha observado en células tumorales de varios cánceres sólidos (Yang et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

CD70 se ha encontrado expresado en la superficie de células malignas hematológicas y de tumores sólidos incluidos el osteosarcoma, el carcinoma de células renales, el carcinoma tímico, el carcinoma nasofaríngeo, gliomas de bajo grado (LGG) y glioblastoma (GBM) (Jing et al., 2018; Yang et al., 2020). También se ha detectado en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y algunos tumores mamarios (Petrau et al., 2014).

El papel de CD70 en células tumorales es controversial; ya que puede reducir el fenotipo tumoral en ciertas condiciones o promoverlo en otras (Pich et al., 2016a). Algunas de las evidencias que lo asocian con un fenotipo invasivo son:

a.- En cáncer de mama temprano *ex vivo* se presenta una expresión significativamente mayor de CD70 en el grupo de tumores de tipo basal invasivos en comparación con los tumores luminales A menos invasivos (Petrau et al., 2014).

b.- Subpoblaciones separadas de líneas celulares de cáncer de mama humanas CD70- y CD70+ presentan un fenotipo epitelial y mesenquimatoso, respectivamente. Las células CD70+ presentan auto renovación, alto potencial de diferenciación y promueven con mayor eficiencia la metástasis tumoral cuando se implantan ortotópicamente en la glándula mamaria del ratón. Además, el análisis de 120 muestras de cáncer de mama primario indicó que aquellas que tienen alta expresión de CD70 tienen abundantes células troncales, contribuyentes clave de la metástasis pulmonar. Por ello, se sugiere que CD70 es un marcador específico de metástasis de pulmón derivadas de tumores de mama (Liu et al., 2018).

c.- La expresión de CD70 en LGG y GBM mesenquimatosos primarios y recurrentes se asoció con una disminución en el tiempo de supervivencia por mediar la producción de quimiocinas protumorales e inducir selectivamente la muerte de células T CD8 +. Por lo anterior, CD70 promueve la inmunosupresión evitando el rechazo de las células cancerosas (Jin et al., 2018). Además, CD70 regula el eje TNF α -TNFRSF1a para inducir la apoptosis en las células T CD8 +, y se ha encontrado que el bloqueo de CD70 en ratones MLK3 -/- atenúa la apoptosis y aumenta el reclutamiento y la función citotóxica de las células T CD8 + ya que conduce a una mayor infiltración de células T CD8 + citotóxicas en los tumores de mama y reduce la carga tumoral principalmente a través de la vía intrínseca de la apoptosis (Kumar et al., 2020). Asimismo, considerando que CD70 está íntimamente ligado a la respuesta inmune de las células tumorales se ha propuesto como un blanco terapéutico para el cáncer.

Las células T de humano y ratón a las que se les inducen receptores de antígenos quiméricos (células CAR-T), específicos para CD70, reconocen LGG y GBM mesenquimatosos primarios CD70+ *in vitro*, promoviendo la regresión de estos tumores en xenoinjertos en modelos singénicos, sin efectos adversos (Jin et al., 2018). Por tanto, la transferencia adoptiva de células CAR-T anti CD70 puede inducir una potente respuesta antitumoral y se puede emplear para mejorar los tratamientos en pacientes con tumores cerebrales refractarios (Jin et al., 2018).

También, las células CAR-T específicas para CD70 reconocen y destruyen células de otros cánceres como de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) positivas para CD70 de manera eficiente, pero no las células cancerosas negativas para CD70 (Park et al., 2018).

CD70 frecuentemente se expresa en conjunto con otros antígenos que promueven la progresión tumoral como B7-H3, lo que ocurre en múltiples tipos de tumores, incluidos cáncer de riñón, mama, esófago, hígado, colon, glioma y melanoma. Por ello, el empleo de células CAR-T que se dirigen contra CD70 y B7-H3 exhiben una actividad antitumoral mejorada y resuelven el problema de la heterogeneidad antigénica y variante, frecuente en los tumores sólidos y el melanoma (Yang et al., 2020).

Por otra parte resulta de nuestro interés el estudio de un microambiente de hiperglucemia, el cual se ha encontrado que una concentración alta de glucosa (30 mM) promueve el fenotipo mesenquimatoso, la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular y la actividad invasiva de células derivadas de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 (Flores et al., 2016). Datos preliminares de arreglos de expresión indican que la concentración alta de glucosa incrementa 3.13 veces la expresión del gen para CD70 o TNFSF 7, por lo que CD70 puede estar implicado en la promoción tumoral por hiperglucemia y estamos interesados en elucidar el significado de la sobreexpresión de CD70 en estas condiciones.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La progresión del cáncer y su agresividad han sido estudiadas desde distintos enfoques, descubriéndose múltiples mecanismos moleculares, que explican en parte, de qué manera el cáncer puede ser tan agresivo. El cáncer de mama muchas veces hace metástasis a otros órganos y puede ser resistente aún a múltiples terapias. Dentro de las moléculas involucradas en la progresión y resistencia a fármacos de las células tumorales, se encuentra la sobreexpresión de CD70, miembro de la familia del TNF α y que se encuentra tanto en la

membrana de células tumorales, como en la membrana de células T, B, NK activadas y dendríticas maduras. Sin embargo, a la presencia de CD70 en células tumorales se le atribuye un aumento en la supervivencia tumoral e incluso la promoción de una alta capacidad invasiva; por lo que su sobreexpresión puede estar relacionada con una mayor supervivencia y actividad migratoria de las células MDA-MB-231 bajo condiciones de alta glucosa. Estudios recientes han experimentado con terapias inmunológicas dirigidas a la inhibición de CD70 y han encontrado resultados favorables, ayudando a la capacidad antitumoral de las células T. Con todo esto, CD70 podría ser una diana terapéutica sumamente importante para el tratamiento del cáncer de mama, sin embargo, aún faltan estudios de los mecanismos que regulan la expresión y función de CD70 en las células tumorales, en especial en las de cáncer de mama, cuando existe una condición hiperglucémica o DM.

4. JUSTIFICACIÓN

Al ser el cáncer de mama la neoplasia más frecuente y con mayor mortalidad en mujeres en todo el mundo, es sumamente importante la búsqueda de posibles dianas de terapia para combatir los factores asociados con su propagación y agresividad. Aunado a esto, las condiciones hiperglucémicas que pueden promover la diabetes mellitus puede ser un factor que contribuya también a la progresión del cáncer de mama. Por esta razón, en este trabajo se busca analizar el papel de CD70 en la capacidad de supervivencia de las células tumorales promovida por su sobreexpresión en condiciones de alta glucosa y su posible valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama, con el fin de proponer posibles terapias y dar un aporte al conocimiento de la agresividad del cáncer.

5. HIPÓTESIS

La hiperglucemia y otros factores protumorales inducen la expresión de CD70 el cual por múltiples vías de señalización, incluyendo NFκB, que promueve la supervivencia y actividad migratoria de las células tumorales.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Analizar los factores que regulan la expresión de CD70 en células de cáncer de mama en condiciones de hiperglucemia y/o diabetes mellitus y cómo este microambiente promueve la supervivencia y actividad migratoria, además de evaluar su posible valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

6.2. Objetivos particulares

- Realizar una revisión bibliográfica y en bases de datos sobre la expresión de CD70 y su interacción con otras proteínas en líneas celulares y tumores de cáncer de mama, en condiciones de hiperglucemia y/o diabetes mellitus.
- Con base en el análisis de expresión de éstos genes que interactúan, inferir los mecanismos por los que CD70 promueve la supervivencia y migración de las células de cáncer de mama.
- Analizar el efecto de una alta expresión de CD70 en la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama, considerando también su coexpresión con otros genes.
- Evaluar el efecto de una alta concentración de glucosa sobre la concentración de CD70 en células MDA-MB-231.

7. METODOLOGÍA

Este proyecto consta de una fase de búsqueda de información y análisis bioinformático y una segunda fase experimental.

7.1. Estudio bibliográfico y análisis bioinformático

La información de CD70 y su participación en la progresión del cáncer, con énfasis en el cáncer de mama, se obtuvo de la base de datos GeneCards (<https://www.genecards.org/>) y a través de la búsqueda bibliográfica en “Web of Science”, y “PubMed” del “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” empleando palabras clave como “breast cancer” AND “CD70”, “cancer” AND “CD70”. Debido a los pocos estudios de CD70 en el cáncer de mama nos auxiliamos de datos en otros tipos de cáncer.

Adicionalmente, se buscaron conjuntos de datos (“datasets”) de expresión de genes dependientes de hiperglucemia o diabetes en la base de datos “Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Aquí, se emplearon palabras clave como “breast cancer” AND “hyperglycemia” o “breast cancer” AND “diabetes”. Se realizó una búsqueda de los genes que interactúan con CD70 en “STRING Interaction Network” (<https://string-db.org/>), “Pathway Commons” (<https://www.pathwaycommons.org/>) y mediante el portal NCBI GENE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), así como en los datos procesados por “Database of Protein, Genetic and Chemical Interactions” del “Repositorio General Biológico para Conjuntos de Datos de Interacción” BioGRID (<https://thebiogrid.org/>). Después se analizaron los cambios en los genes encontrados en el o los conjuntos de datos recuperados para inferir las posibles vías por las que CD70 promueve el cáncer de mama en condiciones hiperglucémicas. En este abordaje, se seleccionaron genes modificados por la concentración alta de glucosa en las células MDA-MB-231 y que además se encuentren asociados con CD70 para analizar su posible participación en la regulación y en su función en la promoción del cáncer de mama. De igual forma, se evaluó si estos genes también se encontraban modificados en pacientes con cáncer de mama y DM2.

El análisis de coexpresión de CD70 y genes relacionados implicados en su regulación y acción (ATM, ZIP7, etc) se realizó mediante la plataforma “R2 genomics analysis and visualisation platform” (<http://r2.amc.nl/>), basada en los datos de expresión en líneas celulares de la “ Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) database” (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/home>), GEO y del “Cancer Genome Atlas” (TCGA, <http://cancergenome.nih.gov>). Los datos de TCGA se accedieron mediante el “cBioPortal for Cancer Genomics” (<http://cbioportal.org>).

El análisis de supervivencia de los pacientes con tumores de mama con baja y alta expresión de CD70 y genes relacionados se realizó mediante la herramienta KM-Plot (<https://kmplot.com>).

7.2. Efecto de la alta concentración de glucosa sobre la concentración de CD70 en células MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231 de (TNBC) se obtuvieron de la American Type Cell Collection (ATCC; Rockville, MD, EE. UU.) y se propagaron en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo glucosa normal (5.6 mmol/L), suplementado con suero fetal de bovino (FBS) al 10 % y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Todos los experimentos se realizaron con células de los pasajes 8–15. Se aplicaron los siguientes esquemas de tratamiento: a) control de glucosa normal (NG), glucosa 5,6 mmol/L y b) glucosa alta (HG), glucosa 30 mmol/L.

7.3. Evaluación de proteínas por “Western blot”

Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), se desprendieron del sustrato con EDTA 20 mmol/L en PBS durante aproximadamente 5 min a 37 °C y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. Los botones celulares resultantes se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en tampón RIPA enfriado con hielo (Cat. 89900, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (Cat. I3786, Sigma-Aldrich). Después de obtener una alícuota para la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford, los lisados se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Las muestras de proteínas se mezclaron con tampón de Laemmli, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 0.8 mA/cm², durante 2 h en tampón Tris de 25 mmol/L, 192 mmol/L de glicina y 20 % de metanol. Después de bloquear los sitios de unión no específicos con BSA al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS), las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de conejo contra CD70 (C02-69209S [E3Q1A], Cell Signaling Technology; Danvers, MA, EE.UU.) en TBS-Tween-20 al 0,1 % que contiene BSA al 1 % y se lavaron tres veces con el mismo tampón. La unión del anticuerpo se

detectó usando un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP) junto con un kit de quimioluminiscencia amplificada Clarity Western ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. La adquisición de imágenes de transferencia se realizó utilizando un escáner de transferencia Digit C (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, EE. UU.). El análisis por "Western blot" de CD70 se limitó al nivel cualitativo.

8. RESULTADOS

Dentro de la búsqueda de expresión de genes en condiciones de hiperglucemia, se encontraron perfiles en Gene Expression Omnibus de NCBI (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) específicamente datos de expresión con número de serie GSE136277, en este microarreglo se describen los genes regulados diferencialmente por hiperglucemia en células MDA-MB-231 y se encontró que el mRNA de CD70 se expresó 3.13 veces más de lo normal. También se encontraron datos de la expresión diferencial de secuenciación de RNA (RNASeq) en tumores de mama en mujeres diabéticas en comparación con no diabéticas, con número de serie GSE150586. Este trabajo se centró más en el análisis del primer arreglo.

8.1. Interacciones con CD70

Se encontraron 24 genes que codifican para proteínas que interactúan con CD70 en la base Pathway Commons (Figura 1), sin embargo, priorizamos aquellos que presentaron cambios en su nivel de expresión en el microarreglo en las células MDA-MB-231 cultivadas con alta glucosa (No. GSE136277). De estos últimos genes, ATM es de los genes regulados al alta cuando existen condiciones de hiperglucemia en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama y tienen una interacción de unión con CD70. De los genes regulados a la baja se encontraron XPO7, CHPT1, AARS2 y PPARA, cuyas proteínas codificadas tienen una interacción de unión con CD70, a excepción de PPARA, en que su interacción es de expresión (Figura 1). Los genes mencionados también fueron encontrados en la base de datos filtrados por BioGRID, a excepción de PPARA.

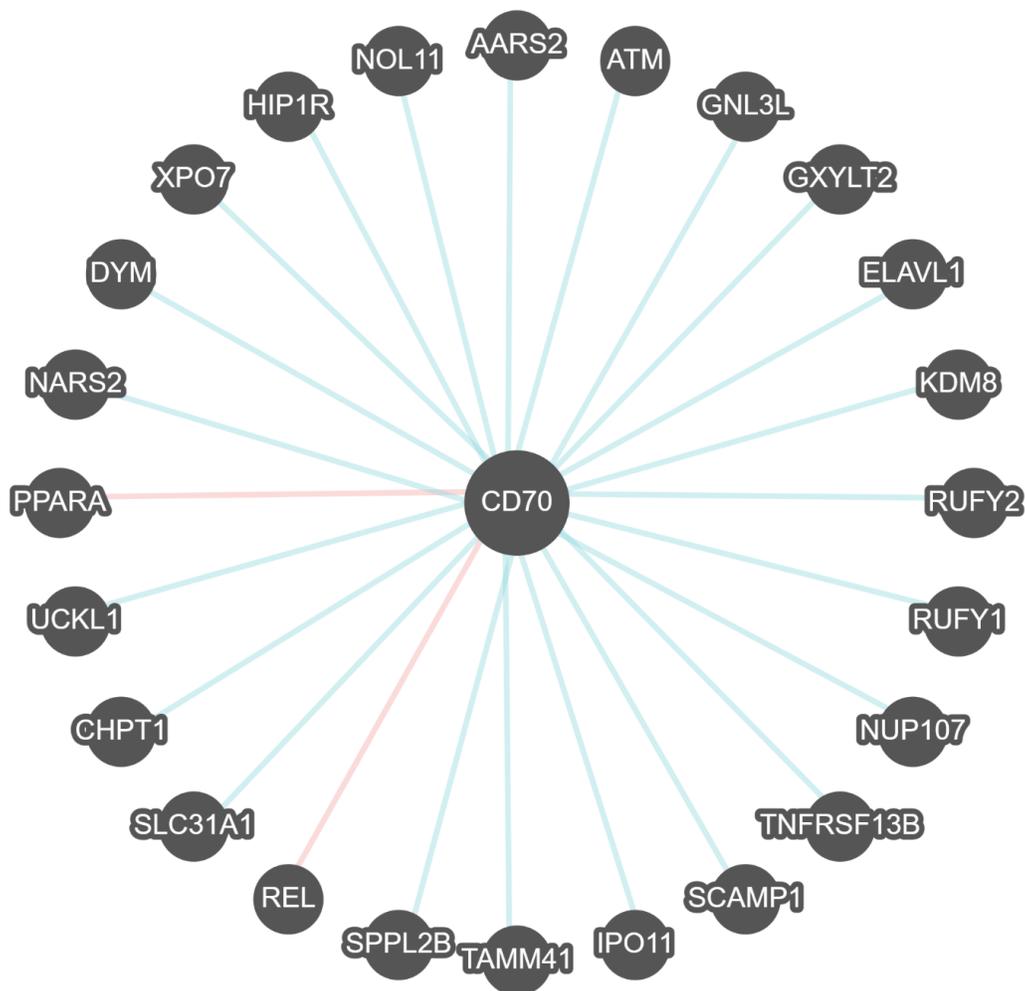


Figura 1. Mapa de genes que interactúan con CD70. Las líneas azules representan interacciones de unión, y las líneas rojas representan una interacción de expresión. Obtenido de "Pathway Commons"

8.2. Genes interactuantes con CD70 y su papel en el cáncer.

En la base de datos de STRING se encontraron 25 genes que codifican para proteínas que interactúan con CD70 (Figura 2), de estas destacamos IL4, que se encuentra regulada a la baja en condiciones hiperglucémicas en las células MDA-MB-231. Los datos procesados por BioGRID arrojaron 164 genes que codifican para proteínas interactuantes con CD70, la mayoría de las interacciones proteína-proteína se ha inferido por cromatografía de afinidad y espectrometría de masas. Acorde con esta base de datos, de los genes regulados al alta en

condiciones hiperglucémicas encontramos XPOT, EXTL3, KIR2DL4 y SLC39A7, mientras que los regulados a la baja fueron CSE1L, GGCX, MAP2K3.

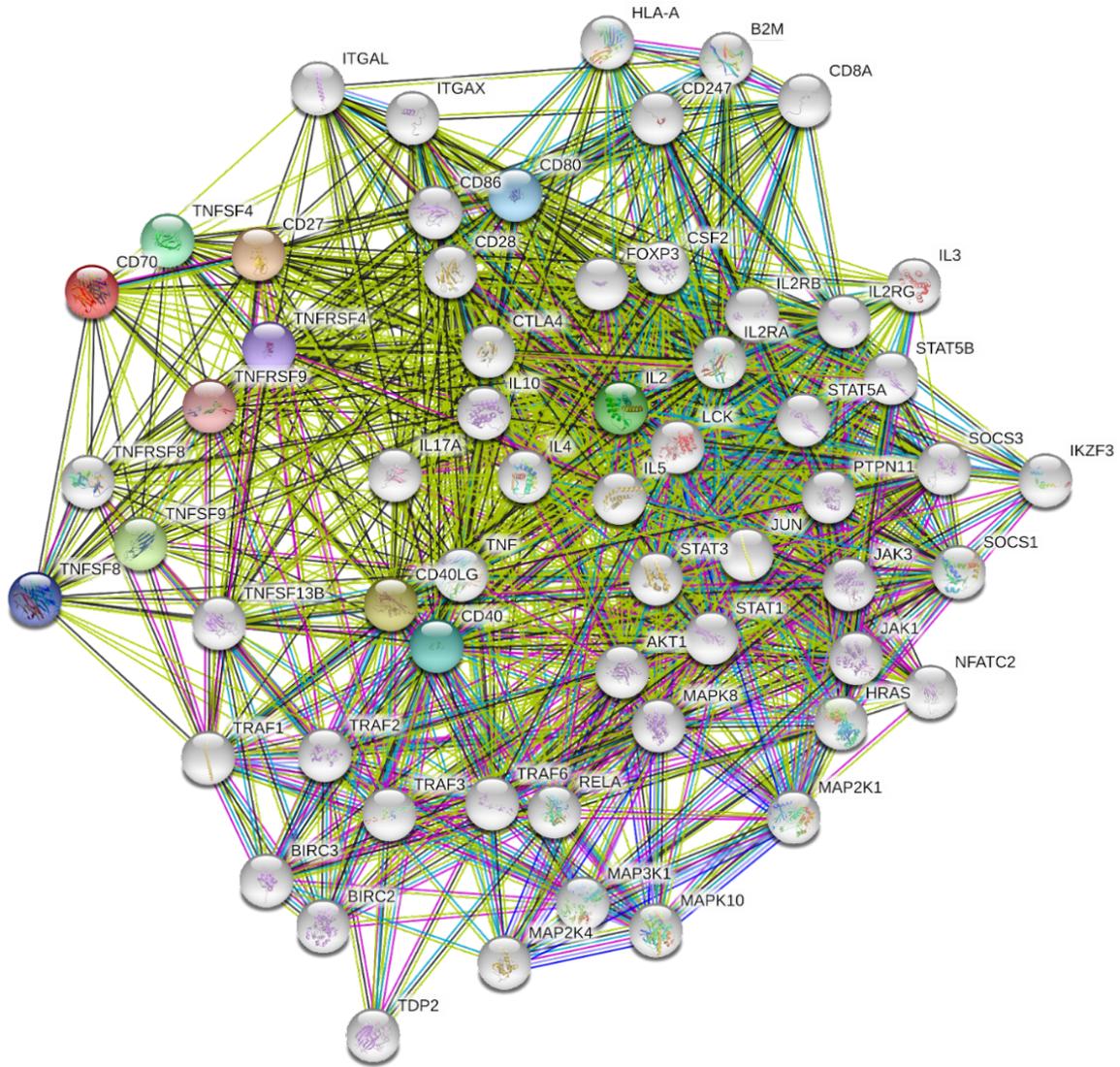


Figura 2. Mapa de genes que interactúan con CD70 obtenido de STRING. Los nodos de color representan la primera capa de interactuantes con CD70 (esfera roja). Las líneas amarillas: significan que la inferencia de interacción fue por extracción de textos, negras: representan coexpresión, rosa: interacciones que fueron determinadas experimentalmente, azul: significan que los datos fueron obtenidos de bases de datos seleccionadas, verdes: son genes vecinos, azul marino: concurrencia de genes, blanco: homología de proteínas.

Los genes regulados por hiperglucemia en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y que codifican para proteínas que interactúan con CD70 (Tabla 1)

fueron recabados para analizar su papel en la promoción de un fenotipo agresivo y metastásico y las posibles vías implicadas.

Tabla 1. Genes asociados con CD70 que son regulados por hiperglucemia en células MDA-MB-231.

ID	Nombre	Veces de cambio	Función de la proteína codificada	Relación con CD70	Referencia y/o fuente
Genes regulados al alta					
NM_001252	TNFSF7 / CD70 Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 7	+3.129304	TNF de tipo membrana, ligando de CD27. Regula la proliferación y función de células T, B y NK, puede promover el rechazo o la tolerancia inmunológica a las células tumorales y promover la invasividad de células de cáncer de mama.	Corresponde con CD70	Pich, et al (2016b) GEO: GSE136277
NM_001440	EXTL3 Exostosin like glycosyltransferase 3	+1.935858	Glicosiltransferasa de membrana que cataliza la transferencia de N-acetilglucosamina a cadenas de glicosaminoglicanos en la síntesis de heparan sulfatos. Aumenta la activación de NFkB inducida por TNFα. Como receptor de REG3A media la activación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK promoviendo la proliferación de células tumorales.	Unión: Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:108438 Huttlin et al 2021. *Wang et al 2021. *Zhang et al 2021.
NM_007235	XPOT Exportin for tRNA	+1.843291	RAN-GTPasa que media la exportación de aminoacil-tRNAs desde el núcleo al citoplasma. La regulación de la expresión génica se basa en parte en el intercambio controlado por XPOT. La regulación al alza de XPOT indica un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama.	Unión: Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:116420 Huttlin 2021. *Vaidyanathan et al 2016.
NM_000051	ATM Ataxia Telangiectasia Mutated; serine/threonine kinase	+1.596333	Cinasa importante en el control del ciclo celular; porque regula proteínas supresoras de tumores p53 y BRCA1, la cinasa de punto de control CHK2, las proteínas de punto de control RAD17 y RAD9 y la proteína de reparación del DNA NBS1.	Unión: Cromatografía de Afinidad-MS*	Pathway Commons BioGRID:106962 Huttlin 2021. Huttlin 2017.
NM_006979	SLC39A7 / ZIP 7 Solute carrier family 39 member 7	+1.573866	Transporta zinc desde el retículo endoplásmico y aparato de Golgi al citoplasma. Se activa al ser fosforilado por la caseína cinasa 2 en respuesta a factores del crecimiento como EGF. El zinc inhibe fosfatasas manteniendo activas tirosin cinasas (MAPK, PI3K y Akt) por lo que estimula la proliferación y migración celular y promueve el cáncer. Es un indicador de resistencia a anti-hormonas en cáncer de mama,	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:113652 Huttlin 2021. *Taylor et al 2012. *Nimmanon et al 2017.
NM_002255	KIR2DL4 Killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 4	+1.516534	Glicoproteína transmembrana expresadas por células asesinas naturales y subconjuntos de células T. Desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria.	Unión: Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:110006 Huttlin 2021. *Kataoka et al 2020.

Genes regulados a la baja					
NM_015024	XPO7 Exportin 7	-2.94604	Se encarga del transporte de proteínas y RNA grandes a través de los complejos de poros nucleares (NPC). También es un supresor de tumores novedoso que regula la expresión de p21/ CIP1 para controlar la senescencia y la tumorigénesis.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:116420 Huttlin 2021. Huttlin 2017. *Innes 2021.
NM_005036	PPARA Peroxisome proliferator activated receptor alpha	-2.901704	Afectan la expresión de genes diana implicados en la proliferación celular, la diferenciación celular y en las respuestas inmunes e inflamatorias; ya que es un factor de transcripción nuclear.	Expresión	Pathway Commons *Rakhshandehroo 2009. *Rakhshandehroo 2010.
NM_000589	IL4 Interleukin 4	-2.316614	Citocina pleiotrópica producida por células T activadas, importante para la reparación de tejidos. Contrarresta los efectos de las citocinas proinflamatorias de tipo 1.	No especifica	STRING *Nagumo 1998.
NM_002756	MAP2K3 Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-2.21603	Cinasa de la familia de MAPK. Es activada por estrés mitogénico y ambiental. Fosforila y, por tanto, activa a MAPK14 / p38-MAPK.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:111592 Huttlin 2021. Huttlin 2017.
NM_020244	CHPT1 Choline phosphotransferase 1	-1.898903	Cataliza la biosíntesis de fosfatidilcolina a partir de CDP-colina. Por tanto, juega un papel central en la formación y mantenimiento de las membranas vesiculares.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:121309 Huttlin 2021. Huttlin 2017.
NM_000821	GGCX Gamma-glutamyl carboxylase	-1.614349	Carboxila los residuos de glutamato de proteínas dependientes de vitamina K a gamma carboxil glutamato, Una modificación necesaria para su actividad. Participa en la coagulación de la sangre e inflamación. Se sobreexpresa en cáncer de mama triple negativo, promueve la población de células madre y reduce la supervivencia del huésped.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:108945 Huttlin 2021. *Beaudin et al 2019.
NM_001316	CSE1L Chromosome segregation 1 like	-1.552524	Media la exportación de la importina α del núcleo al citoplasma, participando en el transporte núcleo-citoplasma de proteínas. Amplifica la apoptosis inducida por TNF α , puede también promover la proliferación y migración celular.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	
NM_001605	AARS2 Alanyl-tRNA synthetase, mitocondrial	-1.542761	Aminoacil-tRNA sintetasa de clase II. Participa en la traducción del mRNA cargando tRNAs con sus aminoácidos afines. El alanil-tRNA y las mutaciones en este gen son una causa de deficiencia combinada de fosforilación oxidativa.	Unión. Cromatografía de Afinidad-MS*	BioGRID:121569 Huttlin 2021. Huttlin 2017.
<p>Genes que interactúan con CD70 y que son regulados por condiciones de hiperglucemia en células de cáncer de mama MDA-MB-231 de acuerdo al interactoma y al microarreglo GSE136277, en esta tabla los genes están ordenados conforme a su regulación y a las veces de cambio en su expresión. Se mencionan los métodos de estudio que se utilizaron para determinar la interacción en las plataformas. Cromatografía de Afinidad-MS*: Cromatografía de afinidad y Espectrometría de masas; se infiere una interacción cuando una proteína de cebo se captura por adición de extractos celulares mediante un anticuerpo policlonal o una etiqueta de epítipo y el socio de interacción asociado se identifica mediante métodos de espectrometría de masas. *Referencias de las funciones asociadas con los genes.</p>					

8.3. Importancia de CD70 en cáncer de mama en mujeres

Las interacciones entre CD70 y otros genes pueden ser clave para el estudio de esta molécula y su posible acción maligna respecto al cáncer, sin embargo su papel en el cáncer de mama en mujeres diabéticas no ha sido estudiado a profundidad. Se encontraron datos sustanciales sobre la coexpresión de estos genes en TNBC, así como los pronósticos de supervivencia de pacientes con éstas interacciones, así mismo se ha determinado la presencia de la proteína CD70 en la línea celular MDA-MB-231 determinado experimentalmente como se aborda en los siguientes apartados.

8.3.1. Expresión de CD70 y genes interactuantes en cáncer de mama de pacientes diabéticas

Se encontró un solo estudio de perfiles de expresión de mRNA en cáncer de mama con diabetes (serie GSE150586) realizado en 12 pacientes; 6 con cáncer de mama y diabetes y 6 solo con cáncer de mama. No encontramos que los genes que codifican para CD70 y genes asociados detectados en el microarreglo de las células MDA-MB-231 cultivadas con alta glucosa se expresaran diferencialmente en relación a la diabetes mellitus. Considerando que son pocos pacientes y los niveles de glucemia en la cohorte y otros parámetros son desconocidos, nos enfocamos a evaluar la coexpresión de CD70 con otros genes y su valor pronóstico en datos de pacientes solo con cáncer de mama triple negativo.

8.3.2. Correlación entre la expresión de CD70 y genes que codifican para proteínas interactuantes

Para analizar la importancia de la coexpresión de TNFSF7 con los otros genes seleccionados en el cáncer de mama, se recurrió a la plataforma R2 Genomic Analysis Visualization Platform para evaluar la correlación entre estos genes interactuantes. Utilizamos el “dataset Tumor Breast (triple negative) - Purrington - 226 - rma_sketch - hugene21t de cáncer de mama triple negativo con un número de serie GEO: GSE142102 y con una cohorte de 226 pacientes. Se trata de una

población de mujeres afroamericanas con alta susceptibilidad para desarrollar cáncer de mama triple negativo.

Se encontró que de los genes regulados a la alta KIR2DL4 tiene una correlación positiva con CD70, siendo su coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0.265 y un valor de p significativo de 5.6×10^{-5} (Figura 3A). De los genes sobreexpresados también encontramos a los que codifican a ZIP7 (SLC39A7) y XPOT que contrario al anterior mostraron una correlación negativa y un valor p significativo (Figura 3C y 3D). Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre la expresión de ATM con la de TNFSF7, obteniéndose una r de 0.019 y un valor p de 0.790 (Figura 3B).

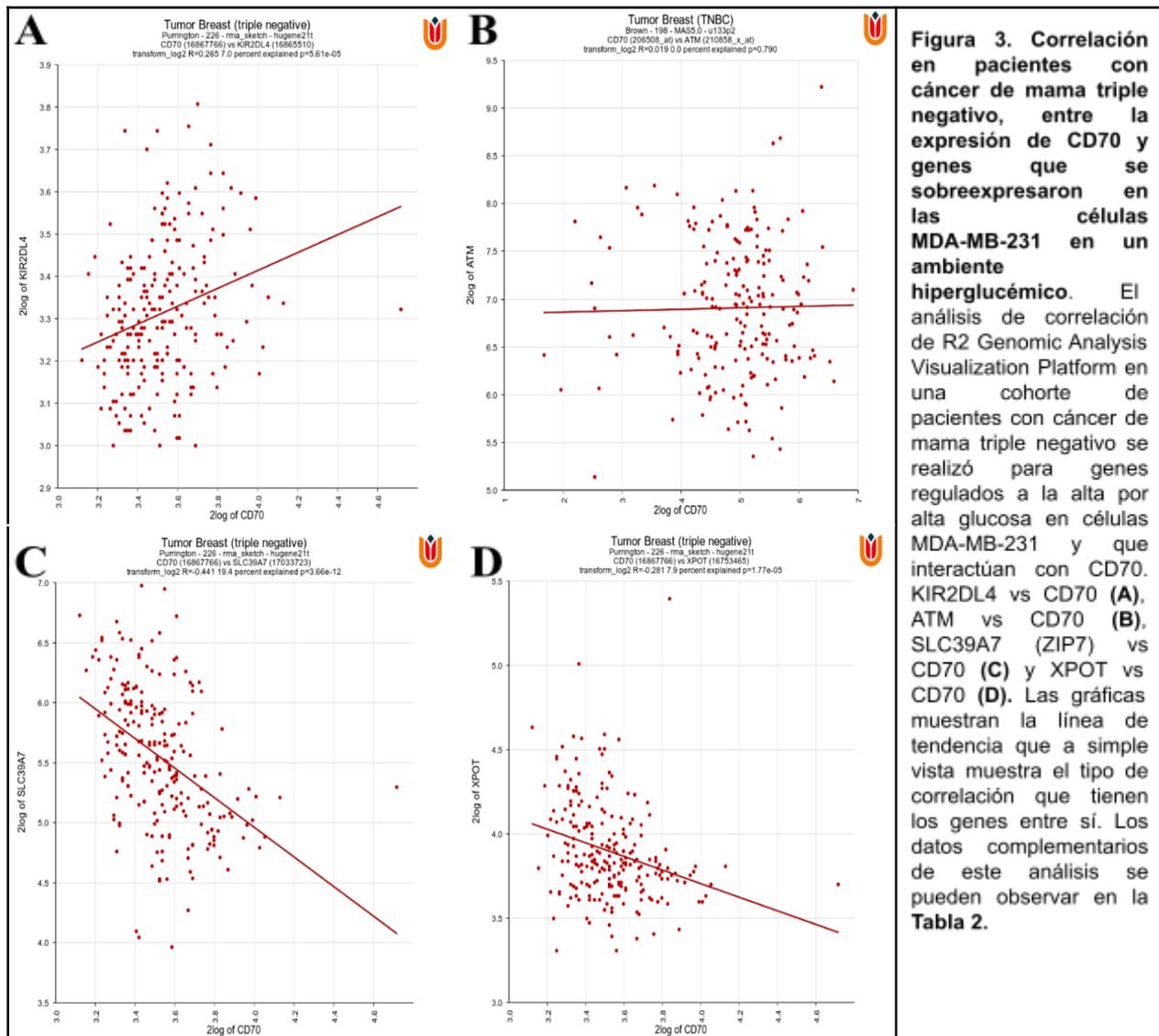


Figura 3. Correlación en pacientes con cáncer de mama triple negativo, entre la expresión de CD70 y genes que se sobreexpresaron en las células MDA-MB-231 en un ambiente hiperglucémico. El análisis de correlación de R2 Genomic Analysis Visualization Platform en una cohorte de pacientes con cáncer de mama triple negativo se realizó para genes regulados a la alta por alta glucosa en células MDA-MB-231 y que interactúan con CD70. KIR2DL4 vs CD70 (A), ATM vs CD70 (B), SLC39A7 (ZIP7) vs CD70 (C) y XPOT vs CD70 (D). Las gráficas muestran la línea de tendencia que a simple vista muestra el tipo de correlación que tienen los genes entre sí. Los datos complementarios de este análisis se pueden observar en la **Tabla 2**.

De los genes regulados a la baja en las células MDA-MB-231 en un ambiente hiperglucémico, XPO7 muestra una correlación negativa de -0.351 y un valor p de 5.89×10^{-8} . Para GGCX se obtuvo una r igual a -0.248 y un valor p igual a 1.6×10^{-4} y por último para CSE1L una r de -0.408 con un valor p igual a 1.9×10^{-10} (Figura 4). Todos los datos obtenidos del análisis de correlación fueron discriminados por sus valores significativos, en la tabla 2 se muestran los valores de r y p correspondientes a dicho análisis.

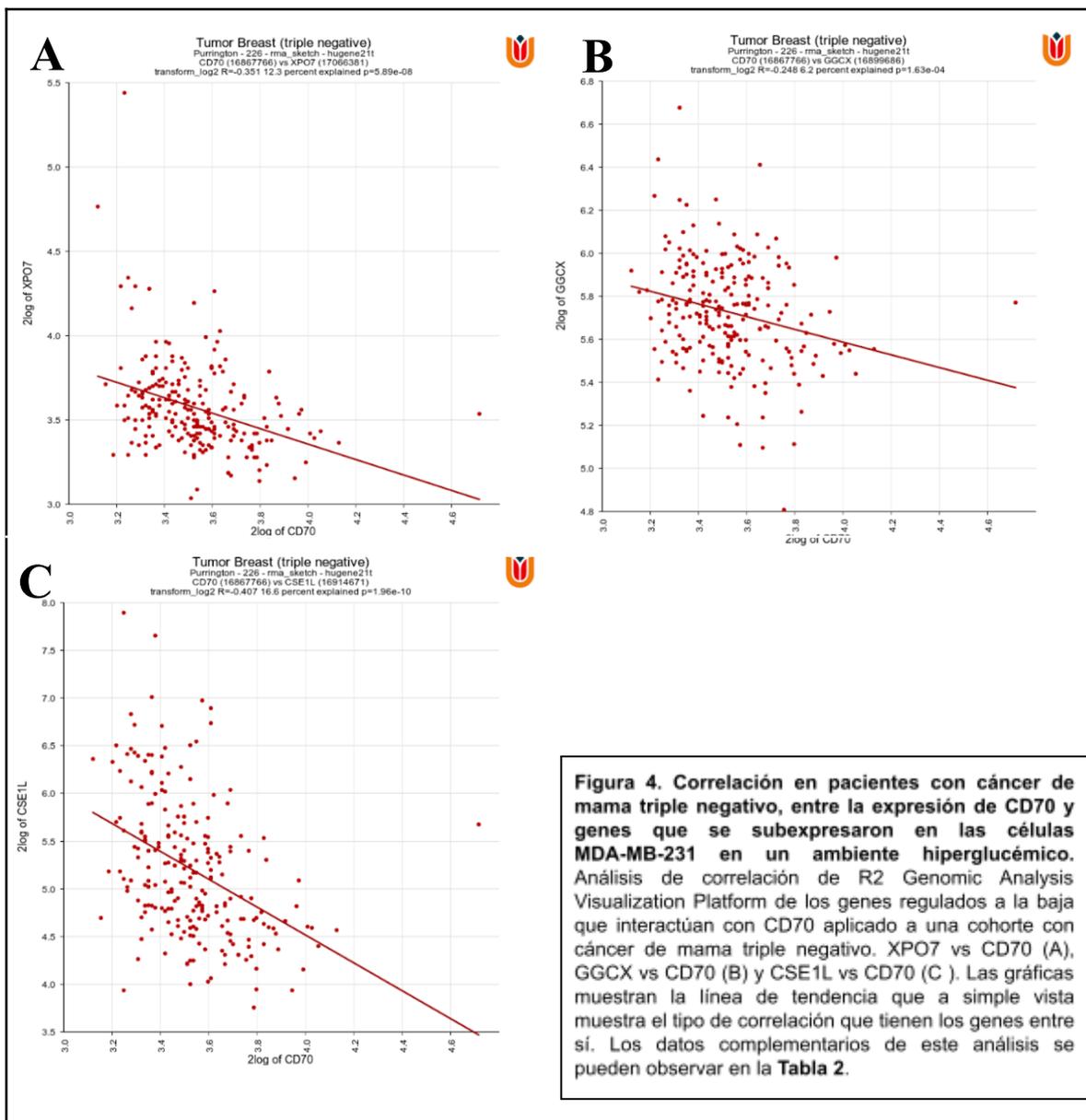


Figura 4. Correlación en pacientes con cáncer de mama triple negativo, entre la expresión de CD70 y genes que se subexpresaron en las células MDA-MB-231 en un ambiente hiperglucémico. Análisis de correlación de R2 Genomic Analysis Visualization Platform de los genes regulados a la baja que interactúan con CD70 aplicado a una cohorte con cáncer de mama triple negativo. XPO7 vs CD70 (A), GGCX vs CD70 (B) y CSE1L vs CD70 (C). Las gráficas muestran la línea de tendencia que a simple vista muestra el tipo de correlación que tienen los genes entre sí. Los datos complementarios de este análisis se pueden observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Valores de correlación entre genes coexpresados con CD70 en pacientes con tumores de mama triple negativos.

Genes al alta		
Gen	<i>r</i>	Valor de <i>p</i>
CD70 vs KIR2DL4	0.265*	5.61E-05*
CD70 vs ATM	0.019	0.790
CD70 vs ZIP7	-0.441	3.66E-12*
CD70 vs XPOT	-0.281	1.77E-05*
Genes a la baja		
CD70/XPO7	-0.351*	5.89E-08*
CD70/GGCX	-0.248*	1.63E-04*
CD70/ CSE1L	-0.408*	1.96E-10*

Se aplicó el análisis de R2 Genomic Analysis Visualization Platform a una cohorte de pacientes con cáncer de mama triple negativo. * indica una correlación significativa

8.3.3. Análisis de supervivencia de pacientes con baja y alta expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a CD70.

Para determinar el valor pronóstico de los genes estudiados en este trabajo, se utilizaron herramientas en la web como Kaplan-Meier Plotter para implementar gráficas de supervivencia en cáncer de mama triple negativo. Para este análisis, la plataforma utiliza un conjunto de datos (“datasets”) que nosotros seleccionamos de acuerdo con las características triple negativo de cáncer de mama (negativo a receptor de ER, PR y HER2).

Se emplearon datos de un total de 534 pacientes con estas características, la supervivencia del cuartil superior en una cohorte de baja expresión para el gen CD70 (o CD27L: ligando de CD27), fue de 37.62 meses, mientras que en una cohorte de alta expresión fue de 22.03 meses y el valor de *p* fue igual a 0.011, por lo que la sobreexpresión de CD70 disminuye significativamente la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. KIR2DL4 (nkat2b) mostró una supervivencia de 36.44 en baja expresión y 25.2 meses en la cohorte de alta expresión, sin embargo, este tuvo un valor de *p* igual a 0.069, es decir no significativo (Figura 5B). EXTL3 (REGR) por sí sólo con baja expresión tiene una supervivencia casi del doble a comparación de cuando se tiene alta expresión con un valor *p* igual a

0.0013 (Figura 5.1J). ATM sólo no muestra diferencia en la supervivencia a baja y alta expresión sin embargo, cuando se evalúa junto con CD70, la supervivencia es mayor cuando ambos tienen una baja expresión y tiene un valor p igual a 0.00076 (Figura 5E). Lo mismo ocurre en la coexpresión de CD70 con ZIP7 (SLC39A7) y XPOT con valores p igual a 0.025 y 0.00063 respectivamente (Figura 5.1G, 5.1I).

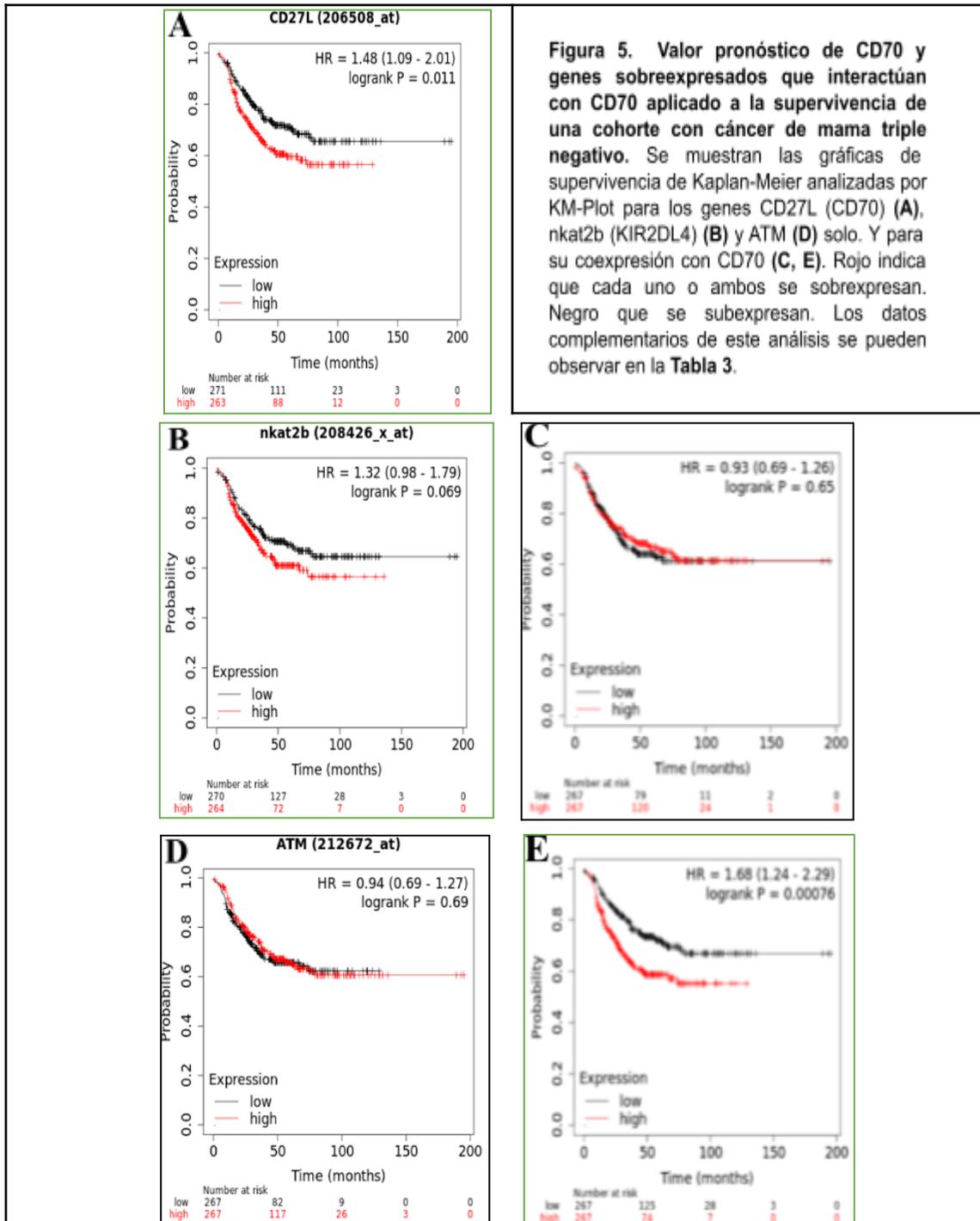


Figura 5. Valor pronóstico de CD70 y genes sobreexpresados que interactúan con CD70 aplicado a la supervivencia de una cohorte con cáncer de mama triple negativo. Se muestran las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier analizadas por KM-Plot para los genes CD27L (CD70) (A), nkat2b (KIR2DL4) (B) y ATM (D) solo. Y para su coexpresión con CD70 (C, E). Rojo indica que cada uno o ambos se sobreexpresan. Negro que se subexpresan. Los datos complementarios de este análisis se pueden observar en la **Tabla 3**.

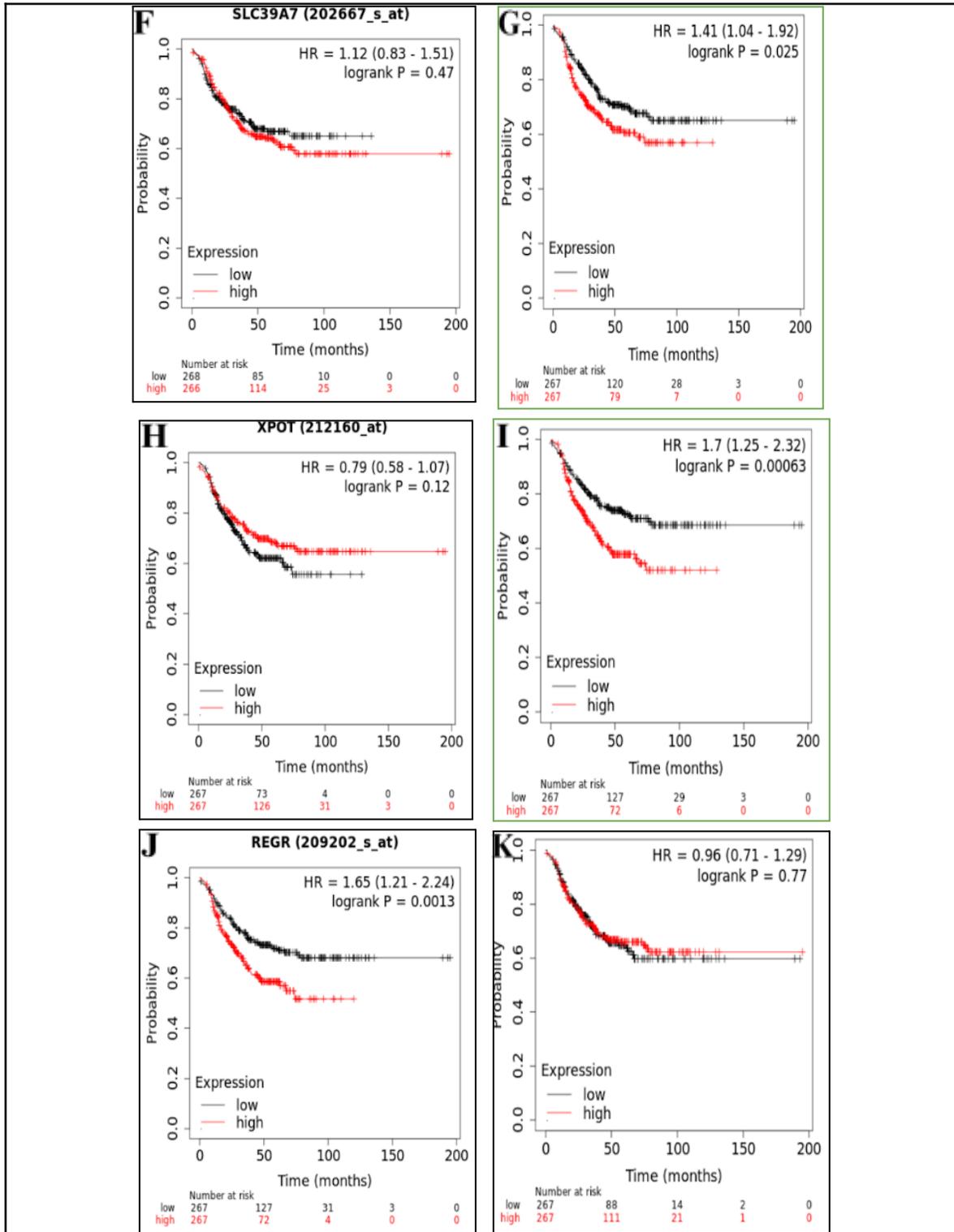


Figura 5.1 Valor pronóstico de CD70 y genes sobreexpresados que interactúan con CD70 aplicado a la supervivencia de una cohorte con cáncer de mama triple negativo. Se muestran las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier analizadas por KM-Plot para los genes SLC39A7 (F), XPOT (H) y REGR (EXTL3) (J) solo. Y para su coexpresión con CD70 (G, I, K). Rojo indica que cada uno o ambos se sobreexpresan. Negro que se subexpresan. Los datos complementarios de este análisis se pueden observar en la **Tabla 3**.

En cuanto a los genes regulados a la baja XPO7, GGCX, CSE1L y CHPT1 en solitario no mostraron datos significativos, sin embargo, cuando se coexpresan al alta con CD70 la supervivencia disminuye, estos datos tuvieron un valor de p significativo (Figura 6, Tabla 3), predomina por tanto el efecto de la sobreexpresión de CD70, no encontramos en la plataforma como evaluar el cambio en supervivencia cuando CD70 se sobreexpresa y los genes asociados se expresan a la baja, lo que imitaría a lo encontrado en el arreglo de expresión de MDA-MB-231 en condiciones de alta glucosa.

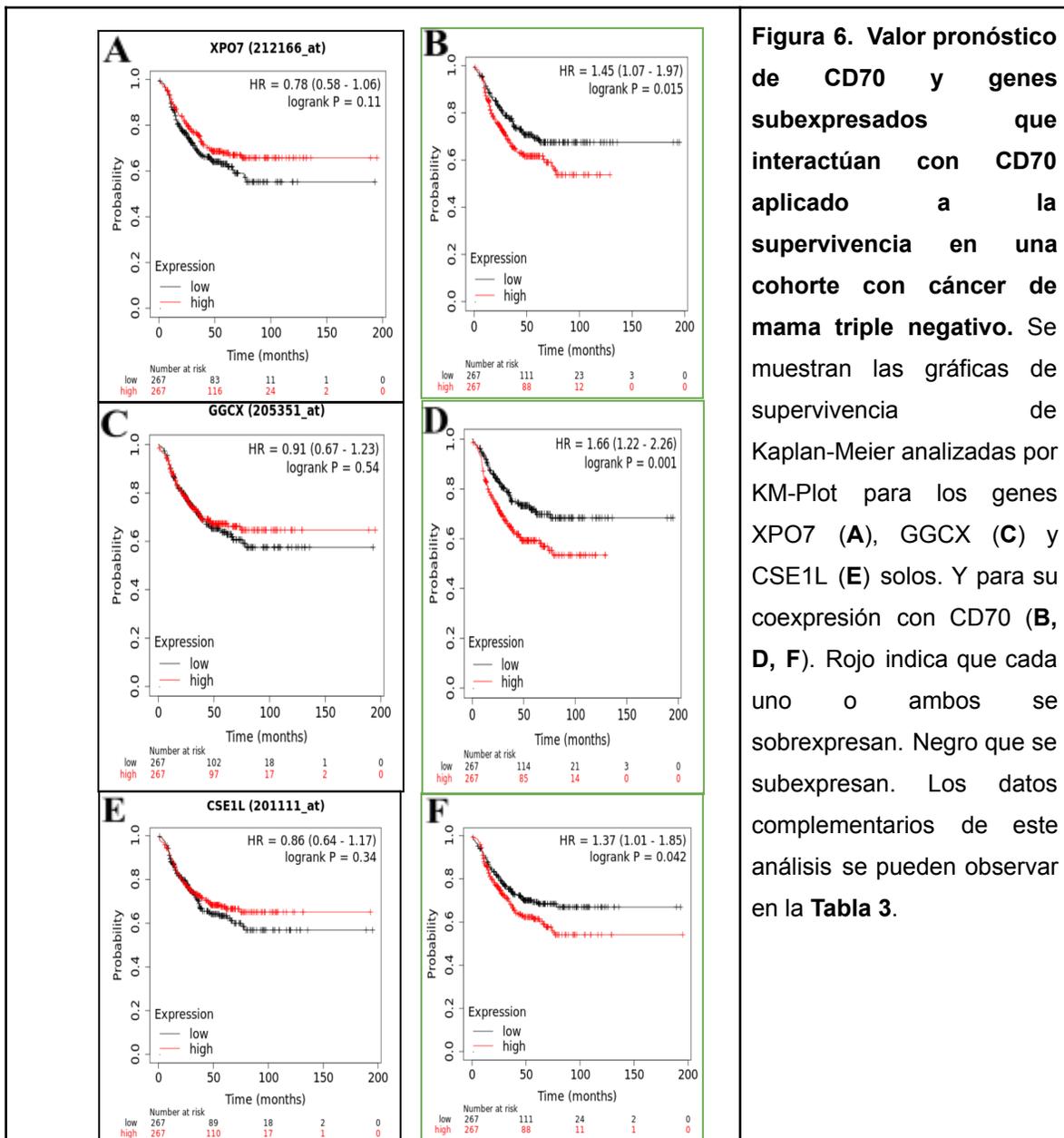


Tabla 3. Análisis de supervivencia de los genes interactuantes con CD70

Supervivencia BC (-/-)				Supervivencia BC (-/-) / Genes combinados			
Genes a la alta				Genes a la alta			
Gen	Cohorte de baja expresión (meses)	Cohorte de alta expresión (meses)	Valor de p	Gen	Cohorte de baja expresión (meses)	Cohorte de alta expresión (meses)	Valor de p
CD70	37.62*	22.03*	0.011*				
KIR2DL4	36.44	25.2	0.069	CD70 / KIR2DL4	28.09	30	0.65
ATM	27.04	33.64	0.69	CD70 / ATM	45*	21*	0.00076*
ZIP7	33.96	28.75	0.47	CD70 / ZIP7	36.84*	21.98*	0.025*
XPOT	27	36.44	0.12	CD70/XPOT	45*	22.03*	0.00063*
EXTL3	43*	22.03*	0.0013*	CD70 / EXTL3	32.03	27.34	0.7
Genes a la baja				Genes a la baja			
XPO7	25	36.84	0.11	CD70 / XPO7	37.62**	24.31**	0.015**
GGCX	30	29	0.54	CD70 / GGCX	38*	22.003*	0.001*
CSE1L	28.75	30	0.34	CD70 / CSE1L	36.04*	25.2*	0.042*
CHPT1	27.6	32.03	0.36	CD70 / CHPT1	38*	22.03*	0.001*

Análisis obtenido de KM-Plott, aplicado a una cohorte de pacientes con cáncer de mama triple negativo. Los meses se refieren a cuando la población tiene una probabilidad de supervivencia del 75% (cuartil superior), * indica que hubo diferencias significativas entre las cohortes de alta y baja expresión. BC, cáncer de mama; (-/-), triple negativo

8.4. Determinación de CD70 por “Western blot” en células MDA-MB-231

La transferencia se hizo a partir de células de cáncer de mama MDA-MB-231, en condiciones de glucosa alta y normal. En la membrana se corrieron 100 μ g de proteína por carril (Figura 7) y las barras presentes en la membrana confirmaron la unión del anticuerpo al epítipo específico, en este caso la proteína CD70, que resultó estar presente en ambas condiciones de glucosa alta y normal, sin presentar cambios notorios entre sí. Se detectaron múltiples bandas acorde a lo esperado, según la hoja de características del anticuerpo ya que se visualiza a los

54 y 81 kDa (Cell Signaling Technology, 2023), y de acuerdo a los artículos donde se presume que este patrón sea distinto dependiendo de la oligomerización y glicosilación de la proteína (Murphy y Weaver, 2017).

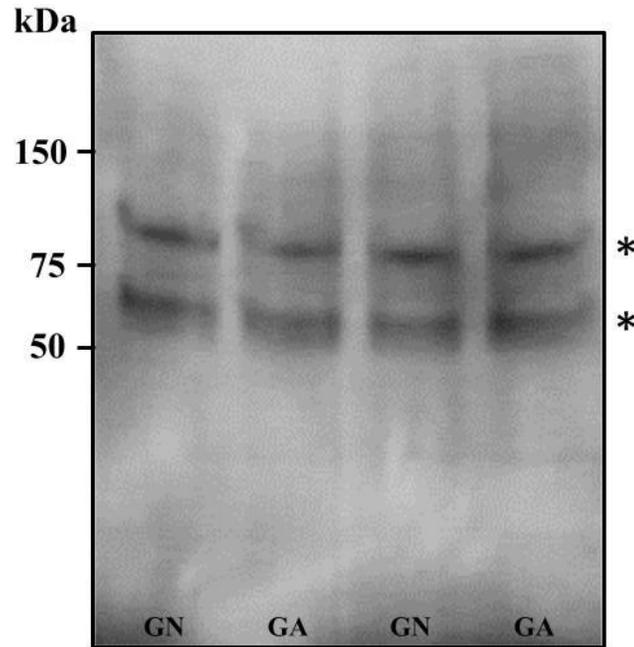


Figura 7. “Western blot” de CD70 en células MDA-MB-231. Las células se cultivaron en condiciones de glucosa normal (GN) y alta (GA). El gel se corrió empleando 200 µg de proteína por carril. *Bandas de CD70 que se detectaron.

9. DISCUSIÓN

En estudios previos de nuestro laboratorio, las células MDA-MB-231 cultivadas en condiciones de alta glucosa mostraron un aumento en el crecimiento de la población celular, en la actividad migratoria e invasiva (Flores-López et al., 2016), esto implica que la hiperglucemia puede influir en la proliferación celular, la apoptosis y metástasis ya que esta condición se asocia con un aumento del IGF-1 y citocinas inflamatorias (Ryu et al., 2014; Wolf et al., 2005; Eketunde, 2020).

La molécula coestimuladora CD70 se encontró presente en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 en condiciones normales y de alta glucosa (Figura 7), situación que normalmente no ocurre en células mamarias no cancerosas (Yang et al 2020). No detectamos cambios notorios de la concentración en la proteína

CD70 en glucosa normal y alta debido a falta de repeticiones, por esta razón, el análisis fue meramente cualitativo, pero demostró que CD70 puede tener una función importante en la progresión tumoral, dependiendo del contexto en el patrón de expresión génica, además, CD70 puede sobreexpresarse en tumores de cáncer de mama de algunas pacientes, al igual que en varios cánceres sólidos como se ha reportado (Petrau et al., 2014; Yang et al., 2020).

9.1 Participación de CD70 en la promoción del cáncer de mama

El papel de CD70 en la respuesta inmunitaria y su acción a través de su receptor (CD27) en las células del sistema inmune es conocido por su efecto en el rechazo o tolerancia de las células tumorales. Sin embargo, los resultados recabados no muestran la expresión genética del receptor (CD27) en las células tumorales de cáncer de mama. Por esta razón fue novedoso abordar la posible acción protumoral de CD70 directamente en las células tumorales en un mecanismo independiente de la interacción con su receptor y que pudiera tener un papel importante en la progresión y metástasis del cáncer de mama en condiciones de hiperglucemia.

La estrategia seguida de identificar los genes que interactúan con CD70 y que su expresión cambia cuando las células MDA-MB-231 se cultiva con alta concentración de glucosa, permitió detectar diversos genes que pueden estar implicados en el mecanismo de acción de CD70 al promover un fenotipo más migratorio/invasivo en estas células así como del análisis de las funciones de éstos genes. De acuerdo a nuestros resultados, CD70 posiblemente esté implicado en vías clave para promover la progresión y metástasis del cáncer de mama (Figura 3). Con base en las interacciones, cambios de expresión y artículos revisados, se muestra un esquema con las vías en las que podría estar implicado CD70 para promover un fenotipo prometastásico en células MDA-MB-231, siendo las vías, ERK-MEK, PI3K-AKT, así como cascadas de señalización involucradas en la supervivencia como NFkB, vías de transporte de zinc, aminoacil tRNA y reparación al daño de DNA por ATM, lo que describiremos a continuación (Figura 8).

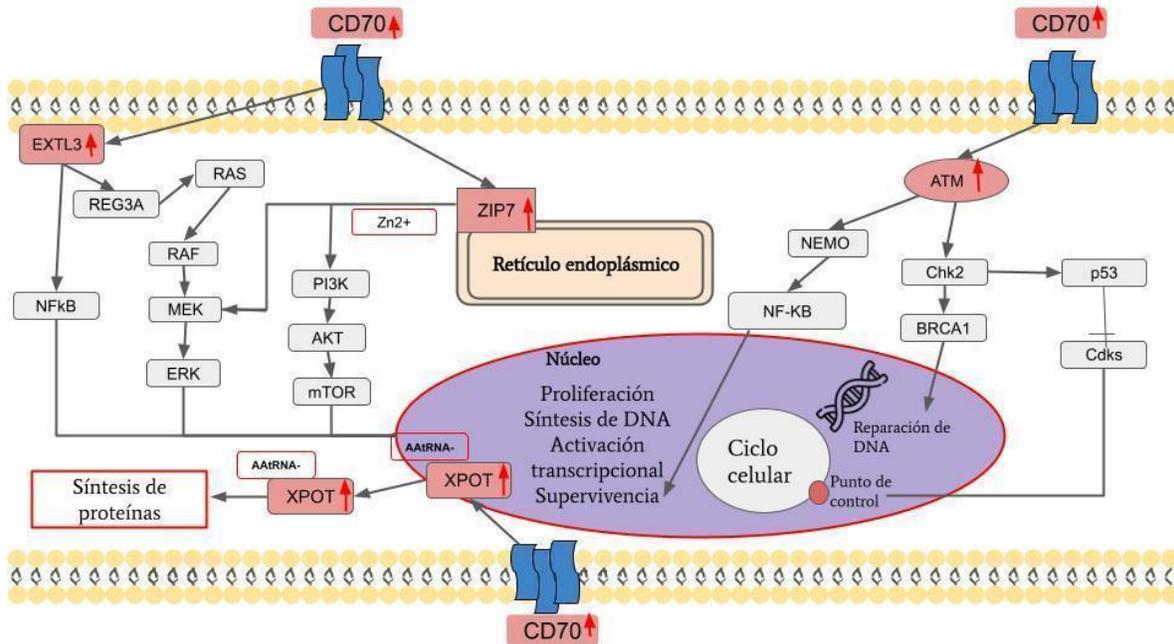


Figura 8. Posibles vías involucradas en la acción de CD70 en células MDA-MB-231, de cáncer de mama en condiciones de hiperglucemia. AAtRNA, aminoacil-tRNA. La acción de CD70 puede ser mediada por EXT3, ZIP7, ATM y XPO1 regulando diferentes vías de señalización.

Las interacciones de CD70 con genes regulados a la alta incluyen a EXT3, que promueve la activación de NFκB inducida por TNFα y funciona como receptor de la proteína de regeneración 3A (REG3A), la que se ha descrito como un factor de proliferación; por lo que puede mediar la activación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK, como ocurre en diversos tumores y células tumorales (metaplasia acinar-ductal, cáncer hepático, etc.) (Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021). No encontramos estudios que analicen el significado de la interacción de CD70 con EXT3 en cáncer de mama. Sin embargo, puede favorecer la proliferación y la supervivencia de las células MDA-MB-231, la primera por inducir la acción de REG3A y la segunda por promover la activación de NFκB y con ello la supervivencia de las células, favoreciendo así la progresión maligna de la enfermedad.

Otro gen que interactúa con CD70 sobreexpresado en las células MDA-MB-231 en un medio hiperglucémico fue XPO1. Su función es la exportación de tRNA desde el núcleo al citoplasma y la regulación al alza de XPO1 indica un mal pronóstico

en pacientes con cáncer de mama (Vaidyanathan et al., 2016). Hay pocos estudios enfocados a la acción molecular de XPOT en la tumorigénesis, su mecanismo en la promoción tumoral y del significado de las vías asociadas en la interacción con CD70, pero en la cohorte de pacientes analizada encontramos que XPOT no se asoció con un mal pronóstico (Figura 5.1H) a diferencia de lo encontrado por Vaidyanathan et al., sin embargo cuando se encuentra coexpresado con CD70 la supervivencia disminuye significativamente (Figura 5.1I). Por esto, podemos especular que la acción de XPOT se asocia a un incremento en el transporte de aminoacil-tRNAs al citosol, promoviendo una mayor síntesis de proteínas indispensable para la rápida proliferación de las células cancerosas y que esto puede depender de su interacción con moléculas como CD70. También, se sabe que la inhibición de XPOT con un análogo de la vitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) suprime la proliferación y migración de células de neuroblastoma (Pan et al., 2021), por esta razón XPOT podría ser un blanco potencial para prevenir la promoción del cáncer de mama por la DM2.

La cinasa ATM que es importante en el control del ciclo celular, regula proteínas supresoras de tumores, cinasas de punto de control y la proteína de reparación del DNA (NBS1) (Shiloh y Ziv, 2013). Esta cinasa interactúa con CD70 y se encuentra regulada a la alta en las células MDA-MB-231 en condiciones de hiperglucemia. Sin embargo, la función de su interacción se desconoce, pero ATM podría mediar los efectos de CD70 en aumentar la proliferación de las células tumorales promoviendo el ciclo celular a través de sus puntos de control y mejorando los mecanismos de reparación al daño de DNA.

SLC39A7 / ZIP 7 es otro de los genes sobreexpresados en las células MDA-MB-231 expuestas a alta glucosa. Esta proteína transporta zinc desde el retículo endoplásmico y aparato de Golgi hasta el citoplasma y es importante en el mantenimiento de la forma activa (fosforilada) de tirosina cinasas (MAPK, PI3K-AK3 y mTOR) al inhibir a las tirosina fosfatasas (Taylor et al., 2012; Nimmanon et al., 2017). Además promueve la proliferación y migración celular asociada al cáncer. ZIP7 es un indicador de resistencia a terapia antihormonas en

cáncer de mama sensible a hormonas. En concordancia con la inducción de la expresión de ZIP7 por hiperglucemia, ZIP7 se eleva en respuesta a la glucosa en los islotes pancreáticos y su fosforilación se eleva en cardiomiocitos cultivados en alta concentración de glucosa (Adulcikas et al., 2019).

Desafortunadamente, los cambios en la expresión genética en cáncer de mama en pacientes diabéticas han sido muy poco estudiados y solo encontramos un estudio con tan solo 6 pacientes que no presentó cambios en la expresión de los genes considerados. Es necesario que haya un mayor número de pacientes estudiadas para realizar un análisis más confiable.

9.2 Valor pronóstico de CD70 y genes asociados

El análisis realizado en plataformas, nos permitió estimar valores pronóstico (supervivencia) en pacientes con cáncer de mama triple negativo, y encontramos aquí que el valor pronóstico de CD70 por sí solo es potencialmente importante, aunque también puede depender de la expresión de otros genes. De esta manera, la alta expresión de CD70 disminuye significativamente la supervivencia de los pacientes (Figura 5A) y caso contrario cuando hay poca expresión de este. Lo anterior concuerda con varios estudios donde CD70 es un marcador específico de metástasis de pulmón derivado de tumores de mama y un marcador predictivo de resistencia a la quimioterapia en cánceres de ovario (Liu et al., 2018; Petrau et al., 2014)

El caso particular de ATM destacó; ya que a pesar de no presentar una correlación con la expresión de CD70 en una cohorte de pacientes con TNBC, sabemos que interactúa con CD70 y también se ha encontrado sobreexpresado en líneas celulares y tumores sólidos. Aún con esto, el análisis de supervivencia con ATM mostró valores importantes; ya que la supervivencia de la cohorte con alta expresión de ambos genes disminuye significativamente la supervivencia de las pacientes y la baja expresión de ambos se asoció con un alta tasa de supervivencia (Figura 5E, Tabla 3). Por esta razón la alta expresión de ATM junto con la de CD70 puede empeorar el pronóstico de las pacientes; debido a que

participa en la reparación del daño a DNA y en la activación de factores de transcripción como NFkB (Shiloh y Ziv, 2013; Hinz et al., 2010).

La coexpresión para el gen ZIP7 con respecto a CD70 arrojó una correlación significativamente negativa con una r de -0.44 (Tabla 2), sin embargo para este gen se esperaba una correlación positiva, ya que el arreglo de expresión de referencia mostró que ambos genes fueron sobreexpresados en células MDA-MB-231 en condiciones de hiperglucemia. Esta diferencia podría deberse a que el arreglo se refiere a una línea celular de cáncer de mama derivada de una sola paciente y hay alta variabilidad en el perfil de expresión génica entre distintas pacientes, aún con el mismo subtipo de cáncer de mama. Aunado a esto, las predicciones de supervivencia para ZIP7 disminuyen cuando se expresa a la alta junto con CD70, por lo que la presencia de CD70 empeora el pronóstico de supervivencia en conjunto con ZIP7. En la figura 3 podemos apreciar que un buen número de pacientes sobreexpresan ATM y CD7; sin embargo, la mayoría de pacientes que tienen baja expresión de CD70, tienen alta expresión de ZIP7.

Al igual que con ZIP7, también se esperaba una correlación positiva entre la expresión de XPOT y la de CD70, pero los valores estimados fueron lo contrario (Tabla 2), una vez más puede deberse a la variabilidad de expresión génica en los tumores de distintos pacientes. Adicionalmente en los valores estimados de supervivencia encontramos que también CD70 coexpresado con este gen empeora el pronóstico (Tabla 3).

EXTL3 según las estimaciones puede ser un marcador pronóstico por sí sólo, ya que la supervivencia con alta expresión del gen es baja, pero cuando se coexpresa con CD70 la supervivencia aumenta, pudiendo en este caso CD70 mejorar el pronóstico cuando se expresan ambos genes conjuntamente.

La mayoría de los genes regulados a la baja en el arreglo de expresión de MDA-MB-231 que interactúan con CD70 mostraron una correlación negativa en el análisis aplicado a pacientes, esto coincide perfectamente con lo encontrado en las células MDA-MB-231; ya que cuando CD70 se encuentra sobreexpresado, otros genes como XPO7, GGCX y CSE1L se regulan a la baja en el arreglo de

expresión en cultivos con alta concentración de glucosa. Los cambios en la expresión de estos genes no modificaron la supervivencia de las pacientes; cuando estos genes se expresaron a la alta junto con CD70, predomina el mal pronóstico debido a este último (Tabla 3, Figura 6). Estos últimos genes regulados a la baja están involucrados en la supresión tumoral, amplificación de la proliferación y apoptosis inducida por TNF- α (Innes, 2021), excluyendo aquí a GGCX que está involucrado en la coagulación de la sangre e inflamación y se ha encontrado también en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Beaudin et al., 2019). Otro gen que se subexpresa en las células MDA-MB-21, CHPT1 y que es encargado del mantenimiento de membranas vesiculares, también se ha encontrado sobreexpresado en cáncer de mama (Wen et al., 2020). A pesar de que estos dos genes no se encuentran sobreexpresados en el arreglo de referencia (GSE136277) y sean partícipes en procesos protumorales, su interacción con CD70 está reportada y la expresión de estos es variable en las pacientes.

Nuestro estudio se vio limitado por el escaso número de pacientes con cáncer de mama y diabetes que han sido estudiados, sin embargo, presenta un posible abordaje en el análisis de la función de un gen en la promoción de la actividad migratoria e invasiva en el cáncer. Además, los cambios en CD70 (ubicación celular y oligomerización) en el cáncer de mama y el cáncer en general, están poco estudiados. De esta manera, CD70 monomérico abundante en células de melanoma, limita la migración e invasión, mientras que la inducción de su forma trimérica y membranal en estas células, restaura la migración e invasión en ellas mediante la activación de múltiples vías como MAPK, AKT y NF κ B (Pich et al, 2016a). Sería interesante estudiar estos eventos en tumores de mama expuestos a altas concentraciones de glucosa.

Por otro lado, es posible que la promoción del cáncer de mama dependa de la oligomerización de CD70 y su asociación a la membrana celular, puesto que en las células MDA-MB-231 de este estudio predominaron las formas di y triméricas en ambas condiciones de glucosa, por tanto, una posibilidad es que la invasividad

en las células MDA-MB-231 en condiciones de alta glucosa se asocia más con la forma trimérica de CD70.

10. CONCLUSIONES

TNFSF7 (CD70) parece ser algo más que un ligando de CD27, teniendo su propia señalización en tumores sólidos, como el cáncer de mama. La promoción de un fenotipo invasivo por la diabetes y la hiperglucemia puede ser dependiente de la activación de múltiples vías y/o procesos bioquímicos como las vías ERK-MEK, PI3K-AKT, NFκB, vías de transporte de zinc, aminoacil tRNA y reparación al daño de DNA, las que pueden activarse en parte por los cambios en la expresión de CD70 y genes que interactúan con CD70, discutidos en éste estudio, en especial ZIP7 y ATM. A pesar de la carencia de estudios en cáncer de mama, la acción protumoral de CD70 podría ser el resultado de la interacción de su forma trimérica de membrana con diversas proteínas implicadas en vías claves para la progresión del cáncer.

CD70 puede funcionar como un marcador pronóstico en el cáncer de mama triple negativo, este análisis tomó como referencia un arreglo de expresión de células MDA-MB-231 en condiciones de alta y baja glucosa, para posteriormente hacer un análisis predictivo en las plataformas que contienen bases de datos de pacientes, sin embargo las condiciones de glucosa no fueron las mismas, por tanto este proyecto puede dar la pauta a investigar más a fondo el papel de CD70 en cáncer de mama, cuando su receptor (CD27) no está presente, así como en pacientes diabéticas.

11. REFERENCIAS

- Adulcikas, J., Sonda, S., Norouzi, S., Sohal, S., Myers, S. (2019) Targeting the zinc transporter ZIP7 in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Nutrients*. 11(2):408. <https://doi.org/10.3390/nu11020408>
- American Cancer Society. (2019, 20 de septiembre) Tipos de cáncer de seno. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/tipos-de-cancer-de-seno.html#:~:text=Los%20tipos%20m%C3%A1s%20comunes%20son,todos%20los%20c%C3%A1nceres%20de%20seno>
- Bargalló, E., Ruvalcaba, E., Quintero, G., Reséndiz, J., Salas, E., Serrano, J., Silva, A., Maffuz, A., Figueroa, P., Villalobos, R., Villarreal, C., Cardona, S., Serrano, R., Rodríguez, A., Barragán, A., Rodríguez, S. (2019) Recursos para la atención de pacientes con cáncer de mama en México. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 18(3):121-126.
- Beaudin, S., Kokabee, L., Welsh, J. (2019) Divergent effects of vitamins K1 and K2 on triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*. 10(23):2292-2305.
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. (2022, 26 de septiembre) Cáncer de mama. ¿Qué es el cáncer de mama? https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
- Cell Signaling Technology. (2023). CD70 (E3Q1A) Conejo mAb #69209. Recuperado de <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cd70-e3q1a-rabbit-mab/69209>
- Chavez, K., Garimella, S., 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(1-2): 35–48.
- Eketunde, A. (2020) Diabetes as a risk factor for breast cancer. *Cureus*. 12(5):e8010.

- Flores, L., Martínez, M., Viedma, R., Díaz, M. Baiza, L. (2016). High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cellular Oncology*. 39(4):365-78.
- García, P., Beltrán, A., Bellón, T., Carpio, E., Llano, M., Caparrós, E., Aparicio, P., López, M. (2004) Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *Journal of leukocyte biology*. 76(1):263-70.
- Gárciga, F., Licea, M. (2012) Relación entre la diabetes mellitus y el cáncer. *Revista Peruana de Epidemiología*. 16(2): 69-75.
- GLOBOCAN. (2020). <https://gco.iarc.fr>
- Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S., khanna, K., Dittmar, G. Scheidereit, C. (2010) A cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-κB activation. *Molecular Cell*. 1(4): 63-74.
- Huttlin, E., Bruckner, J., Paulo, J., Cannon, J., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M., Parzen, H., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Pontano, L., Swarup, S., White, A., Schweppe, D., Rad, R., Erickson, B., Obar, R., Guruharsha, K., Li, K., Artavanis, S., Gygi, S., y Wade, J. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*. 545(7655): 505–509.
- Huttlin, E., Bruckner, J., Navarrete, J., Cannon, J., Baltier, K., Gebreab, F., Gygi, M., Thornock, A., Zarraga, G., Tam, S., Szpyt, J., Gassaway, B., Panov, A., Parzen, H., Fu, A., Golbazi, A., Maenpaa, E., Stricker, K., Thakurta, S., Zhang, T., Rad, R., Pan, J., Nusinow, D., Paulo, J., Schweppe, D., Pontano, L., Harper, J., Gygi, S. (2021). Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell*. 184(11):3022-3040.e28. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.011.
- Innes, A., Sun, B., Wagner, V., Brookes, S., McHugh, D., Pombo, J., Porreca, R., Dharmalingam, G., Vernia, S., Zuber, J., Vannier, J., García, R., Gil, J. (2021) XPO7 is a tumor suppressor regulating p21CIP1-dependent senescence. *Genes & Development*. 35(5-6):379-391.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2021). Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 de febrero). Comunicado de prensa Núm. 105/21. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2021). Estadísticas a propósito del Día mundial de la diabetes. (14 de noviembre). Comunicado de prensa Núm. 645/21. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf
- Jacobs, J., Deschoolmeester, V., Zwaenepoel, K., Rolfo, C., Silence, K., Rottey, S., Lardon, F., Smits, E. y Pauwels, P. (2015) CD70: An emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*. (155):1-10
- Jilaveanu, L., Sznol, J., Aziz, S., Duchon, D., Kluger, H. y Camp, R. (2012) CD70 Expression Patterns in Renal Cell Carcinoma. *Human Pathology*. 43(9): 1394–1399.
- Jin, L., Ge, H., Long, Y., Yang, C., Chang, Y., Mu L., Sayour, E., De Leon, G., Wang, Q., Yang, J., Kubilis, P., Bao, H., Xia, S., Lu, D., Kong, Y., Hu, L., Chencheng, Y., Nie, J., Li, S., Gu, Y., Sun, J., Mitchell, D., Lin, Z. y Huang, J. (2018). CD70, a novel target of CAR T-cell therapy for gliomas. *Neuro-Oncology*. 20(1):55–65.
- Kataoka, T., Ueshima, C., Hirata, M., Minamiguchi, S., Haga, H. (2020). Killer immunoglobulin-like receptor 2DL4 (CD158d) regulates human mast cells both positively and negatively: Possible roles in pregnancy and cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(3): 954.
- Kumar, S., Singh, SK., Viswakarma, N., Sondarva, G., Nair, R., Sethupathi, P., Dorman, M., Sinha, S., Hoskins, K., Thatcher, G., Rana, B. Rana, A. (2020). Rationalized inhibition of mixed lineage kinase 3 and CD70 enhances life span and antitumor efficacy of CD8+ T cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 8(2):e000494.

- Liu, L., Yin, B., Yi, Z., Liu, X., Hu, Z., Gao, W., Yu, H., Li, Q. (2018). Breast cancer stem cells characterized by CD70 expression preferentially metastasize to the lungs. *Breast Cancer*. 25(6):706-716.
- Monian, P., Jiang, X. (2016) The cellular apoptosis susceptibility protein (CAS) promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis and cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 291(5):2379–88.
- Murphy, K. y Weaver, C. (2017) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, 9ed.
- Nagumo, H., Agematsu, K. (1998). Synergistic augmentative effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interactions on B-cell immunoglobulin synthesis. *Immunology*. 94(3):388-94.
- Nimmanon, T., Ziliotto, S., Morris, S., Flanagan, L., Taylor, K. (2017) Phosphorylation of zinc channel ZIP7 drives MAPK, PI3K and mTOR growth and proliferation signaling. *Metallomics*. 9(5):471-481.
- Pan, L., Chen, J., Wu, Z., Wu, Y. (2021) Exportin-T: A novel prognostic predictor and potential therapeutic target for neuroblastoma. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 20:15330338211039132.
- Park, Y., Jin, L., Bennett, K., Wang, D., Fredenburg, K., Tseng, J., Chang, L., Huang, J., Chana E. (2018). CD70 as a target for chimeric antigen receptor T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 78, 145-150
- Petrau, C., Cornic, M., Bertrand, P., Maingonnat, C., Marchand, V., Picquenot, J. M., Jardin, F., Clatot, F. (2014). CD70: A potential target in breast cancer? *Journal of Cancer*. 5(9), 761–764.
- Pich, C., Sarrabayrouse, G., Teiti, I., Mariamé, B., Rochaix, P., Lamant, L., Favre, G., Maisongrosse, V., Tilkin, A. (2016a). Melanoma-expressed CD70 is involved in invasion and metastasis. *British Journal of Cancer*. 114:63–70.
- Pich, C., Teiti, I., Sarrabayrouse, G., Gallardo, F., Gence, R. & Tilkin, A. (2016b). Melanoma expressed-CD70 is regulated by RhoA and MAPK pathways without affecting vemurafenib treatment activity. *PLOS One*. 11(2).

- Rakhshandehroo, M., Knoch, N., Müller, M., Kersten, K. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research*. 2010:612089.
- Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., Kersten, K. (2009) Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLOS One*. 4(8): e6796.
- Ryu, T., Park, J., Scherer, P. (2014). Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes & Metabolism Journal*. 38(5):330–336.
- Shiloh Y., Ziv, Y., (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:197–210.
- Taylor, K., Hiscox, S., Nicholson, R., Hogstrand, C., Kille, P. (2012) Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Science Signaling*. 5(210):ra11.
- Vaidyanathan, S., Thangavelu, P., Duijf, P. (2016) Overexpression of Ran GTPase components regulating nuclear export, but not mitotic spindle assembly, marks chromosome instability and poor prognosis in breast cancer. *Target Oncology*. 11(5):677-686.
- Wang L, Quan Y, Zhu Y, Xie X, Wang Z, Wang L, Wei X, Che F. (2021) The regenerating protein 3A: a crucial molecular with dual roles in cancer. *Molecular Biology Reports*. doi: 10.1007/s11033-021-06904-x.
- Wen, S., Él, Y., Liewei, W., Zhang, J., Quan, C., Niu, Y. y huang, H. (2020) Aberrant activation of super enhancer and choline metabolism drive antiandrogen therapy resistance in prostate cancer. *Oncogene*. 39:6556–6571.
- Wolf, I., Sadetzki, S., Catane, R., Karasik, A., Kaufman, B. (2005) Diabetes mellitus and breast cancer. *The Lancet Oncology*. 6(2):103-111
- Yang, M., Tang, X., Zhang, Z., Gu, L., Wei, H., Zhao, S., Zhong, K., Mu, M., et al. (2020). Tandem CAR-T cells targeting CD70 and B7-H3 exhibit potent preclinical activity against multiple solid tumors. *Theranostics*, 10(17);7622–7634.

- Ye, M., Han, R., Shi, J., Wang, X., Zhao, A., Li, F., Chen, H. (2020) Cellular apoptosis susceptibility protein (CAS) suppresses the proliferation of breast cancer cells by upregulated cyp24a1. *Medical Oncology*. 37(5):43.
- Zhang, H., Corredor ALG, Messina-Pacheco J, Li Q, Zogopoulos G, Kaddour N, Wang Y, Shi BY, Gregorieff A, Liu JL, Gao ZH. (2021) REG3A/REG3B promotes acinar to ductal metaplasia through binding to EXTL3 and activating the RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Communications Biology*. 7;4(1):688.