

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***SOBREEXPRESIÓN DE TRPM4 Y KCTD5 COMO
BIOMARCADORES DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE
NEGATIVO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al
Título de Bioquímico por:**

Nicolás Armando Díaz Véliz

Director de Tesis: Dr. Oscar Alejandro Cerda Arancibia

Santiago-CHILE

Julio 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

NICOLÁS ARMANDO DÍAZ VÉLIZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Oscar Cerda Arancibia _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Chiong _____

Dra. Lilian Jara _____

Dra. Carmen Romero _____

"A medida que la ciencia se vuelve más abstracta y en consecuencia más lejana de los problemas, de las preocupaciones, de las palabras, de la vida diaria, su utilidad aumenta en la misma proporción (...). El poder de la ciencia se adquiere gracias a una especie de pacto con el diablo: a costa de una progresiva evanescencia del mundo cotidiano. Llega a ser monarca, pero, cuanto lo logra, su reino es apenas un reino de fantasmas"

Ernesto Sabato, Uno y el Universo (1945)

*Para y por mí,
mi familia, mis amigos,
mis amigos del laboratorio
y mi Asuka*

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el Núcleo Milenio de enfermedades asociadas a canales iónicos (MiNICAD) y el Proyecto FONDECYT Regular 1160518 del Dr. Oscar Alejandro Cerda Arancibia.

INDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	I
INDICE GENERAL	II
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
SUMMARY	X
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	11
METODOLOGÍA	12
Cultivo celular	12
Extracción de RNA	12
Tratamiento con DNasa I	12
Retrotranscripción	13
Diseño de partidores	13
qPCR	13
Electroforesis e inmunoblot	15
Inmunohistoquímica	16
Ensayo de inmunofluorescencia	16

Estadística	17
RESULTADOS	18
Determinación de condiciones de ensayo qPCR	18
Expresión diferencial de mRNA de TRPM4 Y KCTD5 en líneas celulares modelo de cáncer de mama	20
TRPM4 y KCTD5 se expresan de forma diferencial en líneas de cáncer de mama a nivel proteico.	22
La expresión de TRPM4 y KCTD5 aumenta en determinados subgrupos de pacientes de cáncer de mama.	24
Diferencia en niveles proteicos de TRPM4 y KCTD5 en líneas celulares son detectables por Inmunofluorescencia.	30
TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan a nivel proteico en tumores triple negativo.	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resumen de tipos de cáncer de mama.	5
Tabla 2.- Partidores seleccionados para qPCR.	19

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Eficiencia de PCR para genes blanco.	19
Figura 2.- mRNA de TRPM4 y KCTD5 se expresan diferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama.	22
Figura 3.- Expresión proteica diferencial de TRPM4 y KCTD5 en líneas celulares de cáncer mama.	23
Figura 4.- mRNAs de TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan en pacientes de cáncer de mama.	26
Figura 5.- Expresión de mRNA de TRPM4 y KCTD5 no se correlacionan con edad y estadios clínicos.	27
Figura 6.- mRNAs de TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan en tumores agresivos.	29
Figura 7.- Localización y niveles de TRPM4 y KCTD5 varían entre las líneas celulares MF10A, T47D, MDA-MB-231 y MCF7.	31
Figura 8.- Expresión de TRPM4 y KCTD5 en tejido tumoral.	33

Abreviaturas

BTB: Bric-a-Brack, Tram Track, Broad

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

Ct: Ciclo Umbral

DMEM: Medio Dulbecco Eagle Modificado

DPBS: Amortiguador Dulbecco Fosfato Salino

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ER: Receptor de Estrógenos

FBS: Suero Fetal Bovino

FISH: Hibridación fluorescente in situ

HER2: Receptor 2 del factor epidérmico humano

IHQ: Inmunohistoquímica

KCTD5: Domino de Tetramerización del Canal de Potasio 5

KLHL22: Proteína similar a Kelch 22

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mTORC1: complejo diana de rapamicina en mamífero 1

PgR: Receptor de Progesterona

PIC: Cocktail de Inhibidores de Proteasas

PMSF: Fenil Metil Sulfonil Fluoruro

qPCR: Reacción en cadena polimerasa cuantitativa

RAC1: Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con el Ras

RNA: Ácido ribonucleico

RSB: Buffer reductor

RT: Retrotranscripción

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio

SDS: Dodecilsulfato de Sodio

SE: Suero Equino

TBS: Tris Salino Tamponado

Tris: Tris (Hidroximetil) aminometano

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPM4: canal catiónico receptor de potencial transitorio subfamilia M miembro 4

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las principales afecciones en mujeres chilenas, afectando a 32/100.000 mujeres y con una tasa de mortalidad de 14,5, lo que vuelve necesario la búsqueda de mejoras en la detección e identificación rápida y precisa. El cáncer de mama se puede clasificar respecto a distintos parámetros, tales como el cuadro clínico de la enfermedad o las propiedades histológicas del tumor, pero uno de los métodos con mayor utilidad por su valor pronóstico y predictivo es la tipificación por los siguientes biomarcadores proteicos; Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona, el Receptor 2 de factor Epidérmico Humano y la proteína Ki-67, todos detectados por inmunohistoquímica. Su patrón de expresión permite identificar el subtipo de cáncer, pronóstico y terapia correspondiente. Uno de los problemas que comparten todas las tipificaciones de cáncer de mama es su limitada precisión; carcinomas con los mismos marcadores no responden de igual manera a la terapia, debido a que la clasificación existente no es lo suficientemente precisa. Es por esto por lo que la identificación de nuevos biomarcadores moleculares que permitan tipificar con mayor precisión los distintos carcinomas es necesaria.

Dentro de las proteínas con expresión dispar entre los tejidos sanos y tumorales se encuentra la superfamilia de canales iónicos TRP (Receptores de Potencial Transitorio). La expresión de miembros de la superfamilia se ha visto alterada en distintos cánceres, tales como el colorrectal y estomacal. Uno de sus miembros es TRPM4, un canal de cationes monovalentes regulado por Ca^{2+} , involucrado en eventos celulares relacionados a la progresión del cáncer y que presenta una expresión está alterada en distintos tipos de la enfermedad. Una de

las proteínas reguladoras de TRPM4 es KCTD5, una proteína adaptadora que forma parte del complejo de ubiquitinación Cul3, actúa como regulador positivo del canal. En nuestro laboratorio hemos encontrado que KCTD5 participa en la migración y proliferación celular. Datos provenientes de bases bioinformáticas sugieren que ambos genes se sobreexpresan en pacientes con temprana mortalidad, lo que indicaría un posible valor diagnóstico de ambas proteínas en esta patología, por lo que se propone a TRPM4 y KCTD5 como posibles biomarcadores en cáncer de mama. Para evaluar esto se determinaron los niveles del mRNA de ambos genes por medio de RT-qPCR en líneas celulares modelo de cáncer de mama, posteriormente estos datos se compararon con la expresión proteica evaluada por Inmunoblot. Con el fin de correlacionar los datos obtenidos con lo observado en el modelo celular con el diagnóstico clínico de los distintos tipos de la enfermedad, se evaluaron la expresión de sus mRNA en micro arreglos de cDNA de muestras de tejidos tumorales y tejidos sanos que poseen detallado el historial clínico de los pacientes. Finalmente, se realizó inmunohistoquímica en muestras de pacientes para comparar los niveles de expresión de mRNA y proteína en los distintos tipos y estadios de la enfermedad. Se encontró que ambos genes se sobreexpresan a nivel de mRNA y proteína en diferentes subtipos de la enfermedad, especialmente en los pacientes triple negativo, que sufren una alta mortalidad en el corto plazo y carecen de tratamientos específicos. Por lo que tanto, TRPM4 como KCTD5 parecen buenos candidatos como marcadores para detección o posibles blancos terapéuticos asociados a este subtipo.

SUMMARY

TRPM4 and KCTD5 expression as possible Breast Cancer Biomarkers.

Breast cancer is one of the main conditions in Chilean women, affecting 32/100,000 women and with a mortality rate of 14.5. Thus, the improvements in the detection and rapid and accurate subtype identification are one way of decreasing this numbers.

Breast cancer can be classified according to different parameters, such as the clinical parameters related to the disease or the tumor histological properties. However, one of the most useful methods because of its prognostic and predictive value is the immunohistochemistry-based typification by protein biomarkers, such as Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PgR), Receptor 2 of Human Epidermal Factor (HER2) and Ki-67 protein levels. The expression pattern of these proteins allows to identify the cancer subtype, its prognosis and corresponding therapy. One of the problems shared by all types of breast cancer typification is its limited accuracy. Carcinomas with the same markers do not respond in the same way to therapy, because the existing classification is not specific enough. Thus, the identification of new molecular biomarkers is important, since it will allow more accurate identification of breast cancer subtypes.

Among the proteins with altered expression between healthy and tumor tissue, there are the TRP channels (Transient Receptor Potential) superfamily. Members of this superfamily have been reported as altered in different cancer types, such as colorectal and gastric cancer. One of these channels is TRPM4, a calcium activated non-selective monovalent cation channel involved in cellular events related to cancer

progression, such as migration and proliferation. It has been reported that its expression is altered in different types of the disease. One of the proteins that regulate TRPM4 activity is KCTD5, an adaptor protein that is part of the Cul3 Ubiquitination complex, acting as a positive regulator of the channel. We have found that KCTD5 also regulates cell migration and proliferation. Data from bioinformatic databases suggest that expression of both TRPM4 and KCTD5 is altered in breast cancer at different stages, which would indicate a possible diagnostics value of these proteins. As such TRPM4 and KCTD5 are proposed as possible biomarkers in breast cancer. To evaluate this, the mRNA levels of both genes were determined by RT-qPCR in breast cancer model cell lines. Moreover, these data were compared with the protein expression determined by immunoblot. We also determined the expression levels of TRPM4 and KCTD5 by RT-qPCR from cDNA arrays of patient samples of tumor and healthy tissues. Finally, immunohistochemistry was performed in patient samples to compare the levels of messenger and protein expression in the different types and stages of the disease. We found that both mRNA and protein levels of these genes had an increased expression in breast cancer tumor subtypes, remarkably in triple negative patients, a subtype with a higher mortality rate and no specific therapy associated. The overexpression of both TRPM4 and KCTD5 in this subtype opens the possible use of these proteins as biomarkers for an early and clear detection or as therapeutics targets specific for this subtype.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en la mujer chilena, (Prieto, 2011), con una tasa de incidencia estimada de 32 casos por cada 100.000 mujeres (Serra C et al., 2009), y una tasa de mortalidad de 14,5 por 100.000 mujeres en el país (Ministerio de Salud, 2010). A nivel mundial, se estima que solo el 75% de las pacientes diagnosticadas sobreviven a los 5 años desde su detección. El grupo con mayor riesgo corresponde a las mujeres mayores a 45 años, donde ocurren más del 90% de los decesos. (Prieto, 2011).

El cáncer de mama constituye un número de neoplasias distintas, que pueden ser clasificadas por diferentes criterios que permiten determinar su posible tratamiento y pronóstico. En la mama existen una serie de alvéolos, estructuras huecas de pocos milímetros, donde se encuentran las células secretoras de leche. Estos alvéolos se encuentran agrupados en estructuras llamadas lóbulos, y cada lóbulo se conecta a un ducto interlobular, que forma estructuras ramificadas al unirse a otros ductos y que desemboca en el pezón. Todas las estructuras se encuentran rodeadas de tejido conectivo y tejido adiposo. Tanto los lóbulos como los ductos se encuentran rodeados por una membrana basal. Histológicamente se pueden clasificar los diferentes subtipos de cáncer; dependiendo del lugar donde se origina el tumor, el mayor porcentaje de estos es ductal o lobular. Si el carcinoma presenta proliferación sin invasión de la membrana basal que lo rodea, se le conoce como un carcinoma *in situ*, que tiene buen pronóstico, ya que sólo basta la extracción del tumor para acabarlo. Sin embargo, la presencia de proliferación en el estroma colindante a la estructura de origen es característica de un carcinoma

infiltrante, que tiene una peor prognosis (Bertos y Park, 2011; Pinder y Ellis, 2003). Los carcinomas ductales y lobulares corresponden al 75% y 15% de los casos respectivamente (Li et al., 2003) mientras que otros subtipos de cáncer, como el carcinoma mucinoso, tubular, papilar y carcinomas inflamatorios solo corresponden al 10% de los casos en conjunto (Li et al., 2005). Por sí sola esta clasificación nos permite conocer tanto el tejido de origen del tumor como su comportamiento infiltrante a grandes rasgos, pero es imposible predecir el desarrollo que tomará y la terapia farmacológica adecuada para cada paciente.

Una clasificación más detallada se obtiene con el análisis del grado histológico, usando la escala de Nottingham. Esta considera tres parámetros en el análisis del tumor; pleomorfismo nuclear, conteo mitótico y grado de desdiferenciación. En base al nivel de estos parámetros se clasifican en G1, G2 y G3, siendo G1 los tumores bien diferenciados y con bajo grado mitótico y G3 los tumores desdiferenciados y con alta proliferación (Rakha et al., 2010).

Otro tipo de clasificación es la estadificación TNM que considera tres parámetros principales; el tamaño del tumor (T), la infiltración en los nodos linfáticos cercanos al busto (N) y la metástasis a órganos distantes (M). cada uno de estos parámetros tienen un puntaje, y la suma de estos permite clasificar al paciente en cinco estadios que van desde 0 a IV, correspondiendo 0 a carcinomas *in situ* y IV a carcinomas metastásicos (Ozsaran y Alanyalı, 2013). Tal como la clasificación anterior, los parámetros permiten determinar el desarrollo clínico de la enfermedad, siendo útil en el aspecto quirúrgico, pero no en la determinación de un tratamiento farmacológico específico ni en el pronóstico.

Un biomarcador es definido como una característica que puede ser medida objetivamente y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, patogénico o una respuesta a la intervención terapéutica. El uso de biomarcadores inmunohistoquímicos para la clasificación de los tipos de cáncer es útil porque permite definir el tipo de tratamiento que se les administrará los pacientes (Duffy et al., 2017). Principalmente, son tres biomarcadores los que se detectan; el Receptor de Estrógenos (ER), el Receptor de Progesterona (PgR) y el receptor del factor de crecimiento epitelial HER2. Cabe destacar que cada uno de estos marcadores se presenta de manera independiente de los demás. La presencia de ER en el carcinoma indica su sensibilidad a la terapia con inhibidores de la aromatasa y a la terapia endocrina con moduladores específicos del receptor, tales como el tamoxifeno, que actúan como agonistas o antagonistas tejido-selectivos. Cuando PR se encuentra junto a ER se aprecia una mejor respuesta al tamoxifeno y mayor supervivencia de las pacientes. La presencia de PR en ausencia de ER se ve relacionada a cánceres irresponsivos al tratamiento endocrino, aun así, estos marcadores se relaciona con un buen pronóstico (Bartlett et al., 2011; Duffy et al., 2017). HER2 permite predecir la respuesta a tratamientos anti HER2, los que constan principalmente en el uso de anticuerpos contra este receptor. Su detección, al igual que la de los biomarcadores tratados anteriormente, es por inmunohistoquímica y se confirma por FISH (Duffy et al., 2017). Para medir el índice de proliferación del tumor se usa como marcador la proteína Ki-67, su detección se asocia a cánceres agresivos y se estudia su relación con una mejor respuesta a la quimioterapia. Su valor radica en su utilidad pronóstica, pues aún no se define como

un blanco terapéutico (Duffy et al., 2017; Petrelli et al., 2015). Ki-67 no es recomendado en todas las guías clínicas, como los tres nombrados anteriormente.

Existen carcinomas que no presentan ninguno de los tres principales biomarcadores usados en la clínica, llamados triple negativos, que tienden a tener un comportamiento agresivo y rápida evolución, estos pacientes no tienen una terapia específica y tienden a tener una menor supervivencia que los pacientes que presentan los otros biomarcadores (Kim et al., 2017).

La clasificación molecular aborda el perfil de expresión génica de los tumores usando la técnica de micro arreglos con lo que se han identificado cinco tipos principales de cáncer: Luminal A, Luminal B, Sobreexpresión HER2, Tipo Basal y Tipo Normal. Estos grupos varían levemente entre las distintas publicaciones descritas (Weigelt et al., 2010), y se han visto relacionados con parámetros como la supervivencia y supervivencia sin recurrencia (Sørlie et al., 2001), siendo identificado el tipo Luminal A como el subtipo con mejor pronóstico, mientras que los tipos Basal y Sobreexpresión HER2+ presentan el pronóstico más pobre.

Por esta clasificación se observó que tumores ER positivos se dividen en dos subtipos con comportamientos distintos; Luminal A y Luminal B, que tiene un pronóstico más pobre. Los problemas de la clasificación molecular son su alto costo, el comportamiento de los tumores no siempre es igual al descrito por su clasificación, su valor pronóstico respecto a recidiva es limitado y es complejo obtener muestras con la calidad suficiente para la realización de la técnica (Weigelt et al., 2010).

Para disminuir los errores de cada una de las tipificaciones por separado, se han buscado correlaciones entre cada una de las diferentes clasificaciones; los tumores lobulillares tienden a presentar ER+/PgR+ y los ductales ER-/PR- (Li et al., 2005), mientras que los subtipos moleculares han sido relacionados de forma bastante clara con los distintos biomarcadores inmunohistoquímicos usados en la clínica, exceptuando el subgrupo Tipo Normal, que presenta los mismos biomarcadores que el subtipo Luminal A. También se han asociado con el grado Nottingham más común en el que son detectados estos tumores (**Tabla 1**) (Dai et al., 2015; Engstrøm et al., 2013).

Tabla 1.- Resumen de distintos tipos de cáncer de mama.

Subtipo	IHQ	Grado	Pronóstico	Prevalencia
Luminal A	[ER+ PR+] HER2- KI67-	1 2	Bueno	23,7%
Luminal B	[ER+ PR+] HER2- KI67+ [ER+ PR+] HER+ KI67+	2 3	Intermedio Pobre	38,8% 14%
Sobreexpresión HER2	[ER- PR-] HER2+	2 3	Pobre	11,2%
Basal	[ER- PR-] HER2-, marcador basal +	3	Pobre	12,3%
Tipo Normal	[ER+ PR+] HER2- KI67-	1 2 3	Intermedio	7,8%

El problema de los distintos tipos de clasificación es que agrupan a carcinomas de diferente comportamiento y pronóstico como iguales. Las clasificaciones consideran los tumores como un tejido homogéneo pero en estos existen poblaciones celulares clonales distintas, con diferentes patrones de expresión y respuesta al tratamiento, por lo que no todas las células cancerígenas se comportan ni responden de la misma manera (Bertos y Park, 2011). Por esto, es necesaria la identificación de nuevos biomarcadores proteicos que permitan, en

conjunto con las clasificaciones ya existentes, la identificación precisa de los subtipos tumorales heterogéneos de forma rápida y a bajo costo, con un alto valor pronóstico y predictivo.

Un tipo de proteínas que participa en procesos celulares desregulados en cáncer son los canales iónicos; tales como la migración, proliferación e invasión (Déliot y Constantin, 2015), también han sido identificados como actores en mecanismos del avance de la enfermedad como la angiogénesis (Munaron, 2015) y metástasis (Stock y Schwab, 2015). Distintos miembros de la superfamilia de canales iónicos presentan diferencias de expresión proteica entre tejido sano y tumoral, y esto se ha relacionado directamente en algunos casos con parámetros como la supervivencia de los pacientes, o la posibilidad de recidiva, Esto junto a su participación en distintos procesos celulares relacionados al cáncer, los convierte en buenos candidatos en la búsqueda de nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos (Lastraioli et al., 2015), incluso proponiéndose el uso de ciertas drogas que tienen como blanco terapéutico diferentes canales iónicos aprobadas para otras patologías como posible tratamiento en cáncer (Kale et al., 2015). Los Receptores de Potencial Transitorio (TRP) son una superfamilia de canales iónicos expresados en distintos tipos de tejidos, donde su actividad anómala se ha visto ligada con variadas patologías (Montell, 2001). La gran mayoría son canales de iónicos no selectivos para Na^+ y K^+ , con selectividad para Ca^{2+} . En mamíferos, esta superfamilia contiene 28 miembros y se ven agrupados en 7 subfamilias: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML y TRPN (Ferrandiz-Huertas et al., 2014). Participan en distintos procesos celulares que se relacionan en el desarrollo del

cáncer, tal como la proliferación, migración e invasión, demostrado tanto en modelos celulares como in vivo (Chen et al., 2014; Liberati et al., 2013). Ha sido reportado que miembros de la superfamilia TRP presentan niveles de expresión alterada en distintos tipos de cáncer (Lehen'kyi y Prevarskaya, 2011), y en algunos casos se ha relacionado con parámetros de importancia clínica como la sobrevida, correlación con grado histológico y metástasis (Park et al., 2016; Santoni y Farfariello, 2011). Por ejemplo, se ha observado que TRPM7 regula la sobrevida celular de las células en cáncer de estómago (Kim et al., 2012), en cáncer de vejiga el mismo gen se encuentra sobreexpresado, mientras que TRPM5 Y TRPM8 se expresan en menor proporción que en el tejido sano (Ceylan et al., 2016). Se ha explorado el rol de TRPM7, TRPM8, TRPV6 y TRPC6 en el desarrollo del cáncer de mama y su utilidad como biomarcadores (Guilbert et al., 2009; Ouadid-Ahidouch et al., 2013). Sin embargo, se necesitan más estudios para lograr hacer un avance significativo en su uso para la identificación de los distintos subtipos en los que se ven involucrados. Lo anterior los hace interesantes como grupo en la búsqueda de nuevos biomarcadores.

Un miembro atípico de la superfamilia TRP es TRPM4, que junto a TRPM5 se diferencia de los otros miembros al ser impermeables a Ca^{2+} , aunque su actividad es regulada por la concentración intracelular local del catión, son permeables a cationes monovalentes (Venkatachalam y Montell, 2007). TRPM4 regula procesos tales como la formación de adhesiones focales, migración, invasión celular y reparación de heridas (Cáceres et al., 2015), se ha identificado como regulador de la contractibilidad en líneas celulares del músculo detrusor (Hristov et al., 2016) y

también está implicado en los procesos de proliferación celular, por la vía de β -catenina (Armisen et al., 2011). La expresión de TRPM4 se ve alterada en distintos tipos de cáncer; en cáncer colorrectal su expresión se ve disminuida (Sozucan et al., 2015), en linfomas de células B su sobreexpresión se relaciona a tipos de cáncer con pobre supervivencia (Palareti et al., 2016; Suguro et al., 2006), en cáncer cervical se ha visto implicado en la carcinogénesis (Narayan et al., 2007) y es una de las proteínas involucradas junto a cofilina en la invasión de células de melanoma (Morales Rojas, 2017). Se ha detectado que la expresión de este canal aumenta en la mayoría de los distintos tipos de cáncer de próstata, como el independiente de andrógenos (Schinke et al., 2014), pero no en aquellos tipos con mejor pronóstico (Ross-Adams et al., 2015). Por otra parte, TRPM4 afecta la migración celular en modelos de cáncer prostático (Holzmann et al., 2015), en esta misma línea se ha observado que es uno de los reguladores de la transición epitelio-mesenquimal usando líneas celulares modelo (Sagredo et al., 2018) y se ha reportado como un biomarcador asociado a recurrencia bioquímica luego de remover la próstata (Berg et al., 2016).

Una de las proteínas asociadas a TRPM4 identificada en nuestro laboratorio es KCTD5 (Dominio de Tetramerización de Canal de Potasio 5). Esta corresponde a una proteína de 25 kD, con un dominio BTB que permite su interacción específica con la E3 RING ubiquitin ligasa Cullin 3 (Bayón et al., 2008), KCTD5 actúa dirigiendo el complejo al reconocer proteínas blanco que serán ubiquitinadas (Rutz et al., 2015). Esta modificación post-traduccional puede tener diferentes consecuencias, como la degradación proteosomal, modificación en interacciones proteicas o regulación del

tráfico de proteínas (Swatek y Komander, 2016). Por medio de ensayos de sobreexpresión, silenciamiento de KCTD5 en presencia de TRPM4 en un modelo heterólogo, descubrimos que KCTD5 es un regulador positivo de la actividad del canal, y por ensayos de inmunoprecipitación confirmamos que ambas proteínas interactúan (Rivas y Diaz, en preparación).

KCTD5 pertenece a la familia KCTD, una serie de proteínas con dominio BTB (Liu et al., 2013). KCTD12 es uno de los miembros más estudiados de esta familia, y se ha encontrado que puede facilitar la oncogénesis en distintos tipos de cáncer (Zhong et al., 2017) y la desdiferenciación celular que lleva a la recidiva en cáncer colorrectal (Li et al., 2016). Se ha sugerido el uso de miembros de esta familia como biomarcadores, KCTD12 en cáncer gastrointestinal al relacionarlo con la sobrevida sin recidiva (Hasegawa et al., 2013) y KCTD20 en cáncer de pulmón, donde se promueve la proliferación e invasión en el modelo celular, y se correlaciona con menor sobrevida y metástasis a linfonodos en pacientes (Zhang et al., 2017). En nuestro laboratorio hemos observado que KCTD5 regula la proliferación y migración en distintos modelos celulares, lo que podría sugerir un rol similar a los descritos en KCTD12 y KCTD20.

Al realizar un análisis de expresión de mRNA de KCTD5 y TRPM4 en distintas bases de datos (Mizuno et al., 2009; Ringnér et al., 2011) se observan diferencias en la expresión al comparar tejidos sanos con los distintos tejidos tumorales clasificados, incluso leves diferencias entre estos, encontrándose grupos de pacientes clasificados de la misma manera tradicional con diferentes niveles de expresión de ambos genes. A su vez se observa en algunos de los subgrupos que

la alta expresión de ambas proteínas se correlaciona con los casos con peor sobrevida y sobrevida sin recidiva. Todos los datos recopilados indican que por su rol en el contexto celular, los niveles de expresión alterados de estas mismas proteínas o miembros cercanos de sus familias proteicas y su relación regulatoria, TRPM4 y KCTD5 son buenos candidatos como posibles biomarcadores en cáncer de mama, enfermedad que sugieren los datos obtenidos por micro arreglos.

HIPÓTESIS

La sobreexpresión de TRPM4 y KCTD5 en cáncer de mama se relaciona con los subtipos más agresivos de la enfermedad.

Objetivo General

Determinar los niveles de expresión de TRPM4 y KCTD5 en distintos tipos de cáncer de mama.

Objetivos Específicos

Evaluar expresión de mRNA de TRPM4 y KCTD5 en distintos modelos celulares de cáncer de mama.

Comparar los niveles de mRNA de TRPM4 y KCTD5 entre las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF7.

Determinar los niveles de mRNA de TRPM4 en muestras clínicas.

Evaluar los niveles de mRNA de TRPM4 en muestras comerciales TissueScan™, que contienen cDNA proveniente de tejidos sanos y tumorales, con su historial clínico detallado.

Determinar relación entre expresión de mRNA de TRPM4 y su expresión proteica.

Comparar expresión del mRNA de TRPM4 en Array de muestras de cDNA con la expresión proteica en muestras de tejidos tratadas por IHQ para la detección de las proteínas.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% v/v. La línea celular T47D se cultivó en medio DMEM alto en glucosa (Thermo Fisher Scientific) suplementado con FBS (GE Healthcare) 5% v/v. La línea MCF10A se cultivó en DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con Suero Equino (HS) (Corning Life Sciences) 5%, 10 µg/mL de Insulina (Sigma), 20 ng/mL Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) (Gibco) y 0,5 µg/mL de Hidrocortisona (Sigma). Todos los medios fueron suplementados con 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y ajustados a pH 7,4. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

Extracción de RNA

Se extrajo RNA total desde las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, T47D y MCF10A usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro de microplaca Epoch (Biotek), y se determinó su pureza por la razón Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ y su integridad se por electroforesis en gel de agarosa 1,2 %p/p formaldehído 0,6 %p/v.

Tratamiento con DNasa I

Se incubó 1 µg de RNA con DNasa I (libre de RNAsa) (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos a 37°C, posteriormente la reacción se detuvo agregando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a concentración final de 5 mM, incubando por 10 minutos a 65°C.

Retrotranscripción

Se tomó el producto del tratamiento con DNasa y se le agregaron hexámeros aleatorios 1000 ng/μl (Thermo Fisher Scientific), dNTPs 1mM, 20 U del inhibidor de RNasas RiboLock (Thermo Fisher Scientific) y 200 U de Transcriptasa Reversa RevertAid (Thermo Fisher Scientific). Se incubó a 25°C por 10 minutos, seguido de 1 hora a 42°C y finalmente 10 minutos a 70°C. En caso de no realizarse inmediatamente qPCR con el cDNA obtenido, se almacenó a -20°C.

Diseño de partidores

Se diseñaron partidores específicos para la amplificación de RNA mensajero de TRPM4 y KCTD5 humanos. Para el diseño se tomaron en cuenta parámetros como el largo del amplicón generado, la diferencia de temperatura de fusión entre los pares de partidores, la especificidad de apareamiento con la secuencia blanco, su porcentaje de composición GC, la amplificación de secuencias que abarcaran una zona interexónica para excluir la amplificación genómica y la formación de posibles estructuras secundarias intra o intercatenaria en las condiciones de temperatura y concentración de sales en las que se llevaron a cabo las reacciones de PCR. Estos análisis se hicieron *in silico* usando las herramientas web Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y Beacon Designer (Premier Biosoft International, Ltd.). Los partidores para β-actina fueron obtenidos de la literatura (Liu et al., 2018). Todos los partidores fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies.

qPCR

Se realizó PCR en tiempo real de los genes de interés TRPM4 y KCTD5, como control interno se amplificó un gen constitutivo; β-actina. Para la detección de

la reacción se usó el SensiMix™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante, con SYBR Green como reportero de la amplificación, y ROX como referencia pasiva. Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, seguidos 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto, subsiguiente a esto se realizó una rampa de desnaturalización empezando en 60°C, incrementando gradualmente la temperatura 0.3 °C hasta 95°C. Cada reacción fue llevada a cabo junto a los controles negativos necesarios.

En líneas celulares se comparó la expresión relativa de los genes de interés, normalizados en relación a la línea celular MCF10A. El mismo protocolo descrito se usó para muestras de cDNA proveniente de tumores de pacientes en placas TissueScan™ (BCRT102 Lot#TH25, OriGene), donde la expresión relativa se normalizó en relación a muestras de tejido sano. Las curvas fueron analizadas con StepOne Software V2.3. La expresión relativa fue normalizada a β-actina y esta fue comprada usando el siguiente modelo de expresión relativa (Pfaffl, 2001)

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{ref})^{Ct \text{ muestra}}}{(E_{blanco})^{Ct \text{ muestra}}} \div \frac{(E_{ref})^{Ct \text{ Calibrador}}}{(E_{blanco})^{Ct \text{ Calibrador}}}$$

Donde Ct corresponde al ciclo en que se detecta la señal y E corresponde a la eficiencia de la reacción en las condiciones experimentales, definida como:

$$E = 10^{-1/m}$$

Donde m corresponde a la pendiente de una curva Ct vs Dilución de DNA inicial para cada uno de los genes a amplificar.

Electroforesis e inmunoblot

Las células fueron lavadas 2 veces con DPBS frío e incubadas por 30 minutos a 4°C en agitación con buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris HCl pH 7.4, 50 mM, NaF 5 mM, NP-40 0.5% v/v, Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) 1 mM y cocktail inhibidor de proteasas (PIC) 1 mM y se realizó lisis mecánica en hielo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 11.000 g, recuperándose el sobrenadante y se cuantificó la concentración proteica total por ensayo Pierce (Thermo Scientific #23227). Las muestras fueron diluidas en buffer reductor (RSB) analizadas mediante geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) a 70 V por 3 horas y transferidas a membranas de nitrocelulosa por medio de una transferencia húmeda a 30 V por 18 horas a 4° C. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (4 % p/v leche libre de grasa en TBS pH 7,5 y 0,1 %v/v Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos usados fueron; anti-TRPM4 Alomone (cat# ACC-044), anti-KCTD5 Origene (cat# TA501035) y anti-actina Cytoskeleton (cat# AAN01). Posteriormente Se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente por 1 hora a temperatura ambiente. La detección del anticuerpo secundario se realizó con sustrato quimio luminiscente Immunoblot Pierce ECL y esta señal quimio luminiscente se detectó utilizando el equipo Alliance Mini HD9 WL. Imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ.

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica para TRPM4 y KCTD5 de tejido normal y tumor invasivo de cáncer de mama fijados en formalina y parafina (FFPE). La recuperación antigénica de los tejidos fue llevada a cabo por digestión enzimática, incubando con tripsina al 0.05% p/v a 37 °C por 20 minutos y seguido por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las preparaciones fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 3% v/v durante 20 minutos. El bloqueo se realizó con suero de ternera al 10% v/v y Triton X-100 0,3% v/v durante 2 horas y se incubó con anti-TRPM4 (1:100, Origene #10H5) y anti KCTD5 (1:100, Abcam #Ab194825) de manera separada por toda la noche a 4°C. Como control negativo, en una preparación el anticuerpo primario fue reemplazado por suero de ternera no inmunizada. El anticuerpo primario fue detectado utilizando anticuerpo universal biotinilado listo para usar e IgG ratón/conejo durante 30 minutos a temperatura ambiente (BP-1400, Vector Laboratories). Posteriormente, usamos un kit ABC de tinción estándar de peroxidasa (Cat. #32020, Thermo Scientific™) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, la señal inmunorreactiva fue detectada con substrato de peroxidasa DAB (SK-4100, Vector Laboratories). Tras los procedimientos inmunohistoquímicos, se usó la solución de Mayer Hemalum (Cat. #109249, Merck) como tinción.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se incubaron cubreobjetos con fibronectina 5 µg/ml en DPBS (KCl 2,67 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 8,06 Mm, pH 7,4) por 1 hora. Las células fueron incubadas por 18 horas en los cubreobjetos a 37°C en su medio de

cultivo. Posteriormente fueron fijadas con formaldehído (PFA) 4% p/v, sacarosa 4% p/v disuelto de DPBS durante 15 minutos a 4°C y se lavaron por 10 minutos 3 veces con DPBS. Se permeabilizó y bloqueó con solución de bloqueo (4 % p/v leche libre de grasa en DPBS, Tritón-X100 0.1% v/v) por 1 hora. Los anticuerpos primarios usados, anti-TRPM4 Cat# TA500381 OriGene y anti-KCTD5 Cat# TA501035 OriGene, se prepararon en dilución 1:100 en solución de bloqueo y se incubaron los cubreobjetos con estos por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos Alexa. Posteriormente se realizó una tinción nuclear con Hoechst 33342 y se montó sobre un portaobjeto. Se tomaron fotografías usando un Spinning Disk (Olympus IX81) y el análisis de imágenes se realizó con el programa ImageJ.

Estadística

Los datos de inmunoblot y qPCR de líneas celulares fueron analizados por ANOVA de una vía, y comparados por test Tukey. Los datos de qPCR para placas con muestras de pacientes fueron analizados usando la prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn. Todos los análisis fueron hechos con GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Determinación de condiciones de ensayo qPCR

Para cumplir el primer objetivo de este trabajo se tuvieron que estandarizar las condiciones necesarias para realizar los ensayos de qPCR de forma reproducible. Para esto se diseñaron una serie de pares de partidores candidatos para TRPM4 y KCTD5. Los partidores finalmente usados se seleccionaron en base a la eficiencia de la reacción obtenida con estos; en cada ciclo de la fase exponencial de la reacción en cadena polimerasa se busca que la cantidad de amplicón sea el doble al ciclo anterior, esto se define como una eficiencia de 100% o en parámetros de la ecuación de Pfaffl, una $E=2$. Para que la reacción sea considerada eficiente, la eficiencia experimental debe ser mayor al 90% y menor al 110%. Para determinar la eficiencia de cada par candidato de partidores se realizaron curvas con diluciones de seriadas de cDNA inicial vs Ct, posteriormente los datos fueron analizados por regresión lineal entre el logaritmo de la dilución del DNA y el Ct de cada uno de estos estándares (**Figura 1**), de la que se obtiene la pendiente respectiva a cada uno de los pares de partidores con lo que se calculó la eficiencia de la reacción. En el caso de algunos pares de partidores se realizó este experimento en diferentes concentraciones, ya que una baja concentración de estos puede disminuir la eficiencia de la reacción. Para descartar candidatos ineficientes de pares de partidores se analizaron las curvas de temperatura de fusión de las reacciones, para identificar productos inespecíficos o dímeros de partidores que afectasen la eficiencia, descartando los partidores que presentaran estos fenómenos. Las curvas

de eficiencia de los partidores finalmente seleccionados se encuentran en la **Figura 1**, los detalles de estos se describen en la **Tabla 2**.

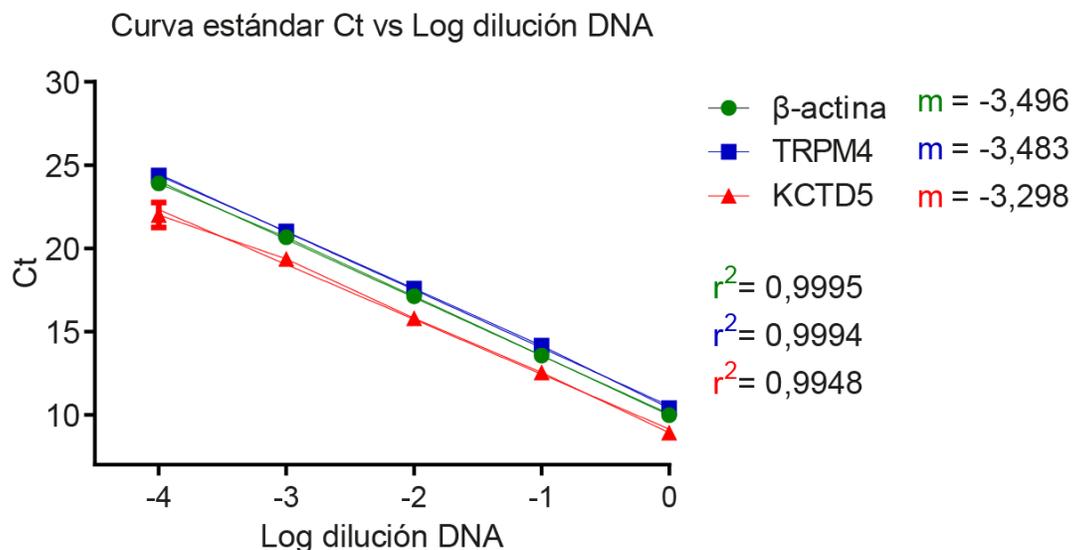


Figura 1.- Eficiencia de PCR para genes blanco. Las reacciones se llevaron a cabo usando las condiciones descritas en la metodología, y con la concentración de partidores descrita en la **Tabla 2**. La regresión lineal y análisis de curva se realizó con el software Graphpad Prism 6 (n=3).

Tabla 2.- Partidores seleccionados para qPCR.

Blanco	Secuencia 5'-3'	Tm °C	Eficiencia	Amplicón	[]
β-actina	TGACGTGGACATCCGCAAAG	57,9	93.2%	205 pb	250 nM
	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	60,2			
TRPM4	AGAGTGAACCTTTTCGGGGG	59,02	93.7%	64 pb	250 nM
	TCCATGAGGGAAGCTTCGAG	59,17			
KCTD5	GGAGCTGCTGGATTTCCTTT	57,6	100.9%	168 pb	400 nM
	GTCAGTCTGCACAGTACCCC	57,5			

Expresión diferencial de mRNA de TRPM4 Y KCTD5 en líneas celulares modelo de cáncer de mama

Con el objetivo de determinar si la diferencia de expresión de TRPM4 y KCTD5 es un buen indicador como posible biomarcador en el cáncer de mama se evaluó la expresión del mRNA de ambos genes en cuatro líneas celulares modelo de la enfermedad distintas; MCF10A, T47D, MDA-MB-231 y MCF7. Estas líneas presentan un patrón genómico y perfiles de expresión muy similares a tumores primarios; T47D y MCF7 son modelos de carcinoma invasivo luminal ER/PgR positivos - HER2 negativos, MDA-MB-231 es modelo de carcinoma basal triple negativo, mientras que la línea MCF10A es usada ampliamente como modelo de células epiteliales mamarias normales (Kao et al., 2009; Neve et al., 2009).

Para esto se cultivaron las líneas celulares a una confluencia del 70%-80%, se sometieron a lisis mecánica y se purificó el RNA total por método de columna de retención. Posteriormente se determinó su concentración y pureza por absorbancia. Solo se realizó retrotranscripción de las muestras que presentaban una razón Abs260/Abs280 entre 1.8 - 2 y que no presentaban más que las bandas características esperadas en la electroforesis en gel de agarosa. Se retrotranscribió 1 µg de RNA total usando hexámeros de oligonucleótidos aleatorios como partidores, obteniéndose cDNA total, del que se realizaron diluciones 1:10, con las que se prepararon las reacciones para el PCR en tiempo real.

El análisis de las curvas de amplificación y fusión fue llevado a cabo con el programa StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems), donde se corroboró la amplificación de un producto específico. Los Ct de cada una de las reacciones

fueron exportados y ajustados al modelo matemático descrito anteriormente, donde la expresión del mRNA de TRPM4 y KCTD5 de cada línea celular fueron normalizados a la expresión de β -actina de estas, obteniéndose así la expresión en relación a la expresión de un gen constitutivo. Se eligió β -actina como gen de referencia por su expresión estable entre tejido tumoral y sano, tanto en el modelo celular como en muestras de pacientes (Liu et al., 2015; Maltseva et al., 2013).

Tal como se muestra en la Figura 2A el RNA mensajero de TRPM4 se encuentra sobrepresado en la línea MCF7 respecto a todas las demás, no observándose una diferencia significativa entre estas.

En el caso de KCTD5 (**Fig. 2B**) se aprecian diferencias significativas en todas las comparaciones, exceptuando entre las líneas MCF10A – MDA-MB-231 y T47D-MCF7. En las dos primeras se aprecia una expresión mayor del mRNA que en las dos últimas. Se observa una ligera mayor expresión del mRNA en MDA-MB-231, aunque no es significativa respecto a la condición control. Cabe destacar que la magnitud de las diferencias observadas es mucho menor que las observadas en la expresión del RNA mensajero de TRPM4.

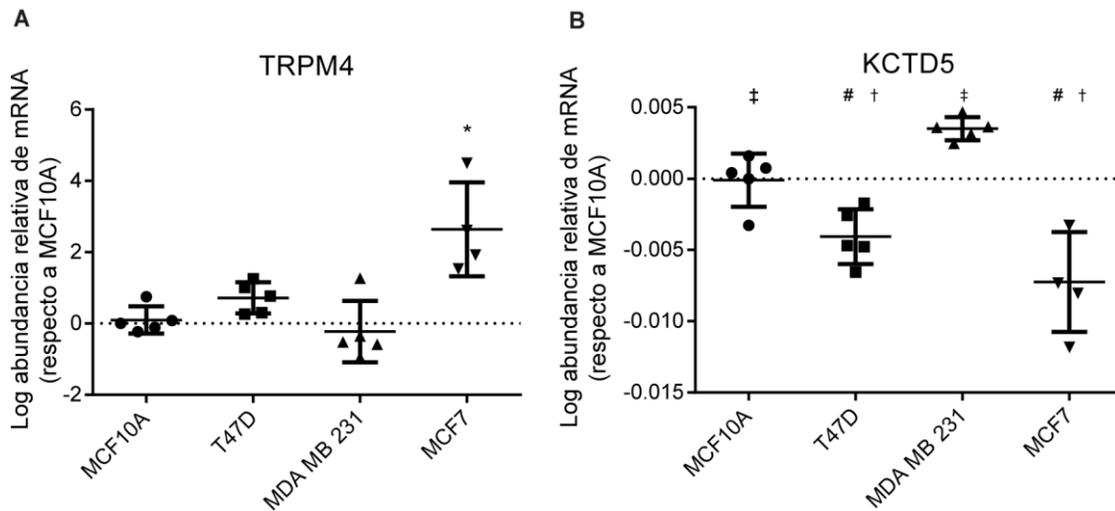
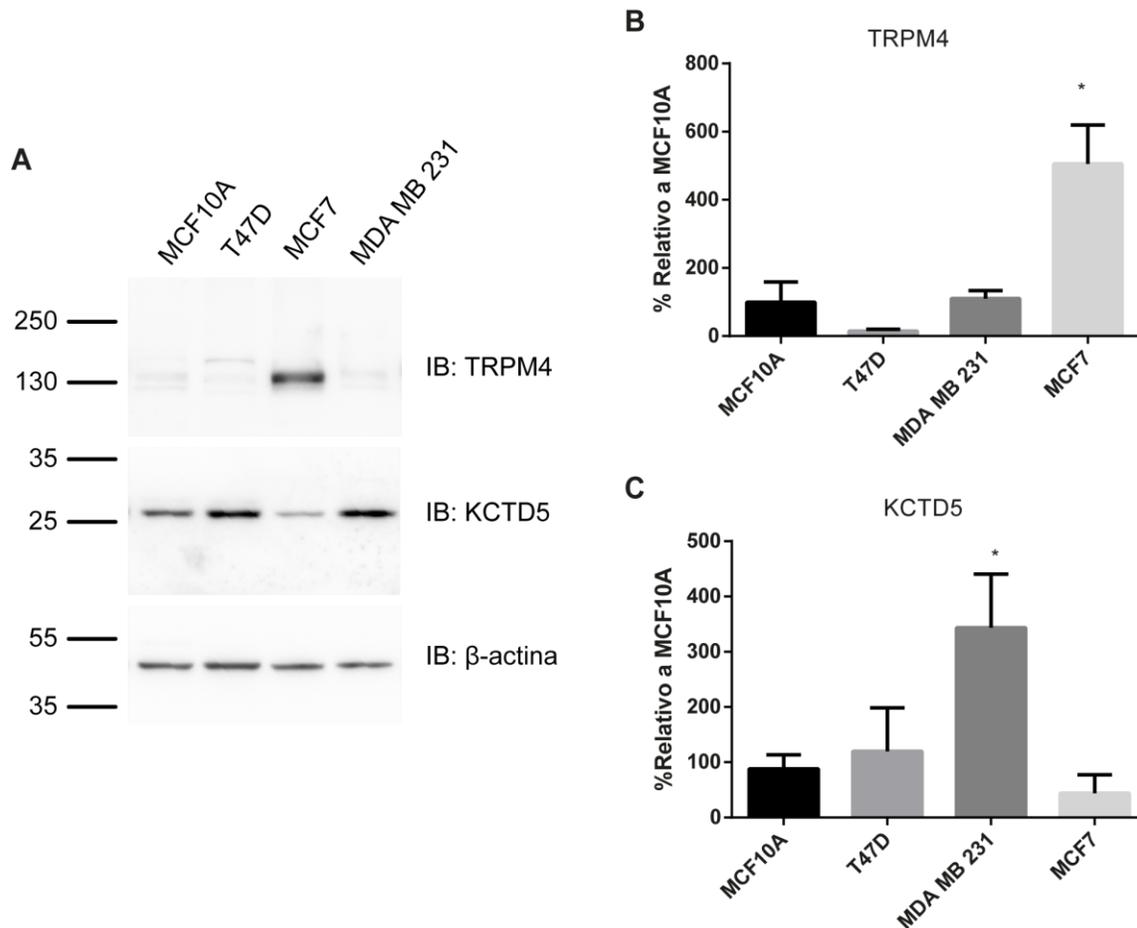


Figura 2.- mRNA de TRPM4 y KCTD5 se expresa diferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama. Niveles de expresión de TRPM4 (A) y KCTD5 (B) normalizados a los de β -actina. Los resultados se presentan como el promedio del Log de las veces de cambio en relación con expresión en la línea MCF10A \pm desviación estándar. Los diferentes símbolos indican diferencias estadísticamente significativas; * Diferencia significativa con todos, # Diferencia significativa con MCF10A, ‡ Diferencia significativa con T47D, † Diferencia significativa con MDA-MB-231 ($p < 0,05$, $n=5$).

TRPM4 y KCTD5 se expresan de forma diferencial en líneas de cáncer de mama a nivel proteico.

Con el fin de relacionar la expresión de los mRNA de TRPM4 y KCTD5 con su expresión proteica, se evaluó de manera semi cuantitativa mediante SDS-PAGE e inmunoblot identificando estas proteínas en las líneas celulares ya nombradas.

Figura 3.- Expresión proteica diferencial de TRPM4 y KCTD5 en líneas



celulares de cáncer mama. (A) Inmunoblot representativo de TRPM4 y KCTD5 en las diferentes líneas de cáncer de mama, se indican los pesos respectivos en kDa. Como control de carga se utilizó β -actina. Cuantificaciones por densitometría relativas a β -actina de los niveles de TRPM4 (B) y KCTD5 (C) normalizadas en porcentaje a la expresión proteica en la línea celular MCF10A. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa respecto a las demás líneas celulares ($P < 0,05$, $n=6$).

Los niveles proteicos de TRPM4 (**Fig.3B**) son similares a los ya indicados por la expresión de su RNA mensajero; en MCF7 se observa una mayor expresión

significativa en comparación a las demás líneas celulares, MCF10A y MDA-MB-231 tienen niveles de expresión similares en ambos casos, pero en T47D aunque no es estadísticamente significativa su diferencia de expresión de mRNA y proteína en relación a MCF10A y MDA-MB-231, se aprecia una disimilitud, ya que su mRNA se encuentra en un nivel ligeramente mayor que las líneas celulares nombradas, pero su nivel proteico es el menor de todas ellas.

En el caso de KCTD5 (Fig.3C) se observa que las relaciones de expresión de mRNA se mantienen en la expresión proteica; la línea celular MDA-MB-231 tiene los mayores niveles de KCTD5 respecto a las demás líneas celulares, diferencia que es estadísticamente significativa. En las otras líneas celulares no se aprecian diferencias estadísticamente significativas; MCF7 tiene el menor nivel de la proteína, la línea celular control MCF10A presenta una expresión mayor y T47D presenta niveles similares a esta última. Cabe destacar que, aunque las diferencias en la expresión se ven relacionadas, no es así con las proporciones; el RNA mensajero de KCTD5 se ve ligeramente incrementado en MDA-MB-231 respecto a las demás líneas celulares, mientras que su nivel proteico es por lo menos 3 veces mayor a la condición control.

La expresión de TRPM4 y KCTD5 aumenta en determinados subgrupos de pacientes de cáncer de mama.

Se obtuvieron placas TissueScan™, Breast Cancer cDNA Array II que contienen 48 muestras distintas de cDNA de pacientes; 5 corresponden a tejido mamario sano y 43 a tejido tumoral de pacientes de diferentes estadios y subgrupos de cáncer de mama. Cada uno de los tejidos de los que se extrae RNA total está

compuesto por lo menos de un 50% de tejido tumoral, y se encuentran clasificados en base a su perfil de expresión de marcadores bioquímicos (ER/PgR y HER2) además de adjuntarse el informe del patólogo en de cada una de las muestras, que contiene datos como la edad, estadio clínico de la enfermedad y gradación Nottingham. Se realizó qPCR de estas muestras con el propósito de detectar alteraciones en la expresión del RNA mensajero de TRPM4 y KCTD5 en relación al gen control β -actina, ya que se observó diferencias en la expresión de los mRNAs entre las líneas celulares modelo de cáncer de mama y la línea control, y entre sí mismas (**Fig.2**).

En la **Figura 4** se aprecia que mRNAs de TRPM4 y KCTD5 se encuentran sobreexpresados de manera estadísticamente significativa en los pacientes con cáncer de mama respecto al tejido sano, y a diferencia de lo observado previamente en las líneas celulares, hay una mayor magnitud de sobreexpresión del mRNA de KCTD5 que el de TRPM4.

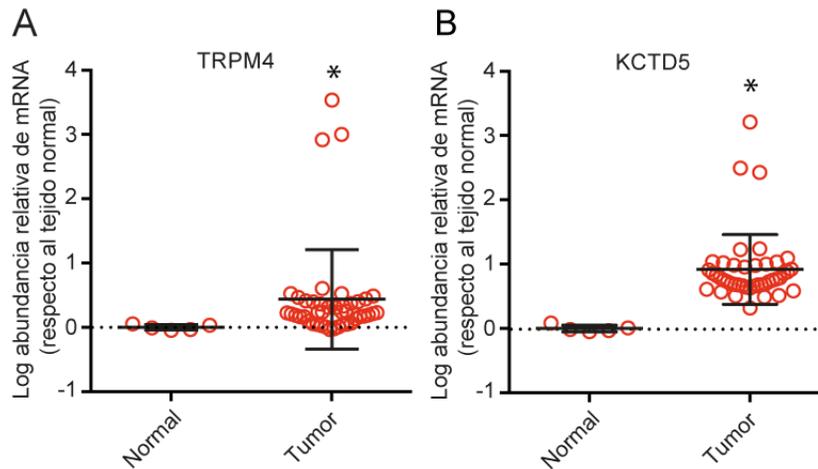


Figura 4.- mRNAs de TRPM4 y KCTD5 se sobrepresan en pacientes de cáncer de mama. Expresión relativa del RNA mensajero de TRPM4 (A) y KCTD5 (B) en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama. Los niveles de los mRNA fueron normalizados en relación con la expresión de β -actina y posteriormente comparado a la expresión relativa en tejido sano. Los resultados se presentan como la mediana del Log de las veces de cambio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $P < 0,05$, $n = 48$).

Ya que se estableció que ambos genes se sobrepresan a nivel de RNA mensajero en tumores de cáncer de mama, se relacionaron estos resultados con la información de cada paciente para con el fin de determinar si la expresión de estos genes es distintiva de diferentes subtipos o etapas del cáncer de mama. Uno de los parámetros usados para comparar es la edad de las pacientes, comparando entre pacientes jóvenes (menores a 50 años) y pacientes viejas (mayores a 50 años), esta edad se eligió por dos motivos; la mayoría de los decesos ocurre en pacientes mayores a esta edad, a su vez es la edad promedio donde ocurre un decaimiento en la producción de estrógeno y progesterona producto de la menopausia, con lo

que podría relacionarse la expresión de los genes de interés con la producción hormonal. Como se puede Observar en la **Figura 5A** no hay diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, por lo que la expresión de los mRNAs de TRPM4 y KCTD5 no estaría determinada por estos factores.

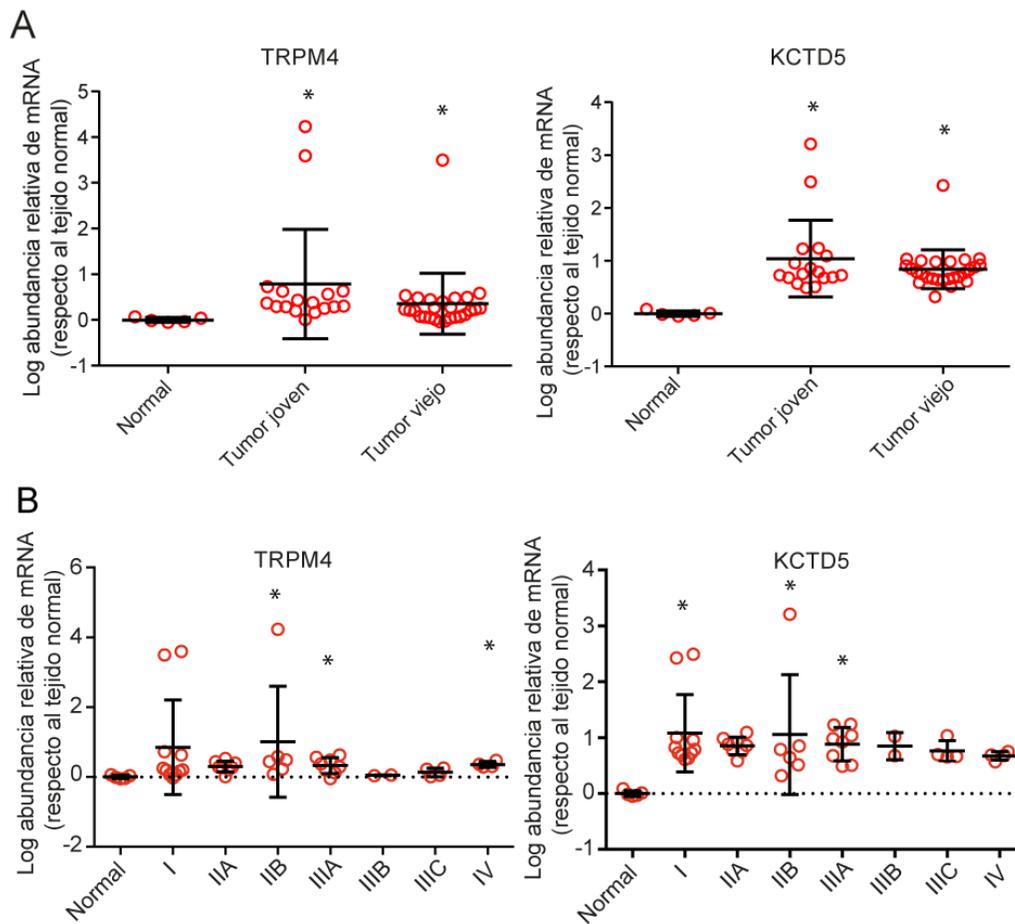


Figura 5.- Expresión de mRNA de TRPM4 y KCTD5 no se correlacionan con edad y estadios clínicos. Expresión relativa de RNA mensajero de TRPM4 y KCTD5 en relación con muestras de tumor joven (< 50 años) y viejo (>50 años) (A) y en relación con los estadios determinados por la clasificación TNM (B). Los resultados se presentan como la mediana del Log de las veces de cambio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en relación con el tejido normal (* $P < 0,05$, $n=48$).

Al comparar con los estadios determinados por la clasificación TNM (**Fig. 5B**), se observan diferencias significativas en la expresión de mRNA en diferentes estadios para TRPM4 y KCTD5; TRPM4 se encuentra sobrepresado en etapas más tardías, III y IV, mientras que KCTD5 se observa mayormente expresado en etapas más tempranas, I y II. Por lo que no se observa una relación en la coexpresión de estos genes en relación con el estadio TNM de la enfermedad.

Finalmente se comparó la expresión de los mRNAs de ambos genes con parámetros que describen la naturaleza y comportamiento del tumor; la gradación de Nottingham y la clasificación por biomarcadores proteicos. Con la gradación de Nottingham se evalúan tres parámetros del tumor; la formación de túbulos en el tumor, el índice mitótico y el pleomorfismo nuclear, con lo que se determina el grado del tumor, que puede ir de 1 donde el tejido se encuentra diferenciado, a 3 donde está altamente desdiferenciado (Dai et al., 2015). Tanto el mRNA de TRPM4 como KCTD5 se sobrepresan de forma significativa con relación al tejido normal en los grupos 2 y 3 (**Fig. 6A**), que representan los tumores con mayor desdiferenciación e índice mitótico.

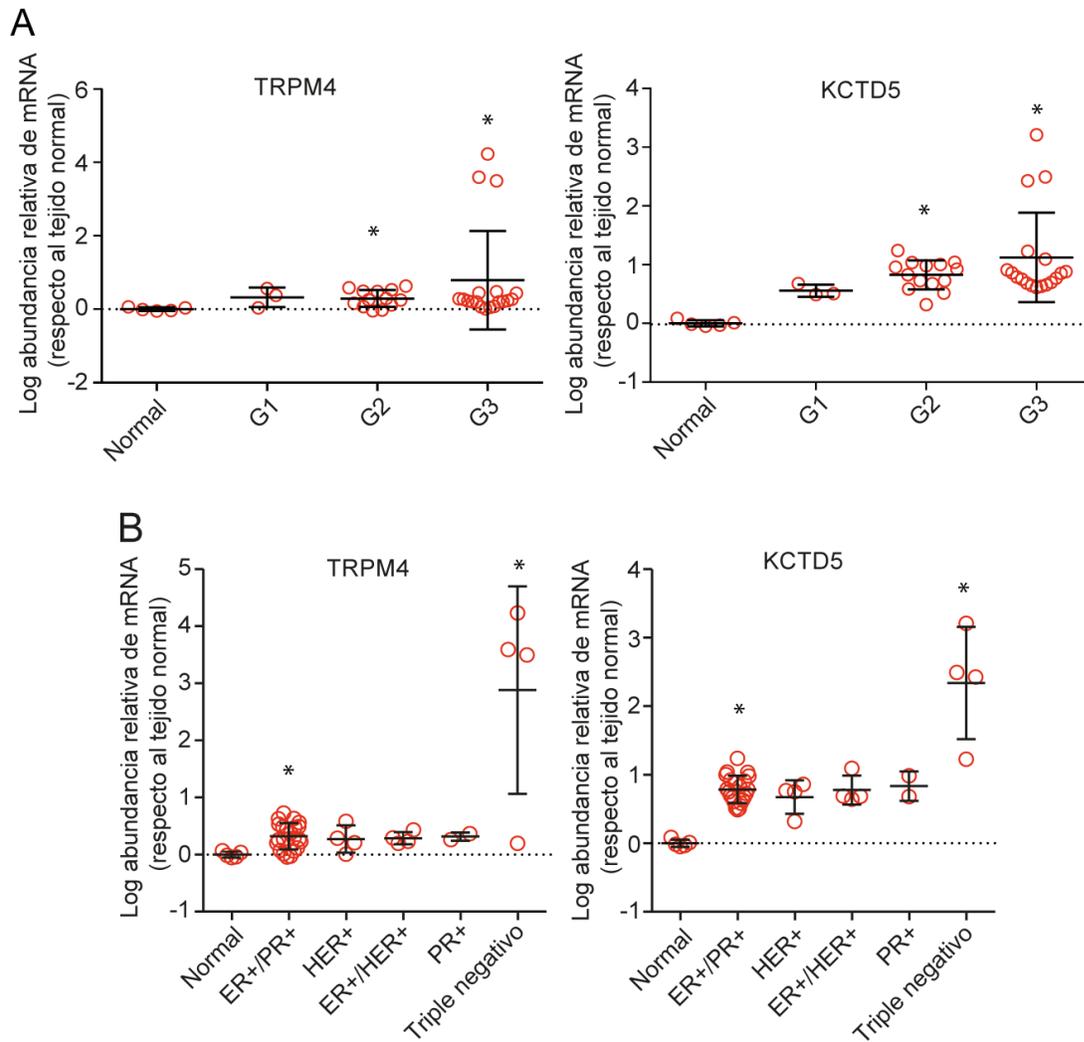


Figura 6.- mRNAs de TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan en tumores agresivos.

Expresión relativa del mRNA de TRPM4 y KCTD5 en muestras de pacientes con relación a su gradación Nottingham (A) y su clasificación por Biomarcadores proteicos (B). Los resultados se presentan como la mediana del Log de las veces de cambio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en relación con el tejido normal (* $P < 0,05$, $n = 48$).

Al relacionar los datos de expresión de RNA mensajero con la clasificación por biomarcadores proteicos de uso clínico ER, PgR y HER2 se observa que tanto TRPM4 como KCTD5 se sobreexpresan de forma significativa respecto al tejido

normal en los mismos subtipos de cáncer; ER-PgR+/ HER2- y en los cánceres triple negativos, observándose el mayor nivel de cambio en la expresión en este último subtipo (**Fig. 6B**). Cabe destacar que los pacientes que presentan estos altos niveles de ambos mRNA son los mismos. Otro punto que notar es que KCTD5 se ve sobrepresado en todos los distintos tipos de cáncer en algún nivel y al observar su expresión respecto a la gradación Nottingham se puede apreciar un incremento gradual en directa relación con la misma.

Diferencia en niveles proteicos de TRPM4 y KCTD5 en líneas celulares son detectables por Inmunofluorescencia.

En el uso clínico los biomarcadores proteicos son los que tienen mayor poder pronóstico y diagnóstico, junto con la determinación de las distintas terapias asociadas a algunos de estos biomarcadores. Los niveles relativos de estos se detectan por IHQ, por lo que como aproximación en las líneas celulares de cáncer de mama se detectaron los niveles de TRPM4 y KCTD5 por inmunofluorescencia, para evaluar si es posible la detección de los niveles por medio de esta técnica similar a IHQ, y si los niveles detectados de proteína se relacionan con los detectados por inmunoblot.

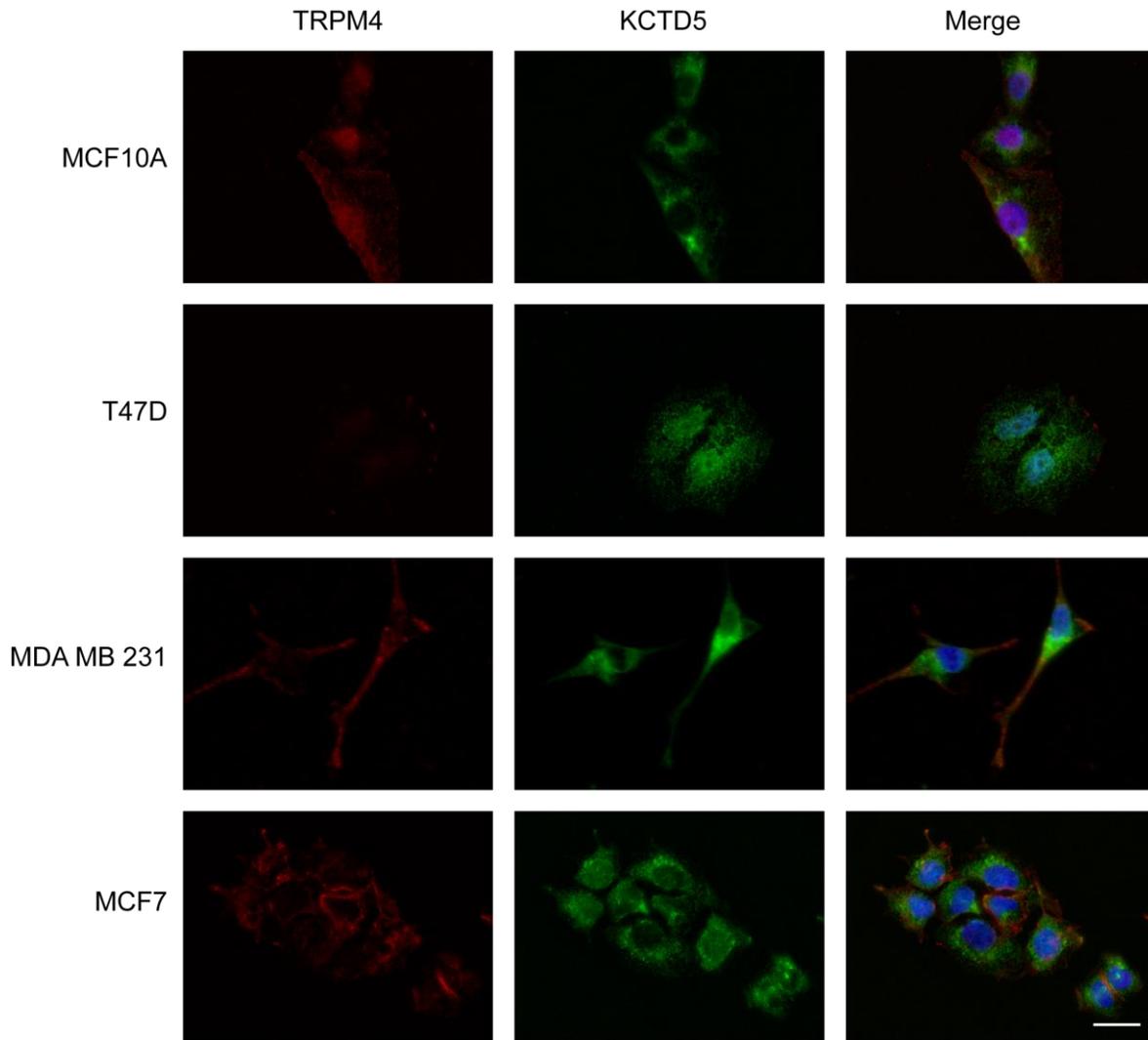


Figura 7. Localización y niveles de TRPM4 y KCTD5 varían entre las líneas celulares MCF10A, T47D, MDA-MB-231 y MCF7. Marcate por inmunofluorescencia de líneas celulares de cáncer de mama. Las células fueron teñidas con Hoechst (Azul) y marcadas anti KCTD5 mAb (verde) y anti TRPM4 mAb (rojo). Barra blanca representa 20 μm .

En la **Figura 7** podemos observar que KCTD5 tiene una localización perinuclear-citoplasmática similar en cada línea celular. Se pueden observar diferencias en la expresión entre las diferentes líneas; la señal de mayor intensidad de fluorescencia se observa en la línea MDA-MB-231.

TRPM4 tiene mayor variación en los niveles observados, no siendo detectable en T47D. Se pueden apreciar diferencias en la ubicación del canal entre las distintas líneas celulares; tanto en MCF10A, MDA-MB-231 y MCF7 se observa la presencia del canal en membrana, aunque en las dos primeras se aprecia un patrón tipo sabana, diferente al de MCF7 donde el canal delimita el contorno celular, contactos célula-célula y posibles adhesiones focales.

TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan a nivel proteico en tumores triple negativo.

Ya que la mayor sobreexpresión a nivel de RNA mensajero de ambos genes fue en pacientes triple negativo, se obtuvieron muestras de tumor primario triple negativo y se le realizó IHQ contra TRPM4 y KCTD5 tal como se realiza en la clínica con otros biomarcadores proteicos.

En el tumor se detecta sobreexpresión de TRPM4 y KCTD5 (**Fig. 8**), y se observan dos tipos de comportamiento dependiendo del corte analizado del tumor; en algunos se observa un mayor nivel de expresión de TRPM4 que KCTD5 (**Fig. 8B**) y la relación inversa (**Fig. 8C**)

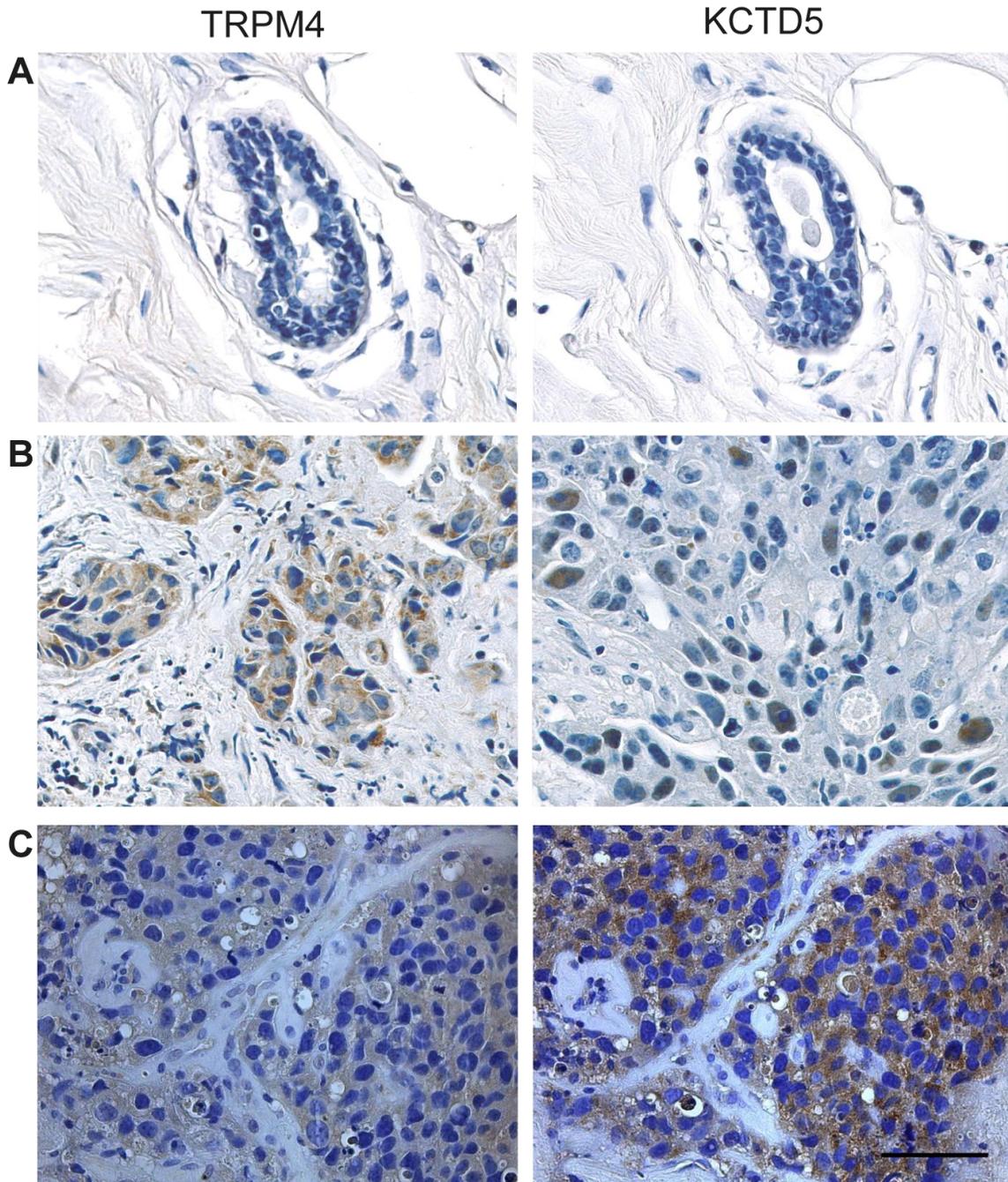


Figura 8. Expresión de TRPM4 y KCTD5 en tejido tumoral. Tinción inmunohistoquímica de TRPM4 y KCTD5 en tejido mamario normal (A) y Tumoral primario (B y C). Barra negra representa 50 μ m.

DISCUSIÓN

En las diferentes líneas celulares modelo de cáncer de mama se observó que varía la expresión relativa tanto de TRPM4 como de KCTD5. El mRNA de TRPM4 se expresa de manera similar en las líneas celulares MCF10A, T47D y MDA-MB-231, pero en la línea MCF7 este aumenta en promedio unas 100 veces en relación con el modelo de tejido normal. La expresión proteica de TRPM4 sigue un patrón similar, siendo mayor en MCF7 que en el resto de las líneas celulares que presentan niveles similares. Llama especialmente la atención la diferencia en niveles de expresión del canal entre MCF7 y T47D; ambas líneas celulares son clasificadas como modelo del mismo tipo de cáncer; carcinoma invasivo luminal A con presencia de receptores hormonales y ausencia de HER2, pero ha sido descrito con anterioridad que sus transcriptomas (Yu et al., 2017), y patrón de expresión proteica (Aka y Lin, 2012) difieren de manera significativa. Esta información, junto con lo observado en la expresión de mRNA y proteína de TRPM4 implica que aún células clasificadas de la misma manera respecto a los parámetros de uso clínico se comportan en la práctica de forma distinta, dando paso a cuadros clínicos con diferente desarrollo y tratamiento (Bertos y Park, 2011).

Aunque no hay diferencia significativa en la expresión de TRPM4 a nivel de mRNA y proteína entre las demás líneas celulares, se aprecia una divergencia entre los datos; a nivel de mRNA, en T47D el canal parece expresarse ligeramente más que en el control MCF10A, pero a nivel proteico TRPM4 es indetectable en la línea T47D, lo que podría indicar algún tipo de mecanismo de regulación postraduccional

en la expresión del canal, aunque se necesitan otros experimentos para concluir esto.

La expresión del mensajero de KCTD5 presenta diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares, aunque la escala de estas diferencias es mínima, pudiendo apreciarse que son relativamente similares. Los niveles relativos de expresión entre mensajero y proteínas son proporcionales en tres de las líneas celulares; MCF10A, T47D y MCF7, pero no en MDA-MB-231, donde se aprecia una mayor magnitud en la diferencia de expresión de la proteína que del mensajero con las demás líneas. Este fenómeno no es extraño, ya que se ha descrito que KCTD5 puede ser regulado post-transcripcionalmente (Bayón et al., 2008).

La alta expresión de TRPM4 en MCF7 y no en la línea MDA-MB-231 se contradice con lo inicialmente esperado, TRPM4 ha sido descrito como un modulador positivo de la proliferación (Armisen et al., 2011), migración e invasión celular (Cáceres et al., 2015), mientras que la línea MCF7 se caracteriza por su bajo potencial invasivo y metastásico (Comşa et al., 2015), contrapunto a la línea MDA-MB-231, modelo de cáncer triple negativo, altamente agresiva en relación a MCF7 (Gest et al., 2013; Gozgit et al., 2006). Ya que en esta tesis no era parte de los objetivos determinar los niveles de actividad de ambas proteínas no se puede descartar que TRPM4 sea uno de los principales actores en estos procesos en MDA-MB-231, ya que esta presenta una sobreexpresión de la proteína KCTD5, descrita en nuestro laboratorio como un regulador positivo de la actividad del canal.

Al evaluar la expresión a nivel de mRNA y de proteína en conjunto de TRPM4 y KCTD5 se pueden establecer diferencias tanto entre líneas celulares del mismo como de diferentes subtipos de cáncer de mama.

Tanto TRPM4 como KCTD5 se sobreexpresan en muestras de tumores primarios de pacientes de cáncer de mama, este último en mayor magnitud. Es más, se aprecia que en todos los subtipos de pacientes KCTD5 se encuentra sobreexpresado en algún nivel. Al relacionar la expresión del mensajero de estos genes en relación a otros diferentes parámetros de clasificación del cáncer de mama se puede concluir que tanto TRPM4 como KCTD5 se sobreexpresan en los tumores más agresivos, esto se evidencia por la gradación Nottingham, donde KCTD5 se sobreexpresa en G2 y G3, los dos tipos con mayor desdiferenciación. TRPM4 y KCTD5 se sobreexpresan en dos subtipos distintos de forma significativa; en tumores Luminal A (ER+/PgR+ HER2-) y en tumores triple negativos. El subtipo Luminal A se caracteriza por tener una respuesta mayor que Luminal B al tratamiento endocrino, mayor expresión de receptores hormonales, menor expresión de genes proliferativos, y se asocia a una buena prognosis (Ignatiadis y Sotiriou, 2013). Por lo que es interesante que tanto TRPM4 como KCTD5 se encuentren sobreexpresados respecto al tejido normal, puesto que ambos están involucrados en migración y proliferación. Cabe destacar que la expresión de estos genes en los pacientes no refleja lo observado en las líneas celulares modelo Luminal A; solo MCF7 presenta sobreexpresión de TRPM4 y ninguna de las líneas sobreexpresa KCTD5.

El cáncer triple negativo se caracteriza por la ausencia de los demás biomarcadores proteicos, presenta alta agresividad; esto se traduce en mayor proliferación, rápida metástasis y baja respuesta al tratamiento (Cinkaya et al., 2016). No tiene un tratamiento específico como otros de los subtipos y es un grupo heterogéneo respecto a su perfil molecular (Akshata Desai, 2012). En este grupo los niveles de mRNA y de proteína detectada por IHQ de TRPM4 y KCTD5 son mayores a cualquier otro, aunque la expresión no se relaciona del todo con el modelo celular pues, aunque la línea modelo de este subtipo de cáncer, MDA-MB-231, presenta los mayores niveles de transcrito y proteicos de KCTD5, tiene una baja expresión de TRPM4.

En las IHQ realizadas a los tumores triple negativos se observa que se sobreexpresan ambas proteínas, pero se aprecia que hay dos tipos de patrones de expresión, algunos cortes presentan mayor tinción de TRPM4 que KCTD5 y otros presentan la relación inversa, esto es un ejemplo claro de cómo la enfermedad puede tener patrones de expresión diferenciales, además hay que considerar el limitado acceso a muestras de tejido primario con el que se realizó este estudio. Este comportamiento disímil podría relacionarse a otros parámetros de clasificación, pero solo se tuvo acceso a la información correspondiente a la clasificación por biomarcadores proteicos. No se observa una distribución determinada de estas proteínas, siendo marcado todo el tejido maligno. Una de las limitantes de la técnica usada es su variabilidad interobservador, lo que disminuye la capacidad de un diagnóstico claro en casos donde la sobreexpresión no es clara.

La sobreexpresión de ambos genes en los tumores se puede relacionar con los roles descritos de estas proteínas a nivel celular. La expresión de KCTD5 puede potenciar los efectos sobre la migración que ejerce TRPM4 u otras proteínas. KCTD5 es un adaptador de la E3-RING ubiquitin ligasa Cullin 3, reconociendo proteínas blanco a ser ubiquitinadas. La sobreexpresión observada, aunque no significativa, en los distintos subtipos de cáncer de mama de KCTD5 de manera independiente a TRPM4 implica que KCTD5 puede estar regulando diferentes proteínas que interfieran en procesos proliferativos, invasivos o de resistencia a la terapia. A la fecha se ha reportado que miembros de la familia KCTD estarían regulando parte de estos procesos en cáncer, como KCTD20 en cáncer de pulmón (Zhang et al., 2017), KCTD12 como regulador del ciclo celular (Zhong et al., 2017) y *cell stemness* en cáncer colorrectal (Li et al., 2016). En cáncer de mama se ha reportado que KCTD10 sería un regulador positivo de procesos como la secreción, migración y respuesta a factor de crecimiento endotelial vascular (Murakami et al., 2019). A su vez se ha descrito que KLHL22, otro adaptador de Cullin 3, regula la oncogénesis en cáncer de mama vía mTORC1 (Chen et al., 2018), por lo que KCTD5 podría estar regulando vías similares en la enfermedad.

La sobreexpresión de TRPM4 en el cáncer triple negativo se puede relacionar directamente con la capacidad invasiva de las células tumorales. En líneas celulares de cáncer de mama diferentes canales iónicos relacionados a las dinámicas celulares de calcio tienen alterada su actividad y/o expresión (So et al., 2018), y aunque TRPM4 no es un canal permeable a calcio, si es activado por este, uno de los roles propuestos por nuestro laboratorio para este canal es la regulación local

de calcio, por regulación del potencial local de membrana, al que son sensibles canales de calcio como TRPC3. Todo este sistema estaría implicado en procesos de migración e invasión celular.

Si bien nuestros resultados sugieren una correlación entre la expresión de los mRNAs de TRPM4 y KCTD5 con muestras tipo triple negativo, cabe mencionar que una limitación del estudio es que el número de pacientes que corresponden a dicho subtipo es bajo (n=4), lo que se repite en la detección proteica en tumores (n=1) por lo que para afirmar que tanto KCTD5 como TRPM4 son buenos marcadores para el uso clínico en este subgrupo es necesario expandir la cohorte. Sin embargo, la sobreexpresión de TRPM4 y KCTD5 en tumores, y su correlación con la agresividad, además de que se expresen en subtipos sin terapia dirigida puede dar paso a pensar en ellos como posibles dianas terapéuticas. Ambos genes se vieron consistentemente sobreexpresados en pacientes triple negativo, lo que los convierte en buenos candidatos como blanco terapéutico para estos pacientes, que tienen una baja sobrevida, con tratamientos no efectivos. Fármacos contra TRPM4 y KCTD5 podrían inhibir la migración y proliferación celular aumentando las esperanzas de vidas de estos pacientes. En nuestro laboratorio se diseñaron péptidos que inhiben el tráfico de TRPM4 en modelo celular de melanoma, inhibiendo su actividad y procesos relacionados al avance del cáncer tales como el ensamble de adhesiones focales e invasión celular (Blanco et al., 2019), pudiendo retrasar el desarrollo de la enfermedad en conjunto a otras terapias como los inhibidores de Poly(ADP-Ribosa) Polymerasa y quimioterapia (Caparica et al., 2019; Okuma and Yonemori, 2017).

CONCLUSIONES

Tanto en el modelo celular como en muestras clínicas TRPM4 y KCTD5 se expresan de forma diferencial. Ambos genes se sobreexpresan al comparar el total de pacientes con controles sanos. Al comparar sus patrones de expresión entre las líneas celulares modelo y las muestras de pacientes pertenecientes subtipos clínicos a los que representan hay incongruencias aparentes, exceptuando la sobreexpresión de TRPM4 en MCF7 y de KCTD5 en MDA-MB-231, por lo que en este caso, las líneas celulares no son un buen modelo de la patología.

Tanto TRPM4 como KCTD5 se sobreexpresan en los cánceres de mayor agresividad en relación a la gradación Nottingham, en el cáncer Luminal A y triple negativo, sobre todo en este último, lo que permitiría identificar con mayor precisión en conjunto con los marcadores de uso clínico estos subtipos de cáncer.

A su vez, la sobreexpresión de estas proteínas y su rol descrito a nivel celular permiten pensar en ellas como posibles blancos terapéuticos, esto es especialmente relevante en los pacientes triple negativos que no poseen terapia dirigida específica y tienen un pobre pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aka, J.A., Lin, S.X., 2012. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031532>
- Akshata Desai, K.A., 2012. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered. Genet.* 2013, 406. <https://doi.org/10.4172/2161-1041.S2-001>
- Armisen, R., Marcelain, K., Simon, F., Tapia, J.C., Toro, J., Quest, A.F.G., Stutzin, A., 2011. TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 226, 103–109. <https://doi.org/10.1002/jcp.22310>
- Bartlett, J.M.S., Brookes, C.L., Robson, T., van de Velde, C.J.H., Billingham, L.J., Campbell, F.M., Grant, M., Hasenburg, A., Hille, E.T.M., Kay, C., Kieback, D.G., Putter, H., Markopoulos, C., Kranenbarg, E.M.-K., Mallon, E.A., Dirix, L., Seynaeve, C., Rea, D., 2011. Estrogen Receptor and Progesterone Receptor As Predictive Biomarkers of Response to Endocrine Therapy: A Prospectively Powered Pathology Study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational Trial. *J. Clin. Oncol.* 29, 1531–1538. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.3677>
- Bayón, Y., Trinidad, A.G., de la Puerta, M.L., del Carmen Rodríguez, M., Bogetz, J., Rojas, A., De Pereda, J.M., Rahmouni, S., Williams, S., Matsuzawa, S., Reed, J.C., Crespo, M.S., Mustelin, T., Alonso, A., 2008. KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases. *FEBS J.* 275, 3900–3910. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06537.x>
- Berg, K.D., Soldini, D., Jung, M., Dietrich, D., Stephan, C., Jung, K., Dietel, M., Vainer, B., Kristiansen, G., 2016. TRPM4 protein expression in prostate cancer: a novel tissue biomarker associated with risk of biochemical recurrence following radical prostatectomy. *Virchows Arch.* 468, 345–355. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1880-y>
- Bertos, N., Park, M., 2011. Breast cancer—one term, many entities? *J. Clin. Invest.* 121, 3789–3796. <https://doi.org/10.1172/JCI57100.prognosis>
- Blanco, C., Morales, Danna, Mogollones, I., Vergara-Jaque, A., Vargas, C., Álvarez, A., Riquelme, D., Leiva-Salcedo, E., González, W., Morales, Diego, Maureira, D., Aldunate, I., Cáceres, M., Varela, D., Cerda, O., 2019. EB1- and EB2-dependent anterograde trafficking of TRPM4 regulates focal adhesion turnover and cell invasion. *FASEB J.* fj.201900136R. <https://doi.org/10.1096/fj.201900136R>
- Cáceres, M., Ortiz, L., Recabarren, T., Romero, A., Colombo, A., Leiva-Salcedo, E., Varela, D., Rivas, J., Silva, I., Morales, D., Campusano, C., Almarza, O., Simon, F., Toledo, H., Park, K.-S., Trimmer, J.S., Cerda, O., 2015. TRPM4 Is a Novel Component of the Adhesome Required for Focal Adhesion Disassembly, Migration and Contractility. *PLoS One* 10, e0130540.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130540>

- Caparica, R., Lambertini, M., de Azambuja, E., 2019. How I treat metastatic triple-negative breast cancer. *ESMO Open* 4, e000504. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000504>
- Ceylan, G., Önalın, E., Kulođlu, T., Aydođ, G., Keleş, İ., Tonyalı, Ş., Ceylan, C., 2016. Potential role of melastatin-related transient receptor potential cation channel subfamily M gene expression in the pathogenesis of urinary bladder cancer. *Oncol. Lett.* 12, 5235–5239. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5359>
- Chen, J., Luan, Y., Yu, R., Zhang, Z., Zhang, J., Wang, W., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Biosci. Trends.* <https://doi.org/10.5582/bst.8.1>
- Chen, J., Ou, Y., Yang, Y., Li, W., Xu, Y., Xie, Y., Liu, Y., 2018. KLHL22 activates amino-acid-dependent mTORC1 signalling to promote tumorigenesis and ageing. *Nature* 557, 585–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0128-9>
- Cinkaya, A., Akin, M., Sengul, A., 2016. Evaluation of treatment outcomes of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Ther.* 12, 150. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.154000>
- Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M., 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 35, 3147–54. <https://doi.org/10.1038/430021a>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., Shi, B., 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* <https://doi.org/www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0014158>
- Déliot, N., Constantin, B., 2015. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009>
- Duffy, M.J., Harbeck, N., Nap, M., Molina, R., Nicolini, A., Senkus, E., Cardoso, F., 2017. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur. J. Cancer* 75, 284–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.017>
- Engstrøm, M.J., Opdahl, S., Hagen, A.I., Romundstad, P.R., Akslen, L.A., Haugen, O.A., Vatten, L.J., Bofin, A.M., 2013. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 140, 463–473. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2647-2>
- Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C.J., Devesa, I., Ferrer-Montiel, A., 2014. Trafficking of Thermo TRP channels. *Membranes (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.-L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C.-Q., Mirshahi, P., Laurent, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.-P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., Soria, C., 2013. Rac3 induces a

- molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 13, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-63>
- Gozgit, J.M., Pentecost, B.T., Marconi, S.A., Otis, C.N., Wu, C., Arcaro, K.F., 2006. Use of an aggressive MCF-7 cell line variant, TMX2-28, to study cell invasion in breast cancer. *Mol. Cancer Res.* 4, 905–13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0147>
- Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H., 2009. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *AJP Cell Physiol.* 297, C493–C502. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00624.2008>
- Hasegawa, T., Asanuma, H., Ogino, J., Hirohashi, Y., Shinomura, Y., Iwaki, H., Kikuchi, H., Kondo, T., 2013. Use of potassium channel tetramerization domain-containing 12 as a biomarker for diagnosis and prognosis of gastrointestinal stromal tumor. *Hum. Pathol.* 44, 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.013>
- Holzmann, C., Kappel, S., Kilch, T., Jochum, M.M., Urban, S.K., Jung, V., Stöckle, M., Rother, K., Greiner, M., Peinelt, C., Holzmann, C., Kappel, S., Kilch, T., Jochum, M.M., Urban, S.K., Jung, V., Stöckle, M., Rother, K., Greiner, M., Peinelt, C., 2015. Transient receptor potential melastatin 4 channel contributes to migration of androgen-insensitive prostate cancer cells. *Oncotarget* 6, 41783–41793. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6157>
- Hristov, K.L., Smith, A.C., Parajuli, S.P., Malysz, J., Rovner, E.S., Petkov, G. V., 2016. Novel regulatory mechanism in human urinary bladder: Central role of transient receptor potential melastatin 4 channels in detrusor smooth muscle function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310, C610–C611. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00270.2015>
- Ignatiadis, M., Sotiriou, C., 2013. Luminal breast cancer: From biology to treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 494–506. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.124>
- Kale, V.P., Amin, S.G., Pandey, M.K., 2015. Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2747–2755. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.034>
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. La, Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Pollack, J.R., 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006146>
- Kim, B.J., Kim, S.-Y., Lee, S., Jeon, J.-H., Matsui, H., Kwon, Y.K., Kim, S.J., So, I., 2012. The role of transient receptor potential channel blockers in human gastric cancer cell viability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 175–186.

<https://doi.org/10.1139/y11-114>

- Kim, S.-Y., Han, B.-K., Kim, E.-K., Choi, W.J., Choi, Y., Kim, H.H., Moon, W.K., 2017. Breast Cancer Detected at Screening US: Survival Rates and Clinical-Pathologic and Imaging Factors Associated with Recurrence. *Radiology* 000, 162348. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017162348>
- Lastraioli, E., Iorio, J., Arcangeli, A., 2015. Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2685–2702. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.016>
- Lehen'kyi, V., Prevarskaya, N., 2011. Oncogenic TRP Channels, in: Islam, M.S. (Ed.), *Transient Receptor Potential Channels, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 929–945. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_48
- Li, C.I., Anderson, B.O., Daling, J.R., Moe, R.E., 2003. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289, 1421–4. <https://doi.org/10.1001/jama.289.11.1421>
- Li, C.I., Uribe, D.J., Daling, J.R., 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br. J. Cancer* 93, 1046–1052. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602787>
- Li, L., Duan, T., Wang, X., Zhang, R.H., Zhang, M., Wang, S., Wang, F., Wu, Y., Huang, H., Kang, T., 2016. KCTD12 Regulates Colorectal Cancer Cell Stemness through the ERK Pathway. *Sci. Rep.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1111/cas.13899>
- Liberati, S., Beatrice Morelli, M., Nabissi, M., Santoni, M., Santoni, G., 2013. Oncogenic and Anti-Oncogenic Effects of Transient Receptor Potential Channels. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 344–366. <https://doi.org/10.2174/1568026611313030011>
- Liu, H.F., Liu, H., Lv, L.L., Ma, K.L., Wen, Y., Chen, L., Liu, B.C., 2018. CCN3 suppresses TGF- β 1-induced extracellular matrix accumulation in human mesangial cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* 39, 222–229. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.87>
- Liu, L.L., Zhao, H., Ma, T.F., Ge, F., Chen, C.S., Zhang, Y.P., 2015. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117058>
- Liu, Z., Xiang, Y., Sun, G., 2013. The KCTD family of proteins: Structure, function, disease relevance. *Cell Biosci.* <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-45>
- Maltseva, D. V., Khaustova, N.A., Fedotov, N.N., Matveeva, E.O., Lebedev, A.E., Shkurnikov, M.U., Galatenko, V. V., Schumacher, U., Tonevitsky, A.G., 2013. High-throughput identification of reference genes for research and clinical RT-

qPCR analysis of breast cancer samples. *J. Clin. Bioinforma.* 3, 1.
<https://doi.org/10.1186/2043-9113-3-13>

Ministerio de Salud, 2010. Guía Clínica Cáncer de mama, Minsal.

Mizuno, H., Kitada, K., Nakai, K., Sarai, A., 2009. PrognScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med. Genomics* 2, 18.
<https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-18>

Montell, C., 2001. Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. Signal.* 2001, re1–re1.
<https://doi.org/10.1126/stke.2001.90.re1>

Morales Rojas, D., 2017. Participación del canal TRPM4 en el proceso de invasión celular de células de melanoma mediante la regulación de la actividad de cofilina. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Munaron, L., 2015. Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. *Biochim. Biophys. Acta.*
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.031>

Murakami, A., Maekawa, M., Kawai, K., Nakayama, J., Araki, N., Semba, K., Taguchi, T., Kamei, Y., Takada, Y., Higashiyama, S., 2019. Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 1–12. <https://doi.org/10.1111/cas.13899>

Narayan, G., Bourdon, V., Chaganti, S., Arias-Pulido, H., Nandula, S. V., Rao, P.H., Gissmann, L., Dürst, M., Schneider, A., Pothuri, B., Mansukhani, M., Basso, K., Chaganti, R.S.K., Murty, V. V., 2007. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: Identification of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes, Chromosom. Cancer* 46, 373–384. <https://doi.org/10.1002/gcc.20418>

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Frederick, L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., Devries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, J.W., Division, L.S., Berkeley, L., 2009. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell* 10, 515–527.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.A>

Okuma, H.S., Yonemori, K., 2017. BRCA gene mutations and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 271–286. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6020-5_13

Quadid-Ahidouch, H., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Sevestre, H., Ahidouch, A., 2013. TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends Mol. Med.* 19, 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.004>

- Ozsaran, Z., Alanyalı, S.D., 2013. Staging of Breast Cancer, in: Haydaroglu, A., Ozyigit, G. (Eds.), Principles and Practice of Modern Radiotherapy Techniques in Breast Cancer. Springer New York, New York, NY, pp. 13–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5116-7_2
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., Tosetto, A., 2016. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int. J. Lab. Hematol.* 38, 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Park, Y.R., Chun, J.N., So, I., Kim, H.J., Baek, S., Jeon, J.-H., Shin, S.-Y., 2016. Data-driven Analysis of TRP Channels in Cancer : Linking Variation in Gene Expression to Clinical Significance. *Cancer Genomics-Proteomics* 13, 83–90.
- Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M., Barni, S., 2015. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 153, 477–491. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3559-0>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification.pdf. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pinder, S.E., Ellis, I.O., 2003. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH) – current definitions and classification. *Breast Cancer Res.* 5, 254. <https://doi.org/10.1186/bcr623>
- Prieto, M., 2011. Epidemiología del cáncer de mama en Chile. *Rev. Médica Clínica Las Condes* 22, 428–435. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(11\)70447-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(11)70447-3)
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., Palacios, J., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., Schmitt, F.C., Tan, P.-H., Tse, G.M., Badve, S., Ellis, I.O., 2010. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 12, 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>
- Ringnér, M., Fredlund, E., Häkkinen, J., Borg, Å., Staaf, J., 2011. GOBO: Gene expression-based outcome for breast cancer online. *PLoS One* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017911>
- Ross-Adams, H., Lamb, A.D., Dunning, M.J., Halim, S., Lindberg, J., Massie, C.M., Egevad, L., Russell, R., Ramos-Montoya, A., Vowler, S.L., Sharma, N.L., Kay, J., Whitaker, H., Clark, J., Hurst, R., Gnanapragasam, V.J., Shah, N.C., Warren, A.Y., Cooper, C.S., Lynch, A.G., Stark, R., Mills, I.G., Grönberg, H., Neal, D.E., 2015. Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. *EBioMedicine* 2, 1133–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.017>
- Rutz, N., Heilbronn, R., Weger, S., 2015. Interactions of cullin3/KCTD5 complexes

with both cytoplasmic and nuclear proteins: Evidence for a role in protein stabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 922–928.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.069>

- Sagredo, A.I., Sagredo, E.A., Pola, V., Echeverría, C., Andaur, R., Michea, L., Stutzin, A., Simon, F., Marcelain, K., Armisén, R., 2018. TRPM4 channel is involved in regulating epithelial to mesenchymal transition, migration, and invasion of prostate cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*
<https://doi.org/10.1002/jcp.27371>
- Santoni, G., Farfariello, V., 2011. TRP Channels and Cancer: New Targets for Diagnosis and Chemotherapy. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets* 11, 54–67. <https://doi.org/10.2174/187153011794982068>
- Schinke, E.N., Bii, V., Nalla, A., Rae, D.T., Tedrick, L., Meadows, G.G., Trobridge, G.D., 2014. A novel approach to identify driver genes involved in androgen-independent prostate cancer. *Mol. Cancer* 13, 120.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-120>
- Serra C, I., Martínez R, R., Mimica S, X., Cavada CH, G., Aguayo S, C., 2009. Cáncer de mama en Chile: Un aporte clínico y epidemiológico según un registro poblacional metropolitano: 1.485 pacientes. *Rev. Chil. cirugía* 61, 254.
<https://doi.org/10.4067/S0718-40262009000600003>
- So, C.L., Saunus, J.M., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., 2018. Calcium signalling and breast cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.11.001>
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Rijn, M. Van De, Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein, P., Børresen-dale, A., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10869–10874.
- Sozucan, Y., Kalender, M.E., Sari, I., Suner, A., Oztuzcu, S., Arman, K., Yumrutas, O., Bozgeyik, I., Cengiz, B., Igci, Y.Z., Balakan, O., Camci, C., 2015. TRP genes family expression in colorectal cancer. *Exp. Oncol.* 37, 208–12.
- Stock, C., Schwab, A., 2015. Ion channels and transporters in metastasis. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2638–2646.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.012>
- Suguro, M., Tagawa, H., Kagami, Y., Okamoto, M., Ohshima, K., Shiku, H., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M., 2006. Expression profiling analysis of the CD5+ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: Development of a CD5 signature. *Cancer Sci.* 97, 868–874. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00267.x>
- Swatek, K.N., Komander, D., 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res.*
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>

- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>.TRP
- Weigelt, B., Baehner, F.L., Reis-filho, J.S., 2010. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification , prognostication and prediction : a retrospective of the last decade. *J. Pathol.* 220, 263–280. <https://doi.org/10.1002/path>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yu, S., Kim, T., Yoo, K.H., Kang, K., 2017. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.114>
- Zhang, X., Zhou, H., Cai, L., Fan, C., Liu, Y., Wang, L., Li, Q., Miao, Y., Miao, Y., North, S., Area, N., Province, L., 2017. Kctd20 promotes the development of non-small cell lung cancer through activating Fak/AKT pathway and predicts poor overall survival of patients. *Mol. Carcinog.* 56, 2058–2065. <https://doi.org/10.1002/jmv.22660>
- Zhong, Y., Yang, J., Xu, W.W., Wang, Y., Zheng, C.C., Li, B., He, Q.Y., 2017. KCTD12 promotes tumorigenesis by facilitating CDC25B/CDK1/Aurora A-dependent G2/M transition. *Oncogene* 36, 6177–6189. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.287>