



Universidad de Chile.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Participación de NAD(P)H Oxidasa4 y Quinasa c-Jun N-Terminal en la diferenciación miofibroblástica de fibroblastos mamarios humanos en respuesta al Factor de Crecimiento Transformante- β 1.

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

MARCELA ALEJANDRA TOYOS RIERA

Director:

Prof. Jorge Martínez

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Instituto de Nutrición y Tecnologías de los Alimentos

Universidad de Chile

Patrocinante:

Dr. Mario Chiong

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2013

Esta memoria de título fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1080196

Agradecimientos.

Quiero agradecer en primer lugar a los miembros de mi comisión, Dra. Lorena García, Dr. Guillermo Díaz y Dr. Mario Chiong por todo el apoyo que me han entregado. No sólo por la constructiva discusión que ayudó a mejorar este trabajo, sino también por su excelente disposición y preocupación por mi desarrollo profesional. Quiero agradecer a todos mis profesores, partiendo desde mi educación básica y en especial a los de la Universidad, por dedicarse incansablemente a la docencia, por entregar herramientas y oportunidades a los que quieren crecer y convertirse en profesionales.

Quiero agradecer a mi profesor guía Jorge Martínez, por aceptarme en su laboratorio, entregarme su cariño, confianza, tiempo y las herramientas durante este proceso de crecimiento como científica. A todos los que forman parte del laboratorio de Biología Celular del INTA, particularmente a Nataly Fuentes por ser un apoyo constante dentro del laboratorio y por su paciencia. Quiero agradecer muy especialmente a Nicolás Tobar que estuvo día a día conmigo en el laboratorio. Gracias por entregarme todo tu conocimiento y experiencia, por motivarme y orientarme todos los días. Gracias por transformarte en un gran amigo y compañero.

Quiero agradecer al laboratorio de Fisiología Periodontal de la Universidad Católica, especialmente a Rodrigo Arancibia que dedicó parte de su tiempo a ayudarme a solucionar dificultades técnicas.

Quiero agradecer a mis compañeros de Carrera a Anibal, Catalina, Camila, Dasfne, Paula, Begoña y Carlos. Ellos se transformaron durante los cinco años de pregrado en mi familia. Quiero agradecerles el estar SIEMPRE ahí, sin su apoyo y compañerismo probablemente no habría llegado a estas instancias.

Quiero agradecer a mis amigos a Javiera, Marcela, Ximena, Sandra, Hernán, Francisca, Pablo y Javier, por recordarme constantemente que hay que disfrutar de las cosas sencillas, que los lazos afectivos son los que nos acompañan toda la vida y que hay que vivir al máximo cada experiencia. Quiero agradecer muy especialmente a Camila y Francisca que me han acompañado toda una vida, me han entregado su amistad incondicional y siempre han visto más en mí de lo que yo misma veo.

Quiero agradecer a mi familia: Francisco, Verónica, Cristina, Alex, Rosalía, Fran Jr. e Ian. Gracias por estar siempre conmigo, por hacer de nuestra familia una estructura fuerte, llena de amor y apoyo. Quiero agradecer especialmente a Sebastián por querer ser parte de esta familia, por toda su paciencia y apoyo. Gracias por ser ese pilar invisible que me ha mantenido en pie estos últimos años, por estar siempre a mi lado y por amarme sin condiciones.

Finalmente quiero agradecer a mis padres Cristina y Francisco, que siempre han luchado por darme TODO y que nunca han dudado de mí. Es gracias a su esfuerzo y dedicación, gracias a su amor y apoyo incondicional el que yo esté aquí. Les dedico todos mis logros y felicidad porque sé que también son los suyos.

Tabla de Contenidos.

1. Índice de figuras.	vi
2. Abreviaturas.	vii
3. Resumen.	1
4. Abstract.	3
5. Introducción:	5
5.1. El estroma tumoral.	5
5.2. Desmoplasia en cáncer de mama.	7
5.3. CAFs: Fibroblastos asociados a carcinoma.	8
5.4. TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β .	10
5.5. TGF- β en cáncer.	11
5.6. TGF- β y miodiferenciación.	12
5.7. Estrés oxidativo: NOX4.	14
5.8. Preguntas relevantes.	16
6. Hipótesis.	17
7. Objetivo general.	17
8. Objetivos específicos.	17
9. Materiales y métodos:	18
9.1. Reactivos.	18
9.2. Cultivo celular.	19
9.3. Obtención de extractos proteicos.	20
9.4. Obtención de extractos proteicos para la inmunodetección de NOX4.	20
9.5. Western blot.	21
9.6. Inmunofluorescencia.	23
9.7. Transfección con siRNA.	24
9.8. Ensayo reportero-Luciferasa.	25
9.9. PCR cuantitativo.	26
9.10. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	27

10. Resultados:	28
10.1. La expresión de marcadores de miodiferenciación estimulada por TGF- β 1 depende de la actividad NOX.....	28
10.2. La expresión de CTGF, NOX4 y el aumento intracelular de ROS estimulados por TGF- β 1 precede a la expresión de α -SMA.	31
10.3. El aumento de NOX4 es necesario para la expresión de marcadores de miodiferenciación estimulada por TGF- β 1.....	34
10.4. TGF- β 1 activa Smad2,3 y JNK1,2. Dependencia en la expresión de marcadores de miodiferenciación.	35
10.5. La activación de JNK1,2 determina el aumento de la expresión de NOX4 y el aumento de ROS estimulados por TGF- β 1.	39
10.6. La actividad NOX y la activación de JNK1,2 afectan la activación de Smad2,3 por TGF- β 1.	41
10.7. La activación de Smad2,3 requiere la acción cooperativa de NOX4 y JNK1,2.	44
11. Discusión	46
12. Conclusiones.	52
13. Bibliografía.	54

1. Índice de Figuras.

Figura 1: TGF- β 1 induce miodiferenciación dependiente de la actividad NOX en fibroblastos RMF-EG.	30
Figura 2: TGF- β 1 aumenta la expresión de los mensajeros de CTGF, NOX4, α -SMA además de los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos RMF-EG.	33
Figura 3: NOX4 ejerce un papel permisivo en la expresión de α SMA inducida por TGF- β 1 en fibroblastos RMF-EG.	35
Figura 4: TGF- β 1 activa las rutas de señalización Smad2,3 y JNK1,2 en fibroblastos RMF-EG.	37
Figura 5: Efecto de la inhibición de JNK1,2 en la expresión de marcadores de miodiferenciación estimulada por TGF- β 1, en fibroblastos RMF-EG.....	38
Figura 6: Efecto de la inhibición de JNK1,2 en la expresión de NOX4 estimulada por TGF- β 1, en fibroblastos RMF-EG.....	39
Figura 7: La activación de JNK1,2 promueve un aumento sostenido de los niveles intracelulares de ROS estimulados por TGF- β 1, en fibroblastos RMF-EG.	40
Figura 8: La activación de Smad2,3 por TGF- β 1 en fibroblastos RMF-EG, depende de la actividad NOX y de la activación de JNK1,2.	43
Figura 9: NOX4 y JNK1,2 cooperan para lograr una activación robusta de Smad2,3 estimulada por TGF- β 1, en fibroblastos RMF-EG.	45

2. Abreviaturas.

α-SMA	<i>Actina de músculo liso alfa.</i>
AMH	<i>Hormona antimulerina.</i>
BMP	<i>Proteínas morfogénicas del hueso.</i>
cDNA	<i>ADN complementario.</i>
Cp	<i>Crossing Point.</i>
CTGF	<i>Factor de crecimiento de tejido conectivo.</i>
DCHF	<i>Diclorofluoresceína.</i>
DPI	<i>Difenileno-iodonium.</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiaminotetraacético.</i>
ERK	<i>Proteína quinasa regulada extracelularmente.</i>
FAK	<i>Quinasa de adhesión focal.</i>
H₂DCFDA	<i>2,7-diclorodihidrofluoresceína.</i>
JNK	<i>Quinasa c-Jun N-terminal.</i>
MEC	<i>Matriz extracelular.</i>
MEK	<i>MAP quinasa quinasa.</i>
NOX	<i>NAD(P)H oxidasa.</i>
OV	<i>Ortovanadato.</i>
PFA	<i>Paraformaldehido.</i>
PMSF	<i>Fenilmetil sulfonido.</i>
PVDF	<i>Difluoruro de polivinilideno.</i>
qPCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.</i>

ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno.</i>
SBE	<i>Elemento de unión a Smad.</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato de sodio.</i>
SFB	<i>Suero fetal bovino.</i>
siRNA	<i>ARN pequeño de interferencia.</i>
TβRI	<i>Receptor de TGF-β tipo I.</i>
TβRII	<i>Receptor de TGF-β tipo II.</i>
TβRIII	<i>Receptor de TGF-β tipo III.</i>
TAK	<i>Quinasa activada por TGF-β.</i>
TCE	<i>Elemento de control de TGF-β.</i>
TGF-β	<i>Factor de crecimiento transformante beta.</i>

3. Resumen.

Los tumores de mama pertenecen a un grupo de lesiones neoplásicas denominadas tumores desmoplásicos que, bajo la influencia de ciertos factores epiteliales, originan una estructura estromal rígida responsable de la consistencia dura de la masa tumoral. Este proceso fibrótico ocurre en etapas tempranas de la enfermedad, es controlado por una forma de fibroblastos conocidos como miofibroblastos, o fibroblastos activados, y sus mecanismos son pobremente comprendidos. La activación del tejido estromal es una etapa fundamental en la progresión tumoral, permitiendo tanto la adquisición de propiedades malignas en células epiteliales, como la capacidad invasiva y metastásica. En esta memoria de título estudiamos la modulación de fibroblastos mamarios no tumorales RMF-EG, frente al estímulo de TGF- β 1, secretado por células tumorales y que es abundante en el microambiente tumoral.

Los resultados mostraron que 5ng/mL de TGF- β 1 aumentó la expresión de actina α -SMA, marcador de miofibroblastos, y de CTGF, molécula asociada a diversos desórdenes fibróticos. A través del uso del inhibidor DPI y el *knock-down* de NOX4 demostramos que TGF- β 1 promovió un ambiente oxidativo que favoreció la modulación fibroblástica de células RMF-EG.

Determinamos también que TGF- β 1 activó la ruta de señalización JNK1,2 y que esta activación era fundamental para el aumento de la expresión de CTGF, NOX4 y α -SMA. Estudiamos la influencia de la activación de esta ruta alternativa junto con el aumento del tenor oxidativo, sobre la activación de la ruta canónica Smad2,3. Los resultados mostraron que el aumento en la expresión de NOX4 y la fosforilación de JNK1,2 actuaban de manera sinérgica para activar la ruta Smad2,3.

En conjunto, estos resultados demuestran que TGF- β 1 provoca la modificación de fibroblastos no tumorales, a través de un mecanismo que requiere de la activación de JNK1,2, el aumento temprano de la expresión de CTGF y NOX4 con un consecuente aumento de los niveles intracelulares de ROS.

4. Abstract.

“NAD(P)H Oxidase4 and c-Jun N-Terminal Kinase participation in Transforming Growth Factor- β 1-stimulated myofibroblastic differentiation of human mammary fibroblasts.”

Brest tumors belong to a group of neoplastic lesions known as desmoplastics or scirrhous tumors which, under the influence of tumor cell factors, originate a fibrous structure responsible for the hard consistency of the tumor mass. This fibrotic process occurs during early stages of the disease, it is orchestrated by activated fibroblast i.e. myofibroblast and its mechanisms are poorly understood. Activation of the stromal compartment is a critical step in tumor progression, enabling the epithelial acquisition of malignant properties, such as invasive and metastatic capacities. In the present study, we investigated the myofibroblastic differentiation of normal human mammary fibroblast RMF-EG, induced by TGF- β 1, a growth factor secreted by tumor cells and abundant in tumor microenvironment.

Our results reveal that a 5ng/mL TGF- β 1 stimulus increased the expression of myofibroblast marker α -SMA and CTGF, a molecule associated to several fibrotic disorders. Using a NOX inhibitor (DPI) and a siRNA for NOX4, we demonstrated that TGF- β 1 promoted an oxidative environment that favors myofibroblastic differentiation of RMF-EG cells.

We also determined that TGF- β 1-dependant activation of JNK1,2 was essential for CTGF, NOX4 and α -SMA increased expression. We assessed the influence of JNK1,2 activation and NOX4 activity on canonical Smad2,3 activation. Our results reveal that the TGF- β 1-dependant increase of NOX4 expression and JNK1,2 phosphorylation induced a synergical activation of the canonical TGF- β 1 pathway, Smad2,3.

Taken together, these results demonstrate that TGF- β 1 promotes myofibroblastic differentiation of normal fibroblasts RMF-EG through a mechanism that requires JNK1,2 activation, early increase of CTGF and NOX4 expression with a consequent increase of intracellular ROS levels.

5. Introducción.

Los carcinomas son lesiones tumorales generadas a partir del crecimiento y diseminación descontrolados de células epiteliales. En un principio el progreso del cáncer se estudió a través del análisis unidimensional de la carga mutagénica de la célula epitelial (Mueller, 2004). En la actualidad, ese análisis se ha complementado con el estudio del papel de células no-epiteliales en el fenómeno tumoral (Bissell, 2001). Hoy sabemos que distintos procesos que determinan la progresión tumoral son llevados a cabo por células estromales y/o migratorias que, junto a las epiteliales, generan el microambiente tumoral (Hanahan, 2011).

5.1 El estroma tumoral.

El microambiente tumoral o estroma tumoral está compuesto principalmente por: fibroblastos, células endoteliales, pericitos, leucocitos y la matriz extracelular (MEC). Todos estos componentes contribuyen a la adquisición de las capacidades funcionales que distinguen la célula tumoral, descritas el año 2000 por Hanahan y Weinberg (Hanahan, 2000; Pietras, 2010). Por consiguiente, tanto las células tumorales como el estroma constituyen participantes activos que contribuyen a la inducción, progresión y metástasis del carcinoma (Ronnov-Jessen, 1995; Beacham, 2005).

En el tumor, tanto las células neoplásicas como las estromales que la rodean, sufren cambios progresivos durante la transformación secuencial desde un tejido sano a un tejido maligno (Pietras, 2010; Hanahan, 2011). Estas transformaciones ocurren de manera simultánea (De Wever, 2003; Castello-Cros, 2009) y dependen de la mantención de una comunicación paracrina dinámica entre epitelio y estroma, que promueve cambios

funcionales recíprocos (Elenbaas, 2001). A estas transformaciones se les ha denominado tumorigénesis y estromagénesis, dado que apelan a las células epiteliales y estromales respectivamente. La estromagénesis se refiere a las alteraciones mesenquimales que significan el remodelamiento de la MEC orquestado principalmente por miofibroblastos estromales e inducido por el estímulo de las células tumorales. Este fenómeno genera de este modo un ambiente permisivo para el crecimiento y desarrollo tumoral (Olumi, 1999).

Durante este proceso secuencial el estroma evoluciona a través de tres etapas que definen su condición de estroma **normal**, **permisivo** y **activado**. En un comienzo las células tumorales proveen de señales inductivas que alteran el comportamiento de los fibroblastos normales produciendo una respuesta epitelial recíproca que genera un ciclo de tumorigénesis/estromagénesis hasta alcanzar una malignización irreversible del epitelio que redundará en la completa independencia del estroma (Beacham, 2005). El hecho de que las interacciones entre epitelio y estroma evolucionen junto con el desarrollo tumorigénico global dificulta enormemente el objetivo de dilucidar los mecanismos íntimos de esta patología (Kessenbrock, 2010).

Bajo condiciones normales, los fibroblastos son el tipo celular predominante del estroma, poseen un bajo índice de proliferación y junto con la MEC, funcionan como barrera para la iniciación y/o progresión tumoral (Maffini, 2004). Las células que componen este conglomerado entregan señales que mantienen tanto la morfología como la adhesión epitelial, restringiendo el carcinoma (*in situ*) dentro de su membrana basal. Muchos tumores son incapaces de invadir el tejido vecino mientras el estroma (celular y molecular) no sufra una serie de alteraciones que se lo permitan (Weaver, 2004).

Bajo estímulos tumorales los fibroblastos estromales se diferencian a miofibroblastos y son denominados *fibroblastos asociados a carcinoma* o CAFs por sus siglas en inglés (Egeblad, 2005). Este fenotipo “activado” es el responsable de la expresión y liberación de

proteínas que alterarán los constituyentes y estructura de la MEC (Desmouliere, 2004; Bachem, 2005). Durante su transformación, el estroma pasa por una etapa intermedia denominada estroma permisivo. Este estroma intermedio ya posee la capacidad para promover e incluso iniciar la transformación maligna de células epiteliales (Beacham, 2005; Castello-Cros, 2009). Cambios estromales adicionales, estimulados por células tumorales, conducen el estroma a un estado irreversible de activación en el que los fibroblastos se convierten en altamente proliferativos y capaces de modificar significativamente la MEC. Las señales liberadas por este estroma activado permiten y promueven la invasión de las células tumorales, transformándolo en un tumor invasivo y potencialmente metastásico (Kalluri, 2006; Joyce, 2009).

Las crecientes evidencias sobre la participación del estroma en las etapas de iniciación, crecimiento y progresión tumoral, hacen imposible comprender la biología de un tumor mediante la simple enumeración de características de la célula neoplásica, sin incluir todas las modificaciones del microambiente y su efectiva contribución a la tumorigénesis. Esta noción del estroma como participante activo del desarrollo tumoral, incluso durante etapas tempranas de la enfermedad, lo transforma en un candidato importante como *indicador de pronóstico* o blanco terapéutico. Comprender las variaciones dinámicas de la interacción “epitelio-estroma” será crucial para desarrollar terapias más eficientes que ataquen ambos compartimentos.

5.2 Desmoplasia en Cáncer de Mama.

A nivel global, el cáncer de mama es la forma más frecuente de tumor en mujeres representando el 16% de todos los cánceres femeninos y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. La mayor proporción de muertes por cáncer de mama son precedidas

por una malignización de las células epiteliales que provoca una invasión local y posterior metástasis (Casey, 2008). En comparación con los tumores invasivos de mama, que han sido extensamente estudiados, los estadios tempranos de la enfermedad son pobremente comprendidos. Los tumores mamarios pertenecen a un grupo de lesiones neoplásicas que, bajo la influencia de factores generados por el propio tumor, originan una estructura estromal rígida que es responsable de la consistencia dura de la masa tumoral (Kunz-Schughart, 2002). A estas neoplasias se les conoce como tumores desmoplásicos. La desmoplasia o reacción desmoplásica es un rasgo histológico del estroma que se caracteriza por una fibrosis central y se produce mediante mecanismos similares a los que participan en el proceso de cicatrización incluyendo: la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, una respuesta inmune intensa y remodelado de la MEC. Sin embargo, a diferencia de la respuesta autolimitada del estroma frente al daño de tejido, la desmoplasia estimulada por la tumorigénesis carece de los mecanismos regulatorios para revertir el fenotipo y restablecer la homeostasis del tejido (Tuxhorn, 2001). Esto provoca una activación mesenquimal persistente y una fibrosis descontrolada y progresiva (Hecker, 2009). En diversos carcinomas, incluyendo el de mama, se ha observado que el estroma desmoplásico se encuentra inmediatamente adyacente a las células tumorales y se cree que esta alteración estromal podría ser crítica en la progresión hacia una enfermedad invasiva (Casey, 2008; Cichon, 2010).

5.3 CAFs: Fibroblastos Asociados a Carcinoma.

Los miofibroblastos asociados a carcinomas o CAFs, son las células estromales más abundantes en el tumor desmoplásico y son particularmente frecuentes en neoplasias mamarias (Ronnov-Jessen, 1995). Son éstos los que construyen el estroma fibroso mediante la secreción de grandes cantidades de colágeno, fibronectina (FN1),

proteoglicanos y metaloproteasas de matriz (MMPs) (Dugina, 2001; Li, 2003; Kim, 2010). Los miofibroblastos del estroma desmoplásico provienen principalmente de la activación tumoral de los fibroblastos residentes del estroma mamario (Ronnov-Jessen, 1995).

Diversos estudios genéticos y funcionales han asociado la activación de fibroblastos al desarrollo y malignización de carcinomas mamarios. La alteración de perfiles de expresión génica de estas células se ha relacionado a progresión tumoral, identificando cambios transcripcionales claves que ocurren en etapas tempranas de la enfermedad (Cichon, 2010). El análisis del transcriptoma de carcinomas invasivos de mama reveló que la invasión de células tumorales ocurre, al menos en parte, debido a la adquisición del fenotipo reactivo de los CAFs (Casey, 2008). Kuperwasser y colaboradores observaron que sólo fibroblastos activados tenían la capacidad de inducir carcinogénesis en tejido epitelial mamario (Kuperwasser, 2004). También se han logrado identificar factores solubles liberados por CAFs que promueven la progresión tumoral, como en el trabajo de Orimo y colaboradores que demostraron que la liberación estromal de la quimioquina CXCL12 promueve la angiogénesis y aumenta la proliferación de células tumorales (Orimo, 2005). También se ha demostrado que la interacción de CAFs con células tumorales provoca la activación epitelial de COX-2, mediador de la inflamación e indicador de mal pronóstico en cáncer invasivo (Singh-Ranger, 2008). Estos y otros estudios han revelado el papel crítico que juega la activación de fibroblastos en la progresión y adquisición de motilidad e invasividad en cáncer de mama (Cichon, 2010; Kim, 2010).

5.4 TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante- β .

La familia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) son un grupo de citoquinas que controla procesos como división, diferenciación, migración, adhesión, organización, metabolismo y apoptosis celular (Massague, 2006; Padua, 2009). Se han identificado 42 miembros de esta familia en el genoma humano incluyendo: TGF- β s, proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), activinas, nodal, mioestatina y la hormona antimulerina (AMH) (Massague, 2006).

Estas citoquinas son secretadas por las células como precursores inertes y son activadas mediante proteólisis (Leask, 2010). Su actividad como moléculas de señalización depende de dos receptores de transmembrana, el receptor tipo I y tipo II (T β RI y T β RII, respectivamente). El receptor que une ligando es T β RII, el que luego forma un complejo bi-dimérico, es decir, dos pares de subunidades T β RI y T β RII (Massague, 2006). Además existe un co-receptor (T β RIII) que asiste el proceso de unión, capturando el TGF- β y presentándolo a T β RII. Existen siete T β RI (ALKs1-7), cinco T β RII (ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, AMHRII y T β RII) y dos T β RIII (endogлина y betaglicano) (Wrana, 1994). T β RI posee un segmento regulatorio GS donde tiene acoplado el inhibidor FKBP12. Al unirse TGF- β a T β RII este último fosforila a T β RI provocando un cambio conformacional que desacopla a FKBP12, dejando la región GS libre para la unión de su sustrato, la familia de factores de transcripción Smad (Huse, 2001).

Se conocen al menos nueve proteínas Smads que responden a distintos ligandos de la familia TGF- β (Yue, 2000). La subfamilia TGF- β s, activina, nodal y mioestatina activan a Smad2,3 a través de ALK4,5,7, mientras que BMPs y AMH activan a Smad1,5,8 a través de ALK1,2,3,6. Las Smads tienen dos dominios globulares (MH1 y MH2) unidos por una región *linker*. MH1 es responsable de la unión a ADN mientras que MH2 se une con proteínas de anclaje para su retención citosólica, con T β RI para su activación y con

otras Smads u otros factores transcripcionales para la regulación de expresión génica. Producto de la unión del ligando a T β RII, T β RI fosforila y activa a las Smads que se unen a Smad4, este último no es sustrato para T β RI y funciona como co-factor permitiendo la traslocación de Smad fosforilada (pSmad) al núcleo. Una vez en el núcleo, las Smads promueven y/o reprimen la expresión génica (Hu, 2003; Leask, 2010). Además de la ruta canónica (asociada a la fosforilación de Smads), la familia TGF- β puede activar otras vías de transducción intracelulares, específicamente TGF- β 1 es capaz de activar proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como: p38, ERK, JNK, TAK-1 y PI3K. Los vínculos bioquímicos entre T β RI y estas vías de transducción son materia de activa investigación (Derynck, 2003).

5.5 TGF- β en Cáncer.

TGF- β juega un rol dual en cáncer manifestando una transición desde un papel supresor (en la célula normal) a promotor tumoral durante la tumorigénesis (Roberts, 2003). En tejidos sanos, TGF- β inhibe el crecimiento celular de diversos tipos celulares incluyendo células epiteliales, por lo que en un principio se consideró como un candidato de gen supresor de carcinomas (Wakefield, 1990). Durante las primeras etapas de la tumorigénesis TGF- β mantiene esta capacidad inhibitoria, controlando el crecimiento de células pre-malignas junto con otras funciones antitumorales como la mantención de la estabilidad genómica y apoptosis (Stampfer, 2001). Más aún, diversos estudios han demostrado que tanto TGF- β como su receptor y sus elementos transductores de señalización primarios, proteínas Smad, son importantes para la supresión de etapas primarias de la tumorigénesis en diversos cánceres humanos (Wakefield, 2002). Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que mientras las células progresan a estados más avanzados, TGF- β pierde sus efectos supresores y estimula la

malignización. TGF- β puede promover la tumorigénesis a través del aumento de la migración celular, formación de tejido conectivo, inmunosupresión y promoción de la angiogénesis (Yue, 2000). Se ha descrito que las células tumorales logran evitar los efectos inhibitorios de TGF- β acumulando mutaciones que atenúan o bien inhabilitan por completo su señalización (Massague, 2006). También es posible que para ejercer sus efectos supresores y oncogénicos TGF- β utilice diferentes vías de señalización, incluyendo aquellas independientes de Smad (Roberts, 2003). Siegel y colaboradores lograron demostrar la dualidad de TGF- β en un modelo de cáncer de mama en que la activación de la señalización de TGF- β retrasa significativamente la aparición de tumores primarios, acción consistente con la de un factor supresor de la tumorigénesis. Sin embargo la activación de esta vía en etapas posteriores de la enfermedad provoca un aumento importante de focos metastásicos, demostrando el carácter oncogénico de TGF- β en estadíos avanzados (Siegel, 2003). Este y otros numerosos estudios han demostrado la importancia de TGF- β en la progresión tumoral, sobretodo en la adquisición de capacidad metastásica de las células tumorales. Un trabajo realizado en nuestro laboratorio muestra que TGF- β 1 es altamente expresado por células tumorales y que los niveles de secreción de este factor son proporcionales a su potencial invasivo (Guerrero, 2010).

5.6 TGF- β 1 y Miodiferenciación.

Ya que las células tumorales expresan y liberan altas cantidades de TGF- β 1 y los fibroblastos contienen altos niveles de su receptor, se ha propuesto que este factor estimula las respuestas fibroblásticas de etapas tempranas de estromagénesis, y se considera por tanto un factor clave en la progresión tumoral promoviendo la diferenciación de los fibroblastos estromales (De Wever, 2003). La diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- β 1 ha sido descrita en diversos tejidos como pulmón, corazón y mama.

Esta diferenciación provoca una sobreproducción de compuestos de la MEC incluyendo colágeno I, VI, XV y XVIII, tenascina-C, PAI-1 y la deposición de diversos factores de crecimiento (Berking, 2001). La actina de músculo liso alfa (α -SMA) es una de las proteínas más abundante en células de músculo liso y constituye un marcador de miodiferenciación debido a que su expresión es característica predominante de los miofibroblastos (Darby, 1990). Las vías de señalización que participan en la miodiferenciación dependiente de TGF- β 1 no están completamente descritas, sin embargo, se ha demostrado que la vía ALK5/Smad3 es responsable, al menos en parte, de la respuesta fibrótica de TGF- β 1 en fibroblastos (Chen, 2006). El promotor de α -SMA tiene dos elementos de unión a Smad (SBE) a los que se ha demostrado que se une Smad3, y además posee un elemento de control de TGF- β (TCE) al que se pueden unir factores semejantes a Krüppel. Tanto los SBE como el TCE han demostrado ser esenciales para la regulación de expresión de α -SMA estimulada por TGF- β 1 (Roy, 2001). La vía ALK5/Smad2,3 también está implicada en la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), proteína matricelular que promueve la adhesión celular e incrementa la señalización vía adhesión a través de integrinas. Se ha identificado que CTGF intermedia el fenómeno fibrótico estimulado por TGF- β 1 aunque no se considera un agente fibrótico potente por sí solo (Mori, 1999).

En función de lo descrito anteriormente, y dado que TGF- β 1 es capaz de activar otras vías de señalización además de la ruta canónica de las Smads, se ha propuesto que algunas de estas vías pueden estar presentes en la respuesta fibrótica a TGF- β 1. A pesar que, la ruta canónica de señalización de TGF- β 1 hace un aporte importante al control de la expresión de α -SMA, resulta relevante investigar la participación de rutas de señalización alternativas dado que ha sido propuesto que el control de la expresión de este marcador es probablemente dependiente del tipo celular (Hu, 2003). Es más,

numerosos datos sugieren que la señalización a través de ALK5/Smad3 contribuye, pero no es la base fundamental, de un fenómeno persistente de fibrosis en modelos de esclerodermia sistémica (Leask, 2010).

5.7 Estrés Oxidativo: NOX4.

Como se mencionara anteriormente, la reacción del estroma frente al estímulo de células tumorales pre-malignas, durante las etapas tempranas de la tumorigénesis, se asimila a un proceso de cicatrización, lo que implica la puesta en marcha de un proceso inflamatorio. Diversos estudios demuestran que las células tumorales inducen la producción de mediadores inflamatorios generando una condición crónica que sustenta la señalización paracrina que estimula la progresión tumoral (Coussens, 2002). Prácticamente todas las lesiones neoplásicas reclutan células del sistema inmune que contribuyen a la expresión de una respuesta inflamatoria en respuesta al tumor y que generan productos que promueven el desarrollo y progresión tumoral (Grivennikov, 2010; Qian, 2010). El desarrollo de este proceso inflamatorio puede contribuir a la adquisición de características distintivas mediante diversos mecanismos: liberando moléculas bioactivas como factores de crecimiento que mantienen una señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, enzimas que modifican la MEC y facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, entre otros (Hanahan, 2011).

Una de las consecuencias fundamentales del proceso inflamatorio es la producción de un estrés oxidativo que genera cantidades elevadas de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, como ha sido demostrado, contribuyen al desarrollo de diversos desórdenes fibróticos y la malignización de carcinomas (Blanchetot, 2008; Bocchino,

2010). Existen muchos estudios que relacionan el aumento de los niveles intracelulares de ROS con la iniciación y progresión tumoral con un foco puesto en la célula epitelial y básicamente en procesos de replicación, angiogénesis, apoptosis y migración (Halliwell, 2007; Kumar, 2008). Un estudio realizado por Toullec y colaboradores demostró que la inducción de estrés oxidativo en células estromales de un modelo de carcinoma mamario, fue suficiente para generar un estroma activado y provocar un aumento significativo en la propagación metastásica (Toullec, 2010).

Existen dos principales fuentes intracelulares productoras de ROS, la mitocondria y la familia de enzimas citoplasmáticas NAD(P)H oxidasas (NOXs) (Blanchetot, 2008). Se ha establecido que el estímulo de diversas citoquinas y factores de crecimiento provoca el aumento de los niveles intracelulares de ROS, que a su vez actúan como segundos mensajeros activando distintas vías de señalización para provocar la respuesta celular correspondiente (Shen, 2006). La generación de ROS por actividad de NOX es un evento reconocido como mediador de la acumulación de componentes de la MEC en desórdenes fibróticos, ya que provoca la miodiferenciación de fibroblastos en diversos tipos celulares (Bondi, 2010). Por primera vez en el año 2009, Hecker y colaboradores implicaron una isoforma específica de esta familia en el proceso de fibrogénesis que resultó ser NOX4. Este estudio comprobó que TGF- β 1 induce la expresión y activación de NOX4 (a través de su ruta canónica ALK5/Smad3), y que el aumento de H₂O₂ dependiente de esta activación es necesaria para la diferenciación miofibroblástica de fibroblastos pulmonares (Hecker, 2009).

A partir de ese año surgieron numerosos estudios que involucran a NOX4 en la miodiferenciación de fibroblastos estimulada por diversos factores, incluyendo a TGF- β , en distintos tipos celulares. Estos estudios también buscaron dilucidar el papel que cumple el aumento de ROS en la vía de transducción de TGF- β 1. En fibroblastos renales

se observó que la mioidiferenciación estimulada por TGF- β 1 dependía de una vía de señalización que incluía a T β RI, Smad3, NOX-4 y ERK (Bondi, 2010). En un modelo de cáncer de próstata se determinó que el estímulo de TGF- β 1 aumenta los niveles de ROS dependiente de la actividad de NOX4, este aumento del tenor oxidativo activa JNK que es esencial en el remodelado del citoesqueleto asociado a mioidiferenciación (Sampson, 2011). También Curacanu y colaboradores observaron que en la mioidiferenciación de fibroblastos cardiacos estimulada por TGF- β 1, el aumento de ROS provocado por NOX4 afecta la activación de Smad2,3 (Cucoranu, 2005). Esto sugiere que TGF- β 1 y NOX-4 podrían estar cooperando en un bucle de retroalimentación positiva para promover la mioidiferenciación de fibroblastos.

5.8 Preguntas relevantes.

A partir de los antecedentes previamente descritos, en la presente memoria de título nos propusimos responder las siguientes interrogantes:

- a) ¿TGF- β 1 induce un fenotipo miofibroblástico en los fibroblastos mamarios no tumorales RMF-EG?
- b) ¿Este efecto depende de un aumento de estrés oxidativo por acción de NOX-4?
- c) ¿Qué rutas de señalización participan en la respuesta de mioidiferenciación a TGF- β 1?

6. Hipótesis.

La miodiferenciación de fibroblastos mamarios RMF-EG en respuesta a TGF- β 1, requiere de un aumento intracelular de ROS dependiente de NOX4 y de la activación de la ruta alternativa JNK1,2.

7. Objetivo General.

Estudiar la miodiferenciación de fibroblastos mamarios RMF-EG inducida por TGF- β 1, evaluando la importancia del tenor oxidativo, y estudiar el rol de la ruta canónica Smad3 y no canónica JNK en estos eventos.

8. Objetivos Específicos.

- Estudiar el efecto de la actividad NOX4 y el aumento intracelular de ROS en la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- β 1.
- Estudiar la importancia de la activación de JNK en la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- β 1.
- Estudiar la influencia de JNK, NOX4 y ROS en la activación de la ruta canónica, Smad2/3, de TGF- β 1.

9. Materiales y Métodos.

9.1 Reactivos.

TGF- β 1 recombinante humano se adquirió de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, US). SP600125, inhibidor de JNK1,2 se adquirió de Merck (Darmstadt, HE, DE). Los medios de cultivo, DMEM y F12, y Trizol provienen de GIBCO (Carlsbad, CA, US). Los antibióticos Gentamicina y Normocina se adquirieron de Laboratorios Sanderson (Santiago, RM, CL) e Invivogen (San Diego, CA, US), respectivamente. El inhibidor de NOX, difenileno-iodonium (DPI), la sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) y los anticuerpos primarios anti-tubulina y anti- β -actina se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). Los RNA pequeños de interferencia (siRNA) control y para NOX4 se adquirieron en Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, US). Los reactivos de transfección de DNA, TransIT-2020 y de siRNA, TransIT-siQuest se adquirieron en MirusBio LLC (Madison, WI, US). La enzima transcriptasa reversa M-MLV, los oligodT, el plasmidio Renilla-luc y el kit de medición de actividad luciferasa, Dual Luciferase Reporter Assay System se adquirieron de Promega (Fitchburg, WI, US). Los anticuerpos primarios anti-fosfo-Smad2,3, anti-Smad2,3, anti-JNK1,2 y anti-CTGF se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, US). El anticuerpo primario anti-fosfo-JNK se adquirió en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, US). Los anticuerpos primarios anti-NOX4 y anti- α -SMA se compraron en Abcam (Cambridge, MA, US). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra se adquirieron de

Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, US). Los anticuerpos secundarios utilizados en ensayos de *inmunofluorescencia*, Alexa Fluor-488 anti-ratón, Alexa Fluor-555 anti-conejo y FITC anti-cabra, se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (Reston, VA, US). Faloidina-Alexa Fluor 594 fue adquirido de Molecular Probes (Eugene, OR, US). Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y el sustrato quimioluminiscente, Supersignal West Pico se adquirieron de Thermo Scientific (Waltham, MA, US). La película fotográfica Amersham Hyperfilm ECL se adquirió de GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, C, SE). Las células estromales de mama RMF-EG y el plasmidio 3TP-Luc fueron proporcionados por Dra. Ch. Kuperwasser y Dr. E. Brandan, respectivamente.

9.2 Cultivo Celular.

En el desarrollo de este proyecto de título, se utilizó la línea celular estromal de mama RMF-EG proporcionada amablemente por Dra. Ch. Kuperwasser, (Tufts University, MA, US). Estas células fueron aisladas desde una paciente normal sometida a una reducción mamaria (Kupperwasser,2004) y fueron cultivadas en botellas de 75cm² de superficie en medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, MO, US) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 2mg/L Gentamicina (Laboratorio Sanderson, RM, CL), y 100µg/mL Normocina (Invivogen, CA, US). Para los ensayos de *western blot* y *knock-down*, utilizando siRNAs, se utilizaron placas de 60mm de diámetro. En los ensayos de *qPCR* las células se sembraron en placas de 35mm, para los ensayos de *inmunofluorescencia* y reporteros de

luciferasa, en placas de 24 pozos y para la determinación de los niveles de ROS intracelular, en placas de 98 pozos.

9.3 Obtención de Extractos Proteicos.

Las células RMF-EG sembradas en placas de cultivo de 60mm de diámetro, se estimularon con 5ng/mL de TGF- β 1 en presencia o ausencia de los inhibidores de NOX y JNK, 2,5 μ M de DPI y 10 μ M de SP600125 respectivamente. Luego del estímulo, las células se lavaron con amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X frío y se lisaron usando el amortiguador comercial *Complete Mini* (Roche Diagnostics, BS, SE), agregándole 2mg/mL de ortovanadato (OV) y 20mM de fluoruro de sodio (NaF). Las placas se rasparon y los lisados se incubaron en hielo durante 10min. Las muestras se centrifugaron a 16.000g durante 10min a 4°C. La concentración de proteínas de las muestras se obtuvo utilizando el reactivo DCTM Protein Assay (Bio-Rad, CA, US).

9.4 Obtención de Extractos Proteicos para la Inmunodetección de NOX-4.

Para la inmunodetección de NOX-4 se utilizó un amortiguador de lisis que contiene: 30mM Tris-HCl (pH 7,5), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS), 10% glicerol, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 2mg/mL pepstatina, 2mg/mL leupeptina y 1mM OV. Luego de someter las placas a raspado en frío, los lisados

celulares se incubaron en hielo durante 1hr. Posteriormente las muestras se sonicaron durante 5seg y se calentaron a 80°C durante 5min. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 13.000rpm durante 10min a 4°C, y la concentración de proteínas se obtuvo utilizando el reactivo DCTM Protein Assay (Bio-Rad, CA, US).

9.5 Western Blot.

Las proteínas se denaturaron a 80°C en una solución con 62,5mM Tris-HCL (pH6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 14,4mMβ-mercaptoetanol y 0,01% azul de Bromofenol. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% usando un equipo de electroforesis. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVFD, previamente activada en metanol, mediante un sistema de transferencia húmeda. Al finalizar la transferencia las membranas se lavaron 3 veces con amortiguador TBS-T (20mM Tris-HCl pH7,6, 150mM NaCl, 0,05% Tween), y se bloquearon con una solución de leche baja en grasa al 10% en TBS-T durante 1hr a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Los anticuerpos se diluyeron en leche libre de grasa al 1% o en BSA 5%. Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-fosfo(ser423/425)-Smad2,3 (1:1.000; Santa Cruz), anti-Smad2,3 (1:1.000; Santa Cruz), anti-fosfo (Thr183/Tyr185)-JNK1,2 (1:1.000; Cell Signaling), anti-JNK1,2 (1:1.000; Santa Cruz), anti-α-SMA (1:300; Abcam), anti-CTGF (1:1.000; Santa Cruz), anti-NOX-4

(1:500;Abcam), anti-Tubulina (1:5.000; Sigma-Aldrich) y anti- β -Actina (1:5.000; Sigma-Aldrich). Luego las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10min a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a peroxidasa durante 1hr a temperatura ambiente. Los secundarios se diluyeron en TBS-T. Los secundarios utilizados fueron: anti-ratón (1:5.000; Rockland), anti-conejo (1:7.000; Rockland) y anti-cabra (1:5.000; Rockland). La marca quimioluminiscente se visualizó utilizando el kit comercial Supersignal West Pico (Thermo Scientific, IL, US) y la detección se realizó con películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, C, SE). Las imágenes digitalizadas de *western blot* se utilizaron para el análisis densitométrico hecho con el software KODAK Molecular Imaging versión Upgrade 4.0 (Kodak, NY, US).

Una vez terminado este análisis las membranas se trataron con una solución de 200mM Glicina pH 2.0, 100mM β -mercaptoetanol y 0,05% Tween 30min a temperatura ambiente para remover los anticuerpos unidos. Se lavaron las membranas tres veces con TBS-T20 min a temperatura ambiente, se volvieron a bloquear y incubar con los anticuerpos dirigidos a las formas totales de las proteínas, α -tubulina o β -actina, como control de carga de los ensayos de *western Blot*.

9.6 Inmunofluorescencia.

Las células RMF-EG se cultivaron en cubreobjetos redondos de 15mm de diámetro (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, BW, DE) previamente autoclavados y pre-incubados con SFB durante 1h a 37°C. Las células se estimularon con 5ng/mL de TGF- β 1 en presencia o ausencia de los inhibidores de NOX y pJNK, 2,5 μ M de DPI y 10 μ M de SP600125 respectivamente. Luego del estímulo correspondiente, las células se fijaron sobre hielo usando paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 1X frío dos veces durante 10min. A continuación las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío. Posteriormente las células se permeabilizaron usando una solución de 0,025% Tritón X-100 preparada en una solución 1% BSA en PBS durante 2min y lavadas dos veces con PBS. Luego las células permeabilizadas se incubaron con una solución de 5%BSA en PBS durante 1h para bloquear la actividad peroxidasa endocelular, y se volvieron a lavar una vez con PBS 1X. Las células se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se diluyeron en una solución de 1%BSA en PBS 1X. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti- α -SMA (1:100; Abcam), anti-fosfo (ser423/425)-Smad2,3(1:50; Santa Cruz), anti-Smad2,3 (1:50; Santa Cruz), anti-fosfo (Thr183/Tyr185)-JNK1,2 (1:50;CellSignaling) y anti-JNK1,2 (1:50; Santa Cruz).Luego, las células se lavaron tres veces con PBS 1X durante 5min y se incubaron con anticuerpo secundario en oscuridad durante 1hr a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en una solución de 1% BSA en PBS 1X. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa Fluor-488 anti-ratón (1:500; Jackson Immuno Research), Alexa Fluor-555 anti-conejo (1:500; Jackson

ImmunoResearch), FITC anti-cabra (1:500; Jackson ImmunoResearch). Para identificar actina, las células se incubaron con Faloidina-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, OR, US). Luego de la incubación las células se lavaron tres veces con PBS1X. Para la tinción del núcleo las células se incubaron con una solución de 1µg/ml de Hoechst en PBS1X durante 3min a temperatura ambiente y se volvieron a lavar dos veces con PBS1X. Finalmente los cristales se montaron sobre cubreobjetos usando el medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories, CA, US).

9.7 Transfección con siRNA.

La transfección de los siRNA se llevó cabo utilizando el reactivo TransIT-siQUEST (MirusBio LLC, WI, US) de acuerdo con el protocolo del fabricante, que permite que la transfección se lleve a cabo en presencia de suero. Luego de 24h de cultivo (confluencia aproximada 70%), se renovó a las células el medio completo para su transfección. Para las condiciones tanto control como experimental se utilizaron concentraciones finales de siRNA de 50nM por cada placa de cultivo. Los siRNA se incubaron con el reactivo TransIT-siQUEST en medio sin suero durante 20min a temperatura ambiente, posteriormente la mezcla se adicionó a las placas y estas se incubaron durante 24h a 37°C. Luego de la transfección, las células se estimularon con 5ng/mL de TGF-β1 para detección de marcadores de diferenciación, o bien tripsinizadas y sembradas en placas de 24 pozos para realizar ensayos de reportero luciferasa.

9.8 Ensayo Reportero-Luciferasa.

El plasmidio reportero 3PT-Luc fue proporcionado amablemente por el Dr. E. Brandan (Pontificia Universidad Católica de Chile, RM, CL). La transfección se llevó a cabo utilizando el reactivo TransIT-2020 (MirusBio LLC, WI, US) de acuerdo con el protocolo del fabricante, que permite que la transfección se lleve a cabo en presencia de suero. Las células RMF-EG se sembraron en placas de 24 pozos (confluencia aproximada 70%) y cultivadas durante 24h a 37°C. Transcurrido el tiempo de cultivo, se renovó el medio completo para realizar la transfección. Se incubaron 500ng de 3TP-Luc y 10ng del plásmido Renilla-luc (Promega, WI, US), como control de transfección, con 3µL por µg de DNA del reactivo TransIT-2020 en 50µL de medio sin suero durante 30min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se adicionó a las placas y se incubó durante 6h a 37°C. Luego de la transfección, las células se estimularon con 5ng/mL de TGF-β1 en presencia o ausencia de los inhibidores de NOX y pJNK, 2,5µM de DPI y 10µM de SP600125 respectivamente, durante 16h a 37°C. Transcurrido este período, las células se lavaron una vez con PBS1X. Luego, se lisaron y su actividad se midió utilizando el sistema Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI, US). Los datos se expresaron como la razón entre la actividad luciferasa de luciérnaga y la de renilla.

9.9 PCR Cuantitativo.

El RNA total se aisló a partir de células RMF-EG sembradas en placas de 35mm tratadas con 5ng/mL de TGF- β 1. La extracción se realizó utilizando Trizol (GIBCO, CA, US), de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. El DNA complementario (cDNA) se generó por la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, WI, US) usando como partidor oligodT (Promega, WI, US) y 1,5 μ gde RNA total.

El ensayo de PCR cuantitativo (*qPCR*) se realizó utilizando los siguientes partidores: NOX4, sentido: 5'TAGATACCCACCCTCCCG 3', anti sentido: 5'TGGGCTCTTCCATACAAATC 3', tamaño producto PCR: 169pb; α -SMA, sentido: 5' GCCGACCGAATGCAGAAGGA 3', anti sentido: 5' TGCGGTGGACAATGGAAGGC 3', tamaño producto PCR: 190pb; CTGF, sentido: 5'TTGGCCCAGACCCA ACTATG 3', anti sentido: 5' CAGGAGGCGTTGTCATTGGT 3', tamaño producto PCR: 240pb. Se utilizó el sistema de PCR en tiempo Real Light CyclerTM (Roche Diagnostics, BS, SE). Las reacciones se llevaron a cabo en capilares de vidrio con 50ng de cDNA en un volumen final de 10 μ L. La mezcla de PCR se preparó con LC Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, BS, SE), 3mM de MgCl₂ y 0,3pmol de cada partidor (S/A). La fluorescencia se analizó usando el software: Light CyclerTM Analysis Software (Roche Diagnostics, BS, SE). El *crossingpoint* (Cp) para cada reacción se determinó usando el algoritmo *Fit Point* y ajuste manual de línea base. La cuantificación se determinó usando el método de curva estándar relativa con distintas cantidades de DNA referente estándar generado a partir del amplicón de PCR de cada gen blanco, y se expresó en copias/ μ L. El templado para las curvas

estándar específicas de cada gen, se generó mediante PCR convencional y purificado mediante el sistema Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco Invitrogene, CA, US). La cantidad de transcrito para cada gen de interés se normalizó contra los niveles de transcrito 18S.

9.10 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

El contenido intracelular de ROS se midió utilizando la sonda fluorescente sensible a oxidación, H₂DCFDA. Células RMF-EG se sembraron en placas de 96 pozos, cultivadas durante 24h a 37°C y posteriormente tratadas con 5ng/mL de TGF-β1. Posterior al estímulo, las células se incubaron con 10μM de H₂DCFDA en medio sin rojo fenol (Gibco Invitrogene, CA, US) durante 30min a 37°C. Luego las células se lavaron y se lisaron con NaOH 0,1N. La fluorescencia se monitoreó usando un fluorómetro para microplaca (Spectra MAX, Gemini EM; Molecular Divices, CA, US) con longitudes de onda de 480 y 530nm, de excitación y emisión, respectivamente. En el experimento en que se inhibió la fosforilación de JNK1,2, las células se pre-incubaron con 10μM de SP600125 durante 30min.

10. Resultados.

10.1 La expresión de marcadores de mioidiferenciación estimulada por TGF- β 1 depende de la actividad NOX.

Diversos estudios han establecido que la mioidiferenciación de fibroblastos en enfermedades con un componente fibrótico requiere de un aumento de los niveles intracelulares de ROS (Bocchino, 2010; Toullec, 2010). En muchos de estos casos, se le adjudica la responsabilidad del aumento del tenor oxidativo a la actividad de enzimas NOX y en algunos casos específicamente a la actividad de la isoforma NOX4 (Shen, 2006; Hecker, 2009; Bondi, 2010; Park, 2010). La mioidiferenciación de los fibroblastos mamarios RMF-EG fue evaluada a través de la expresión de los marcadores α -SMA y CTGF mediante *Western blot*, y se estudió el efecto de la actividad NOX (y la producción concomitante de ROS) utilizando DPI, inhibidor de estas flavoenzimas. Células RMF-EG se pre-incubaron con 2,5 μ M de DPI durante 30min y posteriormente estimuladas con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 72 y 30h para observar los niveles de α -SMA y CTGF, respectivamente. Como se observa en la figura 1A, TGF- β 1 aumentó significativamente la expresión de ambos marcadores ($p < 0,0001$ y $p < 0,001$). Como se observa en la misma figura, un pre-tratamiento de 30min con 2,5 μ M de DPI bloqueó el aumento de los marcadores de mioidiferenciación estimulado por TGF- β 1 ($p < 0,0001$ y $p < 0,001$).

También se estudió el aumento de la expresión de α -SMA mediante *Inmunofluorescencia* usando un anticuerpo específico contra α -SMA. Como se observa en la primera columna de la figura 1B, el tratamiento de células RMF-EG con 5ng/mL TGF- β 1 provoca un aumento significativo en la expresión de este marcador (verde). La segunda columna de la Figura 1B muestra un claro aumento en los filamentos de actina

(rojo), identificada mediante el uso de faloidina. Estos filamentos que incorporan los monómeros de α -SMA y que se conectan de manera directa a adhesiones focales, son esenciales para el aumento de contractilidad característico de los miofibroblastos (Smith, 2006; Cai, 2012). Este resultado demuestra que el estímulo de TGF- β 1 provoca un aumento significativo de α -SMA junto a una importante reestructuración del citoesqueleto, ambos fenómenos considerados marcadores de la mioidiferenciación. Un pre-tratamiento de 30 min con 2,5 μ M de DPI bloqueó ambos fenómenos.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante *Western blot* e *Inmunofluorescencia* sugieren que la mioidiferenciación de fibroblastos RMF-EG estimulada por TGF- β 1 depende del establecimiento de un nivel redox intracelular atribuible a la actividad NOX.

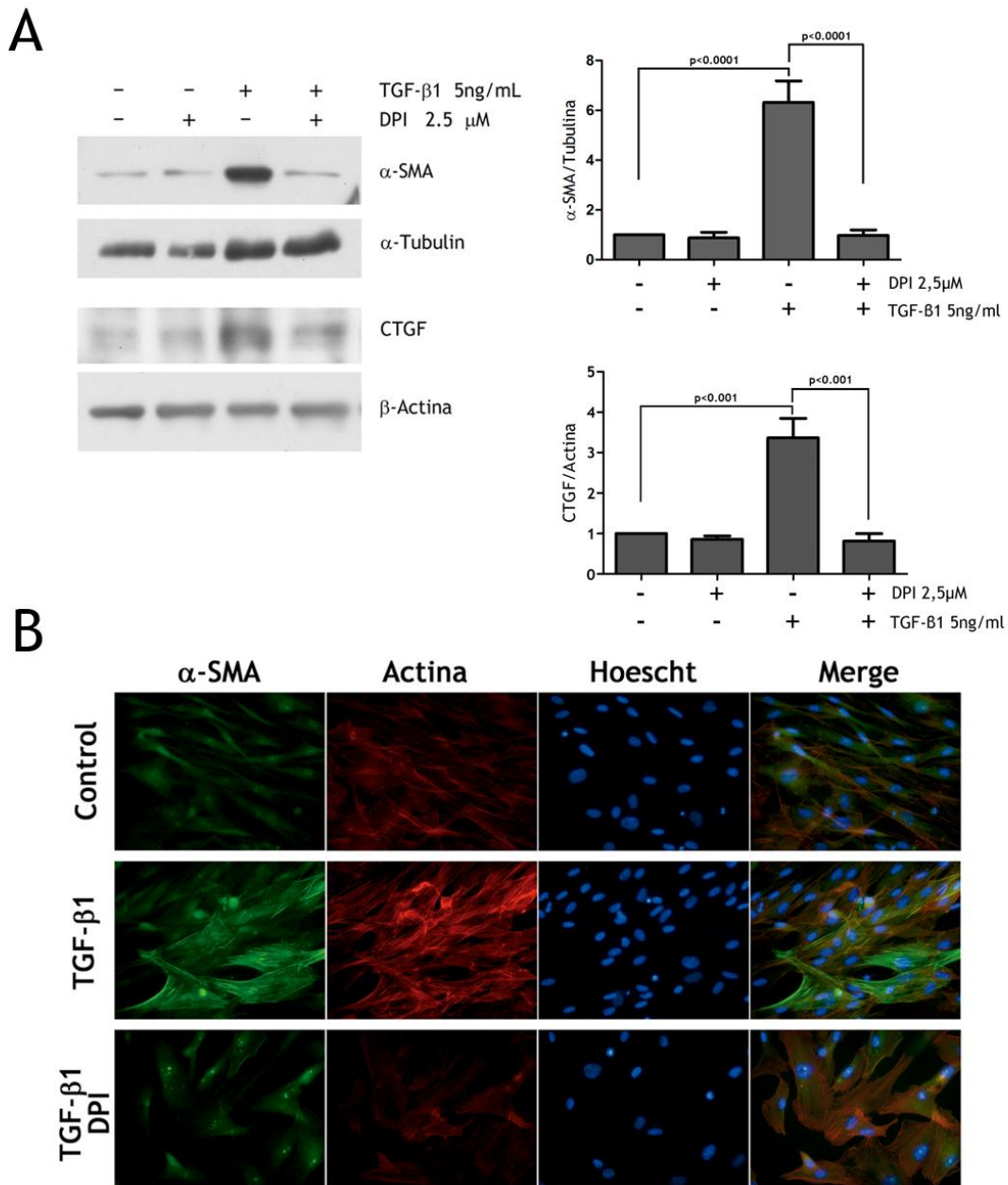


Figura 1: TGF- β 1 induce mioidiferenciación dependiente de la actividad NOX en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se pre-incubaron con 2,5 μ M de DPI durante 30min y posteriormente estimuladas con 5ng/ml de TGF- β 1 durante 30h para el caso de CTGF y 72h para α -SMA. **A)** *Western blot* representativo y análisis densitométrico muestran que la expresión de α -SMA y CTGF aumenta significativamente luego del estímulo de TGF- β 1 y que este aumento es bloqueado por DPI. La expresión de α -SMA se normalizó con respecto Tubulina, mientras que la expresión de CTGF se normalizó con β -Actina. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (n=3). **B)** *Inmunofluorescencia* representativa que muestra el aumento en la expresión de α -SMA y reordenamiento de los filamentos de Actina en respuesta a TGF- β 1 y la inhibición de ambos fenómenos por la acción de DPI. Verde: α -SMA marcado con anticuerpo acoplado a Alexa Fluor 488. Rojo: Actina marcada con faloidina-Alexa Fluor 594. Azul: núcleo marcado con Hoescht.

10.2 La expresión de CTGF, NOX4 y el aumento intracelular de ROS estimulado por TGF- β 1 precede a la expresión de α -SMA.

Estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que las células RMF-EG expresan mRNA para las isoformas NOX4 y NOX5, sin embargo, únicamente la primera responde a un estímulo de TGF- β 1, aumentando significativamente su expresión (Tobar, 2010). Teniendo en cuenta este antecedente, en el presente trabajo se tomó en consideración únicamente los cambios de expresión e influencia de NOX4 en la respuesta a TGF- β 1.

Con el propósito de analizar el curso temporal de la expresión de las moléculas estimuladas por TGF- β 1, realizamos un análisis mediante *qPCR*, de la expresión de RNA mensajeros (mRNA) en células RMF-EG en un lapso que abarcó hasta 48h de estímulo. De este modo, pretendimos aproximarnos a los eventos tempranos que determinan la respuesta de midiferenciación de fibroblastos mamarios estimulada por TGF- β 1. Se examinaron por *qPCR* los niveles de los mRNA de α -SMA, CTGF y NOX4. En la Figura 2A se observa que el estímulo de 5ng/mL de TGF- β 1 provocó un aumento temprano del mRNA de CTGF y NOX4 alcanzando un máximo a las 4 y 16h ($p < 0,0001$), respectivamente. Por otra parte, el estímulo sobre el mRNA de α -SMA alcanza un aumento significativa a las 24h de estímulo ($p < 0,0001$). La expresión de los tres mensajeros se mantuvo elevada durante al menos las 48h post-estímulo ($p < 0,0001$). Este resultado muestra que la expresión de CTGF y NOX4 precede en 20 y 8h, respectivamente, al aumento del principal marcador de diferenciación miofibroblástica α -SMA.

De forma paralela, se midieron los niveles intracelulares de ROS utilizando H₂DCFDA como sonda fluorescente. Para ello, células RMF-EG se trataron durante los

tiempos indicados con 5ng/mL de TGF- β 1. Como se muestra en la Figura 2B, TGF- β 1 provocó un aumento significativo de los niveles intracelulares de ROS a partir de la 4h de estímulo ($p < 0,0001$). Estos niveles continuaron aumentando durante las horas posteriores, manteniéndose elevados hasta por lo menos 48h post-estímulo ($p < 0,0001$). Este resultado demuestra que el aumento de expresión de NOX4 está acompañado de un consecuente aumento de los niveles intracelulares de ROS, generándose de tal manera un ambiente intracelular oxidativo.

La figura 2C corresponde a un gráfico temporal que muestra en conjunto los resultados de *qPCR* y de la medición de ROS intracelular hasta las 48h post-estímulo de TGF- β 1. Ambos resultados muestran que TGF- β 1 aumenta tempranamente la expresión de los mRNA de CTGF y NOX4, para posteriormente aumentar el de α -SMA. Esta respuesta a TGF- β 1 ocurre dentro de un contexto de aumento del tenor oxidativo intracelular, generado probablemente por el aumento temprano de la expresión de NOX4.

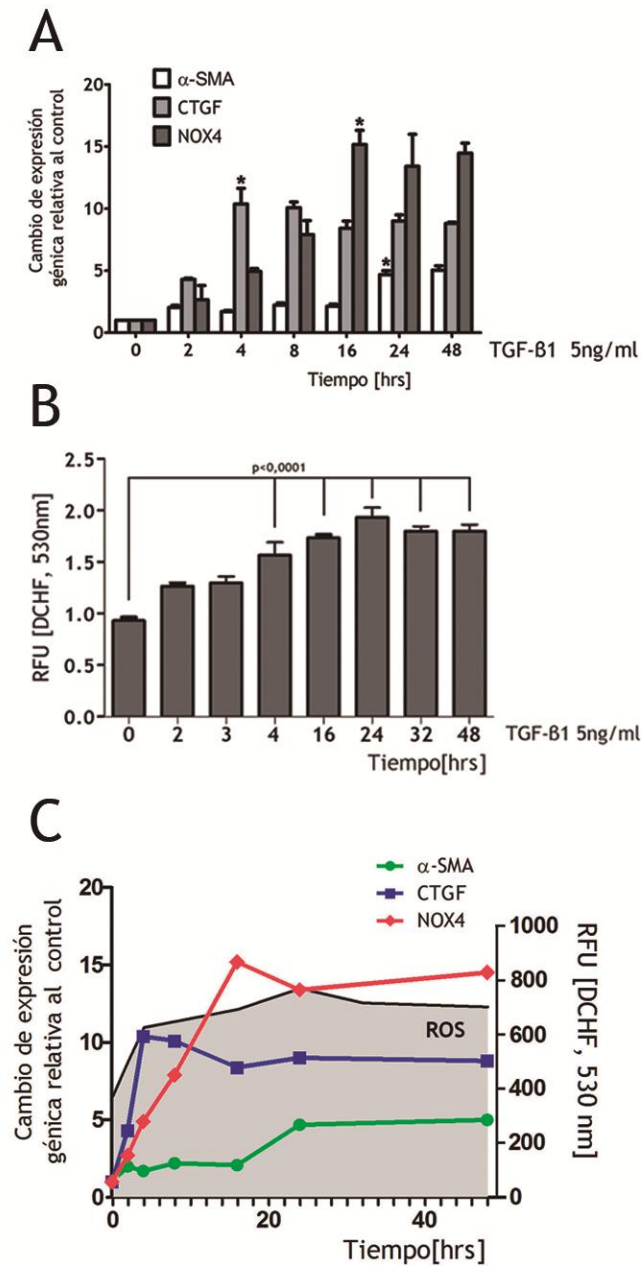


Figura 2: TGF-β1 aumenta la expresión de los mensajeros de CTGF, NOX4 y α-SMA además de los niveles intracelulares de ROS. Células RMF-EG se estimularon con 5ng/mL de TGF-β1 durante los tiempos indicados. **A)** Ensayo de *qPCR* muestra el aumento temprano de los mRNA de CTGF y NOX4, y un posterior aumento de α-SMA en respuesta a TGF-β1. * $p < 0,0001$ **B)** Producción intracelular de ROS evaluada a través de la fluorescencia generada a partir de la incubación de las células con H₂DCFDA. Se observa que TGF-β1 aumenta significativamente la producción intracelular de ROS a partir de las 4h de estímulo. **C)** Curso temporal de la expresión de mRNAs y producción de ROS. Se observa que el aumento de los mRNA de CTGF, NOX4 y α-SMA en respuesta a TGF-β1, ocurre dentro de un contexto de aumento de tenor oxidativo. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3).

10.3 El aumento de NOX4 es necesario para la expresión de marcadores de miodiferenciación estimulada por TGF- β 1.

Debido a la baja especificidad del inhibidor DPI, que no distingue entre las distintas isoformas de NOX, se realizó un experimento en que se inhibió la expresión de NOX4 usando un siRNA específico para esta molécula para determinar si, efectivamente, NOX4 participa de la respuesta de miodiferenciación estimulada por TGF- β 1. Con este propósito, fibroblastos RMF-EG fueron transfectados con el siRNA para NOX4 (siRNA-NOX4) de acuerdo a la técnica descrita en la sección Material y Métodos.

Los niveles de α -SMA fueron evaluados en células RMF-EG transfectadas durante 24h con siRNA-Control o siRNA-NOX4 y posteriormente estimuladas durante 72h con 5ng/mL de TGF- β 1. Como se muestra en la figura 3, TGF- β 1 no logró aumentar los niveles del marcador α -SMA en células donde la expresión de NOX4 está disminuida con siRNA-NOX4, manteniéndose su expresión en niveles basales ($p < 0,0001$). Estos resultados demuestran concluyentemente que la miodiferenciación estimulada por TGF- β 1 en fibroblastos RMF-EG requiere específicamente de la actividad de NOX4.

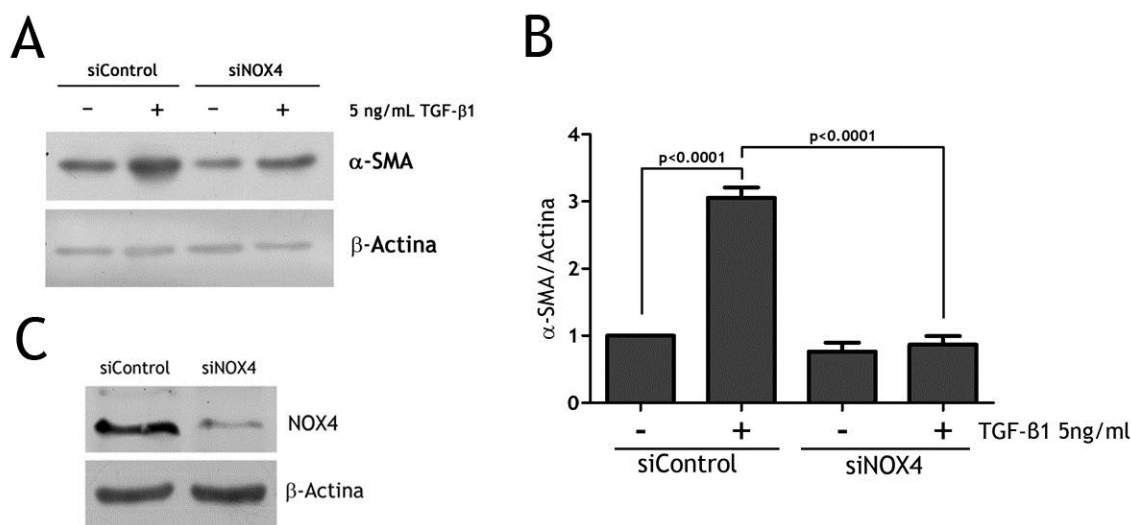


Figura 3: NOX4 ejerce un papel permisivo en la expresión de α SMA inducida por TGF- β 1 en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se transfectaron con siRNA-Control o siRNA-NOX4 durante 24h y posteriormente estimuladas con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 72h. *Western blot* representativo **(A)** y análisis densitométrico **(B)** que muestran la inhibición del aumento de α -SMA estimulado por TGF- β 1 debido al *knock-down* de NOX4. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (n=3). **(C)** *Western blot* representativo que muestra la disminución la expresión de NOX4 debido a la expresión del siRNA-NOX4. Este es un resultado representativo de tres experimentos independientes.

10.4 TGF- β 1 activa Smad2,3 y JNK1,2. Dependencia en la expresión de los marcadores de miodiferenciación.

Estudios de miodiferenciación han demostrado que el estímulo de TGF- β 1 modifica la respuesta celular mediante la activación de diversas vías de transducción entre las cuales, además de la ruta de proteínas Smads, se activan otras vías alternativas. Existen evidencias de que TGF- β 1 puede activar proteínas como ERK, TAK1, FAK y JNK, las que participan, junto con el aumento intracelular de ROS, en la inducción del fenotipo miofibroblástico (Shi-wen, 2009; Bondi, 2010; Sampson, 2011). Existen estudios que implican a JNK en la expresión de marcadores de miodiferenciación y remodelamiento del

citoesqueleto en fibroblastos que sufren diferenciación por TGF- β 1. Específicamente un estudio realizado por Smith y colaboradores en conjunto con nuestro laboratorio mostró que JNK participa en la expresión de α -SMA, en la miodiferenciación de fibroblastos gingivales estimulada por TGF- β 1 (Smith, 2006).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se estudió en células RMF-EG, la activación dependiente de TGF- β 1 de las rutas Smad2,3 y JNK1,2. La activación de ambas rutas se analizó mediante la inmunodetección de las formas fosforiladas de las proteínas Smad2,3 (Ser423/425), y JNK1,2 (Thr183/Tyr185) utilizando anticuerpos fosfo-específicos dirigidos a los residuos aminoacídicos señalados. La Figura 4A muestra que TGF- β 1 aumentó la fosforilación de Smad2,3 llegando a un máximo de activación a los 60min de estímulo. La figura 4B muestra que TGF- β 1 también aumenta la fosforilación de JNK1,2 a partir de los 30min ($p < 0,05$), llegando a un máximo a los 60min y manteniéndose elevada hasta al menos los 120min post-estímulo ($p < 0,0001$).

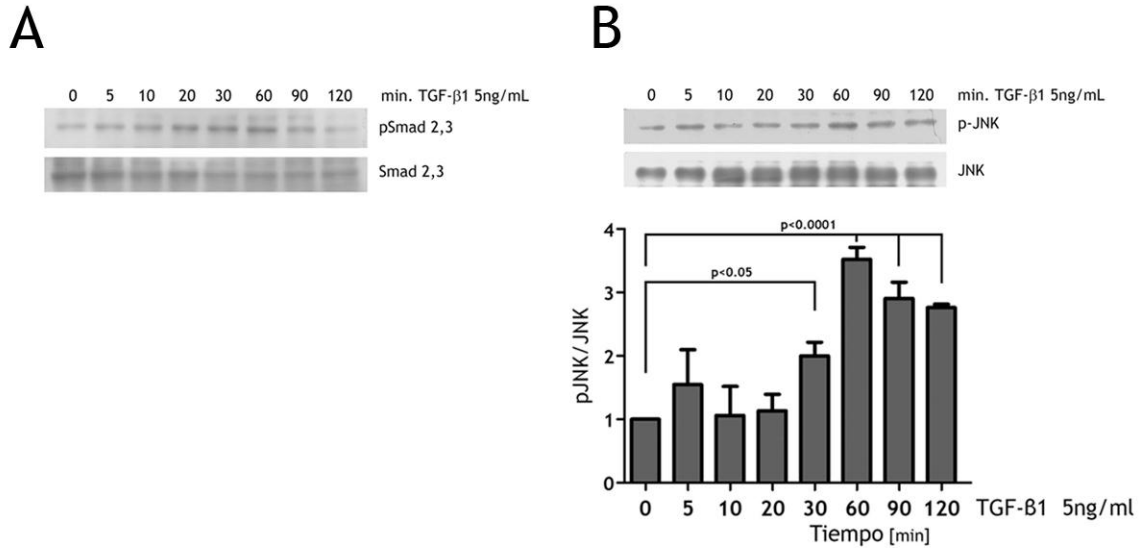


Figura 4: TGF-β1 activa las rutas de señalización Smad2,3 y JNK1,2 en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se privaron de suero durante 24h y posteriormente se estimularon con 5ng/mL de TGF-β1 durante los tiempos indicados. El nivel de fosforilación de Smad2,3 y JNK1,2 se determinó mediante *western blot* usando anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas de ambas moléculas. **A)** *Western blot* representativo que muestra la fosforilación de Smad2,3 en respuesta a TGF-β1 con un pico de activación a los 60min. **B)** *Western blot* y análisis densitométrico de la fosforilación de JNK1,2 en respuesta a TGF-β1 con un pico de activación a los 60min. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3).

Para evaluar si la activación de JNK1,2 es relevante en la mioidiferenciación estimulada por TGF-β1, se estudió la expresión de los marcadores de mioidiferenciación en presencia de un inhibidor específico de esta proteína, SP600125 (Merck, HE, DE). Para ello, las células se pre-incubaron con el inhibidor durante 30min y posteriormente se estimularon con 5ng/mL de TGF-β1. Como se muestra en la figura 5, en células pretratadas con SP600125, TGF-β1 no aumentó la expresión basal de α-SMA ni CTGF (p<0,0001). Estos resultados sugieren que la activación de JNK1,2 es necesaria para la mioidiferenciación de células RMF-EG estimulada por TGF-β1.

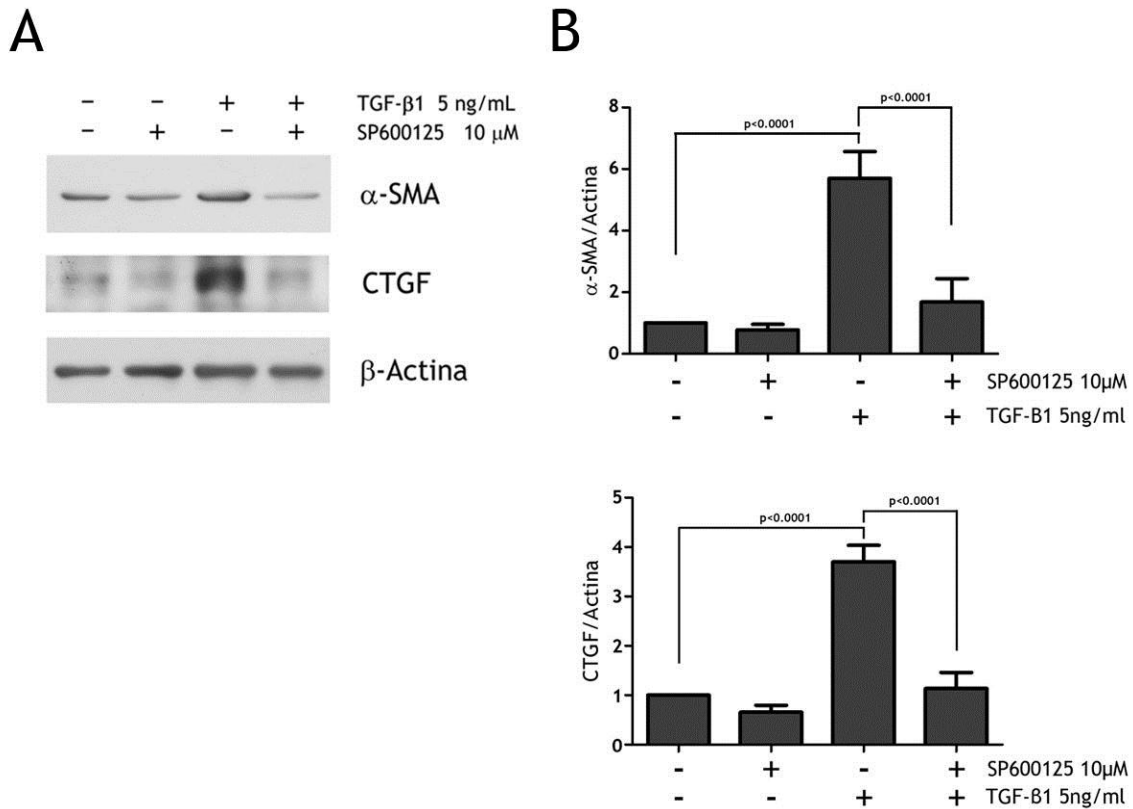


Figura 5: Efecto de la inhibición de JNK1,2 en la expresión de marcadores de miodiferenciación estimulada por TGF-β1, en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se preincubadas con el compuesto SP600125, inhibidor de JNK1,2 durante 30min y posteriormente estimuladas con 5ng/mL de TGF-β1 durante 72h. *Western blot* representativo **(A)** y análisis densitométrico **(B)** que muestra el bloqueo del estímulo por TGF-β1 de las proteínas α-SMA y CTGF debido a la inhibición de JNK1,2. La expresión de ambos marcadores se normalizó con respecto a β-Actina. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3).

10.5 La activación de JNK1,2 determina el aumento de la expresión de NOX4 y el aumento de ROS estimulados por TGF- β 1.

A continuación se evaluó la contribución de la activación de JNK1,2 al aumento de expresión de NOX4 estimulado por TGF- β 1. Para ello, previo al estímulo del factor (5ng/mL), las células se pre-incubaron con SP600125, inhibidor de JNK1,2. Como se muestra en la figura 6, en las células el pre-tratamiento con SP600125 previno el aumento de la expresión de NOX4 inducido por TGF- β 1 ($p < 0,01$).

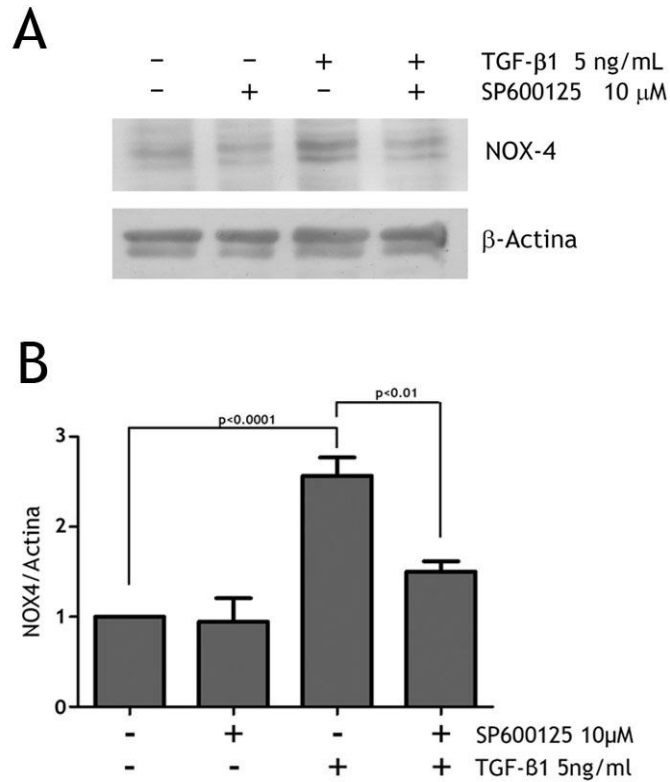


Figura 6: Efecto de la inhibición de JNK1,2 en la expresión de NOX4 estimulada por TGF- β 1, en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se pre-incubadas con el compuesto SP600125, inhibidor de JNK1,2, durante 30min y posteriormente estimuladas con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 30h. *Western blot* representativo (**A**) y análisis densitométrico (**B**) que muestran el bloqueo del aumento de NOX4 estimulado por TGF- β 1 debido a la inhibición de JNK1,2. La expresión de NOX4 se normalizó con respecto a β -Actina. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar ($n=3$).

Para corroborar si la inhibición de JNK1,2 sobre la expresión de NOX4 tiene también una consecuencia en la producción intracelular de ROS, analizamos sus niveles utilizando la sonda fluorescente H₂DCFDA en células estimuladas con 5ng/mL de TGF-β1 en presencia o ausencia del inhibidor SP600125. En la figura 7 podemos apreciar que el aumento de los niveles de ROS se bloqueó por el inhibidor de JNK1,2 sólo desde las 16h. A partir de las 32h, los niveles de ROS de las células pretratadas con el inhibidor vuelven a niveles basales ($p < 0,01$ vs condición estimulada), haciéndose la inhibición más evidente a las 48h ($p < 0,0001$ vs condición estimulada).

En conjunto estos resultados demuestran que JNK1,2 participaría en el aumento de los niveles proteicos de NOX4 estimulado por TGF-β1. Esta actividad se expresaría de modo más manifiesto en la mantención de un estado intracelular oxidativo prolongado.

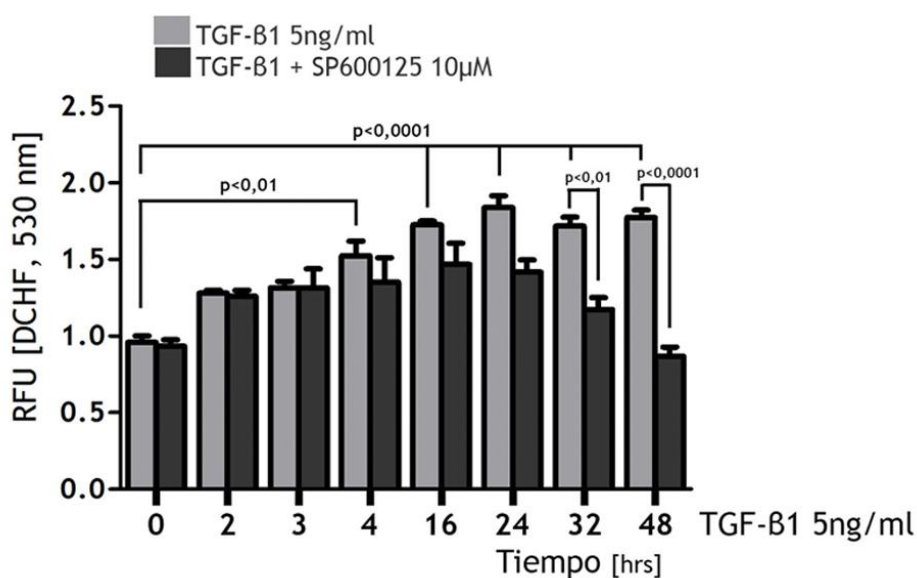


Figura 7: La activación de JNK1,2 promueve un aumento sostenido de los niveles intracelulares de ROS estimulados por TGF-β1 en fibroblastos RMF-EG. Células RMF-EG se pre-incubaron con SP600125, inhibidor de JNK1,2, durante 30min y posteriormente estimuladas con 5ng/mL de TGF-β1 durante los tiempos indicados. La producción intracelular de ROS se midió a través de la fluorescencia generada a partir de la incubación de las células con H₂DCFDA. TGF-β1 aumenta la producción intracelular de ROS. El pre-tratamiento con SP600125 evita que este aumento se mantenga en el tiempo, volviendo la producción de ROS a niveles basales a partir de las 32h de estímulo. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3).

10.6 La actividad NOX y la activación de JNK1,2 afectan la activación de Smad2,3 por TGF- β 1.

Dado que hemos establecido que tanto la actividad de NOX como la activación de JNK1,2 participan de la midiferenciación fibroblástica estimulada por TGF- β 1, se decidió investigar el posible efecto de ambos fenómenos sobre la activación de la ruta canónica de TGF- β 1. Para evaluar esta posibilidad se utilizó el plasmidio 3PT-Luc, que contiene el gen reportero de luciferasa acoplado al promotor de PAI-1 que responde a la activación de Smad3 (Kanasaki, 2003; Kano, 2005). Las células RMF-EG fueron transfectadas con el plasmidio 3PT-luc durante 6h para luego estimularlas durante 16h con 5ng/mL de TGF- β en presencia o ausencia distintas concentraciones de los inhibidores DPI y SP600125 (pre-tratamiento de 30min). Como podemos ver en la figura 8A, el estímulo de TGF- β 1 provocó un aumento de 15 veces en la actividad luciferasa, respecto a la condición control ($p < 0,0001$). Por otra parte vemos que una pre-incubación de 30min con el inhibidor DPI provocó una inhibición dosis dependiente que llega a ser significativa a una concentración de 5 μ M ($p < 0,01$). Del mismo modo, se observa que una pre-incubación de 30min con el inhibidor SP600125 provocó una inhibición dosis dependiente de la activación de Smad2,3 estimulada por TGF- β 1 ($p < 0,05$ para 5 μ M y $p < 0,0001$ para 10 μ M).

Para corroborar el resultado obtenido con los genes reporteros se realizó un experimento de *Inmunofluorescencia* en el que se evaluó la activación de la ruta Smad2,3 en células RMF-EG deprivadas de suero durante 24h y estimuladas con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 60min en presencia o ausencia de los inhibidores DPI o SP600125 (pre-tratamiento de 30min). Como se muestra en la figura 8B, TGF- β 1 aumenta los niveles de pSmad2,3 (azul) en comparación con la condición control. Esta activación disminuye significativamente en las condiciones pre-tratadas con DPI y SP600125, siendo este último el que provoca una inhibición más notoria. Al unir la marca de pSmad2,3 (azul) con

la marca del núcleo (rojo) se puede observar el grado de traslocación de pSmad2,3 (morado). De este modo, pudimos observar que el uso de ambos inhibidores disminuyó no sólo la fosforilación de Smad2/3 sino que además su traslocación al núcleo, requisito para que esta molécula lleve a cabo su función regulatoria. En conjunto, ambos resultados muestran que tanto la actividad NOX como la activación de JNK1,2 participan en la activación de Smad2,3 por TGF- β 1 en fibroblastos RMF-EG.

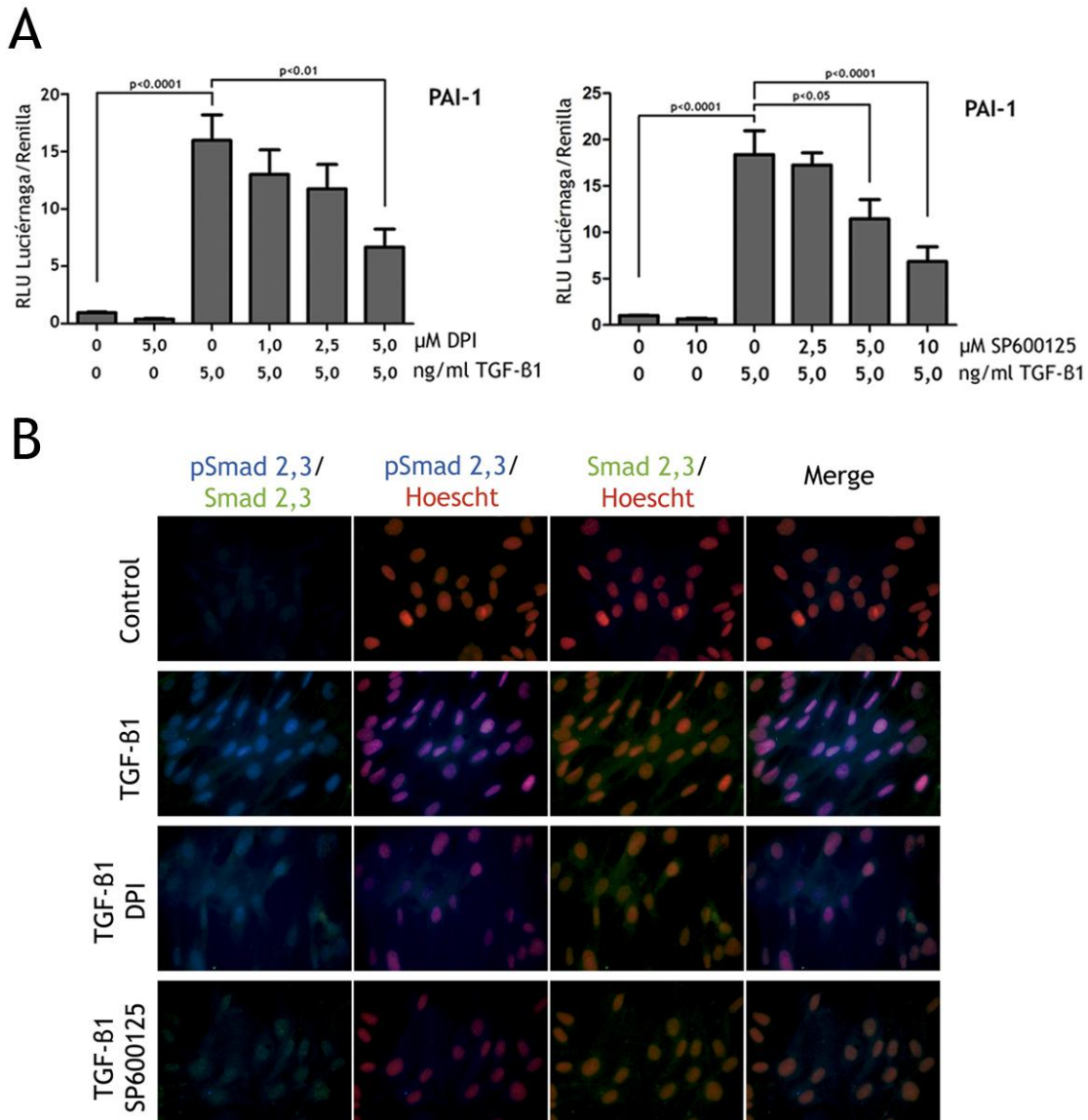


Figura 8: La activación de Smad2,3 por TGF-β1 en fibroblastos RMF-EG, depende de la actividad NOX y de la activación de JNK1,2. (A) Ensayo de genes reporteros para actividad de la ruta Smad3. Células RMF-EG se transfectaron con el plasmidio 3TP-Luc y el reportero Renilla-luc, como control de transfección, durante 6h. Posteriormente se pre-incubaron durante 30min con los compuestos SP600125 o DPI en las concentraciones indicadas y estimuladas con 5ng/mL de TGF-β1 durante 16h. Ambos inhibidores (DPI y SP600125) muestran una inhibición del aumento de actividad Smad3 estimulada por TGF-β1. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3). **(B)** *Inmunofluorescencia indirecta* para pSmad2,3. Células RMF-EG fueron pre-incubadas con 2,5μM de DPI o 10μM de SP600125 durante 30min y posteriormente estimuladas con 5 ng/mL de TGF-β1 durante 60min. El ensayo muestra que TGF-β1 aumenta la fosforilación de Smad2,3 y su traslocación al núcleo. Ambos fenómenos son bloqueados por el pre-tratamiento de las células con los inhibidores DPI o SP600125. Azul: pSmad2,3 marcado con anticuerpo acoplado a Alexa Fluor555. Verde: Smad2,3 marcado con anticuerpo acoplado a FITC. Rojo: núcleo marcado con Hoescht.

10.7 La activación de Smad2,3 requiere de la acción cooperativa de NOX4 y JNK1,2.

Finalmente, evaluamos el efecto conjunto de la modificación de los niveles de expresión de NOX4 y la activación de JNK1,2 sobre la ruta de señalización de Smad2,3. Para ello, realizamos un ensayo de reportero luciferasa con el plasmidio 3TP-Luc en células transfectadas con siRNA-Control o siRNA-NOX4 y cultivadas en presencia o ausencia de SP600125, inhibidor de JNK1,2. Las células RMF-EG se transfectaron en primer término con siRNA-Control o siRNA-NOX4 durante 24h y posteriormente con el plasmidio 3TP-luc y el plasmidio Renilla-luc (Promega, WI, US) como control de transfección durante 6h. Finalmente, las células se estimularon con 5ng/mL de TGF β 1 durante 16h en presencia o ausencia de 10 μ M de SP600125 (pre-tratamiento de 30min).

Como se observa en la figura 9, tanto en las células transfectadas con siRNA-Control como en aquellas que expresan el siRNA-NOX4, TGF- β 1 provocó un aumento significativo en la actividad luciferasa ($p < 0,0001$). En las células siRNA-Control, el pre-tratamiento con SP600125 disminuyó significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β 1 ($p < 0,0001$ con respecto a siRNA-Control + TGF- β 1). También se observa una disminución significativa en células que expresan siRNA-NOX4 ($p < 0,001$ respecto a siRNA-Control + TGF- β 1). La inhibición más drástica en estas condiciones experimentales se observó al estimular con TGF- β 1 células que expresaban siNOX4 y, además, se pre-trataron con el inhibidor de JNK lo que sugiere que tanto la expresión de NOX4 como la fosforilación de JNK1,2 son necesarios para una activación robusta de la ruta canónica de TGF- β 1, Smad2,3.

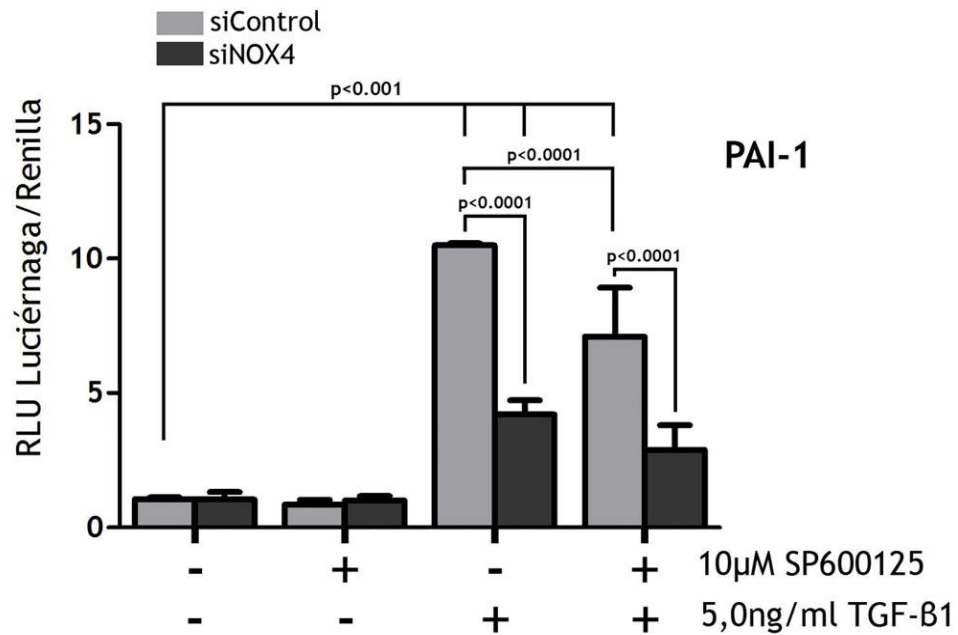


Figura 9: NOX4 y JNK1,2 cooperan para lograr una activación robusta de Smad2,3 estimulada por TGFβ1, en fibroblastos RMF-EG. Las células RMF-EG se transfectaron con un siRNA-Control o siRNA-NOX4 durante 24h y posteriormente transfectadas con el plasmidio 3TP-Luc y el reportero Renilla-luc, como control de transfección, durante 6h. A continuación las células se pre-incubaron con 10μM de SP600125 durante 30min y finalmente estimuladas con 5ng/mL de TGF-β1 durante 16h. Se observa que TGF-β1 estimula la actividad Smad2,3 la que resulta sensible a la expresión de siRNA-NOX4 y a la inhibición de JNK por SP600125. Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=3).

11. Discusión.

En el carcinoma mamario el desarrollo de un estroma pro-fibroso promueve y favorece la malignización de las células epiteliales (Radisky, 2007; Arendt, 2010). Se ha demostrado que el fenómeno desmoplástico que otorga una estructura rígida al tumor depende prioritariamente de la maquinaria fibrogénica de las células estromales estimulada por factores solubles generados por el epitelio. Este proceso, también conocido como estromagénesis, es orquestado por miofibroblastos, células que provienen principalmente de la diferenciación de fibroblastos residentes del tejido (Castello-Cros, 2009). Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, demostró que el co-cultivo de células epiteliales tumorales poco invasivas (MCF-7) con células estromales no tumorales, RMF-EG, provoca un aumento de la capacidad migratoria epitelial. Este efecto fue inhibido al pre-incubar las células RMF-EG con un inhibidor de TGF- β 1, lo que sugiere que esta citoquina actúa sobre las células estromales generando factores que promueven la migración celular (Tobar, 2010). Se ha demostrado que factores de crecimiento de la familia TGF- β son capaces de estimular la miodiferenciación de fibroblastos y promover su persistencia en los tejidos. Esta acción genera una acumulación de proteínas de MEC que es responsable de la consistencia rígida que caracteriza estos tumores. En el presente trabajo demostramos que el estímulo de TGF- β 1 sobre fibroblastos no-tumorales de mama RMF-EG, provoca la expresión de los marcadores de miofibroblastos como α -SMA y CTGF. Consecuente con lo anterior, también pudimos observar una re-estructuración del citoesqueleto de actina en respuesta a TGF- β 1 compatible con un fenotipo miofibroblástico con capacidad contráctil y expresión de proteínas de MEC. En el trabajo mencionado anteriormente también se demostró que el efecto sobre la migración de células MCF-7 de los factores solubles provenientes de

células estromales RMF-EG, era sensible al inhibidor DPI, bloqueador de la actividad NOX. Consecuentemente, este trabajo muestra que tanto la expresión de marcadores de miodiferenciación como la formación de filamentos de actina estimulada por TGF- β 1 en células RMF-EG, fue también inhibida por DPI.

El hecho que la miodiferenciación inducida por TGF- β 1 sea sensible a DPI sugiere que este evento depende de la actividad de NOX y de un eventual aumento de los niveles intracelulares de ROS. La evaluación del curso temporal de la expresión del mensajero para NOX4 mediante qPCR nos permitió observar que TGF- β 1 provoca un aumento temprano del mensajero de NOX4. Consecuentemente, observamos un aumento temprano de los niveles de ROS que mantienen un ambiente intracelular oxidativo por al menos 48hrs post-estímulo. Estos resultados concuerdan con estudios que establecen que procesos fibróticos asociados y no asociados a carcinoma, requieren del establecimiento previo de un estrés oxidativo. Más aún, un estudio realizado por Toullec y colaboradores demostró que el aumento en la producción de ROS en el estroma asociado a carcinoma mamario, fue suficiente para provocar la miodiferenciación de fibroblastos y aumentar la propagación metastásica de las células tumorales (Toullec, 2010). Diversos estudios implican a las enzimas NOX en el aumento de ROS asociado a miodiferenciación de fibroblastos en distintos tejidos, específicamente la isoforma NOX4 (Cucoranu, 2005; Bondi, 2010; Sampson, 2011). Las células RMF-EG expresan dos isoformas de esta enzima, NOX4 y NOX5, sin embargo únicamente NOX4 responde de manera temprana al estímulo de TGF- β 1, aumentando su expresión (Tobar, 2010). Este hallazgo fue ratificado bloqueando la expresión de NOX4 mediante el uso de un siRNA-NOX4. De este modo, pudimos demostrar con certeza que la expresión y actividad de esta isoforma de NOX es responsable del aumento de α -SMA estimulado por TGF- β 1.

El análisis temporal de la expresión de mensajeros por q-PCR también mostró un aumento temprano del mensajero de CTGF. Se ha demostrado previamente que CTGF aumenta su expresión en respuesta a TGF- β 1 (el gen que codifica para GTGF posee en su secuencia promotora elementos de respuesta a Smad) y cumple un rol clave en la formación de tejido conectivo estimulada por TGF- β 1 en diversos desórdenes fibróticos (Xie, 2005). En un estudio realizado por Shi-Wen y colaboradores en que utilizaron un modelo de fibroblastos embrionarios (MEFs) extraídos de ratones *knock-out* para CTGF, demostraron que de los 942 genes que responden normalmente a TGF- β 1, sólo 345 respondieron en ausencia de CTGF lo que convierte a esta molécula en un elemento clave en la diferenciación miofibroblástica inducida por el factor. Estos mismos autores observaron que ante el estímulo TGF- β 1, los fibroblastos *knock-out* mostraron una menor expresión de fibronectina, colágeno I y α -SMA además de un retraso en la formación de fibras de Actina (Shi-wen, 2006). En un estudio realizado el año 1999, el estímulo aislado de TGF- β 1 o CTGF en ratones neonatos resultó en la formación transitoria de tejido granular, sin embargo el estímulo de ambos produjo un tejido fibrótico persistente (Mori, 1999). Estas y otras evidencias han permitido establecer que CTGF actúa como co-factor de TGF- β 1, siendo necesario para las respuestas de proliferación y miodiferenciación de fibroblastos. La estimulación temprana de la expresión de CTGF en fibroblastos RMF-EG observada en este trabajo, podría significar un evento clave para la expresión sostenida de α -SMA y la formación de filamentos de Actina. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para confirmar si este aumento temprano de CTGF es requisito para la miodiferenciación de las células RMF-EG.

La acción de TGF- β se puede ejercer a través de diversos mecanismos que comprometen distintas rutas de señalización. La más estudiada es la ruta canónica que implica a proteínas Smads, sin embargo, existen otros mediadores que pueden modular la

respuesta a TGF- β y han sido denominadas rutas alternativas o *no-Smads*. Estas rutas alternativas han adquirido cada vez mayor importancia y, en muchos casos, han logrado explicar la amplia variedad de respuestas celulares que tiene este factor de crecimiento. En este trabajo observamos que además de activar su ruta canónica, Smad2,3, TGF- β 1 activa JNK1,2 alcanzando un pico de fosforilación a los 60min. En otros modelos celulares, la ruta JNK1,2 ha sido implicada en la respuesta fibrótica de TGF- β 1 y el aumento de la expresión de α -SMA y la re-estructuración del citoesqueleto (Smith, 2006). Sin embargo, el rol específico que juega JNK1,2 en la señalización de TGF- β 1 y las consecuencias funcionales de la activación de esa vía no han sido aún completamente dilucidados. En este trabajo demostramos que la activación de JNK1,2 por TGF- β 1 es, efectivamente, necesaria para el aumento de la expresión de α -SMA, marcador de miofibroblastos. Además demostramos que la activación de esta proteína participa en los eventos más tempranos de la miodiferenciación estimulada por TGF- β 1, ya que la inhibición de su fosforilación previene el aumento en la expresión de CTGF y NOX4. Además inhibe el aumento sostenido de los niveles de ROS, previniendo la mantención de un ambiente intracelular oxidativo.

En una revisión de Moustakas y Heldin, que analiza las vías de señalización alternativas de TGF- β descritas, los autores clasifican estas vías en tres grupos según su mecanismo de acción. (1) Rutas que interactúan con el receptor de TGF- β y modifican la función de proteínas Smads; (2) Rutas que son moduladas (corriente arriba) por las proteínas Smads; y (3) Rutas que interactúan con el receptor de TGF- β y no requieren de la activación previa de proteínas Smads para ejercer la respuesta celular (Moustakas, 2005). La mayoría de los estudios de miodiferenciación estimulada por TGF β 1 que reportan una activación de vías de señalización alternativas a Smads, no determinan el mecanismo por el cual estas actúan o si tienen alguna relación con la ruta canónica. Una

excepción es el trabajo de Bondi y colaboradores en que se demuestra que TGF- β provoca la modiferenciación de fibroblastos renales a través de una ruta en que T β RI aumenta los niveles de NOX4 a través de Smad3, lo que produce un aumento de los niveles intracelulares de ROS, lo que finalmente activa la ruta MEK/ERK. Este modelo representa un mecanismo de ruta alternativa tipo (2) según la clasificación de Moustakas y Heldin. En el presente trabajo, demostramos que el aumento de NOX4 y la fosforilación de JNK1,2 ocurren tempranamente, por lo que se pensó que estos podrían ser activados a través de T β RI es decir, un mecanismo tipo (1) o (3).

En nuestros resultados pudimos observar que la fosforilación de JNK1,2 afecta la fosforilación y traslocación al núcleo de Smad2,3 estimulada por TGF- β 1. Además el estudio realizado con el reportero 3TP-Luc demostró que SP600125 (inhibidor de la ruta JNK) bloquea la activación de Smad3. Estos resultados sugieren que JNK1,2 en este modelo celular, actuaría según el mecanismo tipo (1) de rutas alternativas, afectando la activación de la ruta canónica de TGF- β 1. En diversos modelos celulares se ha observado que la activación de JNK1,2 por TGF- β 1 ocurriría a través de las proteínas quinasa activada por TGF- β 1 (TAK-1) y quinasa de adhesión focal (FAK), lo que coincide con una activación de JNK1,2 independiente de Smad2,3. Sin embargo se necesitarían estudios adicionales para descartar una posible influencia de Smad2,3 sobre la activación de JNK1,2.

El análisis de la *Inmunofluorescencia* mostrada en la Figura 8B nos permitió observar que el uso de DPI también inhibió la activación y traslocación de Smad 2,3, pero en un grado menor que la inhibición de JNK por SP600125. Por su parte, el uso del gen reportero 3pT-luc para evaluar la activación de Smad3 mostró que DPI inhibió la actividad de Smad3, sólo a concentraciones elevadas (5 μ M). Para poder determinar, por lo tanto, si el nivel redox intracelular tiene un efecto en la activación de la ruta canónica de TGF- β 1,

realizamos un ensayo de reportero luciferasa en que se utilizaron células transfectadas con un siRNA-NOX4. Además, en este ensayo se realizó en presencia o ausencia de SP600125, de manera de poder analizar el efecto de la inhibición de NOX4 y JNK1,2, tanto por separado como en conjunto, sobre la activación de la ruta. Este experimento mostró que la inhibición del estímulo de TGF- β 1, por el inhibidor de JNK1,2 es más notoria en células que expresan menores niveles de NOX4. Estos datos sugieren que el efecto de JNK1,2 sobre la activación de Smad3 necesita de un nivel oxidativo intracelular mínimo, requisito que no se cumple en células siRNA-NOX4. Por otra parte, las células siRNA-NOX4 parecen tener una sensibilidad mayor al efecto inhibitorio de SP600125. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que ambas condiciones, nivel redox intracelular e integridad de la ruta JNK, ejercen un efecto cooperativo sobre una activación robusta de Smad3.

En resumen, este trabajo demuestra que TGF- β 1 estimula la midiferenciación de fibroblastos no-tumorales de mama RMF-EG, a través de un mecanismo que involucra la activación de JNK1,2, el aumento de expresión de NOX4 y, consecuentemente, el establecimiento de un ambiente oxidativo elevado. Además, definimos que, como parte de la respuesta temprana a TGF- β 1 se observan el aumento de los mensajeros de CTGF y NOX4. Finalmente demostramos que tanto la activación de JNK1,2 como la actividad de NOX4 son necesarias para una activación robusta de la ruta canónica de TGF- β 1, Smad2,3.

12. Conclusiones.

El trabajo realizado en esta memoria de título buscaba estudiar los mecanismos involucrados en la miodiferenciación de fibroblastos mamarios no tumorales RMF-EG, en respuesta a TGF- β 1 y la influencia del estado redox en este proceso. A partir de los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

- a. La miodiferenciación de fibroblastos RMF-EG estimulada por TGF- β 1 requiere de un estado redox mínimo, que se establece luego de una serie de eventos celulares que incluye un aumento de la expresión de la enzima NOX4.
- b. TGF- β 1 aumenta de manera temprana la expresión de CTGF y NOX4, mientras que la expresión de α -SMA ocurre de manera tardía.
- c. La activación de JNK1,2 estimulada por TGF- β 1 es un paso esencial tanto para el aumento de expresión de NOX4 como para la mantención sostenida de un ambiente intracelular oxidativo.
- d. La expresión de NOX4 y la activación de JNK1,2 cooperan para lograr una activación robusta de la ruta canónica Smad2,3.

Este estudio entrega información fundamental para comprender los mecanismos iniciales que dirigen la respuesta de TGF- β 1, factor abundante del microambiente tumoral. Es un hecho conocido que modificaciones tempranas, ocurridas tanto a nivel estromal como epitelial, determinan en gran medida el resultado del fenómeno carcinogénico. Dado que algunas de estas transformaciones han demostrado ser reversibles es posible pensar en un abordaje terapéutico temprano focalizado en el estroma. Nuestros resultados muestran claramente que uno de los eventos fundamentales que favorece la mioidiferenciación de fibroblastos mamarios, etapa inicial de la estromagénesis, es el aumento sostenido de ROS, debido a un aumento en la expresión de NOX4. También es interesante el aumento temprano de la expresión de CTGF, que ha sido asociado a diversos desórdenes fibróticos. Además se demostró que la mioidiferenciación en respuesta a TGF- β 1 es fundamental la activación de la ruta alternativa JNK1,2. Estos resultados son una buena base para estudios posteriores que permitan determinar con certeza los participantes más relevantes en los procesos de malignización del cáncer de mama.

13. Bibliografía.

Arendt, L. M., J. A. Rudnick, et al. (2010). "Stroma in breast development and disease." *Semin Cell Dev Biol* 21(1): 11-8.

Bachem, M. G., M. Schunemann, et al. (2005). "Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells." *Gastroenterology* 128(4): 907-21.

Beacham, D. A. and E. Cukierman (2005). "Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression." *Semin Cancer Biol* 15(5): 329-41.

Berking, C., R. Takemoto, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling." *Cancer Res* 61(22): 8306-16.

Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." *Nat Rev Cancer* 1(1): 46-54.

Blanchetot, C. and J. Boonstra (2008). "The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18(1): 35-45.

Bocchino, M., S. Agnese, et al. (2010). "Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis." *PLoS One* 5(11): e14003.

Bondi, C. D., N. Manickam, et al. (2010). "NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts." *J Am Soc Nephrol* 21(1): 93-102.

Cai, G. Q., C. F. Chou, et al. (2012). "Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is critical for formation of alpha-smooth muscle actin filaments during myofibroblast differentiation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(8): L692-702.

Casey, T. M., J. Eneman, et al. (2008). "Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study." *Breast Cancer Res Treat* 110(1): 39-49.

Castello-Cros, R. and E. Cukierman (2009). "Stromagenesis during tumorigenesis: characterization of tumor-associated fibroblasts and stroma-derived 3D matrices." *Methods Mol Biol* 522: 275-305.

Cichon, M. A., A. C. Degnim, et al. (2010). "Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(4): 389-97.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-7.

Cucoranu, I., R. Clempus, et al. (2005). "NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts." *Circ Res* 97(9): 900-7.

Chen, Y., X. Shi-wen, et al. (2006). "Contribution of activin receptor-like kinase 5 (transforming growth factor beta receptor type I) signaling to the fibrotic phenotype of scleroderma fibroblasts." *Arthritis Rheum* 54(4): 1309-16.

Darby, I., O. Skalli, et al. (1990). "Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing." *Lab Invest* 63(1): 21-9.

De Wever, O. and M. Mareel (2003). "Role of tissue stroma in cancer cell invasion." *J Pathol* 200(4): 429-47.

Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* 425(6958): 577-84.

Desmouliere, A., C. Guyot, et al. (2004). "The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior." *Int J Dev Biol* 48(5-6): 509-17.

Dugina, V., L. Fontao, et al. (2001). "Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors." *J Cell Sci* 114(Pt 18): 3285-96.

Egeblad, M., L. E. Littlepage, et al. (2005). "The fibroblastic coconspirator in cancer progression." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70: 383-8.

Elenbaas, B. and R. A. Weinberg (2001). "Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation." *Exp Cell Res* 264(1): 169-84.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* 140(6): 883-99.

Guerrero, J., N. Tobar, et al. (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(2): 497-508.

Halliwell, B. (2007). "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" *Biochem J* 401(1): 1-11.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-74.

Hecker, L., R. Vittal, et al. (2009). "NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury." *Nat Med* 15(9): 1077-81.

Hu, B., Z. Wu, et al. (2003). "Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(3 Pt 1): 397-404.

Huse, M., T. W. Muir, et al. (2001). "The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch." *Mol Cell* 8(3): 671-82.

Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nat Rev Cancer* 9(4): 239-52.

Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.

Kanasaki, K., D. Koya, et al. (2003). "N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits TGF-beta-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression via inhibition of Smad pathway in human mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* 14(4): 863-72.

Kessenbrock, K., V. Plaks, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." *Cell* 141(1): 52-67.

Kim, H., J. Watkinson, et al. (2010). "Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1." *BMC Med Genomics* 3: 51.

Kumar, B., S. Koul, et al. (2008). "Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype." *Cancer Res* 68(6): 1777-85.

Kunz-Schughart, L. A. and R. Knuechel (2002). "Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression?" *Histol Histopathol* 17(2): 599-621.

Kuperwasser, C., T. Chavarria, et al. (2004). "Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4966-71.

Leask, A. (2010). "Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation." *Circ Res* 106(11): 1675-80.

Li, G., K. Satyamoorthy, et al. (2003). "Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil." *Oncogene* 22(20): 3162-71.

Maffini, M. V., A. M. Soto, et al. (2004). "The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1495-502.

Massague, J. and R. R. Gomis (2006). "The logic of TGFbeta signaling." *FEBS Lett* 580(12): 2811-20.

Mori, T., S. Kawara, et al. (1999). "Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model." *J Cell Physiol* 181(1): 153-9.

Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." *J Cell Sci* 118(Pt 16): 3573-84.

Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* 4(11): 839-49.

Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res* 59(19): 5002-11.

Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121(3): 335-48.

Padua, D. and J. Massague (2009). "Roles of TGFbeta in metastasis." *Cell Res* 19(1): 89-102.

Park, S., J. Y. Ahn, et al. (2010). "Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38 MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts." *J Mol Med (Berl)* 88(8): 807-16.

Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." *Exp Cell Res* 316(8): 1324-31.

Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." *Cell* 141(1): 39-51.

Radisky, E. S. and D. C. Radisky (2007). "Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion." *Rev Endocr Metab Disord* 8(3): 279-87.

Roberts, A. B. and L. M. Wakefield (2003). "The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15): 8621-3.

Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen, et al. (1995). "The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells." *J Clin Invest* 95(2): 859-73.

Roy, S. G., Y. Nozaki, et al. (2001). "Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts." *Int J Biochem Cell Biol* 33(7): 723-34.

Sampson, N., R. Koziel, et al. (2011). "ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma." *Mol Endocrinol* 25(3): 503-15.

Shen, W. L., P. J. Gao, et al. (2006). "NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin-II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 339(1): 337-43.

Shi-wen, X., S. K. Parapuram, et al. (2009). "Requirement of transforming growth factor beta-activated kinase 1 for transforming growth factor beta-induced alpha-smooth muscle actin expression and extracellular matrix contraction in fibroblasts." *Arthritis Rheum* 60(1): 234-41.

Shi-wen, X., L. A. Stanton, et al. (2006). "CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts." *J Biol Chem* 281(16): 10715-26.

Siegel, P. M., W. Shu, et al. (2003). "Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8430-5.

Singh-Ranger, G., M. Salhab, et al. (2008). "The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review." *Breast Cancer Res Treat* 109(2): 189-98.

Smith, P. C., M. Caceres, et al. (2006). "Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor-beta1: role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways." *J Periodontal Res* 41(5): 418-25.

Stampfer, M. R., J. Garbe, et al. (2001). "Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor beta growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4498-503.

Tobar, N., J. Guerrero, et al. (2010). "NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration." *Br J Cancer* 103(7): 1040-7.

Toullec, A., D. Gerald, et al. (2010). "Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading." *EMBO Mol Med* 2(6): 211-30.

Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, et al. (2001). "Reactive stroma in prostate cancer progression." *J Urol* 166(6): 2472-83.

Wakefield, L. M. and A. B. Roberts (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 22-9.

Wakefield, L. M. and M. B. Sporn (1990). "Suppression of carcinogenesis: a role for TGF-beta and related molecules in prevention of cancer." *Immunol Ser* 51: 217-43.

Weaver, V. M. and P. Gilbert (2004). "Watch thy neighbor: cancer is a communal affair." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1287-90.

Wrana, J. L., L. Attisano, et al. (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." *Nature* 370(6488): 341-7.

Xie, S., M. B. Sukkar, et al. (2005). "Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(1): L68-76.

Yue, J. and K. M. Mulder (2000). "Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway." *J Biol Chem* 275(40): 30765-73.