



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE LA APOCININA EN LA EXPRESIÓN  
DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JAVIER RODRIGO PRADO BAEZA**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Arturo Baiza  
Gutman.**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo.de México, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 3 de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfofisiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la UNAM, con la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y el apoyo de la Dra. María Guadalupe Martínez Hernández.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IN223014 “Regulación del sistema de activación del plasminógeno y metaloproteinasas de matriz extracelular por glucosa y estrés oxidante en procesos de invasividad tisular: trofoblasto y células de cáncer de mama” y del Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (FESI-DIP-PAPCA-2016-19), de la FES Iztacala, UNAM.

Agradezco a la DGAPA, UNAM la beca recibida.

# AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la UNAM, por todo lo que me ha dado desde el día que fui aceptado, hasta el día en que por fin concluyo mis estudios.

Agradezco a mi mamá Lola, todo esto es gracias a ti, siempre has creído en mí y siempre me has dado todo tu apoyo, y el que haya llegado hasta aquí es el resultado de eso, gracias mamá por todo lo que me has dado.

A mi Paty, fuiste mi gran apoyo durante todo este tiempo, escuchaste mis quejas y aguantaste mis berrinches, siempre estuviste a mi lado, no me alcanzan las palabras para decirte lo agradecido que estoy y lo mucho que te quiero.

Agradezco a todos los miembros del Laboratorio 3 de la unidad de morfo que me acompañaron en ésta última etapa de la carrera y hacia los cuales mi cariño y respeto son inmensos.

Al Dr. Baiza, por haberme dado la oportunidad de ser parte de este laboratorio, por no haber dejado que me rindiera cuando todo era un caos, gracias por su paciencia y apoyo para lograr terminar este trabajo de la mejor manera posible.

A la Dra. Lupita, porque fue usted quien me abrió las puertas del laboratorio desde el principio, quien me estuvo apoyando en todo momento y a pesar de mis errores no dejó de educarme en el laboratorio.

A la Dra. Rubi, gracias por haberme ayudado tanto a lo largo de éste proyecto, sin ti aún seguiría peleándome con los cultivos; me enseñaste lo difícil que es este camino que apenas inicio y a no rendirme a pesar de lo complicado que pueda volverse, gracias de verdad.

A Eli, por esas platicas llenas de alegría que me ayudaban a no darme por vencido cuando todo me salía mal, por siempre levantarme el ánimo y por haberme enseñado que un ¿cómo estás? siempre puede mejorar el día de alguien

A Gisela, a Ale y a Eda, por brindarme su apoyo, por siempre haberme ayudado, me enseñaron a ser una mejor persona, y que el trabajo no lo es todo en la vida; gracias a usted también Jaime, que siempre llegaba en el momento menos esperado haciendo enojar a su hermana, pero haciéndome reír mucho, gracias por sus pláticas y sus consejos.

Agradezco a lo Dra. Salcedo, por todo el apoyo que me ha brindado, desde que fue mi profesora y hasta ahora en la revisión de ésta tesis, por sus pláticas, por sus consejos, pero sobre todo porque sin usted jamás habría conocido a nadie de ese gran laboratorio, y probablemente aún seguiría vagando por todos lados, gracias.

Agradezco a mis queridas amigas, Ana, Nayely, Vicky y Marisol porque sin ustedes jamás habría logrado pasar mis materias, gracias por haberme aguantado durante toda la carrera, sobre todo en las prácticas de campo, gracias por su amistad.

“El que aprende y aprende y no práctica lo que sabe,  
es como el que ara y ara y no siembra.”  
-Platón-

“El primer paso de la ignorancia es presumir de saber.”  
-Albert Einstein-

## ÍNDICE.

I.- Abreviaturas. -----	4
II.- Índice de figuras y tablas. -----	6
III.- Resumen. -----	8
IV.- Introducción. -----	10
1. El cáncer. -----	10
1.1. Características intrínsecas del cáncer. -----	11
1.2. Cáncer de mama. -----	12
1.3. Incidencia del cáncer de mama. -----	12
2. Clasificación. -----	16
2.1. Por histopatología. -----	16
2.1.1. Carcinoma ductal <i>in situ</i> o carcinoma intraductual. -----	17
2.1.2. Carcinoma ductal invasivo. -----	17
2.1.3. Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> . -----	17
2.1.4. Carcinoma lobulillar invasivo. -----	18
2.2. Por marcadores de superficie celular. -----	18
2.2.1. Receptor hormonal positivo. -----	18
2.2.2. Receptor hormonal negativo. -----	19
2.2.3. Her2 positivo. -----	19
2.2.4. Her2 negativo. -----	19
2.2.5. Triple positivo. -----	19
2.2.6. Triple negativo. -----	19
3. Especies reactivas de oxígeno. -----	19

3.1. Estrés oxidativo. -----	20
3.2. La familia de NADPH oxidasas (NOX). -----	22
3.3. Mecanismo de acción de la NADPH oxidasa. -----	23
4. Apocinina. -----	24
4.1. Mecanismo de acción. -----	24
5. Mecanismos antioxidantes de las células. -----	25
6. Señalización intracelular y ROS. -----	26
6.1. ROS y cáncer. -----	27
7. El sistema plasminógeno/plasmina. -----	27
7.1. Estructura del plasminógeno. -----	28
7.2. Activadores del plasminógeno (tPA y uPA). -----	30
7.3. Receptores del plasminógeno (PGL-R). -----	30
7.3.1. Receptor para tPA (tPAR). -----	30
7.3.2. Receptor para uPA (uPAR). -----	30
V. Antecedentes. -----	31
VI. Justificación. -----	32
VII. Objetivos. -----	33
1. Objetivo general. -----	33
2. Objetivos particulares. -----	33
VIII. Materiales y Métodos. -----	33
1. Cultivo celular y tratamientos. -----	33
2. Crecimiento celular. -----	33
3. Migración celular. -----	34

<b>4. Expresión y actividad de uPA. -----</b>	<b>34</b>
<b>4.1. " Western blot". -----</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Zimografía para activadores del plasminógeno. -----</b>	<b>35</b>
<b>IX. Análisis estadísticos. -----</b>	<b>35</b>
<b>X. Resultados. -----</b>	<b>36</b>
<b>1. Efecto de diferentes concentraciones de apocinina sobre el crecimiento de la población de células MDA-MB-231. -----</b>	<b>36</b>
<b>2. Disminución de la migración de células MDA-MB-231 por apocinina. ----</b>	<b>37</b>
<b>3. Análisis de la actividad y expresión del activador de plasminógeno tipo uroquinasa en lisados celulares tratados con apocinina. -----</b>	<b>40</b>
<b>XI. Discusión. -----</b>	<b>41</b>
<b>XII. Conclusiones. -----</b>	<b>45</b>
<b>XIII. Perspectivas. -----</b>	<b>45</b>
<b>XIV. Bibliografía. -----</b>	<b>46</b>

## I.- ABREVIATURAS.

**AKT** Protein cinasa B

**Arg** Arginina

**Asp** Aspartato

**ATCC** Del inglés  
American Type Culture  
Collection: Colección  
Americana de Cultivos

**BRCA 1/2** Del inglés  
Breast Related Cancer  
Antigen: Antígeno  
Relacionado a Cáncer de  
mama

**Cu/Zn SOD** Superóxido  
dismutasa con centro de  
cobre y zinc

**DCIS** Del inglés Ductual  
carcinoma in situ:  
Carcinoma ductual in situ

**DMEM** Del inglés  
Dulbecco's Modified  
Eagle's Medium: Medio  
Eagle modificado por  
Dulbecco

**ECM** Del inglés  
Extracellular Matrix:  
Matriz Extracelular

**EDTA** Ácido  
etilendiaminotetraacético

**EMT** Del inglés  
epithelial-mesenchymal  
transition: Transición  
epitelio mesénquima

**ER** Receptor de  
Estrógeno

**ERK 1/2** Del inglés  
Extracellular-regulated  
kinase: Cinasa regulada  
por señal extracelular 1/2

**FAK** Del inglés Focal  
Adhesion Kinase: Cinasa  
de adhesión focal

**FBS** Suero Fetal de  
Bovino

**HER2** Del inglés Human  
epidermal growth factor  
receptor: Receptor para  
el factor de crecimiento  
epidérmico humano 2

**His** Histidina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de  
hidrógeno

**IC50** Dosis letal media

**IDC** Del inglés Invasive  
ductual carcinoma:  
Carcinoma ductual  
invasivo

**ILC** Del inglés Invasive  
lobulillar carcinoma:  
Carcinoma lobulillar  
invasivo

**IKK** Cinasa del inhibidor  
de NFκB

**kDA** kilo Daltones

**LCIS** Del inglés  
Lobulillar carcinoma in  
situ: Carcinoma lobulillar  
in situ

**MAPK** Del inglés  
mitogen-activated protein  
kinase: Proteincinasa  
activada por mitógeno

**MEK** Del inglés  
mitogen.activated protein  
kinase kinase: Cinasa de  
la cinasa activada por  
mitógeno.

**μL** Microlitro

**MMPs** Metaloproteinasas

<b>MMP-9</b> Metaloproteínasa 9	<b>O<sub>2</sub></b> Oxígeno diatómico	<b>ROS</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>MMP-2</b> Metaloproteínasa 2	<b>·O<sub>2</sub></b> Superóxido	<b>RTK</b> Receptor de tirosin cinasa
<b>MMP-1</b> Metaloproteínasa 1	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> Singulete de oxígeno	<b>Ser</b> Serina
<b>µm</b> Micrómetro	<b>O<sub>3</sub></b> Ozono	<b>SOD</b> Superóxido dismutasa
<b>µM</b> Micromolar	<b>*OH</b> Radical hidroxilo	<b>TBS</b> Solución salina tris
<b>MnSOD</b> Superóxido dismutasa con centro de manganeso	<b>PAI-1</b> Inhibidor del activador de plasminógeno 1	<b>tPA</b> Activador de plasminógeno tipo tisular
<b>MTT</b> Sales de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium	<b>PBS</b> Solución salina de fosfatos	<b>tPAR</b> Receptor del activador de plasminógeno tipo tisular
<b>NAC</b> N-acetilcisteína	<b>PI3K</b> Fosfoinositol 3 cinasa	<b>uPA</b> Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
<b>NFκB</b> Factor Nuclear kappa B	<b>PTK</b> Proteína tirosin cinasa	<b>uPAR</b> Receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa
<b>nm</b> nanómetro	<b>PTP</b> Proteína tirosin fosfatasa	<b>UV</b> Radicación ultravioleta.
<b>NO*</b> Óxido nítrico	<b>PR</b> Receptor de progesterona	
<b>NOX</b> NADPH oxidasa	<b>rpm</b> Revoluciones por minuto	

## II.- ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig 1. Adquisición acumulativa de mutaciones que dan lugar al fenotipo de cáncer. -----	10
Fig 2. Habilidades intrínsecas del cáncer. -----	11
Fig 3. Habilidades emergentes del cáncer. Evasión del sistema inmune y metabolismo aberrante. -----	12
Fig 4. Incidencia de tumor maligno de mama por sexo en México. -----	15
Fig 5. Incidencia de tumor maligno de mama por rango de edad en mujeres en México.	15
Fig 6. Estructura anatómica de la mama. -----	16
Fig 7. Representación gráfica de un DCIS. -----	17
Fig 8. Representación gráfica de un LCIS. -----	18
Fig.9. Mecanismos principales de la generación de ROS y de su detoxificación. -----	21
Fig.10. La generación de ROS y sus efectos en la célula. -----	21
Fig 11. Modelo de la estructura de la NADPH oxidasa. -----	22
Fig 12. Esquema del complejo multimérico funcional de NOX2. -----	23
Fig.13. Mecanismo de acción de la apocinina. -----	24
Fig.14. Formación del dímero de apocinina. -----	25
Fig.15. Participación del peróxido de hidrógeno como segundo mensajero en varias vías de señalización. -----	26
Fig.16. El sistema del plasminógeno/plasmina como mediador de la invasión tumoral y metástasis. -----	28
Fig.17. Estructura del Glu-plasminógeno. -----	29
Fig.18. La apocinina inhibe el crecimiento de la población de células MDA-MB-231. -----	36

Fig.19. La migración de células MDA-MB-231 es inhibida por acción de la apocinina.	37
Fig. 20. Fotografías de los cultivos celulares en medio sin suero observados con el objetivo de 10X.-----	38
Fig. 21. Fotografías de los cultivos celulares en medio con suero observados con el objetivo de 10X.-----	39
Fig.22. Zimogramas y análisis densitométrico de la actividad de uPA. -----	40
Fig.23.Western blots y análisis densitométrico de los niveles de expresión de uPA. -----	41
Tabla 1. Incidencia de causas de muerte a nivel mundial. -----	13
Tabla 2. Incidencia de tipos de cáncer por sexo y nivel socioeconómico. -----	14

### III.- Resumen.

El cáncer es uno de los principales problemas de salud mundial, siendo el cáncer de mama el más frecuente en mujeres a nivel mundial; en México, éste ocupa el segundo lugar en causas de muerte en mujeres. Su desarrollo y progresión depende de diversos factores, tanto internos como externos a las células, y uno es el efecto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tiene sobre esta enfermedad. Las ROS son generadas a partir de moléculas de oxígeno y son altamente reactivas; juegan un doble papel en las células pues actúan como segundos mensajeros en varias rutas de señalización, pero en exceso generan daños a macromoléculas muchas veces irreparables. Estos daños pueden llevar al desarrollo de un fenotipo tumoral, de ahí que se vea a estas moléculas como posibles blancos terapéuticos, no sólo contra el cáncer si no contra diversas enfermedades crónico-degenerativas. Las ROS son producidas principalmente en la cadena transportadora de electrones y su segunda fuente más importante es la NADPH oxidasa, una enzima multimérica cuya función es la formación de superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), molécula precursora de muchas otras ROS. Al producirse constantemente, la concentración de estas moléculas debe ser finamente regulada y para ello las células poseen sus propios mecanismos antioxidantes, sin embargo, una vez que las células han perdido el equilibrio redox y han pasado a un estadio maligno, estos mecanismos dejan de ser eficientes. Recientes estudios han mostrado que compuestos antioxidantes tiene un efecto inhibitorio en la progresión de diversos tipos de cáncer, entre ellos, de próstata, de piel, de intestino y de mama. Se ha encontrado que la N-acetilcisteína es eficiente al reducir los procesos de proliferación, migración e invasión celular, además de disminuir la actividad y expresión de enzimas proteolíticas necesarias para los dos últimos procesos mencionados, el mecanismo no está claro, pero al ser el NAC un antioxidante genérico, interactúa y remueve ROS, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inhibiendo también varias rutas de señalización dependientes del estado redox, entre ellas algunas necesarias en los procesos antes mencionados. En este proyecto nos enfocamos en estudiar el efecto que la apocinina, un inhibidor específico de la NADPH oxidasa (NOX), tiene sobre los procesos de proliferación y migración celular en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, además de evaluar el efecto de este antioxidante en la concentración del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), proteasa clave en el sistema plasminógeno-plasmina, un sistema de degradación de matriz extracelular que se ha relacionado con procesos de metástasis y migración tumoral. La apocinina al inhibir una fuente de generación de ROS, estaría previniendo el aumento de sus niveles intracelulares antes de ser generados, por lo tanto, la acción de la apocinina sobre las

células será similar o menor a la encontrada con N-acetilcisteína, dependiendo de la importancia de la NOX en la producción de ROS. Se probaron diversas concentraciones de apocinina, en cultivos celulares crecidos en presencia y ausencia de suero fetal de bovino. Los resultados obtenidos muestran un efecto inhibitorio dependiente de la concentración y el tiempo por parte de la apocinina tanto en el crecimiento de la población celular, así como en la migración, encontrando un mayor efecto en los cultivos crecidos en ausencia de suero. Sin embargo, los ensayos de actividad y expresión de uPA no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles, lo que puede indicar que la acción inhibitoria en el proceso de migración por parte de la apocinina se deba a otras enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas de matriz.

## IV.- Introducción.

### 1. El cáncer.

El proceso por el cual una célula normal se transforma progresivamente hasta llegar a la malignidad, es a lo que llamamos carcinogénesis, este proceso requiere de la acumulación de mutaciones producto del daño al genoma (figura 1), causadas por factores endógenos (errores en la replicación del DNA, inestabilidad química de pares de bases o daño por estrés oxidante), o factores exógenos (radiaciones UV o ionizantes o agentes químicos carcinogénicos). Las células poseen mecanismos para reparar dichos daños, pero por varias razones pueden no ser suficientes y las mutaciones se conservan en el genoma (1). Las células de cáncer tienen defectos en los circuitos regulatorios que rigen los procesos de proliferación y homeostasis en las células normales; tomando en cuenta las observaciones en cáncer humano y en modelos animales, varios autores argumentan que el cáncer presenta un proceso análogo a la evolución Darwiniana, en el cual un cambio genético confiere a las células una ventaja en el crecimiento y diseminación en relación a las células normales (2).

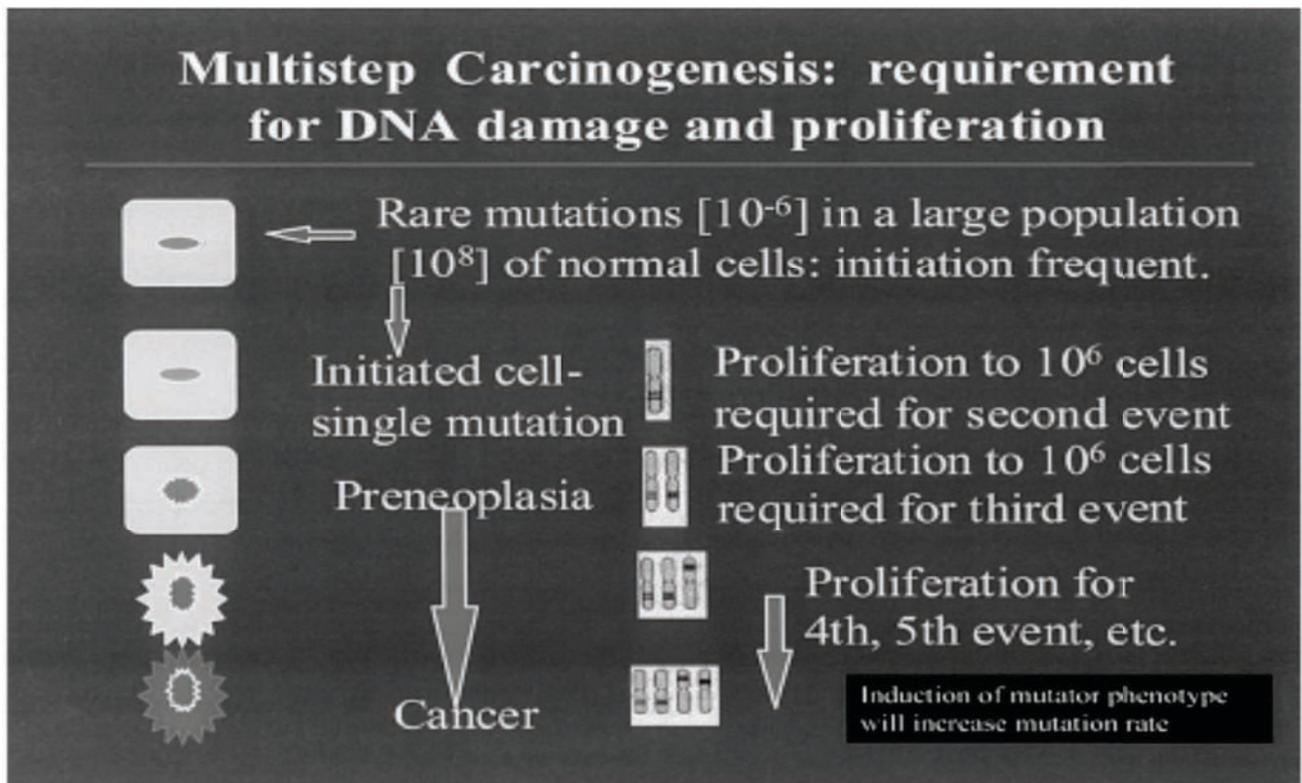


Fig 1. Adquisición acumulativa de mutaciones que dan lugar al fenotipo de cáncer. Tomada de Bertram. 2001 (1).

## 1.1 Características intrínsecas del cáncer.

Hay cerca de 100 tipos diferentes de cáncer y cada uno puede abarcar un gran número de subtipos dependiendo del órgano en que se originen; en las células de cáncer se habla de seis características particulares (figura 2), las cuales llevan progresivamente al desarrollo de esta enfermedad y corresponden a: la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, un potencial replicativo ilimitado, una angiogénesis sostenida y la invasión tisular y metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos producto de la inestabilidad genómica sufrida por las células a causa de mutaciones, representan el éxito o el fallo de los mecanismos de defensa dentro de las células y los tejidos (2).

En la última década y gracias al progreso científico, se han añadido dos características más que propician la progresión del cáncer (figura 3) : la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmunológico. Además de esto los tumores muestran un fenómeno de “reclutamiento”, provocando que células normales contribuyan al desarrollo y progresión del tumor creando lo que se conoce como un microambiente tumoral. Por esta razón, comprender todos estos conceptos es algo necesario para desarrollar métodos más efectivos para combatir el cáncer (3).

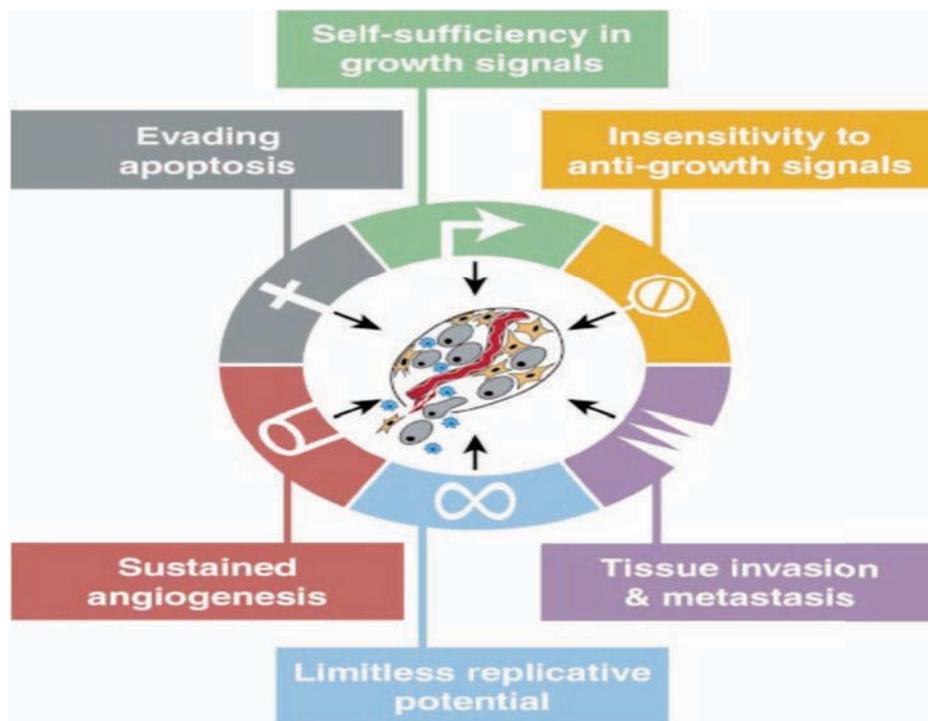


Fig 2. Habilidades intrínsecas del cáncer. Tomada de Hanahan y Weinberg. 2000 (2).

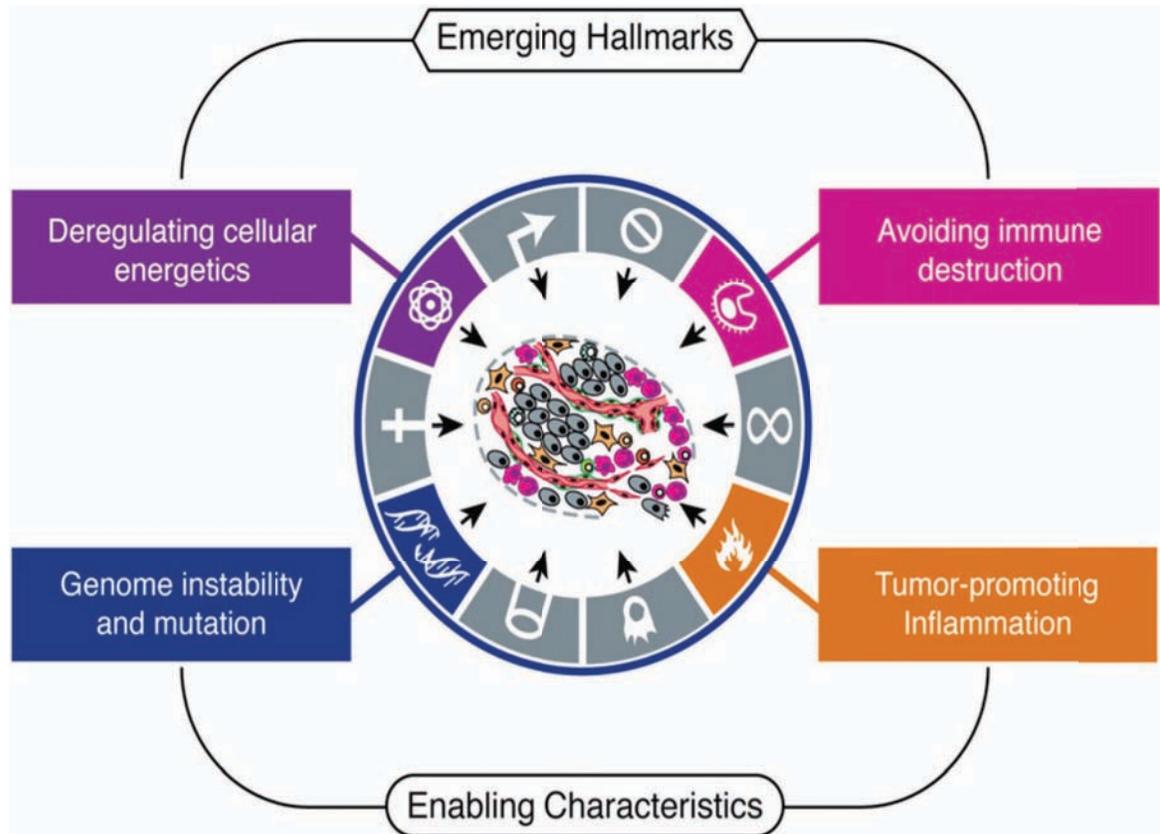


Fig 3. Habilidades emergentes del cáncer. Evasión del sistema inmune y metabolismo aberrante. Tomada de Hanahan y Weinberg. 2011 (3).

## 1.2. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es una de las enfermedades que no discriminan entre la población de países desarrollados y en desarrollo, y es el tipo de cáncer con mayor presencia en las mujeres a nivel mundial. Al igual que otros tipos de cáncer, su etiología es multifactorial, es decir, su desarrollo no se puede atribuir a una única causa interviniendo varios factores, entre otros, factores genéticos como mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (Breast Related Cancer Antigen), o factores hormonales como niveles elevados de estrógeno, o factores exógenos como tabaquismo, dieta y consumo de alcohol (4).

## 1.3. Incidencia del cáncer de mama.

El cáncer fue la segunda causa de muerte en el mundo en el 2013 (tabla 1); siendo el cáncer de mama el más frecuente en mujeres alrededor del mundo, en 2012 se registraron cerca de 1.7 millones de casos, representando el 25% de todos los casos de cáncer registrados

en mujeres. El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres por neoplasia en países en desarrollo, y la segunda en países desarrollados (tabla 2) (5).

Tabla 1. Incidencia de causas de muerte a nivel mundial, por nivel socioeconómico en el 2012 (miles). Tomada y modificada de American Cancer Society (5).

	Worldwide			Low- and Middle-income			High-income		
	Rank	Deaths	%	Rank	Deaths	%	Rank	Deaths	%
Cardiovascular diseases	1	17,513	31%	1	13,075	30%	1	4,438	38%
Malignant neoplasms	2	8,204	15%	3	5,310	12%	2	2,894	25%
Infectious and parasitic diseases	3	6,431	12%	2	6,128	14%	7	303	3%
Respiratory diseases	4	4,040	7%	4	3,395	8%	3	645	6%
Unintentional injuries	5	3,716	7%	5	3,212	7%	5	504	4%
Respiratory infections	6	3,060	5%	6	2,664	6%	6	396	3%
Digestive diseases	7	2,263	4%	7	1,748	4%	4	515	4%
Diabetes mellitus	8	1,497	3%	8	1,243	3%	9	254	2%
Intentional injuries	9	1,428	3%	9	1,185	3%	10	243	2%
Genitourinary diseases	10	1,195	2%	10	935	2%	8	260	2%
Nutritional deficiencies	11	559	1%	11	534	1%	14	25	0%
Congenital anomalies	12	556	1%	12	515	1%	13	42	0%
Maternal conditions	13	296	1%	13	293	1%	16	3	0%
Musculoskeletal diseases	14	216	0%	14	158	0%	12	58	1%
Other neoplasms	15	193	0%	15	116	0%	11	77	1%
All causes		55,843			44,172			11,671	

Source: World Health Organization Global Health Observatory Data Repository, Mortality and Global Health Estimates 2012. [apps.who.int/gho/data/?theme=main](http://apps.who.int/gho/data/?theme=main). Accessed August 24, 2014.

American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2015

Tabla 2. Incidencia de tipos de cáncer por sexo y nivel socioeconómico 2012. Tomada y modificada de American Cancer Society (5).

**Estimated Incidence and Mortality Rates\* by Sex, Cancer Site, and Level of Economic Development, 2012**

Site	Males				Females			
	Developed countries		Developing countries		Developed countries		Developing countries	
	Incidence	Mortality	Incidence	Mortality	Incidence	Mortality	Incidence	Mortality
Bladder	16.9	4.5	5.3	2.6	3.7	1.1	1.5	0.7
Brain, nervous system	5.9	4.0	3.3	2.6	4.4	2.7	2.7	1.9
Breast	-	-	-	-	74.1	14.9	31.3	11.5
Cervix uteri	-	-	-	-	9.9	3.3	15.7	8.3
Colon and rectum	36.3	14.7	13.7	7.8	23.6	9.3	9.8	5.6
Corpus uteri	-	-	-	-	14.7	2.3	5.5	1.5
Esophagus	6.4	5.2	10.1	9.0	1.2	0.9	4.1	3.6
Hodgkin lymphoma	2.3	0.4	0.8	0.4	1.9	0.3	0.5	0.3
Kidney	12.6	4.2	3.4	1.7	6.2	1.7	1.8	0.9
Larynx	5.1	2.2	3.5	2.0	0.6	0.2	0.4	0.3
Leukemia	8.8	4.6	4.4	3.7	5.8	2.8	3.2	2.6
Lip, oral cavity	7.0	2.3	5.0	2.8	2.6	0.6	2.5	1.4
Liver	8.6	7.1	17.8	17.0	2.7	2.5	6.6	6.4
Lung	44.7	36.8	30.0	27.2	19.6	14.3	11.1	9.8
Melanoma of skin	10.2	2.0	0.8	0.4	9.3	1.2	0.7	0.3
Multiple myeloma	3.3	1.8	1.0	0.8	2.2	1.2	0.7	0.6
Nasopharynx	0.6	0.2	2.0	1.3	0.2	0.1	0.8	0.5
Non-Hodgkin lymphoma	10.3	3.5	4.3	2.8	7.1	2.0	2.8	1.8
Other pharynx	4.7	2.2	2.8	2.2	0.8	0.3	0.7	0.5
Ovary	-	-	-	-	9.1	5.0	5.0	3.1
Pancreas	8.6	8.3	3.3	3.2	5.9	5.5	2.4	2.3
Prostate	69.5	10.0	14.5	6.6	-	-	-	-
Stomach	15.6	9.2	18.1	14.4	6.7	4.2	7.8	6.5
Testis	5.2	0.3	0.7	0.3	-	-	-	-
Thyroid	3.6	0.3	1.4	0.4	11.1	0.4	4.7	0.7
All sites <sup>†</sup>	308.7	138.0	163.0	120.1	240.6	86.2	135.8	79.8

\*Per 100,000, age standardized to the World Standard Population. †Excludes nonmelanoma skin cancer.

Source: GLOBOCAN 2012.

American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2015

En México el cáncer de mama es la cuarta causa de muerte por tumor maligno en la población general mayor de 20 años y la segunda en mujeres en el mismo rango de edad. De 2007 a 2014 la incidencia en mujeres ha ido en aumento siendo el 2014 el año en que se registró la mayoría de casos, principalmente entre las edades de 60 a 64 años (figura 4 y 5) (4).

**Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más, por sexo**  
**Serie anual de 2007 a 2014**  
 Por 100 mil habitantes de cada sexo



Fig 4. Incidencia de tumor maligno de mama por sexo en México. Tomada de INEGI. 2015 (4)

**Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por grupo de edad**  
**2014**  
 Por 100 mil mujeres de cada grupo de edad

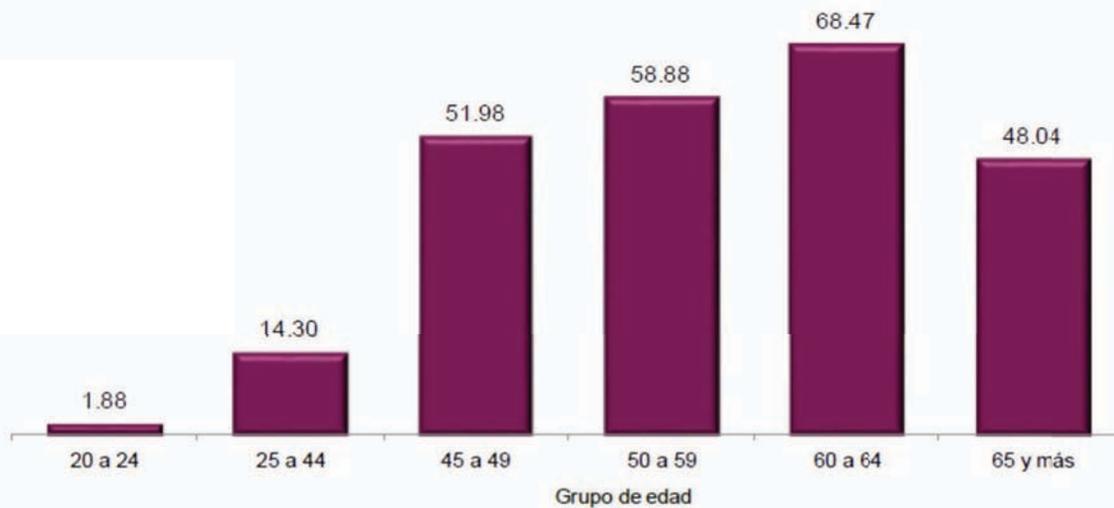


Fig 5. Incidencia de tumor maligno de mama por rango de edad en mujeres en México. Tomada INEGI. 2015 (4).

## 2. Clasificación.

El cáncer de mama puede originarse en cualquier tipo celular que forme parte de los componentes de la mama o seno, dichos componentes se pueden dividir en tres (figura 6): los lobulillos, que son las glándulas a cargo de la producción de leche, los conductos que sirven como estructuras de comunicación entre los lobulillos y el pezón y a través de los cuales viaja la leche, y el estroma que es todo el tejido conectivo, músculo y grasas que recubre los dos componentes previamente mencionados. El cáncer de mama se clasifica por criterios histopatológicos (en base a las células que le dieron origen), o por marcadores moleculares expuesto o no en la superficie de las células.

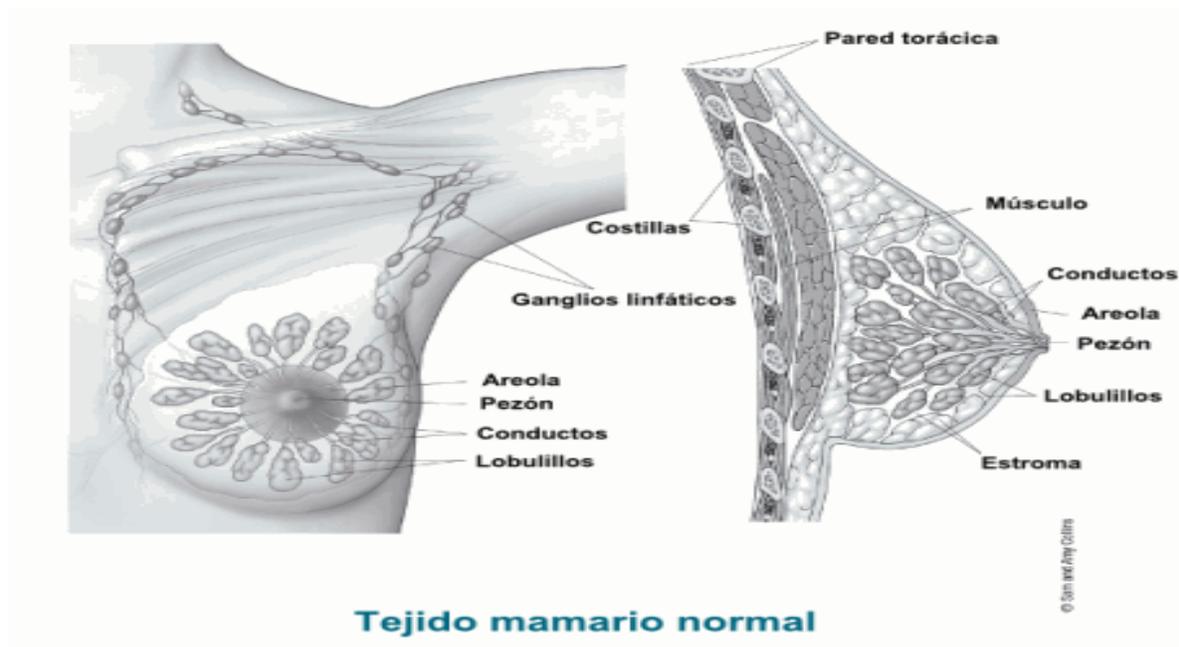


Fig 6. Estructura anatómica de la mama. Tomada de American Cancer Society. 2015 (5).

### 2.1. Por histopatología.

La mayoría de los cánceres de mama cerca del 95% se denominan carcinomas, lo que indica que se originaron en elementos tisulares que forman parte de los epitelios de la mama, normalmente son ductales o lobulillares. Siguiendo esta clasificación el carcinoma de mama se puede dividir en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo.

### 2.1.1. Carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductual.

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS por sus siglas en inglés), es como se denomina a la proliferación de células malignas confinadas a los ductos, no muestran un comportamiento invasivo, es el tipo más común de carcinoma no invasivo, alrededor de uno de cada cinco casos nuevos de cáncer de mama serán de este tipo (figura 7).

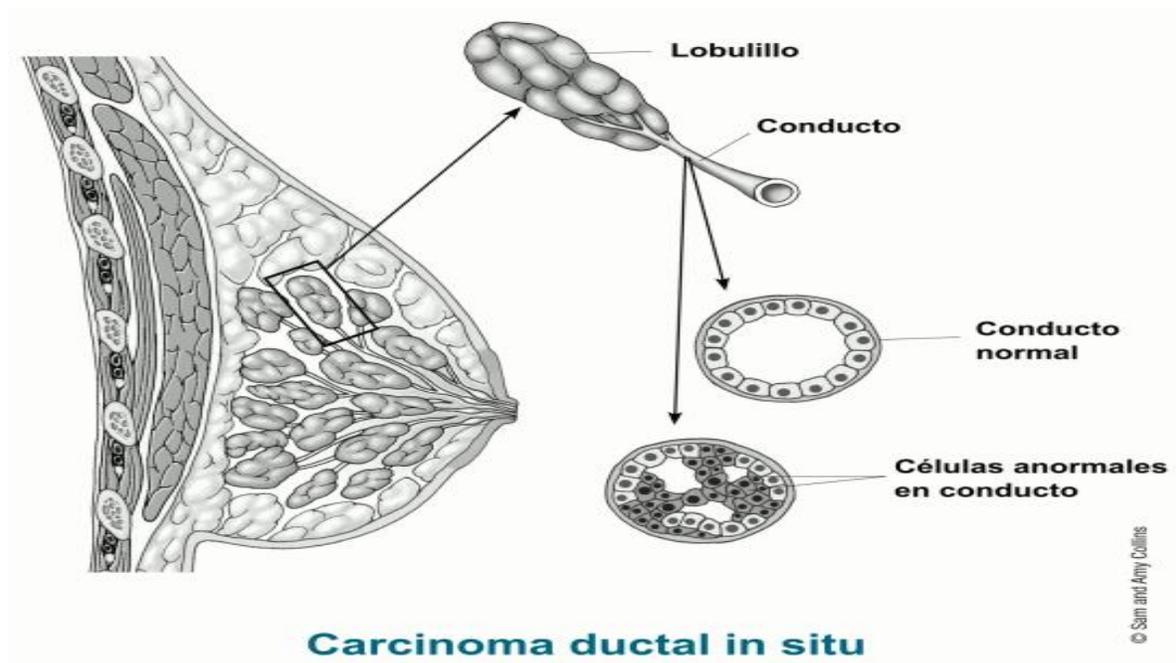


Fig 7. Representación gráfica de un carcinoma ductal *in situ*. DCIS. Tomada de American Cancer Society., 2015 (5).

### 2.1.2. Carcinoma ductal invasivo.

El carcinoma ductal invasivo o infiltrante (IDC por sus siglas en inglés), comienza en las glándulas productoras de leche, en general es el tipo más común de cáncer de mama, este cáncer crece en la pared del conducto lácteo que posteriormente penetra y crece en el tejido adiposo del seno, una vez ahí puede ocurrir metástasis a otros órganos. Aproximadamente ocho de cada diez de los cánceres invasivos serán de este tipo.

### 2.1.3. Carcinoma lobulillar *in situ*.

El carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS por sus siglas en inglés), es un tipo de cáncer de mama no invasivo en el que las células malignas surgen en las glándulas productoras de leche, no suele ser mortal, pero si representa un aumento en el riesgo de desarrollar un cáncer maligno.

#### 2.1.4. Carcinoma lobulillar invasivo.

El carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante (ILC por sus siglas en inglés) comienza en los lobulillos y al igual que el IDC puede hacer metástasis a otras partes del cuerpo, sin embargo, es menos frecuente, sólo uno de cada diez nuevos cánceres invasivos será de este tipo.

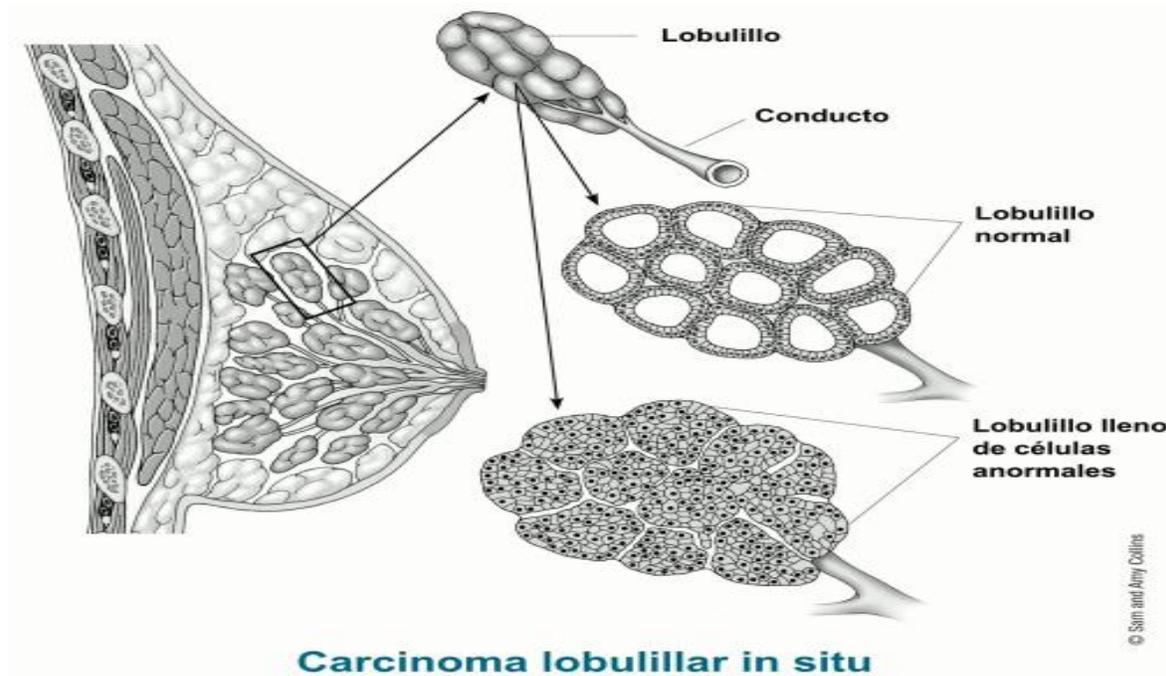


Fig 8. Representación gráfica de un carcinoma lobulillar *in situ* .LCIS. Tomada de. American Cancer Society., 2015 (5).

#### 2.2. Por marcadores de superficie celular.

El cáncer de mama también puede clasificarse en base a la presencia de receptores hormonales para estrógenos (ER) y para progesterona (PR) o para el receptor para el factor de crecimiento epidérmico, HER2.

##### 2.2.1. Receptor hormonal positivo.

Las células cancerosas que caen en esta clasificación pueden ser doble positivo (+/+) si poseen receptores para estrógeno y progesterona, o pueden ser solo positivas para alguna de las dos hormonas (+/-), las mujeres que padecen este tipo de cáncer suelen tener un buen pronóstico a corto plazo, pero el cáncer regresa con más frecuencia años después; este tipo de cáncer suele ser más común en mujeres post-menopáusicas.

### **2.2.2. Receptor hormonal negativo.**

Las células que caen en esta clasificación no poseen receptores para ninguna de las dos hormonas, estos cánceres suelen desarrollarse más rápido que los positivos, y son más comunes en mujeres que aún no han pasado por la menopausia.

### **2.2.3. Her2 positivo.**

Las células de cáncer que poseen un exceso de esta proteína, o copias adicionales del gen que codifica para Her2 caen en esta clasificación.

### **2.2.4. Her2 negativo.**

Las células de cáncer que no poseen un exceso de esta proteína entran en esta clasificación.

### **2.2.5. Triple positivo.**

Este término se usa para referirse a células que poseen receptores ER, PR, y tienen un exceso de proteína Her2, pueden ser tratados con medicamentos hormonales o medicamentos dirigidos a la proteína Her2.

### **2.2.6. Triple negativo.**

Si las células de cáncer de mama carecen tanto de receptores hormonales, así como de un exceso de Her2, son llamadas triple negativo, este tipo de cáncer suele desarrollarse con más frecuencia en mujeres jóvenes hispanas o de raza negra, es el tipo de cáncer más agresivo por la rapidez con la que se desarrolla y hace metástasis (6).

## **3. Especies reactivas de oxígeno.**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son iones o moléculas muy reactivas por el oxígeno que contienen, siendo algunos de ellos, radicales libres por poseer un electrón desapareado en su último nivel energético, son un producto de la ruptura o excitación del oxígeno diatómico ( $O_2$ ), debido a esta característica las ROS son altamente reactivas, y suelen clasificarse en dos grupos, los radicales libres de oxígeno por ejemplo: el superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $*OH$ ) y el óxido nítrico ( $NO^*$ ); y las ROS no radicales, como: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el singulete de oxígeno ( $^1 O_2$ ) y el ozono ( $O_3$ ) (7).

La generación de diversas ROS se da en una serie de reacciones bioquímicas que inician con la formación del  $\cdot\text{O}_2$  (8) (figura 9), bajo condiciones fisiológicas normales las ROS son producidas como un subproducto de la cadena transportadora de electrones y el  $\cdot\text{O}_2$  es producido principalmente entre el complejo I y III (7, 9) de la cadena de transporte de electrones siendo otra fuente importante las NADPH oxidasas (8).

Dependiendo de la concentración de ROS en la célula, éstas pueden tener un papel benéfico o perjudicial. Debido a que éstas moléculas son necesarias para mantener el equilibrio REDOX, son utilizadas en algunas células del sistema inmunológico como mecanismos de defensa contra patógenos, además de que recientemente se ha visto que están involucradas en varias rutas de señalización necesarias para el funcionamiento normal de la células (7) y en un caso más particular, para regular la expresión de proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (10); sin embargo en exceso pueden generar una condición de estrés oxidativo que puede llevar a la muerte celular o generar mutaciones que culminen en el desarrollo de alguna patología como las neoplasias.

### **3.1. Estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo es por definición un estado en el cual el equilibrio de los agentes oxidantes y las defensas antioxidantes de las células se han perdido (11). Una tensión oxidativa controlada es algo a lo que los organismos se adaptan con facilidad, en general estímulos oxidantes bajos pueden provocar una resistencia posterior por parte de una célula a estímulos más concentrados. Sin embargo, las ROS que se producen bajo condiciones fisiológicas normales, producen continuamente daño al DNA, proteínas y lípidos, de esta manera, es posible detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el DNA, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos (12). Por esta razón hay una relación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de enfermedades como arterosclerosis, hipertensión, diabetes, daños isquémico y cáncer (figura 10) (11).

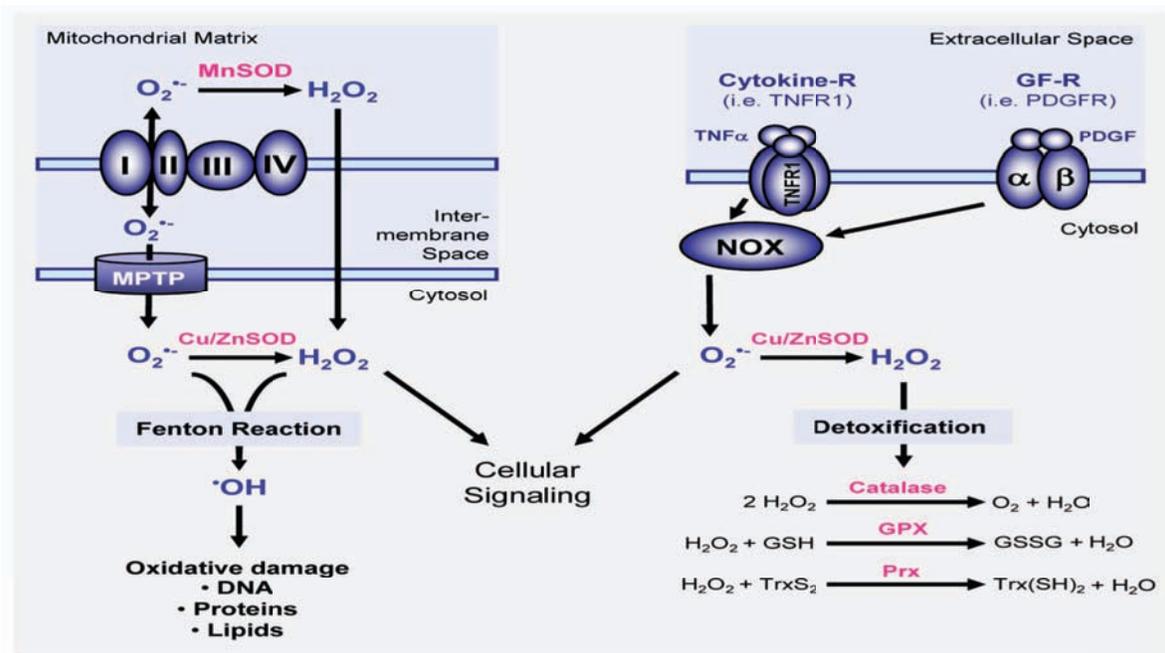


Fig.9. Mecanismos principales de la generación de ROS y de su detoxificación. Se muestra la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por la cadena respiratoria y NOX, su dismutación por la superóxido dismutasa con centro activo de manganeso o de cobre y zinc (MnSOD, Cu/Zn SOD), además de los mecanismos antioxidantes, la catalasa, el sistema del glutatión (GSH, GSSG) y glutatión peroxidasa (GPX) y las tioredoxina peroxidasa (PRX). Tomada de Liou y Sortz.2010 (7).

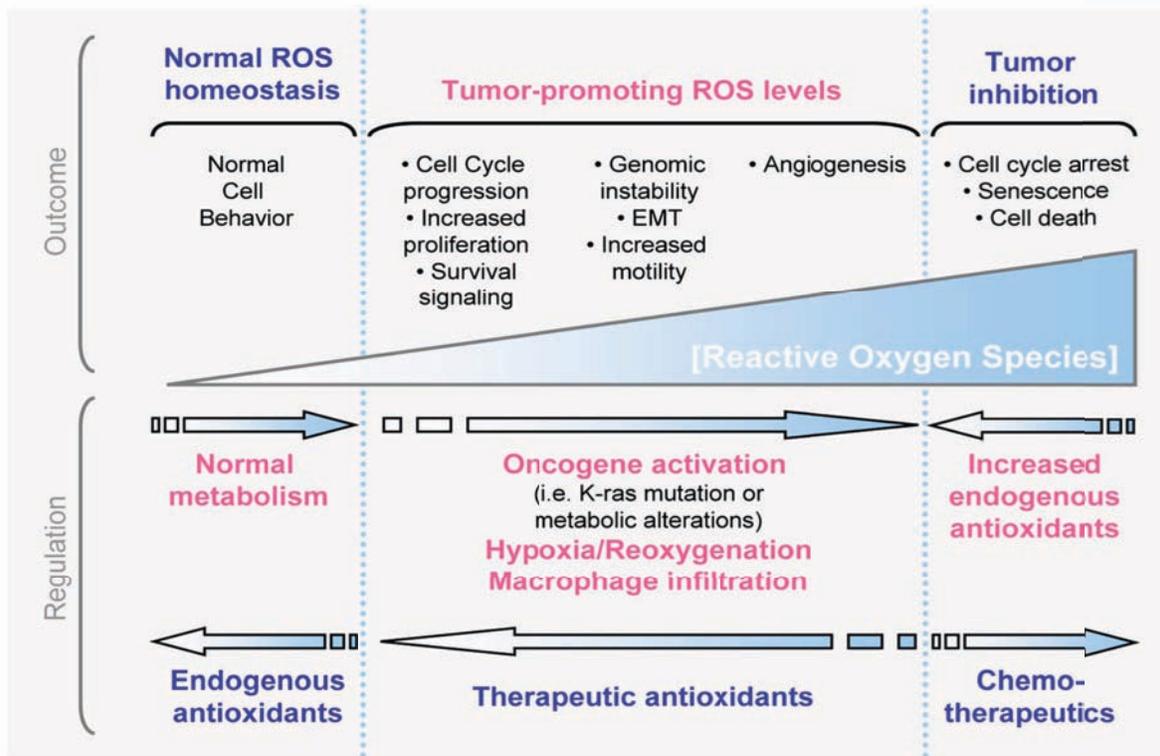


Fig.10. La generación de ROS y sus efectos en la célula. En una concentración pequeña las ROS contribuyen al comportamiento normal de la célula, a medida que aumenta promueven un comportamiento tumoral llegando a angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (EMT). Tomada de Liou y Sortz. 2010 (7).

### 3.2. La familia de NADPH oxidasas (NOX).

Las NADPH oxidasas son un grupo de proteínas transmembranales que transportan electrones a través de las membranas biológicas para reducir parcialmente el oxígeno ( $O_2$ ) en el radical anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), son un grupo de enzimas altamente conservadas en la escala evolutiva. El componente citocromo o NOX de todas las isoformas presenta la siguiente estructura común (figura 11): el sitio de unión a NADPH en el extremo carboxilo terminal, el sitio de unión a FAD en el dominio transmembranal más cercano al extremo carboxilo terminal, seis dominios transmembranales conservados, cuatro sitios de unión a histidina altamente conservados dos en el tercero y dos en el cuarto dominios transmembranales.

En mamíferos hay 7 isoformas de la subunidad catalítica e la enzima (NOX 1 a 5 y DUOX 1 y 2) cuyos niveles de expresión varían en diferentes tipos de células. La NOX1 se encuentra con mayor expresión en el colon, la NOX2 o gp91<sup>phox</sup> en fagocitos, la NOX3 en células del oído interno, la NOX4 en riñones y vasos sanguíneos y la NOX5 en el tejido linfático.

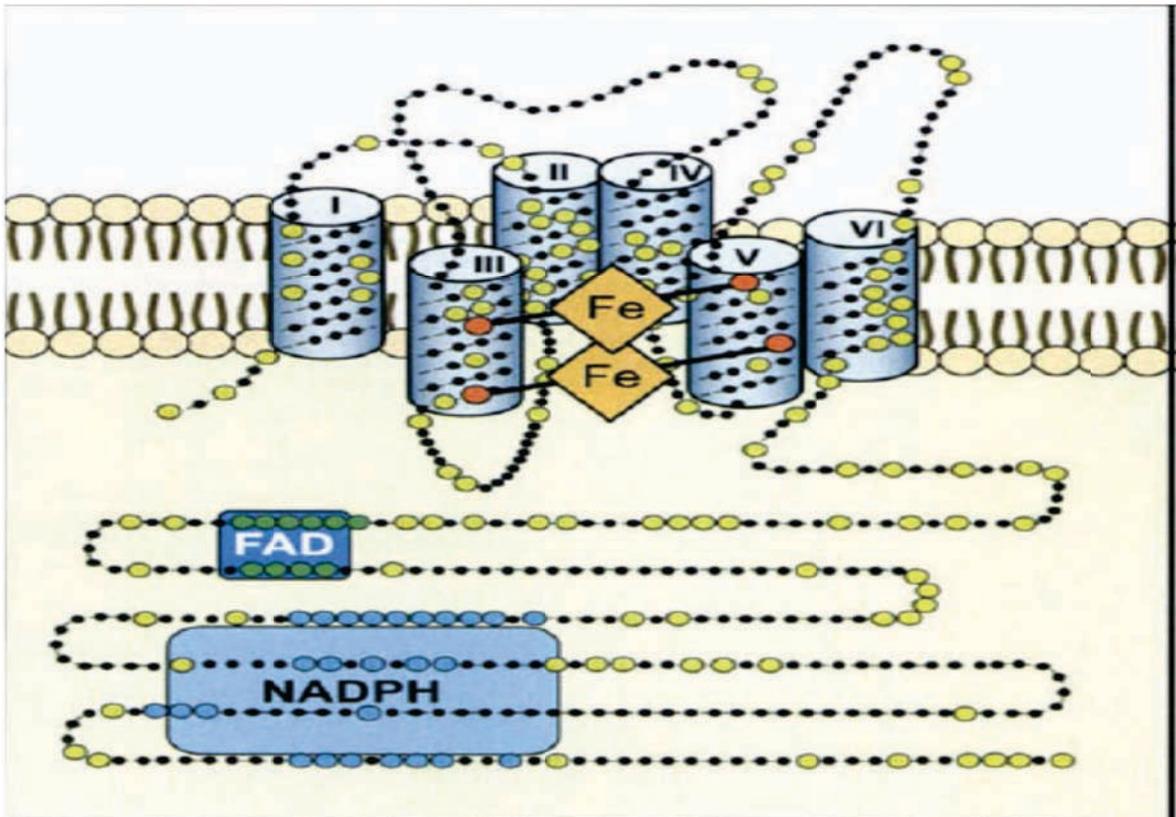


Fig 11. Modelo de la estructura de la NADPH oxidasa. Tomada de Bedard y Krause. 2007 (8).

### 3.3. Mecanismo de acción de la NADPH oxidasa.

El mecanismo (figura 12) fue elucidado con base en la NOX2 que está asociada constitutivamente a una subunidad conocida como p22<sup>phox</sup> en la membrana, la activación de la subunidad catalítica NOX2 requiere de la traslocación a la membrana de diversos factores citosólicos, entre ellos Rac, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>. La fosforilación de p47<sup>phox</sup> provoca un cambio conformacional que permite su interacción con p22<sup>phox</sup>, se piensa que p47<sup>phox</sup> permite la traslocación de otros factores citosólicos, lo que hace que se considere como una “subunidad organizadora”. La localización de p47<sup>phox</sup> en la membrana pone en contacto a p67<sup>phox</sup> la “subunidad activadora” con NOX2, y también lleva a la subunidad pequeña p40<sup>phox</sup> al complejo. Finalmente, la proteína G Rac interactúa con NOX2 en dos pasos, el primero entrando en contacto directo con NOX2 y seguida de una interacción con p67<sup>phox</sup>. Una vez ensamblado, el complejo se activa y comienza a generar  $\text{O}_2^-$  por la transferencia de electrones del NADPH del citosol al oxígeno (8).

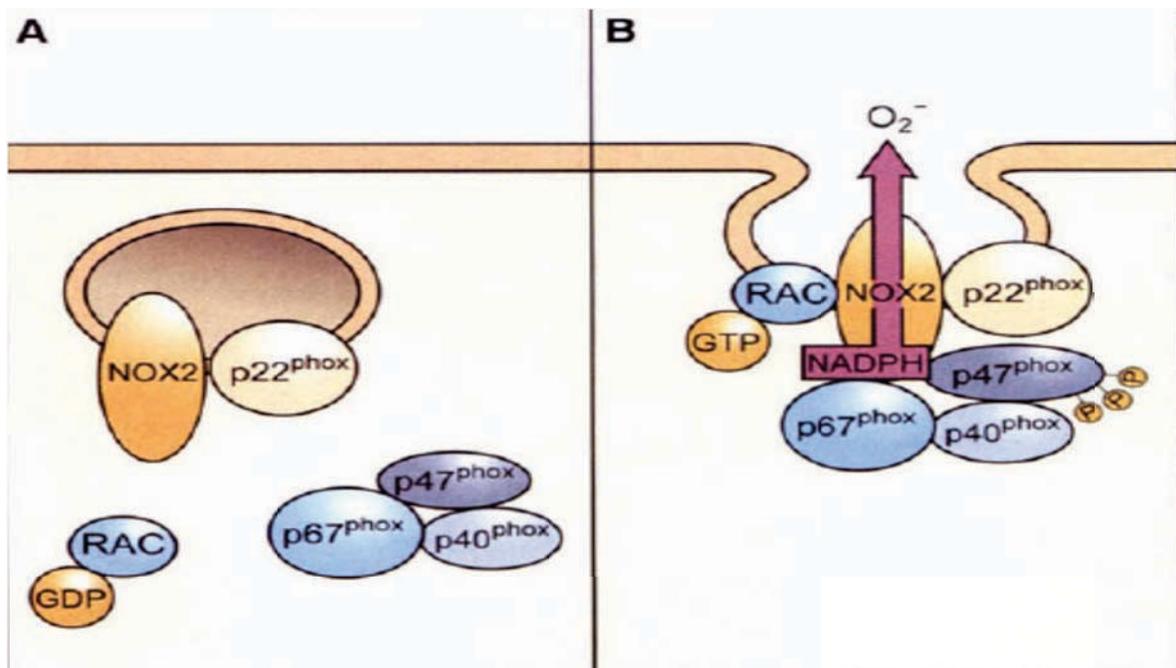


Fig 12. Esquema del complejo multimérico funcional de NOX2. Tomada de Bedard K., Krause K.H., 2007 (8).

#### 4. Apocinina.

La apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) fue descrita en 1883, se aisló por primera vez de las raíces del cáñamo canadiense (*Apocynun cannabinum*), y su extracto es comúnmente usado como remedio para problemas cardiacos. Es una acetofenona con un peso molecular de 166.17 kDa. Este compuesto ha sido usado como un inhibidor eficiente de la NADPH oxidasa, en muchos modelos experimentales y por tal inhibe directamente la producción de ROS, en contraste con los sistemas antioxidantes celulares que inhiben la acción de las ROS ya formadas. Posee un IC 50 (concentración inhibitoria media) de 10  $\mu$ M (13).

##### 4.1. Mecanismo de acción.

La apocinina previene la traslocación a la membrana de p47<sup>phox</sup> (figura 13), se asume que la apocinina es activada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente esta apocinina oxidada es convertida en un dímero (figura 14) que es la forma inhibitoria del compuesto. La acción de la apocinina es tardada y se cree que debido a su dimerización requiere un lapso de tiempo prolongado para que la NOX sea inhibida (14).

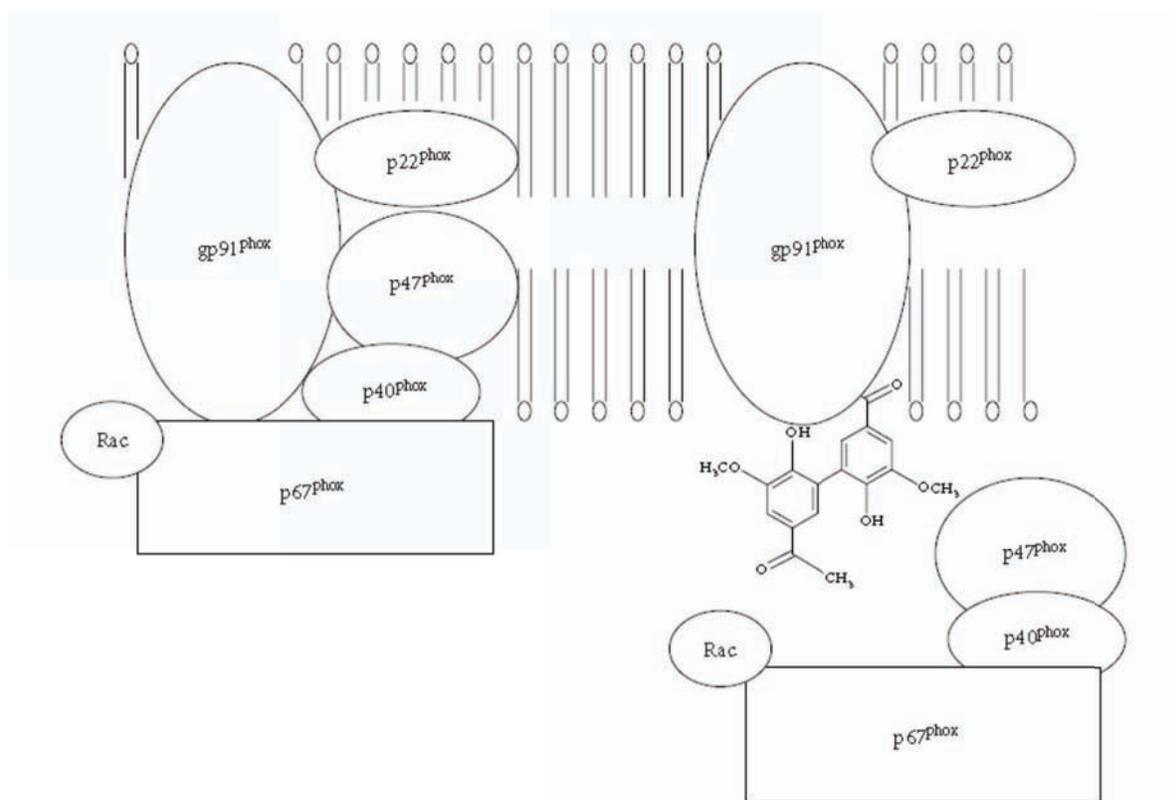


Fig.13. Mecanismo de acción de la apocinina, se ilustra la formación del dímero y el bloqueo de la unión de la subunidad p47<sup>phox</sup> a la subunidad gp91<sup>phox</sup> o NOX2. Tomada de Stefanska y Pawliczak, 2008 (14).

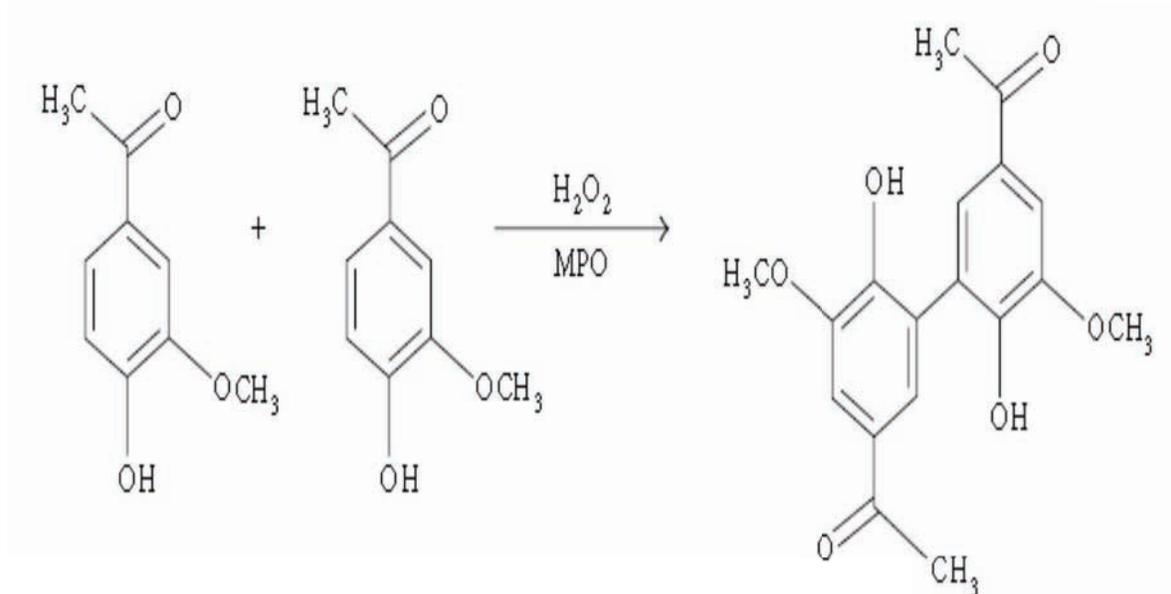


Fig.14. Formación del dímero de apocinina, mostrando la participación de la mieloperoxidasa (MPO) y el peróxido de hidrogeno en la reacción de dimerización. Tomada de Stefanska y Pawliczak. 2008 (14).

## 5. Mecanismos antioxidantes de las células.

El daño que causan las ROS es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes de las células y los de recambio y reparación; estos mecanismos son diversos y en cada tipo celular, órgano y tejido predominan unos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con funciones variadas, o enzimas que mantienen a raya los compuestos antioxidantes y así mismo otras que eliminan  $\cdot\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  evitando la formación de  $\cdot\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$ . Aparte de todos estos mecanismos muchos otros compuestos y enzimas contribuyen de alguna manera a mantener el equilibrio REDOX de la célula (12)

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que utiliza metales como cofactor, cataliza la dismutación del  $\cdot\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , existen diferentes SOD en los diferentes compartimientos celulares. La catalasa es otra enzima antioxidante, esta cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno, la mayor concentración de esta enzima se encuentra en el citosol y los peroxisomas. Otro mecanismo detoxificante es el sistema del glutatión, que está formado por el glutatión, la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa, y la glutatión S-transferasa. Entre otros compuestos antioxidantes no proteicos encontramos a la vitamina C, la vitamina A, y la vitamina E (7).

## 6. Señalización intracelular y ROS.

Recientemente una gran cantidad de evidencia indica que las ROS juegan un rol central, en las rutas de señalización intracelular en una variedad de procesos celulares. Por este motivo una señalización aberrante por parte de las ROS puede resultar en cambios fisiológicos y patológicos, pudiendo afectar la progresión del ciclo celular, la muerte celular apoptótica, el proceso de envejecimiento, daños isquémicos y diabetes (15). El  $H_2O_2$  juega un papel importante como segundo mensajero que regula la actividad de diferentes proteínas (figura 15) por medio de una oxidación reversible de las proteínas blanco, entre estas se encuentran: proteínas tirosín fosfatasas (PTP), proteínas tirosín cinasas (PTK) y sus receptores (RTK) (7); también participan en vías de señalización como: la vía MAPK/ERK, la vía PI3K/AKT y la vía IKK/  $NF-\kappa B$  (9), que son importantes no solo en procesos de proliferación, crecimiento y supervivencia celular, sino también como mediadores transcripcionales de genes relacionados con la metástasis como las integrinas y las MMPs.

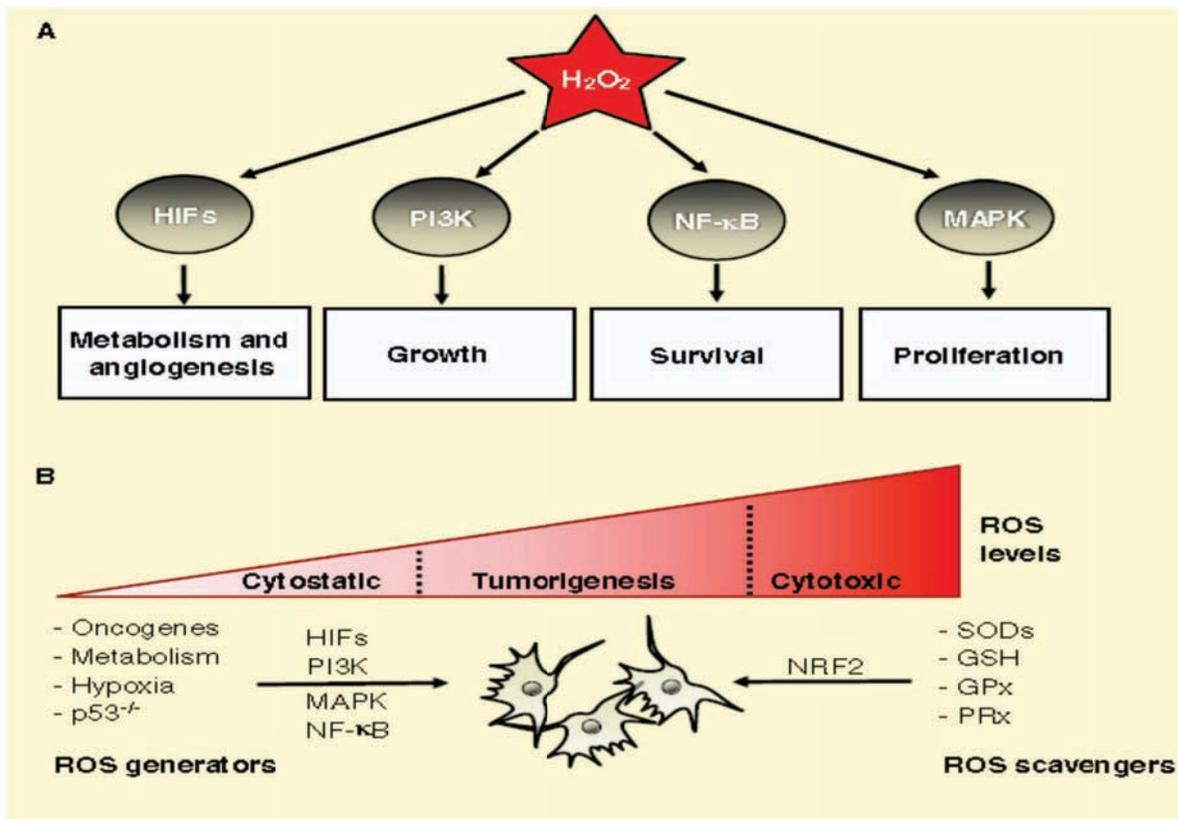


Fig.15. Participación del peróxido de hidrogeno como segundo mensajero en varias vías de señalización. Tomada de Schieber y Chandel, 2014 (36).

## **6.1. ROS y cáncer.**

La migración celular está íntimamente relacionada con la degradación de la matriz extracelular, y las proteasas activas son un prerrequisito para la invasión y metástasis de las células de cáncer (10). El factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB), regula la transcripción de varios genes relacionados con el proceso de invasión del tumor, dentro de estos genes se encuentran algunos que codifican para diversas MMPs, como la MMP-9, MMP-2 y MMP-1, el gen que codifica para la interleucina 8, y el gen que codifica para una molécula particular, el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (16). Este último es miembro del sistema plasminogeno-plasmina, un sistema de degradación proteolítica implicado en procesos fisiológicos y patológicos entre los cuales se encuentra el cáncer, se ha visto que un fallo en la regulación de cualquier componente de este sistema resulta en un favorecimiento para el crecimiento del tumor y metástasis (17).

## **7. El sistema plasminógeno/plasmina.**

El sistema plasminógeno/plasmina, tiene varios componentes: la enzima proteolítica conocida como plasmina, sus activadores el tipo tisular y el tipo uroquinasa, los receptores de plasminógeno así como los receptores de los activadores y varios inhibidores (figura16), todos ellos necesarios para llevar a cabo las funciones de fibrinólisis así como la degradación de la matriz extracelular, importante en varios procesos fisiológicos como el cierre de heridas, angiogénesis e incluso la embriogénesis (17).

La plasmina como la gran mayoría de enzimas proteolíticas, es secretada a manera de un precursor, que asegure que la enzima no llevará a cabo su acción catalítica si no es necesario, este zimógeno es llamado plasminógeno, se encuentra circulando en la sangre constantemente y es secretado por el hígado (13) y el paso de plasminógeno a plasmina es regulado por un conjunto de enzimas activadoras, inhibidores y receptores.

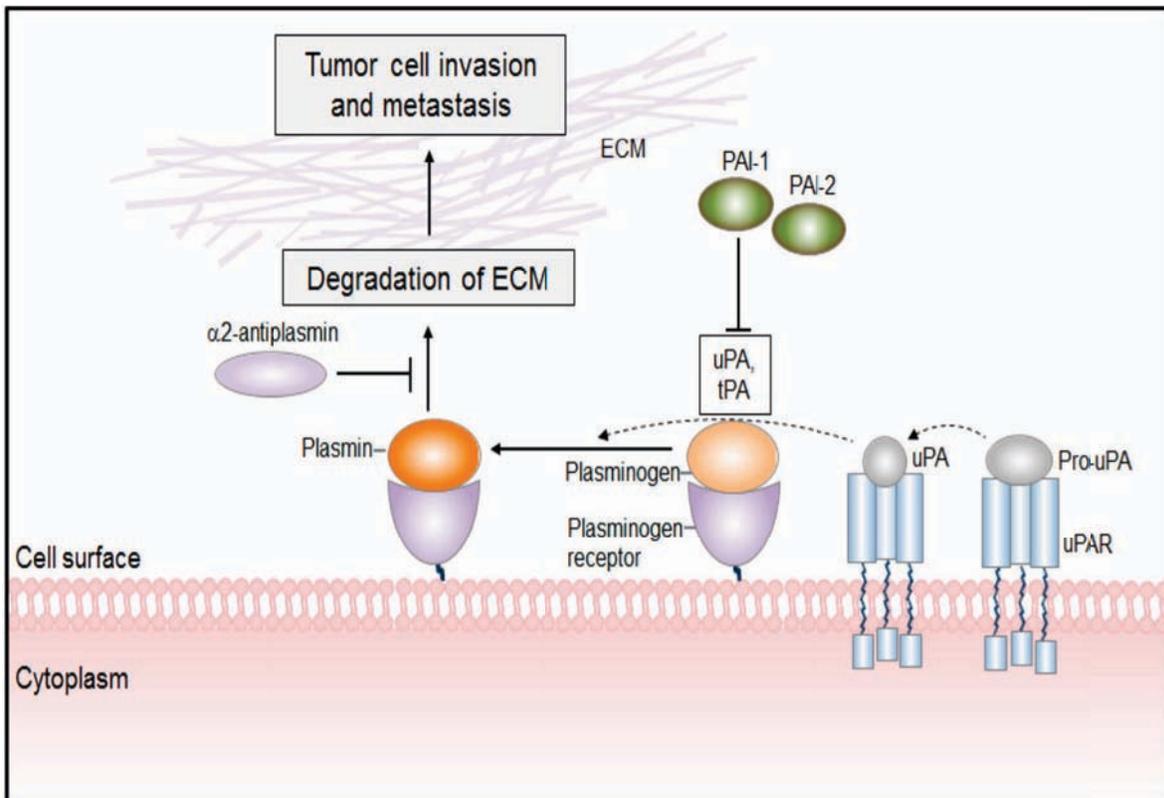


Fig.16. El sistema del plasminógeno/plasmina como mediador de la invasión tumoral y metástasis. Tomada de Didiosava *et.al.* 2014 (17).

### 7.1. Estructura del plasminógeno.

La forma nativa del plasminógeno, es una glicoproteína de una sola cadena llamada Glu-plasminógeno (figura 17) con un ácido glutámico en su extremo amino terminal, con un peso de 93 kDa. En el extremo amino terminal también se encuentra un péptido N terminal que comprende del aminoácido 1 al 77, la cadena posee 5 dominios "kringle" homólogos con aproximadamente 80 aminoácidos cada uno que se pliegan y estabilizan por medio de 3 enlaces disulfuro y el dominio serín proteasa (PD). Esta cadena sencilla sufre una ruptura entre los aminoácidos Arg561-Val562 a cargo de los activadores del plasminógeno, obteniendo así dos cadenas una pesada de 60 kDa y una ligera de 25 que constituyen a la plasmina, el centro activo de la plasmina contiene la triada catalítica, tres aminoácidos que cumplen la función de lisis, Ser741, His603 y Asp646 que se localizan en la cadena ligera. En presencia de cantidades traza de plasmina, el péptido N terminal se rompe, formándose el Lis-plasminógeno con un peso de 85 kDa, quedando la lisina como aminoácido N-terminal.

Una característica específica del sistema es la presencia de sitios de unión a lisina (LBS) en los “kringles”, lo que permite al plasminógeno y plasmina la unión a fibrina,  $\alpha$ 2-antiplasmina, receptores celulares y ligandos extracelulares, cada “kringle” posee una afinidad por lisinas carboxilo terminales. Dependiendo del ambiente celular el Glu-plasminógeno puede adoptar diferentes conformaciones, una conformación cerrada  $\alpha$ , una conformación semiabierta  $\beta$  y una conformación abierta  $\gamma$ , mientras que el Lis-plasminógeno carente del péptido N terminal solo puede adoptar la conformación  $\beta$  o  $\gamma$  y se activa más rápido que el Glu-plasminógeno. (13).

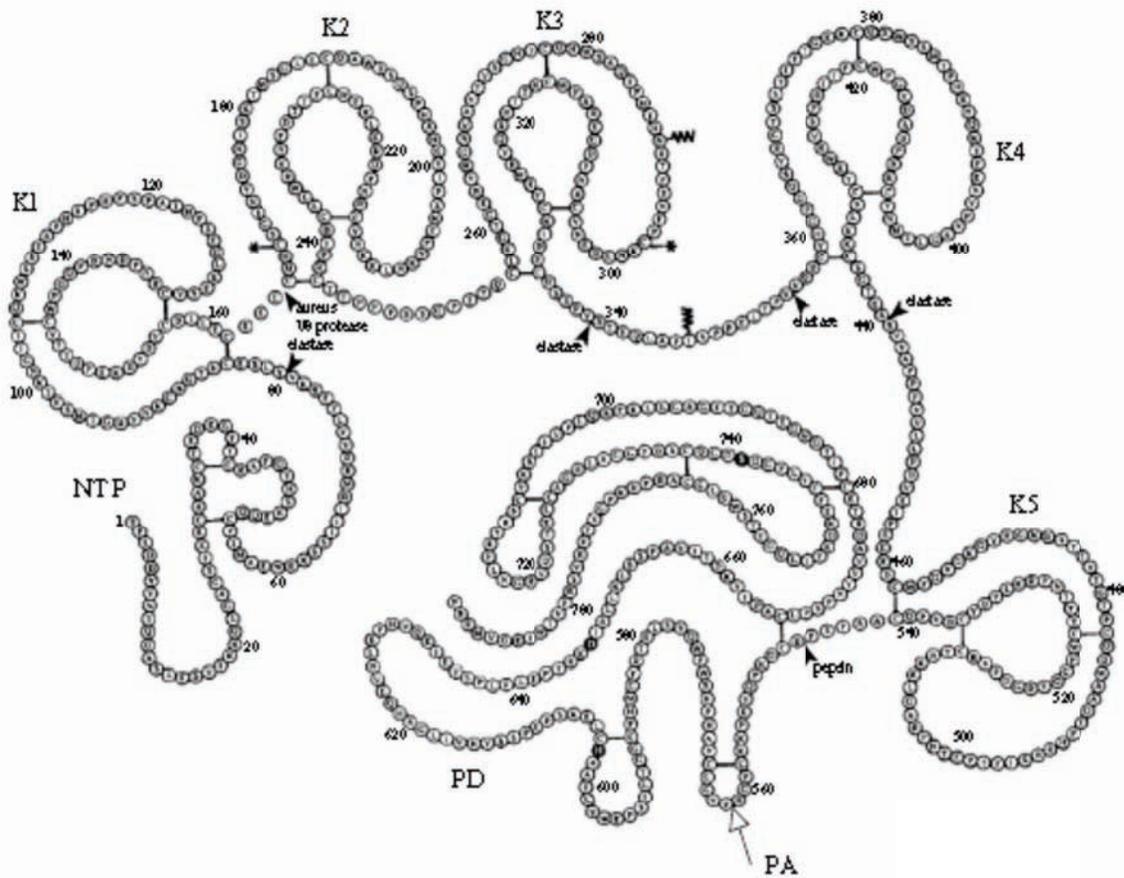


Fig.17. Estructura del Glu-plasminógeno, se muestran los “kringles” (K1, K2, K3, K4 y K5), el péptido N terminal (NTP), el dominio proteolítico (PD) y el sitio de corte para plasmina (PA). Tomada de Asina y Mukhaemetova, 2014 (13).

## **7.2. Activadores del plasminógeno (tPA y uPA).**

Existen dos tipos de activadores, el activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) de 70 kDa y el tipo uroquinasa (uPA) de 33 kDa. El tPA es expresado principalmente en células endoteliales y oocitos, mientras que el uPA se encuentra en leucocitos, macrófagos, fibroblastos y células tumorales; se expresan a manera de precursores de una sola cadena tPA-1 y scuPA, los cuales por acción de la plasmina y la kaliceína son cortados y transformados a su forma activa de doble cadena, que posteriormente cortaran al plasminógeno para llevarlo a su forma activa de plasmina (13).

## **7.3. Receptores del plasminógeno (PGL-R).**

Son un grupo heterogéneo de proteínas de superficie celular que se pueden enlazar al plasminógeno y a la plasmina, se encuentran en procariontes y eucariontes (17). En vertebrados se encuentran en una gran variedad de células incluyendo: monocitos, macrófagos, plaquetas, fibroblastos, células endoteliales e incluso células tumorales. Estos receptores reconocen los sitios LBS de los “kringles” (13).

### **7.3.1 Receptor para tPA (tPAR).**

Se puede encontrar en una gran variedad de células para desarrollar una función, ya sea de pro-fibrinólisis o para ayudar a mejorar el flujo sanguíneo, las células del endotelio vascular son ricas en este tipo de receptor, algunos sitios de enlace son comunes para tPA y plasminógeno, como la anexina II que mejora la tasa de activación del plasminógeno y juega un rol importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo (13).

### **7.3.2 Receptor para uPA (uPAR).**

Es un receptor específico para uPA y scuPA, que se ha encontrado en monocitos y células de cáncer. El enlace de scuPA a uPAR lleva a su transformación en uPA, y a su vez el enlace de este último a uPAR lleva a la ruptura del plasminógeno y a la formación de la plasmina. La activación del plasminógeno por acción de uPA enlazado a uPAR juega un papel importante en la degradación de la matriz, proliferación, migración celular y angiogénesis (13).

## V. Antecedentes.

Previamente se ha visto que una elevada tasa de ROS está presente en células de cáncer, lo que contribuye a la progresión del tumor, inicialmente un tumor primario exhibe un fenómeno de transición epitelio-mesénquima (EMT) lo que le permite adquirir un fenotipo mesenquimatoso y migrar a los tejidos que lo rodean. Hay varios reportes que demuestran que, en un estado de estrés oxidativo crónico, la EMT se puede detonar. Durante este proceso, se resalta la participación de las enzimas NOX como fuente intracelular de ROS (15). En parte la acción de las ROS se debe a la activación de diferentes vías de señalización. Dentro de las ROS, el  $H_2O_2$  actúa como segundo mensajero en varias rutas de señalización como PI3K/Akt e IKK/NF $\kappa$ B (9). NF $\kappa$ B está implicado en la regulación de varios genes que se relacionan con procesos de migración, dentro de los genes regulados por éste factor de transcripción, se encuentra el del uPA, posiblemente involucrado en la degradación de la matriz extracelular durante la migración e invasión. La migración es un fenómeno que requiere de la degradación de la matriz extracelular para lo cual se necesita la activación de proteasas como MMPs, uPA y plasmina, las dos últimas componentes del sistema plasminógeno/plasmina. Dicho sistema desarrolla funciones en la fisiología normal de los organismos, como la fibrinólisis durante la remoción de coágulos sanguíneos, pero se ha visto que un mal funcionamiento en alguno de sus componentes está ligado a la progresión y metástasis tumorales (16, 17).

Estudios recientes demuestran que el uso de antioxidantes inhibe procesos esenciales para el desarrollo y progresión del cáncer, como proliferación y migración en modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in situ*, algunos de estos estudios se mencionan a continuación. Suzuki y Cols (18) probaron la apocinina, un compuesto que inhibe a la enzima NOX en diferentes modelos de cáncer de próstata, encontrando que la apocinina reduce la progresión del cáncer de próstata en el ratón, inhibiendo la proliferación celular, el crecimiento tumoral y la producción de ROS. También mencionan que anteriormente probaron el antioxidante en una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógeno, en donde la apocinina inhibió el crecimiento celular y la angiogénesis, por medio de la inhibición de la fosforilación de Rac 1 y de la activación del NF $\kappa$ B (19). Otros trabajos que apoyan el aquí presentado, son el realizado por Byun y Cols. (20) donde demuestran que la apocinina tiene un efecto inhibitorio en el desarrollo y progresión del cáncer de piel de tipo no melanoma y Komiya y Cols. (21), que encuentran un efecto inhibitorio de la apocinina sobre la actividad de NF $\kappa$ B y su relación con la progresión de cáncer intestinal en

un modelo *in vivo*. También se encuentra el trabajo realizado por Flores-López y Cols. (22) en el que usan la NAC como antioxidante genérico y ven la relación de la producción de ROS con la actividad y expresión de diferentes componentes del sistema plasminógeno/plasmina, en el encuentran que la N-acetil-cisteína, un antioxidante que interactúa con ROS ya generadas, previene la proliferación y el comportamiento migratorio e invasivo promovido por una alta concentración de glucosa (30 mM) en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). Previene también el desarrollo de un fenotipo mesenquimal y la expresión del uPA, su receptor uPAR y su inhibidor PAI-1. Por lo que se sugiere que la promoción de un comportamiento metastásico es mediado por ROS y el sistema plasminógeno/plasmina. Estos trabajos en conjunto demuestran la capacidad de los antioxidantes y en particular de la NAC y la apocinina para detener la progresión de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de mama.

El estudio de uso farmacológico de la apocinina está tomando auge últimamente, debido a que cada vez más, se ha asociado a la producción de ROS por la NADPH oxidasa, con condiciones de estrés metabólico, proinflamatorio o redox, relacionadas con diversas patologías, incluyendo enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer y la diabetes mellitus. El empleo de apocinina nos permite, a su vez, evaluar la importancia de la NOX como productora de ROS.

## **VI. Justificación.**

Un gran número de evidencias sugiere que alteraciones del equilibrio redox y el estrés oxidativo participan en los mecanismos patogénicos y de progresión de diversas enfermedades, incluido el cáncer. En algunas condiciones como las enfermedades metabólicas, asociadas a alteraciones en el metabolismo de la glucosa, hay un aumento del estrés oxidativo y en la incidencia de cáncer, incluido el cáncer de mama. Los mecanismos de asociación entre las aberraciones metabólicas y el cáncer no están bien elucidados, las condiciones de hiperinsulinemia e hiperglicemia, se asocian a estrés oxidativo y a la promoción del desarrollo de cáncer. Es por eso que en este proyecto nos enfocamos en estudiar el efecto de un inhibidor de la producción de ROS por la NADPH oxidasa, una de las principales fuentes de estas especies en las células tumorales y diversos procesos patológicos. También se estudiará el efecto de la apocinina sobre la expresión del activador del plasminógeno, una enzima proteolítica que interviene en los procesos de invasión y metástasis y cuya expresión es regulada por ROS.

## **VII. Objetivos.**

### **1. Objetivo general.**

Evaluar la participación de la NADPH oxidasa en la actividad migratoria y expresión de uPA en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

### **2. Objetivos particulares.**

Evaluar la acción de la apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa sobre:

- a) El crecimiento de la población celular.
- b) La actividad migratoria de las células.
- c) La expresión de uPA y la actividad de uPA.

## **VIII. Materiales y Métodos.**

### **1. Cultivo celular y tratamientos.**

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). Las células se cultivaron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> con medio Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal de bovino (FBS) 10% y antibiótico (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 mg/mL), se incubaron a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzado el 80%-100% de confluencia las células se despegaron por medio de tripsinización y se suspendieron en medio DMEM F12, se centrifugaron a 2700 rpm durante 7 minutos, la pastilla se resuspendió en 1 mL y se traspasó a diferentes cajas de cultivo según el experimento, manteniéndolas en medio DMEM/F12 con suero hasta alcanzar la confluencia, posteriormente se aplicó la apocinina a 0, 2.5, 5, 10 y 15 µM, durante 48 h.

### **2. Crecimiento celular.**

El crecimiento celular fue medido usando el ensayo de sales de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). Se sembraron 5 x 10<sup>3</sup> células por pozo en placas de 96 pozos, en las diferentes condiciones de tratamiento, por 24 y 48 h. Después de esto se agregaron 10 µL del reactivo MTT, y se incubó la placa nuevamente a 37°C por 4 h. Pasado el tiempo se agregó SDS (100 µL) como detergente para disolver los cristales de azul de formazán para después ser

incubados por 2 h para asegurar que la mayor cantidad de cristales se disolvieran, la placa se leyó a 595 nm en un lector de microplaca (iMark, Bio-Rad, EE.UU.). Dado que la formación del formazan a partir de MTT es dependiente de la actividad metabólica de las células, es una medida indirecta de la cantidad de células, que depende de la proliferación y muerte celular, por lo que se considera una medida de la población en total de células vivas.

### **3. Migración celular.**

El método utilizado fue el llamado “wound healing” o de cierre de herida. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en placas de 24 pozos en medio DMEM/F12 con suero, se esperó hasta que se formara una monocapa de células que cubriera la superficie de los pozos, una vez ocurrido esto se procedió a desprender las células en una línea en el centro de la caja dividiendo la monocapa en dos partes con ayuda de una punta de micropipeta estéril de 100  $\mu$ L. Después de esto se colocaron los tratamientos descritos arriba, y se siguió con la captura de imágenes a las 0, 24 y 48 h. Las imágenes se tomaron con ayuda de una cámara CCD (Evolution, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) instalada en un microscopio invertido (Olympus CKX41, Tokyo, Japan). La distancia de la migración se midió en micrómetros ( $\mu$ m) usando el software Q-Capture Pro 7 (QImaging, Inc., Surrey BC, Canada).

### **4. Expresión y actividad de uPA.**

Se usó el método “Western Blot” y zimografía en gel.

#### **4.1. ” Western blot”**

Las células crecidas con los diferentes tratamientos fueron despegadas con ayuda de un raspador, después se colectó el medio de cultivo con las células en suspensión y se centrifugó a 2700 rpm X 7 min. Para cada tratamiento se obtuvo la pastilla y se lavó en 1mL de PBS, esta nueva suspensión se centrifugó a 2700 rpm X 7 min. Se obtuvo una vez más la pastilla y se resuspendió en 50  $\mu$ L de amortiguador RIPA (Pierce RIPA Buffer Cat.89900, Thermo Scientific, Rockford, Il, USA) al cual se le añadió 2  $\mu$ L de coctel de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Cat. 13786, Sigma Aldrich) y la suspensión se dejó reposar por 4 h, para después centrifugarla a 14000 rpm por 15 min, obteniendo el sobrenadante sobre el cual se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (23). Al sobrenadante se le añadió amortiguador de muestra 4X con

mercaptoetanol (33.3  $\mu$ L por cada 100  $\mu$ L), esta mezcla se calentó a 90°C por 5 min y se corrió en geles de electroforesis de poliacrilamida-SDS 10% (SDS-PAGE). Se procedió a la transferencia de proteínas a membranas de PVDF para detectar las bandas de uPA y  $\beta$ -actina, para esto se confirmó la transferencia de proteínas con rojo de Ponceu, después se realizaron tres lavados de 15 min a las membranas con TBS-Tween (TBS 10X 100 mL/L, agua destilada 900 mL/L, Tween 20 1 mL/L). Concluidos los lavados se bloquearon las membranas con una solución TBS-Tween con leche descremada Svelty en polvo al 5% en la que se mantuvieron las membranas por 2 h. Al finalizar los bloqueos se volvió a lavar con TBS-Tween, y se colocó el primer anticuerpo para uPA o  $\beta$ -actina, las membranas se incubaron con estos anticuerpos toda la noche a 4°C. Se retiraron los anticuerpos y se lavaron nuevamente las membranas, para seguir con el segundo anticuerpo específico para el primer anticuerpo y marcado con peroxidasa, este se dejó con las membranas por 2 h a 4°C, y se lavaron nuevamente. Las bandas de expresión se detectaron con ayuda del kit de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad), seguido del uso del escáner C-Digit Blot (LI-COR Biotechnology) y el programa Image Studio 4.0. La intensidad de las bandas se calculó con ayuda del programa Image J 1.49.

#### **4.2. Zimografía para activadores del plasminógeno.**

La obtención de los lisados celulares y la cuantificación de proteínas se hicieron como se mencionó arriba. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% copolimerizados con caseína y plasminógeno. Después de la electroforesis los geles se incubaron en una solución 2% (v/v) de Tritón X100 por 30 min y se incubaron toda la noche a 37°C en una solución de glicina 100 mmol/L y EDTA 10 mmol/L a pH 8.3. Después se tiñeron los geles con una solución de azul de Coomassie 0.5% en 45% de metanol y 10% de ácido acético. Las bandas de proteólisis se observaron como zonas claras en el fondo azul del gel al momento de la tinción. Los geles fueron capturados con el documentador de imágenes, G:Box Gene Documentation System (Syngene, Frederick, MD, USA) y la intensidad de las bandas de lisis se midieron con el programa Image J 1.49.

#### **IX. Análisis estadísticos.**

Los resultados son expresados como la media y desviación estándar ( $X \pm DE$ ) de cada experimento realizado por triplicado. Todos los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA seguida de la técnica de comparaciones múltiples de Turkey con un rango de confianza de 0.05.

## X. Resultados.

### 1. Efecto de diferentes concentraciones de apocinina sobre el crecimiento de la población de células MDA-MB-231.

Las células MDA-MB-231 crecidas en medio con presencia y ausencia de suero fueron expuestas a diferentes concentraciones de apocinina (2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 24 (figura 18 a y b) y 48 (figura 18 c y d) h, utilizando como control células MDA-MB-231 no tratadas con el antioxidante. Los resultados obtenidos muestran un ligero efecto inhibitorio de la apocinina sobre el crecimiento de la población celular que parece ser dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al antioxidante, este efecto es más notorio en las células crecidas con el medio sin suero (b y d). A 24 h la proliferación se inhibió hasta un 19.09% (figura 18 b) en los cultivos sin suero, siendo la concentración de 15  $\mu\text{M}$  donde se obtuvo este valor, mientras que a 48 h la proliferación se inhibió hasta un 23.25%, esto en los cultivos sin suero (figura 18 d) en la concentración de 15  $\mu\text{M}$ .

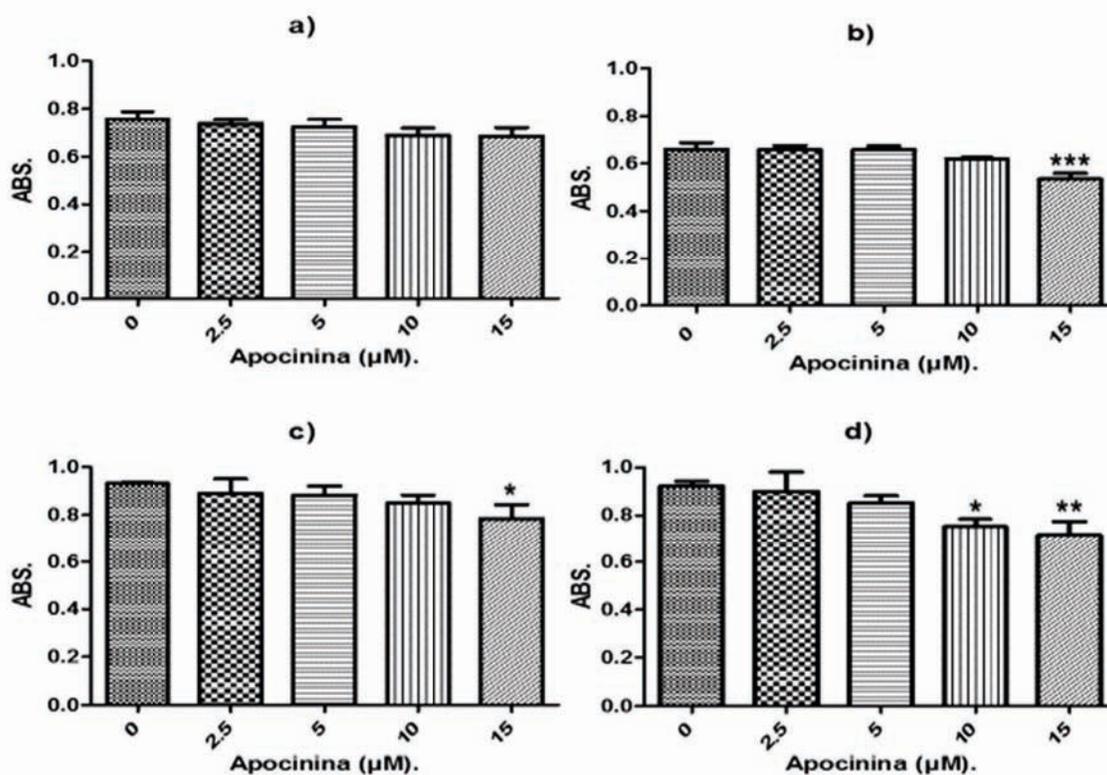


Fig.18. La apocinina inhibe el crecimiento de la población de células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de apocinina, en presencia de suero (a, c) y sin él (b, d), por 24 (a, b) y 48 h (c, d) h. Se muestran la media y desviación estándar ( $X \pm \text{DE}$ ) de 3 experimentos realizados por duplicado. \* $p \leq 0.05$  en relación al control.

## 2. Disminución de la migración de células MDA-MB-231 por apocinina.

Se realizó el experimento de “cierre de herida” para determinar el efecto que las diferentes concentraciones de apocinina tienen sobre la migración celular, las células se trataron por 24 (figura 19 a y b) y 48 (figura 19 c y d) h, encontrándose una reducción en la migración celular dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a la apocinina, nuevamente se vio un mayor efecto inhibitorio sobre las células crecidas en medio sin suero. La migración celular en los cultivos en medio adicionado con suero se redujo hasta un 60.14% a las 24 h (figura 19 a), mientras que a las 48 h se redujo en un 65.83% en la concentración de 15  $\mu\text{M}$  con respecto al grupo control (figura 19 c), mientras que en los cultivos en medio sin suero la migración se redujo hasta un 74.37% a las 24 h (figura 19 b) y un 86.34% a las 48 h (figura 19 d) a una concentración igual que la previamente mencionada.

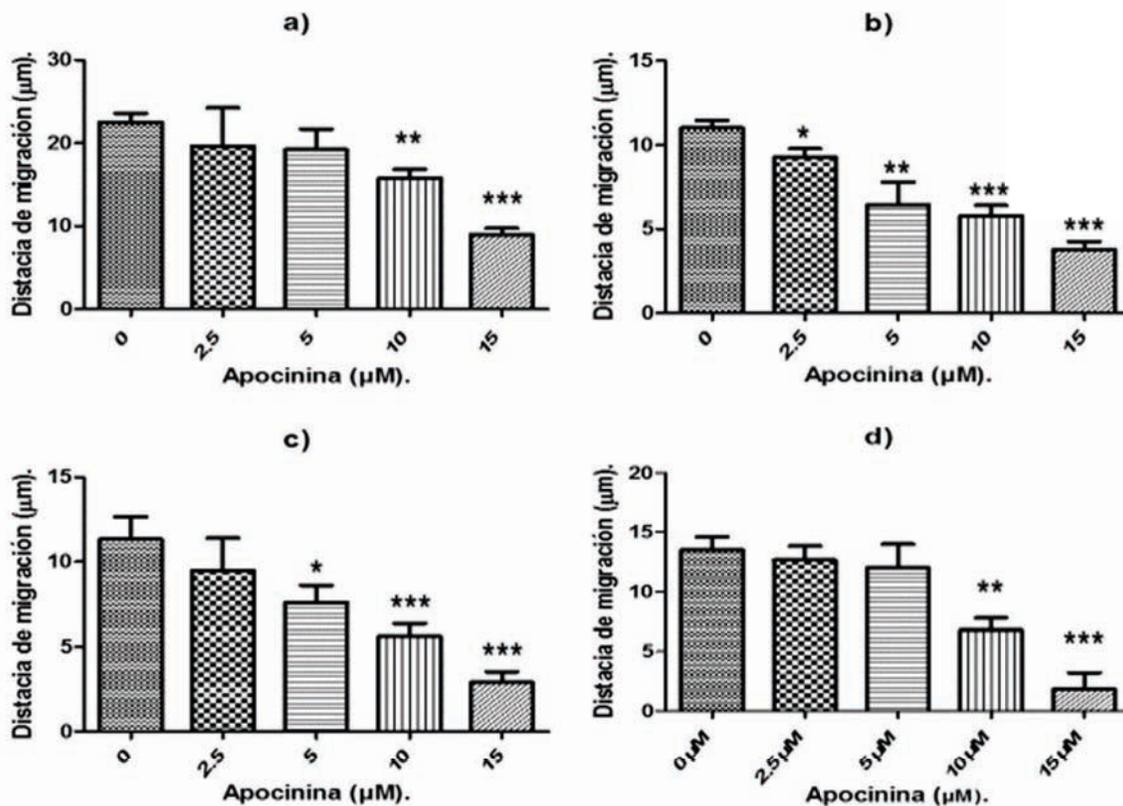


Fig.19. La migración de células MDA-MB-231 se ve inhibida por acción de la apocinina. Se muestran los resultados de los cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de apocinina en presencia de suero (a, c) o sin él (b, d) por 24 h (a y b) y 48 h (c y d). Se muestran la media y desviación estándar ( $X \pm DE$ ) de 3 experimentos realizados por duplicado. \* $p \leq 0.05$  en relación al control.

**0 h**

**24 h**

**48 h**

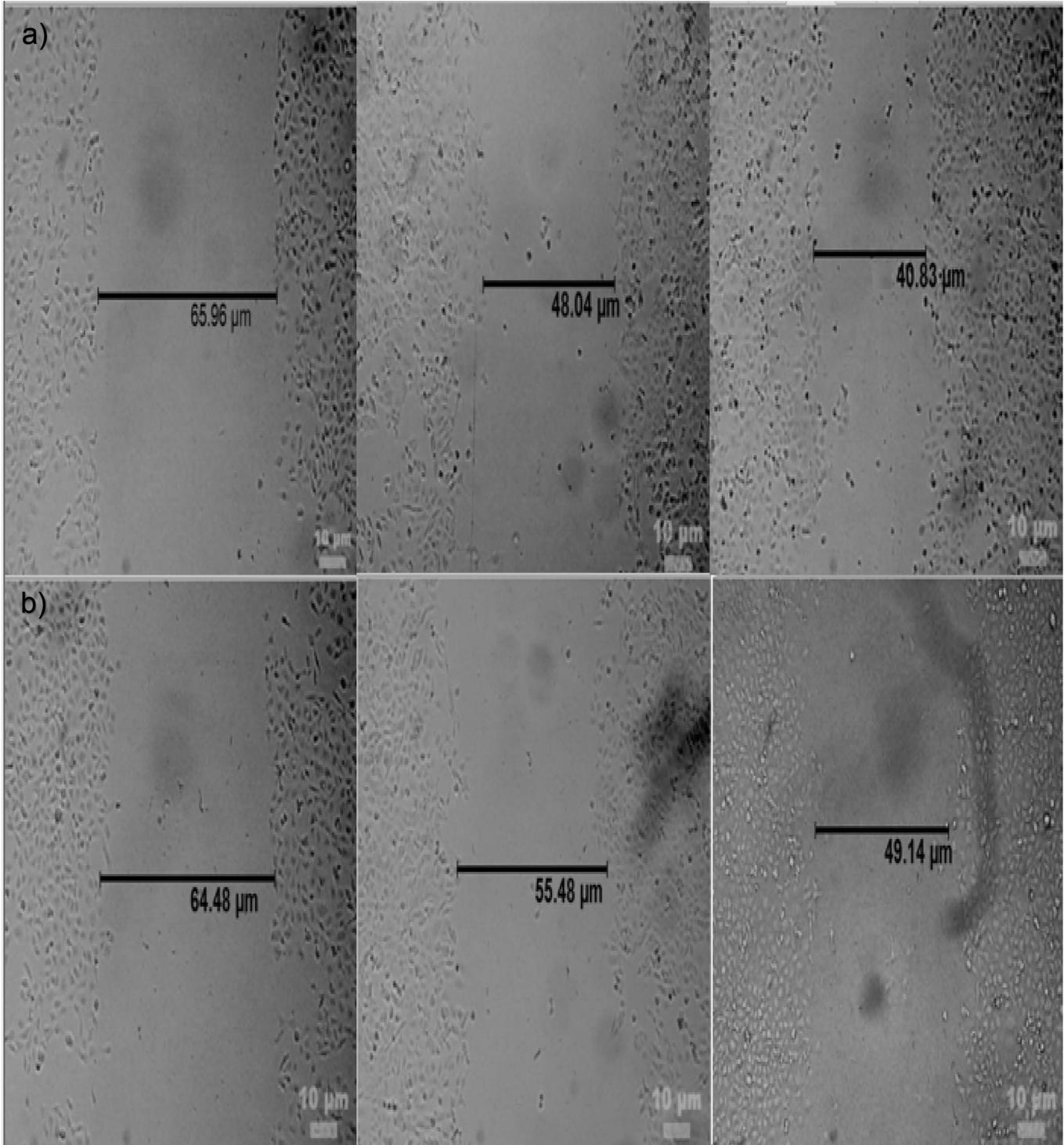


Fig.20. Imágenes representativas del ensayo de migración en cultivos celulares crecidos sin suero. Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido con el objetivo 10X. Se presentan las imágenes del grupo control (a) y el tratamiento con apocinina 15  $\mu\text{M}$  (b) a 0, 24 y 48 horas.

**0 h**

**24 h**

**48 h**

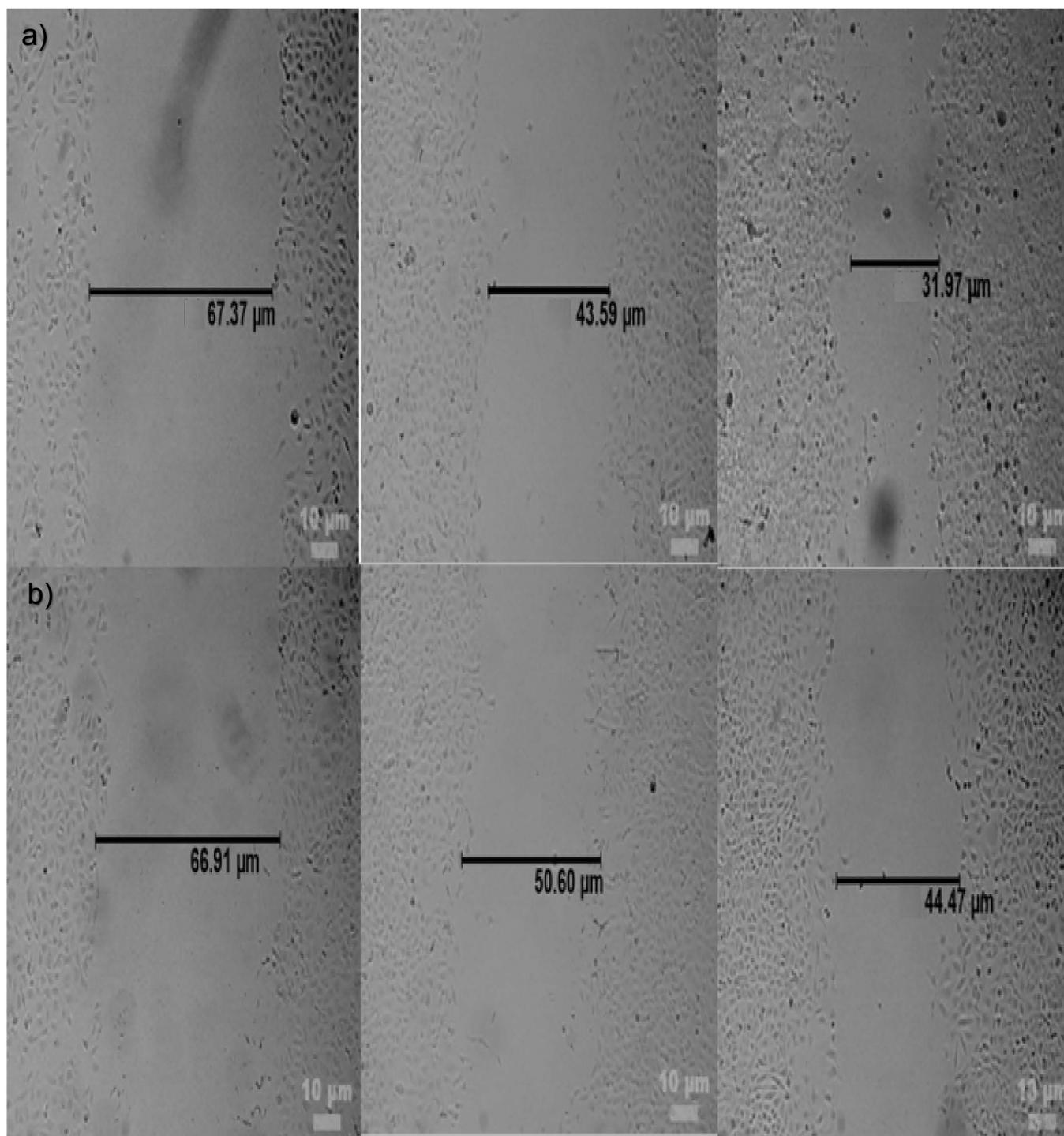


Fig.21. Imágenes representativas del ensayo de migración en cultivos celulares crecidos con suero. Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido con el objetivo 10X. Se presentan las imágenes del grupo control (a) y el tratamiento con apocinina 15 μM (b) a 0, 24 y 48 horas.

### 3. Análisis de la actividad y expresión del activador de plasminogeno tipo uroquinasa en lisados celulares tratados con apocinina.

Por medio de zimogramas en geles copolimerizados con caseína y plasminogeno se detectaron bandas de lisis correspondientes al activador del plasminogeno uPA en cultivos celulares expuestos al antioxidante por 48 h (figura 22), los datos obtenidos muestran un comportamiento del activador no esperado, pues tanto para los lisados crecidos con suero (figura 22 a) como los crecidos sin suero (figura 22 b) la actividad proteolítica no se ve afectada por las diferentes concentraciones de apocinina. Por otro lado, el análisis de “western blot” (figura 23) corrobora el resultado anterior, pues los niveles de expresión de uPA no se ven afectados en ninguna de las diferentes concentraciones de antioxidante utilizadas, tanto para los cultivos con suero (figura 23 a) como los cultivos sin suero (figura 23 b). Sin embargo, el análisis densitométrico tanto para los zimogramas como para los “western blot” muestra una tendencia a la disminución conforme va aumentando la concentración de apocinina.

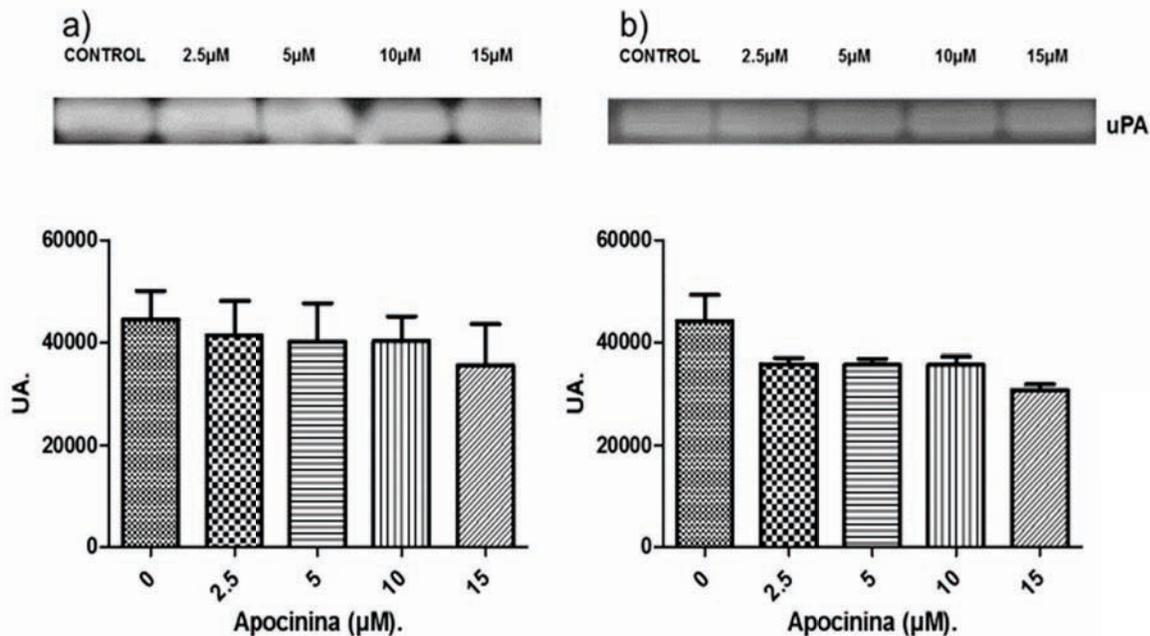


Fig.22.Evaluación de los niveles de uPA por zimografía en gel. La actividad proteolítica de uPA fue detectada a las 48 h de exposición a apocinina en lisados celulares de células crecidas con suero (a) o sin suero (b). En los paneles superiores se muestran zimogramas representativos, en los inferiores el análisis densitométrico. Se muestran la media y desviación estándar ( $X \pm DE$ ) de 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p \leq 0.05$  en relación al control.

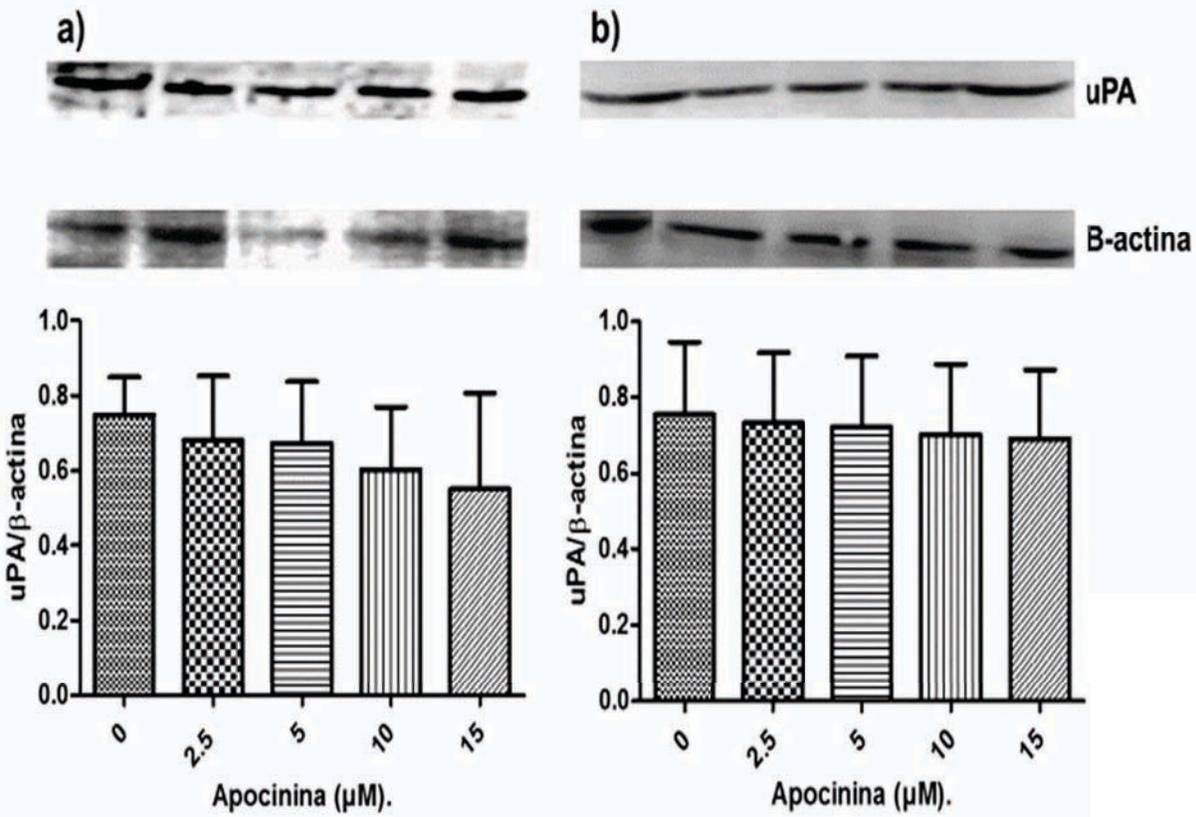


Fig.23. Análisis de los niveles de expresión de uPA a nivel de proteína. Se muestran los “western blot” realizados de los lisados celulares con suero (a) y sin suero (b) expuestos a apocinina por 48 h. Similar a lo que ocurre en los zimogramas se ve una tendencia a la reducción en los niveles de expresión de la proteína, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Se muestran la media y desviación estándar ( $X \pm DE$ ) de 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p \leq 0.05$  en relación al control.

## XI. Discusión.

Diversas evidencias sugieren que alteraciones en el equilibrio redox celular así como el estrés oxidativo tienen importancia en el desarrollo de diversas patologías, entre ellas el cáncer. Las ROS se han detectado en cantidades anormales en la mayoría de los diferentes tipos de cáncer, se sabe que están involucradas en procesos importantes para la progresión y desarrollo del tumor (7), sin embargo los mecanismos por los cuales actúan aún no están bien comprendidos, de ahí el creciente interés en estas moléculas como blancos terapéuticos. En el presente trabajo encontramos que la apocinina en tiempos cortos y dosis moderadas inhibe la actividad migratoria de células de cáncer de mama triple negativas e

invasivas, las MDA-MB-231, pero solo inhibe ligeramente el crecimiento de la población, sin tener un efecto notorio en la expresión de uPA.

Los resultados encontrados en los ensayos de proliferación muestran que la inhibición de ROS por parte de la apocinina resulta en un decremento de hasta el 23.25%. En el crecimiento de la población de las células de cáncer de mama, con una concentración de apocinina 15  $\mu\text{M}$ , por 48 h en ausencia de suero; sin embargo, este efecto se ve atenuado por la presencia de FBS en el medio de cultivo, lo atribuimos a que el suero funciona como una fuente extra de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento que promueven la proliferación celular y en parte que la apocinina se puede absorber a proteínas séricas como la albúmina lo que puede disminuir su disponibilidad. Nuestros resultados concuerdan con la acción inhibitoria de la apocinina, observada en el crecimiento de la población de células troncales de ratón (24) en un mecanismo mediado por la inhibición de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. También inhibe el crecimiento en células de cáncer de prostata andrógeno dependiente LNCaP de humano (18) y PLS10 de rata e independiente de andrógenos (19); aunque a concentraciones de apocinina de 100 a 1000  $\mu\text{M}$ , mucho mayores a las empleadas por nosotros. La acción inhibitoria sobre la proliferación ha sido confirmada *in vivo*; ya que este compuesto reduce el marcaje de células para Ki-67, un indicador de proliferación celular, en un modelo transgénico de rata para adenocarcinoma (TRAP) (18), en este caso la acción inhibitoria de apocinina fue mediada por la inactivación de la vía de la MEK/ERK 1/2, lo que se infirió, al encontrar una menor fosforilación de ERK, siendo ésta vía importante en la división celular. En células de cáncer de mama la proteína ERK1/2 puede ser activada directamente por  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se obtiene como un subproducto del metabolismo del estrógeno o como el resultado de la dismutación del  $\cdot\text{O}_2$  (7); debido a que la apocinina inhibe la segunda fuente más importante de ROS en las células, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se debe de reducir considerablemente.

Usando el ensayo de migración celular encontramos que la apocinina reduce la migración en un 86.34%, viéndose un efecto menor en los tratamientos adicionados con suero, esta disminución del efecto de la apocinina se puede atribuir nuevamente a la presencia de factores séricos que promuevan la migración o a la disminución de la disponibilidad de apocinina por su absorción a proteínas séricas; sin embargo, el efecto inhibitorio de la apocinina sobre la migración celular, sigue siendo importante en presencia de suero. A diferencia de lo encontrado en éste trabajo y los antes discutidos, la apocinina no afectó la migración de células de cancer de mama MDA-MB-435, aunque si lo hacen algunos

derivados de la oxidación de apocinina en condiciones alcalinas (25). Adicionalmente apocinina también inhibe la migración de células humanas de cáncer de pulmón, estimuladas con el factor de crecimiento hepático (HGF) (26) y en células de glioma U251 bajo hipoxia (27). Otro trabajo más reciente, en el que evalúan los monómeros y homodímeros de vanilina y apocinina en células de hepatocarcinoma humano HepG2 encuentran el mismo efecto inhibitorio de la apocinina en la migración, explicando que esto es mediado por la acción de la apocinina sobre la ruta de señalización activada por integrinas y cinasa de adhesión focal (FAK) en particular la vía PI3K/Akt (28). También concuerda con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (22) donde se encontró una reducción en la migración de células MDA-MB-231, sin embargo utilizando un antioxidante genérico N-acetil-cisteína.

Uno de los procesos principales para la progresión del cáncer es la migración celular, y este a su vez está regulado por varios factores entre los que destaca la degradación de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas como las MMPs o del sistema plasminógeno-plasmina (29). Una de las posibles explicaciones para la reducción de la migración celular es que NF $\kappa$ B un factor de transcripción relacionado con la expresión de enzimas proteolíticas, se está inhibiendo, se sabe que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede activar la señalización de este factor de transcripción por diferentes medios, aumentando la concentración de la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) o promoviendo la fosforilación y degradación de IKK (7, 10, 15). Debido al efecto inhibitorio de la apocinina sobre la producción de ROS por parte de la enzima NOX, se asume que los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> están disminuidos; por lo que se espera a su vez que la reducción en esta molécula, reduzca la actividad proteolítica de las células de cáncer de mama sobre la matriz extracelular y de como consecuencia una reducción en la migración.

Las enzimas proteolíticas son mediadoras en las alteraciones encontradas en el microambiente tumoral para la progresión del cáncer, en el crecimiento tumoral juegan un papel importante en la degradación del tejido conectivo y componentes de la matriz extracelular, estas interacciones permiten a las células volverse menos adherentes y por lo tanto tienen más posibilidades migrar e invadir otros tejidos (30). Lo sugerido por los resultados de los experimentos de migración celular, era que la actividad de uPA estaría disminuyendo al igual que su expresión debido a la acción de la apocinina, sin embargo, no fue así, los zimogramas de los lisados celulares no mostraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de apocinina, tanto para los cultivos con suero como para

los cultivos sin suero (figura 22). uPA es una proteína relacionada con la progresión de distintos tipos de cáncer (31,32) y que ha sido considerada como un marcador para la detección del mismo (33). Hay estudios en los que miden la expresión de uPA en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, encontrando que la línea celular MDA-MB-231 presenta las concentraciones más altas de esta enzima, cerca de un 26 % más, en relación con la línea celular MCF-7 y la MDA-MB-235 (32,34), presentando a este fenotipo de cáncer de mama como uno de los más invasivos. En el trabajo realizado anteriormente en este laboratorio (22), la exposición a NAC reduce significativamente la actividad y expresión de uPA, sin embargo, los mecanismos de acción entre el NAC y la apocinina varían enormemente, pues el NAC es una molécula que funciona como una fuente de grupos sulfhidrilos y acarreadores de radicales libres que interactúan con ROS como el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno conduciendo a su inactivación, también es capaz de bloquear la ruta de NF- $\kappa$ B/IKK evitando que IKK se libere de NF- $\kappa$ B, además suprime la expresión de cinasas de la familia MAPK como ERK y p38 (35), dejando claro que sus efectos en las células comparados con los que podría tener la apocinina son de más amplio espectro, dando una posible explicación al porqué de los resultados obtenidos con respecto a la actividad de uPA. Otra alternativa puede ser que las grandes concentraciones de uPA en la línea celular ya mencionada, sean demasiado altos, por lo que se necesitaría una mayor concentración de apocinina a la máxima utilizada en este estudio para ver un efecto inhibitorio en la actividad de uPA por parte del antioxidante, esto va apoyado por el hecho de que ésta proteasa también es secretada al medio extracelular y que los zimogramas de los medios de cultivo (resultados no mostrados) tampoco presentan diferencias entre los tratamientos. Por otro lado, viendo los resultados arrojados por el “western blot” que no muestran diferencia en los niveles de expresión de uPA en los diferentes tratamientos, sugiere otra explicación, esta es que quizá los procesos proteolíticos que este mediando la apocinina y que están relacionados directamente con los procesos de migración celular vayan entorno a otros sistemas de degradación de proteínas como las MMPs y no hacia el sistema plasminógeno-plasmina. Una última posibilidad es que el efecto de apocinina sea independiente de su acción en la disminución de especies reactivas de oxígeno, lo que se ha encontrado para la acción de la apocinina a concentraciones de 5 a 10 veces más altas, en algunos modelos experimentales (24). Todo lo anterior hace ver la relevancia que la producción de ROS por fuentes específicas tiene sobre la proliferación y la migración celular, procesos importantes en la progresión del cáncer, y a su vez apoya la necesidad

de seguir explorando las implicaciones que las distintas fuentes de ROS tienen en el desarrollo de diversas patologías, no solo en el cáncer.

## **XII. Conclusiones.**

De nuestros resultados podemos concluir que:

-La apocinina reduce la proliferación celular, así como la migración de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, lo que puede estar asociada a una acción inhibitoria sobre la activación de la vía de señalización FAK/PI3K/Akt o IKK/NFkB.

-Se requiere la evaluación de las ROS para establecer que en nuestro modelo experimental la apocinina está inhibiendo su producción y discutir su participación en los efectos observados.

-La apocinina no muestra un efecto en la actividad y expresión de uPA, lo que sugiere el uso de una concentración mayor a 15  $\mu$ M para ver una reducción en uPA, o que los procesos proteolíticos mediados por uPA no se ven afectados por la apocinina, pero podría estar afectando a otros sistemas proteolíticos extracelulares, como el de las MMPs.

## **XIII. Perspectivas.**

Tomando en cuenta las partes inconclusas en el proyecto y las diferentes posibilidades que se dan para explicar los resultados obtenidos, se propone medir la concentración de ROS en los cultivos celulares para saber con certeza la manera en que la apocinina está actuando, también se podría ver los efectos que ésta tiene en una línea celular menos metastática como la MCF7, para saber si los efectos encontrados en relación a la actividad y expresión de uPA realmente se debe a los altos niveles de expresión de uPA en la línea MDA-MB-231, también sería conveniente excluir otros sistemas de degradación proteolítica realizando pruebas para ver la actividad y expresión de otras proteasas, específicamente las MMPs. Del mismo modo debido a las diferentes vías de señalización que se mencionan pueden verse afectadas por la disminución de ROS intracelular y que podrían explicar los resultados obtenidos en las pruebas de migración y proliferación, habría que tratar de ver

la expresión de ciertas proteínas clave que participen en esas rutas, para dilucidar mejor el mecanismo de acción que tienen las ROS sobre estos procesos.

#### **XIV. Bibliografía.**

1. Bertram S. J., 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 21:167-223.
2. Hanahan D., Weinberg R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144: 646-674.
4. INEGI. 2015. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
5. American Cancer Society. 2015. *Global cancer facts & figures* 3rd Edition. American Cancer Society, Atlanta, EE.UU.
6. American Cancer Society. 2014. Guide of breast cancer. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-deseno-que-es-que-es-cancer-de-seno>
7. Liou G. Y., Storz P., 2010. Reactive species of oxygen in cancer. *Free Radicals Research*. 44(5):479-496 DOI 10.3109/10715761003667554.
8. Bedard K., Krause K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiology Review*. 87:245-313.
9. Ding S, Li C, Cheng N, Cui X, Xu X, Zhou G. 2015. Redox regulation in cancer stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 750798 DOI 10.1155/2015/750798.
10. Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, Huseby N-E, Winberg J-O. 2008. The role of reactive species of oxygen in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connective Tissue Research*. 49: 197-202.
11. Toshikazu Y., Yuji N. 2002. What is oxidative stress? *Journal of Japan Medical Association*. 45: 1549-1553.
12. Cea-Bonilla A., Del Arenal-Mena I., Riveros-Rosas H., Vázquez-Contreras E. 2002. Biología de las especies reactivas de oxígeno. *Mensaje bioquímico*. 26:19-54.
13. Aisina B., Mukhametova I. 2014. Structure and function of plasminogen / plasmin system. *Russian Journal of Biorganic Chemistry*. 40: 590-605.
14. Stefanska J., Pawliczak R. 2008. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation*. 2008:106507 DOI 10.1155/2008/106507.

15. Weng-She W. 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Review*. 25: 695-705.
16. Aggarwal BA. 2004. Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. *Cancer cell*. 6:203-208.
17. Didiasova M., Wujak L., Wygrecka M., Zakrzewicz D. 2014. From plasminogen to plasmin: Role of plasminogen receptors in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(11):21229-52 DOI 10.3390/ijms151121229.
18. Suzuki S, Shiraga K, Sato S, Punfa W, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Shirai T, Takahashi S. 2013. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Science*. 104(12):1711-7.
19. Suzuki S, Pitchakarn P, Sato S, Shirai T, Takahashi S. 2013. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65: 1035-1041.
20. Byun S, Lee E, Jang J. Y, Kim Y, Lee W. L. 2016. The NADPH oxidase inhibitor apocynin inhibits UVB-induced skin carcinogenesis. *Experimental Dermatology*. 25:475-494.
21. Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. 2015. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-A<sup>y</sup> and Apc mutant Min mice. *Cancer Science*. 106:1499-1505.
22. Flores-Lopez L. A., Martinez-Hernandez M. G., Viedma-Rodriguez R., Baiza-Gutman L. A. 2016. High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer derived-cells. *Cellular Oncology*. 39(4):364-378. DOI 10.1007/s13402-016-0282-8.
23. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-75.
24. Kučera J, Binó L, Štefková K, Jaroš J, Vašíček O, Večeřa J, Kubala L, Pacherník J. 2016. Apocynin and diphenyliodonium induce oxidative stress and modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk activity in mouse embryonic stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. 2016:7409196. DOI 10.1155/2016/7409196.
25. Klees R.F, De Marco P. C, Salasznyk R. M, Ahuja D, Hogg M, Antoniotti S, Kamath L, Dordick J. S, Plopper G. E. 2006. Apocynin derivatives interrupt intracellular signaling resulting in decreased migration in breast cancer cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006: 87246. DOI 10.1155/JBB/2006/87246.

26. Lirdprapamongko, K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, Svasti J. 2009. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3055–63.
27. Xu CS, Wang ZF, Huang XD, Dai LM, Cao CJ, Li ZQ. 2015. Involvement of ROS-alpha v beta 3 integrin-FAK/Pyk2 in the inhibitory effect of melatonin on U251 glioma cell migration and invasion under hypoxia. *Journal of Translational Medicine*. 13: 95.
28. Phatcharida J, Kriengsak L, Wilailak K, Charnsak T, Kiattawee C, Korakot A, Somsak R, Jisnuson S. 2017. Homodimers of vanillin and apocynin decrease the metastatic potential of human cancer cells by inhibiting the FAK/PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65: 2299-2305.
29. Gialeli C, Theocharis A, Karamanos NK. 2011. Role of matrix metalloproteinase in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal*. 278: 16-27. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.
30. Coronato S, Laguens G, Di Giloramo V. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en la patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)*. 72:495-502.
31. Stillfried G. E, Saunders D. N, Ranson M. 2007. Plasminogen binding and activation at the breast and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. *Breast Cancer Research*. 9: R14. DOI: 10.1186/bcr1647.
32. Dass K, Ahmad A, Azmi S.A, Sarkar S.H, Sarkar H. F. 2008. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treatments Reviews*. 34: 122-136.
33. McMahon B.J, Kwaan H.C. 2015. Components of plasminogen-plasmin system as biologic markers for cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 867:145-56. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0\_10.
34. Hols-Hansen C, Johannesen B, Hoyer-Hansen G, Romer J, Ellis V, Brünner N. 1996. Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Clinical and Experimental Metastasis*. 14: 297-307.
35. Zafarullah M, Li W. Q, Sylvester J, Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 6-20.
36. Schieber M, Chandel NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 24(10): 453-62.