

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MUERTE CELULAR PROGRAMADA 4 (PDCD4) INHIBE LA PROGRESIÓN DE
CÁNCER DE MAMA INDUCIDA POR LEPTINA Y COX-2.**

T E S I S

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

Q.B.P. VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA

MAYO, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MUERTE CELULAR PROGRAMADA 4 (PDCD4) INHIBE LA PROGRESIÓN DE
CÁNCER DE MAMA INDUCIDA POR LEPTINA Y COX-2.**

POR

Q.B.P. VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. YOLANDA GUTIERREZ PUENTE

DIRECTOR EXTERNO:
Dra. ANA M. TARI

CO-DIRECTOR:
Dr. ARTURO CHÁVEZ REYES

MAYO, 2012

**MUERTE CELULAR PROGRAMADA 4 (PDCD4) INHIBE LA PROGRESIÓN DE
CÁNCER DE MAMA INDUCIDA POR LEPTINA Y COX-2.**

COMITÉ DE TESIS

Director Interno: Dra. Yolanda Gutiérrez Puente

Director Externo: Dra. Ana María Tari

Co-Director: Dr. Arturo Chávez Reyes

Secretario: Dr. Pablo Zapata Benavides

1er. Vocal: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

2do. Vocal: Dra. Diana Reséndez Pérez

3er. Vocal: Dr. Arturo Chávez Reyes

Alumno: Q.B.P. Vianey González Villasana

ÍNDICE

Sección	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
Capítulo 1.	
ANTECEDENTES	1
1.1. Cáncer de mama.....	1
1.2. Leptina.....	3
1.3. Ciclooxygenasa-2 (COX-2).....	7
1.4. Invasión celular, Metaloproteinasas e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2).....	13
1.5. Resistencia a tamoxifeno inducida por leptina y COX-2.....	16
1.6. JNK (Jun N-terminal quinasa).....	18
1.7. ERK (Quinasa reguladora de señales extracelulares) y JAK2/STAT3 (Janus quinasa2/transductor de señal y activador de la transcripción 3).....	19
1.8. Proteína de Muerte Celular Programada 4 (PDCD4).....	20
Capítulo 2.	
RESUMEN	24
INTRODUCCIÓN	25
2.1. HIPÓTESIS.....	27
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	28
2.3. OBJETIVOS PARTICULARES.....	28

2.4. MATERIAL Y MÉTODOS	29
2.4.1. Líneas celulares tumorales.....	29
2.4.2. Ensayo de invasión en Matrigel.....	29
2.4.3. Transfección de las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2.....	30
2.4.4. Extracción de RNA total y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).....	31
2.4.5. Western Blot.....	32
2.4.5.1. Obtención de las muestras	32
2.4.5.2. Preparación de las muestras.....	32
2.4.5.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	32
2.4.5.4. Inmunoelectrotransferencia.....	33
2.4.6. Ensayo de viabilidad celular (MTS).....	34
2.5. RESULTADOS	35
2.5.1. PDCD4 inhibe la invasión inducida por leptina en las células de cáncer de mama MCF-7.....	35
2.5.2. TIMP-2 es esencial para que PDCD4 inhiba la invasión inducida por leptina en células de cáncer de mama MCF-7.....	38
2.5.3. El silenciamiento de TIMP-2 permite la activación de ERK1,2 y STAT3 inducida por leptina en las células MCF-7/PDCD4.....	42
2.5.4. PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina.....	44
2.6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	46
 Capítulo 3.	
RESUMEN	49
INTRODUCCIÓN	50
3.1. HIPÓTESIS.....	52
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	53
3.3. OBJETIVOS PARTICULARES.....	53
3.4. MATERIAL Y MÉTODOS	54

3.4.1. Cultivo celular.....	54
3.4.2. Reactivos.....	54
3.4.3. Western blot.....	55
3.4.4. Extracción nuclear de proteínas.....	55
3.4.5. Ensayo de invasión en Matrigel.....	56
3.4.6. Ensayo de viabilidad celular (MTS).....	57
3.5. RESULTADOS.....	58
3.5.1. La sobreexpresión de COX-2 incrementa los niveles de JNK fosforilado.....	58
3.5.2. La inhibición de JNK disminuye la invasión de las células MCF-/COX-2.....	61
3.5.3. La inhibición de JNK no incrementa la sensibilidad de las células MCF-7/COX-2 a tamoxifeno.....	64
3.5.4. PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por PGE ₂	65
3.6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	67
CONCLUSIÓN GENERAL.....	71
APÉNDICE.....	73
LITERATURA CITADA.....	79

DEDICATORIA.

A Dios: Por estar siempre conmigo, por todo lo que me ha dado y brindarme paciencia y fuerza para no desistir y cumplir mis objetivos.

A mis Padres: María Isabel Villasana de González y Fernando González Sánchez por confiar siempre en mi, por su paciencia e invaluable consejos, pero sobre todo por cuidar de mi hijo Christopher como si fueran sus padres en nuestra ausencia, que Dios los bendiga siempre.

A mi hijo Christopher: Por ser la inspiración que me dio fuerza en todo momento para cumplir esta meta. Christopher perdóname por el tiempo que tuve que sacrificar lejos de ti, jamás volveré a separarme de ti, te amo, eres lo más hermoso e importante en mi vida, gracias por ser mi hijo, por ser fuerte y por ser el motor que me ayuda a funcionar y ser mejor cada día.

A Cristian: Que en los últimos años me ha apoyado e impulsado a alcanzar esta meta, que en los momentos difíciles a permanecido a mi lado y ha sido mi soporte para no darme por vencida, que ha compartido conmigo alegrías, penas, sacrificios y noches en vela, pero sobre todo porque ha sido mi amor y compañero incondicional.

A mis hermanos Diana Elizabeth, Luis Mario y Fernando: Por creer en mí, por todo su cariño y porque han sido el motivo de mi superación.

A mi hermana Diana: Por sus incontables consejos, su compañía, cariño, apoyo y comprensión.

A mis Abuelos: María de la Luz Sánchez Reyes, Guadalupe González Cisneros e Ismael Villasana Sánchez por todos los buenos momentos vividos, enseñanzas que me brindaron, porque los amo y extraño.

A mi abuelita Juana Sánchez Velásquez: Por todo su apoyo, enseñanzas, consejos y el amor que me ha brindado.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a tres instituciones sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible. Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto. **A la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la Ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México y al MD Anderson Cancer Center de la Universidad de Texas en la Ciudad de Houston TX, USA específicamente al Laboratorio de Acarreadores de Drogas en el Departamento de Terapia Experimental:** Por la gran oportunidad que me dieron de formar parte de los mismos y el inmenso apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana M. Tari, Dra. Yolanda Gutiérrez Puente, Dr. Arturo Chávez Reyes, Dr. René Nieves Alicea, DDR Gabriel Lopez-Berestein y al Maestro en Ciencias José Luis Méndez. Porque gracias a ustedes comencé y culminé esta meta en mi vida, por creer y confiar en mí, por sus invaluable consejos y su asesoría científica, por estimularme a seguir creciendo profesional y personalmente, pero sobre todo por concederme la dicha de contar con su valiosa amistad.

Al Maestro en Ciencias Cristian Rodríguez Aguayo: Por el gran apoyo y colaboración brindados en esta investigación, al compartirme sus conocimientos y experiencia científica.

A Vanity McMurtry, Armando Huaranga, Dr. Pablo Vivas Mejía y Dra. Juliana M Benito: Por su colaboración en el desarrollo de esta tesis, su disposición incondicional en aclarar mis dudas, compartirme sus experiencias en el ámbito científico y por su gran amistad.

I would like to express my sincere gratitude to my external Advisor **Dr Ana M. Tari** for give me the opportunity of work with her, for trust in me, for her patience, continuous support and guidance, for helping me all the time and share her experience and knowledge, for her invaluable friendship. Thank you very much Ana.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN COLABORACION CON EL
LABORATORIO DE ACARREADORES DE DROGAS EN EL DEPARTAMENTO
DE TERAPIA EXPERIMENTAL EN EL MD ANDERSON CANCER CENTER DE
LA UNIVERSIDAD DE TEXAS EN LA CIUDAD DE HOUSTON, TX, U.S.A.**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	Acido araquidónico
Akt/GSK3	Serina/treonina quinasa/glucógeno sintasa quinasa 3
AP-1	Proteína activadora-1
ATCC	American type cell culture
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
BCL-2	Linfoma de células B-2
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cdk2	Quinasa dependiente de ciclina 2
CO₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
COX-3	Ciclooxigenasa-3
CSS	Suero tratado con carbón vegetal
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM/F12	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dra.	Doctora
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF4A	Factor de inicio eucariótico 4A
eIF4E	Factor de inicio eucariótico 4E
eIF4G	Factor de inicio eucariótico 4G
ER	Receptor de estrógeno
ER+	Positivo para receptor de estrógeno
ERK 1,2	Quinasa reguladora de señales extracelulares 1,2
ERα	Receptor de estrógeno α
FBS	Suero fetal bovino
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

h	Horas
H₂O_{dd}	Agua bidestilada
HAD	Hiperplasia ductal atípica
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidermal
IL-8	Interleucina-8
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de masa corporal
JAK2/STAT3	Janus quinasa 2/ transductor de señal y activador de la transcripción 3
JNK	Jun N-terminal quinasa
kb	Kilobase
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
L	Litro
LpB	Cuerpos lipídicos
M	Molar
mA	Miliamperes
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAP4K1	Proteína 4 quinasa 1 activada por mitógenos
MAPKKs	MAP quinasa quinasa quinasa
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
min	Minutos
miR-21	MicroRNA-21
MKK4	MAP quinasa quinasa 4
MKK7	MAP quinasa quinasa 7
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinasa de matriz

mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico anhídrido
Na₃VO₄	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato de sodio monobásico anhídrido
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato/nitroazul de tetrazolium
ng	Nanogramos
NH₄Cl	Cloruro de amonio
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
Ob-R	Receptor de leptina
°C	Grados Celsius
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDCD4	Muerte celular programada 4
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF₂α	Prostaglandina F ₂ α
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PMS	Fenacin metosulfato
pRb	Proteína del retinoblastoma
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
s	Segundos
S6K1	Proteína S6 quinasa 1
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.
Ser	Serina
SERM's	Moduladores selectivos del receptor de estrógeno
SHP2	Proteína tirosina fosfatasa con un dominio homólogo a Src 2
TBE	Buffer tris borato EDTA
TBS	Solución amortiguadora Tris-salina
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina
TGF-β1	Factor transformador de crecimiento beta1
TIMP-2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas-2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TPY	Treonina Prolina Tirosina
Trp	Triptófano
TX	Texas
TXA₂	Tromboxano A ₂
uPAR	Receptor activador del plasminógeno tipo uroquinasa
USA	Por sus siglas en inglés United States of America/Estados Unidos de America.
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WT	Silvestre
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
%	Porcentaje

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Esquema de transfección de las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2 y control.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
1. Anatomía de la glándula mamaria.....	2
2. Representación esquemática de las isoformas de los receptores de leptina.....	5
3. Localización celular y actividad enzimática de COX-2.....	10
4. Desarrollo del cáncer de mama ductal.....	14
5. Modelo de como PDCD4 inhibe la traducción.....	22
6. Ensayo de invasión en Matrigel.....	30
7. Sobreexpresión de PDCD4 en las células establemente transfectadas MCF-7/PDCD4.....	36
8. PDCD4 inhibe la invasión inducida por leptina en células de cáncer de mama.....	37
9. Sobreexpresión de TIMP-2 en las células MCF-7/PDCD4.....	39
10. Reducción en la expresión del RNAm de TIMP-2 en las células MCF-7/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2.....	40
11. El silenciamiento de TIMP-2 incrementa la invasión de las células de cáncer de mama MCF-7/PDCD4.....	41
12. El silenciamiento de TIMP-2 incrementa la activación inducida por leptina de ERK1,2, STAT3, pero no afecta la activación de JNK en células MCF-7/PDCD4.....	43
13. PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina.....	45
14. COX-2 no induce cambios sobre la activación de ERK1/2, p38MAPK y Akt en células MCF-7.....	59

15. COX-2 incrementa la fosforilación de JNK y los niveles de c-Jun en las células de cáncer de mama MCF-7.....	60
16. La inhibición específica de JNK, pero no la de ERK1,2 disminuye la invasión de las células MCF-7/COX-2.....	62
17. Efecto de la inhibición de JNK en la proliferación de las células de cáncer de mama en ausencia o en presencia de Matrigel.....	63
18. La inhibición de JNK no afecto la resistencia de las células MCF-7/COX-2 a tamoxifeno.....	64
19. PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2/PGE ₂	66
20. Modelo esquemático del efecto de PDCD4 sobre la invasión y resistencia a tamoxifeno inducidas por leptina y COX-2 en las células de cáncer de mama MCF-7.....	72

Capítulo 1.

ANTECEDENTES.

1.1. Cáncer de mama.

El cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres es el cáncer de mama. La incidencia de esta enfermedad varía alrededor del mundo, en Estados Unidos de América, durante el 2011, se estimaron alrededor de 39,970 muertes por cáncer de seno (39,520 mujeres, 450 hombres). En el mismo año, se estimaron 230,480 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres y cerca de 2,140 en hombres, mientras que los casos de cáncer de mama *in situ* fueron 57,650 (Society 2011). La metástasis es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer de mama. En Estados Unidos de América el rango de sobrevivencia a 5 años para mujeres diagnosticadas con cáncer de mama localizado (cáncer que no se ha diseminado a nódulos linfáticos u otros lugares fuera de la mama) es del 98%, el cual contrasta dramáticamente con el porcentaje de sobrevivencia en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y metástasis distante, el cual es de solo 23% (Society 2011). En México el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres y en 2010 fallecieron 5,113 mujeres por esta causa (SALUD 2010).

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por un crecimiento descontrolado de células anormales encontradas en el tejido de la mama. Cada mama tiene entre 15 y 20 lóbulos, los cuales a su vez tienen pequeñas secciones denominadas lobulillos. Los lóbulos y lobulillos están conectados a través de tubos llamados ductos (Figura 1). El tipo de cáncer de mama más común es el ductal, originado en las células del ducto, seguido por el carcinoma lobular en lóbulos o lobulillos. El cáncer de mama inflamatorio es el tipo de cáncer menos frecuente y se caracteriza por enrojecimiento, edema, calor y dolor de las mamas (Society 2011).

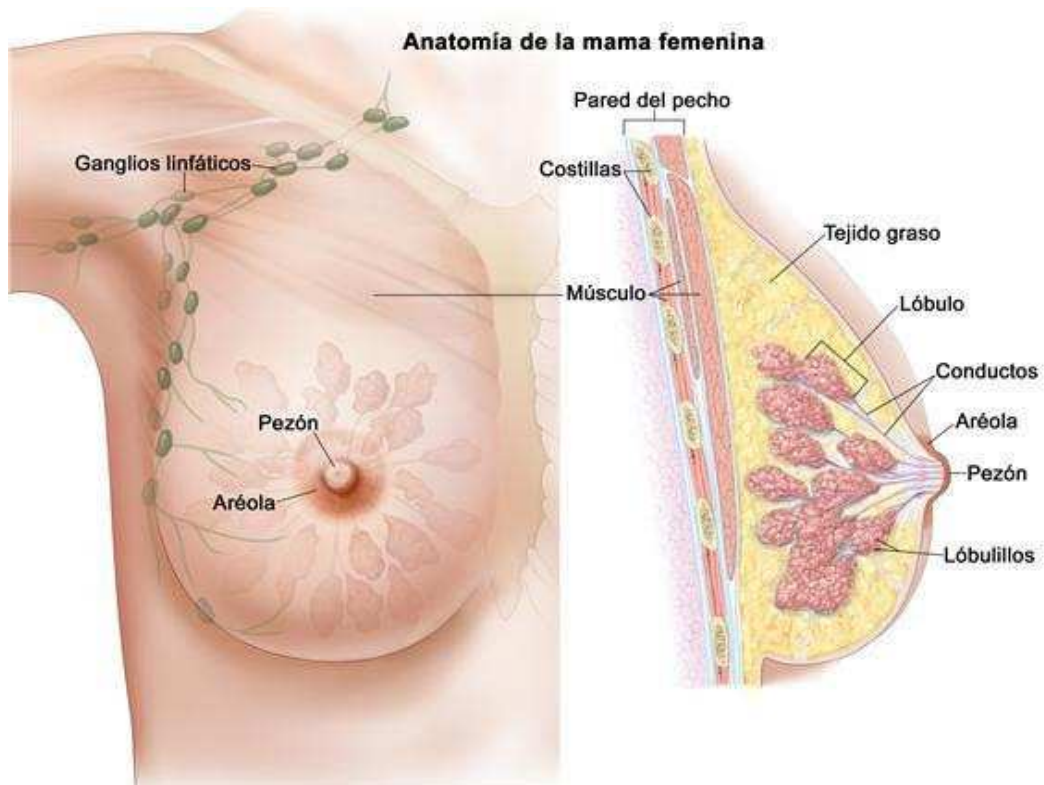


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria. En el esquema se señalan los lóbulos y conductos de la glándula mamaria, que se encuentran entre la grasa subcutánea y se irradian al pezón ubicado en la superficie en el centro de la areola.

Aunque no se conoce exactamente la causa del cáncer de mama, se sabe que existen una gran variedad de factores de riesgo relacionados con esta enfermedad, entre los cuales se encuentran la edad, antecedentes familiares, menarquia precoz, menopausia tardía, densidad de la mama, uso de hormonas y la obesidad. La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una forma simple de medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), esto es el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros. Una persona con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa y con un IMC igual o superior a 25 es considerada con sobrepeso. El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (OMS 2011). En mujeres post-menopáusicas una IMC $>30 \text{ kg/m}^2$ es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (Protani, Coory et al. 2010). El estrógeno circulante en mujeres post-menopáusicas es producido principalmente en el tejido adiposo, por lo tanto, tener una mayor cantidad de tejido graso incrementa los niveles de estrógeno y la probabilidad de desarrollar cáncer de mama (Society 2011). Además, una elevada masa corporal se relaciona comúnmente con tumores dependientes de hormonas y una de las hormonas relacionadas con obesidad y cáncer de mama es leptina (Zhang, Proenca et al. 1994). Ambos factores, masa corporal y porcentaje de grasa incrementan los niveles de leptina circulante (McMurtry, Simeone et al. 2009).

1.2. Leptina.

La leptina es una hormona de 16 kDa fue descubierta en 1994 como un regulador del peso corporal y balance energético que actúa en el hipotálamo y es producida principalmente en el tejido adiposo (Zhang, Proenca et al. 1994). Aunque inicialmente se creía que leptina se expresaba y secretaba exclusivamente por adipocitos, ha sido identificada en tejidos como la placenta, mucosa gástrica y colonica, testículos, ovarios y en células de epitelio mamario (Cirillo, Rachiglio et al. 2008). En la mama, la leptina juega un papel importante en el desarrollo normal de la glándula mamaria y la lactancia (Neville, McFadden et al. 2002). En estudios anteriores se encontró que leptina puede modular distintos procesos en

órganos periféricos tales como respuesta inmune, fertilidad y hematopoyesis (Surmacz 2007).

La regulación de la producción y secreción de leptina no está totalmente clara, pero las hormonas sexuales parecen estar involucradas en este proceso. Los estrógenos estimulan la liberación de leptina *in vitro* e *in vivo*, por lo que podrían ser los responsables de encontrar una mayor cantidad de leptina en mujeres que en hombres y de los elevados niveles de la misma durante el ciclo menstrual (Marttunen, Andersson et al. 2000). Se ha observado que los estrógenos regulan positivamente la expresión de leptina, mientras que la testosterona la regula negativamente (Cirillo, Rachiglio et al. 2008).

La leptina ejecuta su actividad biológica a través de la unión a su receptor (Ob-R), un miembro de la familia de receptores de citocinas. Se han identificado hasta el momento seis diferentes isoformas del receptor de leptina; (ObRa-ObRf), el dominio extracelular de cinco de las isoformas (ObRa-ObRd, ObRf) es idéntico, y consiste de 816 aminoácidos, dos motivos de unión (Trp-Ser-X-Ser-Trp) y un dominio de fibronectina tipo III. Las isoformas ObRa, ObRc, ObRd y ObRf están además caracterizadas por un dominio intracelular corto formado de 32-40 residuos y un dominio transmembranal que consiste de 23 aminoácidos. Solo el receptor ObRb contiene un dominio intracelular largo que comprende aproximadamente 306 aminoácidos (Figura 2) (Cirillo, Rachiglio et al. 2008). ObRb se conoce como la isoforma larga y es expresada principalmente en el hipotálamo. Mientras que ObRa representa la isoforma corta cuya expresión es más abundante en tejidos periféricos (Revillion, Charlier et al. 2006).

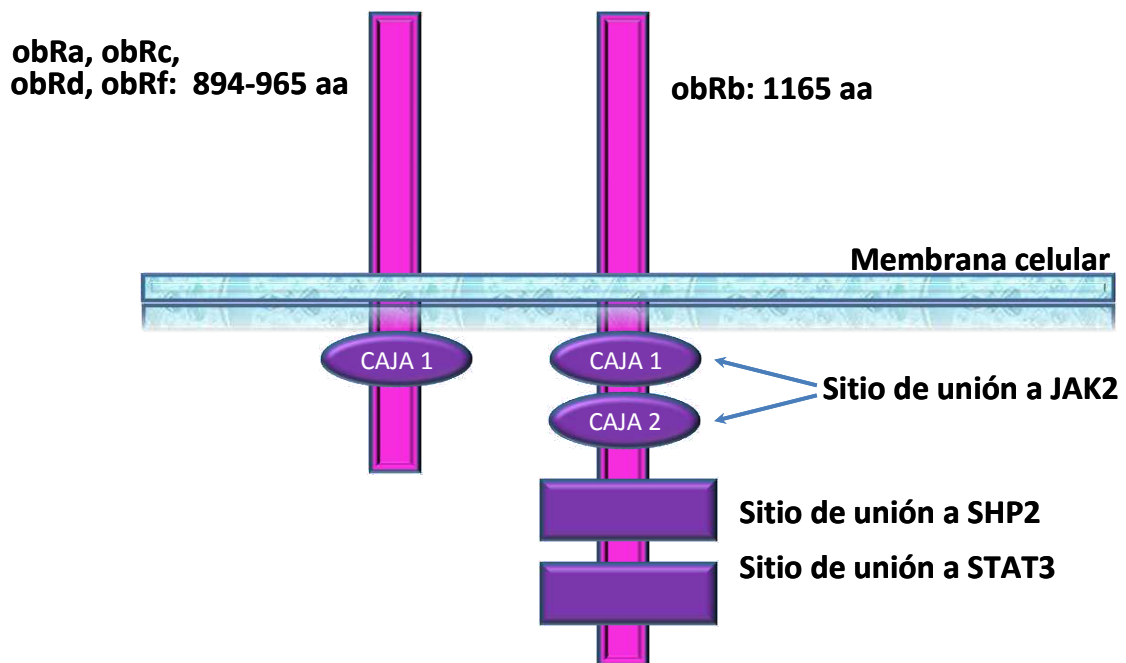


Figura 2. Representación esquemática de las isoformas de los receptores de leptina. Todas las isoformas muestran el mismo dominio extracelular, solo difieren en la longitud del dominio intracelular. La isoforma larga del receptor de leptina (obRb) contiene dos sitios de unión a JAK2 (Box1 y Box2), un motivo de unión SHP2 (Proteína tirosina fosfatasa con un dominio homólogo a Src 2) y un sitio de unión a STAT3. Las isoformas cortas del receptor de leptina (obRa, obRc, obRd, obRf) presentan solo un dominio BOX1. La isoforma soluble del receptor de leptina (obRe), la cual no se muestra en este esquema, pierde los dominios transmembrana e intracelular (Cirillo, Rachiglio et al. 2008).

Varias líneas de evidencia sugieren que leptina y sus receptores están involucrados en el desarrollo normal de la glándula mamaria y en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Los receptores de leptina (isoformas cortas y larga) son expresados en células normales de epitelio mamario durante el embarazo y la lactancia (Laud, Gourdou et al. 1999). Se ha sugerido además que leptina está involucrada en la patogénesis y progresión del cáncer de mama dependiente de estrógenos. La síntesis de leptina en adipocitos es influenciada por diferentes factores humorales, tales como insulina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), glucocorticoides, hormonas reproductivas y prostaglandinas. Muchos de estos factores han sido asociados a procesos neoplásicos (Garofalo and Surmacz 2006). En líneas celulares de cáncer de mama positivas para receptor de estrógeno (ER+) como, T47D, MCF-7, y ZR75-1, leptina estimula la síntesis de DNA y crecimiento celular actuando a través de múltiples cascadas de señalización, incluyendo JAK/STAT (Janus quinasa/ transductor de señal y activador de la transcripción), ERK1/2 (Quinasa reguladora de señales extracelulares 1/2), y PKC- α (Proteína quinasa C- α). Además de las clásicas señales de citocinas, leptina es capaz de inducir la vía de sobrevivencia Akt/GSK3 (Serina/treonina quinasa/glucógeno sintasa quinasa 3) *in vitro* en células de cáncer de mama (Garofalo, Sisci et al. 2004). Leptina puede inducir la progresión del ciclo celular incrementando los niveles de cdk2 (Quinasa dependiente de ciclina 2) y ciclina D1, así como hiperfosforilando e inactivando al inhibidor del ciclo celular, pRb (Proteína del retinoblastoma). En un estudio realizado por Hu y colaboradores se observó que las células de epitelio mamario humano HBL100 y células T4TD de cáncer de mama positiva para ER, expresaban el receptor de leptina obRb. En estas células, leptina activó las vías STAT3, ERK y AP-1, resultando en una mayor proliferación celular. Si embargo, solo en las células T4TD de cáncer de mama leptina aumentó el crecimiento celular independiente de anclaje (Hu, Juneja et al. 2002).

En cáncer de mama, leptina puede mediar angiogénesis a través de la inducción de la expresión del VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular) y promover invasión y migración mediante la transactivación de EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico). Además, la leptina promueve la migración e

invasión de células derivadas de glioma, condrosarcoma, carcinoma de colon, células de carcinoma endometrial y hepatocelular, así como cáncer de próstata.

En las células de cáncer de próstata (DU145 y PC-3), leptina incrementa significativamente la migración celular y la expresión inducida de VEGF, TGF- β 1 (Factor transformador de crecimiento beta1) y bFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos básico) y, por lo tanto, probablemente en general contribuye a la progresión del cáncer de próstata (Lang and Ratke 2009). Además se ha observado que leptina incrementa la invasión de las células de cáncer de mama a través de la activación de JNK (Jun N-terminal quinasa), lo cual resulta en un incremento en la actividad de MMP-2 (Metaloproteinasa de matriz-2) (McMurtry, Simeone et al. 2009).

En las células de cáncer de mama, leptina y ambas isoformas de los receptores se expresan a nivel de RNAm y proteína. Altos niveles de esta hormona han sido asociados con un incremento en la incidencia de cáncer de mama metastático. La metástasis en cáncer mamario está directamente asociada con invasividad. Además, leptina juega un papel importante en la estimulación de la proliferación celular y sobrevivencia. En pacientes con cáncer de mama y obesidad, leptina podría contribuir a la resistencia a terapias antiestrógeno. Esto es porque algunos de los efectos de los agentes antiestrógeno tales como tamoxifeno y raloxifeno son suprimidos por altos niveles de leptina (Jansen, Camalier et al. 2005).

1.3. Ciclooxygenasa-2 (COX-2).

Otro factor importante relacionado con invasión y resistencia a tamoxifeno en cáncer de mama positivo para ER α es la sobreexpresión de COX-2. Las ciclooxigenasas (COXs) son también conocidas como prostaglandina H sintasas o prostaglandina endoperóxido sintasas ya que catalizan la biosíntesis de prostaglandina H₂, el precursor de moléculas tales como prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Las ciclooxigenasas son enzimas bifuncionales con dos actividades catalíticas distintas: actividad ciclooxigenasa y peroxidasa. La actividad de ciclooxigenasa oxigena ácido araquidónico para generar

prostaglandina G_2 (PGG_2), mientras que la actividad de peroxidasa reduce este último a prostaglandina H_2 (PGH_2) (Figura 3). PGH_2 puede ser metabolizado por varias prostaglandinas sintasas a prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2) y tromboxano A_2 (TXA_2) (Taketo 1998).

La familia de las enzimas COX consiste de 3 isoenzimas: COX-1, COX-2 y COX-3. COX-1 es expresada constitutivamente en pulmón, próstata, cerebro, tracto gastrointestinal, riñón, hígado y bazo. En estudios recientes de biopsias y autopsias, COX-1 fue encontrada en vasos sanguíneos, células de músculo liso y plaquetas (Menter, Schilsky et al. 2010). La actividad de COX-1 es producir prostaglandinas citoprotectoras, tales como prostaciclina y PGE_2 (Prostaglandina E_2), las cuales parecen ser críticas para mantener la integridad de la mucosa gástrica (Williams, Tsujii et al. 2000). COX-2 normalmente no es detectable en muchos tejidos pero exhibe niveles de expresión basal en macrófagos, células endoteliales, arteria coronaria, corazón, próstata, pulmón, placenta, páncreas, cerebro y riñón (Menter, Schilsky et al. 2010). La expresión de COX-2 puede ser inducida por varios estímulos, tales como mitógenos, citocinas, factores de crecimiento, oncogenes, entre otros y está involucrada en reacciones inflamatorias (Taketo 1998; Ristimaki, Sivula et al. 2002; Chandrasekharan and Simmons 2004). COX-3 es una variante de COX-1 que retiene el intron 1 y tiene un cambio del marco de lectura, su función biológica aún no es clara (Vesga 2004). COX-1 y COX-2 son dos proteínas, codificadas por genes con distinta localización cromosómica: COX-1 en el cromosoma humano 9 y COX-2 en el cromosoma 1. El gen que codifica para COX-2 es de aproximadamente 8 kb, consiste de 10 exones y 9 intrones, mientras que el gen que codifica para COX-1 es de aproximadamente 22 kb y consiste de 11 exones y 10 intrones. COX-2 muestra una secuencia y actividad catalítica significativamente homóloga con COX-1 (Williams, Tsujii et al. 2000; Ristimaki, Sivula et al. 2002). Las diferencias estructurales entre los sitios catalíticos de COX-1 y COX-2 consisten en la sustitución del aminoácido 523, el cual es una isoleucina en COX-1 por una valina en COX-2, esta última al tener menor volumen determina una abertura en la pared del canal del sitio activo de COX-2 haciéndolo 17% más amplio que el de COX-1 (Taketo 1998; Rizzo 2011).

COX-2 se localiza principalmente en el lumen del retículo endoplasmático, en el cual se lleva a cabo la oxigenación del ácido araquidónico. La localización nuclear de COX-2 es consistente con su papel regulador en la mitogénesis. Por otra parte, existe evidencia de que en las células tumorales, COX-2 se localiza en la mitocondria y en cuerpos lipídicos. La localización intracelular de COX-2 en la mitocondria juega un papel importante en la protección contra la apoptosis inducida por estrés oxidativo, mientras que la localización de COX-2 en los cuerpos lipídicos influye en el crecimiento tumoral, probablemente al funcionar como una fuente intracelular adicional para el suministro continuo de prostaglandinas (Figura 3) (Rizzo 2011).

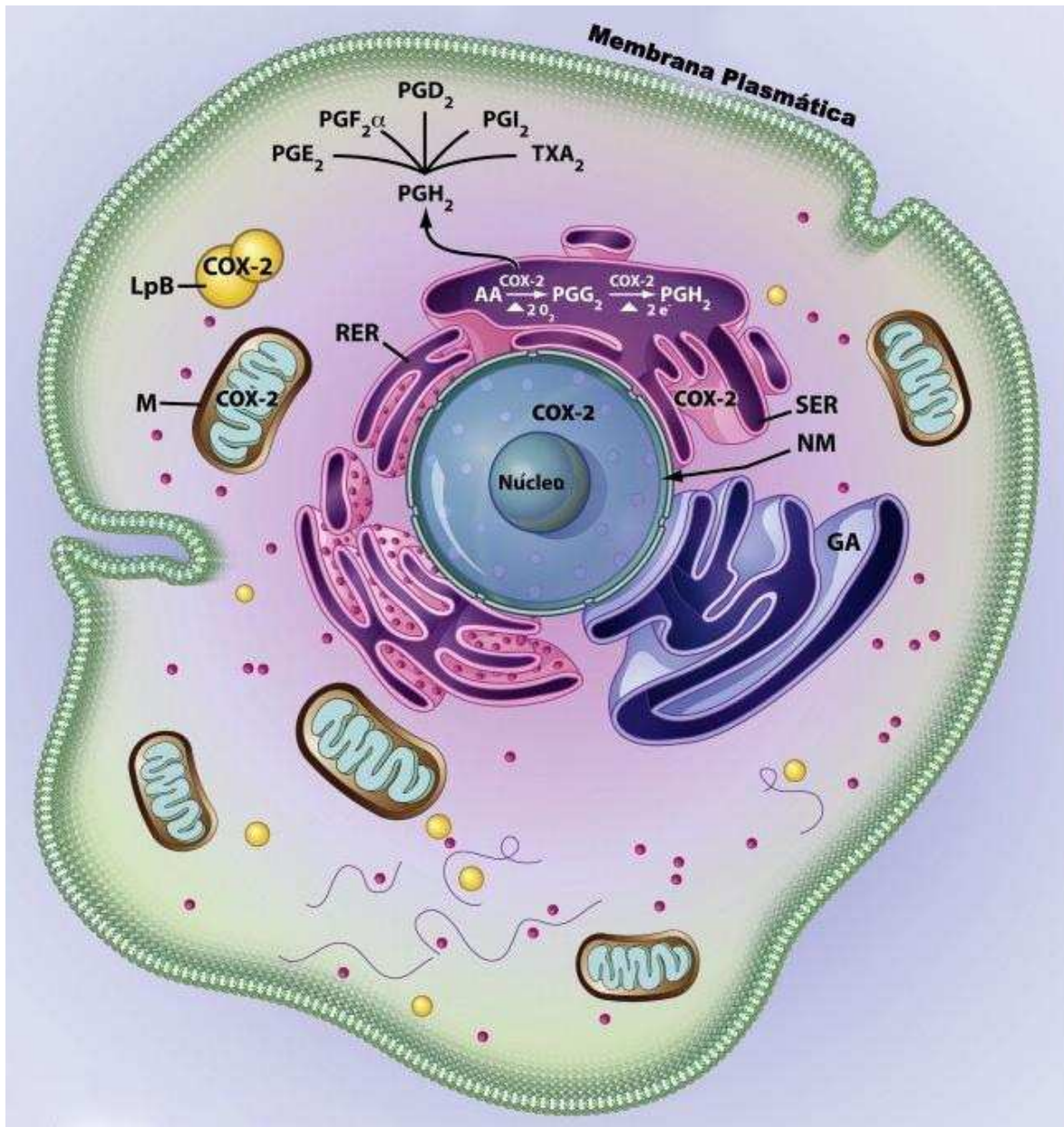


Figura 3. Localización celular y actividad enzimática de COX-2. En la figura se indica la localización de COX-2 en el retículo endoplasmático (ER), núcleo, mitocondria (M) y cuerpos lipídicos (LpB). Además, se muestra la oxigenación del ácido araquidónico (AA) por COX-2 en el retículo endoplasmático. El AA es convertido a prostaglandina G₂ (PGG₂), a través de la actividad de ciclooxigenasa de COX-2. PGG₂ es entonces reducido por la actividad de peroxidasa de COX-2 a prostaglandina H₂ (PGH₂). PGH₂ sirve como sustrato para prostaglandinas sintasas, las cuales son responsables de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F₂α (PGF₂α), prostaciclina (PGI₂) y tromboxano A₂ (TXA₂) (Rizzo 2011).

De los tres tipos de COXs, el más relevante en la terapia contra cáncer es COX-2 ya que se ha observado que una alta expresión de esta enzima se correlaciona con cambios malignos en una variedad de cánceres humanos, incluyendo colorectal, mama, próstata, esófago, piel, hígado, pancreático, cerebro, pulmón, cabeza y cuello (Singh, Berry et al. 2005). Recientemente se ha sugerido que COX-2 podría estar involucrado directamente con el carcinoma mamario. En el 2001, Catherine *et al*, encontraron que COX-2 indujo el desarrollo de tejido tumoral en ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen COX-2 en glándulas mamarias, además de una reducción en los niveles de la proteína apoptótica Bax (Proteína X asociada a Bcl-2) y un incremento en la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Linfoma de células B-2), sugiriendo que la disminución de apoptosis en células del epitelio mamario contribuye a la tumorigénesis.

Estos datos indican que el aumento de la expresión de COX-2 es suficiente para inducir tumorigénesis en glándulas mamarias. Sin embargo, el posible papel de COX-2 en el cáncer de mama se percibió inicialmente cuando se encontraron elevados niveles de prostaglandinas en células de tumores mamarios. En varios tejidos tumorales de animales y humanos, incluyendo cáncer de colón humano, se han reportado altas concentraciones de prostaglandinas (Taketo 1998; Kim, Bossuyt et al. 2005).

Reportes recientes sugieren que COX-2 se sobreexpresa en aproximadamente el 40% de los cánceres de mama invasivo (Singh, Berry et al. 2005) y en una alta frecuencia en carcinoma ductal pre-invasivo *in situ*, el cual se asocia con un pobre pronóstico del paciente. La sobreexpresión de COX-2 está correlacionada con parámetros que son característicos de un cáncer de mama agresivo, tales como gran tamaño del tumor, alta proliferación celular y sobreexpresión de HER2 (Receptor del factor de crecimiento epidermal), el cual está presente en un 25-30% de los cánceres de mama y está asociado con una enfermedad agresiva y un incremento de la resistencia a una variedad de terapias contra el cáncer (Simeone, Colella et al. 2006; Howe 2007).

Previamente se demostró que las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama *in situ* o invasivo que tomaban aspirina al menos una vez por semana durante 6 meses o más, tuvieron una menor asociación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama que las que no tomaban regularmente aspirina. La reducción del riesgo del cáncer de seno se observó en mujeres con ER+ pero no ER- (Terry, Gammon et al. 2004). Además, se ha observado que el ibuprofeno, pero no el acetaminofén, reduce el riesgo del cáncer de mama y debido a que la aspirina y el ibuprofeno pueden inhibir la actividad de COX-2, se ha especulado que entre los numerosos mecanismos de acción de estas drogas, es la actividad de anti-COX-2 la que reduce el riesgo de cáncer mamario (Tari, Simeone et al. 2005).

La expresión de COX-2 en pacientes con cáncer de mama es un marcador de baja supervivencia libre de enfermedad y global (Ristimaki, Sivula et al. 2002; Denkert, Winzer et al. 2004; O'Connor, Avent et al. 2004) y ha sido considerada como un marcador de alto potencial metastásico. La expresión de COX-2 es muy alta en tumores metastásicos y está asociada con metástasis distante (Costa, Soares et al. 2002). COX-2 incrementa la invasión de células de cáncer de mama *in vitro* (Singh, Berry et al. 2005) e *in vivo* (Connolly, Harmey et al. 2002).

Además se ha observado que derivados prostanoideos de COX-2 como PGE₂ promueven angiogénesis, inducen invasión e incrementan metástasis. Durante la progresión del cáncer, las prostaglandinas pueden mediar una gran variedad de mecanismos, incluyendo proliferación celular, apoptosis, modulación del sistema inmune y angiogénesis (Costa, Soares et al. 2002). Por otra parte, la producción de PGE₂ mediada por COX-2, eleva la actividad de aromatasa, lo cual podría explicar el hecho de que COX-2 este involucrado en promover el crecimiento de cáncer de mama ER+, particularmente en mujeres postmenopáusicas (Filipovic, Giamas et al. 2011).

Anteriormente, en nuestro laboratorio se observó que COX-2 utiliza PKC (Proteína quinasa C) para incrementar la producción de IL-8 (Interleucina-8). IL-8 a su vez activa uPA (Activador de plasminógeno de tipo urinario), resultando en un incremento en la invasión de células de cáncer de mama (Simeone, Nieves-

Alicea et al. 2007). Además se reportó que PGE₂ y PKC están involucrados en la resistencia a tamoxifeno e invasión inducida por COX-2. La activación del receptor de PGE₂ y PKC incrementó la invasión de las células MCF-7 a través del Matrigel (Tari, Simeone et al. 2005). Sin embargo, no se conoce cuales son los factores río abajo utilizados por la vía COX-2/PGE₂/PKC para inducir resistencia a tamoxifeno e invasión en las células de cáncer de mama

Ambos leptina y COX-2 juegan un papel muy importante en invasión y resistencia a drogas, los cuales, son procesos complejos que involucran alteraciones genéticas y celulares.

1.4. Invasión celular, Metaloproteinasas e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2)

La invasión de células tumorales es el proceso en el cual las células invaden tejido adyacente penetrando a través de la membrana basal y entrando a vasos linfáticos y sanguíneos (Chambers, Groom et al. 2002). Se ha sugerido que existen múltiples vías para el desarrollo de cáncer de mama invasivo. Una posible vía para la progresión de cáncer de mama ductal es que a partir de una hiperplasia ductal atípica (HAD) pasa a un carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y de este a un carcinoma ductal invasivo (CDI) (Figura 4). CDIS puede definirse como proliferación de células cancerosas situadas dentro de los confines del ducto mamario. Por lo tanto, la invasión de cáncer de mama ductal requiere que las células cancerosas penetren la membrana basal del epitelio y migren del ducto hacia el tejido adyacente. Como consecuencia, el cáncer invasivo puede diseminarse a tejidos circundantes, entrar al sistema vascular y colonizar sitios distantes, lo que eventualmente conduce a la muerte de la mayoría de los pacientes con cáncer mamario. Por lo tanto, es de gran importancia entender los mecanismos a través de los cuales se facilita la invasión del cáncer de mama.

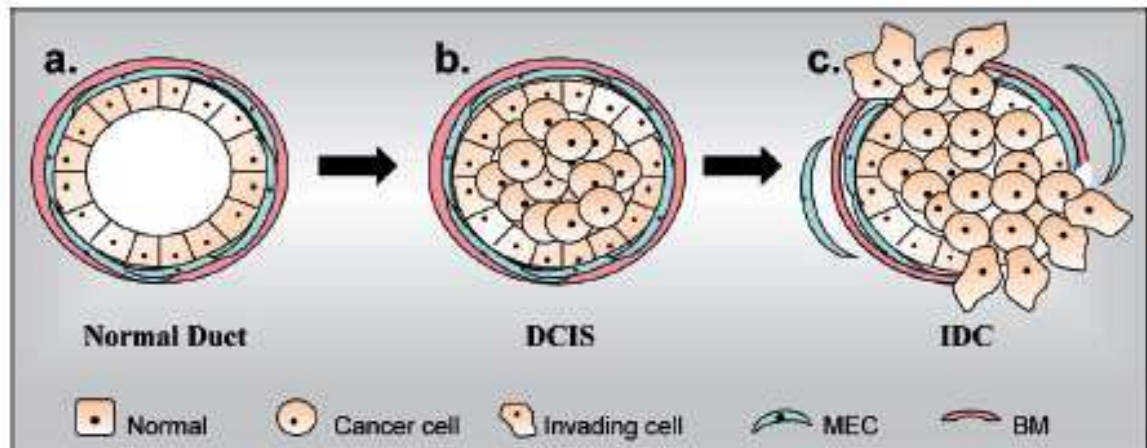


Figura 4. Desarrollo del cáncer de mama ductal. Es generalmente aceptado que la progresión del cáncer de mama ductal ocurre principalmente a través de las siguientes etapas. Normal, definida por una capa delgada de células epiteliales que recubren el lumen ductal (a) Carcinoma Ductal *in situ* (siglas en inglés DCIS), en el cual las células cancerosas se han multiplicado llenando el ducto de la mama (b) y, Carcinoma ductal invasivo (siglas en inglés IDC), en el que la presencia de células mioepiteliales (siglas en inglés MEC) disminuye y las células de cáncer ductal rompen la membrana basal (siglas en inglés BM) de las células epiteliales e invaden tejido adyacente (c) (McSherry, Donatello et al. 2007).

El proceso de invasión consiste en una serie de eventos complejos de los cuales un paso inicial involucra la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Este proceso es catalizado por la acción de varias enzimas, incluyendo MMPs, las cuales son una familia de proteinasas dependientes de zinc que participan en la degradación de componentes de la matriz extracelular y que han sido involucradas en la invasión de células tumorales, metástasis y angiogénesis (Sacco, Cato et al. 2001; Bernardo and Fridman 2003; Ahn, Jeong et al. 2004). Fisiológicamente, estas enzimas desempeñan un papel importante en la remodelación de tejido normal, desarrollo embrionario, angiogénesis, ovulación, involución de la glándula mamaria y cicatrización de heridas. Por otra parte la expresión anormal de estas enzimas contribuye a diversos procesos patológicos, incluyendo artritis reumatoide, crecimiento tumoral, invasión y metástasis, entre otros (Chambers, Groom et al. 2002).

En general, se cree que el principal mecanismo por el cual las MMPs promueven la propagación del cáncer es a través de la degradación de la MEC, la cual se compone principalmente de membrana basal y tejido conectivo intersticial. La membrana basal a su vez presenta como principal componente colágeno tipo IV, el cual se cree es degradado en su mayoría por MMP-2 y MMP-9; otras proteínas tales como laminina, proteoglicanos, entactina y osteonectina están también presentes en la MEC. Para establecer metástasis, las células cancerosas deben pasar a través de la membrana basal al menos tres veces. Las células de cáncer de mama inicialmente atraviesan esta membrana cuando un carcinoma *in situ* se convierte en invasivo. Posteriormente, las células malignas penetran a través de la membrana basal durante la entrada y salida al torrente sanguíneo (Duffy, Maguire et al. 2000).

Las MMPs presentan un dominio en común con una familia de proteínas que juegan un papel opuesto; los inhibidores tisulares de metaloproteinasa-2 (TIMPs) los cuales inhiben a las MMPs formando uniones no covalentes asociadas con el sitio activo de las MMPs (Ree, Florenes et al. 1997; Sacco, Cato et al. 2001). Algunos estudios han mostrado que la sobreexpresión de TIMP-2 disminuye *in vitro* la invasión de células epiteliales transformadas por ras (Ahn, Jeong et al. 2004). Además, ratones inyectados con células de cáncer de mama

MDA-MB-231 transfectadas con TIMP-2 presentaron un menor número de metástasis óseas y una mayor tasa de supervivencia que los ratones inyectados con células no transfectadas (Yoneda, Sasaki et al. 1997).

1.5. Resistencia a tamoxifeno inducida por leptina y COX-2.

Uno de los tratamientos empleados para el cáncer mamario dependiente de hormonas, es el tamoxifeno, el cual ha demostrado ser también un agente preventivo. El tamoxifeno puede prolongar considerablemente la supervivencia libre de enfermedad y la remisión en más de la mitad de los pacientes con cáncer de mama ER+ e invasivo, por lo que se cree que la reducción significativa de la mortalidad por cáncer de mama durante la última década se debe al amplio uso del tamoxifeno.

El tamoxifeno ha sido usado para el tratamiento sistémico de pacientes con cáncer de mama desde hace casi tres décadas. En el carcinoma mamario el éxito del tratamiento depende principalmente de la presencia del receptor de estrógeno (ER). Sin embargo, cerca de la mitad de los pacientes con enfermedad avanzada y ER+ no responden al tratamiento con tamoxifeno de manera inmediata, mientras que en los pacientes que responden en última instancia, la enfermedad progresa a un fenotipo de resistencia (Dorssers, van der Flier et al. 2001).

Las posibles causas de la resistencia intrínseca y adquirida han sido atribuidas a: la farmacología del tamoxifeno, alteraciones en la estructura y función del ER, las interacciones con el microambiente tumoral y alteraciones genéticas en las células tumorales. Hasta el momento no ha sido identificado un mecanismo prominente que conduzca a la resistencia a tamoxifeno (Dorssers, van der Flier et al. 2001).

Se ha encontrado que la leptina modula tanto la síntesis de estrógeno como la actividad del receptor de estrógeno α (ER α). Por ejemplo, la leptina puede incrementar la expresión del gen de la aromatasa y la actividad de la aromatasa en células MCF-7, lo cual podría incrementar la síntesis de estrógeno. La leptina puede además incrementar la estabilidad del ER α permitiendo

mantener la transcripción dependiente de ER α en células de cáncer de mama en presencia de antiestrógenos (Garofalo and Surmacz 2006). Estas observaciones sugieren que altos niveles de leptina en pacientes obesas con cáncer mamario podrían contribuir al crecimiento tumoral y desarrollo de resistencia a antiestrógenos.

Garofalo *et al.*, en el 2004 demostró que leptina es capaz de atenuar los efectos del antiestrógeno ICI 182,780 (Fulvestrant) en células MCF-7. El tratamiento de las células MCF-7 con fulvestrant indujo una rápida degradación del ER α en la membrana celular, lo cual redujo la expresión nuclear del receptor y la transcripción dependiente de ER α , lo que produjo a su vez, una significativa inhibición del crecimiento. En presencia del antiestrógeno ICI 182,780, leptina estabilizó ER α , interfiriendo con las vías de degradación ubiquitina-proteosoma del ER α .

Por otra parte, la sobreexpresión de COX-2 se correlaciona con una enfermedad agresiva e incrementa la resistencia a una gran variedad de terapias contra el cáncer (Simeone, Li et al. 2004; Kim, Bossuyt et al. 2005; Howe 2007). En el 2002, Ristimaki *et al.*, reportaron que las mujeres cuyos tumores de mama invasivo eran positivos para ER α pero tenían bajos niveles de COX-2, presentaban una oportunidad del 86% de sobrevivencia libre de enfermedad a 5 años, mientras que las mujeres cuyos tumores eran positivos para ER α pero que tenían altos niveles de COX-2 presentaron una oportunidad de sobrevivencia libre de enfermedad a 5 años del 76% (Ristimaki, Sivula et al. 2002).

Tari y colaboradores, observaron que la transfección de COX-2 en la línea celular MCF-7, incrementó la resistencia de estas células al tamoxifeno aproximadamente 5 veces comparado con las células MCF-7/WT. Además reportaron que la activación del receptor de PGE₂ y PKC inhibió el efecto antiproliferativo del tamoxifeno (Tari, Simeone et al. 2005). Esta información sugiere que los pacientes con cáncer de mama positivo para ER α y que sobreexpresan COX-2 y/o leptina podrían no estar beneficiándose de tratamientos

con tamoxifeno como aquellos pacientes con tumores mamarios y bajos niveles de COX-2 y/o leptina.

Leptina estimula invasión y sobrevivencia en células de cáncer de mama actuando a través de múltiples cascadas de señalización, tales como JNK (McMurtry, Simeone et al. 2009), JAK2/STAT3 (Yin, Wang et al. 2004) y ERK 1,2 (Bjorbaek, Uotani et al. 1997).

1.6. JNK (Jun N-terminal quinasa)

Las Jun N-terminal quinasas son miembros de la superfamilia de las MAP quinasas. Se han identificado 10 isoformas de JNK codificadas por tres distintos genes denominados JNK1, JNK2 y JNK3. Una serie de MAP quinasa quinasa, las cuales sirven como conductos para las diversas señales que activan la vía de JNK, fosforilan y activan dos distintas MAP quinasa quinasa, MKK4 (MAP quinasa quinasa 4) y MKK7 (MAP quinasa quinasa 7), las cuales a su vez fosforilan el motivo TPY (Treonina, Prolina, Tirosina) de JNK permitiendo su activación (Heasley and Han 2006). Una vez fosforilado, JNK es translocado al núcleo donde fosforila y transactiva al factor de transcripción c-Jun. La fosforilación de c-Jun permite la formación de la proteína AP-1 (proteína activadora-1), la cual está involucrada en la transcripción de una gran variedad de genes. Aunque la actividad pro-apoptótica de JNK está comenzando a ser entendida, debe señalarse que el papel pro-apoptótico de JNK es a menudo determinado por otros factores celulares. Esto podría incluir la activación paralela de sobrevivencia celular ó vías antiapoptóticas. Se cree que la activación sostenida de JNK se asocia con apoptosis, mientras que la activación aguda de JNK esta involucrada con proliferación celular y vías de sobrevivencia (Dhanasekaran and Reddy 2008).

Recientemente se ha demostrado que JNK desempeña un papel crucial en obesidad y resistencia a insulina. Además, JNK2 ha sido involucrado en proliferación celular, progresión del ciclo celular y sobrevivencia en cáncer de próstata dependiente de andrógenos (Onuma, Bub et al. 2003). Por otra parte, JNK ha sido implicado en la producción y activación de MMP-2 (Ispanovic and Haas 2006) y se ha demostrado que leptina incrementa la invasión de las células

de cáncer de mama MCF-7 a través de la activación de la vía de JNK, la cual a su vez incrementa la actividad de MMP-2 (McMurtry, Simeone et al. 2009).

1.7. ERK (Quinasa reguladora de señales extracelulares) y JAK2/STAT3 (Janus quinasa 2/ transductor de señal y activador de la transcripción 3)

Las acciones celulares de leptina son iniciadas a través de la unión de leptina a su receptor específico seguido por la activación de MAPK dependiente de ras y la fosforilación de STAT3. La p44/42 MAPK (ERK1/2) es una familia de proteínas quinasas intracelulares, cuya actividad es regulada por la fosforilación o su sitio de activación en residuos conservados de T (treonina) y Y (tirosina). Bajo la estimulación de factores de crecimiento, citocinas inflamatorias o estrés físico, las MAPKKs (MAP quinasa quinasa quinasa) son activadas por interacción con una familia de pequeñas GTPasas y/u otras proteínas quinasas conectando las MAPK al receptor de superficie celular o al estímulo externo. MAPKKs a su vez activan a las MAPKKs, las cuales finalmente fosforilan y activan ERK. La vía de ERK está involucrada en diferentes procesos celulares tales como proliferación diferenciación, motilidad y muerte. ERK ha sido implicada en la producción y activación de MMP-2 (Ispanovic and Haas 2006). Leptina activa la vía de ERK a través de la unión a su receptor ObRa (la isoforma corta).

STAT3 pertenece a una familia de factores de transcripción citosólicos y es activado a través de factores de crecimiento y citocinas. STAT3 es considerado como un oncogén que promueve proliferación e inhibe apoptosis. Bajo la estimulación de leptina, las quinasas JAKs son activadas vía transfosforilación y fosforilan residuos de tirosina en el receptor de leptina ObRb (isoforma larga) y en las proteínas STAT. Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y translocan al núcleo para activar la transcripción de genes. La vía de STAT3 está involucrada en la proliferación celular inducida por leptina (Bjorbaek, El-Haschimi et al. 1999).

La invasión y resistencia a la quimioterapia juegan un papel crucial en la progresión tumoral y son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer. Por ello es extremadamente importante conocer y entender los mecanismos que permiten la resistencia a drogas e invasión del cáncer de mama para desarrollar nuevos y mejores tratamientos con el fin de bloquear estos

procesos y así prolongar la vida de los pacientes con cáncer de mama, permitiéndoles mejorar su calidad de vida. Un nuevo y prometedor blanco terapéutico para inhibir la progresión del cáncer de mama inducida por leptina y COX-2 es PDCD4 (proteína de muerte celular programada 4).

1.8. Proteína de Muerte Celular Programada 4 (PDCD4)

El gen de muerte celular programada 4 fue originalmente identificado como un gen cuya expresión es fuertemente inducida durante la apoptosis en células de ratón (Shibahara, Asano et al. 1995). Este gen suprime la transformación de queratinocitos de ratón *in vitro* inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Cmarik, Min et al. 1999; Yang, Jansen et al. 2001), así como la inducción y progresión de carcinogénesis de piel en respuesta al 7,12-dimetilbenzo (a) antraceno/TPA en modelos animales (Jansen, Camalier et al. 2005). Además, se ha demostrado que la expresión de PDCD4 inhibe la transactivación y transformación mediada por el factor de transcripción AP-1 (Yang, Jansen et al. 2001). Una serie de genes blanco de AP-1 han sido implicados en invasión celular y progresión metastásica, incluyendo uPAR (Receptor activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y varios miembros de la familia de metaloproteinasas (Jansen, Camalier et al. 2004).

Se ha reportado que Akt (Serina/treonina quinasa) es un modulador río arriba de la actividad de PDCD4 que fosforila específicamente los sitios Ser67 y Ser457 de PDCD4 *in vitro* e *in vivo*, resultando en una disminución significativa en la capacidad de PDCD4 para interferir con la transactivación de un promotor de respuesta a AP-1 a través de c-Jun (Wen, Shi et al. 2007). PDCD4 es regulado también por la proteína S6 quinasa 1 (S6K1) y la ubiquitina quinasa SCF β TRCP en respuesta a la activación de la vía mTOR (Blanco de rapamicina en mamíferos) por mitógenos. La degradación controlada de PDCD4 es esencial para la eficiente síntesis de proteínas y, consecuentemente, para el crecimiento y proliferación celulares (Chang, Cho et al. 2009). Por otra parte, se ha observado que altos niveles de miR-21 (microRNA-21) regulan negativamente el RNAm de PDCD4 al unirse a su región 3' no traducida (3' UTR), promoviendo así transformación celular y progresión tumoral (Lankat-Buttgereit and Goke 2003; Zhu, Wu et al. 2008). Además, se ha reportado que la metilación en la región CpG

dentro del extremo 5' de PDCD4 bloquea la expresión de PDCD4 a nivel de RNAm en gliomas (Xia *et al.*, 2010).

Varias líneas de evidencia sugieren que PDCD4 juega un papel importante en el metabolismo del RNA y/o traducción de proteínas. PDCD4 comparte homología con factores de iniciación de la traducción eucariotas y se ha demostrado que se une e inhibe la actividad de helicasa del factor de iniciación eucariótico eIF4A (eIF4A es una helicasa de RNA, con dos dominios, que desenrollan las estructuras secundarias en la región 5' no traducida (5'UTR) y el cap del RNAm facilitando su reconocimiento por parte de los ribosomas), lo que subsecuentemente inhibe la traducción dependiente de cap. PDCD4 compite con eIF4A por la unión a eIF4G, la cual es una proteína adaptadora que coordina el ensamblaje de los factores de la traducción y la subunidad ribosomal pequeña (Figura 5) (Lankat-Buttgereit and Goke 2003; Yang, Jansen *et al.* 2003; Chang, Cho *et al.* 2009). PDCD4 también puede competir con eIF4G por la unión a eIF4A y prevenir su unión al complejo de iniciación eucariota o su unión a eIF4F o a ambos. PDCD4 parece ser el primer ejemplo de una proteína en células de mamíferos que inhibe la traducción al atenuar la actividad de helicasa de eIF4A (Yang, Jansen *et al.* 2003).

Varios tumores humanos y líneas de células tumorales muestran niveles elevados de factores de iniciación de la traducción incluyendo eIF4A, eIF4E y eIF4G (Jansen, Camalier *et al.* 2004). Por lo tanto, la inhibición de factores de traducción mediada por PDCD4 podría regular negativamente el desarrollo del cáncer. PDCD4 es un nuevo inhibidor de la transformación de células en cultivo y un inhibidor en varias etapas de la carcinogénesis, lo cual sugiere que la inhibición de la iniciación de la traducción por PDCD4 podría ser una estrategia prometedora para la prevención del cáncer (Jansen, Camalier *et al.* 2004).

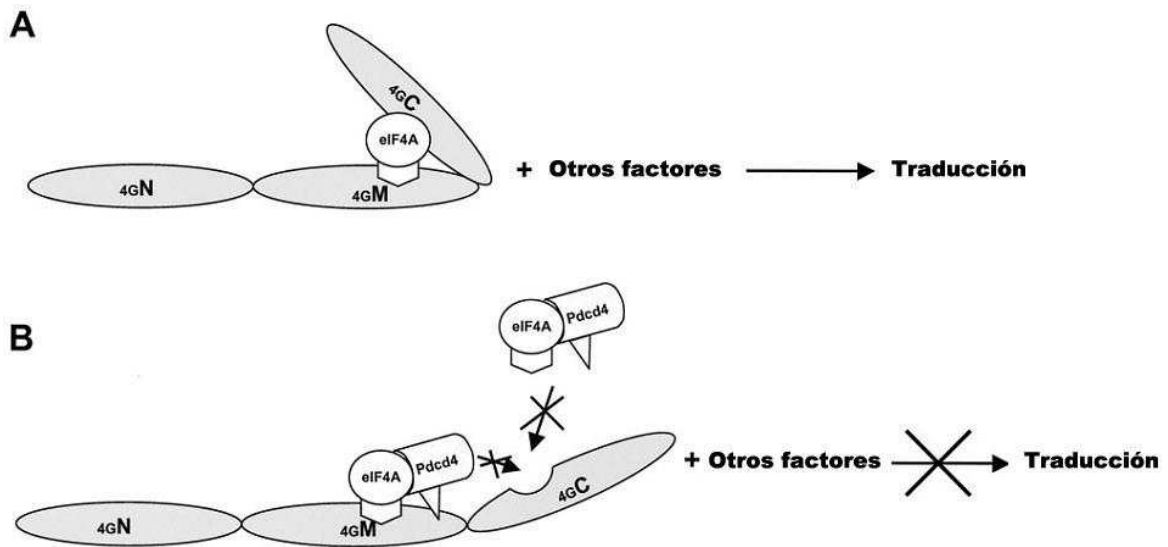


Figura 5. Modelo de como PDCD4 inhibe la traducción. (A) Modelo en el que se muestra la unión de eIF4A y el factor eIF4G. La molécula de eIF4A se une a la región media (4GM) y al dominio C-terminal (4GC) de eIF4G. (B) Modelo de inhibición de la traducción por PDCD4. PDCD4 se une e inhibe la actividad de helicasa del factor eIF4A, permitiendo la unión del factor eIF4A inactivado a la región media de eIF4G y a su vez previniendo la asociación de eIF4A al dominio C-terminal de eIF4G, lo cual resulta en la inhibición de la traducción. 4GN (Dominio N-terminal del factor eIF4G). (Lankat-Buttgereit and Goke 2003; Yang, Jansen et al. 2003)

En células de carcinoma de colon que fueron transfectadas establemente con PDCD4, se observó una disminución en la capacidad invasiva. Esto fue asociado con una reducción significativa de la actividad de MAP4K1 (Proteína 4 quinasa 1 activada por mitógenos), lo que sugiere que PDCD4 bloquea la vía de JNK al regular blancos río arriba tales como MAP4K1 (Yang, Matthews et al. 2006).

Zhang y DuBois, demostraron que la inhibición de COX-2 por el inhibidor selectivo NS398 incrementa la expresión del RNAm de PDCD4 en células de cáncer de colon (Zhang and DuBois 2001). Recientemente, en nuestro laboratorio se observó que COX-2, PGE₂ e IL-8 están asociados con la disminución de la expresión de PDCD4. Mientras que la sobreexpresión de PDCD4 bloquea la invasión inducida por PGE₂ e IL-8 en células MCF-7. Además, se ha reportado que PDCD4 inhibe la invasión de células de cáncer de mama al elevar la expresión de TIMP-2 (Nieves-Alicea, Colburn et al. 2009).

Por otra parte, altos niveles de PDCD4 han sido correlacionados con un aumento en la sensibilidad a antiestrógenos. Jansen *et al*, reportaron que la expresión estable del antisentido de PDCD4 reduce significativamente la sensibilidad de las células MCF-7 a geldanamicina y tamoxifeno. Mientras que la sensibilidad a geldanamicina se incrementó significativamente en células de cáncer renal UO-31 que sobreexpresaban PDCD4, induciendo un mayor arresto celular y apoptosis (Jansen, Camalier et al. 2004; Jansen, Camalier et al. 2005). Además se ha demostrado que PDCD4 puede promover significativamente la apoptosis inducida por cisplatino a través de la vía del receptor de muerte en células de cáncer de ovario (Xia *et al.*, 2010).

Sin embargo, no se sabe aún si en el cáncer de mama PDCD4 puede inhibir la invasión y resistencia a tamoxifeno inducida por leptina y COX-2.

Capítulo 2.

RESUMEN

La obesidad es un factor de riesgo significativo de desarrollar y morir por cáncer de mama para las mujeres post-menopáusicas. La leptina es una adipocina producida en altos niveles en personas obesas y sus receptores se sobreexpresan en tumores mamarios y metástasis en nódulos linfáticos. Anteriormente se ha demostrado que leptina estimula la invasión de células de cáncer de mama, lo cual está correlacionado con metástasis en cáncer mamario. Además, leptina ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a antiestrógenos. Por otra parte, se ha demostrado que PDCD4 es capaz de bloquear la invasión de células de cáncer de mama y ha sido correlacionado con un incremento en la sensibilidad a antiestrógenos. Sin embargo, aún no se ha determinado si PDCD4 puede bloquear la invasión y resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en células de cáncer de mama. En este estudio mostramos los nuevos hallazgos de que leptina no induce invasión en las células de cáncer de mama que sobre-expresan PDCD4 (MCF-7/PDCD4). Además TIMP-2 resultó ser esencial para el efecto anti-invasivo de PDCD4, ya que leptina estimuló la invasión de las células MCF-7/PDCD4 que habían sido pre-tratadas con siRNA anti-TIMP-2. Por lo tanto, el silenciamiento de TIMP-2 permitió que leptina incrementara la fosforilación de ERK 1,2 y JAK2/STAT3 pero no la activación de JNK. Estos datos indican que PDCD4 utiliza a TIMP-2 para ejercer su efecto anti-invasivo mediante la inhibición de la activación de ERK 1,2 y STAT3 inducida por leptina. Por otra parte, mostramos que leptina incrementa la resistencia a tamoxifeno en células MCF-7, pero más importante aún, que PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en células de cáncer de mama. Nuevas estrategias terapéuticas enfocadas a incrementar la expresión de PDCD4 en tumores de cáncer de mama podrían ser capaces de detener la progresión de tumores mamarios relacionados con obesidad y de esta manera prolongar la vida de los pacientes.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres. En Estados Unidos de América, durante el 2011, se estimaron alrededor de 39,970 muertes por cáncer de seno (39,520 mujeres, 450 hombres). En el mismo año, se estimaron 230,480 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres y cerca de 2,140 en hombres, mientras que los casos de cáncer de mama *in situ* fueron 57,650 (Society 2011). En México, en el 2010 fallecieron 5,113 mujeres por esta causa (SALUD 2010). Uno de los principales factores de riesgo para las mujeres postmenopáusicas de desarrollar cáncer de mama es la obesidad. Los tumores de pacientes con cáncer de mama y alto índice de masa corporal son típicamente dependientes de hormonas (Verreault, Brisson et al. 1989; Giuffrida, Lupo et al. 1992; Huang, Newman et al. 2000). La leptina, es una hormona de 16 kDa que fue descubierta como un regulador de peso corporal y balance energético que actúa en el hipotálamo, es una de las muchas hormonas relacionadas con obesidad y cáncer de mama (Zhang, Proenca et al. 1994). Ambos factores, masa corporal y el porcentaje de grasa incrementan los niveles de leptina circulante (McMurtry, Simeone et al. 2009).

Una alta expresión de leptina y la isoforma larga de su receptor ha sido encontrada en tumores mamarios. (Ishikawa, Kitayama et al. 2004; Caldefie-Chezet, Damez et al. 2005; Garofalo, Koda et al. 2006; Miyoshi, Funahashi et al. 2006; Revillion, Charlier et al. 2006). En ratones deficientes de leptina, se ha observado una disminución de tumores mamarios inducidos por oncogenes (Cleary, Juneja et al. 2004). Además, altos niveles de leptina en tumores mamarios se correlacionan con un mal pronóstico e incremento en la incidencia de metástasis (Ishikawa, Kitayama et al. 2004; Garofalo, Koda et al. 2006; Revillion, Charlier et al. 2006). La metástasis en cáncer de mama es directamente asociada con la invasión (McMurtry, Simeone et al. 2008). Recientemente, hemos demostrado que leptina estimula la invasión de las células de cáncer de mama MCF-7 al activar JNK, el cual a su vez incrementa la actividad de metaloproteinasa-2.

Leptina también ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a antiestrógenos en cáncer de mama (Garofalo, Sisci et al. 2004). Es un potente modulador de la vía de señalización del receptor de estrógeno (Catalano, Marsico et al. 2003; Catalano, Mauro et al. 2004; Garofalo, Sisci et al. 2004). La leptina estimula la producción de estrógenos a través del incremento de la expresión de la aromatasa, pero además puede activar el receptor de estrógeno de una manera independiente de ligando. Por otra parte, esta hormona puede estabilizar el receptor de estrógeno al interferir con su degradación mediada por el proteosoma (Garofalo, Sisci et al. 2004). Por lo tanto, la alta expresión de leptina podría estar asociada con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama ya que estimula invasión y resistencia a antiestrógenos. Nuevas estrategias terapéuticas destinadas a bloquear la señalización de leptina en tumores mamarios podrían ser capaces de impedir la progresión del cáncer de mama relacionado con obesidad para así prolongar la vida de los pacientes.

PDCD4, originalmente identificado como un inhibidor de la transformación celular en ratones, es un nuevo supresor de tumores. La expresión de PDCD4 está disminuida o es nula en varios tipos de tumores, incluyendo tumores de mama invasivo ductal (Jansen, Camalier et al. 2004). Recientemente se demostró que al incrementar la expresión de TIMP-2, la sobreexpresión de PDCD4 suprime la invasión de las células de cáncer de mama mediada por PGE₂ e IL-8 (Nieves-Alicea, Colburn et al. 2008). Sin embargo, aún no se sabe si PDCD4 podría suprimir la invasión y resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en las células de cáncer de mama

En el presente trabajo encontramos que la sobreexpresión de PDCD4 permite incrementar la transcripción de TIMP-2, el cual puede inhibir la invasión de las células de cáncer de mama inducida por leptina al bloquear la activación de ERK 1,2 y STAT3. Además, que la sobreexpresión de PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno mediada por leptina en células de cáncer de mama.

2.1. HIPÓTESIS

PDCD4 inhibe la progresión del cáncer de mama inducida por leptina bloqueando la invasión y resistencia a tamoxifeno.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar si PDCD4 inhibe la progresión inducida por leptina en las células de cáncer de mama bloqueando la invasión y resistencia a tamoxifeno.

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si PDCD4 inhibe la invasión de las células de cáncer de mama inducida por leptina.
- Analizar la activación de ERK, STAT3 y JNK inducida por leptina en células MCF-7 que sobreexpresan PDCD4.
- Examinar si TIMP-2 es esencial para el efecto anti-invasivo de PDCD4.
- Determinar si PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en células de cáncer de mama.

2.4. MATERIAL Y MÉTODOS

2.4.1. Líneas celulares tumorales.

En este estudio se utilizó la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7 silvestre (MCF-7/WT), la cual fue transfectada establemente con el plásmido pcDNA 3.1 (MCF-7/Vector) o con plásmido pcDNA 3.1 que contiene el gen de PDCD4 (MCF-7/PDCD4). Estas células fueron adquiridas a través de la colaboración con la Dra. Ana M Tari del MD Anderson Cancer Center en la Ciudad de Houston, Texas, EUA. Las células fueron examinadas contra micoplasma y mantenidas en medio DMEM/F12 (Medio Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen Corporation) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) en 5% de CO₂ y 95% de humedad a 37°C. Para el mantenimiento de las líneas celulares transfectadas, se realizaron tratamientos una vez por semana con 500 µg/mL de geneticina.

2.4.2. Ensayo de invasión en Matrigel

La invasividad de las células MCF-7/WT y MCF-7/PDCD4 tratadas con leptina se determinó contando el número de células que invadieron a través del Matrigel, el cual es una membrana basal artificial. Las células fueron colectadas y lavadas con medio DMEM/F12 sin suero. Después se ajustaron a 4×10^5 células en 1 mL de medio sin suero y se agregaron dentro de insertos especiales llamados transwells (los cuales cuentan con un filtro con poros de 8 µm y son colocados dentro de pozos en placas de 6 pozos (Fisher Scientific, Middleton, VA, USA)) a los que se les recubrió con una capa de Matrigel (0.7 mg/mL: BD Bioscience, Bedford, MA, USA). Posteriormente, al pozo donde se colocó el transwell se le agregaron 2 mL de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS, el cual se utilizó como agente quimiotáctico para las células de cáncer de mama (Figura 6). Finalmente, las células fueron tratadas con 0, 10 y 100 ng/mL de leptina empleando medio sin suero. Setenta y dos horas después, las células presentes en la superficie superior del filtro del transwell fueron removidas con una torunda. Mientras que las células que invadieron a través del Matrigel dentro de la parte inferior del filtro fueron fijadas en laminillas, teñidas con el sistema de tinción Hema-3 (Fisher Scientific), contadas y fotografiadas a una magnificación de 40X. Se cuantificaron las células presentes en 9 campos de cada laminilla y por

triplicado. Para comparar la habilidad invasiva de las células MCF-7 parentales con la de las células MCF-7/PDCD4 se empleó la prueba *t* de student para dos muestras

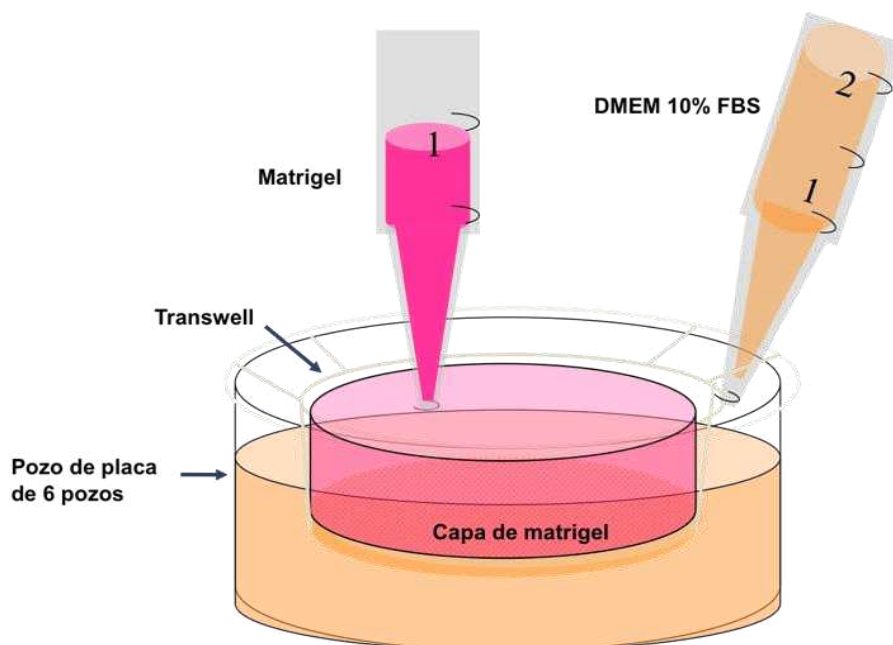


Figura 6. Ensayo de invasión en Matrigel.

2.4.3. Transfección de las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2.

Las células MCF-7/PDCD4 fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 2×10^5 células por pozo. Al día siguiente, las células se transfectaron con 200 nM de siRNA anti-TIMP-2 (Thermo Scientific) y siRNA control (Qiagen) empleando como agente de transfección Hiperfect (Qiagen) en una proporción de 1:4 con respecto al siRNA, en el orden y volumen que se muestra en la tabla 1. Todos los componentes se mezclaron por agitación en vórtex durante 10 s y después fueron incubados por 15 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. Mientras la formación de los complejos tenía lugar, el medio de cultivo fue cuidadosamente aspirado de las placas. Se agregó medio fresco y posteriormente fueron adicionados lentamente, gota por gota sobre las células los complejos de transfección. Se agitó la placa con cuidado para asegurar una distribución uniforme de los complejos sobre el cultivo. Cuarenta y ocho horas después, las

células se colectaron y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pozo. Finalmente se trataron con leptina a 100 ng/mL en medio DMEM/12 5% FBS durante 72 h más. Después de éste período de incubación las células fueron colectadas para realizar RT-PCR y western blot. De la misma manera se colectaron células para llevar a cabo ensayos de invasión como se describe anteriormente.

Tabla 1.

Esquema de transfección de las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2 y control.

siRNA anti-TIMP-2 y Control [20µM]	Hiperfect	Medio DMEM/F12 5% FBS	Volumen Final
20 µl	20 µl	75 µl	100 µl

2.4.4. Extracción de RNA total y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).

Para confirmar que los niveles de RNAm de TIMP-2 fueron reducidos en las células transfectadas con siRNA anti-TIMP-2, se extrajo RNA total utilizando el kit RNeasy (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, las células se lisaron adicionando la solución amortiguadora RLT, se resuspendieron usando una jeringa con aguja de 0.9 mm de diámetro. Después se agregó un volumen de etanol al 70% al homogenizado y se mezcló por pipeteo. Se transfirieron 700 µL de la muestra (incluyendo algún precipitado que se pudo haber formado) a las columnas RNeasy, colocadas en tubos de 2 mL. Se centrifugaron 15 s a 10000 rpm, para descartar el fluido a través de la columna. Luego se adicionaron 700 µL de la solución amortiguadora RW1 en la columna y se centrifugó a 10000 rpm por 15 s, para descartar el fluido a través de la columna. Posteriormente, se agregaron 500 µL de solución RPE a la columna y se centrifugó 2 min a 10000 rpm, para descartar el fluido a través de la columna. Después la columna se colocó en tubos de 1.5 mL, se le adicionó agua libre de RNAsas y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 min para eluir el RNA. Para llevar a cabo el RT-PCR se trabajó con el sistema SuperScript III one-step RT-PCR (Invitrogen Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando 1 µg de RNA. Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores (primers) utilizados

son las siguientes; TIMP-2: sentido, 5'-GGT CTC GCT GGA CGT TGG AG-3' y antisentido, 5'-GGA GCC GTC ACT TCT CTT G-3'. GAPDH: sentido, 5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3' y antisentido, 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'. GAPDH se usó como control de carga. Las condiciones del PCR para todas las reacciones que se realizaron fueron como se describe a continuación: 55°C 30 min, 94°C 2 min, 30 ciclos de 94°C durante 15 s, 57°C por 30 s, 68°C 1 min y 68°C 5 min. Los productos del PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5%. El corrimiento de los geles se llevo a cabo a 90 V.

2.4.5. Western Blot

2.4.5.1. Obtención de las muestras.

Después sembrar y tratar las células, éstas se tripsinizaron, colectaron y centrifugaron a 1500 rpm, a una temperatura de 4°C por 5 min. En seguida, se realizaron dos lavados con una solución de PBS 1X e inhibidores de fosfatasas. Posteriormente se removió el sobrenadante y el pellet celular se conservó a -80°C hasta su uso.

2.4.5.2. Preparación de las muestras.

Las células colectadas se lisaron con 50 µL de buffer de lisis (1% Triton X-100, 150 mM NaCl y 25 mM de Tris, pH 7.6, 4 µL/mL de NaF, 4 µL/mL de Na₃VO₄ y 10 µL/mL de inhibidor de proteasas SIGMA (St. Louis MO)) y agitación en vórtex por 30 s. Las muestras se incubaron durante 30 min a 4°C (repetiendo la agitación en vórtex cada 5 min o hasta deshacer la pastilla celular). Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL. Las proteínas fueron cuantificadas por el método del ácido bicinonónico, empleando el kit Pierce BCA protein assay de Thermo Scientific (Rockford, IL).

2.4.5.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Las proteínas obtenidas fueron separadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. En cada carril se cargaron 30 µg de proteínas totales en geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se realizó en buffer de

corrimiento (Tris-glicina 1X) a 40 V para el gel concentrador y a 70 V para el gel separador.

2.4.5.4. Inmunoelectrotransferencia.

Una vez terminada la electroforesis, el gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) como se describe a continuación. Se preparó el sándwich para la transferencia colocando el gel, esponjas, papel filtro y la membrana de nitrocelulosa dentro de un recipiente con buffer de transferencia (Tris-glicina-metanol 1X).

El sándwich se colocó dentro de la cámara (Bio-Rad), la cual se llenó con el mismo buffer. La transferencia se llevó a cabo a 26 V constantes a 4°C durante 24 h. Al término de la transferencia la membrana fue teñida con Rojo Ponceau, después se lavó con H₂O hasta su total decoloración. Posteriormente, se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 1X pH 7.4 por 30 min y en agitación constante. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween 1X pH 7.4.

Después de los lavados, los anticuerpos primarios de ERK1,2 fosforilado (T²⁰²/Y²⁰⁴), ERK1,2 total, STAT3 fosforilado (Y⁷⁰⁵), STAT3 total, JNK fosforilado (T¹⁸³/Y¹⁸⁵) y JNK total se prepararon a una dilución 1:1000 con leche descremada al 5% en TBS-Tween 1X pH 7.4 y se agregaron por separado respectivamente a las membranas correspondientes, las cuales se dejaron en agitación constante durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 1X pH 7.4. En seguida se agregó el anticuerpo secundario anti-Fc de ratón o conejo (dependiendo del anticuerpo primario utilizado) a la membrana a una dilución 1:1000 con leche descremada al 5% en TBS-Tween 1X pH 7.4 y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 2 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 1X pH 7.4. Posteriormente, las proteínas fueron detectadas a través de quimioluminiscencia incubando las membranas con el reactivo ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ) durante 1min. La membrana se colocó en un film autoradiográfico durante diferentes tiempos de exposición. El film fue revelado en la máquina de revelado radiográfico AFP IMAGING. Finalmente, las imágenes fueron escaneadas y analizadas en el densitómetro

Alphamager (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). La β -actina fue utilizada como control de carga. Las membranas fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo primario de β -actina adquirido de Sigma (St. Louis, MO), el cual se preparó a una dilución de 1:10,000 con leche descremada al 5% en TBS-Tween 1X pH 7.4. Después se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 1X pH 7 y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-Fc de ratón obtenido de Cell Signaling Technology, Inc. (3 TraskLane Danvers, MA) (a una dilución de 1:10,000) por otros 30 min a temperatura ambiente.

2.4.6. Ensayo de viabilidad celular (MTS).

Para determinar si PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina, llevamos a cabo ensayos de viabilidad celular (MTS). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1000 células en 100 μ L de medio DMEM/F12 suplementado con 5% de FBS por pozo y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, las células se trataron con diferentes concentraciones de leptina (0, 10 y 100 ng/mL) e incubaron por 24 h, después de éste tiempo, fueron tratadas con 0, 0.1, 1, 5 y 9 μ M de tamoxifeno durante 5 días. Posteriormente se preparó la solución de trabajo, agregando 2 mL de la solución de MTS Promega (Madison, WI) y 100 μ L de la solución PMS Promega (Madison, WI). Después se agregaron 20 μ L de la solución MTS/PMS a cada pozo. Las placas se leyeron en un lector de ELISA (Kinetic Microplate Reader; Molecular Devices Corp.) a 490 nm. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control (células no tratadas).

2.5. RESULTADOS

2.5.1. PDCD4 inhibe la invasión inducida por leptina en las células de cáncer de mama MCF-7.

Mediante western blot confirmamos que las células MCF-7/PDCD4 expresan más niveles de la proteína PDCD4 que las células control (MCF-7/Vector). Los niveles de PDCD4 expresados en las células MCF-7/PDCD4 fueron 1.5 veces más altos que en las células control (Figura 7). Posteriormente, realizamos ensayos de invasión en Matrigel, tratando a las células MCF-7 parentales (células control MCF-7/WT) y MCF-7/PDCD4 con 0, 10 y 100 ng/mL de leptina. En ausencia de leptina, el número de células MCF-7/WT que invadieron a través del Matrigel fue de 55 (± 15), mientras que en presencia de 10 y 100 ng/mL de leptina, el número de células invasivas fue de 100 (± 18) y 140 (± 30), respectivamente (Figura 8A). Estos resultados confirmaron nuestros reportes previos de que leptina estimula la invasión de células MCF-7 (McMurtry, Simeone et al. 2008). Por otra parte, leptina no estimuló la invasión de las células MCF-7/PDCD4; en presencia de 0, 10 y 100 ng/mL de leptina, el número de células MCF-7/PDCD4 que invadieron a través del Matrigel fue de 48 (± 5), 51 (± 4) y 47 (± 4) respectivamente (Figura 8B). Estos datos, indican que altos niveles de PDCD4 bloquean la invasión inducida por leptina en las células de cáncer de mama.

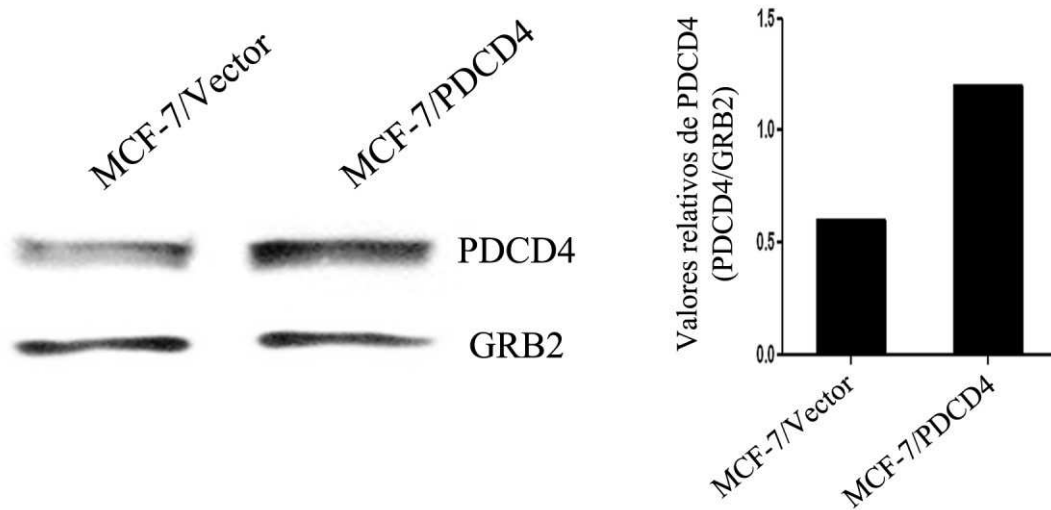
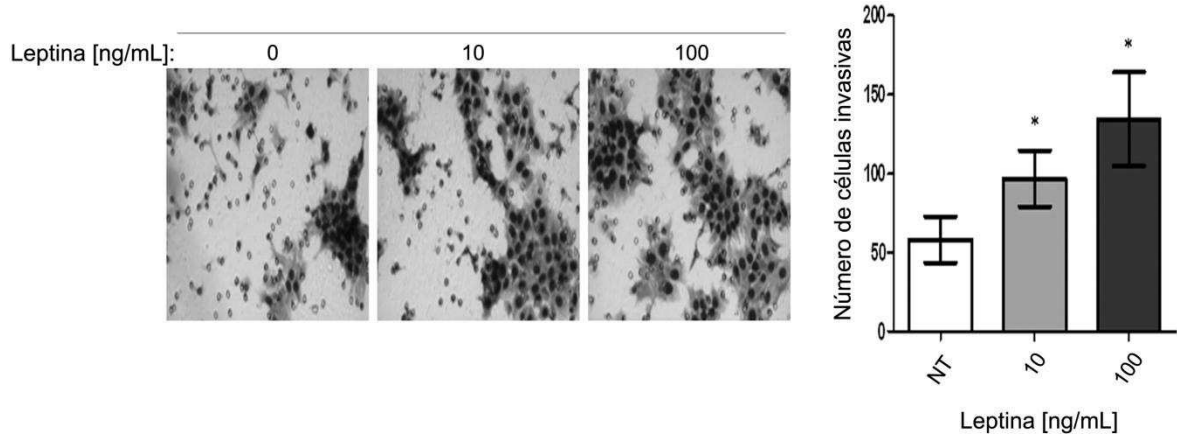


Figura 7. Sobreexpresión de PDCD4 en las células establemente transfectadas MCF-7/PDCD4. Mediante western blot se confirmó la alta expresión de PDCD4 en las células MCF-7/PDCD4. La proteína GRB2 fue usada como control de carga. Las bandas de proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia. Las imágenes fueron escaneadas y analizadas por densitometría a través del programa Alpha Imager.

A



B

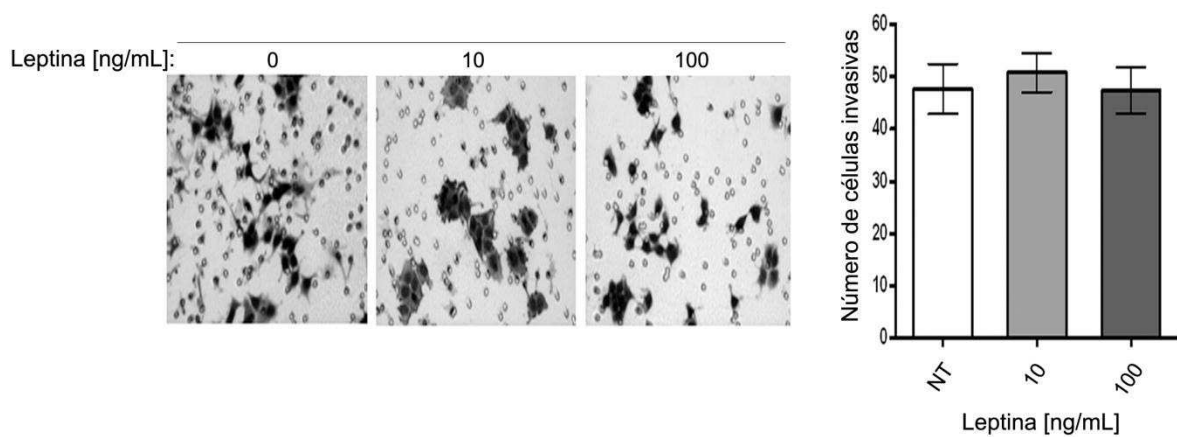


Figura 8. PDCD4 inhibe la invasión inducida por leptina en células de cáncer de mama. Se realizaron ensayos de invasión en Matrigel para determinar el efecto de leptina en la invasividad de las células (A) MCF-7/WT y (B) MCF-7/PDCD4. El número de células que invadieron a través del Matrigel fue significativamente más alto en las células tratadas con leptina que en las células no tratadas. Las columnas indican el número promedio de las células invasivas \pm desviación estándar, (*, $P < 0.05$).

2.5.2. TIMP-2 es esencial para que PDCD4 inhiba la invasión inducida por leptina en células de cáncer de mama MCF-7.

Debido a que los resultados anteriores muestran que la sobreexpresión de PDCD4 inhibe la invasión de células de cáncer de mama inducida por leptina y a que en estudios anteriores se observó que la sobreexpresión de PDCD4 bloquea la invasión de células de cáncer de mama inducida por PGE₂ e IL-8 a través del incremento de la expresión de TIMP-2, (Nieves-Alicea, Colburn et al. 2008) decidimos determinar si TIMP-2 podría ser esencial para el efecto anti-invasivo de PDCD4. Primeramente realizamos RT-PCR para determinar los niveles basales de RNAm de TIMP-2 en las células MCF-7/WT, MCF-7/Vector y MCF-7/PDCD4. Los niveles de RNAm de *TIMP-2* fueron aproximadamente 2.1 y 1.5 más altos en las células MCF-7/PDCD4 que en las células MCF-7/WT y MCF-7/Vector, respectivamente (Figura 9). Con el fin de determinar si TIMP-2 es esencial para que PDCD4 pueda bloquear la invasión de las células de cáncer de mama inducida por leptina, tratamos las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2 y control (Figura 10), y después realizamos ensayos de invasión en Matrigel tratando a las células con leptina (100 ng/mL). En presencia de leptina, el número de células MCF-7/PDCD4 no tratadas y tratadas con siRNA control que invadieron a través del Matrigel fue de 60 (± 3) y 62 (± 5) respectivamente, mientras que bajo las mismas condiciones, el número de células MCF-7/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2 que invadieron a través del Matrigel fue de 220 (± 20) (Figura 11). Estos resultados sugieren que en presencia de leptina y cuando la expresión de TIMP-2 es disminuida, la capacidad invasiva de las células MCF-7/PDCD4 aumenta significativamente, indicando que TIMP-2 es esencial para que PDCD4 pueda bloquear la invasión de las células de cáncer de mama inducida por leptina.

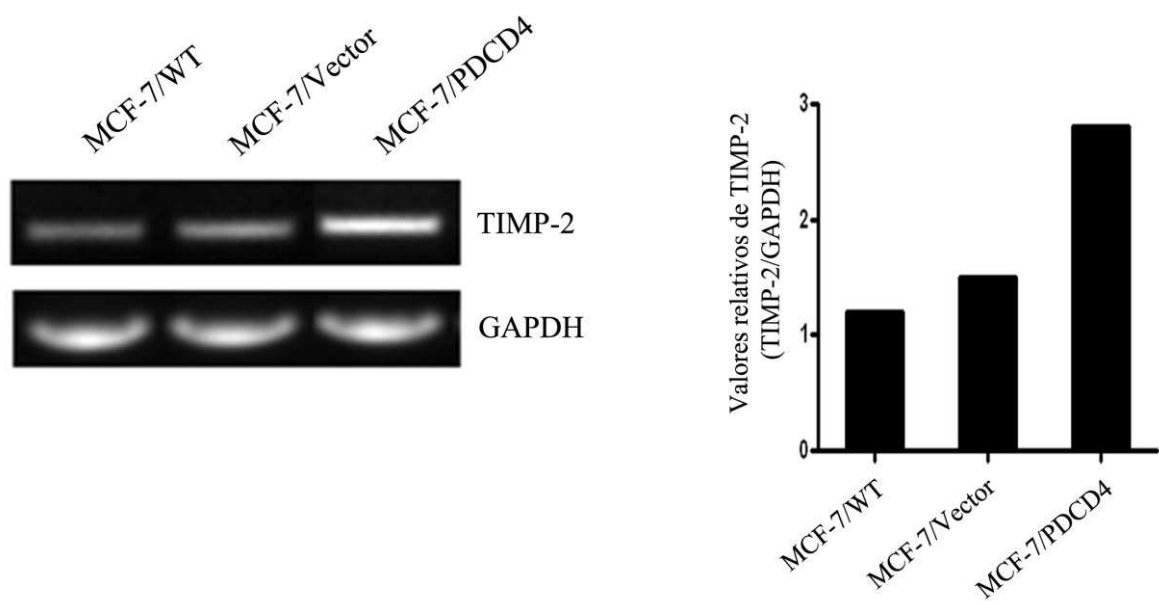


Figura 9. Sobreexpresión de TIMP-2 en las células MCF-7/PDCD4. Se realizó RT-PCR para determinar los niveles de mRNA de TIMP-2 en las células de cáncer de mama. GAPDH fue usado como control de carga. Las bandas de DNA fueron visualizadas, fotografiadas y analizadas por densitometría a través del Alpha Imager.

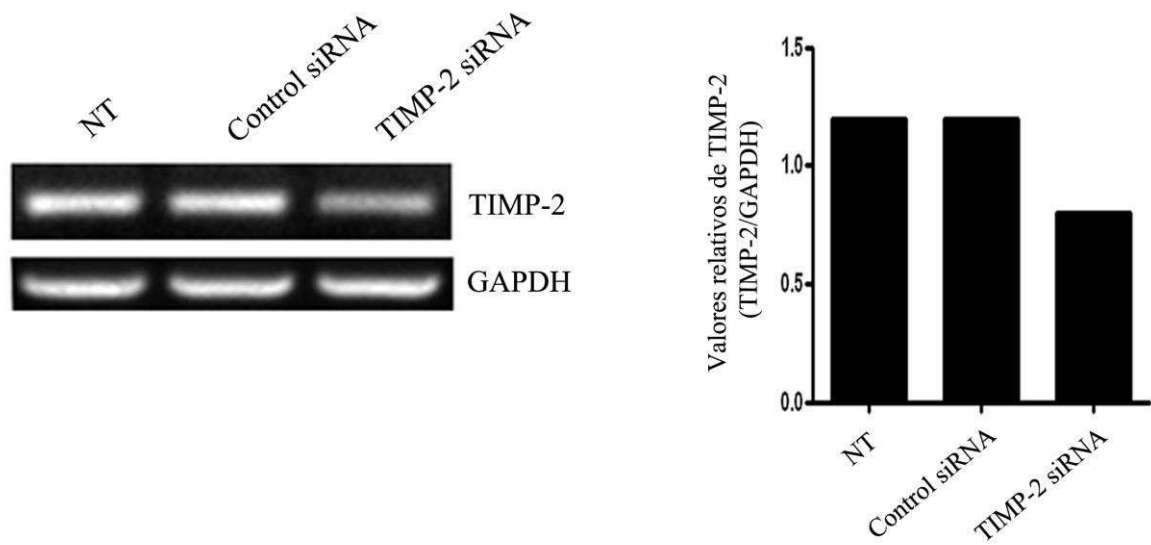


Figura 10. Reducción en la expresión del RNAm de TIMP-2 en las células MCF-7/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2. Se realizó RT-PCR para confirmar que el siRNA anti-TIMP-2 redujo la expresión del RNAm de *TIMP-2*. GAPDH fue usado como control de carga. Las bandas de DNA fueron visualizadas, fotografiadas y analizadas por densitometría a través del Alpha Imager.

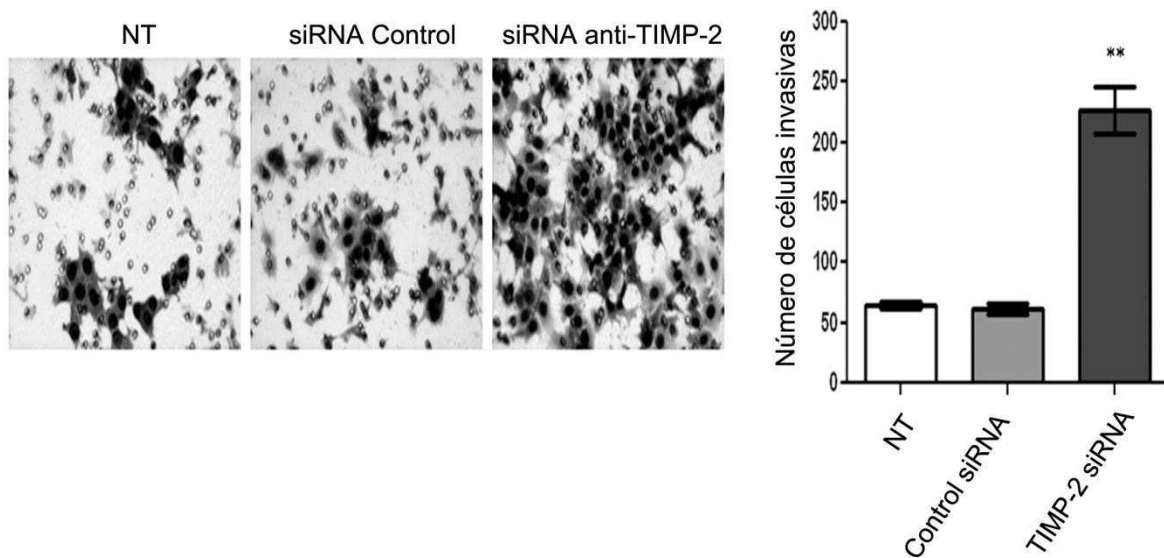


Figura 11. El silenciamiento de TIMP-2 incrementa la invasión de las células de cáncer de mama MCF-7/PDCD4. El número de células que invadieron a través del Matrigel fue significativamente más alto en las células tratadas con siRNA anti-TIMP-2 que en las células transfectadas con el siRNA control. Las columnas indican el número promedio de las células invasivas \pm desviación estándar, (**, $P < 0.01$).

2.5.3. El silenciamiento de TIMP-2 permite la activación de ERK1,2 y STAT3 inducida por leptina en las células MCF-7/PDCD4.

Nuestros resultados anteriores sugieren que TIMP-2 es esencial para que PDCD4 pueda bloquear la invasión de las células de cáncer de mama inducida por leptina y como ya se ha demostrado que leptina activa ERK1,2, STAT3 y JNK en cáncer de mama,(Catalano, Marsico et al. 2003; Catalano, Mauro et al. 2004; Yin, Wang et al. 2004; Chen, Chang et al. 2006; Gonzalez, Cherfils et al. 2006; Ray, Nkhata et al. 2007; Saxena, Sharma et al. 2007; Jiang, Yu et al. 2008; McMurtry, Simeone et al. 2008) nuestro siguiente objetivo fue determinar si el mecanismo por el cual PDCD4 y TIMP-2 bloquean la invasión inducida por leptina en las células de cáncer de mama es a través de la activación de ERK1,2, STAT3 y/o JNK. Por tanto, pre-tratamos las células MCF-7/PDCD4 con siRNA anti-TIMP-2 y siRNA control, antes de tratarlas con leptina. En seguida, realizamos western blot para determinar los niveles de fosforilación de ERK1,2, STAT3 y JNK. En presencia de leptina, las células MCF-7/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2 aumentaron tres veces los niveles de ERK1,2 fosforilado comparado con las células tratadas con el siRNA control (Figura 12A). Además en presencia de leptina, las células MCF-7/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2 aumentaron 2.5 veces más la fosforilación de STAT3 comparado con las células tratadas con el siRNA control (Figura 12B). Sin embargo, bajo las mismas condiciones, no se observó diferencia en los niveles de JNK fosforilado entre las células MCF-/PDCD4 tratadas con siRNA anti-TIMP-2 y control (Figura 12C). Estos resultados muestran que el silenciamiento de TIMP-2 permite que leptina estimule la activación de ERK1,2 y STAT3 en las células MCF-7/PDCD4. De manera interesante el silenciamiento de TIMP-2 permitió un incremento en la fosforilación de ERK 1,2 pero una disminución en los niveles de ERK 1,2 total, mientras que el silenciamiento de TIMP-2 incremento los niveles de fosforilación de STAT3 sin afectar los niveles de STAT3 total. En este caso, se sugiere que podría existir un mecanismo de retroalimentación que regula los niveles de ERK fosforilado a partir de los niveles de ERK total.

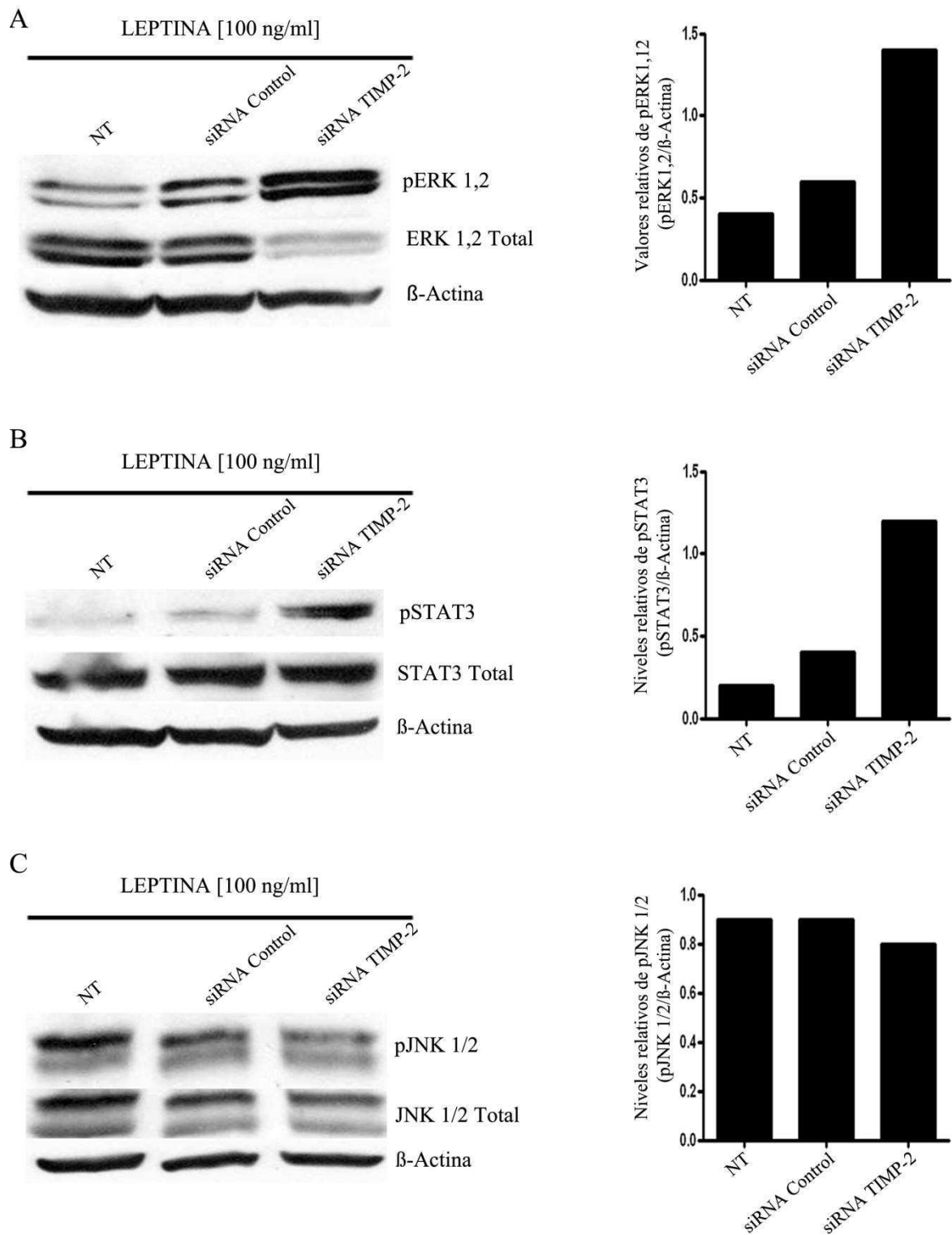


Figura 12. El silenciamiento de TIMP-2 incrementa la activación inducida por leptina de ERK1,2, STAT3, pero no afecta la activación de JNK en células MCF-7/PDCD4. Mediante western blot se determinaron los niveles de (A) ERK1,2 fosforilado y ERK1,2 total, (B) los niveles de STAT3 fosforilado y STAT3 total y (C) los niveles de JNK fosforilado y JNK total. β -actina fue usada como control de carga. Las bandas de

proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia. Las imágenes fueron escaneadas y analizadas por densitometría a través del programa Alpha Imager.

2.5.4. PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina.

La leptina puede incrementar la expresión del gen de la aromatasa y su actividad en células MCF-7, lo cual podría aumentar la síntesis de estrógeno. Leptina puede además incrementar la estabilidad del receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) permitiendo mantener la transcripción dependiente de $ER\alpha$ en células de cáncer de mama en presencia de antiestrógenos (Garofalo and Surmacz., 2006). Estas observaciones sugieren que altos niveles de leptina en pacientes obesos con cáncer mamario podrían contribuir al crecimiento tumoral y desarrollo de resistencia a antiestrógenos. Por otra parte, altos niveles de PDCD4 han sido correlacionados con un incremento en la sensibilidad a antiestrógenos. Para determinar si PDCD4 puede inhibir la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en células MCF-7, realizamos ensayos de viabilidad celular, pre-tratando a la células MCF-7/Vector y MCF-7/PDCD4 con 0, 10 y 100 ng/mL de leptina durante 24 h. En seguida las células fueron tratadas con 0, 0.1, 1, 5 y 9 μ M de tamoxifeno durante 5 días. Nuestros resultados muestran que las células MCF-7/PDCD4 son más sensibles al tamoxifeno que las células MCF/Vector (Figura 13A). En presencia de 10 ng/mL de leptina, las células MCF-7/Vector llegaron a ser más resistentes a tamoxifeno, mientras que la leptina no estimuló la resistencia a tamoxifeno en las células MCF-7/PDCD4 (Figura 13B). Aunque en presencia de 100 ng/mL de leptina la resistencia a tamoxifeno en las células MCF-7/Vector no se incrementó, la sensibilidad a tamoxifeno en las células MCF-7/PDCD4 se mantuvo (figura 13C).

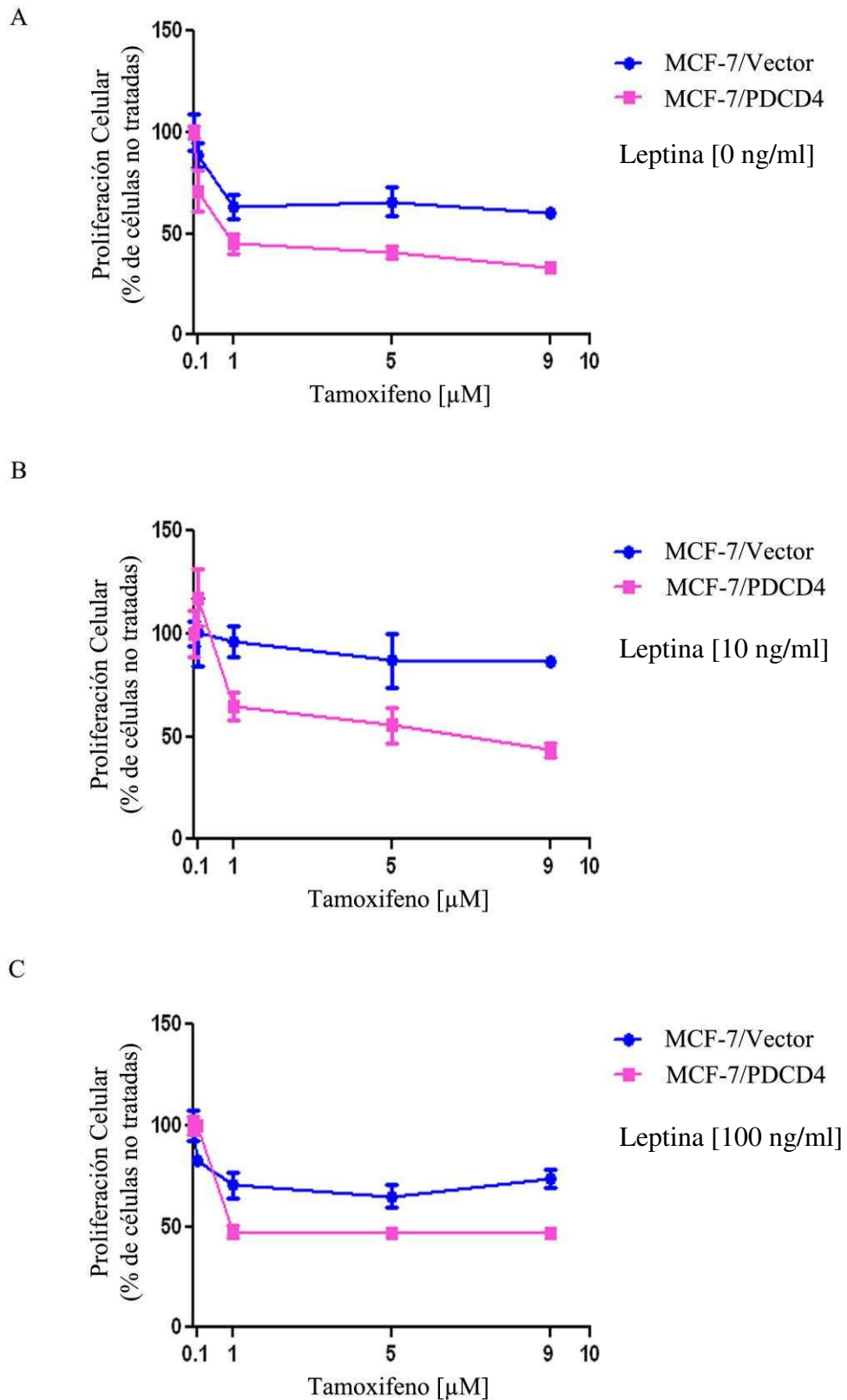


Figura 13. PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina. Las células MCF-7/Vector y MCF-7/PDCD4 se pre-trataron con 0 (A), 10 (B) y 100 (C) ng/mL de leptina durante 24 h. Después de este tiempo de incubación, fueron tratadas con 0, 0.1, 1, 5 y 9 μM de tamoxifeno por 5 días. La viabilidad celular se realizó mediante MTS

2.6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

La obesidad es un factor de riesgo de mortalidad para las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama; las mujeres con un índice de masa corporal de al menos 40 tienen 2.1 veces más riesgo de morir por cáncer de mama (Calle, Rodriguez et al. 2003). La leptina es un enlace vital entre obesidad y cáncer de mama, ya que altos niveles de leptina han sido asociados con un mal pronóstico e incremento en la incidencia de metástasis (Ishikawa, Kitayama et al. 2004; Garofalo, Koda et al. 2006; Revillion, Charlier et al. 2006). Nuevas estrategias terapéuticas son necesarias para impedir la progresión inducida por leptina en cáncer mamario.

En este estudio, mostramos por primera vez que PDCD4 inhibe la invasión de células de cáncer de mama inducida por leptina y que tal y como en reportes anteriores (Nieves-Alicea, Colburn et al. 2008) TIMP-2 es crítico para el efecto anti-invasivo de PDCD4. La leptina estimuló la invasión de células MCF-7/PDCD4 cuando la expresión de TIMP-2 disminuyó. Interesantemente, se ha observado que la expresión de PDCD4 está solo ligeramente disminuida en muestras de carcinoma ductal *in situ* en comparación con células de epitelio normal, pero esta marcadamente disminuida en muestras de carcinoma ductal invasivo (Wen, Shi et al. 2007). Por lo tanto, PDCD4 podría actuar como un supresor de la invasión en células de cáncer de mama.

En este proyecto estudiamos también el mecanismo a través del cual PDCD4 y TIMP-2 inhiben la invasión inducida por leptina en células de cáncer de mama. Se sabe que leptina estimula la fosforilación de ERK 1,2, STAT3 y JNK en células de cáncer de mama (Catalano, Marsico et al. 2003; Catalano, Mauro et al. 2004; Yin, Wang et al. 2004; Chen, Chang et al. 2006; Gonzalez, Cherfils et al. 2006; Ray, Nkhata et al. 2007; Saxena, Sharma et al. 2007; Jiang, Yu et al. 2008; McMurtry, Simeone et al. 2008). Nosotros encontramos que el silenciamiento de TIMP-2 permite que leptina aumente la activación de ERK 1,2 y STAT3 en células MCF-7/PDCD4, sugiriendo que PDCD4 utiliza TIMP-2 para contrarrestar la activación mediada por leptina de ERK 1,2 y STAT3 para bloquear la invasión. En efecto ERK 1,2 y STAT3 son esenciales para la invasión estimulada por leptina, ya que se ha observado que inhibidores farmacológicos de JAK2/STAT3 y ERK

1,2 bloquean la invasión inducida por leptina en células de carcinoma hepatocelular y endometrial (Sharma, Saxena et al. 2006; Saxena, Sharma et al. 2007).

Sin embargo, el silenciamiento de TIMP-2 no cambió los niveles de fosforilación de JNK mediada por leptina, indicando que TIMP-2 no es utilizado por PDCD4 en la regulación de la actividad de JNK. Se ha mostrado que PDCD4 inhibe la transcripción de MAP4K1 (Yang, Matthews et al. 2006), una quinasa río arriba de JNK, inhibiendo de este modo la activación de c-Jun y la transcripción dependiente de AP-1 (Yang, Matthews et al. 2006). Alternativamente, PDCD4 podría inhibir la transcripción dependiente de AP-1 al interferir con el reclutamiento del co activador p300 a través de c-Jun, y suprimir la fosforilación de c-Jun a través de JNK (Bitomsky, Bohm et al. 2004). Por lo que en nuestro caso PDCD4 podría estar regulando a JNK a través de la inhibición de MAP4K1 o del reclutamiento del co activador p300 o mediante otras proteínas pero no a través de TIMP-2.

Por otra parte, mostramos que leptina incrementa la resistencia a tamoxifeno en células MCF-7, ya que en presencia de leptina (10ng/mL) y tamoxifeno (9 μ M) se obtuvo un 13% de inhibición de la proliferación en células MCF-7/Vector, comparado con el 40% de inhibición observado en las células tratadas solo con tamoxifeno (9 μ M). Además, observamos que en las células MCF-7/PDCD4, en presencia de leptina (10ng/mL) y tamoxifeno (9 μ M) el porcentaje de inhibición del crecimiento fue de 57%, indicando que PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en células de cáncer de mama. En base a estos resultados se sugiere que PDCD4 podría no solo actuar como un supresor de la invasión si no también como un supresor de cáncer mamario en pacientes con cáncer de mama obesos.

La leptina puede incrementar la expresión del gen de la aromatasa y su actividad en células MCF-7, lo cual podría aumentar la síntesis de estrógeno. Leptina puede además incrementar la estabilidad del receptor de estrógeno alfa (ER α) permitiendo mantener la transcripción dependiente de ER α en células de

cáncer de mama en presencia de antiestrógenos (Garofalo and Surmacz., 2006). Estas observaciones sugieren que altos niveles de leptina en pacientes obesos con cáncer mamario podrían contribuir al crecimiento tumoral y desarrollo de resistencia a antiestrógenos

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de PDCD4 permite incrementar la transcripción de TIMP-2, el cual puede inhibir la invasión de células de cáncer de mama inducida por leptina al bloquear la activación de ERK 1,2 y STAT3. Además, la sobreexpresión de PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno mediada por leptina en células de cáncer de mama (Figura 20). Nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a incrementar la expresión de PDCD4 en tumores de mama podrían ser capaces de impedir la progresión del cáncer de mama relacionado con obesidad para prolongar y mejorar la calidad de vida de los pacientes y probablemente llegar a curarlos.

Capítulo 3.

RESUMEN

La expresión elevada de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en tumores de mama ha sido asociada con una menor tasa de supervivencia en pacientes con tumores positivos para ER α . Nosotros proponemos que COX-2 reduce la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama positivo para ER α debido a que disminuye la sensibilidad a tamoxifeno e incrementa la actividad invasiva de las células de cáncer de mama. Anteriormente, en nuestro laboratorio se demostró que la transfección del gen *COX-2* en las células de cáncer de mama MCF-7 (células positivas para ER α y sensibles a tamoxifeno) disminuyó la sensibilidad a tamoxifeno aproximadamente 5 veces e incrementó su actividad invasiva alrededor de 3 veces más comparado con las células MCF-7 no transfectadas. También, se demostró que COX-2 utiliza PGE₂ para activar PKC e inducir estos efectos tumorigénicos. Sin embargo, no se conocen hasta el momento cuales factores río abajo son utilizados por la vía COX-2/PGE₂/PKC para inducir resistencia a tamoxifeno e invasión de las células de cáncer de mama. Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de COX-2, PGE₂ y IL-8 está asociada con una baja expresión de PDCD4, mientras que la sobreexpresión de PDCD4 bloquea la invasión inducida por PGE₂ y IL-8. En este estudio, reportamos que COX-2 incrementa la fosforilación de JNK, pero no la de ERK 1,2, p38 ó AKT. La inhibición de JNK pero no la de ERK 1,2, redujo la invasión mediada por COX-2. Aunque, la inhibición de JNK no alteró la resistencia a tamoxifeno mediada por COX-2 en las células que sobreexpresan COX-2. La sobreexpresión de PDCD4 no afectó la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2. Nosotros concluimos que JNK es esencial para que COX-2 induzca invasión, pero no resistencia a tamoxifeno. También concluimos que aún y cuando PDCD4 bloquea la invasión inducida por COX-2 en células de cáncer de mama, PDCD4 no bloquea la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en células de cáncer de mama positivas para ER α .

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios han demostrado altos niveles de la proteína COX-2 en tumores sólidos (Eberhart, Coffey et al. 1994; Soslow, Dannenberg et al. 2000; Kirschenbaum, Liu et al. 2001). En cáncer de mama, la expresión de COX-2 es un marcador de supervivencia global y libre de enfermedad (Ristimaki, Sivula et al. 2002; Denkert, Winzer et al. 2003; O'Connor, Avent et al. 2004). Ristimaki y colaboradores reportaron que la expresión elevada de COX-2 estaba asociada con una baja tasa de supervivencia en pacientes con tumores mamarios positivos para ER α . Esta asociación fue particularmente significativa para los tumores de mama positivos para ER α que sobreexpresaban COX-2 y que no tenían expresión de p53 ó amplificación de *HER2/neu*. Además, observaron que las mujeres cuyos tumores de mama invasivo eran positivos para ER α pero tenían bajos niveles de COX-2, presentaban una oportunidad del 86% (IC de 95%, 84-89) de supervivencia libre de enfermedad distante a 5 años, mientras que las mujeres cuyos tumores eran positivos para ER α pero que tenían altos niveles de COX-2 presentaron una oportunidad de supervivencia libre de enfermedad distante a 5 años del 76% (IC de 95%, 72-81) (Ristimaki, Sivula et al. 2002).

Los pacientes con cáncer de mama que tienen tumores positivos para ER α son comúnmente tratados con moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM's). En nuestro laboratorio, se demostró previamente que la transfección de COX-2 dentro de la línea celular MCF-7, la cual es sensible a tamoxifeno y positiva para ER α redujo la sensibilidad a tamoxifeno 5 veces más que las células no transfectadas (Tari, Simeone et al. 2005). Estos resultados sugieren que los pacientes con cáncer de mama positivo para ER α que sobreexpresan COX-2 podrían no estar beneficiándose del tratamiento con tamoxifeno, como aquellos pacientes con tumores positivos para ER α que presentan bajos niveles de COX-2. Niveles elevados de COX-2 han sido asociados con un alto potencial metastásico en tumores mamarios. La expresión de COX-2 es alta en tumores metastásicos (Badawi and Badr 2003) y esta asociada con metástasis a nódulos linfáticos y distante (Costa, Soares et al. 2002; Denkert, Winzer et al. 2004; Ranger, Thomas et al. 2004). Además, se ha observado que COX-2 incrementa la invasión de las

células de cáncer de mama *in vitro* (Rozic, Chakraborty et al. 2001; Prosperi, Mallery et al. 2004; Singh, Berry et al. 2005). Nosotros y otros investigadores (Prosperi et al) demostramos que las células MCF-7 transfectadas con COX-2 (MCF-7/COX-2) son 3 veces más invasivas que las células MCF-7 parentales (Simeone, Nieves-Alicea et al. 2007). Por otra parte, demostramos que PGE₂ e IL-8 disminuyeron la expresión de PDCD4, pero que la sobreexpresión de PDCD4 inhibió la invasión inducida por COX-2 a través del incremento en los niveles de TIMP-2 (Nieves-Alicea, Colburn et al. 2009). Nosotros proponemos que la reducción en la sensibilidad a tamoxifeno y el incremento de la actividad invasiva inducida por COX-2 podrían contribuir a la reducción del rango de supervivencia en pacientes con tumores de mama positivos para ER α que sobreexpresan COX-2.

Se sabe que COX-2 activa la proteína quinasa C (PKC) (Fiebich, Schleicher et al. 2001; Timoshenko, Xu et al. 2003; Gerlo, Verdood et al. 2004; Chang, Ai et al. 2005). En nuestro laboratorio, se mostró que la activación de PKC incrementó la invasión de las células MCF-7 a través del Matrigel (Simeone, Nieves-Alicea et al. 2007) y redujo los efectos anti-proliferativos de tamoxifeno en las células MCF-7 (Tari, Simeone et al. 2005). Sin embargo, no se conoce cuales son los factores río abajo utilizados por COX-2 y PKC para incrementar la invasividad y reducir la sensibilidad a tamoxifeno de las células de cáncer de mama. Altos niveles de COX-2 han sido asociados con la activación de la familia de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la quinasa Akt (Guan, Buckman et al. 1998; Kim and Kim 2004; Ispanovic and Haas 2006; Wu, Luo et al. 2006; Park, Kim et al. 2007; Looby, Abdel-Latif et al. 2009). Pero no se sabe si estas quinasas regulan la resistencia a tamoxifeno y la actividad invasiva inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama. Además, hemos establecido que PDCD4 inhibe la invasión inducida por COX-2 de las células MCF-7, pero no se sabe aún si PDCD4 afecta la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2. En este estudio reportamos que COX-2 incrementa la actividad de JNK para mediar invasión, pero no la resistencia a tamoxifeno en las células de cáncer de mama MCF-7. También reportamos que PDCD4 no bloquea la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en células de cáncer de mama positivas para ER- α , a pesar de que PDCD4 bloquea la invasión inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama MFC-7.

3.1. HIPÓTESIS

JNK es esencial para que COX-2 induzca invasión y resistencia a tamoxifeno, mientras que PDCD4 inhibe la progresión del cáncer de mama al bloquear la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores río abajo utilizados por COX-2 y PKC para incrementar la invasividad y la resistencia a tamoxifeno de las células de cáncer de mama, así como analizar si PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama.

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si COX-2 incrementa la activación de ERK 1,2, p38MAPK, Akt y JNK en las células de cáncer de mama MCF-7.
- Dilucidar cual (es) de estas quinasas son esenciales para que COX-2 induzca invasión y resistencia a tamoxifeno en las células de cáncer de mama MCF-7.
- Establecer si PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama MCF-7.

3.4. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.4.1. Cultivo celular.

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 parental (MCF-7/WT) y la línea celular MCF-7/COX-2, la cual fue generada a través de la transfección estable del plásmido que codifica el gen *COX-2* en las células MCF-7 fueron adquiridas a través de la colaboración con la Dra. Ana M Tari del MD Anderson Cancer Center en la Ciudad de Houston, Texas, EUA. Las células fueron examinadas contra micoplasma y mantenidas en medio DMEM/F12 (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen Corporation) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y 500 µg/mL de geneticina (G418) en 5% de CO₂ y 95% de humedad a 37°C. En el caso de las células transfectadas, se trataron con, para mantener solo las células transfectadas. Para confirmar la sobreexpresión de COX-2 en las células MCF-7/COX-2, se realizó western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) a una dilución de 1:1000, y el anticuerpo secundario (anti-ratón) obtenido de Cell Signaling Technology, Inc. (3 TraskLane Danvers, MA) a una dilución de 1:1000.

3.4.2. Reactivos.

Citrato de tamoxifeno, Gö6976 (inhibidor de proteína quinasa C), SP600125 (inhibidor de JNK) y PD98059 (inhibidor de ERK) se compraron en EMD Chemicals (San Diego, CA). Las soluciones de trabajo (10 mM) de tamoxifeno, Gö6976, SP600125 y PD98059 fueron preparadas en DMSO y almacenadas a -20°C. Todos los reactivos se diluyeron en medio de cultivo a la concentración final indicada. El Matrigel se obtuvo de BD Biosciences (Bedford, MA). Los anticuerpos específicos para ERK fosforilado (T²⁰²/Y²⁰⁴), p38MAPK fosforilado (T¹⁸³/Y¹⁸⁵), JNK fosforilado (T¹⁸³/Y¹⁸⁵) y Akt fosforilado (S⁴⁷³), ERK total, JNK total, p38MAPK total, Akt total y c-Jun se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Los anticuerpos específicos para β-actina e Histona H3 se compraron en Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano se compraron de Amersham Life Sciences (Cell Signaling Technology)

3.4.3. Western blot

Las células MCF-7/WT y MCF-7/COX-2 fueron sembradas a una concentración de 4×10^5 células/pozo en una placa de 6 pozos. Dos días después, las células se colectaron y se aislaron proteínas totales para posteriormente realizar el western blot como se ha descrito previamente (sección 2.4.5.). La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico empleando el kit Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific). Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Posteriormente las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 1X pH 7.4 por 30 min y en agitación constante. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween 20 1X pH 7.4. Después de los lavados, cada anticuerpo primario con excepción de β -actina se agregó por separado respectivamente a las membranas correspondientes, a una dilución de 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados nuevamente, enseguida se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes. Posteriormente, las proteínas fueron detectadas a través de quimioluminiscencia (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y analizadas con el densitómetro Alphamager (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). β -actina fue utilizada como control de carga, como ya se indicó anteriormente (sección 2.4.5).

Para determinar el efecto de la inhibición de PKC en la fosforilación de JNK, las células MCF-7/COX-2 se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/pozo en una placa de 6 pozos. Dos días después, las células se trataron con el inhibidor Gö6976 a diferentes concentraciones (0, 25, 50 nM) durante 8 h. En seguida, se colectaron las células tratadas y no tratadas, se aislaron las proteínas para después realizar western blot como ya se ha descrito (sección 2.4.6.).

3.4.4. Extracción de proteínas nucleares.

Para determinar los niveles de c-Jun en las células MCF-7/WT y MCF-7/COX-2, se sembraron 4×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos. Después se obtuvieron y lisaron las pastillas celulares con 250 μ L de buffer de lisis (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.5% Nonidet P-40, pH 7.9) en hielo por 15 min. Los núcleos

se sedimentaron por centrifugación a 13,000 rpm por 1 min y las proteínas nucleares fueron extraídas con 50 μ L de buffer de extracción nuclear (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7.9). La concentración de proteína nuclear se determinó con el kit Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. El western blot se llevó a cabo como se describió anteriormente, en este caso los geles de poliacrilamida al 12 % se cargaron con 50 μ g de proteína nuclear. Después de la transferencia se agregó el anticuerpo primario específico para c-Jun a una dilución de 1:500, seguido por el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:1000. La Histona H3 fue utilizada como control de carga. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-histona H3 (dilución 1:5000) durante 30 min a temperatura ambiente, después de los lavados se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón (dilución 1:5000) por 30 min a temperatura ambiente.

3.4.5. Ensayo de invasión en Matrigel

El efecto de la inhibición de JNK en la invasión de las células de cáncer de mama MCF-7/COX-2 fue determinado *in vitro* a través de ensayos de invasión en Matrigel. Transwells para placas de 6 pozos, con un filtro de policarbonato y poros de 8 μ m (Fisher Scientific, Middleton, VA), se cubrieron con Matrigel (0.7 mg/mL) e incubaron a temperatura ambiente por 40 min. Las células MCF-7/COX-2 se sembraron a una concentración de 4×10^5 células/pozo en 500 μ L de medio DMEM al 5% FBS, luego de 24 h se pre-trataron con SP600125 y PD98059 (0, 5 y 10 μ M) 2 h antes de agregar el Matrigel en los transwells. Posteriormente se realizó el ensayo de invasión en Matrigel como se indicó previamente (sección 2.4.2). Después de las 72 h de incubación, las células que invadieron a través del Matrigel fueron fijadas en laminillas, teñidas, contadas y fotografiadas. Se cuantificaron las células presentes en 9 campos de cada laminilla y por triplicado. La invasividad de las células MCF-7/COX-2 se expresó como el número de células que invadieron la parte inferior del filtro.

3.4.6. Ensayo de viabilidad celular (MTS)

Para determinar el efecto de la inhibición de JNK en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7/COX-2, éstas células se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 1000 células por pozo en presencia y ausencia de Matrigel en 0.1 mL de DMEM/F12 suplementado con 5% FBS. Al día siguiente, las células fueron tratadas con varias concentraciones de SP600125 por 3 días. Después de esta incubación, se determinó la proliferación celular mediante MTS (Madison, WI) previamente descrito (sección 2.4.6.).

Para determinar la sensibilidad de las células MCF-7/COX-2 a tamoxifeno, las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1000 células en 100 μ L de medio DMEM/F12 suplementado con 5% de FBS por pozo y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se reemplazó el medio por DMEM/F12 suplementado con 5% de CSS (por sus siglas en inglés charcoal stripped serum). Después de 24 h, las células se pre-trataron con SP600125 (0, 5 y 10 μ M) y luego de 4 h fueron tratadas con diferentes concentraciones de tamoxifeno (0, 0.1, 1, 5 y 9 μ M) por 5 días. Al final de esta incubación, se determinó la proliferación celular a través del ensayo MTS. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control (células no tratadas).

3.5. RESULTADOS.

3.5.1. La sobreexpresión de COX-2 incrementa los niveles de JNK fosforilado.

Altos niveles de COX-2 han sido asociados con la activación de la familia de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la quinasa Akt (Guan, Buckman et al. 1998; Kim and Kim 2004; Ispanovic and Haas 2006; Looby, Abdel-Latif et al. 2009). En este estudio, nosotros tratamos de determinar si MAPK y/o Akt son utilizados por COX-2 para inducir resistencia a tamoxifeno e invasión en las células de cáncer de mama. Para ello, primeramente determinamos si la sobreexpresión de COX-2 altera los niveles de fosforilación de proteínas de la familia MAPK ó la de Akt. Los niveles de fosforilación de ERK, p38MAPK y Akt fueron muy similares entre las células MCF-7/COX-2 y MCF-7/WT (Figura 14). Sin embargo, observamos un aumento en la fosforilación de JNK en las células MCF-7/COX-2 comparado con las células MCF-7/WT (Figura 15A). Esto corresponde con los altos niveles de c-Jun encontrados en las células MCF-7/COX-2 en comparación con las células MCF-7/WT (Figura 15B). Por otra parte, se sabe que COX-2 activa a PKC (Fiebich, Schleicher et al. 2001; Timoshenko, Xu et al. 2003; Gerlo, Verdood et al. 2004; Chang, Ai et al. 2005). Para determinar si JNK esta río abajo de PKC en la vía mediada por COX-2/PGE2/PKC para inducir resistencia a tamoxifeno e invasión celular, tratamos a las células MCF-7/COX-2 con el inhibidor de PKC Gö6976 (0, 25 y 50 nM) durante 8 h. Posteriormente, se analizaron los niveles de JNK fosforilado mediante western blot. La inhibición de PKC resultó en la disminución de JNK fosforilado en las células MCF-7/COX-2 (Figura 15C), sugiriendo que PKC regula la activación de JNK inducida por COX-2.

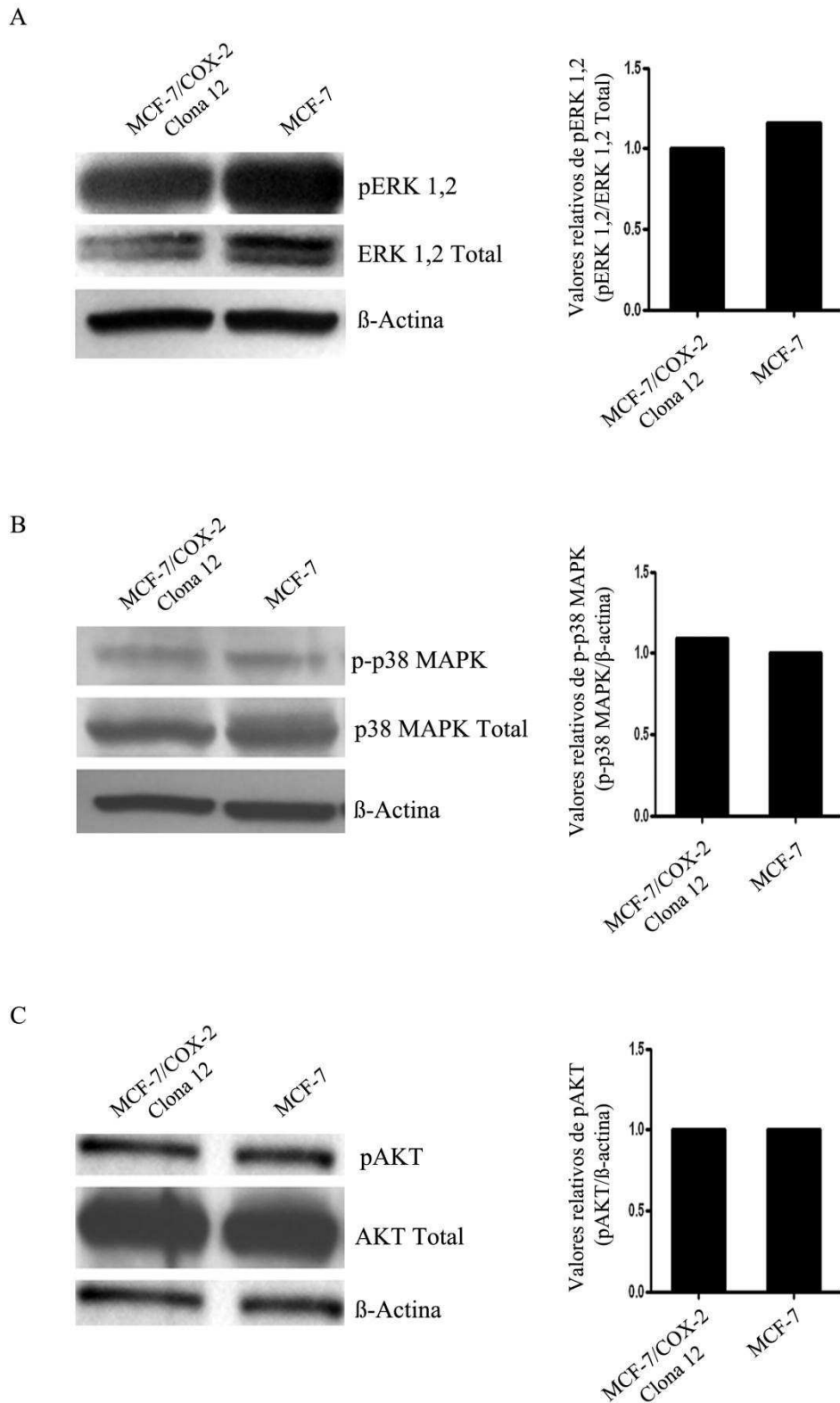


Figura 14. COX-2 no induce cambios sobre la activación de ERK1/2, p38MAPK y Akt en células MCF-7. En las células MCF-7/COX-2 y MCF-7/WT se determinaron los niveles de fosforilación de ERK (A), p38MAPK (B) y Akt (C).

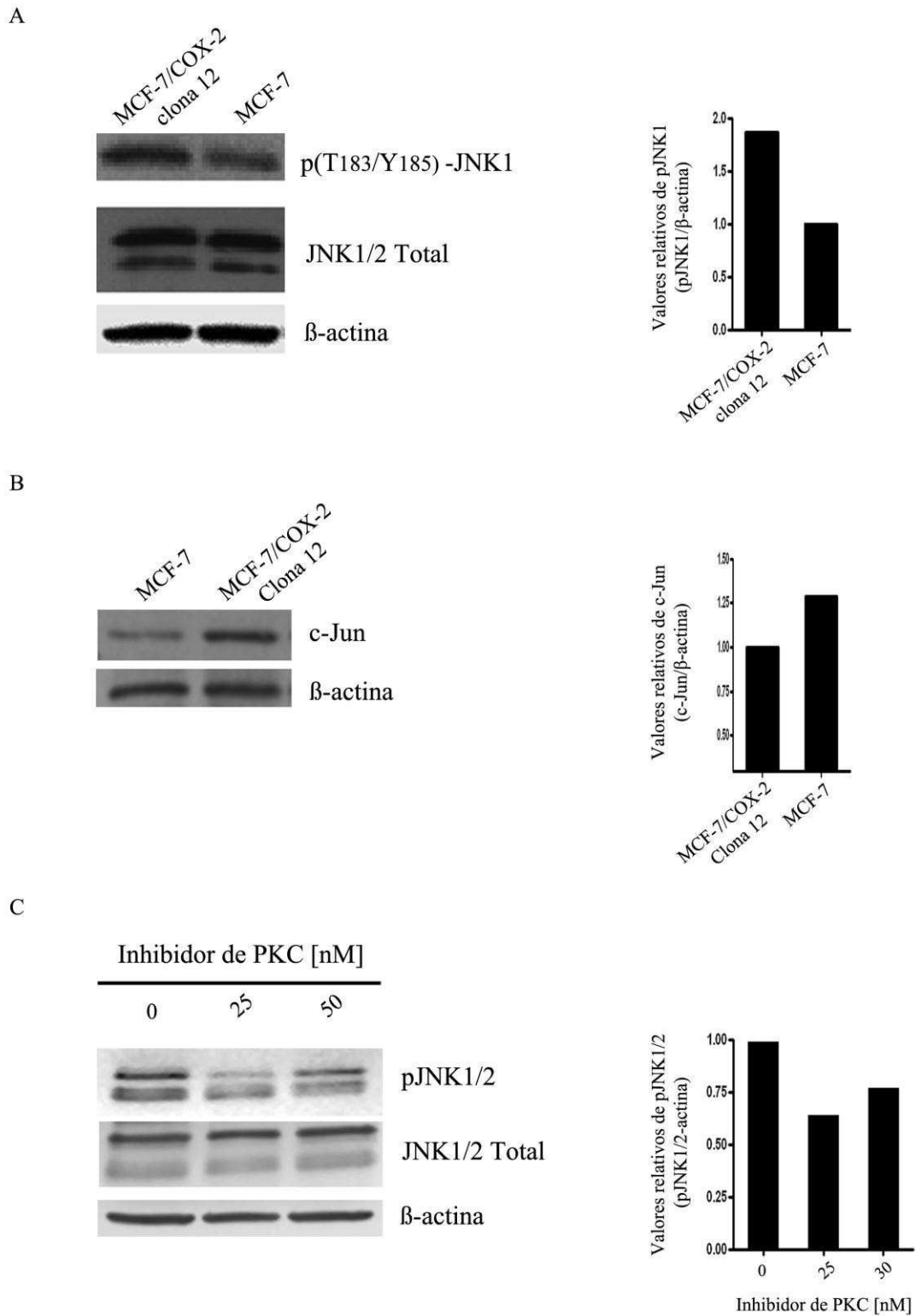


Figura 15. COX-2 incrementa la fosforilación de JNK y los niveles de c-Jun en las células de cáncer de mama MCF-7. Mediante western blot se determinaron los niveles de fosforilación de JNK (A) y los niveles nucleares de c-Jun (B) en las células MCF-7/COX-2 y en las células MCF-7/WT. La inhibición de PKC disminuye la fosforilación de JNK en las células MCF-7/COX-2 (C).

3.5.2. La inhibición de JNK disminuye la invasión de las células MCF-7/COX2

Las MAPKs se encuentran implicadas en el control de procesos angiogénicos (migración, proliferación) a través de ERK y JNK los cuales están específicamente implicados en la producción y activación de MMP-2 (Ispanovic and Haas 2006). Para determinar si JNK es esencial para que COX-2 induzca invasión en las células de cáncer de mama, las células MCF-7/COX-2 fueron tratadas con SP600125 (inhibidor químico contra JNK) y debido a que no pudimos observar cambios sobre la activación de ERK1/2 inducidos por COX-2, decidimos usar como control negativo en los ensayos de invasión en Matrigel, las células tratadas con el inhibidor de PD98059 (inhibidor químico contra ERK). La inhibición de JNK redujo la invasión de las células MCF-7/COX-2 (Figura 16A). A concentraciones de 5 y 10 μM , el inhibidor SP600125 disminuyó la actividad invasiva de las células MCF-7/COX-2 aproximadamente un 75% y 80% respectivamente. Sin embargo y como se esperaba, bajo las mismas condiciones, el inhibidor PD98059 no afectó la actividad invasiva de las células MCF-7/COX-2 (Figura 16B). Estos resultados indican que JNK regula la invasión inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama.

Sin embargo, debido a que JNK ha sido asociado con proliferación celular (Xu, Heidenreich et al. 1996; Du, Lyle et al. 2004), se determinó el efecto de la inhibición de JNK en la proliferación de las células de cáncer de mama en ausencia o en presencia de Matrigel (17) para simular las condiciones usadas en el ensayo de invasión. Las dosis de 5 y 10 μM del inhibidor de JNK, indujeron una inhibición de la proliferación en las células MCF-7/COX-2 del 23.4% y 21.8% respectivamente en presencia de Matrigel. Mientras que en ausencia de Matrigel se observó una inhibición de la proliferación del 20.2% y 16.3% en las dosis de 5 y 10 μM del inhibidor de JNK respectivamente. Estos resultados sugieren, que JNK no influye en la proliferación celular. Por lo tanto, la disminución observada en los ensayos de invasión en Matrigel es debida a la inhibición del proceso de invasión celular regulada por JNK y no por causa de la inhibición de la proliferación celular.

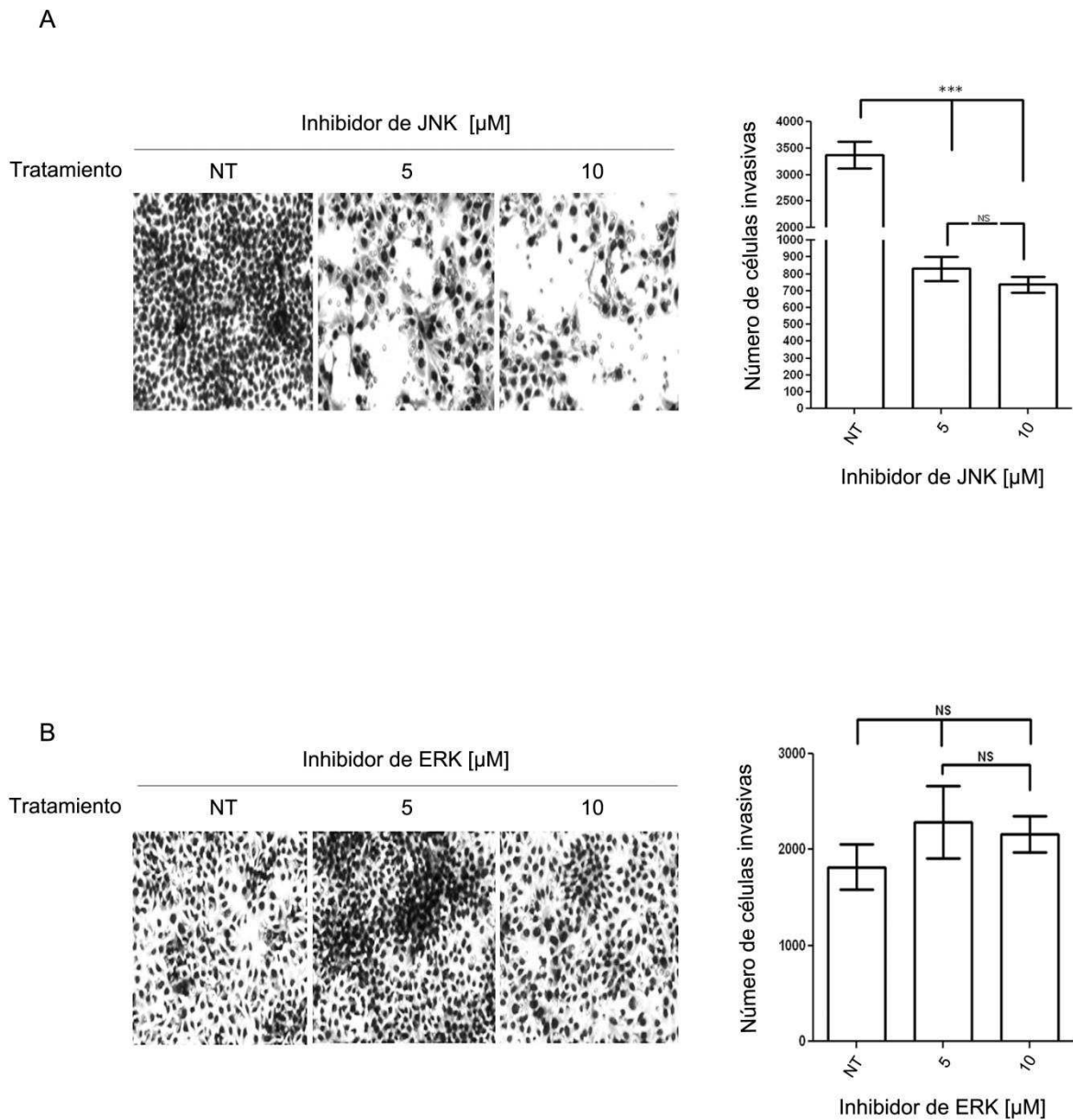


Figura 16. La inhibición específica de JNK, pero no la de ERK 1,2 disminuye la invasión de las células MCF-7/COX-2. Se realizaron ensayos de invasión en Matrigel para evaluar la actividad invasiva de las células MCF-7/COX-2 tratadas con inhibidor de JNK (A) e inhibidor de ERK (B). Las columnas indican el número promedio de las células invasivas \pm desviación estándar. ***, $P < 0.001$, NS no significativo ($P > 0.05$), determinados a través de la prueba t de student para dos muestras.

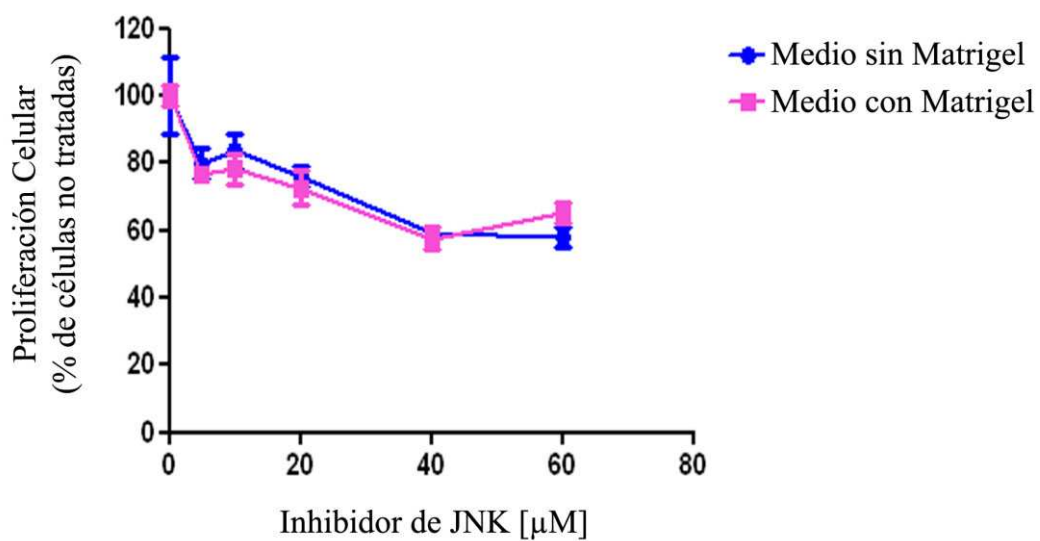


Figura 17. Efecto de la inhibición de JNK en la proliferación de las células de cáncer de mama en ausencia o en presencia de Matrigel. La inhibición de JNK no afectó la proliferación de las células MCF-7/COX-2 cultivadas en medio con y sin Matrigel.

3.5.3. La inhibición de JNK no incrementa la sensibilidad de las células MCF-7/COX-2 a tamoxifeno.

Previamente en nuestro laboratorio se reportó que las células MCF-7/COX-2 son altamente resistentes a tamoxifeno (Tari, Simeone et al. 2005). Por lo que en este estudio determinamos si JNK es además esencial para la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2. A una concentración de 5 μM , tamoxifeno inhibió el crecimiento de las células MCF-7/COX2 solo un 20% (Figura 18). En presencia de 5 y 10 μM de SP600125 y 5 μM de tamoxifeno, la inhibición del crecimiento de las células MCF-7/COX-2 fue del 30% y 40% respectivamente (Figura 18) ($P>0.05$). Estos resultados indican que JNK no regula la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2.

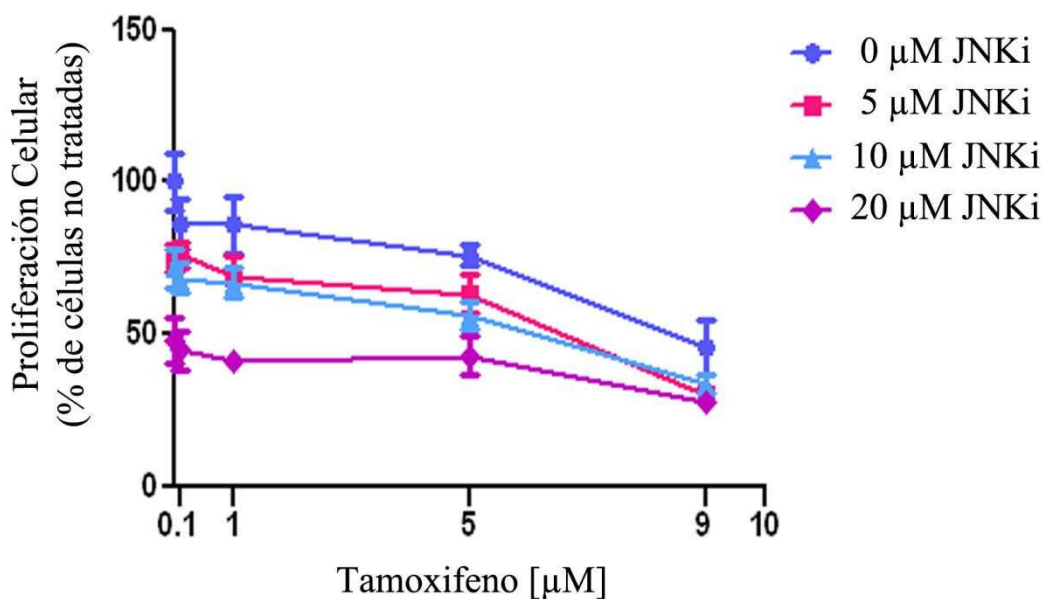


Figura 18. La inhibición de JNK no afecto la resistencia de las células MCF-7/COX-2 a tamoxifeno. Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular MTS para evaluar el efecto de SP600125 en la sensibilidad a tamoxifeno de las células MCF-7/COX-2.

3.5.4. PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por PGE₂

La Prostaglandina E₂ (PGE₂) es una de las prostaglandinas más secretadas en tumores y se cree que es el principal producto tumorigénico derivado de COX-2 (Chen and Smyth 2011). Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que COX-2 disminuye el efecto del tamoxifeno a través de PGE₂ en las células de cáncer de mama (Tari, Simeone et al. 2005). Por otra parte, se ha correlacionado al incremento en los niveles de PDCD4 con un incremento en la sensibilidad de las células MCF-7 a antiestrógenos tales como tamoxifeno (Jansen, Camalier et al. 2004). Para determinar si PDCD4 puede inhibir la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en las células MCF-7, llevamos a cabo ensayos de MTS. Las células MCF-7/Vector y las MCF-7/PDCD4 se sembraron y trataron con 0, 1 y 10 μ M de PGE₂ por 24 h, después se trataron con diferentes concentraciones de tamoxifeno (0, 0.1, 1, 5 y 9 μ M) durante 5 días. Las células MCF-7/PDCD4 son más sensibles al tamoxifeno que las células MCF-7/Vector (Figura 19A). En presencia de 1 y 10 μ M de PGE₂ (Figura 19B y 19C) las células MCF-7/Vector y MCF-7/PDCD4 llegaron a ser más resistentes al tamoxifeno, sugiriendo que la sobreexpresión de PDCD4 no afecta la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2/PGE₂.

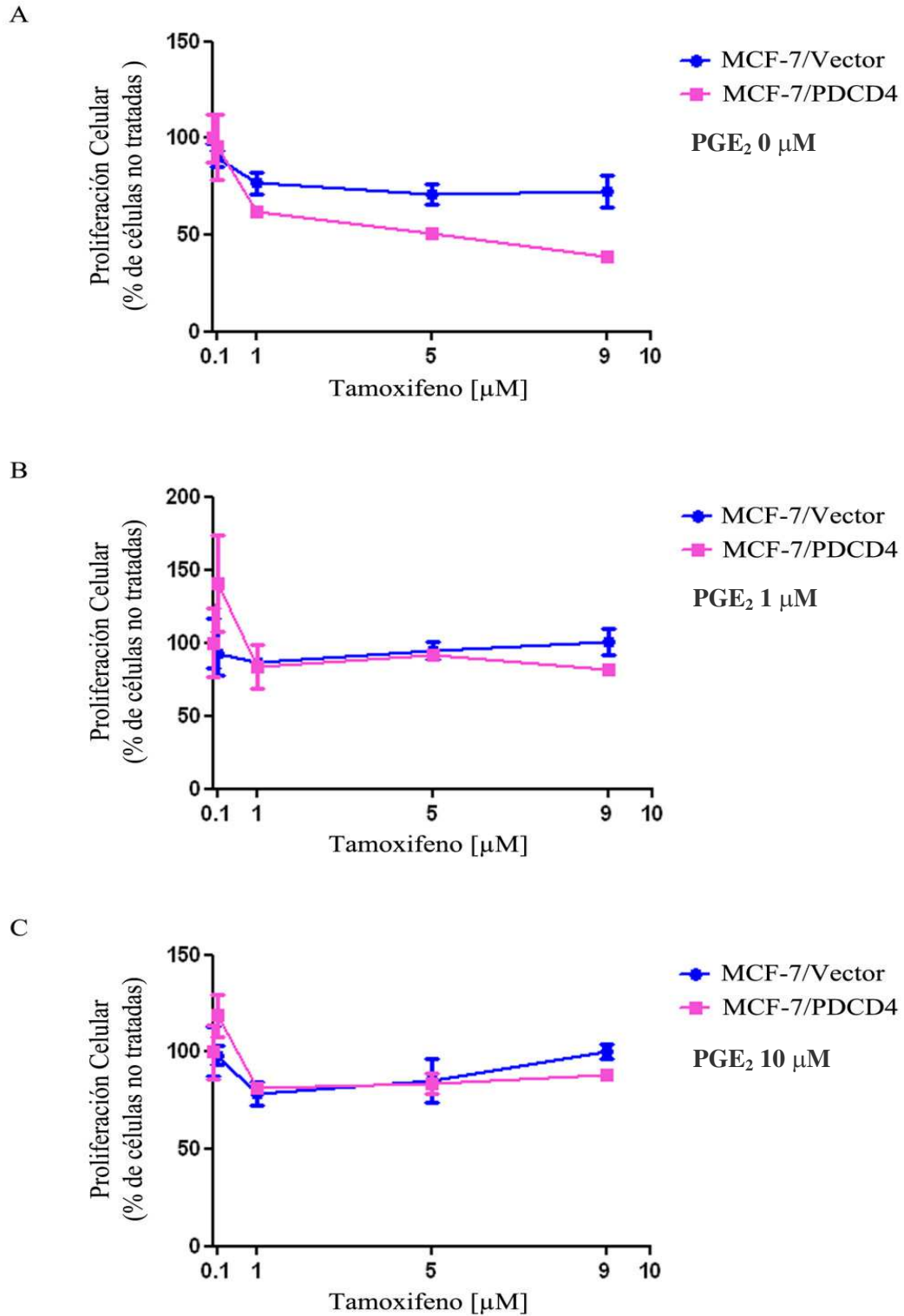


Figura 19. PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2/PGE₂. Las células MCF-7/Vector y MCF-7/PDCD4 se pre-trataron con 0(A), 1(B) y 10 (C) μM de PGE₂ por 24 h. Posteriormente, se trataron con 0,0.1, 1,5 y 9 μM de tamoxifeno durante 5 días. Finalmente, se realizaron los ensayos de viabilidad celular MTS.

3.6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres y la metástasis su principal causa de mortalidad. La naturaleza agresiva de las células cancerosas es determinada por vías de señalización complejas que regulan funciones clave, incluyendo proliferación celular, sobrevivencia, resistencia a drogas, migración e invasión. La expresión de COX-2 en pacientes con cáncer de mama es un marcador de una baja sobrevivencia global y libre de enfermedad (Ristimaki, Sivula et al. 2002; Denkert, Winzer et al. 2004; O'Connor, Avent et al. 2004) y ha sido considerado como un marcador de alto potencial metastásico. COX-2 se sobreexpresa en aproximadamente el 40% de los tumores de mama (Soslow, Dannenberg et al. 2000; Ristimaki, Sivula et al. 2002; Denkert, Winzer et al. 2004; Singh, Berry et al. 2005). La relevancia de la expresión de COX-2 en cáncer también se desprende de los estudios clínicos que indican que la presencia de COX-2 se correlaciona, en ciertos tumores con un fenotipo más agresivo (incluyendo una desregulación del crecimiento y proliferación celular, un incremento en la habilidad para escapar de la apoptosis, neovascularización sostenida, incremento de invasión, metástasis y la habilidad para evadir el sistema inmune) y, sobre todo, con un bajo pronóstico clínico (Rizzo 2011).

Estudios recientes han relacionado la expresión de COX-2 con la activación de la vía de las MAPK y Akt (Guan, Buckman et al. 1998; Kim and Kim 2004; Ispanovic and Haas 2006; Wu, Luo et al. 2006; Park, Kim et al. 2007; Looby, Abdel-Latif et al. 2009). La familia de las MAPK incluye tres subfamilias: ERK, p38 y JNK. Recientemente, se ha demostrado que la activación de ERK, p38 y JNK promueve migración celular en cáncer de mama (You, Mi et al. 2009). En este estudio, nosotros observamos que COX-2 incrementó la activación de JNK; esta activación se confirmó con los niveles nucleares de c-Jun encontrados en las células MCF-7/COX-2. Por otro lado, se sabe que COX-2 activa las vías de PKA y PKC (Fiebich, Schleicher et al. 2001; Timoshenko, Xu et al. 2003; Gerlo, Verdood et al. 2004). Previamente en nuestro laboratorio se reportó que la activación de PKC, mas no la de PKA, estaba involucrada en la invasión inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama MCF-7 (Simeone, Nieves-Alicea et al. 2007). Aquí, nosotros encontramos que la activación de JNK en las células

MCF-7/COX-2 es regulada por PKC, sugiriendo que en la vía que hemos propuesto (COX-2/PGE₂/PKC), JNK se encuentra río abajo de PKC. Este resultado es consistente con reportes previos como el de Lopez-Bergami *et al*, que mostraron que PKC contribuye al incremento de la activación de JNK en las células SW1 (células de melanoma de ratón) y HEK 293T (células embrionarias humanas de riñón 293), además revelaron que la inhibición de PKC redujo la fosforilación de JNK, disminuyendo la respuesta pro-apoptótica después de radiación ultravioleta (Lopez-Bergami and Ronai 2008). En el 2002 Chen *et al*, demostraron que la activación de JNK es mediada a través de la vía de PKC, lo cual se asocia con la inducción de apoptosis por TPA (Chen, Wu et al. 2002). En estos reportes los autores correlacionan la activación de JNK a través de PKC con la actividad apoptótica de JNK. En nuestro trabajo, correlacionamos la activación de JNK a través de PKC con la actividad invasiva de JNK.

Las MAPK están implicadas en el control de procesos angiogénicos, específicamente a través de la activación de ERK1,2 y JNK, los cuales están involucrados en la producción y activación de MMP-2 (Ispanovic and Haas 2006). En el 2009, You *et al*, describió una vía para el mantenimiento de la migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, en la cual metabolitos del ácido araquidónico (AA) son capaces de activar PKC que sirve como un activador río arriba de ERK 1,2, que a su vez activa la vía de señalización de β -catenina, ciclina D1 y survivina lo cual contribuye a la proliferación celular y migración (You, Mi et al. 2009). En contraste con este estudio, nuestros resultados indican que ERK1,2 no juega un papel en la invasión inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama MCF-7 y que es solo a través de la activación de JNK que COX-2 regula la invasión en éstas células. Por lo tanto, sugerimos que JNK es el factor río abajo que es utilizado por la vía COX-2/PGE₂/PKC para inducir invasión en las células de cáncer de mama.

El tamoxifeno es el fármaco más ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de mama (Dorssers, van der Flier et al. 2001). Desafortunadamente, cerca de la mitad de los pacientes con cáncer de mama positivo para ER α no responden al tamoxifeno y muchos de los pacientes que responden adquieren resistencia al tamoxifeno, permitiendo así la progresión de la enfermedad. Son

muchos los mecanismos que podrían contribuir al desarrollo de este fenotipo de resistencia, estos incluyen: pérdida del ER en el tumor, farmacología del tamoxifeno, alteraciones en la estructura y función del ER o la activación de vías tales como JNK y COX-2. Anteriormente, se ha encontrado un incremento sustancial en la actividad de JNK en tumores de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno. En 1999, Johnston *et al*, encontraron que la regulación positiva tanto de la unión de AP-1 al DNA y de la actividad de JNK ocurre en tumores de mama positivos para ER, que han adquirido resistencia a tamoxifeno (Johnston, Lu et al. 1999). En el 2000, Schiff *et al*, demostraron que el incremento en la actividad de JNK y fosforilación de c-Jun están involucrados con el fenotipo de resistencia a tamoxifeno (Schiff, Reddy et al. 2000). Sin embargo, en el presente trabajo, observamos que JNK no regula la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2, sugiriendo que COX-2 regula la activación de JNK para inducir invasión pero no para incrementar la resistencia a tamoxifeno. Por lo tanto, la resistencia a tamoxifeno a través de la sobreexpresión de COX-2 pudiera ser causado a través de la activación de las vías de Akt (Kirkegaard, Witton et al. 2005) o ERK1,2 (Li, Wang et al. 2012), las cuales se han sido asociadas también a la resistencia a tamoxifeno en células de cáncer mama.

Se sabe que la sobreexpresión de COX-2, incrementa la producción de PGs, tales como PGE₂ (Chen and Smyth 2011). Anteriormente, nuestro grupo demostró que COX-2 inhibe el efecto del tamoxifeno en las células de cáncer de mama (Tari, Simeone et al. 2005). Además se observó que el efecto de COX-2 sobre la resistencia a tamoxifeno estaba mediado por PGE₂. Por otra parte, se ha reportado que altos niveles de PDCD4 están correlacionados y específicamente contribuyen con la actividad anti-tumoral del tamoxifeno en las células MCF-7 (Jansen, Camalier et al. 2004). Consistente con este reporte, nosotros encontramos que la sobreexpresión de PDCD4 incrementa la sensibilidad al tamoxifeno en las células de cáncer de mama MCF-7. Sin embargo, en presencia de PGE₂, la sobreexpresión de PDCD4 no mantiene o incrementa la sensibilidad al tamoxifeno en las células MCF-7.

En conclusión, en este estudio, encontramos que COX-2 incrementa la actividad de JNK para regular la invasión, pero no la resistencia a tamoxifeno en las células de cáncer de mama MCF-7. Además aunque PDCD4 inhibe la invasión inducida por COX-2, PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama, positivas para ER α MCF-7 (Figura 20).

CONCLUSIÓN GENERAL.

Se encontró que leptina incrementa la resistencia a tamoxifeno en las células MCF-7, y que la sobreexpresión de PDCD4 incrementa la transcripción de TIMP-2, permitiendo la inhibición de la invasión inducida por leptina, al bloquear la activación de ERK 1,2 y STAT3. También se reportó que la sobreexpresión de PDCD4 inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por leptina en las células MCF-7. Además en este trabajo, se encontró que PKC induce la activación de JNK 1/2 con la subsecuente activación de c-Jun para regular la invasión de las células MCF-7. También se observó, que aunque PDCD4 inhibe la invasión inducida por COX-2, PDCD4 no inhibe la resistencia a tamoxifeno inducida por COX-2 en las células de cáncer de mama, positivas para ER α MCF-7 (como se muestra en el siguiente modelo esquemático).

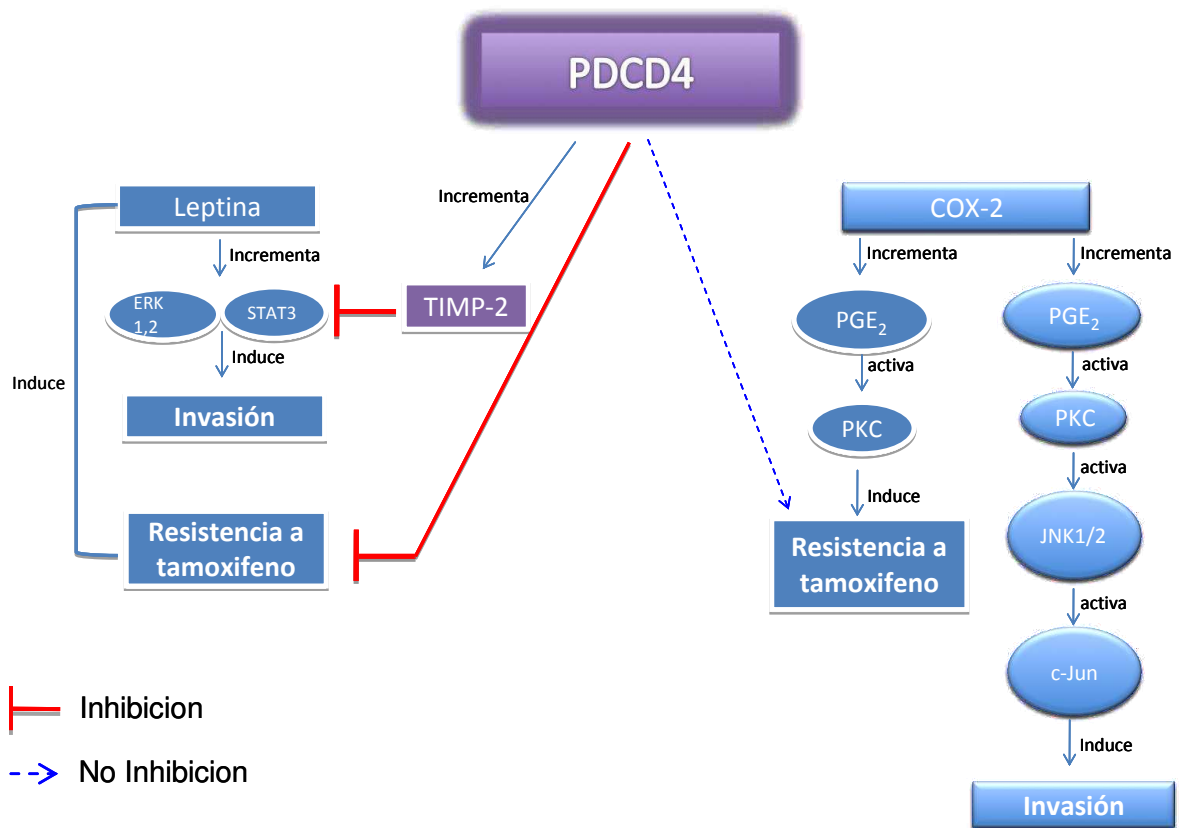


Figura 20. Modelo esquemático del efecto de PDCD4 sobre la invasión y resistencia a tamoxifeno inducidas por leptina y COX-2 en las células de cáncer de mama MCF-7.

APÉNDICE

Soluciones utilizadas para el ensayo de invasión.

Matrigel 0.7mg/mL

Medio sin suero (DMEM/F12)	3 mL
Matrigel	200 μ L

Leptina 1mg/mL

Leptina	1mg
H ₂ Odd	1mL

Soluciones usadas para RT-PCR

Preparación de la muestra

Buffer de muestra 6X	3.3 μ L
Muestra	20 μ L

Preparación del marcador de peso molecular de DNA

Buffer de muestra 6X	1 μ L
Marcador de peso molecular de DNA	2 μ L

Buffer de corrida ó TBE 5X (solución stock)

Tris-Base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5M pH~8.0	20 mL

Buffer de corrida ó TBE 1X

Buffer de corrida TBE 5X	100 mL
H ₂ Odd	400 mL

Gel de agarosa al 2%

Agarosa	0.8 g
---------	-------

TBE 1X	40 mL
Bromuro de etidio*	2 μ L

* 5 μ l de bromuro de etidio por cada 100 mL de agarosa

Soluciones para la preparación de las muestras para Western blot.

PBS 10X (solución stock)

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con H₂O

PBS 1X con inhibidores de fosfatasas

PBS 10X	5 mL
H ₂ O	45 mL
NaF 1M	50 μ L
Na ₃ VO ₄ 1M	50 μ L

Buffer de lisis

NaCl	2.19 g
Tris 25 mM	0.76 g
Triton X-100	1%
H ₂ O	200 mL

Ajustar el pH a 7.6 y aforar a 250 mL con H₂O

Buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas

Buffer de lisis	1 mL
NaF 1M	4 μ L
Na ₃ VO ₄ 1M	4 μ L
Inhibidor de proteasas*	10 μ L

* Agregar 10 μ l de inhibidor de proteasas/mL

Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Acrilamida/bisacrilamida 30%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	1g

Aforar a 100 mL con H₂Odd

Buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8

Tris-HCl	60.5 g
H ₂ Odd	800 mL

Ajustar el pH a 6.8 y Aforar a 1 L con H₂Odd

Buffer Tris-Base 1.5 M pH 8.8

Tris-Base	182 g
H ₂ Odd	800 mL

Ajustar el pH a 8.8 y Aforar a 1 L con H₂Odd

PSA 10%

PSA	1 g
H ₂ Odd	10 mL

SDS 10%

SDS	10 g
-----	------

Aforar a 100 mL con H₂Odd

Solución para gel concentrador de poliacrilamida

H ₂ Odd	1.4 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.33 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	0.25 mL
SDS 10%	0.02 mL
PSA 10%	0.02 mL
TEMED	0.002 mL

Solución para gel separador al 10% de poliacrilamida.

H ₂ O	4 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.3 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
PSA 10%	0.1 mL
TEMED	0.004 mL

Soluciones para el corrimiento electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida.**Buffer de corrimiento (Tris-Glicina) 10X**

Tris-Base	30 g
Glicina	144 g
H ₂ O	1 L

Buffer de corrimiento (Tris-Glicina) 1X

Buffer de Corrida 10X	50 mL
H ₂ O	450 mL
SDS 10%	5 mL

Buffer de muestra 1X

SDS 30%	1.2 mL
β-mercaptoetanol	0.9 mL
Glicerol	1.8 mL
Azul de Bromofenol 2.5%	0.18 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.1 mL
H ₂ O	0.82 mL

Soluciones para la inmunoelectrotransferencia**Buffer de Transferencia (Tris-glicina) 10X**

Tris-Base	30 g
Glicina	144 g
H ₂ O	1 L

Buffer de transferencia (Tris-glicina) 1X

Buffer de transferencia 10X	100 mL
Metanol	200 mL
H ₂ Odd	700 mL

Buffer TBS 10X (solución stock)

Tris-HCl	31.5 g
NaCl	80 g

Ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1 L con H₂Odd

Buffer TBS-Tween 20 1X (TBS-T)

Buffer TBS 10X	100 mL
Tween-20	1 mL
H ₂ Odd	900 mL

Leche descremada al 5%

Leche descremada	5 g
Buffer TBS-T 1X	100 mL

Rojo de Ponceau-S (solución stock)

Rojo de Ponceau-S	2 g
Ácido tricloroacético	30 g
Ácido sulfosalicílico	30 g

Aforar a 100 mL con H₂Odd

Rojo de Ponceau-S (solución de trabajo)

Rojo de Ponceau-S stock	10 mL
H ₂ Odd	90 mL

Soluciones utilizadas para el ensayo de MTS.**MTS (Solución stock)**

MTS	42 mg
-----	-------

D-PBS 1X sin calcio y magnesio 21 mL
Ajustar el pH a 6.5, cubrirlo con papel aluminio, filtrarlo y conservarlo a -20 °C

PMS (Solución stock)

PMS 0.92 mg
D-PBS 1X sin calcio y magnesio 1 mL
Cubrirlo con papel aluminio, filtrarlo y conservarlo a -20 °C

MTS/PMS (Solución de trabajo)

MTS 2 mL
PMS 100 µL

Soluciones utilizadas para la extracción nuclear de proteínas

Buffer de lisis

HEPES 10 mM
KCl 10 mM
Nonidet P-40 0.5%

Ajustar el pH a 7.9

Buffer de extracción nuclear

HEPES 20 mM
NaCl 400 mM

Ajustar el pH a 7.9

LITERATURA CITADA

- Ahn, S. M., S. J. Jeong, et al. (2004). "Retroviral delivery of TIMP-2 inhibits H-ras-induced migration and invasion in MCF10A human breast epithelial cells." Cancer Lett **207**(1): 49-57.
- Badawi, A. F. and M. Z. Badr (2003). "Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E-2 and 15-deoxy-Delta(12.14)-prostaglandin J(2) in human breast cancer and metastasis." International Journal of Cancer **103**(1): 84-90.
- Bernardo, M. M. and R. Fridman (2003). "TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP." Biochem J **374**(Pt 3): 739-745.
- Bitomsky, N., M. Bohm, et al. (2004). "Transformation suppressor protein Pcd4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun." Oncogene **23**(45): 7484-7493.
- Bjorbaek, C., K. El-Haschimi, et al. (1999). "The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance." J Biol Chem **274**(42): 30059-30065.
- Bjorbaek, C., S. Uotani, et al. (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." J Biol Chem **272**(51): 32686-32695.
- Caldefie-Chezet, F., M. Damez, et al. (2005). "Leptin: a proliferative factor for breast cancer? Study on human ductal carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **334**(3): 737-741.
- Calle, E. E., C. Rodriguez, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." N Engl J Med **348**(17): 1625-1638.
- Catalano, S., S. Marsico, et al. (2003). "Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line." J Biol Chem **278**(31): 28668-28676.
- Catalano, S., L. Mauro, et al. (2004). "Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells." J Biol Chem **279**(19): 19908-19915.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-572.
- Chandrasekharan, N. V. and D. L. Simmons (2004). "The cyclooxygenases." Genome Biology **5**(9).
- Chang, J. H., Y. H. Cho, et al. (2009). "Crystal structure of the eIF4A-PDCD4 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3148-3153.
- Chang, S. H., Y. Ai, et al. (2005). "The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia." Cancer Res **65**(11): 4496-4499.
- Chen, C., Y. C. Chang, et al. (2006). "Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1." Breast Cancer Res Treat **98**(2): 121-132.

- Chen, E. P. and E. M. Smyth (2011). "COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer." Prostaglandins Other Lipid Mediat **96**(1-4): 14-20.
- Chen, Y., Q. Wu, et al. (2002). "Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells." World J Gastroenterol **8**(6): 1014-1018.
- Cirillo, D., A. M. Rachiglio, et al. (2008). "Leptin signaling in breast cancer: an overview." J Cell Biochem **105**(4): 956-964.
- Cleary, M. P., S. C. Juneja, et al. (2004). "Leptin receptor-deficient MMTV-TGF- α /Lepr(db)Lepr(db) female mice do not develop oncogene-induced mammary tumors." Exp Biol Med (Maywood) **229**(2): 182-193.
- Cmarik, J. L., H. Min, et al. (1999). "Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14037-14042.
- Connolly, E. M., J. H. Harmey, et al. (2002). "Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer." Br J Cancer **87**(2): 231-237.
- Costa, C., R. Soares, et al. (2002). "Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer." J Clin Pathol **55**(6): 429-434.
- Denkert, C., K. J. Winzer, et al. (2004). "Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer." Clin Breast Cancer **4**(6): 428-433.
- Denkert, C., K. J. Winzer, et al. (2003). "Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma." Cancer **97**(12): 2978-2987.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-6251.
- Dorssers, L. C. J., S. van der Flier, et al. (2001). "Tamoxifen resistance in breast cancer - Elucidating mechanisms." Drugs **61**(12): 1721-1733.
- Duffy, M. J., T. M. Maguire, et al. (2000). "Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis." Breast Cancer Res **2**(4): 252-257.
- Eberhart, C. E., R. J. Coffey, et al. (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Gastroenterology **107**(4): 1183-1188.
- Fiebich, B. L., S. Schleicher, et al. (2001). "Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C." J Neurochem **79**(5): 950-958.
- Filipovic, A., G. Giamas, et al. (2011). "The potential role of cyclooxygenase-2 (COX-2) during early breast cancer therapy." Ann Oncol **22**(8): 1700-1702.
- Garofalo, C., M. Koda, et al. (2006). "Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli." Clin Cancer Res **12**(5): 1447-1453.
- Garofalo, C., D. Sisci, et al. (2004). "Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182,780 in MCF-7 breast cancer cells." Clin Cancer Res **10**(19): 6466-6475.
- Garofalo, C. and E. Surmacz (2006). "Leptin and cancer." J Cell Physiol **207**(1): 12-22.

- Gerlo, S., P. Verdood, et al. (2004). "Mechanism of prostaglandin (PG)E₂-induced prolactin expression in human T cells: cooperation of two PGE₂ receptor subtypes, E-prostanoid (EP) 3 and EP4, via calcium- and cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated signaling pathways." J Immunol **173**(10): 5952-5962.
- Giuffrida, D., L. Lupo, et al. (1992). "Relation between steroid receptor status and body weight in breast cancer patients." Eur J Cancer **28**(1): 112-115.
- Gonzalez, R. R., S. Cherfils, et al. (2006). "Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2)." J Biol Chem **281**(36): 26320-26328.
- Guan, Z., S. Y. Buckman, et al. (1998). "Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells." J Biol Chem **273**(44): 28670-28676.
- Heasley, L. E. and S. Y. Han (2006). "JNK regulation of oncogenesis." Mol Cells **21**(2): 167-173.
- Howe, L. R. (2007). "Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer." Breast Cancer Res **9**(4): 210.
- Hu, X., S. C. Juneja, et al. (2002). "Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development." J Natl Cancer Inst **94**(22): 1704-1711.
- Huang, W. Y., B. Newman, et al. (2000). "Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status." Am J Epidemiol **151**(7): 703-714.
- Ishikawa, M., J. Kitayama, et al. (2004). "Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer." Clin Cancer Res **10**(13): 4325-4331.
- Ispanovic, E. and T. L. Haas (2006). "JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **291**(4): C579-588.
- Jansen, A. P., C. E. Camalier, et al. (2005). "Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis." Cancer Res **65**(14): 6034-6041.
- Jansen, A. P., C. E. Camalier, et al. (2004). "Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity." Mol Cancer Ther **3**(2): 103-110.
- Jiang, H., J. Yu, et al. (2008). "Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells." Biochem Biophys Res Commun **368**(1): 1-5.
- Johnston, S. R., B. Lu, et al. (1999). "Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH₂-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance." Clin Cancer Res **5**(2): 251-256.
- Kim, H. J. and T. Y. Kim (2004). "IGF-II-mediated COX-2 gene expression in human keratinocytes through extracellular signal-regulated kinase pathway." Journal of Investigative Dermatology **123**(3): 547-555.
- Kim, J. H., V. Bossuyt, et al. (2005). "Cyclooxygenase-2 expression in postmastectomy chest wall relapse." Clin Cancer Res **11**(14): 5199-5205.

- Kirkegaard, T., C. J. Witton, et al. (2005). "AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen." J Pathol **207**(2): 139-146.
- Kirschenbaum, A., X. Liu, et al. (2001). "The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer." Urology **58**(2 Suppl 1): 127-131.
- Lang, K. and J. Ratke (2009). "Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration." Cell Commun Signal **7**: 27.
- Lankat-Buttgereit, B. and R. Goke (2003). "Programmed cell death protein 4 (pdc4): a novel target for antineoplastic therapy?" Biol Cell **95**(8): 515-519.
- Laud, K., I. Gourdou, et al. (1999). "Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation." FEBS Lett **463**(1-2): 194-198.
- Li, Z., N. Wang, et al. (2012). "Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells." Oncol Rep **27**(6): 1879-1886.
- Looby, E., M. M. Abdel-Latif, et al. (2009). "Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells." BMC Cancer **9**: 190.
- Lopez-Bergami, P. and Z. Ronai (2008). "Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7." Int J Biochem Cell Biol **40**(5): 1055-1064.
- Marttunen, M. B., S. Andersson, et al. (2000). "Antiestrogenic tamoxifen and toremifene increase serum leptin levels in postmenopausal breast cancer patients." Maturitas **35**(2): 175-179.
- McMurtry, V., A. M. Simeone, et al. (2008). "Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells." Clin Exp Metastasis.
- McMurtry, V., A. M. Simeone, et al. (2009). "Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells." Clin Exp Metastasis **26**(3): 197-204.
- McSherry, E. A., S. Donatello, et al. (2007). "Molecular basis of invasion in breast cancer." Cell Mol Life Sci **64**(24): 3201-3218.
- Menter, D. G., R. L. Schilsky, et al. (2010). "Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward." Clin Cancer Res **16**(5): 1384-1390.
- Miyoshi, Y., T. Funahashi, et al. (2006). "High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels." Int J Cancer **118**(6): 1414-1419.
- Neville, M. C., T. B. McFadden, et al. (2002). "Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(1): 49-66.
- Nieves-Alicea, R., N. H. Colburn, et al. (2008). "Programmed Cell Death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 expression." Breast Cancer Res Treat.
- Nieves-Alicea, R., N. H. Colburn, et al. (2009). "Programmed cell death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression." Breast Cancer Res Treat **114**(2): 203-209.
- O'Connor, J. K., J. Avent, et al. (2004). "Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(4): 1034-1040.
- OMS (2011) "Obesidad y sobrepeso." Centro de prensa **311**.

- Onuma, M., J. D. Bub, et al. (2003). "Prostate cancer cell-adipocyte interaction - Leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase." Journal of Biological Chemistry **278**(43): 42660-42667.
- Park, S. A., E. H. Kim, et al. (2007). "KG-135 inhibits COX-2 expression by blocking the activation of JNK and AP-1 in phorbol ester-stimulated human breast epithelial cells." Signal Transduction Pathways, Pt C **1095**: 545-553.
- Prosperi, J. R., S. R. Mallery, et al. (2004). "Invasive and angiogenic phenotype of MCF-7 human breast tumor cells expressing human cyclooxygenase-2." Prostaglandins Other Lipid Mediat **73**(3-4): 249-264.
- Protani, M., M. Coory, et al. (2010). "Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis." Breast Cancer Res Treat **123**(3): 627-635.
- Ranger, G. S., V. Thomas, et al. (2004). "Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer." Anticancer Res **24**(4): 2349-2351.
- Ray, A., K. J. Nkhata, et al. (2007). "Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status." Int J Oncol **30**(6): 1499-1509.
- Ree, A. H., V. A. Florenes, et al. (1997). "High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases." Clinical Cancer Research **3**(9): 1623-1628.
- Revillion, F., M. Charlier, et al. (2006). "Messenger RNA expression of leptin and leptin receptors and their prognostic value in 322 human primary breast cancers." Clin Cancer Res **12**(7 Pt 1): 2088-2094.
- Ristimaki, A., A. Sivula, et al. (2002). "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer." Cancer Res **62**(3): 632-635.
- Rizzo, M. T. (2011). "Cyclooxygenase-2 in oncogenesis." Clin Chim Acta **412**(9-10): 671-687.
- Rozic, J. G., C. Chakraborty, et al. (2001). "Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis." Int J Cancer **93**(4): 497-506.
- Sacco, M. G., E. M. Cato, et al. (2001). "Systemic gene therapy with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice." Gene Ther **8**(1): 67-70.
- SALUD, S. D. (2010). SE REFUERZAN ACCIONES PARA LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA. MÉXICO.
- Saxena, N. K., D. Sharma, et al. (2007). "Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells." Cancer Res **67**(6): 2497-2507.
- Schiff, R., P. Reddy, et al. (2000). "Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo." J Natl Cancer Inst **92**(23): 1926-1934.
- Sharma, D., N. K. Saxena, et al. (2006). "Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways." Endocr Relat Cancer **13**(2): 629-640.

- Shibahara, K., M. Asano, et al. (1995). "Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death." Gene **166**(2): 297-301.
- Simeone, A. M., S. Colella, et al. (2006). "N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and nitric oxide pro-drugs exhibit apoptotic and anti-invasive effects against bone metastatic breast cancer cells." Carcinogenesis **27**(3): 568-577.
- Simeone, A. M., Y. J. Li, et al. (2004). "Cyclooxygenase-2 is essential for HER2/neu to suppress N-(4-hydroxyphenyl)retinamide apoptotic effects in breast cancer cells." Cancer Res **64**(4): 1224-1228.
- Simeone, A. M., R. Nieves-Alicea, et al. (2007). "Cyclooxygenase-2 uses the protein kinase C/interleukin-8/urokinase-type plasminogen activator pathway to increase the invasiveness of breast cancer cells." International Journal of Oncology **30**(4): 785-792.
- Singh, B., J. A. Berry, et al. (2005). "COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells." Int J Oncol **26**(5): 1393-1399.
- Society, A. C. (2011). "Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012." Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- Soslow, R. A., A. J. Dannenberg, et al. (2000). "COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors." Cancer **89**(12): 2637-2645.
- Surmacz, E. (2007). "Obesity hormone leptin: a new target in breast cancer?" Breast Cancer Res **9**(1): 301.
- Taketo, M. M. (1998). "Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I)." J Natl Cancer Inst **90**(20): 1529-1536.
- Tari, A. M., A. M. Simeone, et al. (2005). "Cyclooxygenase-2 protein reduces tamoxifen and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibitory effects in breast cancer cells." Lab Invest **85**(11): 1357-1367.
- Terry, M. B., M. D. Gammon, et al. (2004). "Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk." Jama-Journal of the American Medical Association **291**(20): 2433-2440.
- Timoshenko, A. V., G. Xu, et al. (2003). "Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells." Exp Cell Res **289**(2): 265-274.
- Verreault, R., J. Brisson, et al. (1989). "Body weight and prognostic indicators in breast cancer. Modifying effect of estrogen receptors." Am J Epidemiol **129**(2): 260-268.
- Vesga, O. E. P. (2004). "Ciclooxigenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia." MedUNAB **7**: 181-184.
- Wen, Y. H., X. Shi, et al. (2007). "Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast." Oncol Rep **18**(6): 1387-1393.
- Williams, C. S., M. Tsujii, et al. (2000). "Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth." J Clin Invest **105**(11): 1589-1594.
- Wu, G., J. Luo, et al. (2006). "Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells." Cardiovasc Res **69**(2): 512-519.
- Yang, H. S., A. P. Jansen, et al. (2003). "The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation." Molecular and Cellular Biology **23**(1): 26-37.
- Yang, H. S., A. P. Jansen, et al. (2001). "A novel transformation suppressor, Pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappa B or ODC transactivation." Oncogene **20**(6): 669-676.

- Yang, H. S., A. P. Jansen, et al. (2001). "A novel transformation suppressor, Pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappaB or ODC transactivation." Oncogene **20**(6): 669-676.
- Yang, H. S., C. P. Matthews, et al. (2006). "Tumorigenesis suppressor Pcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion." Mol Cell Biol **26**(4): 1297-1306.
- Yang, H. S., C. P. Matthews, et al. (2006). "Tumorigenesis suppressor Pcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion." Molecular and Cellular Biology **26**(4): 1297-1306.
- Yin, N., D. Wang, et al. (2004). "Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin." Cancer Res **64**(16): 5870-5875.
- Yoneda, T., A. Sasaki, et al. (1997). "Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2." J Clin Invest **99**(10): 2509-2517.
- You, J. C., D. Mi, et al. (2009). "A Positive Feedback between Activated Extracellularly Regulated Kinase and Cyclooxygenase/Lipoxygenase Maintains Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells." Endocrinology **150**(4): 1607-1617.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhang, Z. and R. N. DuBois (2001). "Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor." Oncogene **20**(33): 4450-4456.
- Zhu, S., H. Wu, et al. (2008). "MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis." Cell Res **18**(3): 350-359.