



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES

JURIQUILLA

LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN BASAL Y EN RESPUESTA
A LA TROMBINA DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA (MDA-MB-
231) Y DE PRÓSTATA (DU-145)

TESIS DE TITULACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:
MAURICIO CHAVESTE ZAVALA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPPJ IMÉNEZ L

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. JUNIO 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.

Resumen

El cáncer, una enfermedad multifactorial caracterizada por una proliferación y diseminación celular descontroladas, es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. En los últimos años ha emergido la trombina como un blanco terapéutico potencial del cáncer en función de sus efectos estimuladores del crecimiento y la metástasis tumoral. Esta proteasa actúa sobre los receptores activados por proteasas (PARs) presentes en las células tumorales para desencadenar distintas vías de señalización que promueven proliferación, invasión y metástasis. Sin embargo, se desconoce si una respuesta diferencial a la trombina se asocia con el tipo y progresión del cáncer. El objetivo de este trabajo fue analizar si una línea celular utilizada en el estudio del cáncer de mama (MDA-MB-231) y una línea de cáncer de próstata (DU-145) difieren en su respuesta de proliferación e invasión a la trombina. La proliferación celular se evaluó a distintos tiempos mediante la incorporación al DNA de un análogo de la timidina (EdU) por el método de “*crick*”. La invasividad se determinó a través de un soporte permeable de doble cámara. La tasa de proliferación en ausencia de trombina (basal) fue similar entre ambos tipos celulares a las 24 y 48 horas pero mayor en las células DU-145 a las 72 horas. La trombina estimuló la proliferación de ambas líneas celulares y su efecto fue mayor sobre las células DU-145 a las 48 y a las 72 horas con respecto a las células MDA-MB-231. La invasividad basal de las células de cáncer de mama fue mayor que las de próstata. La trombina estimuló la invasividad de ambos tipos de cáncer pero su efecto también fue mayor en las células DU-145. La mayor respuesta de las células DU-145 a la trombina no parece deberse a una mayor expresión del PAR1, principal receptor de los efectos promotores de la trombina, porque la expresión del RNA mensajero de PAR1 evaluada mediante RT-qPCR fue similar entre ambos tipos celulares. En conclusión, las células DU-145 parecen ser más susceptibles a la acción de la trombina vía mecanismos independientes de un aumento en la expresión de PAR1.

Agradecimientos

Subvención

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT A1-S-9620)

Agradecimientos a:

Dra. Xarubet Ruiz Herrera, Técnico académico del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

Lic. Fernando López Barrera, Técnico académico del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

Daniel Mondragón Huerta, Laboratorista del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

Antonio Prado Galán, Laboratorista del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

M. en C. María Magdalena Zamora Corona, Estudiante de posgrado del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

Dr. Juan Pablo Robles Álvarez, Investigador asociado del Laboratorio en Endocrinología Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM.

Jessica Ivonne Martínez Urbina, estudiante de la Licenciatura en Tecnología, Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla, UNAM.

Índice

1	Introducción	7
2	Antecedentes	9
2.1	Cáncer: Definición	9
2.2	Estadísticas del cáncer de mama	9
2.3	Estadísticas del cáncer de próstata	10
2.4	Línea celular MDA-MB-231 como herramienta para el estudio del cáncer de mama	11
2.5	Línea celular DU-145 como herramienta para el estudio del cáncer de próstata	12
2.6	Trombina	13
2.7	Receptores activados por proteasas	13
3	Pregunta de investigación.....	15
4	Hipótesis.....	15
5	Objetivos	16
5.1	General	16
5.2	Específicos	16
6	Metodología	17
6.1	Cultivo celular	17
6.2	Proliferación celular	17
6.3	Número celular	17
6.4	Invasión celular en soporte permeable tipo <i>transwell</i>	18
6.5	qPCR	18
7	Resultados	19
7.1	Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 no presentan diferencias significativas en su proliferación basal, pero si en respuesta a la trombina 19	
7.2	Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 presentan diferencias en su invasión basal y en respuesta a la trombina.....	23
7.3	Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 no presentan diferencias significativas en la expresión de PAR1 en condiciones basales ni en respuesta a la trombina	25
8	Discusión.....	26
9	Conclusiones	30
10	Bibliografía.....	31
11	Tabla de figuras.....	40

1 Introducción

El cáncer comprende un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación y la diseminación celular más allá de sus límites normales. El cáncer fue la segunda causa de muerte a nivel mundial en el 2021 (OMS, 2022), siendo el más común el cáncer de mama, seguido del cáncer de próstata y de pulmón (Siegel et al., 2022). En México, el cáncer representa la cuarta causa de muerte y, dentro del cáncer, el de mama ocupa el primer lugar de muerte en mujeres y el cáncer de colon y de próstata en hombres (INEGI, 2021).

La proliferación sostenida, así como la capacidad de invasión y metástasis de las células cancerosas se sustentan en procesos como la inestabilidad genómica, la inflamación, la inmunosupresión, la desregulación metabólica y la angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Diversas proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento y proteasas participan como promotores de dichas alteraciones (Sevenich & Joyce, 2014; van Hinsbergh et al., 2006). En particular, la proteasa trombina juega un papel importante promoviendo la proliferación, la invasión y la metástasis de las células cancerosas, así como la angiogénesis tumoral (Nierodzik & Karpatkin, 2006). La trombina; un metabolito primario dada su importancia para el mantenimiento de los procesos fisiológicos normales; participa de manera fisiológica en el control de la hemostasia del cuerpo a través de estimular la conversión de fibrinógeno a fibrina, determinante para la formación del coágulo.

La trombina participa de manera fisiológica en el control de la hemostasia a través de estimular la conversión de fibrinógeno a fibrina, determinante para la formación del coágulo. Sin embargo, la generación de trombina también tiene lugar en el microambiente tumoral, ya que las células cancerosas expresan el factor tisular de tromboplastina (o factor III) en su superficie, necesario para convertir a la protrombina circulante en trombina activa (Reddel et al., 2019). De hecho, los eventos de trombosis frecuentemente se asocian con tumores ocultos y la trombina generada puede favorecer la malignidad de dichos tumores (Nierodzik & Karpatkin, 2006).

Es el sitio donde la generación de trombina también tiene lugar ya que las células cancerosas expresan el factor tisular de tromboplastina (o factor III) en su superficie, necesario para convertir a la protrombina circulante en trombina activa (Reddel et al., 2019). De hecho, los eventos de trombosis frecuentemente se asocian con tumores que no han sido previamente diagnosticados y la trombina generada puede favorecer la malignidad de dichos tumores (Nierodzik & Karpatkin, 2006).

La trombina modifica la función celular a través de activar a una familia de cuatro receptores acoplados a proteínas G, activados por proteasas denominados PARs por sus siglas en inglés (“*Protease Activated Receptors*”) (Coughlin, 2000; Mackie et al., 2002). Particularmente en las células de cáncer, la trombina señala principalmente vía el PAR1 lo que promueve el crecimiento tumoral y la metástasis (Han et al., 2011) siendo un factor determinante para la progresión tumoral (Arakaki et al., 2018). Adicionalmente, la trombina puede activar a sus receptores en las células endoteliales para promover su proliferación y migración necesarias para la vascularización tumoral (Ossovsckaya & Bunnett, 2004; Tsopanoglou & Maragoudakis, 1999), contribuyendo también de esta manera al crecimiento y metástasis tumoral.

La agresividad y el pronóstico de los distintos tipos de cáncer es muy variable y multifactorial (Kou et al., 2020). A pesar de que la trombina es un factor determinante para la progresión tumoral y la metástasis, se desconoce si una respuesta diferencial de los distintos tipos de cáncer a la trombina serviría como marcador del comportamiento y progreso de la enfermedad. Por lo que resulta interesante, evaluar si dos líneas celulares que sirven como modelo para estudiar los dos tipos de cáncer más comunes (mama y próstata) presentan diferencias a la respuesta estimulante de la trombina sobre algunos de los procesos celulares más distintivos del cáncer, que son la proliferación e invasión celular.

2 Antecedentes

2.1 Cáncer: Definición

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolable de células y su diseminación hacia otras partes del cuerpo como resultado de una alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular. Su consecuencia es el crecimiento desmedido de una clona que destruye e invade los tejidos de su alrededor. Posteriormente se va a esparcir hacia sitios distantes en donde forman colonias nuevas, proceso conocido como metástasis (Granados, 2017).

Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales reciben su nombre de acuerdo con el órgano o tejido donde se produce el cáncer, o bien, al tipo celular que lo conforma. El tipo de cáncer más común es el carcinoma, que está conformado por células epiteliales y se subdivide según el tipo de célula epitelial que le dio origen, siendo el más común el adenocarcinoma, que se produce en las células epiteliales que secretan fluidos o moco. Ejemplos de adenocarcinoma son el cáncer de mama, de colon y de próstata, que actualmente, junto con el cáncer de pulmón, presentan las tasas de mortalidad más altas a nivel mundial (NCI, 2021).

2.2 Estadísticas del cáncer de mama

Se estima que a nivel mundial el cáncer de mama representa el 11.7% de todos los cánceres y ocupa el quinto lugar de muerte en mujeres a nivel mundial, siendo la tasa de mortalidad del 16% (Arnold et al., 2022). Mientras que en México, en 2020, el cáncer de mama fue la enfermedad más frecuente (15.3%) y la primera causa de muerte en mujeres, con una tasa de mortalidad del 10.6% (Medrano Guzmán & Martínez Sánchez, 2022).

Algunos de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del cáncer de mama son la menarca temprana y la menopausia tardía, los ciclos menstruales cortos, el consumo de una dieta hipercalórica y la obesidad, así como la administración de anticonceptivos orales (Granados, 2017). Todos estos factores están asociados con una probabilidad más alta de adquirir mutaciones durante los procesos de proliferación que son

inducidos tanto por sustancias exógenas como endógenas con actividad estrogénica (Cummings et al., 2005). En este tipo de cáncer la predisposición hereditaria es de entre el 5 y el 10%, siendo las mutaciones más importantes las de los genes *BRCA-1* y *BRCA-2*, que son responsables de hasta el 80% de los casos de cáncer de mama hereditario, estas mutaciones implican un riesgo del 60 al 85% de desarrollar cáncer de mama (Korde et al., 2004).

La metástasis del cáncer de mama es la responsable del 90% de la mortalidad de esta enfermedad, los principales sitios colonizados son el hueso, el cerebro, el hígado, el pulmón y los nódulos linfáticos distantes. Aún en estadios tempranos, cerca del 20 al 30% de las pacientes ya presentan metástasis (W. Chen et al., 2018).

2.3 Estadísticas del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte oncológica en hombres a nivel mundial, con una tasa de mortalidad del 10% sólo después del cáncer de pulmón (OMS, 2022). Sin embargo, en México, el cáncer de próstata es la primera causa de enfermedad y muerte masculina por tumores malignos, siendo la edad promedio en la que se diagnóstica 67 años y su tasa de mortalidad del 16% (IMSS, 2022).

Algunos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata son la edad, raza, la historia familiar, la alta ingesta de grasas animales, el alcoholismo, el tabaquismo, un alto índice de masa corporal y la baja actividad física (Giovannucci, 2001). El cáncer de próstata hereditario representa el 9% de los casos totales, teniendo la particularidad que cuando se tienen familiares en primer grado, el riesgo aumenta al doble de lo normal y entre 5 y 11 veces si hay dos o más familiares (Steinberg et al., 1990).

En cuanto a su proceso metastásico, es importante mencionar que la diseminación hemática se dirige principalmente a los nódulos linfáticos y a los huesos (Bratt, 2002). A diferencia del cáncer de mama, en estadios tempranos solamente del 5 al 7% de los pacientes presentan metástasis (NCI, 2021).

2.4 Línea celular MDA-MB-231 como herramienta para el estudio del cáncer de mama

La línea MDA-MB-231 es de tipo epitelial. Las células son poco diferenciadas y tienen forma de huso, especialmente cuando se encuentran a subconfluencia. Deriva de un adenocarcinoma mamario obtenido a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Tienen el subtipo triple negativo que se caracteriza por tener ausencia de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y del receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Subik et al., 2010).

Así mismo, la invasividad de estas células está mediada por la degradación proteolítica de la matriz extracelular. Las células MDA-MB-231 son invasivas *in vitro* y, cuando se implantan ortotópicamente, producen xenoinjertos que metastatizan espontáneamente en los ganglios linfáticos (Welsh, 2013). También tiene una morfología epitelial y crece con un tiempo de duplicación de 35 horas (Holliday & Speirs, 2011).

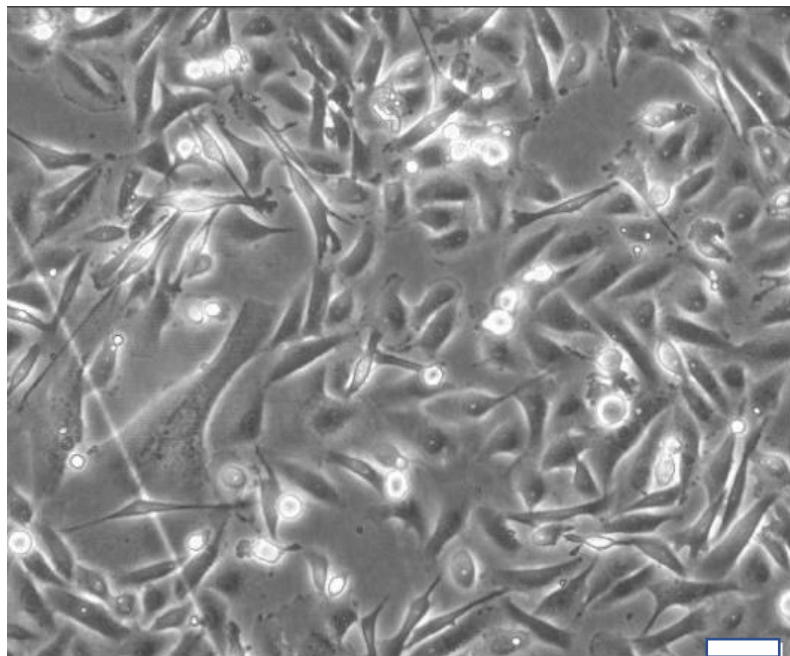


Figura 1. Línea celular MDA-MB-231 (escala 50 μm). Modificado de (*mda-mb-231-cell line profile*, 2023).

2.5 Línea celular DU-145 como herramienta para el estudio del cáncer de próstata

La línea celular DU-145 presentan una morfología epitelial, caracterizada por la presencia de uniones intracelulares, uniones de la matriz extracelular y una polaridad apical. Esta línea celular sido usada para investigación sobre el cáncer de próstata, fue aislada de una metástasis cerebral de un paciente con cáncer de próstata, este tipo de células no secretan antígeno prostático específico y son insensibles a los andrógenos. Tienen una morfología epitelial y un tiempo de replicación de 34 horas, su crecimiento en cultivo es como una monocapa adherente. Las células DU-145 tienen un potencial moderado de realizar metástasis principalmente al hueso (Mori et al., 2007; Stone et al., 1978).

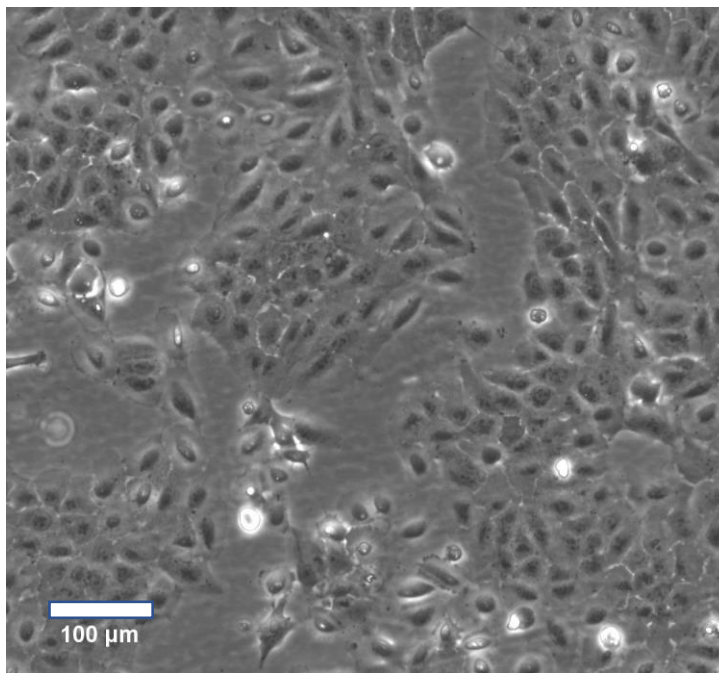


Figura 2. Línea celular DU-145 (escala 100 μm). Modificado de (CLS, 2023)

2.6 Trombina

La trombina es la principal proteasa efectora de la cascada de la coagulación, cuya función más conocida es la de cortar al fibrinógeno soluble circulante hacia monómeros fibrina insolubles, que se polimerizan y agregan para formar el coágulo sanguíneo (Coughlin, 1998). La producción de trombina durante la cascada de la coagulación implica una serie de conversiones de zimógenos que se activan cuando los factores de coagulación que circulan entran en contacto con el factor tisular de tromboplastina, el último paso de este proceso es la conversión proteolítica de la protrombina que se encuentra inactiva, hacia trombina (Coughlin, 2000).

El microambiente tumoral; definido como el ambiente celular presente en el tumor y que está constituido por diversos componentes celulares como las células dendríticas, los fibroblastos, los macrófagos, las células endoteliales, las células innatas linfoides, los linfocitos T, los linfocitos B y las células mieloides (Sanz et al., 2021). Así mismo el microambiente tumoral influye en la evolución tumoral mediante influir en el desarrollo de resistencia a terapia, eludir el sistema inmune y si metastatiza (F. Chen et al., 2015). Es el sitio donde la generación de trombina también tiene lugar ya que las células cancerosas expresan el factor tisular de tromboplastina (o factor III) en su superficie, que se requiere para convertir a la protrombina circulante en trombina (Reddel et al., 2019). De hecho, los eventos de trombosis se asocian con tumores ocultos y la trombina generada puede favorecer la malignidad de dichos tumores (Nierodzik & Karpatkin, 2006).

Además de su efecto sobre la coagulación, la trombina también tiene funciones tipo “hormona” sobre distintos tipos celulares a través de activar a una familia de cuatro receptores acoplados a proteínas G, activados por proteasas denominados PARs por sus siglas en inglés (Coughlin, 2000; Mackie et al., 2002).

2.7 Receptores activados por proteasas

Se han descrito cuatro receptores activados por proteasas (PARs) en el humano presentes en distintos tipos celulares: el PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4. De éstos, el PAR1, PAR3, y PAR4

pueden ser activados por trombina y el PAR2 es activado por tripsina (Coughlin, 2000). El PAR1 es el prototipo de esta familia de receptores y se activa cuando la trombina corta su dominio amino terminal extracelular (-NH₂) en un sitio específico (Vu et al., 1991). Este corte permite que la región N-terminal actúe como ligando anclado (*“tethered ligand”*), pues permanece unido al receptor, uniéndose intramolecularmente al PAR1 y desencadenando su señalización (Coughlin, 2000).

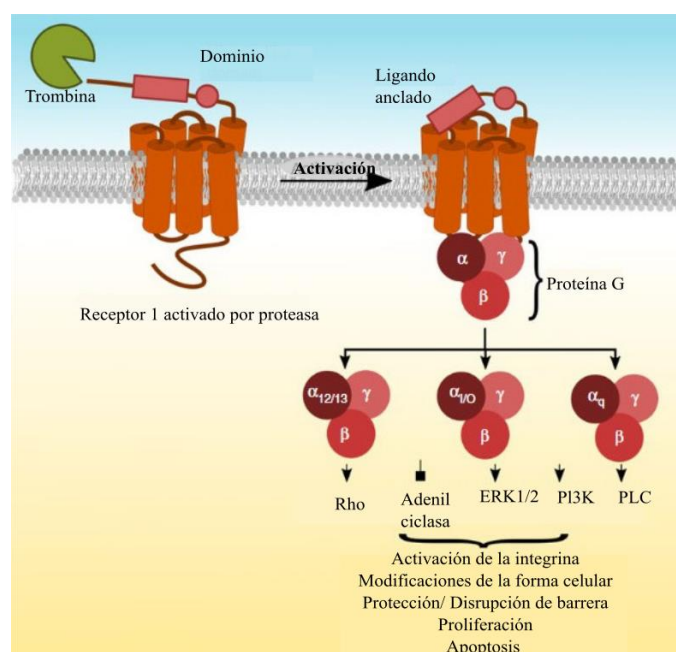


Figura 3. Activación de receptores activados por proteasa. Modificado de (Posma et al., 2016).

Los PARs transducen la señal mediante las proteínas G heterotriméricas que comprenden una subunidad G α y un dímero G $\beta\gamma$ asociadas al dominio intracelular de estos receptores. La activación de los PARs induce la disociación de estas subunidades y la señalización clásica por las proteínas G $\alpha_{12/13}$, G α_{q11} , G α_i y G $\beta\gamma$ capaces de activar múltiples vías: la vía de Rho-Rac1, la de la PLC β que activa la vía de IP₃-Ca²⁺ y la vía del DAG-PKC-Raf1-MAPK, y la vía de Akt (Coughlin, 2000; Ossovskaya & Bunnett, 2004). La señalización a través de estos receptores induce la proliferación y la invasión de neuronas, células endoteliales y epiteliales y cambios en la forma celular de plaquetas para la

conformación del coágulo (Ossovskaya & Bunnett, 2004). En particular, la activación de los PARs en células cancerosas (Arakaki et al., 2018) y en células endoteliales (Tsopanoglou & Maragoudakis, 1999) promueve su proliferación y migración necesaria para la progresión y la vascularización tumoral (Adams et al., 2011; Ossovskaya & Bunnett, 2004). La influencia de los PARs en la patología de distintos padecimientos, como las enfermedades cardiovasculares (Coughlin, 2000), las enfermedades inflamatorias (Russell & McDougall, 2009), las retinopatías (Murugesan et al., 2015) y el cáncer (Han et al., 2011; Wojtukiewicz et al., 2015), los convierte en un blanco terapéutico altamente promisorio (Hamilton & Trejo, 2017).

3 Pregunta de investigación

¿Las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145) presentan diferencias en el efecto estimulante de la proliferación e invasión celular de la trombina?

4 Hipótesis

Las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) tienen una mayor tasa de proliferación y son más invasivas que las células de cáncer de próstata (DU-145), además de que presentan una mayor respuesta a la estimulación de dichos procesos celulares con trombina.

5 Objetivos

5.1 General

Analizar si las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145) presentan diferencias en la tasa de proliferación e invasión basales y en el efecto estimulante de la trombina.

5.2 Específicos

- 1.1.1. Establecer el protocolo para el cultivo de las líneas celulares humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145).
- 1.1.2. Evaluar la proliferación (síntesis de DNA) basal y en respuesta a la trombina de las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145).
- 1.1.3. Evaluar la tasa de replicación basal y en respuesta a la trombina de las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145).
- 1.1.4. Evaluar la invasión basal y en respuesta a la trombina de las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145).
- 1.1.5. Evaluar mediante qPCR la expresión del PAR1 bajo condiciones basales y por efecto de la trombina en las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (DU-145).

6 Metodología

6.1 Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, ATCC HTB-26) y de próstata (DU-145, ATCC HTB-81) se cultivaron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.2 Proliferación celular

Las células MDA-MB-231 y DU-145 se sembraron a una confluencia de 55,000 células cm⁻² en placas de 96 pozos en DMEM al 10% de SFB. Después de 24 horas, las células se incubaron con medio estacionario (0.5% SFB) por 24 horas. Enseguida se agregaron 20 nM de trombina humana purificada de plasma (Sigma-Aldrich) en conjunto con 10 μM del análogo de timidina 5-etinil-2'desoxiuridina (EdU, Sigma-Aldrich), cuya incorporación al DNA sirvió como marcador de la proliferación celular. A las 24 horas, se detectó la incorporación del EdU mediante una reacción de cicloadición tipo *click* catalizada por cobre (Robles et al., 2018; Salic & Mitchison, 2008), la cual añade una azida fluorescente al EdU incorporado al DNA. Brevemente, la reacción de *click* consistió en 100 mM Tris, 0.5 mM de CuSO₄, 50 mM de ácido ascórbico y 30 μM de Azida Flúor 545 (Sigma-Aldrich). Finalmente, las células se cotiñeron con Hoechst 33342 y se determinó el porcentaje de células EdU-positivas del número total de células. Todas las imágenes se cuantificaron utilizando el software CellProfiler (Carpenter et al., 2006).

6.3 Número celular

Se sembraron 14,000 células cm⁻² (10% confluencia) en una placa de cultivo de 12 pozos en DMEM con 10% de SFB y 24 h después se estacionaron (0.5% SFB). A las 24 h se agregó o no la trombina (20 nM) en medio de estación, y cada 24 h por los siguientes 5 días se despegaron y contaron las células. El medio de estación (0.5% SFB) y los tratamientos se refrescaron cada 24 h durante la duración del experimento. Cada 24 horas se despegaron y

contaron las células en una cámara de Neubauer. Las imágenes fueron cuantificadas mediante el software CellProfiler (Carpenter et al., 2006).

6.4 Invasión celular en soporte permeable tipo *transwell*

La invasión celular fue evaluada mediante un ensayo de invasión de matriz (Justus et al., 2014). Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 fueron sembradas a una confluencia del 70% (90,000 células cm^{-2}) en la cámara superior de un inserto tipo *transwell*, teniendo como características un diámetro de 6.6 mm y un poro de 8 μm , sobre una capa de Matrigel a una concentración de 0.38 mg ml^{-1} . Una hora después de sembrar las células, se agregó la trombina (20 nM) en la cámara superior del *transwell* en medio de estación (0.5% SFB) y las células se incubaron por 24 h. Como quimioatrayente en la parte inferior del *transwell* se utilizó medio condicionado de células 3T3-L1 tipo fibroblasto. Finalmente, las células que invadieron la cara abluminal del *transwell* se tiñeron con 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Chazotte, 2011) y se fotomicrografiaron bajo un microscopio Olympus IX51.

6.5 qPCR

Las células MDA-MB-231 o DU-145 se sembraron en una placa de cultivo de 6 pozos al 50% de confluencia (65,000 células cm^{-2}) en medio completo (10% SFB). Al día siguiente las células se estacionaron (0.5% SFB) por 24 h y se agregó al medio de estación 20 nM de trombina por 4 h. Posteriormente, se extrajo el RNA utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). El RNA se retrotranscribió con el kit “high-capacity complementary DNA (cDNA) reverse transcription” (Applied Biosystems), y se cuantificó utilizando el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en una reacción final de 10 μl conteniendo 20 ng de cDNA, y 0.5 μM de cada uno de los siguientes oligos humanos: *PARI*: *forward* (5'-GCCTTCTCTGCTGTCTTCTTTT-3') y *reverse* (5'-ACAGAGGAGGTAGGCAAAGTAG-3'); y *GAPDH* *forward* (5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3') y *reverse* (5'-TGACGGTGCCATGGAATTTG-3'). Las condiciones de amplificación fueron de 10 segundos a 95°C, 30° segundos a la temperatura de alineamiento de los oligos (56°C), y 30 segundos a 72°C por 40 ciclos. Los

niveles de expresión de mRNA se calcularon por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), normalizado al transcrito del *GAPDH* humano.

7 Resultados

7.1 Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 no presentan diferencias significativas en su proliferación basal, pero si en respuesta a la trombina

Para evaluar si las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145 presentan diferencias en su proliferación basal y estimulada con trombina, se evaluó la síntesis de DNA de ambas líneas celulares mediante la detección con un azida fluorescente de la incorporación al DNA de un análogo de la timidina en las células proliferantes. Contrario a nuestra hipótesis, las células MDA-MB-231 no presentaron diferencias significativas en su proliferación basal con respecto a las células DU-145 (Figura 4). De manera consistente a observaciones previas, la trombina estimuló casi al doble la proliferación basal de las células MDA-MB-231 y DU-145, sin embargo, a las 24 horas de tratamiento, la proliferación en respuesta a la trombina no fue diferente entre ambas líneas celulares (Figura 4).

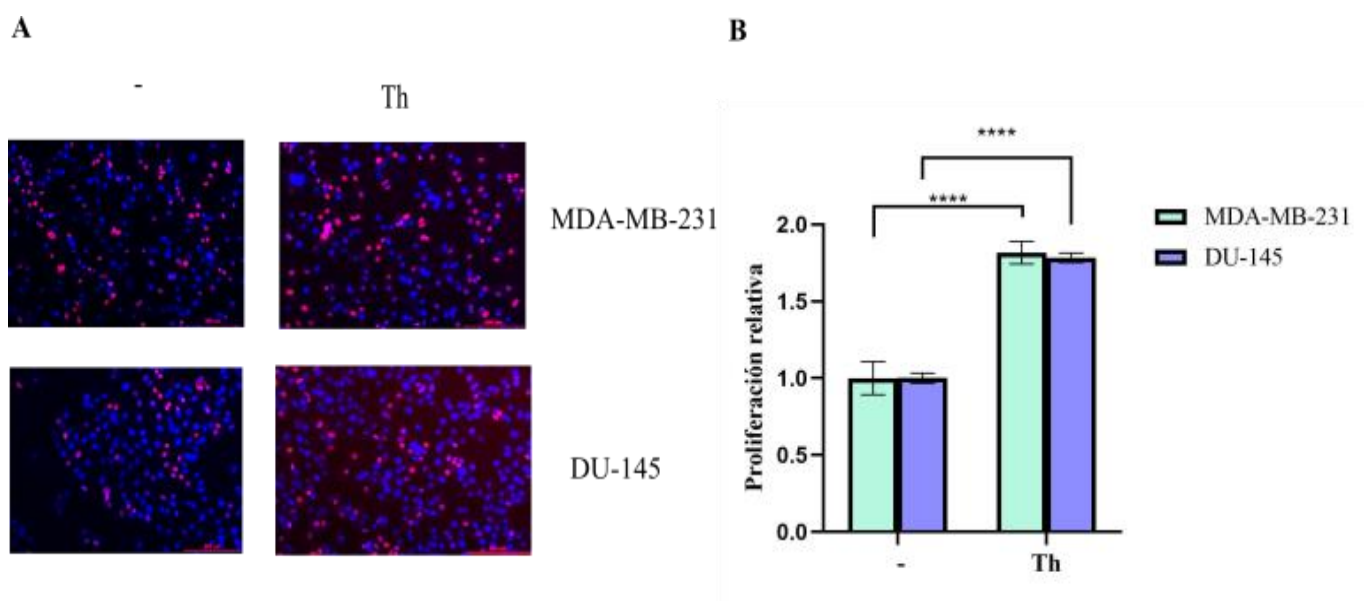
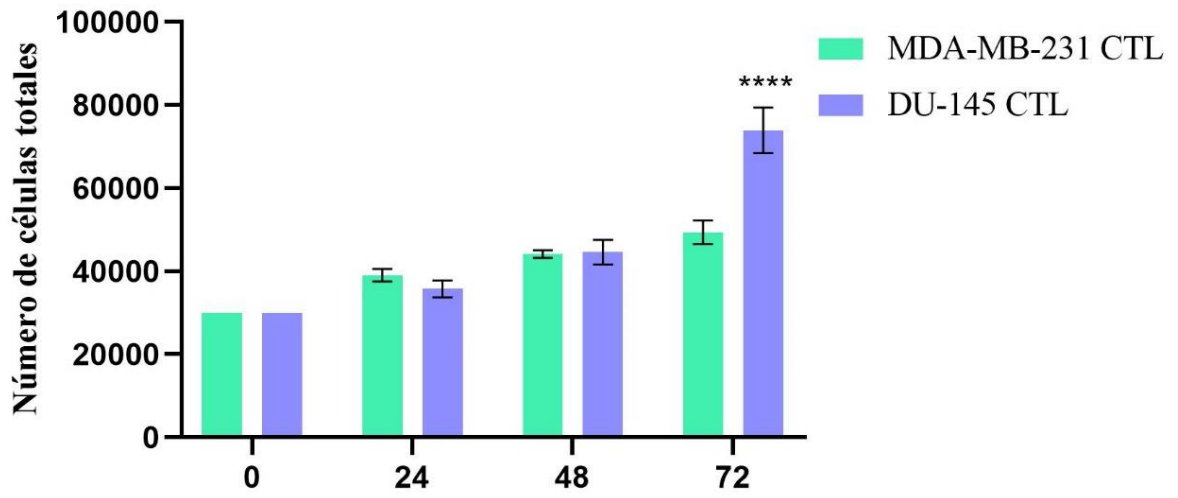


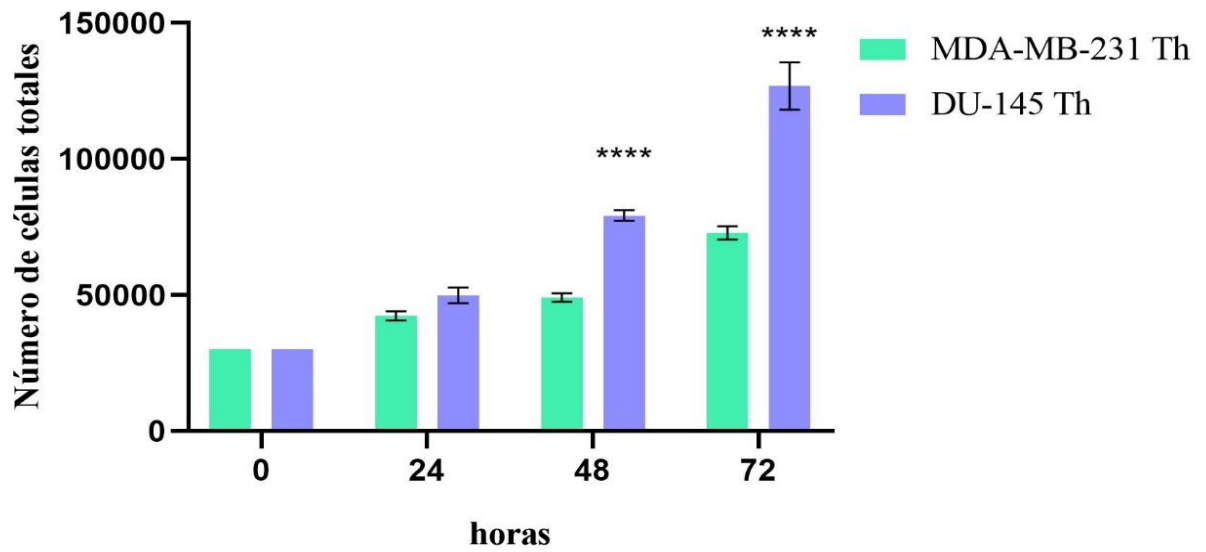
Figura 4. A. Micrografías representativas de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y cáncer de próstata DU-145. Se indican las células proliferantes (rojo) y las células totales (azul). Las células fueron tratadas por 24 h con 20 nM de trombina (Th). **B.** Proliferación relativa de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145. Los valores son relativos a la proliferación basal de las células no estimuladas (-). Los valores son las medias \pm error estándar, $n=3$, **** $p<0.0001$ (ANOVA de dos vías, corrección de Šídák).

Debido a que no se observaron diferencias significativas en la síntesis de DNA (proliferación) entre las células MDA-MB-231 y DU-145 durante las primeras 24 horas, se optó por cuantificar directamente el número de células en tiempos más prolongados en presencia y ausencia de 20 nM de trombina, la dosis fue determinada mediante la realización de una curva dosis respuesta, donde 20nM fue la concentración mínima a la que se obtuvo un efecto máximo. No obstante hay algunos artículos que utilizan 100 nM y 10nM respectivamente para ensayos de invasión con células de cancerígenas (Booden et al., 2004; Henrikson et al., 1999). La dos En condiciones basales, de las 0 a las 48 h, el número de células cada 24 horas (la tasa de replicación) de ambas líneas celulares no presentó diferencias, pero a las 72 horas, contrario a lo especulado, las células de cáncer de próstata DU-145 presentaron una mayor tasa de replicación respecto a las células MDA-MB-231 (Figura 5A). De igual manera, cuando se estimuló a las células con trombina, las células DU-145 presentaron una tasa de replicación significativamente mayor que la de las células MDA-MB-231 a partir de las 48 horas (Figura 5B). Consistentemente con la falta de diferencias significativas en la síntesis de DNA cuantificado a las 24 h postratamiento (Figura 4), la cuantificación del número de células no fue diferente entre ambas líneas celulares. Sin embargo, la proliferación basal de las células de cáncer de próstata DU-145 fue mayor que la de las MDA-MB-231 a las 72 horas y el efecto proliferativo de la trombina también fue mayor en las DU-145 tanto a las 48 como a las 72 horas de incubación (Figura 5)

A



B



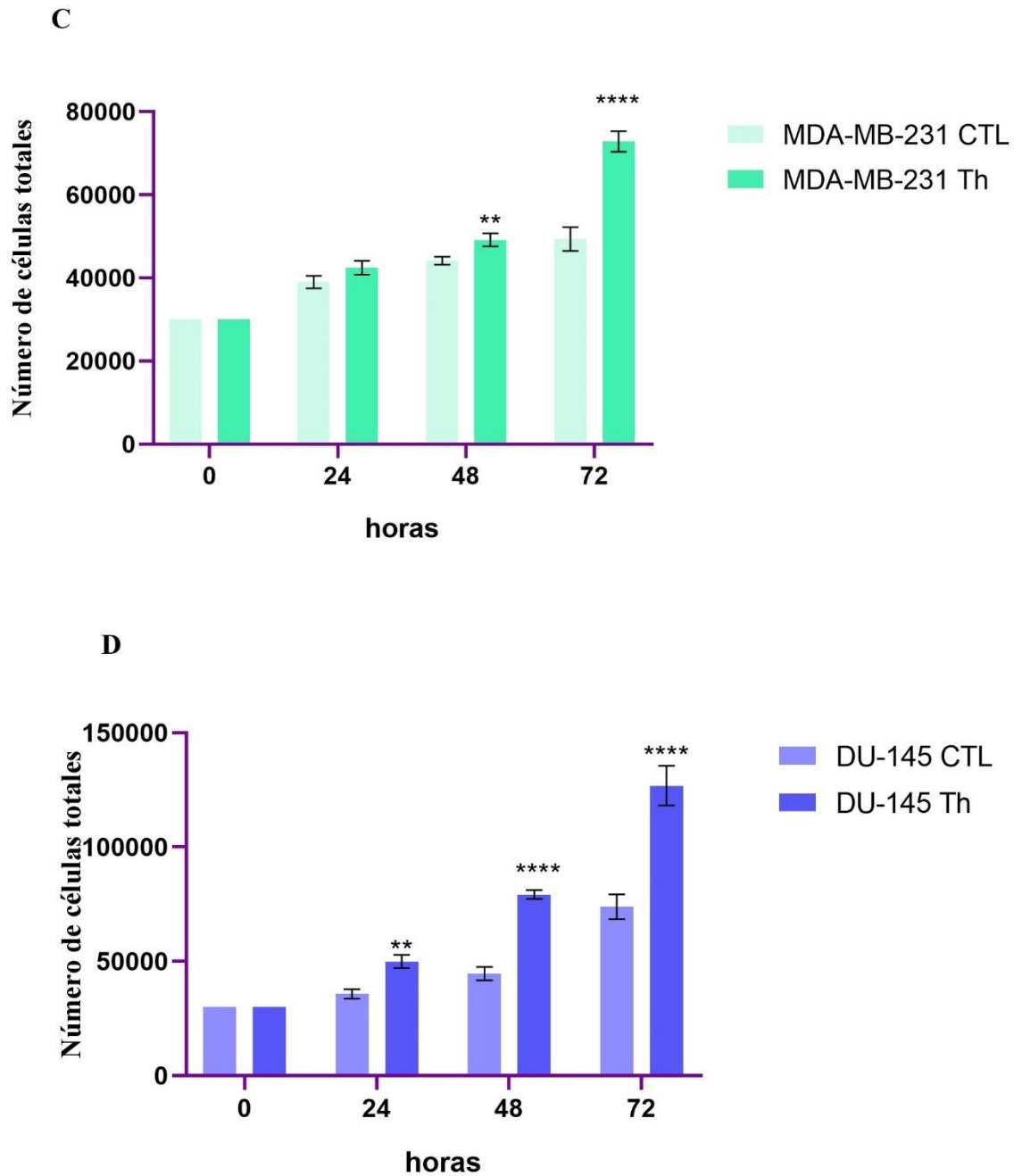


Figura 5. A. Proliferación en condiciones basales de las líneas celulares MDA-MB-231 y DU-145 a las 24, 48 y 72 h. Se indica el número de células totales presente en el pozo. **B.** Proliferación en respuesta al tratamiento con 20 nM de trombina (Th) a las 24, 48 y 72 h postratamiento. **C.** Proliferación de la línea celular MDA-MB-231 en condiciones basales y en respuesta al tratamiento con 20 nM de trombina (Th) a las 24, 48 y 72 h postratamiento. **D.** Proliferación de la línea celular DU-145 en condiciones basales y en respuesta al

tratamiento con 20 nM de trombina (Th) a las 24, 48 y 72 h postratamiento. Los valores son las medias \pm error estándar, $n=3$, **** $p<0.0001$ vs la tasa de replicación de las MDA-MB-231. (ANOVA de dos vías, corrección de Šidák).

7.2 Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 presentan diferencias en su invasión basal y en respuesta a la trombina

La característica que define a los tumores malignos es la capacidad que tienen para producir metástasis. Dentro de los primeros pasos que se requieren para que haya metástasis se encuentra la invasión local de la matriz extracelular por las células tumorales para alcanzar los vasos sanguíneos (Román Curto, 1999).

Para evaluar si las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 presentan diferencias en su invasividad basal y en respuesta a trombina, utilizamos soportes permeables tipo *transwell*, donde se mide la capacidad de las células tumorales de degradar y atravesar una matriz de Matrigel (Justus et al., 2014).

En condiciones basales, la invasión a través de la matriz de Matrigel de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 fue significativamente mayor que la de las células de cáncer de próstata DU-145 (Figura 6). Consistentemente a observaciones previas, la trombina estimuló significativamente la invasión de las células MDA-MB-231 y DU-145, 1.5 y 2.5 veces respectivamente (Figura 6). Finalmente, y consistente a lo observado sobre la proliferación celular, cuando las células fueron estimuladas con trombina, las células DU-145 mostraron una invasión significativamente mayor a la de las células MDA-MB-231 (Figura 6).

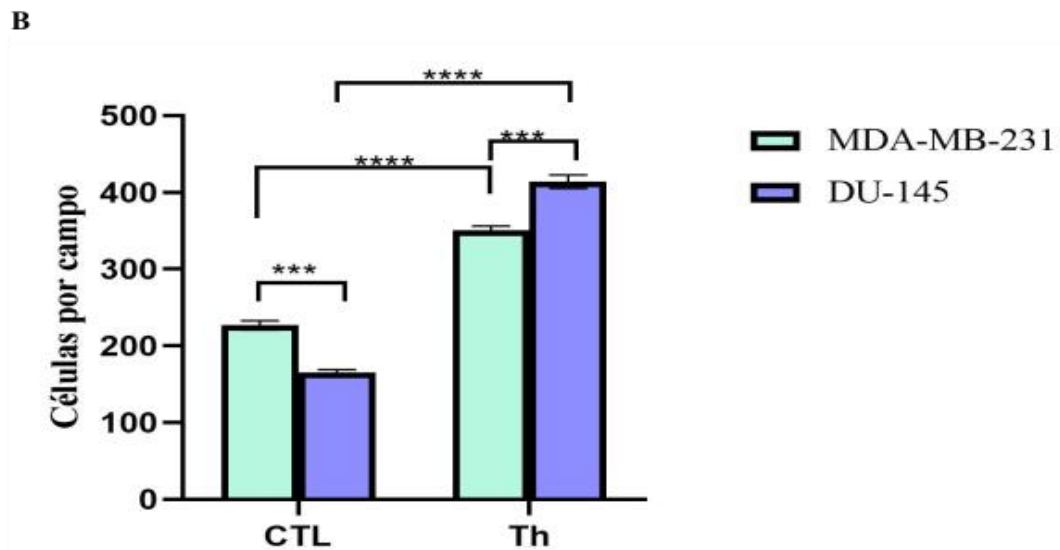
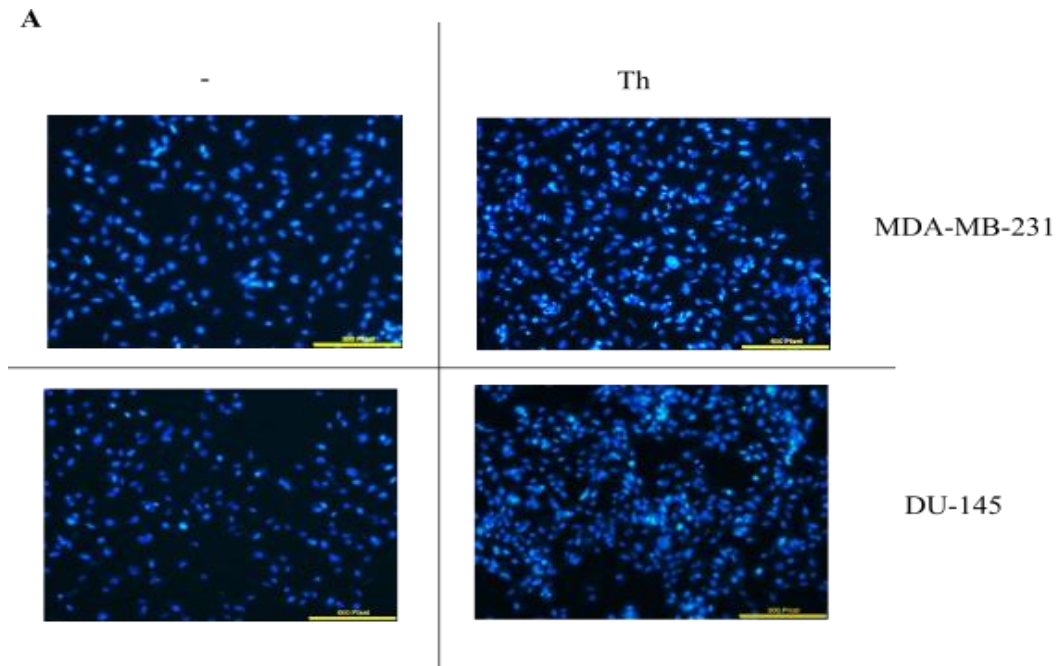


Figura 6. **A.** Micrografías representativas de las células MDA-MB-231 y DU-145 teñidas con Hoechst que invadieron la cara abluminal del inserto tipo *transwell* después de 24 horas de tratamiento en presencia o ausencia de 20 nM de trombina (Th). **B.** Número de células MDA-MB-231 y DU-145 por campo que invadieron la cara abluminal del transwell a través de degradar la matriz de Matrigel. Los valores son las medias \pm error estándar, $n=3$, **** $p < 0.0001$ (ANOVA de dos vías, corrección de Šidák).

7.3 Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 no presentan diferencias significativas en la expresión de PAR1 en condiciones basales ni en respuesta a la trombina

En las células de cáncer, la trombina ejerce sus efectos a través de señalizar sobre todo vía el PAR1 para promover el crecimiento tumoral y la metástasis (Na Han, et. al., 2011). Para entender si las diferencias observadas en respuesta a la trombina entre las células MDA-MB-231 y DU-145 en la tasa de replicación y en la invasión, se deben a los niveles de expresión del receptor de la trombina, PAR1, evaluamos su nivel RNA mensajero mediante la retrotranscripción y reacción de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión del PAR1 entre ambas líneas celulares, ni en condiciones basales ni cuando se estimulan con trombina durante las cuatro horas de tratamiento (Figura 7). Por lo que son necesarios más estudios para entender el mecanismo que subyace las diferencias observadas en respuesta a la trombina entre ambas líneas celulares.

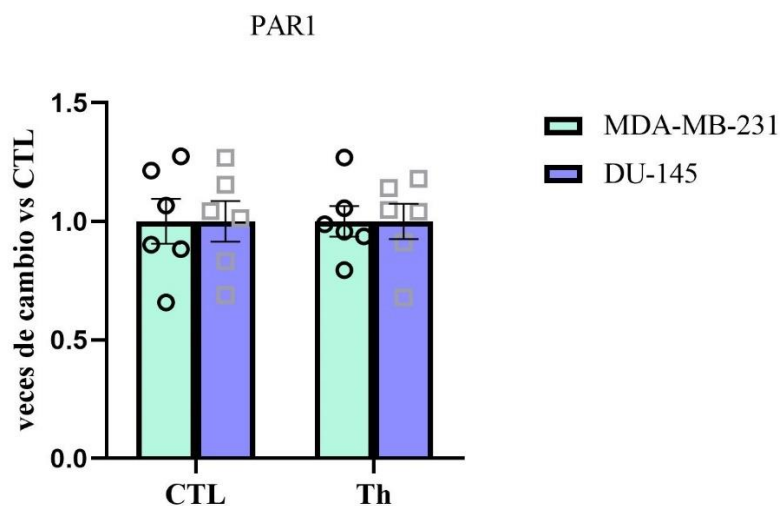


Figura 7. Expresión del mRNA del PAR1 en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 luego de 4 horas de tratamiento en ausencia o presencia de 20 nM de trombina (Th). Los valores son las medias \pm error estándar, n=6. No se observaron diferencias significativas (ANOVA de dos vías, corrección de Šidák).

8 Discusión

El cáncer de mama y el de próstata constituyen el primer y segundo tipos de cáncer más comunes en mujeres y en hombres, respectivamente (Siegel et al., 2022). Estos tipos de cáncer presentan varias similitudes, por ejemplo, ambos se originan en órganos reproductivos y se caracterizan por ser tumores epiteliales dependientes de hormonas y, por lo tanto, usualmente responden a terapias endócrinas (Risbridger et al., 2010). Para los dos tipos de cáncer existe un período de latencia de varios años entre la detección del tumor primario y el desarrollo de metástasis que, en ambos casos, el sitio más común es el hueso (Haider, 2016). Una diferencia importante entre el cáncer de mama y el cáncer de próstata es epidemiológica, pues además de que la incidencia del cáncer de mama es casi el doble que la del de próstata, también la mortalidad del cáncer de mama es 50% mayor (OMS, 2022).

Nosotros especulamos que, consistentemente por un fenotipo más agresivo, la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 presentaría una mayor proliferación e invasividad que la de cáncer de próstata. No obstante, nuestros resultados indican que la proliferación basal evaluada por la síntesis de DNA y número celular en un período de 24 horas no presentó diferencias entre ambas líneas celulares. Sin embargo, la tasa de proliferación basal evaluada a través del número celular por un período de 72 horas sí fue significativamente mayor para las células DU-145 que para las MDA-MB-231. Por el contrario, al evaluar la invasión basal de ambos tipos celulares, encontramos que las células más invasivas fueron las MDA-MB-231. Sabemos que el estudio *in vitro* no puede ser extrapolado a una condición *in vivo* y particularmente al padecimiento en humanos, esto debido a algunas desventajas que resultan de trabajar con cultivos celulares como la falta de capacidad para mimetizar la estructura natural de la masa tumoral, la privación de las interacciones entre células y con el ambiente extracelular, lo que resulta en que no haya una similitud al microambiente *in vivo*. También hay un cambio de la morfología y la forma de las divisiones, así como pérdida de la diversidad fenotípica y la polaridad. Por último, también se presentan cambios en la expresión génica y en la topología y bioquímica de las células (Kapałczyńska et al., 2018).

Es posible especular que la diferencia observada sobre la invasión de las células MDA-MB-231 podría contribuir a explicar el que aún en estadios tempranos, cerca del 20 al 30 % de las pacientes con cáncer de mama ya presentan metástasis, en tanto que la metástasis en el cáncer de próstata se observa en estadios más tardíos (W. Chen et al., 2018). En cuanto a la mayor tasa de replicación que presentaron las células DU-145, es difícil hacer una asociación con la tasa de crecimiento tumoral de ambas enfermedades, puesto que normalmente el cáncer de próstata es detectado de manera más tardía que el cáncer de mama, debido entre otros aspectos, a que la exploración de los pacientes requiere ser realizado por un especialista (Haider, 2016).

Enseguida evaluamos si las células MDA-MB-231 y DU-145 presentan una respuesta diferente en su proliferación e invasión en respuesta a la trombina. La trombina desempeña un papel en la protección y promoción de tumores (D. Green & Karpatkin, 2010; Wojtukiewicz et al., 2016), también parece ser que la trombina puede alterar la expresión génica de las células tumorales para promover la oncogénesis (D. L. Green & Karpatkin, 2009). La trombina también promueve la progresión y metástasis del cáncer mediante las plaquetas (van Es et al., 2014) debido a que activa las plaquetas y promueve sus interacciones con las células tumorales, las plaquetas a su vez facilitan la tumorigénesis mediante la secreción de factores que puedan promover la proliferación de células tumorales, factores proangiogénicos y cambios en la expresión celular (Buergy et al., 2012; Wang et al., 2018).

Finalmente, la trombina promueve la proliferación, invasión y metástasis tumoral, mediante la activación de los PARs. Específicamente, en las células MDA-MB-231 y DU-145, la trombina actúa a través del PAR1 (Wojtukiewicz et al., 2015). Nuestros hallazgos indican que la trombina estimula ~2 veces la proliferación de ambos tipos celulares, resultado que confirma lo previamente reportado (Vianello et al., 2016). A las 24 horas de exposición a la trombina, la proliferación celular evaluada tanto mediante la síntesis de DNA como por el número celular no mostró diferencias entre las células MDA-MB-231 y DU-145. Sin embargo, las células DU-145 tuvieron una tasa de replicación significativamente mayor que la de las células MDA-MB-231 cuando se estimularon con trombina por tiempos más prolongados (48 y 72 horas). Estos resultados sugieren, que, ante la generación de trombina

en el microambiente tumoral (Reddel et al., 2019), las células de cáncer de próstata podrían replicarse más rápidamente. Sin embargo, hacen falta más estudios para conocer si esto ocurre *in vivo*.

En cuanto a su invasividad y, a diferencia de lo que se observó en condiciones basales, el número de células DU-145 que invadieron la matriz de Matrigel, fue significativamente mayor que el de las células MDA-MB-231. Sin embargo, de manera consistente con la proliferación, la trombina estimuló al doble la invasión basal de ambos tipos celulares tal como se ha reportado previamente (Ohshiro et al., 2012). Esta discrepancia entre la invasión basal y la invasión estimulada por trombina sugiere que las células de cáncer de mama, por si mismas muy invasivas, son poco responsivas a trombina, en tanto que las células de cáncer de próstata, menos invasivas, son mas susceptibles a la acción de la trombina. Por lo tanto, aunado con los resultados de proliferación, es posible especular que la trombina es un factor promotor mas importante para el cáncer de próstata que para el cáncer de mama.

Finalmente, intentamos explorar un posible mecanismo capaz de explicar las diferencias observadas, a través de evaluar el nivel de expresión del receptor PAR1 de la trombina en ambos tipos celulares. Nuestros resultados indicaron que no hay diferencias significativas en la expresión de este receptor ni en condiciones basales ni bajo la estimulación con trombina. Esto podría deberse a que cuando los PARs se activan y señalizan, son internalizados, siendo unos pocos degradados y la gran mayoría reciclados mediante tráfico endosomal (Heuberger & Schuepbach, 2019), creando un reservorio interno de PARs listos para reponer su número en la membrana celular (Grimsey et al., 2016) sin necesidad de síntesis *de novo*. De tal manera que el hecho de que exista un mecanismo de reciclaje de PARs, podría explicar por qué no es necesaria la síntesis de nuevos PARs y por qué los niveles de expresión del PAR1 no cambian en respuesta a la trombina.

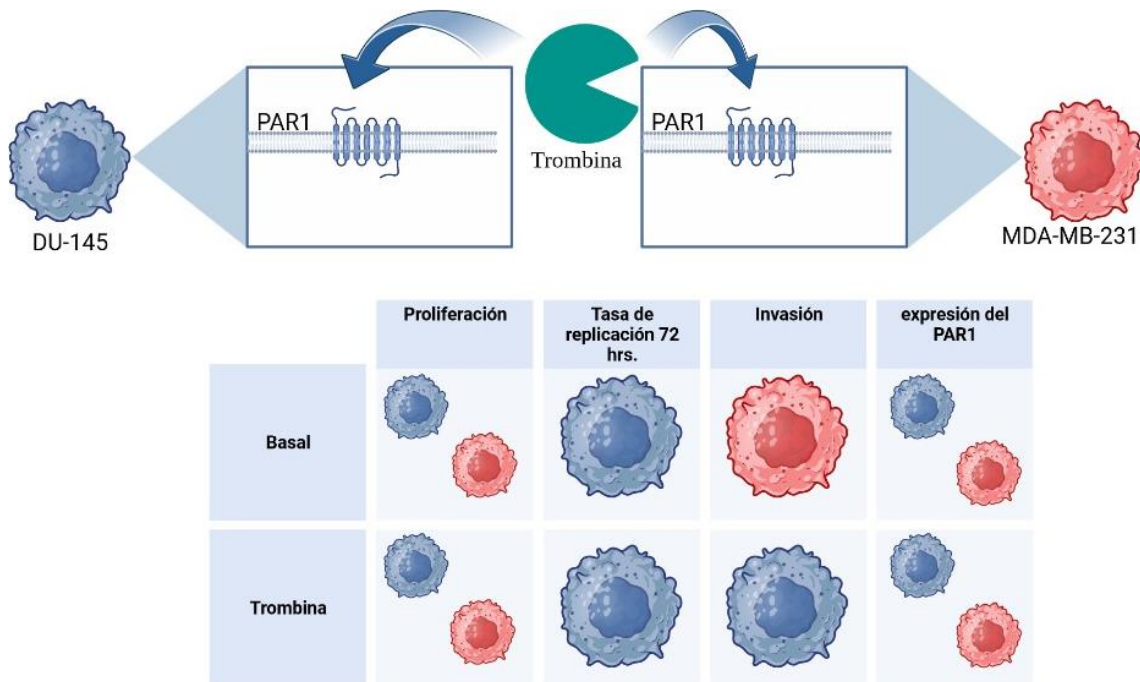


Figura 8. Resumen de resultados obtenidos. La trombina activa a su receptor (PAR1) en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (rosa) y de próstata DU-145 (azul) para estimular su proliferación, tasa de replicación e invasión. Se indica en la tabla el tipo celular que tuvo la mayor respuesta en cada uno de los procesos celulares evaluados de manera basal o estimulados por trombina. Cuando no hubo diferencia significativa entre las dos líneas celulares se indica con la representación de ambas líneas celulares.

En conjunto, nuestros resultados muestran que el fenotipo más agresivo del cáncer de mama con respecto al de próstata no se refleja en el modelo *in vitro* de las líneas celulares respectivas, esto debido a que la línea celular MDA-MB-231 parece ser menos responsiva a la trombina en comparación con las células DU-145, así mismo se observan diferencias importantes entre ambos tipos celulares de cáncer donde las células DU-145 presentaron una proliferación e invasividad en respuesta a trombina mayor que la de las células MDA-MB-231. No obstante, la invasión basal de las células MDA-MB-231 fue mayor que la de las células DU-145, lo cual es consistente con el fenotipo más agresivo y metastásico de este tipo de cáncer. Restan por realizarse más estudios que permitan superar las limitaciones inherentes de los modelos *in vitro* utilizados en esta tesis, a fin de poder concluir si una

respuesta diferencial de los distintos tipos de cáncer a la trombina serviría como marcador del comportamiento y progresión de la enfermedad. A este respecto, estudios *in vivo* sobre la generación y niveles de trombina en ambos tipos de cáncer *in situ* sería de gran importancia para sustentar esta hipótesis.

9 Conclusiones

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y de próstata DU-145 presentaron diferencias significativas en los procesos celulares de proliferación e invasión, tanto basales como en respuesta a la estimulación con trombina. Este es el primer estudio que compara sistemáticamente la respuesta de estas dos líneas celulares a la trombina. Resta por evaluar si estas diferencias observadas se replican en modelos *in vivo*, así como el mecanismo de acción que subyace esta respuesta diferencial.

10 Bibliografía

- Adams, M. N., Ramachandran, R., Yau, M.-K., Suen, J. Y., Fairlie, D. P., Hollenberg, M. D., & Hooper, J. D. (2011). Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *130*(3), 248-282. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.003>
- Arakaki, A. K. S., Pan, W.-A., Lin, H., & Trejo, J. (2018). The α -arrestin ARRDC3 suppresses breast carcinoma invasion by regulating G protein-coupled receptor lysosomal sorting and signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(9), 3350-3362. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001516>
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast: Official Journal of the European Society of Mastology*, *66*, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Booden, M. A., Eckert, L. B., Der, C. J., & Trejo, J. (2004). Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(5), 1990-1999. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.5.1990-1999.2004>
- Bratt, O. (2002). *Hereditary prostate cancer: Clinical aspects*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12187189/>
- Buergy, D., Wenz, F., Groden, C., & Brockmann, M. A. (2012). Tumor-platelet interaction in solid tumors. *International Journal of Cancer*, *130*(12), 2747-2760. <https://doi.org/10.1002/ijc.27441>

- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., & Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, 7(10), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5557. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., & Sun, Y. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: Challenges and opportunities. *BMC Medicine*, 13, 45. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0278-7>
- Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., & Liu, X. (2018). Organotropism: New insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *Npj Precision Oncology*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>
- CLS. (2023). *DU-145 | Cell Lines*. CLS Cell Lines Service GmbH. <https://cls.shop/DU-145/300168>
- Coughlin, S. R. (1998). Sol Sherry lecture in thrombosis: How thrombin «talks» to cells: molecular mechanisms and roles in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(4), 514-518. <https://doi.org/10.1161/01.atv.18.4.514>
- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407(6801), 258-264. <https://doi.org/10.1038/35025229>
- Cummings, S. R., Lee, J. S., Lui, L.-Y., Stone, K., Ljung, B. M., & Cauleys, J. A. (2005). Sex hormones, risk factors, and risk of estrogen receptor-positive breast cancer in older women: A long-term prospective study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research*,

- Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 14(5), 1047-1051.*
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0375>
- Giovannucci, E. (2001). Medical history and etiology of prostate cancer. *Epidemiologic Reviews, 23*(1), 159-162. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a000783>
- Granados, M. (2017). *Manual de Oncología* (6.^a ed.). McGraw Hill Medical.
- Green, D., & Karpatkin, S. (2010). Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 9*(4), 656-661. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10729>
- Green, D. L., & Karpatkin, S. (2009). Effect of cancer on platelets. *Cancer Treatment and Research, 148*, 17-30. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9_2
- Grimsey, N. J., Coronel, L. J., Cordova, I. C., & Trejo, J. (2016). Recycling and Endosomal Sorting of Protease-activated Receptor-1 Is Distinctly Regulated by Rab11A and Rab11B Proteins. *The Journal of Biological Chemistry, 291*(5), 2223-2236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702993>
- Haider, M. (2016). *Breast and Prostate Cancers: A Comparison of Two Endocrinologic Malignancies.*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128000779000190>
- Hamilton, J. R., & Trejo, J. (2017). Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 57*(1), 349-373. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-140016>
- Han, N., Jin, K., He, K., Cao, J., & Teng, L. (2011). Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncology Letters, 2*(4), 599-608. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.291>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell, 100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Henrikson, K. P., Salazar, S. L., Fenton, J. W., & Pentecost, B. T. (1999). Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *British Journal of Cancer*, *79*(3-4), 401-406. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690063>
- Heuberger, D. M., & Schuepbach, R. A. (2019). Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis Journal*, *17*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12959-019-0194-8>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research: BCR*, *13*(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- IMSS. (2022). *Cáncer de próstata*. <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>
- INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER*. *105*(21).
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *88*, 51046. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, *14*(4), 910-919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Korde, L. A., Calzone, K. A., & Zujewski, J. (2004). Assessing breast cancer risk. *Postgraduate Medicine*, *116*(4), 6-34. <https://doi.org/10.3810/pgm.2004.10.1595>

- Kou, K., Cameron, J., Aitken, J. F., Youl, P., Turrell, G., Chambers, S., Dunn, J., Pyke, C., & Baade, P. D. (2020). Factors associated with being diagnosed with high severity of breast cancer: A population-based study in Queensland, Australia. *Breast Cancer Research and Treatment*, *184*(3), 937-950. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05905-x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mackie, E. J., Pagel, C. N., Smith, R., de Niese, M. R., Song, S. J., & Pike, R. N. (2002). Protease-activated receptors: A means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals. *IUBMB Life*, *53*(6), 277-281. <https://doi.org/10.1080/15216540213469>
- Mda-mb-231-cell line profile*. (s. f.). Recuperado 8 de junio de 2023, de <https://www.culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>
- Medrano Guzmán, R., & Martínez Sánchez, Y. L. (2022). *Epidemiología del cáncer de mama*. gob.mx. <http://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
- Mori, K., Le Goff, B., Charrier, C., Battaglia, S., Heymann, D., & Rédini, F. (2007). DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFκB: New insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone*, *40*(4), 981-990. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.006>
- Murugesan, N., Üstunkaya, T., & Feener, E. P. (2015). Thrombosis and Hemorrhage in Diabetic Retinopathy: A Perspective from an Inflammatory Standpoint. *Seminars in*

- Thrombosis and Hemostasis*, 41(6), 659-664. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556731>
- NCI. (2021). *What Is Cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Nierodzik, M. L., & Karpatkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.002>
- Ohshiro, K., Bui-Nguyen, T. M., Divijendra Natha, R. S., Schwartz, A. M., Levine, P., & Kumar, R. (2012). Thrombin stimulation of inflammatory breast cancer cells leads to aggressiveness via the EGFR-PAR1-Pak1 pathway. *The International Journal of Biological Markers*, 27(4), e305-313. <https://doi.org/10.5301/JBM.2012.10437>
- OMS. (2022, febrero). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiological Reviews*, 84(2), 579-621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2003>
- Posma, J. J. N., Posthuma, J. J., & Spronk, H. M. H. (2016). Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(10), 1908-1916. <https://doi.org/10.1111/jth.13441>
- Reddel, C. J., Tan, C. W., & Chen, V. M. (2019). Thrombin Generation and Cancer: Contributors and Consequences. *Cancers*, 11(1), E100. <https://doi.org/10.3390/cancers11010100>
- Risbridger, G. P., Davis, I. D., Birrell, S. N., & Tilley, W. D. (2010). Breast and prostate cancer: More similar than different. *Nature Reviews. Cancer*, 10(3), 205-212. <https://doi.org/10.1038/nrc2795>

- Robles, J. P., Zamora, M., Velasco-Bolom, J. L., Tovar, M., Garduño-Juárez, R., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2018). Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35383-7>
- Román Curto, C. (1999). El proceso metastásico I: Invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 90(4), 143-155.
- Russell, F. A., & McDougall, J. J. (2009). Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 58(3), 119-126. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-8087-0>
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2415-2420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105>
- Sanz, J. M., Lahoz, A. M. G., & Silva, A. (2021). El sistema inmune y el microambiente tumoral: Componentes y función. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(33), 1932-1941. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.006>
- Sevenich, L., & Joyce, J. A. (2014). Pericellular proteolysis in cancer. *Genes & Development*, 28(21), 2331-2347. <https://doi.org/10.1101/gad.250647.114>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

- Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H., Childs, B., & Walsh, P. C. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate*, 17(4), 337-347. <https://doi.org/10.1002/pros.2990170409>
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., & Paulson, D. F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, 21(3), 274-281. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210305>
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G., & Tang, P. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4, 35-41.
- Tsopanoglou, N. E., & Maragoudakis, M. E. (1999). On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23969-23976. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23969>
- van Es, N., Sturk, A., Middeldorp, S., & Nieuwland, R. (2014). Effects of cancer on platelets. *Seminars in Oncology*, 41(3), 311-318. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.04.015>
- van Hinsbergh, V. W. M., Engelse, M. A., & Quax, P. H. A. (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 716-728. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17>
- Vianello, F., Sambado, L., Goss, A., Fabris, F., & Prandoni, P. (2016). Dabigatran antagonizes growth, cell-cycle progression, migration, and endothelial tube formation induced by thrombin in breast and glioblastoma cell lines. *Cancer Medicine*, 5(10), 2886-2898. <https://doi.org/10.1002/cam4.857>

- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, *64*(6), 1057-1068. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90261-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90261-v)
- Wang, S., Li, Z., & Xu, R. (2018). Human Cancer and Platelet Interaction, a Potential Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 1246. <https://doi.org/10.3390/ijms19041246>
- Welsh, J. (2013). Chapter 40—Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. En P. M. Conn (Ed.), *Animal Models for the Study of Human Disease* (pp. 997-1018). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3>
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2015). Protease-activated receptors (PARs)—Biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *34*, 775-796. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9599-4>
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2016). Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *35*(2), 213-233. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9626-0>

11 Tabla de figuras

Figura 1.	11
Figura 2.	12
Figura 3.	14
Figura 4.	19
Figura 5.	21
Figura 6.	24
Figura 7.	25
Figura 8.	29