

UCH - FC
Biotecnología
R 299
C. J



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**PAPEL DEL TENOR OXIDATIVO SOBRE EL EJE CXCR4/SDF-1
EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS HUMANAS.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular por

Guillermo Antonio Rodríguez Piccoli

Director de Seminario de Título: Dr. Jorge Martínez Winkler

Junio, 2010

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Guillermo Rodríguez Piccoli

**“PAPEL DEL TENOR OXIDATIVO SOBRE EL EJE CXCR4/SDF-1
EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS MAMARIAS HUMANAS.”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Jorge Martínez Winkler

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Nuñez G.

Presidente Comisión

Dr. Julio Alcayaga U.

Evaluador



Santiago de Chile, Julio 2010



Guillermo Rodríguez Piccoli nació en la ciudad de Santiago el 7 de Junio de 1985, egreso de enseñanza media del Colegio Adventista Las Condes y luego Findlay High School, USA, donde partió su amor por los computadores, los deportes, la nieve y las ciencias. En el año 2006 ingresa a la carrera de Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile, participando de múltiples actividades deportivas, el coro de la Facultad de Ciencias, ayudantías, programas Work and Travel, entre otros.





DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis a todos quienes han sido mi soporte durante todos estos años de universidad y a lo largo de mi vida. A quienes me han ayudado siempre a mirar hacia un mejor futuro sin importar las dificultades que presente el camino.

De manera especial quiero dedicar este seminario de Título a mi madre Daniella y mi abuela Oda sin quienes no sería nada de lo que soy hoy en día. A Romina quien me ha apoyado incondicionalmente a lo largo de este trabajo, a mi padre Luis, que siempre ha estado en los momentos difíciles durante mi carrera.

También quiero dedicar esta tesis a quienes me ayudaron diariamente durante el desarrollo de este trabajo y me guiaron en mi trabajo, ayudándome a crecer como profesional: mi director de tesis Jorge Martínez, quien me enseñó las exigencias de mi profesión, a mi jefe Nicolás Tobar quien me ayudó con todas mis dudas a lo largo del desarrollo de este seminario de tesis, a Naty y Don José, quienes siempre alegran los días de trabajo en el Laboratorio, a Nico chico, a María Elena, por nunca negarse a prestar algún insumo, a Cesar, Oscar, Celeste, Profesor Juan Pablo y Profesora Mireya y a todo el equipo del Laboratorio de Biología Celular.



AGRADECIMIENTOS

A todos quienes me ayudaron a lo largo de este proceso de formación y durante el desarrollo de mi seminario de tesis, especialmente a Jorge Martínez, Nicolás Tobar, Dra. María Rosa Bono, Mónica Cáceres, Liliana Ortiz, Nataly Fuentes, Nicolás Méndez, María Elena Ponce, Don José.



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fibroblastos Estromales e Interacción con el Carcinoma.	3
1.2. Rol de las Quimioquinas y el Eje SDF-1 CXCR4.	7
1.3. Papel de la Señalización por TGF- β en la Progresión Tumoral.	10
1.4. Tenor Oxidativo y el Desarrollo del Cáncer.	12
1.5. ERK1/2 en progresión del cáncer mamario	13
2. Hipótesis.	15
3. Objetivos.	15
3.1. Generales.	15
3.2. Específicos.	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Equipos e instrumentos de medición	17
Reactivos y Anticuerpos	17
Líneas celulares y cultivo celular	18
Crio-preservación	19
Ensayos	19
Uso de Anticuerpos y Reactivos	19
Western Blot	20



Análisis por RT-PCR	21
Test de significancia estadística.	22
RESULTADOS	24
Factores solubles de origen epitelial modulan la expresión de CXCR4/SDF-1 en células estromales. Posible papel de TGF- β 1 en este estímulo.	24
Papel del tenor oxidativo sobre la expresión de CXCR4/SDF-1 en células estromales.	31
Factores de origen estromal estimulan la expresión de CXCR4 en células epiteliales. Posible papel de SDF-1 y c-Met en la señalización.	39
Efectos de los factores de origen estromal sobre la activación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2 en células epiteliales MCF-7.	48
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

INDICE DE TABLAS O CUADROS

Tabla 1. Partidores para RT-PCR

23





INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los efectos pro-tumorales provocados por fibroblastos estromales dentro de carcinomas mamarios invasivos (Orimo y Weinberg, 2006).	6
Tabla 1. Partidores para RT-PCR	23
Figura 2. Factores solubles generados por células MDA-MB-231 estimulan la expresión de SDF-1 en células estromales HS-5. Posible participación de TGF- β 1.	25
Figura 3. Efecto de factores solubles generados por células MCF-7 sobre la expresión de SDF-1 en células RMF-EG. Posible participación de TGF- β 1.	27
Figura 4. TGF- β 1 Modula la expresión de SDF-1 en células HS-5.	29
Figura 5. Efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de SDF-1 en células RMF-EG.	30
Figura 6. Efecto del cambio del nivel redox sobre el estímulo de MC por células MDA-MB-231 en la síntesis de SDF-1 en células estromales HS-5.	33
Figura 7. Modificación del estímulo epitelial presente en MC por células MCF-7 sobre la expresión de SDF-1 por cambios en el tenor oxidativo del estroma mamario (RMF-EG).	34
Figura 8. Efecto de la modificación del tenor oxidativo sobre la expresión de SDF1 en células HS-5 estimuladas por TGF- β 1.	36
Figura 9. Efecto de la modificación del tenor oxidativo sobre la expresión de SDF1 en RMF-EG estimuladas por TGF- β 1.	38
Figura 10. Expresión de CXCR4 en células MCF7 estimulada por MC RMF-EG.	40
Figura 11. Expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por MC HS5.	41
Figura 12. Efectos de la inhibición de c-Met y CXCR4 sobre la expresión de CXCR4 en células MCF-7 estimulada por MC RMF-EG.	43
Figura 13. Efectos de la inhibición de c-Met (PHA665752) y CXCR4 (AMD3100) sobre la expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por MC HS-5.	44
Figura 14. Expresión de CXCR4 en células MCF7 estimulada por SDF1.	46
Figura 15. Expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por SDF1.	47
Figura 16. Activación de la ruta MAPK/ERK1,2 en células epiteliales MCF-7 mediada por factores solubles generados por células RMF-EG. Posible participación de HGF y SDF-1.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	α -actina de músculo liso
AMD3100	Hidrocloruro de plerixafor, antagonista de CXCR4
BSA	Albumina de suero bovino
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer
CXCR4	Receptor 4 tipo CXC de quimioquinas
CXCR7	Receptor 7 tipo CXC de quimioquinas
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPI	Yoduro de difenileno, inhibidor específico de NOX
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EGTA	ácido etilenglicol tetra-acético
EPCs	Células progenitoras endoteliales
ERK1,2	Quinasas Reguladas extracelularmente 1 y 2
F12	Mezcla de nutrientes para cultivo celular F-12
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HEPES	4-[2-hidroxietil]-1-piperacinetan-ácido sulfónico, Buffer
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HPCs	Células progenitoras hematopoyéticas
IgG	Inmunoglobulina G
JNK	MAPK de c-Jun N-terminal
MAPK/ERK1,2	Proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK1,2
MC	Medio Condicionado

MEC	Matriz extra-celular
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MMP-13	Metaloproteinasa de la matriz 13
NAC	N-acetil-l-cisteína, antioxidante genérico
NaCl	Cloruro de Sodio
NADPH	enzima mevaldato reductasa
NOX	NADPH oxidasas
p38	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción polimeraza en cadena
pERK1,2	ERK1,2 fosforiladas
PHA665752	Inhibidor de c-Met ATP-Competitivo
pTyr	Fosfotirosina
Rac1	Proteína GTPasa perteneciente a la superfamilia RAS
RAS	subfamilia de proteínas de bajo peso molecular envueltas en transducción celular
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SB431542	Inhibidor específico de la superfamilia TGF-β tipo I
SDF-1/CXCL12	Factor derivado de células estromales 1
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero fetal bovino
Smad	Proteínas relacionadas con actina de musculo liso
TβRI	Receptor de TGF- β tipo I

TAK1	Quinasa 1 activada por TGF- β
TEMED	Tetrametil etileno diamina
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante 1

RESUMEN

Las células del carcinoma mamario interactúan en forma permanente con un microambiente tumoral complejo. Un componente determinante de este microambiente son las células estromales, quienes establecen una conversación cruzada con las células del epitelio tumoral. La familia de las quimioquinas (citoquinas con propiedades pro-migratorias) y otros factores solubles como TGF- β 1 y HGF, entre otros, regulan parte importante de esta interacción. En nuestro Laboratorio hemos descrito recientemente que el tenor oxidativo estromal modula la actividad de estos factores solubles y, con ello, la progresión tumoral. En el presente seminario de título se investigaron los mecanismos a través de los cuales se regula la generación de estas señalizaciones paracrinas y cómo esto afecta la progresión del tumor. Como modelos biológicos se utilizaron dos pares de líneas celulares epitelio / estroma: un par que busca representar la condición de interacción epitelio - estroma en la mama (líneas MCF-7 / RMF-EG) y otro que representa la interacción epitelio mamario - estroma secundario (tejido óseo) (líneas MDA-MB-231 / HS-5). Se determinó que el MC por células epiteliales modula la expresión de SDF-1 en ambas líneas estromales y que en particular el MC MDA-MB-231 estimularía la expresión de SDF-1 en células HS-5 a través de TGF- β 1. Adicionalmente se observó que ambos MC estromales modulan la expresión *de novo* del receptor CXCR4 en las líneas epiteliales respectivas, en el caso MCF-7 / MC RMF-EG lo haría mediante SDF-1 y en escalas de tiempo cortas (alrededor de 6 hrs) y en el caso MDA-MB-231 / MC HS-5 posiblemente mediante trans-activación de CXCR4 por medio de HGF.

ABSTRACT

Mammary carcinoma cells permanently interact with a complex tumor microenvironment. One of the key playing components of this microenvironment are the stromal cells who establish a crossed talk with the tumor epithelial cells. The chemokine protein family (cytokines with pro-migrating properties) and other soluble factors such as TGF- β 1, and HGF among others, regulate much of this interaction. In our Laboratory we have recently described that the stromal redox state modulates the activity of this soluble factors and, thus tumoral progression. In the following seminar we investigated the mechanisms through which this paracrine signaling is generated and how does it affect tumoral progression. As biological models, we used two pairs of epithelia / strome cell lines: one that seeks to represent the epithelia – strome interacting condition found in breast (MCF-7 / RMF-EG cell lines) and other representing the interaction between mammary epithelium and secondary strome found in bone tissue (MDA-MB-231 / HS-5 cell lines). It was determined that epithelial CM modulates SDF-1 expression over both stromal cell lines, and particularly MDA-MB-231 CM stimuli over SDF-1 expression in HS-5 cells would act through TGF- β 1. Additionally we observed that both stromal CM modulate de novo expression of CXCR4 receptor over their respective epithelial cell lines, in the case of MCF-7 / RMF-EG CM would act through SDF-1 and at short time scales (around 6 hrs.) and in the case of MDA-MB-231 / HS-5 would possibly act through trans activation of CXCR4 through HGF.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer de mama corresponde al 10,4% de la incidencia total de cáncer en mujeres, convirtiéndolo en el segundo carcinoma más común y la quinta causa más frecuente de muerte asociada a cáncer (World Health Organization., 2009).

Los carcinomas son comunidades complejas de células mutuamente interactuantes que presentan una falla progresiva en los mecanismos homeostáticos, que causa la expansión inapropiada del componente epitelial y que, en casos avanzados, puede producir diseminación de éste a sitios distantes, fenómeno conocido como metástasis.

Este fenómeno constituye la mayor causa de muerte y morbilidad en todas las formas de cáncer (Xie y col., 2009).

Para generar metástasis, la célula tumoral debe superar una serie de barreras estructurales. En primer lugar, en el microambiente tumoral inmediato, toma contacto con fibroblastos asociados al tumor y luego con el tejido conectivo subyacente, a medida que avanza en dirección al torrente sanguíneo. La interacción de las células tumorales con los fibroblastos estromales influye de manera determinante en la posibilidad de que la célula tumoral despliegue su potencial maligno (Egeblad y col., 2005).

El tejido óseo es el sitio con mayor frecuencia de metástasis tanto del carcinoma prostático como mamario, constituyendo este rasgo un factor de aumento en el riesgo de muerte por estos tipos de cáncer (Costa y Major, 2009).

La capacidad de la célula epitelial de realizar metástasis, está determinada por una serie de mecanismos que involucran no sólo a la propia célula de carcinoma sino también al microambiente que rodea al tumor conformado por las células estromales,

los productos de su actividad secretoria y la matriz extracelular (MEC) (Sengupta y col., 2009).

Las células de carcinoma coexisten con un estroma complejo compuesto por variados tipos de células no epiteliales que incluyen células inmunes, microvasculares y células estromales como fibroblastos. Este complejo multicelular y la MEC que lo rodea, constituyen el llamado microambiente tumoral (Bissell y Radisky, 2001; Mueller y Fusenig, 2004). Una vez establecido este contacto, las células epiteliales y del estroma participan en una interacción funcional comandada por señales químicas en las que, muy probablemente, los productos de secreción de una afectan el comportamiento de la otra (Beacham y Cukierman, 2005; Proia y Kuperwasser, 2005).

Existe una vasta evidencia clínica que apoya la contribución del estroma al desarrollo de una gran variedad de tumores. Así, por ejemplo, se ha descrito una mayor incidencia de formación de tumores en tejidos que han sido expuestos a una inflamación crónica así como también en aquellos tejidos sometidos a procesos de cicatrización de heridas, en los que el estroma juega un papel central (Jacobs y col., 1999; Coussens y Werb, 2002). En modelos de tumorigénesis en ratones se ha demostrado que tanto las células inflamatorias y vasculares como también los fibroblastos, ayudan activamente al crecimiento del tumor (Tlsty, 2001; Bhowmick, Neilson, y col., 2004). La interacción tumor-estroma influye también en el crecimiento tumoral por medio de la regulación de la angiogénesis o suprimiendo/destruyendo la respuesta inmune del huésped o bien modulando la matriz extracelular. La mayoría de estas interacciones involucran la producción de moléculas señalizadoras, que actúan sobre las células epiteliales alterando su fisiología celular a favor del crecimiento tumoral (Olumi y col., 1999; Liotta y Kohn, 2001; Proia y Kuperwasser, 2005).

1.1. Fibroblastos Estromales e Interacción con el Carcinoma.

Entre las células estromales que interactúan con el tumor, destacan por su abundancia y funcionalidad los fibroblastos tumorales, también conocidos por su sigla en inglés CAFs (cancer-associated fibroblasts) (Micke y Ostman, 2005; Proia y Kuperwasser, 2005; Bagloli y col., 2006). La respuesta de las células de carcinoma a los fibroblastos depende de muchos factores, que incluyen la naturaleza y el grado de las lesiones oncogénicas en las células tumorales, y del tiempo y estado de activación de los fibroblastos (Olumi y col., 1999; Kuperwasser y col., 2004; Bhowmick y Moses, 2005; Campisi, 2005; Bagloli y col., 2006).

La respuesta del tumor a los fibroblastos puede tener características contradictorias. Se ha identificado que células provenientes de un tejido normal expresan una actividad supresora del tumor, situación que cambia hacia una propiedad promotora del tumor a medida que la carcinogénesis progresa (Proia y Kuperwasser, 2005). Este cambio en el fenotipo se asocia –entre otros- con un fenómeno llamado activación fibroblástica, mediante el cual se da origen a un nuevo fenotipo de fibroblastos modificados irreversiblemente y que exhiben propiedades promotoras del tumor, llamados miofibroblastos (Beacham y Cukierman, 2005). Es así como, en el estroma de muchos tumores humanos de mama invasivos, se ha observado una gran acumulación de miofibroblastos, positivos para α -actina de músculo liso (α -sma) que constituye un marcador característico de este fenotipo activado (Sappino y col., 1988; Beacham y Cukierman, 2005). Los miofibroblastos también existen en áreas de cicatrización e inflamación crónica y se les asigna un rol crucial en la reparación de heridas dadas sus propiedades contráctiles, su capacidad de promover la angiogénesis, producción de

matriz extracelular y la secreción de factores de crecimiento y citoquinas (Serini y Gabbiani, 1999; Mueller y Fusenig, 2004). Un análisis histológico de muestras tumorales y tejido en cicatrización, muestra una gran similitud entre ambos especímenes, encontrándose en ambos gran cantidad de miofibroblastos (Dvorak, 1986).

Trabajos recientes indican que los fibroblastos estromales extraídos de muestras tumorales humanas son capaces de secretar una serie de factores de crecimiento con potencial de malignización epitelial como SDF-1 (Factor Derivado de Estroma 1) y HGF (Factor de Crecimiento de Hepatocitos), además de producir una importante alteración de la abundancia relativa de MEC, que contribuye a la rigidez del microambiente y a la generación de un contexto de señalización proclive a la progresión tumoral (Olumi y col., 1999; Egeblad y col., 2005; Orimo y col., 2005; Paszek y col., 2005; Baglole y col., 2006). De ello se deduce que la diferenciación miofibroblástica es inducida por el tumor, el que responde creando condiciones microambientales que favorecen la progresión tumoral.

Los CAFs provenientes de carcinomas mamarios difieren de sus homólogos localizados fuera de las masas tumorales y de los fibroblastos obtenidos de reducciones mamarias en múltiples aspectos funcionales importantes (Orimo y col., 2005):

- i) Los CAFs provenientes de carcinomas mamarios humanos invasivos son más competentes que los fibroblastos normales en el estímulo del crecimiento de células de cáncer de mamas.
- ii) Incluyen una mayor proporción de miofibroblastos que exhiben altos niveles de expresión de α -SMA y capacidad para contraer colágeno.

- iii) En experimentos *In vivo*, e inoculados con células tumorales mamarias, producen tumores altamente vascularizados en contraste a los tumores pobremente vascularizados generados por adición de fibroblastos normales.
- iv) Liberan niveles mayores de SDF-1 (CXCL12) quimioquina responsable, entre otras funciones, del reclutamiento de células progenitoras endoteliales (EPCs) en la masa tumoral, impulsando así la angiogénesis tumoral. Adicionalmente este factor produce también un aumento del crecimiento tumoral por un estímulo paracrino directo a través de su receptor CXCR4 presente en las células tumorales mamarias, develando así un segundo papel de SDF-1 en el estímulo de la progresión tumoral *in vivo* (Fig. 1).
- v) Tanto las propiedades promotoras del tumor, como las propiedades miofibroblásticas de los CAFs existen de manera estable en estas células en ausencia de contacto con células de cáncer de mama.

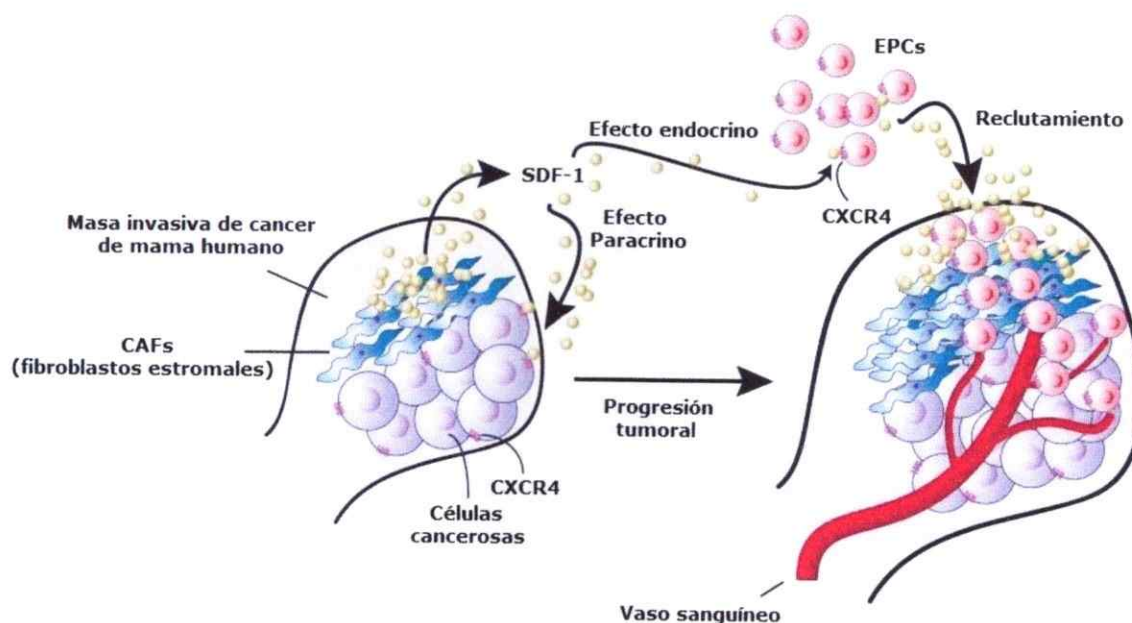


Figura 1. Esquema de los efectos pro-tumorales provocados por fibroblastos estromales dentro de carcinomas mamarios invasivos (Orimo y Weinberg, 2006).

En la figura se observa el efecto de la secreción del Factor Derivado de Estroma 1 (**SDF-1**) por parte de las células estromales (**CAFs**) sobre la progresión del tumor. Su efecto paracrino afecta sobre la expresión de su propio receptor (**CXCR4**) y endocrinamente estimula el reclutamiento de células progenitoras endoteliales (**EPCs**), aumentando la vascularización y promoviendo así la progresión tumoral.

La propuesta mayormente aceptada vigente en la actualidad es que las células del carcinoma reclutan fibroblastos normales en su entorno y luego estimulan su conversión en miofibroblastos lo que promueve el crecimiento y progresión tumoral. Cabe destacar que las células del carcinoma reclutan además macrófagos y células B las que, en lugar de exhibir respuestas citotóxicas ante el tumor, facilitan su crecimiento (Balkwill y col., 2005; de Visser y col., 2006).

1.2. Rol de las Quimioquinas y el Eje SDF-1 CXCR4.

Se ha identificado que moléculas del tipo citoquinas quimiotácticas o quimioquinas pueden jugar un rol central en el fenómeno metastásico (Muller y col., 2001).

Existen aproximadamente 45 familias de quimioquinas (Rossi y Zlotnik, 2000) organizadas en 4 grupos identificados por sus motivos cisteína N-terminales (CXC, CC, C y CX3C). En su mayoría son proteínas básicas, con sitios de unión de heparina cuya principal función es la de inducir la migración celular, principalmente de varios tipos de leucocitos (Koizumi y col., 2007). La actividad de las quimioquinas está determinada por su unión a receptores específicos que, en su totalidad, pertenecen a la categoría de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con 7 dominios transmembrana (Koizumi y col., 2007). Al receptor quimioquina 4 de la familia CXC (CXCR4), se le ha atribuido un papel relevante en la migración de la célula tumoral (Muller y col., 2001). Más de 23 diferentes tipos de tumores humanos expresan CXCR4 (Murakami y col., 2004; Zlotnik, 2004), por lo que su expresión ha sido motivo de intenso estudio con vistas a una aplicación terapéutica (Muller y col., 2001). Altos niveles de expresión de CXCR4 en variados tipos de células de cáncer humanos están clínicamente asociados con un mal pronóstico (Kang y col., 2003; Marchese y col., 2003). Por otra parte, CXCR4 expresado ectópicamente en células de cáncer estimula el crecimiento del tumor primario en modelos de xenoinjerto en ratas (Helbig y col., 2003). Adicionalmente se ha identificado que la alta expresión de CXCR4 en pacientes con tumores primarios HER-2 negativos, sugiere un peor pronóstico (Mizell y col., 2009). La quimioquina CXCL12, también conocida como SDF-1 α es una quimioquina homeostática del tipo CXC a la que se le ha asignado un papel importante en la

hematopoyesis (Hartmann y col., 2005), en el desarrollo y organización del sistema inmune y en la supervivencia y crecimiento de una variedad de tipos celulares normales y malignos (Begley y col., 2007). SDF-1 reconoce como su receptor a CXCR4 y también a CXCR7, teniendo similares efectos ambas interacciones (Maksym y col., 2009). Datos experimentales sugieren que la interacción CXCR4 – SDF-1 generaría cambios conformacionales en CXCR4 que afectan de manera específica la heterodimerización, indicando la complejidad del mecanismo regulador función-dimerización, de esta quimioquina (Isik y col., 2008). Se ha identificado que el par SDF-1/CXCR4 está involucrado en el desarrollo de varios subgrupos de células inmunes y sus procesos de migración (Rossi y Zlotnik, 2000).

En forma adicional a su papel como organizador y estimulador de la migración en células inmunes, se ha estudiado que el eje SDF-1/CXCR4 juega un papel importante en la metástasis de cáncer de mamas a nodos linfáticos (Muller y col., 2001). Pronunciados gradientes de SDF-1 generados de manera local por células endoteliales y fibroblastos presentes en lesiones isquémicas atraen células progenitoras que expresan CXCR4, en particular células progenitoras hematopoyéticas (HPCs) y endoteliales (EPCs), y posiblemente células de tejido progenitor al sitio de la lesión, facilitando la reparación a través del estímulo de la angiogenesis y la consiguiente regeneración de los compartimentos celulares epiteliales (Askari y col., 2003; Schober y col., 2003). Se ha demostrado que este mismo mecanismo opera en tumores, indicando una semejanza biológica entre ambos estromas (Orimo y col., 2005).

Tanto en tumores primarios de mama como en líneas celulares invasivas, la expresión de receptores CXCR4 funcionales se asocia con el nivel de malignidad (Muller y col., 2001; Tan y col., 2008). Este hecho, además de facilitar el fenómeno metastásico, parece ser responsable del crecimiento del tumor primario (Chen y col., 2003; Liang y

col., 2004; Smith y col., 2004; Lapteva y col., 2005; Liang y col., 2005). Por otra parte, el tratamiento de células tumorales mamarias con anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 inhibe de manera efectiva la capacidad metastásica de estas células tanto a pulmón como a nodos linfáticos (Tan y col., 2008). SDF-1 (o CXCL12), ligando de CXCR4, es mayoritariamente secretado por fibroblastos estromales y constituye un factor paracrino que estimula específicamente la proliferación dependiente e independiente de quinasas reguladas por señalizaciones extracelulares (ERK 1,2) en células epiteliales (Begley y col., 2005; Wang y col., 2005). Además, SDF-1 media una respuesta transcripcional en células epiteliales que estimula directamente la expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en la proliferación celular, metástasis tumoral y motilidad celular y reprime directamente la transcripción de genes codificantes de proteínas involucradas en adhesión célula-célula y resistencia a apoptosis (Begley y col., 2007). En síntesis la señalización mediada por SDF-1 activa rutas que estimulan la transcripción génica y proliferación celular, dentro de las que se incluyen la ruta MAPK/ERK1,2 y la expresión de MMP-13 (metaloproteinasa de la matriz 13) (Begley y col., 2005; Wang y col., 2005; Tan y col., 2008) en un proceso que es inhibido por el tratamiento con AMD3100, droga antagonista de CXCR4 (Tan y col., 2008).

La expresión de CXCR4 en la superficie celular está regulada a distintos niveles incluyendo el control de la transcripción de CXCR4 (Kang y col., 2003; Castellone y col., 2004) y la internalización del receptor luego de la unión a ligando (Marchese y col., 2003). De manera interesante, se ha demostrado que microambientes de pániculo adiposo mamario y hueso inducen la expresión génica de CXCR4 en células de cáncer de mama (Helbig y col., 2003; Kang y col., 2003).

1.3. Papel de la Señalización por TGF- β en la Progresión Tumoral.

TGF- β pertenece a una familia de factores de crecimiento pleiotrópicos que juegan papeles importantes en la mantención de la homeostasis normal de los tejidos (Massague, 2000). TGF- β es una citoquina multifuncional que inhibe la proliferación de la mayoría de las líneas celulares epiteliales y también es responsable de la producción del fenómeno fibrótico tisular a través de la inducción de múltiples proteínas de la matriz extracelular.

TGF- β señaliza en las células blanco luego de unirse a receptores con actividad serina-treonina quinasa específicos (Massague, 2000; Paszek y col., 2005). Estos receptores transmembrana constituyen un complejo receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas: el receptor de TGF- β tipo I (ALK 1-5) y el receptor de TGF- β tipo II (T β RI y T β RII respectivamente), que luego activa cascadas de señalizaciones intracelulares que incluyen la vía canónica de señalización Smad2/3 y vías de señalización alternativas tales como p38 mediado por TAK1 o señalización JNK (Massague, 2008). T β RII transfosforila T β RI y este último activa proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smads) (Heldin y col., 1997), específicamente Smad2 y Smad3, mientras que los receptores BMP tipo I inducen fosforilación de Smad1, 5 y 8 (Miyazawa y col., 2002). Los R-Smads activados forman complejos con Smad4 y se translocan en el núcleo (Heldin y col., 1997), donde interactúan con múltiples factores de transcripción, co-activadores y co-represores transcripcionales de genes blanco (Nishihara y col., 1998; Akiyoshi y col., 1999).

La desregulación de la señalización de TGF- β se ha relacionado con el proceso carcinogénico en muchos órganos. En el transcurso de la progresión del cáncer, TGF- β usualmente pasa de un papel supresor del tumor al inicio de la carcinogénesis a uno

promotor en las etapas avanzadas de la progresión tumoral (Massague, 2008). En el embrión, se observa frecuentemente expresión de TGF- β en sitios donde ocurren interacciones mesénquima-epitelio (Timme y col., 1994), sugiriendo que TGF- β podría actuar como un mensajero importante entre estos dos compartimientos. En apoyo de esa función, la pérdida genética de respuesta ante TGF- β en fibroblastos está asociada con una expresión aberrante de factores de crecimiento y citoquinas de parte de los fibroblastos, resultando en el desarrollo de lesiones malignas y premalignas en múltiples epitelios suprayacentes en estómago, próstata y mama (Bhowmick, Chytil, y col., 2004; Bhowmick y Moses, 2005; Cheng y col., 2005). Sin embargo, la sobreexpresión forzada de TGF- β en fibroblastos los lleva a promover la extensión de células de epitelio mamario humano (Kuperwasser y col., 2004). Estas interacciones genéticas implican la existencia de mecanismos homeostáticos balanceados, entre los fibroblastos y el parénquima epitelial, basados en la actividad señalizadora de TGF- β . Trabajos previos de nuestro grupo han permitido identificar en tumores mamarios humanos invasivos el origen predominantemente epitelial de TGF- β en el frente invasivo tumoral (Guerrero y col., 2010). Tomando esa información en consideración, hemos postulado un modelo que supone que factores generados por las células de carcinoma –entre los que TGF- β juega un papel central- activan mecanismos estromales que predisponen la generación de señales paracrinas que promueven la malignidad celular.

1.4. Tenor Oxidativo y el Desarrollo del Cáncer.

Se ha descrito que el equilibrio oxidativo intracelular determina el progreso de numerosas enfermedades inflamatorias sistémicas (Kumar y col., 2008). El nivel redox tisular, depende de la actividad mitocondrial y de la actividad de una familia específica de enzimas conocidas como NADPH oxidasas (NOX), enzimas descritas originalmente en células fagocíticas y que, además, desempeñan un papel importante en la señalización de células no asociadas a la función fagocítica (Kumar y col., 2008). En algunas especies celulares se ha identificado que algunas NOX tienen en su estructura polimérica la molécula Rac1 lo que ha permitido asociar la actividad generadora de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la motilidad celular (Tobar y col., 2008).

Las NOX representan un sistema generador de ROS regulado cuya principal función reside en servir como elementos de señalización (Kamata, 2009). El principal producto de la actividad NOX es el anión superóxido que es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno (Liochev y Fridovich, 2007). Una gama de proteínas con funciones específicas, son blanco de la oxidación intracelular a través de oxidación reversible o irreversible de residuos cisteína redox-sensibles, dependientes de catálisis por metales pesados. Tal es el caso de una serie de Fosfo-tirosín fosfatasas cuya inhibición por oxidación genera un aumento de la vida media de la fosforilación en tirosina, modificación covalente de importancia capital en la señalización intracelular. Se ha descrito que la desregulación del equilibrio redox intracelular generado por ROS dependientes de NOX, pueden perturbar el balance de la homeostasis celular, resultando finalmente en estados patológicos, como aterosclerosis, hipertensión, inflamación, cáncer entre otros (Lambeth, 2007). Trabajos relativamente recientes han

demostrado que, en líneas celulares de próstata humana, la malignidad celular está relacionada en forma directa con la capacidad de las células de generar ambientes pro-oxidativos dependientes de NOX (Lambeth, 2007).

En el presente trabajo pretendemos investigar el papel que juega el equilibrio redox estromal en el fenómeno migratorio epitelial. En particular nos interesa estudiar los cambios redox producidos en el estroma celular y la forma como esta condición afecta la activación de mecanismos importantes en el fenómeno migratorio tumoral como el eje SDF-1 (CXCL12)/CXCR4.

Además de identificar los mecanismos subyacentes a la inducción de la expresión génica de CXCR4 en células de cáncer de mama en los microambientes de pániculo adiposo mamario y hueso.

1.5. ERK1/2 en progresión del cáncer mamario

La ruta de las MAP quinasas ha sido implicada en la progresión del cáncer de mamas a través de sus 4 cascadas de señalización: la vía quinasa regulada extracelularmente 1/2 (ERK1/2), la vía quinasa c-Jun N-terminal (JNK), la vía p38 y la vía ERK5 (Wang y Tournier, 2006; Krishna y Narang, 2008). Entre estas vías de señalización anteriores, se ha descrito que la vía ERK1/2 tiene especial importancia en modelos de cáncer de mamas (Santen y col., 2002). En aproximadamente el 30% de los cánceres de mama humanos se pueden encontrar mutaciones en la vía MAPK ERK1/2; sin embargo, la naturaleza de las desregulaciones varía entre tumores individuales y subtipos de cáncer (Cobleigh y col., 1999; Navolanic y col., 2003). La activación de la ruta ERK1,2 en líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 induce proliferación celular e

inhibición de apoptosis efecto que puede ser revertido mediante la inhibición de la actividad ERK1,2.

La señalización a través de las vías de MAPKs envuelve la activación secuencial de una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), luego una MAPK quinasa (MAPKK) y finalmente una MAPK. En el caso particular de la vía ERK1,2 Ras, una GTPasa de bajo peso molecular cumple el papel de activador primario de entrada, activando a Raf1 (MAPKKK), el que a su vez activa MEK1,2 (MAPKK), quien finalmente activa ERK1,2 (MAPK) (Krishna y Narang, 2008). En su forma activa, ERK1,2, fosforila un variado rango de proteínas (en sus substratos serina o treonina), funcionando así como proteína andamio, previo a su translocación al núcleo u otros compartimentos celulares. Este efecto andamio permite que la actividad de la cascada Raf1-MEK1,2-ERK1,2 sea autorregulada por ERK1,2 mediante la inactivación de MEK1 y por fosfatasas ERK1,2-específicas como MKP2 y MKP3 (fosfatasas MAPK de especificidad doble) (Eblen y col., 2004; Ramos, 2008). Así ERK1,2 controla la intensidad y duración de su propia señalización.

La cascada de señalización ERK1/2 es gatillada por factores de crecimiento y citoquinas que pueden actuar a través de receptores tirosina quinasa, receptores asociados a proteínas G o receptores esteroidales (Boonstra y col., 1995; Filardo y col., 2000; Nguyen y col., 2000; Schlessinger, 2000; Liu y col., 2002; Fata y col., 2007; Song y col., 2007; May y Hill, 2008). Las consecuencias biológicas de la fosforilación de sustrato para ERK1/2 incluyen efectos pro-proliferativos (Pearson y col., 2001), pro-diferenciativos (Pearson y col., 2001), pro-sobrevivencia (Pearson y col., 2001), pro-angiogénicos (Pages y col., 2000), pro-migratorios (Joslin y col., 2007) y pro-invasivos (Price y col., 2002).

2. Hipótesis.

TGF- β producido por las células epiteliales modula de forma paracrina la expresión de SDF-1 en células estromales vecinas, el que a su vez, regula la síntesis *de novo* de su propio receptor en células epiteliales. El mecanismo propuesto es dependiente del tenor oxidativo estromal.

3. Objetivos.

3.1. Generales.

Estudiar los mecanismos involucrados en el funcionamiento del eje SDF-1/CXCR4 y su rol en la migración de células epiteliales mamarias, y determinar la importancia del tenor oxidativo estromal en el fenómeno migratorio epitelial.

3.2. Específicos.

- Estudiar la expresión de SDF-1 en células estromales mamarias humanas y células estromales de médula ósea, pertenecientes a las líneas celulares RMF-EG y HS-5 respectivamente, luego del estímulo por factores generados por las células epiteliales mamarias interactuantes con estos microambientes (MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente), e identificar el papel que juega TGF- β en este estímulo.
- Analizar la estimulación de la migración de células mamarias MCF-7 por medios condicionados (MC) por células RMF-EG e identificar mediante el uso de inhibidores la participación del eje CXCR4-SDF-1 en este fenómeno.
- Estudiar, en células RMF-EG y HS-5 la expresión de SDF-1 en respuesta a cambios en sus estados de oxidación intracelular. Adicionalmente, evaluar la participación de

NOX4 en la producción de SDF-1 y su potencial efecto en el estímulo migratorio epitelial.

- † Analizar, en células epiteliales MCF-7 y MDA-MB-231, los mecanismos de estímulo a la expresión de CXCR4 y las rutas de señalización activadas por factores estromales secretados, que sean parte del proceso migratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos e instrumentos de medición

Para realizar todos los experimentos conducentes a resultados incluidos en este documento se utilizaron una Campana de bioseguridad Forma Scientific modelo 1129; un Incubador Lab-Line CO₂ automático; Cámaras de transferencia Bio-Rad; Centrífuga Heraeus Biofuge primo R; Microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F; Termociclador TECHNE TC-312; Espectrofotómetro UV/Visible de un haz de luz UNICO SQ-2800; Transiluminador BioJSP FOTODYNE 3-3002; Balanza analítica Denver Instrument Company AA-160; pHmetro HANNA Instruments HI111.

Reactivos y Anticuerpos

- DMSO, TEMED, β -mercaptoetanol, Tris, Acrilamida, Agarosa (SIGMA-Aldrich, st Louis, MO).
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Bicarbonato de Sodio (Merck Damstadt, Alemania).
- Metanol (TCL, Chile).
- Estandar de Peso molecular, inhibidor de IKK VI (BioRad).
- Oligo dT 12-18 Primer, M-MLV Reverse Transcriptaza, Buffer enzima 5X, Reactivo TRIzol®, dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, dTTP 100 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA).
- 100bp DNA Lader (New England BioLabs).
- Anticuerpos monoclonales anti pERK1,2 y anti ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

- Tripsina-EDTA (Gibco).
- Anticuerpo secundario anti mouse conjugado con peroxidasa IgG (Rockland, Gilbertsville, PA).
- PHA665752 (Calbiochem, Darmstadt, Germany).
- SB431542 (TOCRIS bioscience, USA).
- AMD3100 (Sigma-Aldrich, USA).
- GoTaq® Green Master Mix (Promega, WI, USA).

Líneas celulares y cultivo celular

Se utilizaron células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231 (ATCC) y las líneas estromales HS-5 (ATCC) y RMF-EG provenientes de médula ósea y mama. Esta última línea celular fue donada por la Dra. Ch. Kuperwasser, (Tufts University, USA)

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en ambiente húmedo con 5% de CO₂ y en botellas de 75 cm² de superficie en medio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en el caso de las líneas estromales y en DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para el caso de ambas líneas las epiteliales, todas suplementadas con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) al 10%, adicionado con antibiótico gentamicina 2 mg/L (Best Pharma) y un antibiótico contra micoplasma adicional (Baycip, Plasmocina o Normocina). Las células se subcultivaron antes de alcanzar la confluencia por tratamiento con 3mL de Tripsina-EDTA (Gibco) de 3 min seguido por una corta incubación con 5 mL de medio con 10% SFB para frenar la actividad proteolítica y una centrifugación de 3 min a 1000 RPM para limpiar el cultivo de posibles contaminaciones.

Para cada ensayo se sembró el total del contenido de una botella de 75 cm² crecida hasta confluencia en 8 placas de 35 mm con una superficie equivalente de 8,8 cm² dejando las células en medio con 10% SFB toda la noche previo a cada ensayo.

Antes de cada tratamiento específico, las células MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio sin SFB, por 48 hrs y 24 hrs en el caso de las líneas RMF-EG y HS-5.

Los medios condicionados (MC) se generaron a partir de células MCF-7, MDA-MB-231, RMF-EG y HS-5 crecidas hasta alcanzar confluencia en botellas de 75 cm², adicionando luego 7 mL de medio de cultivo sin SFB y con antibiótico (Gentamicina 2 mg/L y Baycip, Plasmocina o Normocina) por 48 hr. El MC se obtuvo directamente de la botella centrifugando 3 min a 1000 RPM y eliminando el pellet, para luego adicionar medio fresco (DMEM o DMEM/F12, según corresponda) hasta una concentración final de MC de 75%.

Crio-preservación

Las células se liberaron de la placa con Tripsina-EDTA (Gibco), agregando sobre ésta 4 volúmenes de medio de cultivo, centrifugando 5 min a 1800 RPM. El pellet resultante se resuspendió en 90% SFB y 10% DMSO a una densidad de 1×10^6 células/mL. Distribuyendo luego 1 mL de la solución en criotubos rotulados y congelando por descenso gradual en N₂ líquido a -196 °C.

Ensayos

Uso de Anticuerpos y Reactivos

Los anticuerpos monoclonales contra ERK1,2 fosforilada y ERK1,2 no fosforilada obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), y un anticuerpo monoclonal

contra residuos fosforilados en tirosina 4G10 facilitados por la Dra. M. R. Bono (Laboratorio de Inmunología, Universidad de Chile), fueron utilizados para ensayos de Western Blot.

Para determinar el papel de algunos de los factores envueltos en el eje CXCR4/SDF-1 utilizamos el inhibidor de la actividad quinasa de c-Met (PHA665752) (Calbiochem, Darmstadt, Germany), el inhibidor del receptor TGF- β tipo I SB431542 (TOCRIS bioscience, USA), el inhibidor de CXCR4 AMD3100 (Sigma-Aldrich, USA) y el inhibidor de IKK VI (Bio-Rad).

Para ensayos de activación de la expresión y transcripción se utilizaron TGF- β 1 recombinante (R&D Systems o PeproTech), SDF-1 α recombinante (200 ng/mL) (PeproTech), el inhibidor de NADPH oxidasa yoduro de difenileno (DPI, 5 μ M) y el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC, 10 μ M), ambos adquiridos en Sigma (USA). Todos los inhibidores y moduladores del tenor oxidativo fueron adicionados 1hr previo al ensayo y luego mantenidos a igual concentración en conjunto con el estímulo a evaluar por el período total de duración del ensayo.

Western Blot

Las células fueron raspadas desde la placa de cultivo de 35 mm con un volumen de 1 mL de tampón C (HEPES 50mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, 10% glicerol, 1% Trirón X-100, MgCl₂ 2 mM e inhibidores de proteasas: Ortovanadato 2 mg/mL, Leupeptina 5 ug/mL y Pepstatina 10 ug/mL). A cada muestra se le agregó tampón de carga 4X con 1% de β -mercaptoetanol. La mezcla se calentó a 75 °C por 5 min y se cargó sobre un gel de SDS-PAGE que se corrió a 80V hasta pasar el gel concentrador y luego a 100V a través del gel separador. La transferencia se realizó a 80V por 1 hr o a 16V "over night". Una vez finalizada la transferencia las membranas se bloquearon

con leche al 10% en el caso de ERK y BSA al 5% para el caso de pTyr, luego se incubó con el anticuerpo primario en leche al 2% o BSA al 1% (1 y 4 hr respectivamente) y finalmente 1 hr con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. El revelado de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit de Pierce.

La activación de ERK 1,2 y carga total fueron obtenidas mediante inmunoblots de lisados celulares (30 µg) resueltos mediante 10% SDS-PAGE usando anti-fosfotirosina ERK y anti-ERK respectivamente, como esta descrito ²⁴. Para el caso de los perfiles de pTyr se analizaron por inmunoblots cargados con 45 µg de lisado celular resueltos mediante 8% SDS-PAGE utilizando el anticuerpo anteriormente descrito.

Análisis por RT-PCR

Extracción:

El RNA total se aisló a partir de células MCF-7, MDA-MB-231, HS-5 o RMF-EG sembradas en placas de cultivo de 35 mm utilizando TRIzol® (GIBCO) mediante el protocolo descrito por los fabricantes para extracción de células crecidas en monocapa.

Síntesis:

Se tomaron 2 µg de RNA, cuantificados por espectrofotometría, y se diluyeron hasta un volumen final de 10 µL esta mezcla se denaturó a 75 °C por 5 min, y luego se renaturó en hielo durante 3 min con objeto de eliminar la estructura terciaria del RNA. Posteriormente se tomaron 5 µL del RNA obtenido y se agregó 0,5 µL de Oligo dT 50 µM, 2,5 de Buffer enzima 5X, 0,75 µL de la mezcla con los 4 dNTPs a 10 mM, 0,5 de enzima M-MLV transcriptasa reversa y completando con agua hasta un volumen final de 7,5 µL. El cDNA se sintetizó a 42 °C por 1 h.

Una vez obtenido el cDNA se diluyó a una concentración final de 200 ng/ μ L por espectrofotometría. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C.

PCR:

En tubos de 0,2 mL RNAase Free autoclavados, se agregaron 10 μ L del GoTaq® Green Master Mix (Promega, WI, USA), 0,5 μ L de cada partidor 10 pmol/ μ L, 1,5 μ L de cDNA (300 ng) y agua libre de nucleasas hasta completar 20 μ L.

Para el PCR de CXCR4 se utilizaron las secuencias de partidores de la siguiente manera: CXCR4 Forward, 5'-AAT CTT CCT GCC CAC CAT-3'; CXCR4 Reverse, 5'-ATC CAG ACG CCA ACA TAG-3' (amplificando para un fragmento de 372 pb a 26 ciclos para el caso de MCF-7 y 27 ciclos para las células MDA-MB-231).

Para el PCR de SDF-1 se utilizaron las secuencias de partidores de la siguiente manera: SDF-1 Forward, 5'-GTG GCA CTC AGA TAC CGA-3'; SDF-1 Reverse, 5'-AAC CCA GTC ACT CAA AGC-3' (amplificando para un fragmento de 444 pb a 24 ciclos para RMF-EG y 26 ciclos para HS-5).

La temperatura de alineamiento utilizada fue de 52 °C para ambos casos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1,5% y visualizados mediante tinción por bromuro de etidio.

Test de significancia estadística.

La significancia estadística fue determinada utilizando el test de T de Student, a partir de los datos obtenidos de 3 ensayos distintos realizados para cada experimento. Los valores de menores a 0,05 fueron aceptados como estadísticamente significativos, designando como * a los valores de p entre 0,05 y 0,01 y ** a los valores inferiores a 0,01.

Tabla 1. Partidores para RT-PCR

Proteína	Partidores (Forward-Reverse)	Tm (°C)	Línea cel. / N° ciclos		Producto (pb)
CXCR4	5'-AAT CTT CCT GCC CAC CAT-3' - 5'-ATC CAG ACG CCA ACA TAG-3'	52	MCF-7	26	372
			MDA-MB-231	27	
SDF-1	5'-GTG GCA CTC AGA TAC CGA-3' - 5'-AAC CCA GTC ACT CAA AGC-3'	52	RMF-EG	24	444
			HS-5	26	

RESULTADOS

Factores solubles de origen epitelial modulan la expresión de CXCR4/SDF-1 en células estromales. Posible papel de TGF- β 1 en este estímulo.

Se ha descrito que los CAFs en el microambiente tumoral producen factores de crecimiento, quimioquinas y moléculas de matriz extracelular que facilitan el reclutamiento angiogénico de células endoteliales y pericitos, lo que los convierte en un determinante clave de la progresión tumoral del cáncer (Orimo y Weinberg, 2006). Una característica común de los CAFs es su capacidad de ser estimulados por factores de crecimiento (PDGF o TGF- β 1) (Orimo y col., 2005) o quimioquinas -como SDF-1- que constituye un señalizador pro-angiogénico en CAFs mamarios por su contribución al reclutamiento de células EPC derivadas de médula ósea (Figura 1).

Con el propósito de evaluar el efecto paracrino de factores secretados por las células epiteliales sobre fibroblastos estromales asociados a cáncer en los microambientes mamario y de hueso, utilizamos como modelo, por un lado, la línea celular epitelial mamaria débilmente invasiva MCF-7 y la línea estromal humana RMF-EG y por otro, la línea celular mamaria invasiva MDA-MB-231 y la línea celular estromal HS-5 obtenida desde médula ósea humana. El primer par (MCF-7/RMF-EG) busca representar la condición de una invasión "local", a nivel mamario, mientras que el segundo (MDA-MB 231/HS-5) pretende representar la condición de una metástasis ósea, sitio más frecuente de metástasis en el cáncer mamario (Costa y Major, 2009).

Con este fin se cultivaron fibroblastos estromales con medios condicionados por las líneas epiteliales por 24 hrs, en presencia o ausencia del inhibidor SB 431542. Esta molécula bloquea la actividad quinásica del receptor I de TGF- β 1 (T β RI) y su inclusión

en el ensayo busca evaluar el efecto de TGF- β 1 sobre los cambios en los niveles de expresión del mensajero de SDF-1 en células estromales.

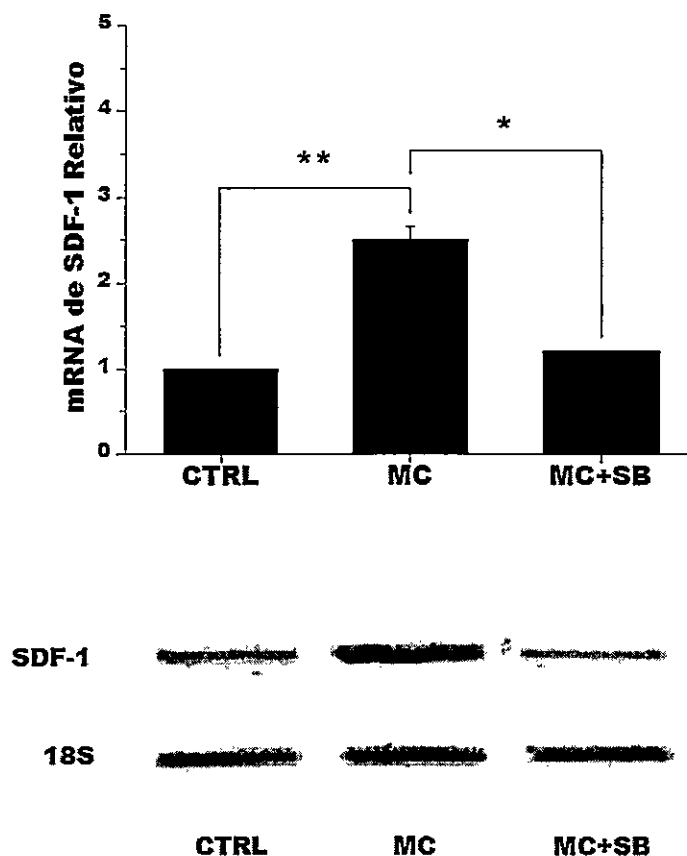


Figura 2. Factores solubles generados por células MDA-MB-231 estimulan la expresión de SDF-1 en células estromales HS-5. Posible participación de TGF- β 1.

En la gráfica se observa el nivel de expresión de mRNA de SDF-1 producidos en células HS-5 estimuladas por MC por células MDA-MB-231 en presencia y ausencia del inhibidor del receptor de TGF- β 1. La gráfica representa el cambio relativo en la expresión de SDF-1 respecto a la expresión basal de células HS-5 (CTRL). La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), estímulo por MC MDA-MB-231 (MC) e inhibición del estímulo mediante pre-tratamiento con SB 431542 (MC+SB). Las diferencias significativas del estimulado (MC) con respecto al control (CTRL) y del estimulado con respecto al inhibido (MC+SB), se representan como * para $p < 0.05$ v ** para $p < 0.01$.

En la figura 2 se observa que el medio condicionado por células MDA-MB-231 genera en células HS-5, un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de SDF-1 relativa a su expresión basal. Este estímulo es inhibido potentemente con la adición del inhibidor de T β RI SB431542. Este resultado sugiere que el factor TGF- β 1 presente en el MC epitelial sería un responsable del estímulo de la expresión de SDF-1 en células HS-5, a través de la activación de T β RI. En términos más generales, el resultado sugiere que factores solubles generados por células mamarias invasivas estimulan la expresión de SDF-1 y que este estímulo podría depender de la actividad de TGF- β 1 presente en el medio.

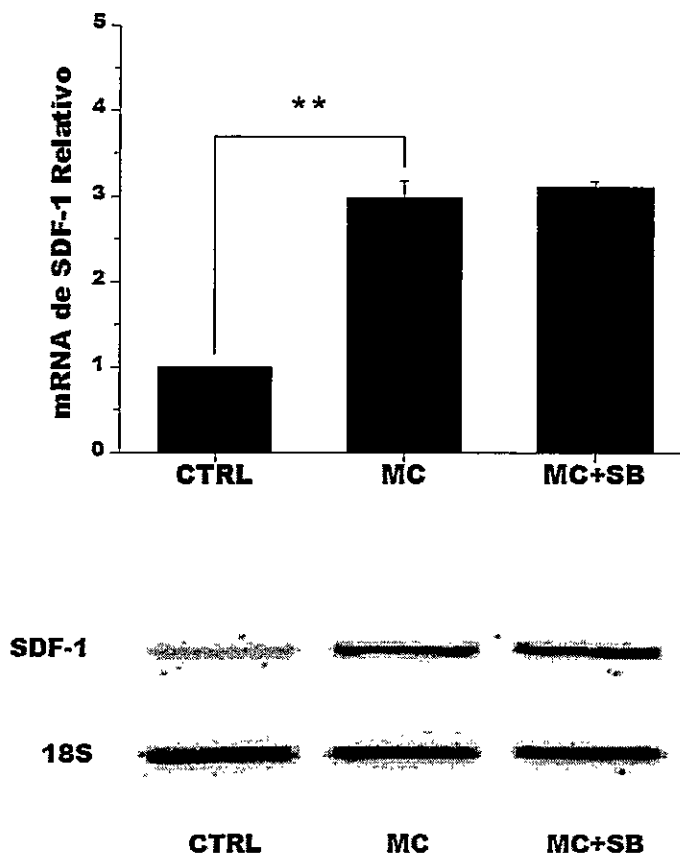


Figura 3. Efecto de factores solubles generados por células MCF-7 sobre la expresión de SDF-1 en células RMF-EG. Posible participación de TGF- β 1.

La gráfica muestra los niveles de expresión de SDF-1 de células RMF-EG cultivadas en presencia (MC) o ausencia (CTRL) de MC por células MCF-7. Como se aprecia en la Figura el MC de origen epitelial estimula significativamente la expresión de SDF-1 el que no se modifica en presencia del inhibidor del receptor de TGF- β 1. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), estímulo por MC MDA-MB-231 (MC) e inhibición del estímulo mediante previa adición de SB 431542 (MC+SB). Las diferencias significativas del estimulado (MC) con respecto al control (CTRL) y del inhibido (MC+SB) con respecto del estimulado, se representan como ** para $p < 0,01$.

En la figura 3 se observa que el medio condicionado por células MCF-7 genera un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de SDF-1 en células RMF-EG relativa a la expresión basal que no se ve afectado por la inhibición de T β RI mediante SB431542, lo que sugiere que TGF- β 1 no sería responsable del estímulo de la expresión de SDF-1 observado al adicionar MC epitelial MCF-7 en células RMF-EG.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos usando el inhibidor de T β RI, evaluamos a continuación el efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de SDF-1 en ambas líneas estromales (Figuras 4 y 5). Para evaluar este efecto utilizamos concentraciones de TGF- β 1 similares a las que podríamos encontrar en MC por células MCF-7 (Guerrero y col., 2010).

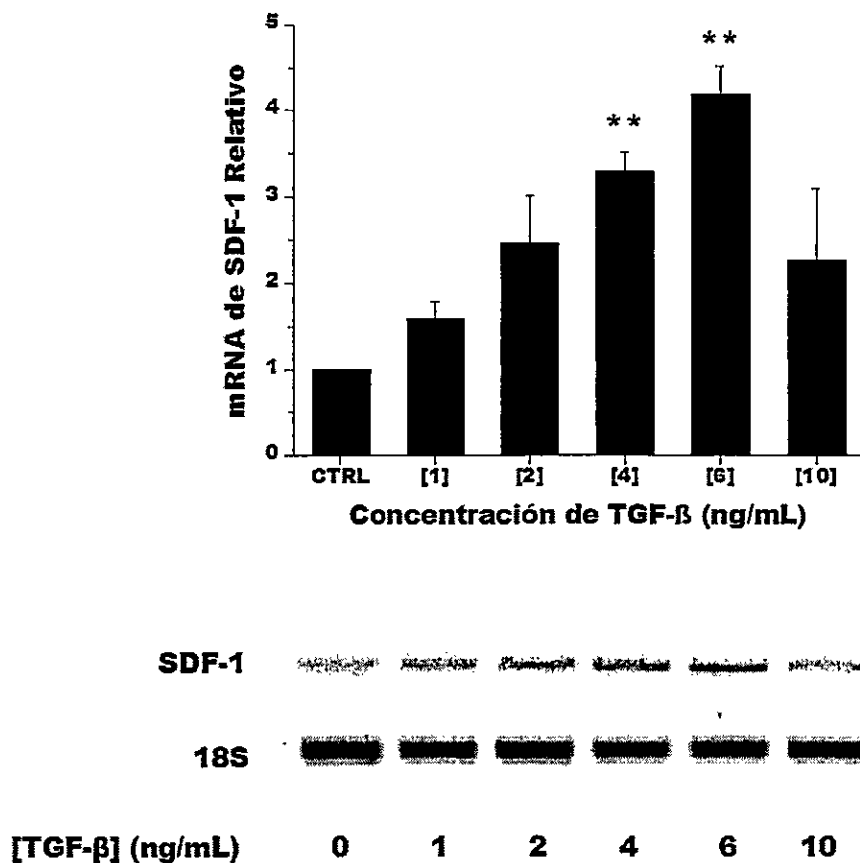


Figura 4. TGF-β1 Modula la expresión de SDF-1 en células HS-5.

La gráfica representa los cambios relativos en los niveles de expresión de mRNA de SDF-1 respecto a la expresión basal de células HS-5 estimulada por concentraciones crecientes de TGF-β1. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL) y el estímulo producido por concentraciones crecientes de TGF-β1 de 1, 2, 4, 6 y 10 ng/mL ([1], [2], [4], [6] y [10] respectivamente). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como ** para $p < 0,01$.

Los resultados de la figura 4 sugieren que expresión de SDF-1 en células HS-5 es estimulada por TGF-β1 de una manera dosis-dependiente. La concentración óptima de

factor se encuentra alrededor de los 4 a 6 ng/mL. A partir de este dato se fijó para los experimentos siguientes una concentración óptima de TGF- β 1 de 6 ng/mL.

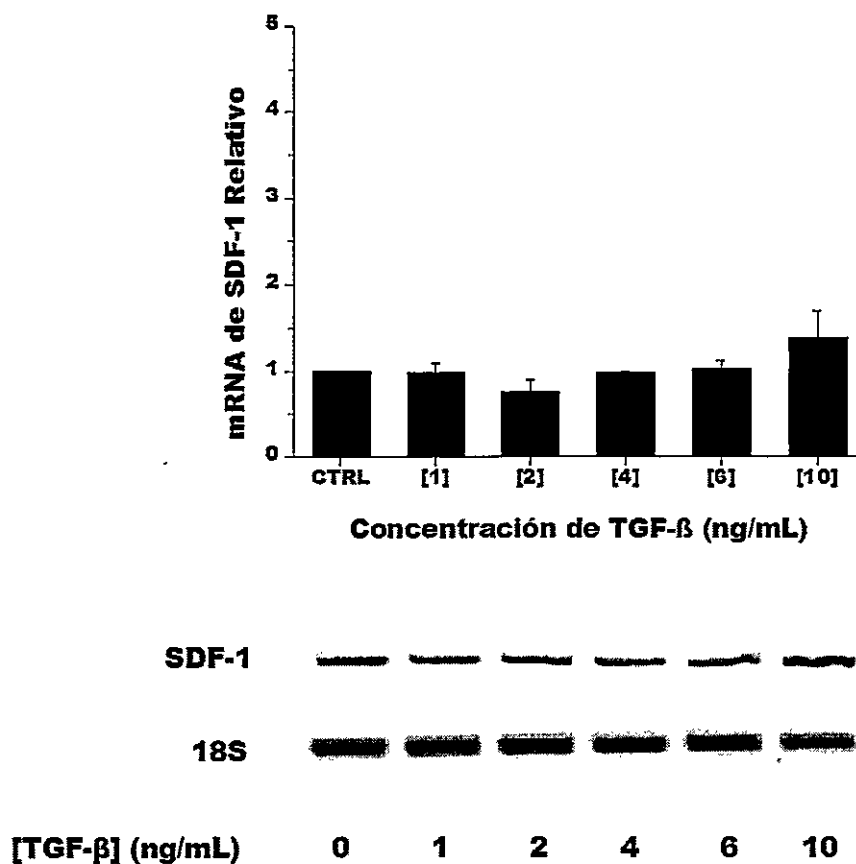


Figura 5. Efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de SDF-1 en células RMF-EG.

La gráfica representa el cambio relativo en los niveles de expresión del mRNA de SDF-1 respecto a la expresión basal de células RMF-EG (CTRL) estimulado por concentraciones crecientes de TGF- β 1. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL) y el estímulo producido por concentraciones crecientes de TGF- β 1 de 1, 2, 4, 6 y 10 ng/mL ([1], [2], [4], [6] y [10] respectivamente). No se observaron diferencias significativas con respecto al control a ninguna de las concentraciones utilizadas.

Los resultados de la figura 5 sugieren que TGF- β 1 en las mismas concentraciones en las que produce un estímulo dosis-dependiente de la expresión de SDF-1 en células estromales de médula ósea HS-5, no genera un cambio significativo del nivel basal de expresión de SDF-1 en células estromales mamarias RMF-EG. Este resultado está en línea con los resultados de la figura 3 que muestran que SB431542 (inhibidor de T β RI), no inhibe el estímulo producido por células MCF-7. Ambos resultados en conjunto sugieren que TGF- β 1 no estaría involucrado en el estímulo de la expresión de SDF-1 por factores secretados por las células epiteliales MCF-7. La ausencia de estímulo no sólo se puede explicar por una limitada capacidad de las células MCF-7 de generar el factor sino, además, por una incapacidad de la célula estromal para reaccionar al estímulo del factor.

Comparando la magnitud de los estímulos producidos por TGF- β 1 puro y el MC epitelial sobre las células HS-5, cabe destacar que el estímulo mediante el factor puro representa el doble del producido por el MC relativo al estado basal lo cual se discutirá en detalle más adelante.

Papel del tenor oxidativo sobre la expresión de CXCR4/SDF-1 en células estromales.

El equilibrio redox del microambiente tumoral es un factor clave en la estimulación de la progresión tumoral fenómeno en el que el estroma juega un papel fundamental. Para estudiar la forma como el nivel redox del estroma tumoral influye sobre la progresión de la producción de SDF-1, realizamos ensayos en los que fibroblastos estromales fueron cultivados en presencia y ausencia de moléculas que alteran su tenor oxidativo: el antioxidante genérico N-acetil-L-cisteína (NAC) y el inhibidor específico de la NADPH oxidasa, yoduro de difenileno (DPI), para luego estimular estas células con medios

condicionados por células epiteliales de acuerdo a los protocolos señalados en el punto anterior. De este modo pretendemos comparar, cómo influye el nivel oxidativo estromal en la producción de SDF-1 de células estromales con factores epiteliales. También evaluamos la influencia del equilibrio redox sobre el estímulo de TGF- β 1 puro sobre la producción de SDF-1 estromal.

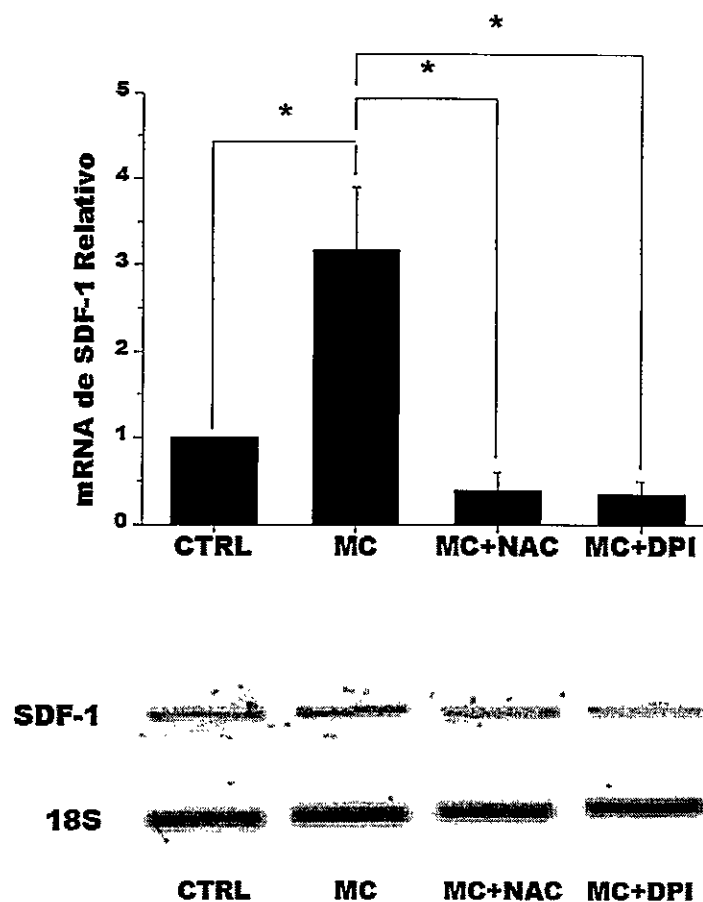


Figura 6. Efecto del cambio del nivel redox sobre el estímulo de MC por células MDA-MB-231 en la síntesis de SDF-1 en células estromales HS-5.

La gráfica representa los cambios relativos en la estimulación epitelial de los niveles de expresión de mRNA de SDF-1 respecto a la expresión basal de células HS-5 (CTRL) modulado por modificaciones en el tenor oxidativo celular. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), el estímulo producido por MC MDA-MB-231 (MC), la variación del estímulo producida al pretratar con NAC (MC+NAC) y al pretratar con DPI (MC+DPI). Las diferencias significativas del estimulado (MC) con respecto al control (CTRL) y de los inhibidos (MC+NAC y MC+DPI) con respecto al estimulado, se representan como * para $p < 0,05$.

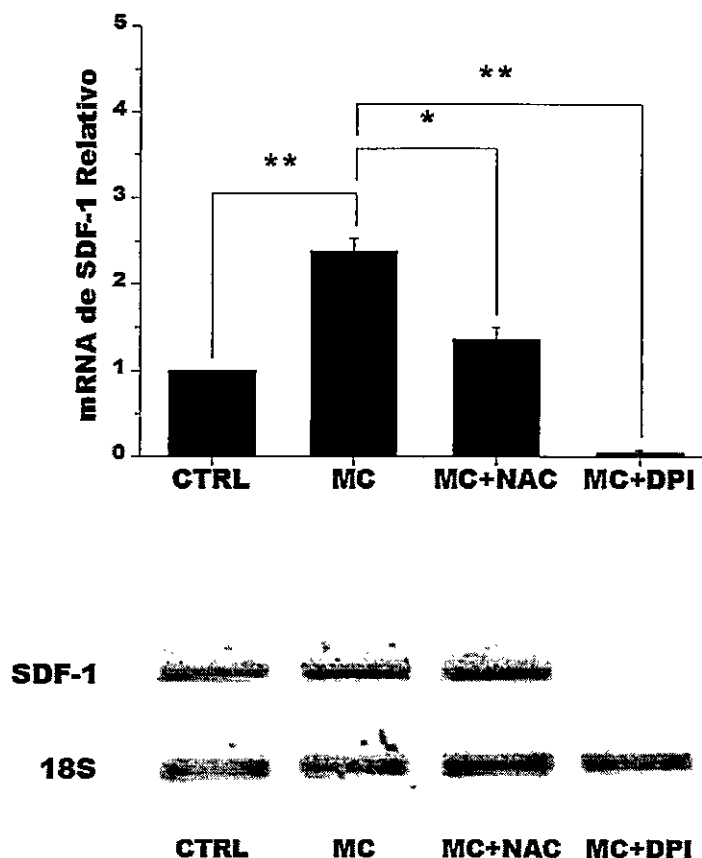


Figura 7. Modificación del estímulo epitelial presente en MC por células MCF-7 sobre la expresión de SDF-1 por cambios en el tenor oxidativo del estroma mamario (RMF-EG).

La figura representa los cambios relativos en la estimulación epitelial de los niveles de expresión de mRNA de SDF-1 respecto a la expresión basal de células RMF-EG (CTRL) modulado por modificaciones en el tenor oxidativo celular. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), el estímulo producido por MC MCF-7 (MC), la variación del estímulo producida al pretratar con NAC (MC+NAC) y al pretratar con DPI (MC+DPI). Las diferencias significativas del estimulado (MC) con respecto al control (CTRL) y de los inhibidos (MC+NAC y MC+DPI) con respecto al estimulado, se representan como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$.

En las figuras 6 y 7 se observa el efecto de las modificaciones del tenor oxidativo del estroma (células RMF-EG y HS-5) sobre el estímulo de la expresión de SDF-1 por medios condicionados de origen epitelial. Este efecto se traduce en una reducción del nivel de expresión estimulado con MC y en una inhibición casi total la expresión de SDF-1 luego del tratamiento con ambos inhibidores.

Con el propósito de evaluar si el efecto estimulador de TGF- β 1 sobre SDF-1 en células HS-5, también se ve afectado por variaciones en el estado redox de estas células estromales realizamos un experimento análogo al anterior pero utilizando TGF- β 1 como único agente estimulador.

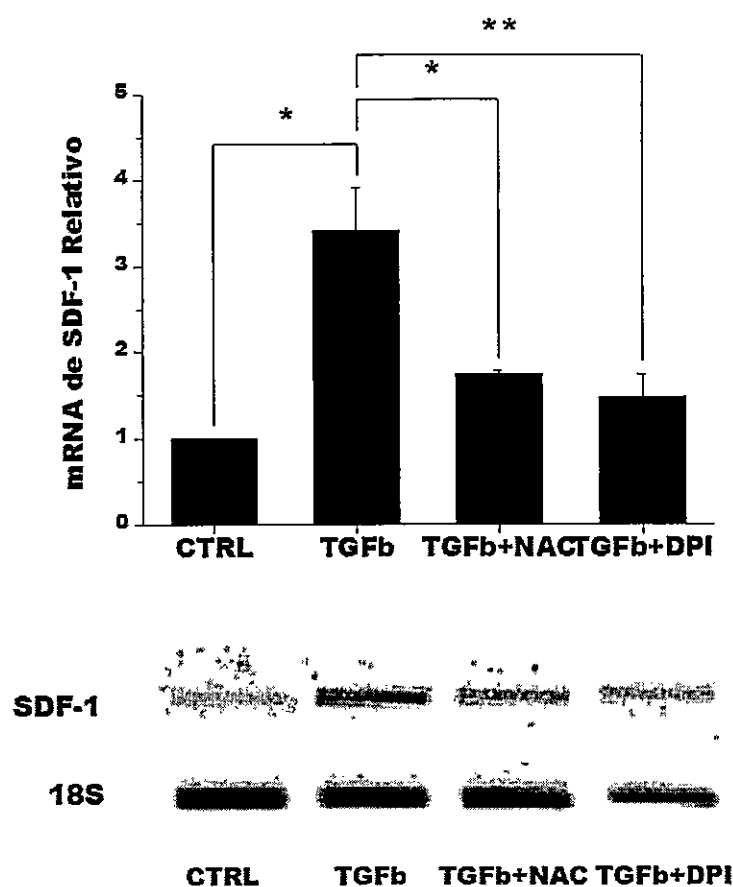


Figura 8. Efecto de la modificación del tenor oxidativo sobre la expresión de SDF1 en células HS-5 estimuladas por TGF- β 1.

La gráfica representa los cambios relativos en la expresión de SDF-1 estimulada por TGF- β 1 en células HS-5 y el efecto de modificaciones en el tenor oxidativo celular sobre la expresión de la quimioquina. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), el estímulo producido por TGF- β 1 a una concentración de 6 ng/mL (TGFb), la variación del estímulo producida al pretratar con NAC (TGFb+NAC) y al pretratar con DPI (TGFb+DPI). Las diferencias significativas del estimulado (TGFb) con respecto al control (CTRL) y de los inhibidos (TGFb+NAC y TGFb+DPI) con respecto al estimulado, se representan como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$.

Como se aprecia en la Figura 8 el estímulo de TGF- β 1 sobre la expresión de SDF-1 también es inhibido por NAC y DPI lo que permite presumir que el requerimiento redox sobre la expresión de SDF-1 es válido tanto para el estímulo del medio condicionado como para el factor puro.

Con el propósito de evaluar si los cambios generados en el ambiente redox tienen algún efecto sobre células estromales que, en nuestros ensayos, mostraron una respuesta modesta al estímulo del factor, evaluamos el efecto de DPI y NAC en células RMF-EG.

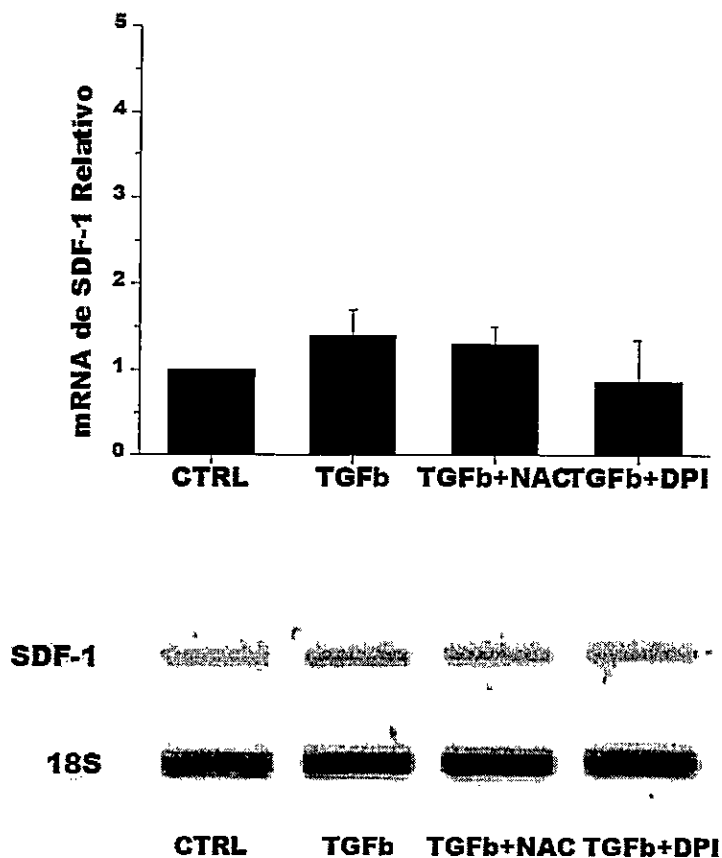


Figura 9. Efecto de la modificación del tenor oxidativo sobre la expresión de SDF1 en RMF-EG estimuladas por TGF- β 1.

La gráfica representa el cambio relativo en la expresión de SDF-1 estimulada por TGF- β 1 en células HS-5, modulado por modificaciones en el tenor oxidativo celular. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para SDF-1. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), el estímulo producido por TGF- β 1 a una concentración de 6 ng/mL (TGFb), la variación del estímulo producida al pretratar con NAC (TGFb+NAC) y al pretratar con DPI (TGFb+DPI). No se observaron diferencias significativas con respecto al control al estimular con TGF- β 1 ni con respecto a esta última al pretratar con ambos moduladores.

Como se muestra en la figura 9, ambos agentes reductores no tienen efecto sobre la expresión de SDF-1 estimulado por TGF- β 1.

Factores de origen estromal estimulan la expresión de CXCR4 en células epiteliales. Posible papel de SDF-1 y c-Met en la señalización.

La sobreexpresión de CXCR4, uno de los receptores de membrana de SDF1, es una característica común para múltiples carcinomas y constituye un indicador de malignidad ampliamente aceptado (Akiyoshi y col., 1999; Kang y col., 2003; Marchese y col., 2003; Murakami y col., 2004; Zlotnik, 2004; Mizell y col., 2009). La activación de este receptor genera un aumento en la capacidad migratoria e invasiva del carcinoma, acompañado generalmente por un aumento en su propia expresión (Muller y col., 2001). La síntesis *de novo* de este receptor es gatillada por múltiples factores. Con el propósito de caracterizar algunos de estos factores realizamos ensayos de RT-PCR para el mensajero de CXCR4 en células epiteliales que expresan niveles basales diferentes del receptor.

Con este fin, cultivamos células MCF-7, que expresan niveles bajos de CXCR4 (Muller y col., 2001), con medios condicionados por células estromales mamarias RMF-EG; y células MDA-MB-231 que expresan niveles altos de CXCR4, con medios condicionados por células estromales de médula ósea HS-5; y analizamos el curso temporal de este estímulo.

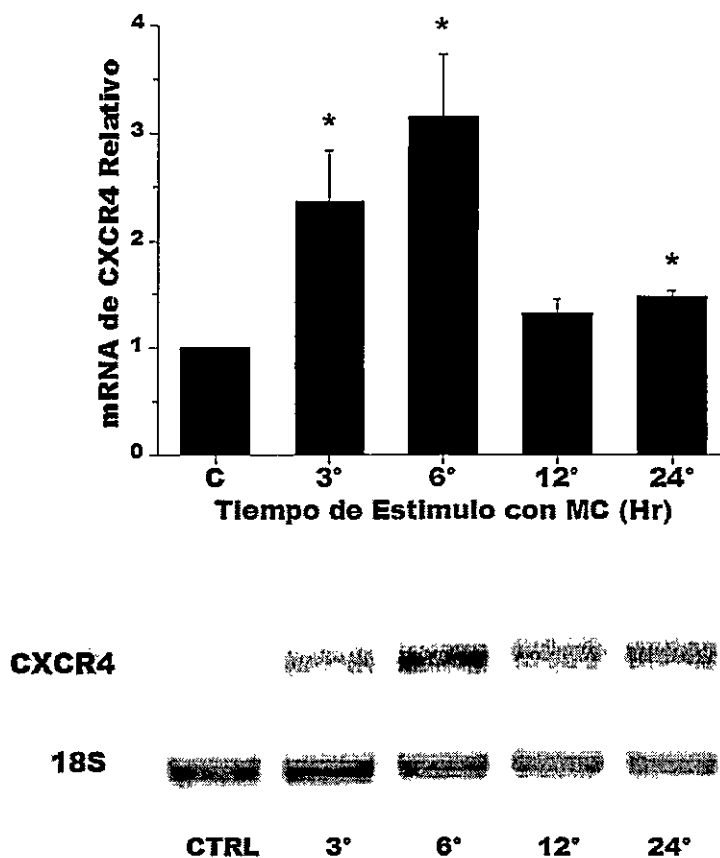


Figura 10. Expresión de CXCR4 en células MCF7 estimulada por MC RMF-EG.

En la figura se muestra una curva temporal de activación de la expresión del mensajero para CXCR4 en células epiteliales tumorales MCF-7 relativo a su expresión basal (CTRL) modulado por MC RMF-EG. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), y los tiempos de estímulo con MC RMF-EG; 3, 6, 12 y 24 hrs (3°, 6°, 12° y 24° respectivamente). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como * para $p < 0,05$.

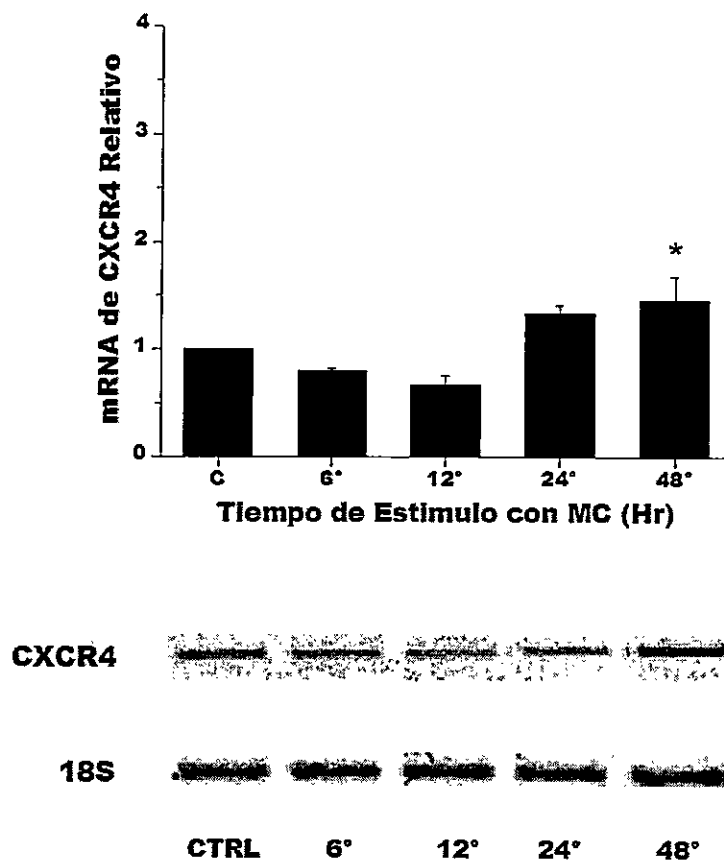


Figura 11. Expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por MC HS5.

La figura representa una curva temporal de expresión de RNA mensajero para CXCR4 en células epiteliales tumorales MDA-MB-231 relativo a su expresión basal (CTRL) modulado por MC HS-5. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), y los tiempos de estímulo con MC HS-5; 6, 12, 24 y 48 hrs (6°, 12°, 24° y 48° respectivamente). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$.

Como se aprecia en la figura 10, la expresión de CXCR4 en células MCF-7 es estimulada por el MC por células RMF-EG con un máximo de estímulo alrededor de las 6 hrs y un segundo máximo tardío a las 24 hrs. Por su parte, las células MDA-MB-231, que expresan altos niveles del receptor, al ser estimuladas por MC por células HS-5 presentan un máximo de menor magnitud a las 48 hrs (Figura 11).

En búsqueda de factores de origen estromal que estimulen la expresión de CXCR4, investigamos el efecto potencial de HGF, factor que posee una característica esencial: es generado prioritariamente por células estromales y su receptor (c-Met) es expresado predominantemente en el epitelio, vale decir, su actividad tiene un sentido vectorial. Las células estromales son capaces de producir y secretar HGF por lo que utilizamos el medio condicionado por estas células para evaluar el potencial efecto de HGF, o su ruta de señalización, en el estímulo estromal sobre la expresión de CXCR4. Con ese fin estimulamos células epiteliales mamarias con medio condicionado por células HS-5 tratadas en presencia o ausencia del inhibidor específico del receptor de HGF, c-Met, PHA665752. Alternativamente, también intentamos develar el papel que el propio ligando del receptor (SDF-1) ejerce sobre la expresión del mensajero del receptor. Utilizando AMD3100 un agonista para CXCR4.

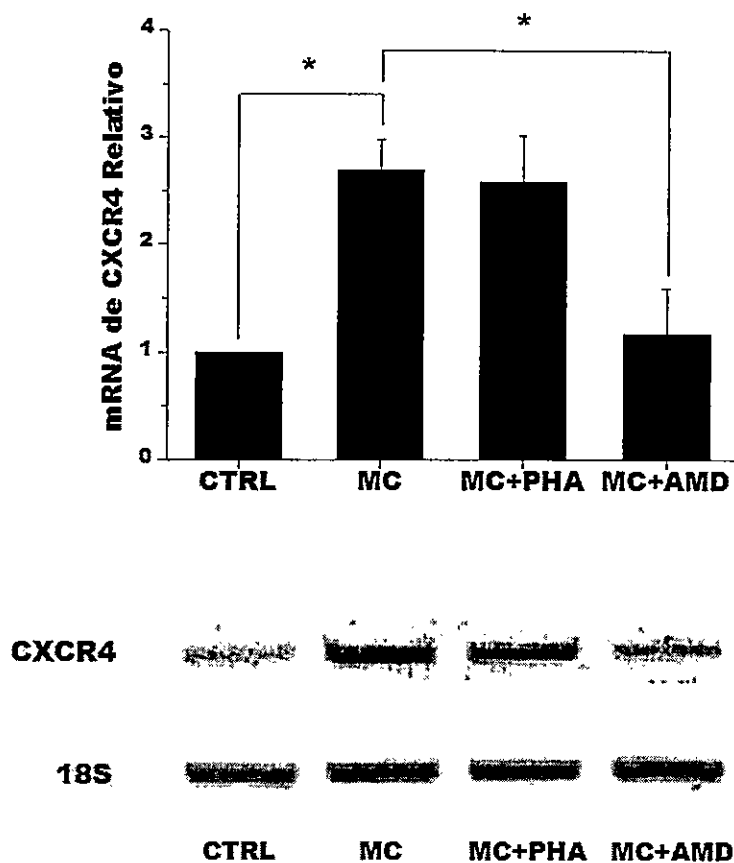


Figura 12. Efectos de la inhibición de c-Met y CXCR4 sobre la expresión de CXCR4 en células MCF-7 estimulada por MC RMF-EG.

La gráfica muestra los efectos sobre la modulación de CXCR4 en células epiteliales tumorales MCF-7 relativo a su expresión basal (CTRL) por MC RMF-EG, mediante el uso de inhibidores de c-Met y CXCR4. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), estimulado con MC RMF-EG (MC) y estimulado en presencia de los inhibidores de c-Met (MC+PHA) y CXCR4 (MC+AMD). Las diferencias significativas de los tiempos de estímulo con respecto al control (CTRL) se representan como * para $p < 0,05$.

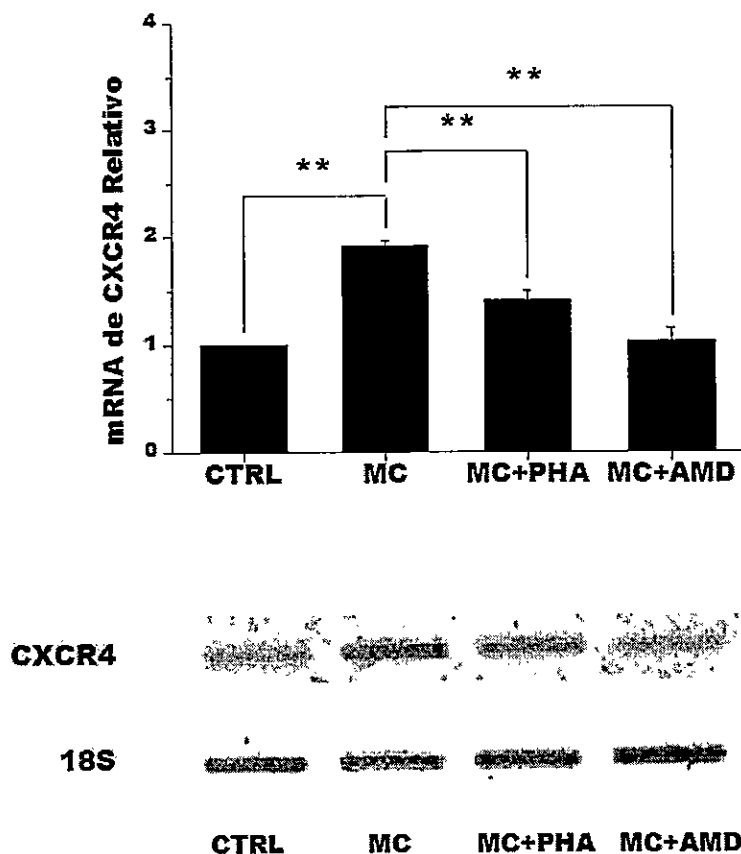


Figura 13. Efectos de la inhibición de c-Met (PHA665752) y CXCR4 (AMD3100) sobre la expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por MC HS-5.

La gráfica muestra los efectos sobre la modulación de CXCR4 en células epiteliales tumorales MDA-MB-231 relativo a su expresión basal (CTRL) por MC HS-5, mediante el uso de inhibidores de c-Met y CXCR4. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), estimulado con MC RMF-EG (MC) y estimulado en presencia de inhibidores de c-Met (MC+PHA) y CXCR4 (MC+AMD). Las diferencias significativas del estimulado (MC) con respecto al control (CTRL) y de los inhibidos (MC+PHA y MC+AMD) con respecto al estimulado, se representan como ** para $p < 0,01$.

Los resultados de las Figuras 12 y 13 muestran una marcada inhibición de la expresión de CXCR4 por su propio antagonista (AMD3100) en ambas líneas epiteliales y una inhibición significativa del estímulo del medio condicionado HS-5 por PHA665752 ($p < 0,01$) en el caso de las células MDA-MB-231. Este resultado nos indicaría que aunque la activación de CXCR4 constituye un paso importante en la síntesis *de novo* del mensajero para CXCR4 estimulada por MC estromal, en el caso del microambiente óseo, c-Met también jugaría un papel importante en la regulación de la expresión del receptor CXCR4.

Dado que la inhibición por AMD3100 afectó la expresión del receptor en ambas líneas celulares epiteliales, analizamos el papel de SDF-1, componente presente en los medios condicionados por células estromales, sobre la expresión de CXCR4. Para ello, realizamos ensayos en los que evaluamos el efecto de SDF-1 puro a distintos tiempos sobre la expresión de su receptor en ambas líneas tumorales. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 14 y 15.

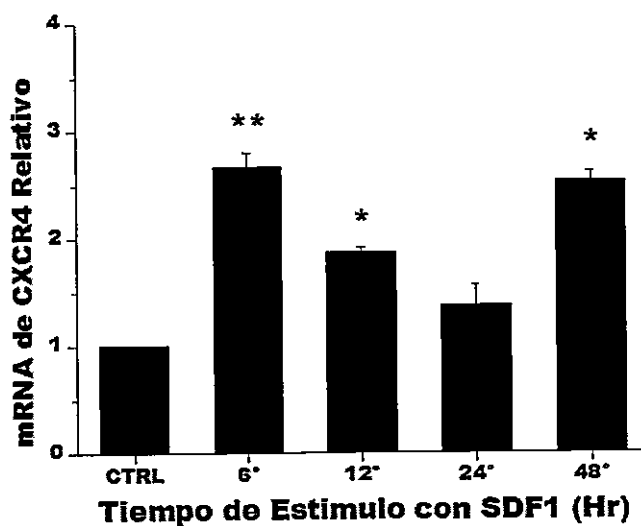


Figura 14. Expresión de CXCR4 en células MCF7 estimulada por SDF1.

La gráfica representa una curva temporal de activación de la síntesis del mensajero para CXCR4 en células epiteliales tumorales MCF-7, estimuladas con SDF-1[200 ng/mL], relativo a la expresión basal (CTRL). La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), y los tiempos de estímulo con SDF-1; 6, 12, 24 y 48 hrs (6°, 12°, 24° y 48° respectivamente). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como ** para $p < 0,01$

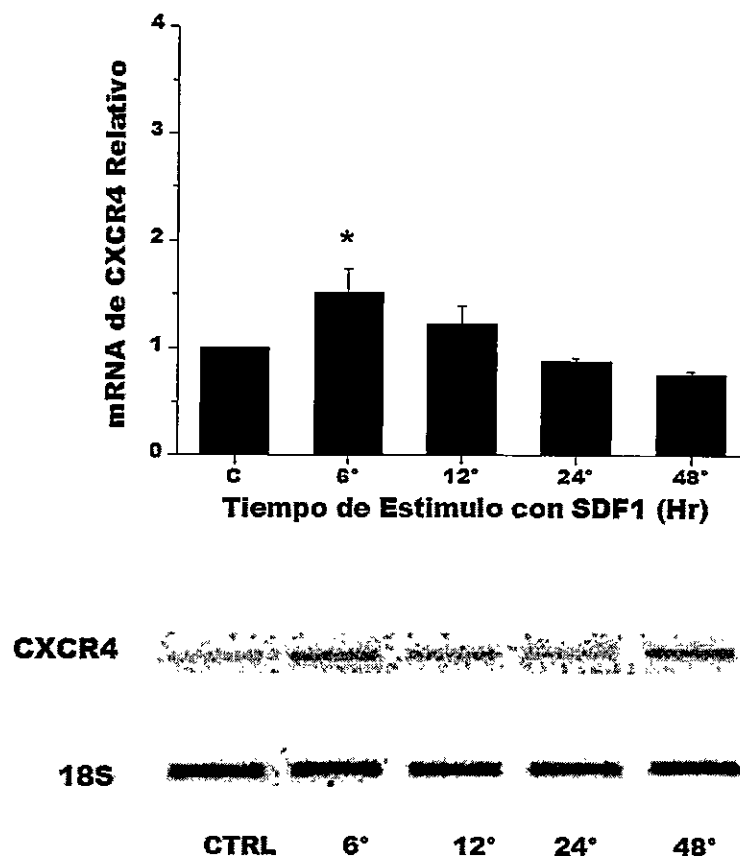


Figura 15. Expresión de CXCR4 en células MDA-MB-231 estimulada por SDF1.

En la figura se muestra una curva temporal de activación de la síntesis de mensajero CXCR4 en células de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 relativo a su expresión basal (CTRL) modulado por SDF-1[200 ng/mL]. La figura inferior muestra un resultado tipo del RT-PCR para CXCR4. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), y los tiempos de estímulo con SDF-1; 6, 12, 24 y 48 hrs (6°, 12°, 24° y 48° respectivamente). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como * para $p < 0,05$

Como se observa en las figuras 14 y 15, el factor estromal SDF-1 estimula la expresión de CXCR4 en ambas líneas celulares epiteliales y en ambos casos se observa un máximo de estímulo a las 6 hr, similar a lo observado con el estímulo por medio condicionado por células RMF-EG sobre células MCF-7. Adicionalmente, en células MCF-7 se observa un segundo pico tardío a las 48 hrs, de magnitud similar al primero, lo que sugiere un segundo ciclo de activación de la expresión de CXCR4 mediada por SDF-1 en células con niveles basales bajos de expresión de CXCR4.

Efectos de los factores de origen estromal sobre la activación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2 en células epiteliales MCF-7.

Las cascadas de señalización de las MAPK están envueltas en la regulación de la proliferación celular y la desregulación de estas vías ha sido asociada con una amplia gama de cánceres (Balmano y Cook, 2009), particularmente la vía MAPK/ERK ha sido objeto de estudio para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer (Roberts y Der, 2007). Por otra parte SDF-1 ha sido caracterizado por la estimulación de la proliferación celular actuando a través de la ruta MAPK/ERK (Begley y col., 2005; Wang y col., 2005). Con el objetivo de evaluar el papel que juegan los factores solubles estromales HGF y SDF-1 sobre la activación de esta vía en células epiteliales de mama, cultivamos células epiteliales MCF-7 con medios condicionados por células estromales RMF-EG por 24 hrs en presencia y ausencia de inhibidores específicos para los receptores de SDF-1 y HGF.

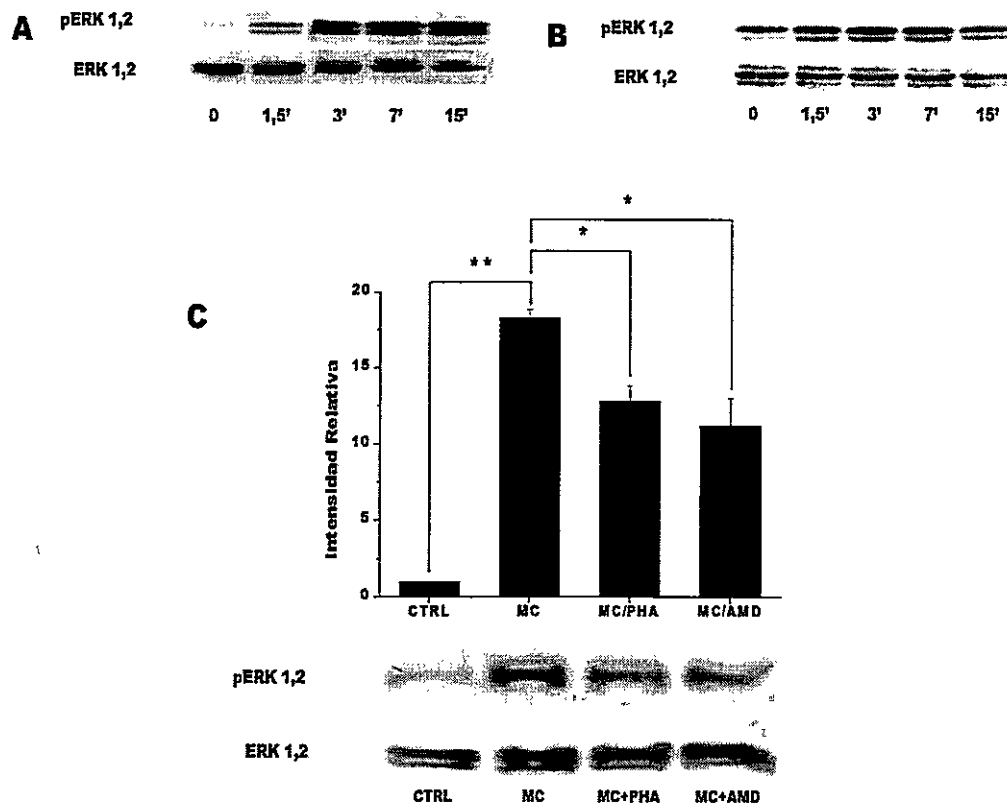


Figura 16. Activación de la ruta MAPK/ERK1,2 en células epiteliales MCF-7 mediada por factores solubles generados por células RMF-EG. Posible participación de HGF y SDF-1. La figura muestra el efecto del MC RMF-EG sobre la activación de la vía MAPK/ERK1,2 en células MCF-7 y el efecto de los inhibidores de c-Met y CXCR4 sobre esta misma activación. Los resultados son referidos a la actividad basal (CTRL). En la figura A muestra los cambios en la fosforilación de ERK1,2 a distintos tiempos de exposición a MC RMF-EG, los carriles de izquierda a derecha corresponden a la actividad basal (0) y los tiempos de estímulo (1,5, 3, 7 y 15 min). La figura B muestra los cambios en la fosforilación de ERK1,2 a distintos tiempos de exposición a SDF-1 puro (200 ng/mL), los carriles de izquierda a derecha corresponden a la actividad basal (0) y los tiempos de estímulo (1,5, 3, 7 y 15 min). La figura C en la parte superior se muestra la modulación de la activación de ERK1,2 producida por los inhibidores de c-Met y CXCR4, en la parte inferior se muestra un resultado tipo del WB para pERK1,2. Los carriles de izquierda a derecha corresponden a la expresión basal (CTRL), estimulado con MC RMF-EG y estimulado en presencia de inhibidores de c-Met (MC+PHA) y CXCR4 (MC+AMD). Las diferencias significativas con respecto al control se representan como ** para $p < 0,01$ y con respecto al estimulado como * para $p < 0,05$.

En la figura 16 se observa que el medio condicionado por células RMF-EG produce un significativo aumento a los 6 minutos en la fosforilación de ERK1/2 respecto a los niveles basales en células MCF-7 y que se observa un estímulo similar al utilizar SDF-1 puro aunque en este último caso es mucho menos sostenido que en el caso del estímulo de MC. El estímulo del MC es inhibido significativamente mediante adición previa de PHA665752 y AMD3100 lo que sugiere que los factores HGF y SDF-1 presentes en el MC estromal serían en parte responsables de la activación de la vía MAPK/ERK en células epiteliales MCF-7, a través de la unión a sus receptores.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo de tesis permiten sostener que en el proceso carcinogénico mamario humano se produce un activo diálogo funcional entre factores solubles producidos tanto por las células epiteliales como las estromales.

En la búsqueda de un papel funcional para las moléculas de señalización generadas por ambos tipos celulares, intentamos identificar factores que fueran producidos predominantemente por un tipo celular y que afectaran el funcionamiento del otro. Tal creemos es el caso de TGF- β 1 que en tumores mamarios humanos aparece asociado fundamentalmente al compartimento epitelial (Guerrero y col., 2010) y el de HGF y SDF-1 que son preferentemente producidos por el estroma (Orimo y Weinberg, 2006).

En ese contexto, en el presente trabajo utilizamos medios condicionados por líneas celulares representativas de dos estados diferentes de malignización epitelial (MCF-7, línea débilmente invasiva y MDA-MB-231 de alta invasividad) y de dos estromas de tejidos susceptibles de invasión: la mama, representada por los fibroblastos RMF-EG y la médula ósea, representada por la línea celular HS-5. Con el propósito de representar, de una manera aproximada, los escenarios tanto local como metastásico, propusimos en este trabajo establecer un modelo de interacción celular que reflejaran una invasión local (células MCF-7 / RMF-EG) y una invasión a distancia - predominantemente a la médula ósea- representada por las líneas MDA-MB-231 / HS-5.

A partir de los resultados obtenidos dentro de este marco, podemos observar que el aumento en la expresión de SDF-1 por el estímulo de MC epitelial sobre ambas líneas celulares estromales, representan magnitudes similares con respecto a sus estados

basales aunque sólo en el caso de las células HS-5 de estroma óseo el estímulo parece ser dependiente de TGF- β 1 presente en el medio condicionado por células epiteliales malignas. (Figuras 2 y 3). Esto se pudo corroborar al observar el estímulo en la expresión de SDF-1 producido por el factor puro en células estromales -utilizado concentraciones que podríamos encontrar en el medio condicionando epitelial (entre 1y 10 ng/mL) (Guerrero y col., 2010). En este caso sólo las células HS-5 mostraron una respuesta estadísticamente significativa al estímulo. Por el contrario, las células RMF-EG, que provienen de estroma mamario no muestran un estímulo apreciable a la expresión de SDF-1 a ninguna de las concentraciones utilizadas de TGF- β 1.

Estos resultados permiten sugerir que la célula francamente invasiva y, de acuerdo a nuestros datos previos, activa productora de TGF- β 1, encuentra en el estroma secundario -óseo- la contrapartida más eficiente para la producción de SDF-1, quimioquina de reconocido papel en el proceso metastático (Muller y col., 2001). Este dato podría servir como argumento a favor de la reconocida propensión de la célula mamaria invasiva de colonizar el tejido óseo (Costa y Major, 2009). Resulta también valioso comentar que las concentraciones a las que TGF- β 1 muestra mayor eficiencia en la expresión de SDF-1 coinciden con concentraciones cercanas a las que es posible encontrar en medios condicionados por células MDA-MB-231 (Guerrero y col., 2010)

También pudimos observar que el estímulo a la expresión de SDF-1 estromal por MC epiteliales es en ambas líneas estromales dependiente del tenor oxidativo intracelular dado que su expresión resulta inhibida al pre-tratar las células estromales tanto con una molécula antioxidante genérica (NAC) como con un inhibidor específico para NADPH oxidasa (DPI) (Figuras 6 y 7). Un fenómeno similar se pudo observar con el estímulo de TGF- β 1 en el caso de las células HS-5 (Figura 8). Estos resultados están en concordancia con datos obtenidos en nuestro laboratorio que reafirman la

dependencia del tenor oxidativo estromal sobre la invasividad epitelial. Utilizando un sistema de co-cultivo en el que la migración de células MCF-7 es estimulada por células RMF-EG, identificamos que el pre-tratamiento de esas células estromales con DPI inhibía el efecto estimulador estromal (Tobar y col., 2010). Los datos generados en este trabajo de tesis nos permiten proponer que el estímulo a la migración epitelial observado en el sistema de co-cultivo antes mencionado, podría estar representado por SDF-1 estromal generado por el estímulo de TGF- β 1 epitelial en un ambiente oxidativo pro-oxidante. Esta situación se observa en forma mucho más nítida en el caso del par epitelio/estroma representado por las células MDA MB-231/HS-5.

Con el propósito de identificar si la célula epitelial es capaz de montar una respuesta a la señal del SDF-1 estromal que permita estimular su conducta invasiva, investigamos los mecanismos que modulan la expresión del receptor CXCR4 epitelial al estímulo estromal. Para ello, estudiamos el efecto de factores solubles secretados por células estromales (RMF-EG y HS-5) que creemos regulan la expresión de CXCR4 en células epiteliales mamarias (Figuras 10 y 11). Los resultados muestran que CXCR4 presente en las células MCF-7, que expresan niveles bajos del receptor y poseen un potencial migratorio inferior a las MDA-MB-231 (Muller y col., 2001), es estimulado en su expresión como mRNA, por el MC por células RMF-EG en mayor magnitud que lo que el MC por células HS-5 lo hace sobre el mRNA de CXCR4 en células el MDA-MB-231. Similares resultados obtuvimos al tratar las células epiteliales con SDF-1, observándose un mayor estímulo (sobre la expresión basal) en las células MCF-7. Estos datos nos permiten suponer que las células débilmente invasivas tienen un mayor potencial de aumento de la expresión de CXCR4, probablemente, porque parte de un nivel basal más bajo. Por el contrario, las células más invasivas probablemente

ejercen su acción provocando un aumento en la expresión de SDF-1 estromal, sin modificar la expresión de su propio receptor.

En la búsqueda de los mecanismos de señalización que regulan la expresión de mRNA para CXCR4, identificamos que su propio ligando SDF-1 (en ambas líneas epiteliales) y el factor de crecimiento de hepatocitos, HGF (en el caso de las células MDA-MB-231) constituyen activos reguladores de la expresión del mensajero para el receptor. Estos datos nos permiten proponer la existencia de un circuito de retroalimentación iniciado por la capacidad del TGF- β 1 epitelial de inducir la expresión de SDF-1 estromal y el papel de éste último de estimular la expresión de su propio receptor, CXCR4. La célula epitelial que expresa ahora niveles altos de receptor, podría, de este modo, iniciar un proceso de malignización que, con toda probabilidad, la induzca a producir y, eventualmente a secretar, niveles crecientes de TGF- β 1 que reiniciaría el circuito.

Finalmente, el posible papel de HGF en el estímulo estromal óseo sobre la actividad del eje SDF-1/CXCR4 puede asumir variados significados. Por una parte, en células invasivas se ha podido sustentar que HGF es también capaz de estimular la expresión de CXCR4 en células de glioma a través de la activación de la ruta NF- κ B (Esencay y col., 2010). Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que tanto SDF-1 como MC por células RMF-EG estimulan la expresión de CXCR4 a través de la activación de la vía NF- κ B es capaz de utilizar la vía de señalización de HGF fosforilando el receptor c-Met (datos no mostrados).

Finalmente, la evaluación de la activación de la ruta MAPK/ERK1,2 por el MC RMF-EG y su inhibición por AMD3100 y PHA665752 mostrada en la Figura 16 nos permite sugerir que muy probablemente SDF-1 y HGF son componentes normales del MC y ejercen un papel importante en la señalización ya sea en forma autónoma o complementaria. Estos descubrimientos están en línea con las activaciones de la ruta

MAPK/ERK1,2 producidas por estos factores estromales encontradas en otras líneas tumorales (Lawrence y col., 2008; Balmano y Cook, 2009), como regulador de la proliferación celular e invasividad (Roberts y Der, 2007).

Tomados en su conjunto nuestros resultados revelan el papel del estroma mamario como el óseo en la producción de factores específicos que modulan la adquisición de propiedades invasivas de células epiteliales. Una parte importante de esta interacción se manifiesta en el establecimiento de un eje de comunicación SDF-1/CXCR4, en el que el equilibrio redox del microambiente tumoral juega un papel determinante en la mantención de las propiedades que confieren malignidad.

CONCLUSIONES

- Las células estromales de los microambientes tumorales mamario y de médula ósea son sensibles al estímulo de factores secretados por células epiteliales lo que se manifiesta en un aumento en la expresión de la quimioquina de origen estromal SDF-1. Este estímulo parece depender en forma importante del equilibrio redox de la célula estromal y de TGF β 1 producido por las células epiteliales.
- El receptor epitelial para SDF-1, conocido como CXCR4, pareciera ser regulado por su contraparte estromal lo que se expresa por el aumento de la expresión de su mRNA bajo el estímulo de factores solubles generados por las células estromales y por HGF y SDF-1, factores de crecimiento producidos por el estroma mamario.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyoshi, S. Inoue, H. Hanai, J. Kusanagi, K. Nemoto, N. Miyazono, K. y Kawabata, M. 1999. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem.* 274: 35269-77.
- Askari, A. T. Unzek, S. Popovic, Z. B. Goldman, C. K. Forudi, F. Kiedrowski, M. Rovner, A. Ellis, S. G. Thomas, J. D. DiCorleto, P. E. Topol, E. J. y Penn, M. S. 2003. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 362: 697-703.
- Bagloli, C. J. Ray, D. M. Bernstein, S. H. Feldon, S. E. Smith, T. J. Sime, P. J. y Phipps, R. P. 2006. More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol Invest.* 35: 297-325.
- Balkwill, F. Charles, K. A. y Mantovani, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 7: 211-7.
- Balmano, K. y Cook, S. J. 2009. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 16: 368-77.
- Beacham, D. A. y Cukierman, E. 2005. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 15: 329-41.
- Begley, L. A. MacDonald, J. W. Day, M. L. y Macoska, J. A. 2007. CXCL12 activates a robust transcriptional response in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem.* 282: 26767-74.
- Begley, L. Monteleon, C. Shah, R. B. Macdonald, J. W. y Macoska, J. A. 2005. CXCL12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell.* 4: 291-8.
- Bhowmick, N. A. Chytil, A. Plieth, D. Gorska, A. E. Dumont, N. Shappell, S. Washington, M. K. Neilson, E. G. y Moses, H. L. 2004. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science.* 303: 848-51.
- Bhowmick, N. A. y Moses, H. L. 2005. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev.* 15: 97-101.
- Bhowmick, N. A. Neilson, E. G. y Moses, H. L. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432: 332-7.
- Bissell, M. J. y Radisky, D. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 1: 46-54.
- Boonstra, J. Rijken, P. Humbel, B. Cremers, F. Verkleij, A. y van Bergen en Henegouwen, P. 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int.* 19: 413-30.

Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120: 513-22.

Castellone, M. D. Guarino, V. De Falco, V. Carlomagno, F. Basolo, F. Faviana, P. Kruhoffer, M. Orntoft, T. Russell, J. P. Rothstein, J. L. Fusco, A. Santoro, M. y Melillo, R. M. 2004. Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 23: 5958-67.

Cobleigh, M. A. Vogel, C. L. Tripathy, D. Robert, N. J. Scholl, S. Fehrenbacher, L. Wolter, J. M. Paton, V. Shak, S. Lieberman, G. y Slamon, D. J. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 17: 2639-48.

Costa, L. y Major, P. P. 2009. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat Clin Pract Oncol*. 6: 163-74.

Coussens, L. M. y Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-7.

Chen, Y. Stamatoyannopoulos, G. y Song, C. Z. 2003. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res*. 63: 4801-4.

Cheng, N. Bhowmick, N. A. Chytil, A. Gorksa, A. E. Brown, K. A. Muraoka, R. Arteaga, C. L. Neilson, E. G. Hayward, S. W. y Moses, H. L. 2005. Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks. *Oncogene*. 24: 5053-68.

de Visser, K. E. Eichten, A. y Coussens, L. M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 6: 24-37.

Dvorak, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315: 1650-9.

Eblen, S. T. Slack-Davis, J. K. Tarcsafalvi, A. Parsons, J. T. Weber, M. J. y Catling, A. D. 2004. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol*. 24: 2308-17.

Egeblad, M. Littlepage, L. E. y Werb, Z. 2005. The fibroblastic coconspirator in cancer progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 70: 383-8.

Esencay, M. Newcomb, E. W. y Zagzag, D. 2010. HGF upregulates CXCR4 expression in gliomas via NF-kappaB: implications for glioma cell migration. *J Neurooncol*. 99: 33-40.

- Fata, J. E. Mori, H. Ewald, A. J. Zhang, H. Yao, E. Werb, Z. y Bissell, M. J. 2007. The MAPK(ERK-1,2) pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGFalpha and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Dev Biol.* 306: 193-207.
- Filardo, E. J. Quinn, J. A. Bland, K. I. y Frackelton, A. R., Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 14: 1649-60.
- Guerrero, J. Tobar, N. Caceres, M. Espinoza, L. Escobar, P. Dotor, J. Smith, P. C. y Martinez, J. 2010. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF-beta1 and TNF-alpha. *Breast Cancer Res Treat.* 119: 497-508.
- Hartmann, T. N. Burger, J. A. Glodek, A. Fujii, N. y Burger, M. 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene.* 24: 4462-71.
- Helbig, G. Christopherson, K. W., 2nd Bhat-Nakshatri, P. Kumar, S. Kishimoto, H. Miller, K. D. Broxmeyer, H. E. y Nakshatri, H. 2003. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem.* 278: 21631-8.
- Heldin, C. H. Miyazono, K. y ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390: 465-71.
- Isik, N. Hereld, D. y Jin, T. 2008. Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS One.* 3: e3424.
- Jacobs, T. W. Byrne, C. Colditz, G. Connolly, J. L. y Schnitt, S. J. 1999. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 340: 430-6.
- Joslin, E. J. Opresko, L. K. Wells, A. Wiley, H. S. y Lauffenburger, D. A. 2007. EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signaling from autocrine stimulation. *J Cell Sci.* 120: 3688-99.
- Kamata, T. 2009. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci.* 100: 1382-8.
- Kang, Y. Siegel, P. M. Shu, W. Drobnjak, M. Kakonen, S. M. Cordon-Cardo, C. Guise, T. A. y Massague, J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 3: 537-49.
- Koizumi, K. Hojo, S. Akashi, T. Yasumoto, K. y Saiki, I. 2007. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 98: 1652-8.

Krishna, M. y Narang, H. 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 65: 3525-44.

Kumar, B. Koul, S. Khandrika, L. Meacham, R. B. y Koul, H. K. 2008. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* 68: 1777-85.

Kuperwasser, C. Chavarria, T. Wu, M. Magrane, G. Gray, J. W. Carey, L. Richardson, A. y Weinberg, R. A. 2004. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 4966-71.

Lambeth, J. D. 2007. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med.* 43: 332-47.

Lapteva, N. Yang, A. G. Sanders, D. E. Strube, R. W. y Chen, S. Y. 2005. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther.* 12: 84-9.

Lawrence, M. C. Jivan, A. Shao, C. Duan, L. Goad, D. Zaganjor, E. Osborne, J. McGlynn, K. Stippec, S. Earnest, S. Chen, W. y Cobb, M. H. 2008. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res.* 18: 436-42.

Liang, Z. Wu, T. Lou, H. Yu, X. Taichman, R. S. Lau, S. K. Nie, S. Umbreit, J. y Shim, H. 2004. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* 64: 4302-8.

Liang, Z. Yoon, Y. Votaw, J. Goodman, M. M. Williams, L. y Shim, H. 2005. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 65: 967-71.

Liochev, S. I. y Fridovich, I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med.* 42: 1465-9.

Liotta, L. A. y Kohn, E. C. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 411: 375-9.

Liu, Z. X. Yu, C. F. Nickel, C. Thomas, S. y Cantley, L. G. 2002. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem.* 277: 10452-8.

Maksym, R. B. Tarnowski, M. Grymula, K. Tarnowska, J. Wysoczynski, M. Liu, R. Czerny, B. Ratajczak, J. Kucia, M. y Ratajczak, M. Z. 2009. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol.* 625: 31-40.

Marchese, A. Chen, C. Kim, Y. M. y Benovic, J. L. 2003. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci.* 28: 369-76.

Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1: 169-78.

Massague, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 134: 215-30.

- May, L. T. y Hill, S. J. 2008. ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 2013-7.
- Micke, P. y Ostman, A. 2005. Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 9: 1217-33.
- Miyazawa, K. Shinozaki, M. Hara, T. Furuya, T. y Miyazono, K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells.* 7: 1191-204.
- Mizell, J. Smith, M. Li, B. D. Ampil, F. y Chu, Q. D. 2009. Overexpression of CXCR4 in primary tumor of patients with HER-2 negative breast cancer was predictive of a poor disease-free survival: a validation study. *Ann Surg Oncol.* 16: 2711-6.
- Mueller, M. M. y Fusenig, N. E. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4: 839-49.
- Muller, A. Homey, B. Soto, H. Ge, N. Catron, D. Buchanan, M. E. McClanahan, T. Murphy, E. Yuan, W. Wagner, S. N. Barrera, J. L. Mohar, A. Verastegui, E. y Zlotnik, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410: 50-6.
- Murakami, T. Cardones, A. R. y Hwang, S. T. 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci.* 36: 71-8.
- Navolanic, P. M. Steelman, L. S. y McCubrey, J. A. 2003. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review). *Int J Oncol.* 22: 237-52.
- Nguyen, D. H. Webb, D. J. Catling, A. D. Song, Q. Dhakephalkar, A. Weber, M. J. Ravichandran, K. S. y Gonias, S. L. 2000. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells. *J Biol Chem.* 275: 19382-8.
- Nishihara, A. Hanai, J. I. Okamoto, N. Yanagisawa, J. Kato, S. Miyazono, K. y Kawabata, M. 1998. Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta. *Genes Cells.* 3: 613-23.
- Olumi, A. F. Grossfeld, G. D. Hayward, S. W. Carroll, P. R. Tlsty, T. D. y Cunha, G. R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 59: 5002-11.
- Orimo, A. Gupta, P. B. Sgroi, D. C. Arenzana-Seisdedos, F. Delaunay, T. Naeem, R. Carey, V. J. Richardson, A. L. y Weinberg, R. A. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 121: 335-48.

- Orimo, A. y Weinberg, R. A. 2006. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 5: 1597-601.
- Pages, G. Milanini, J. Richard, D. E. Berra, E. Gothie, E. Vinals, F. y Pouyssegur, J. 2000. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci*. 902: 187-200.
- Paszek, M. J. Zahir, N. Johnson, K. R. Lakins, J. N. Rozenberg, G. I. Gefen, A. Reinhart-King, C. A. Margulies, S. S. Dembo, M. Boettiger, D. Hammer, D. A. y Weaver, V. M. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 8: 241-54.
- Pearson, G. Robinson, F. Beers Gibson, T. Xu, B. E. Karandikar, M. Berman, K. y Cobb, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 22: 153-83.
- Price, D. J. Avraham, S. Feuerstein, J. Fu, Y. y Avraham, H. K. 2002. The invasive phenotype in HMT-3522 cells requires increased EGF receptor signaling through both PI 3-kinase and ERK 1,2 pathways. *Cell Commun Adhes*. 9: 87-102.
- Proia, D. A. y Kuperwasser, C. 2005. Stroma: tumor agonist or antagonist. *Cell Cycle*. 4: 1022-5.
- Ramos, J. W. 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 2707-19.
- Roberts, P. J. y Der, C. J. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 26: 3291-310.
- Rossi, D. y Zlotnik, A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 18: 217-42.
- Santen, R. J. Song, R. X. McPherson, R. Kumar, R. Adam, L. Jeng, M. H. y Yue, W. 2002. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80: 239-56.
- Sappino, A. P. Skalli, O. Jackson, B. Schurch, W. y Gabbiani, G. 1988. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer*. 41: 707-12.
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103: 211-25.
- Schober, A. Knarren, S. Lietz, M. Lin, E. A. y Weber, C. 2003. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 108: 2491-7.
- Sengupta, S. Schiff, R. y Katzenellenbogen, B. S. 2009. Post-transcriptional regulation of chemokine receptor CXCR4 by estrogen in HER2 overexpressing, estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 117: 243-51.

- Serini, G. y Gabbiani, G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 250: 273-83.
- Smith, M. C. Luker, K. E. Garbow, J. R. Prior, J. L. Jackson, E. Piwnica-Worms, D. y Luker, G. D. 2004. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 64: 8604-12.
- Song, R. X. Zhang, Z. Chen, Y. Bao, Y. y Santen, R. J. 2007. Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 148: 4091-101.
- Tan, C. T. Chu, C. Y. Lu, Y. C. Chang, C. C. Lin, B. R. Wu, H. H. Liu, H. L. Cha, S. T. Prakash, E. Ko, J. Y. y Kuo, M. L. 2008. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis.* 29: 1519-27.
- Timme, T. L. Truong, L. D. Merz, V. W. Krebs, T. Kadmon, D. Flanders, K. C. Park, S. H. y Thompson, T. C. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology.* 134: 1039-45.
- Tlsty, T. D. 2001. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol.* 11: 97-104.
- Tobar, N. Caceres, M. Santibanez, J. F. Smith, P. C. y Martinez, J. 2008. RAC1 activity and intracellular ROS modulate the migratory potential of MCF-7 cells through a NADPH oxidase and NFkappaB-dependent mechanism. *Cancer Lett.* 267: 125-32.
- Tobar, N. Guerrero, J. Smith, P. C. y Martinez, J. 2010. NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration. *Brit Journal of Cancer.* (in press):
- Wang, J. Sun, Y. Song, W. Nor, J. E. Wang, C. Y. y Taichman, R. S. 2005. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal.* 17: 1578-92.
- Wang, X. y Tournier, C. 2006. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal.* 18: 753-60.
- World Health Organization. 2009. World health statistics. Geneva, Switzerland. World Health Organization. v.
- Xie, Y. Wolff, D. W. Wei, T. Wang, B. Deng, C. Kirui, J. K. Jiang, H. Qin, J. Abel, P. W. y Tu, Y. 2009. Breast cancer migration and invasion depend on proteasome degradation of regulator of G-protein signaling 4. *Cancer Res.* 69: 5743-51.
- Zlotnik, A. 2004. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol.* 14: 181-5.