

VCH - FC
Biotecnología
B585
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

Estudio del rol de Glucosa en la inflamación y
modificación estromal dependiente de IL-1 en un
modelo de cáncer mamario humano.

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

ARANTZAZÚ BELÉN BIDEGAIN RIVERA

Director del Seminario de Título:

Dr. Jorge Martínez Winkler

Enero 2017 – Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la **Srta. Arantzazú Belén Bidegain Rivera**:

“Estudio del rol de Glucosa en la inflamación y miodiferenciación estromal dependiente de IL-1 en un modelo de cáncer mamario humano.”

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

Director Seminario de Título

Dr. Jorge Martínez Winkler:

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Elías Utreras Puratich:



Dr. Christian González Billault:

Santiago de Chile, ___ de Enero 2017

*"Dedicado a mis papás
y a mi Pocho"*

FINANCIAMIENTO

Para la realización de este Seminario de Título se contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1120187 que tiene como jefe de proyecto al Dr. Jorge Martínez Winkler y fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del INTA, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad de Chile.

Para la asistencia a congresos en que se expuso los resultados de este Seminario de Título se contó con el apoyo de la beca para estudiantes de pregrado otorgada por la Sociedad de Biología Celular de Chile y con la beca de ayuda estudiantil que otorga la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile el año 2015.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Cáncer	5
2. Cáncer de mamas.....	5
3. Hiperglicemia y cáncer de mamas.....	6
4. Microambiente tumoral.....	8
5. Metástasis.....	11
6. Desmoplasia	12
7. Cáncer, diabetes e inflamación	14
8. Familia de Interleuquinas-1	16
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1 Materiales	22

1.1 Líneas celulares.....	22
1.2 Muestras mamarias de pacientes.....	22
1.3 Materiales de cultivo	23
1.4 Materiales generales.....	23
1.5 Anticuerpos.....	23
1.6 Partidores para RT-PCR cuantitativo	24
2 Reactivos	25
2.1 Reactivos para cultivo celular.....	25
2.2 Reactivos para PCR cuantitativo, western blot y Zimografía	26
2.3 Reactivos generales.....	26
3 Metodología	27
3.1 Cultivo celular.....	27
3.2 Medios condicionados	27
3.3 RT-PCR cuantitativo	28
3.3.1 Extracción RNA y síntesis cDNA	28
3.3.2 qPCR	28
3.4 Western Blot.....	29
3.4.1 Extractos proteicos.....	29
3.4.2 Electroforesis denaturante.....	29
3.5 Zimografía.....	30

3.6 Densitometría digital de las bandas de WB y zimografía.....	31
3.7 Inmunofluorescencia.....	31
3.8 Inmunohistoquímica.....	32
3.9 Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS.....	34
1. La exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa aumenta la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.	34
2. Factores solubles epiteliales favorecen la expresión estromal de IL1R1 y ésta es favorecida por la glucosa.	36
3. Factores solubles epiteliales favorecen la secreción de metaloproteinasas de matriz extracelular en fibroblastos mamarios humanos.....	37
4. La mio-diferenciación fibroblástica es favorecida por la prolongada exposición a altas concentraciones de glucosa en células estromales mamarias.....	40
5. La rigidez de la matriz extracelular modula la expresión de IL1R1.	44
6. El receptor de interleuquina-1 β es un potencial marcador molecular de malignidad en carcinomas mamarios del tipo ductal infiltrante.	47
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos primarios.	23
Tabla 2: Anticuerpos secundarios para western blot.	24
Tabla 3: Anticuerpos fluorescentes.	24
Tabla 4: Partidores qPCR.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Componentes del nicho tumoral.....	9
Figura 2. Activación de fibroblastos.	10
Figura 3: Densidad mamaria y desarrollo tumoral.....	14
Figura 4: Vías de señalización de IL-1 α e IL-1 β	19
Figura 5: La expresión del receptor de IL-1 β es inducida por la exposición prolongada a una alta concentración de glucosa en fibroblastos mamarios humanos.....	35
Figura 6: Factores de origen epitelial y el ligando IL-1 β inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.	37
Figura 7: La expresión y secreción de MMPs es inducida por IL-1 β y por factores epiteliales en células estromales mamarias.....	39
Figura 8: Fibroblastos humanos de origen mamario cultivados en condiciones de alta glucosa presentan un aumento en la expresión de marcadores de mio-diferenciación	42
Figura 9: La expresión del receptor de IL-1 β es inducida por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en células estromales mamarias.	43
Figura 10: IL-1 β no induce la expresión del marcador de mio-diferenciación α -SMA en células estromales mamarias.....	44

Figura 11a: La rigidez de la matriz extracelular y la exposición a una alta concentración de glucosa inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.....	46
Figura 11b: La rigidez de la matriz extracelular y la exposición a una alta concentración de glucosa inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.....	47
Figura 12: La expresión de IL1R1 se correlaciona con el grado de malignidad del tumor mamario.	49
Figura 13: Modelo de interacción entre epitelio y estroma mamario	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
α -SMA	Actina de músculo liso alfa
BSA	Albúmina de suero bovino
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer
cDNA	ADN complementario
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ES	Error estándar
FAK	Quinasa de adhesión focal
FN-EDA	Fibronectina celular con dominio EDA
IHQ	Inmunohistoquímica
IL1R1	Receptor de interleuquina-1 β tipo I
IL-1 β	Interleuquina 1 beta

MC	Medio condicionado
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa de matriz
mRNA	ARN mensajero
OV	Ortovanadato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PFA	Paraformaldehido
PMSF	Fenilmetil sulfonido
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot

RESUMEN

El cáncer de mamas corresponde al tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el segundo cáncer con mayor mortalidad en el mundo. La hiperglicemia, característica de la diabetes, se ha descrito como un importante factor de riesgo para la adquisición de este cáncer y se ha observado que genera una predisposición al desarrollo de un fenotipo más agresivo. Los mecanismos moleculares mediante los cuales actúa la hiperglicemia, han sido estudiados predominantemente en el compartimento epitelial, existiendo, a la fecha, menor información sobre su efecto en el microambiente tumoral. Diversos estudios han mostrado que la progresión tumoral, vale decir, la capacidad invasiva de la célula epitelial transformada, está fuertemente influenciada por el componente estromal. En efecto, los fibroblastos que acompañan al tumor son capaces de modificar su comportamiento y adquirir un fenotipo activado, que se caracteriza por una acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC), generando un fenómeno fibrótico que promueve la proliferación, invasión y metástasis tumoral. Histopatológicamente, los tumores se asemejan a un tejido inflamado y en proceso de cicatrización. Se ha determinado que existen niveles elevados de IL-1 β en el microambiente tumoral y que ésta tiene un papel central en la generación de un ambiente pro-inflamatorio propenso a la malignidad.

En este trabajo se estudió el efecto de una alta concentración de glucosa, que simula una hiperglicemia, sobre el estroma mamario, enfocado en: la expresión y actividad de señalización del receptor de IL-1 β (IL1R1), la expresión de marcadores de mio-diferenciación fibroblástica y la relación entre el fenómeno desmoplásico, caracterizado por un aumento en la rigidez de la MEC, con la expresión y señalización del receptor de

IL-1 β . Para lograr este objetivo, células estromales mamarias sanas fueron cultivadas en una condición de normoglicemia o hiperglicemia y estimuladas con factores solubles de origen epitelial o con señales mecánicas provenientes de placas de cultivo con sustratos rígidos.

Se determinó que en fibroblastos mamarios humanos la hiperglicemia promueve la expresión de IL1R1, en condiciones basales y frente a estímulos epiteliales, y la expresión de marcadores moleculares de miodiferenciación. Por otra parte, se observó que IL-1 β induce la expresión de su receptor y la secreción de metaloproteinasas de matriz, y no está involucrado en la adquisición de un fenotipo miofibroblasto. Además, se estableció que glucosa junto con la rigidez de la MEC modulan la expresión de IL1R1. Finalmente, se observó una correlación entre la expresión de IL1R1 y la malignidad tumoral mamaria.

Estos resultados sugieren que glucosa posee un rol central en la adquisición de un ambiente pro-inflamatorio, corroborando la importancia del estroma en la progresión tumoral y permitiendo una mejor comprensión de la relación entre hiperglicemia, inflamación y cáncer.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women and the second type of cancer with the highest mortality in the world. Hyperglycemia, the defining characteristic of diabetes, has been described as an important risk factor for the acquisition of breast cancer and it has been observed that generates a predisposition of developing a more aggressive phenotype. The molecular mechanisms by which hyperglycemia acts have been studied predominantly in the epithelial compartment, but there is little information about its effect on the tumor microenvironment. Several studies have shown that tumor progression, or the invasive capacity of transformed epithelial cells, is strongly influenced by the stromal component. Indeed, fibroblasts accompanying the tumor are able to modify their behavior and acquire an activated phenotype, which is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix (MEC) components, generating a fibrotic phenomenon that promotes proliferation, invasion and tumor metastasis. Histopathologically, tumors resemble an inflamed tissue during healing process. It has been determined that there are high levels of IL-1 β in the tumor microenvironment and it has a central role in generating a pro-inflammatory environment prone to malignancy.

In this work the effect of high glucose, simulating a hyperglycemic environment, on breast stroma was studied focused on: the expression and signaling activity of IL-1 β receptor (IL1R1), the expression of mio-fibroblasts molecular markers and the relationship between the desmoplastic phenomenon, characterized by a rigid MEC, and the expression of IL-1 β receptor. To achieve this, healthy mammary stromal cells were

cultured in hyperglycemia and normoglycemia conditions and stimulated with epithelial soluble factors or mechanical signals from culture plates with rigid substrates.

It was determined that in human mammary fibroblasts hyperglycemia promotes the expression of IL1R1, both in basal conditions and with epithelial stimuli, and the expression of mio-differentiation molecular markers. Moreover, it was observed that IL-1 β induces the expression of its own receptor and the secretion of matrix metalloproteinases, and is not involved in the acquisition of a myofibroblast phenotype. Additionally, it was established that glucose and MEC rigidity modulate the expression of IL1R1. Finally, a correlation between the expression of IL1R1 and breast tumor malignancy was observed.

These results suggest that glucose has a central role in the acquisition of a pro-inflammatory environment, confirming the importance of stroma in tumor progression and allowing a better understanding of the relationship between hyperglycaemia, inflammation and cancer.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer suele describirse como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control. Sin embargo, corresponde a un proceso de mayor complejidad que involucra el establecimiento de un nicho tumoral compuesto por diversos tipos celulares que interactúan entre ellos y que mediante la adquisición de diez capacidades biológicas permiten el desarrollo del tumor. Estas son: evasión de supresores del crecimiento, señalización de proliferación mantenida, inducción de la angiogénesis, resistencia a la muerte celular, reprogramación del metabolismo, acumulación de mutaciones genómicas, evasión de la destrucción del sistema inmune, adquisición de inmortalidad replicativa, inflamación y la activación de la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

2. Cáncer de mamas

El cáncer de mamas corresponde al tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el segundo cáncer con mayor mortalidad en el mundo, después del cáncer de pulmón (Jemal y col., 2010). En Chile, por su parte, es la segunda causa de muerte luego del cáncer de vesícula y vías biliares (Prieto, 2011). En las dos últimas décadas se ha observado un incremento en la mortalidad del orden de un 20% llegando a superar las 1300 muertes en el año 2011. Esta creciente mortalidad se relaciona con un envejecimiento poblacional, obteniéndose los niveles más altos en edades sobre los 60 años con una mayor frecuencia de estadios III y IV. Estos estadios del cáncer de mama

son determinados de acuerdo a su patología y van desde el I al IV, siendo este último el más agresivo y de carácter metastásico (Serra y col., 2014).

Existen diversos tipos de cáncer mamario los cuales pueden originarse en el ducto mamario (carcinomas ductales), en los lobulillos productores de la leche (carcinomas lobulillares) o en el tejido circundante (sarcomas, tumor filoides, cáncer inflamatorio, etc.). Además, pueden clasificarse de acuerdo al tipo celular que los origina, siendo los carcinomas los derivados del epitelio, angiosarcomas los derivados del endotelio, liposarcomas derivados del tejido adiposo, etc. (Richie y Swanson, 2003). El tipo de cáncer de mamas más común es el carcinoma ductal infiltrante, que deriva de células epiteliales, se origina en el ducto mamario y posee la capacidad de invadir los tejidos circundantes (Li y col., 2005).

3. Hiperglicemia y cáncer de mamas.

El sedentarismo, una dieta inadecuada, padecer obesidad y el envejecimiento son las principales causas para la adquisición de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Estudios poblacionales han propuesto que la hiperglicemia, característica de la enfermedad diabética, constituye un importante factor de riesgo para la adquisición de un cáncer mamario (Ryu y col., 2014). Específicamente, se ha observado que las mujeres con diabetes tienen una mayor mortalidad una vez desarrollada esta neoplasia debido a que, al diagnóstico, presentan estadios más avanzados de cáncer de mama. Más aún, se ha determinado que las mujeres con diabetes poseen un mayor riesgo de metástasis a los ganglios linfáticos y de presentar tumores con un tamaño superior a los 2 cm (Lipscombe y col., 2015). Todos estos hallazgos sugieren que la diabetes genera una predisposición al desarrollo de un cáncer de mama más agresivo.

En general, se ha propuesto que esta asociación entre hiperglicemia y cáncer mamario está determinada por el desbalance hormonal secundario a la diabetes. Sin embargo, en la actualidad se ha identificado a glucosa como un agente modulador de la actividad celular que promueve el desarrollo tumoral (Jang y col., 2013). Este hallazgo se vincula con uno de los rasgos característico de los tumores sólidos: su alto consumo de glucosa. Esta característica ha servido como una eficiente herramienta de diagnóstico mediante el uso de la Tomografía de emisión de Positrones (PET) que usa el análogo de glucosa [¹⁸F] fluorodeoxiglucosa (FDG) como trazador y que, basado en la mayor avidéz del tumor por glucosa, permite la detección no sólo del tumor primario sino además de las metástasis a distancia (Gatenby y Gillies, 2004).

Una de las características distintivas de la conducta metabólica tumoral es el hecho de que este alto consumo de glucosa opere a través de la vía glicolítica aun en situación de normoxia. Esta adaptación metabólica es conocida como “Efecto Warburg” y su finalidad primordial es anabólica (Warburg, 1956; Heiden y col., 2009).

Se ha establecido que la hiperglicemia induce la progresión tumoral mediante diversos mecanismos moleculares. Uno de ellos es promover la proliferación celular mediante el aumento en la expresión de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 (Hahn y col., 1998), el aumento de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el aumento en los niveles de proteína quinasa C (PKC) y el aumento de factores de transcripción como PPARs (Ryu y col., 2014). Además, se ha descrito que la hiperglicemia inhibe la apoptosis mediante la interferencia en la degradación del factor inducible de hipoxia-1 α (HIF1- α) por la enzima prolil hidroxilasa (PHD) y por la inactivación redox del citocromo c (Vaughn y Deshmukh, 2008). Más aun, se ha observado que induce la invasión y metástasis mediante la disminución de los niveles

de E-caderina y el aumento en los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). También, se ha determinado que este estado metabólico da lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) e induce la expresión de citoquinas inflamatorias (González y col., 2012). Finalmente, se ha logrado identificar un fenómeno epigenético llamado "Memoria hiperglicémica", en el que se activan rutas oncogénicas debido a la exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa, las cuales se mantienen activas incluso luego de volver a una condición de normoglicemia (Ryu y col., 2014).

A pesar de que los efectos de la hiperglicemia sobre las células neoplásicas han sido ampliamente estudiados, poco es lo que se ha dilucidado respecto a esta sobre oferta de glucosa sobre el microambiente que acompaña al tumor.

4. Microambiente tumoral

El nicho tumoral mamario (Figura 1) está compuesto por el parénquima (células transformadas o neoplásicas) y por el estroma, componente principal que comprende células estromales (fibroblastos, células endoteliales, células inmunes, adipocitos, etc.) y proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Ironsides y Jones, 2016).

Durante las últimas décadas, se ha propuesto que la progresión tumoral, vale decir, la capacidad invasiva de la célula epitelial transformada, está fuertemente determinada por la relación funcional que establece el epitelio con el estroma (Elenbaas y Weinberg, 2001). En el caso de la MEC, se ha descrito que sirve como un reservorio de diversos factores de crecimiento, en su forma latente y activos, así como también de otros mediadores solubles que contribuyen a la progresión del cáncer (Cichon y col., 2010).

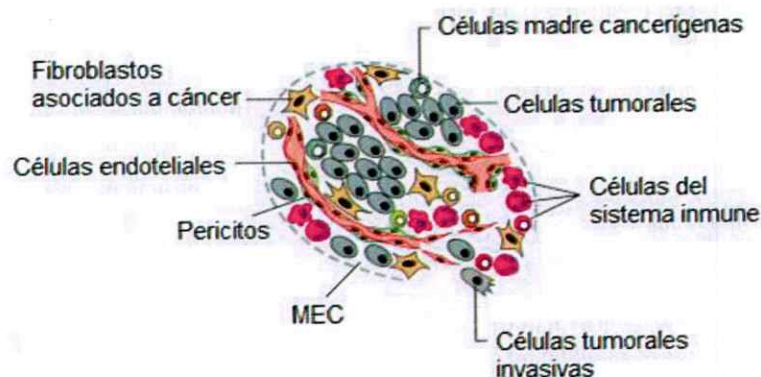


Figura 1: Componentes del nicho tumoral. En la mayoría de tumores sólidos tanto el parénquima como el estroma contienen distintos tipos y subtipos celulares que permiten colectivamente el crecimiento y la progresión tumoral. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

Por otra parte, los fibroblastos que acompañan al tumor son capaces de modificar su comportamiento mediante un proceso conocido como estromagénesis que ocurre de manera paralela a la tumorigénesis. En un principio, el estroma sano actúa como barrera para la progresión tumoral, pero durante las primeras etapas de la tumorigénesis las células tumorales adquieren la capacidad de inducir la activación de estos fibroblastos, comenzando así, una comunicación cruzada entre el epitelio y el estroma. Esta comunicación es capaz de promover tanto tumorigénesis como estromagénesis y mediante transiciones graduales es capaz de culminar en la adquisición de un fenotipo estromal totalmente activado. Llegado este punto, tanto estroma como tumor se verán comprometidos irreversiblemente con un fenotipo transformado maligno (Beacham y Cukierman, 2005).

Estos fibroblastos activados (Figura 2) o fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), fenotípicamente se caracterizan por la expresión de α -actina de musculo liso (α -SMA) y

de fibronectina con un dominio extra tipo EDA (FN-EDA), sumado a un aumento en la deposición de colágeno I en la MEC. En cuanto a su función, son capaces de interactuar con las células de carcinoma mediante la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y tenascina C induciendo la proliferación e invasión tumoral. Además, secretan señales pro-tumorígenicas, tales como TGF- β y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), que actúan sobre el epitelio mamario sano. Por otra parte, los CAFs también pueden interactuar con la microvasculatura, a través del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) induciendo la angiogénesis, y con la MEC, secretando proteasas que degradan sus componentes. Finalmente, son capaces de mediar la respuesta inflamatoria mediante citoquinas tales como IL-1 y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) (Kalluri y Zeisberg, 2006).

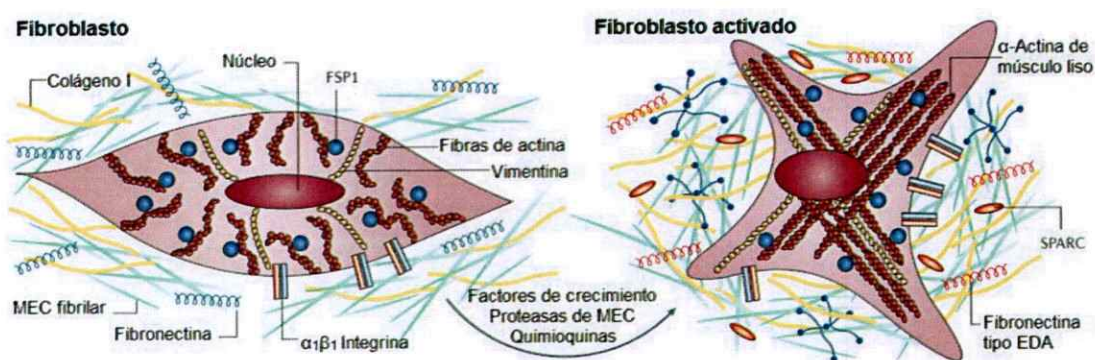


Figura 2. Activación de fibroblastos. Diversas señales, tales como factores de crecimiento, proteasas de la matriz extracelular y quimioquinas, en conjunto son capaces de inducir la diferenciación de un fibroblasto sano a un fenotipo activado asociado a cáncer. Modificado de Kalluri y Zeisberg, 2006.

5. Metástasis

La mortalidad del cáncer de mama está directamente relacionada con el fenómeno metastásico, ya que se propaga principalmente a los pulmones, huesos, el hígado y el cerebro (Gupta y Massagué, 2006). Para desarrollar esta capacidad la célula neoplásica debe exhibir un fenotipo complejo que incluye la capacidad de escapar de la masa del tumor primario, invadir el tejido normal circundante y penetrar en la circulación, para finalmente poder proliferar en el parénquima de órganos distantes (Davies, 2014). Para que esto ocurra es necesario que las células tumorales experimenten un fenómeno conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), proceso mediante el cual una célula epitelial polarizada que normalmente interactúa con la membrana basal a través de su superficie basal, es objeto de múltiples cambios funcionales que le permiten adquirir un fenotipo de tipo mesenquimal que incluye: mayor capacidad migratoria, invasividad, resistencia a la apoptosis y producción aumentada de componentes de la MEC. Diversos procesos moleculares están involucrados con el desarrollo de una EMT dentro de los cuales se incluyen la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas en la superficie celular, la expresión y reorganización de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la MEC y cambios en la expresión de microARNs específicos (Kalluri y Weinberg, 2009).

Desde el punto de vista del estroma este fenómeno se ve reforzado por la secreción de proteasas que digieren los componentes de la lámina basal y facilitan el movimiento de las células tumorales a través de la MEC. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn y su principal función es la degradación de proteínas de la MEC. Las MMPs pueden dividirse en cuatro grupos: colagenasas, gelatinasas, de membrana y estromelinas (Visse y Nagase, 2003).

Dentro del grupo de las gelatinasas se encuentran MMP-2 y MMP-9, enzimas capaces de degradar colágeno tipo IV (componente principal de la membrana basal) y que son secretadas por células estromales de tumores mamarios (Koujan y col., 2015). Específicamente, MMP-2 es secretada en su forma latente (pro-MMP-2) la cual es activada proteolíticamente por la metaloproteínasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP) para generar una especie intermedia, que mediante un corte proteolítico genera la enzima totalmente activa (Nishida y col., 2008). La activación de pro-MMP-2 está regulada por el inhibidor de la metaloproteínasa de tejido 2 (TIMP-2) el cual se une al sitio catalítico de MT1-MMP impidiendo su función (Roomi y col., 2013).

Aunque el rol de las MMPs se consideraba exclusivamente relacionado a la invasión y metástasis, nueva evidencia sugiere que las MMPs participan en varias etapas de la progresión del cáncer pudiendo alterar procesos fisiológicos celulares que inducen señales de crecimiento, resistencia a señales inhibitoras del crecimiento, insensibilidad a la apoptosis, sobre replicación y angiogénesis (Koujan y col., 2015).

6. Desmoplasia

La desmoplasia es una característica propia del tumor mamario generada por un aumento en la producción de colágeno por los fibroblastos del estroma que contribuye al establecimiento de una MEC más rígida, que se asocia con un mal pronóstico y desarrollo tumoral. Clínicamente este proceso se expresa en el análisis mamográfico y se relaciona con el aumento de la densidad mamaria que representa un importante factor de riesgo de la tumorigénesis (Boyd y col., 2011).

Se sugieren dos posibles mecanismos por los cuales el aumento de la densidad de colágeno podría promover el desarrollo de tumores (Figura 3). El primero correspondería

a un efecto directo sobre las células epiteliales debido a la rigidez de la matriz extracelular la cual mediante señales mecánicas promovería la proliferación, invasión y metástasis. El segundo, sería un efecto indirecto sobre el comportamiento de los fibroblastos mamarios lo que resultaría en la secreción alterada de factores de crecimiento y citoquinas las cuales modificarían el comportamiento de las células epiteliales tumorales (Ironsides y Jones, 2016).

Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales ocurre la activación de miofibroblastos y la consecuente síntesis de colágeno. Estos incluyen la producción de citoquinas inmunes, la generación de lesiones microvasculares (con características análogas a la cicatrización de heridas) y la activación paracrina por factores de crecimiento liberados por las células tumorales. Algunos de estos factores son: Factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β), Factor de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF-I y IGF-II) y el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Walker, 2001).



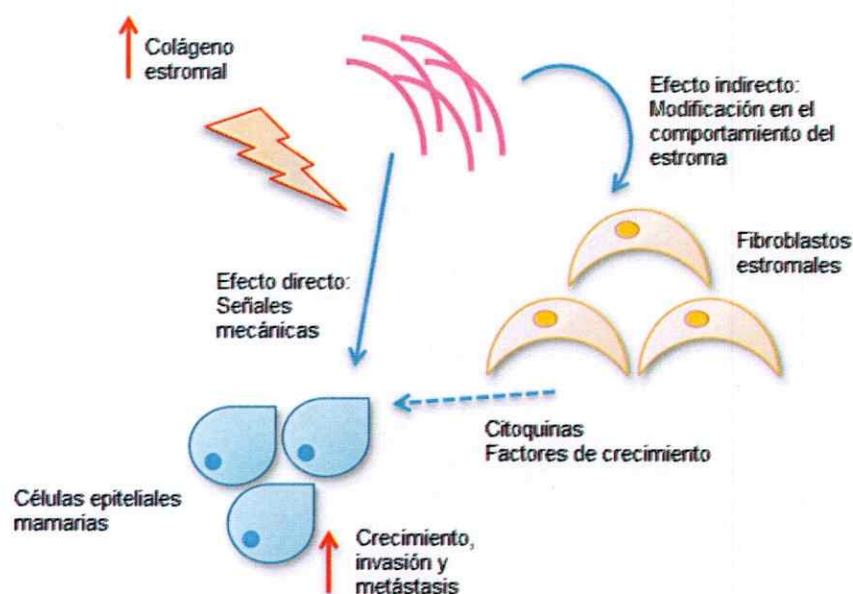


Figura 3: Densidad mamaria y desarrollo tumoral. El aumento en la densidad de colágeno puede influir en el comportamiento de las células epiteliales mamarias directamente a través de señales mecánicas o indirectamente a través de la modificación del comportamiento de fibroblastos estromales. Modificado de Ironside y Jones, 2016.

7. Cáncer, diabetes e inflamación.

Es un hecho conocido que el envejecimiento, la obesidad, el sedentarismo, una dieta poco sana y el consumo de tabaco y alcohol constituyen potenciales factores de riesgo tanto para la adquisición de cáncer como de diabetes. En la búsqueda de una asociación funcional entre ambas patologías, los posibles mecanismos para un vínculo directo incluyen la hiperglicemia y el fenómeno inflamatorio (Giovannucci y col., 2010).

Durante décadas se ha sostenido que histopatológicamente los tumores se asemejan a un tejido inflamado y en proceso de cicatrización, semejanza que abarca la activación del estroma, entendida como el proceso de miodiferenciación fibroblástica, y la posterior

infiltración tanto de miofibroblastos como de células del sistema inmune. La principal diferencia entre la activación del estroma de un tejido en cicatrización y el de un tumor es que el primer fenómeno es transitorio y el segundo permanente (McAllister and Weinberg, 2014).

Interleuquina-1 (IL-1) es uno de los factores solubles más abundantes en los distintos cuadros inflamatorios (Dinarello, 2011). Consecuentemente, se ha identificado que en muchas formas de cáncer, incluido el mamario, existe una producción endógena de IL-1 elevada, la cual se asocia con un mal pronóstico y potencial desarrollo de metástasis (Miller y col., 2000). Por otro lado, altos niveles de ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima que posee un papel fundamental en la vía de síntesis de prostaglandina E2 (PGE2), definen un microambiente inflamado y predicen un mal pronóstico en varios tipos de cáncer, estableciendo así a COX-2 como un marcador de malignidad (Menter y col., 2010).

Por otra parte, también se ha observado que niveles elevados de IL-1 β e IL-6, son predictores de la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (Spranger y col., 2003). Además, ha sido posible observar altos niveles de IL-1 β , quimioquinas y macrófagos en los islotes pancreáticos una vez adquirida esta enfermedad. La DMT2 se caracteriza por un flujo excesivo de sustratos, como la glucosa y los ácidos grasos libres, los cuales en conjunto aumentan significativamente los niveles de IL-1 β , lo que constituye un estímulo a la producción de citoquinas y quimioquinas en las células β pancreáticas, que finalmente culminan en el desarrollo de un cuadro inflamatorio (Boni-Schnetzler y col., 2009).

Específicamente, respecto al sistema inmune, se ha descrito que la hiperglicemia aumenta la adhesión y transmigración de leucocitos a través del endotelio, aumenta los

niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias tempranas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), aumenta la transcripción de quimioquinas (MCP-1, HCC-4, MCP-3, IP-10 y TARC) y altera la fagocitosis de leucocitos polimorfonucleares (Turina y col., 2005).

Podemos decir entonces que tanto el cáncer como la DMT2 cursan con episodios inflamatorios, lo que permite suponer que la inflamación puede ser un posible blanco terapéutico en ambas patologías. Como ejemplo de ello, resultados recientes han demostrado que la inhibición de la actividad de COX-2, mediante el uso de una droga anti-inflamatoria no esteroidea (NSAID), se ha asociado con una menor recurrencia de cáncer mamario positivo para receptor de estrógeno (ER α +) en mujeres obesas y con sobre-peso (Bowers y col., 2014).

8. Familia de Interleuquinas-1

La familia de IL-1 posee un rol central en la mediación de la inmunidad innata y la inflamación, ya que todas las células del sistema inmune innato expresan y/o se ven afectadas por los miembros de esta familia. Está compuesta por once miembros: siete ligandos con actividad agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ), tres antagonistas (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38) y una citoquina anti-inflamatoria (IL-37) (Garlanda y col., 2013).

Unas de las citoquinas más estudiadas de esta familia son IL-1 α e IL-1 β . Estas se sintetizan como precursores inactivos (pro-IL-1 α y pro-IL-1 β), que mediante el corte proteolítico por calpaina y caspasa-1 respectivamente, dan origen a sus formas activas maduras. Pro-IL-1 β también puede ser secretada y procesada por proteasas de neutrófilos extracelulares. Por otro lado, pro-IL-1 α miristoilada y asociada a la membrana puede señalizar a través del receptor de IL-1 tipo 1 (IL1R1) mediante comunicación

célula-célula. Adicionalmente, tanto pro-IL-1 α como su producto procesado N-terminal poseen la señal de localización nuclear (NLS), que les permite translocar al núcleo donde ejercen sus funciones biológicas (Figura 4). Pro-IL-1 α , IL-1 α e IL-1 β se unen a IL1R1, permitiendo el reclutamiento del co-receptor IL-1RacP y formando el complejo IL-1R. Una vez unido el ligando, se activa una cascada de señalización que incluye proteínas quinasas activadas por mitógenos (JNK, p38, ERK1/2), así como factores de transcripción (NF κ B y c-Jun) que controlan la expresión de una serie de proteínas inflamatorias tales como la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la fosfolipasa A tipo 2 (PLA2). La señalización a través del complejo IL-1R puede ser inhibida por: i) el receptor de IL-1 tipo 2 (IL1R2), que no posee tallo citoplasmático y cumple un rol dominante negativo, ii) el receptor de IL-1 tipo 2 soluble (sIL-1R2), iii) el co-receptor IL-1RacP soluble (sIL-1RacP) y iv) el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Risbud y Shapiro, 2014).

En la DMT2 se ha observado que las altas concentraciones de glucosa inducen la producción de IL-1 β por las células β -pancreáticas y se ve reducida la expresión del antagonista de IL1R1 (IL1Ra), lo que lleva a una secreción de insulina alterada, a una disminución de la proliferación celular y finalmente a la apoptosis de estas células. Ensayos clínicos en pacientes diabéticos han mostrado que la administración de Anakinra, un antagonista recombinante de IL1R1 humano, mejora la glicemia y reduce la inflamación (Larsen y col., 2007).

Por otra parte, en relación al cáncer de mamas, la producción de IL-1 β ha sido atribuida a diversos tipos celulares, entre ellas las propias células del carcinoma (Li y col., 2012), así como macrófagos infiltrantes y monocitos (Sims y Smith, 2010). Se ha visto que IL-1 β es capaz de inducir angiogénesis y proliferación tumoral, observándose que ratones

knockout para IL-1 β poseen estas capacidades considerablemente disminuidas. Además, se ha visto que el tratamiento con IL1Ra inhibe la respuesta inflamatoria y el desarrollo tumoral en ratones. Más aún, el tratamiento con tamoxifeno, medicamento que se utiliza como terapia para el cáncer mamario con receptores de estrógeno positivos, disminuye los niveles estromales de IL-1 β y aumenta los niveles tanto estromales como epiteliales de IL1Ra (Lindahl y col., 2011).

En este trabajo entonces, se busca profundizar el estudio de la relación entre hiperglicemia, cáncer e inflamación. Específicamente, estudiar el efecto de la sobreoferta de glucosa sobre el estroma mamario, enfocado en la expresión y actividad de señalización del receptor de IL-1 β , así como también en la expresión de marcadores de mio-diferenciación fibroblástica. Además, se busca dilucidar la relación entre el fenómeno desmoplásico, caracterizado por un aumento en la rigidez de la MEC, con la expresión y señalización del receptor de IL-1 β .

Para esto, se desarrolló un modelo de células en cultivo que pretende simular la situación del tejido mamario en un ambiente de hiperglicemia. Se utilizó una línea celular estromal mamaria sana de origen humano, obtenida desde una reducción mamaria e inmortalizada mediante la incorporación de la subunidad catalítica de la telomerasa, la cual fue mantenida en medios de cultivo normoglicémicos (5,5 mM) o hiperglicémicos (25 mM).

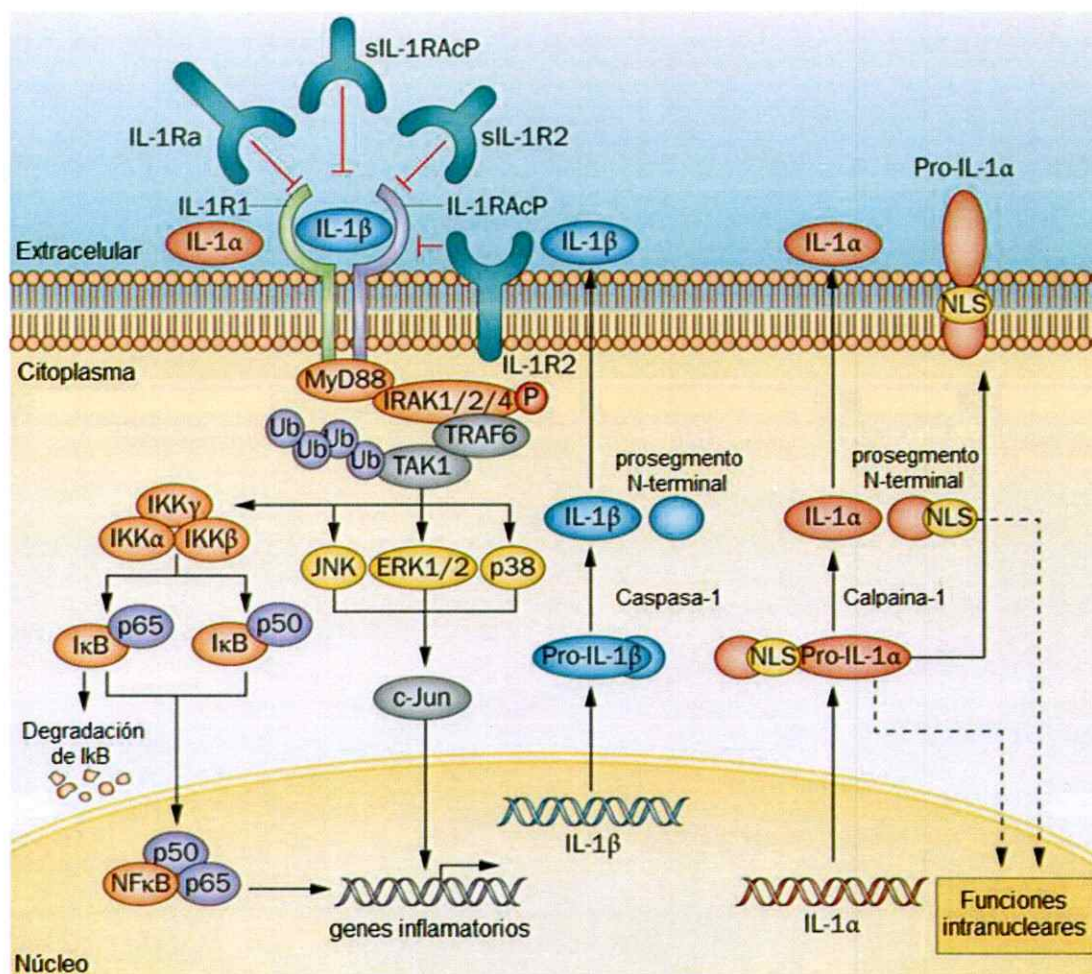


Figura 4: Vías de señalización de IL-1 α e IL-1 β . Las citoquinas inflamatorias IL-1 α e IL-1 β son sintetizadas como precursores inactivos y necesitan de un corte proteolítico para dar paso a su forma madura. Estas citoquinas se unen a su receptor (IL1R1) activando una cascada de señalización mediada por proteínas quinasas y factores de transcripción que finalmente inducen la expresión de genes inflamatorios. Modificada de Risbud y Shapiro, 2014.

HIPÓTESIS

Fibroblastos mamarios humanos de la línea RMF-EG cultivados en concentraciones elevadas de glucosa establecen una condición pro-inflamatoria que está asociada con elementos de la modificación fibroblástica y la expresión y actividad del receptor de IL-1 β .

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de glucosa en la expresión y actividad de señalización del receptor de IL-1 β y en la expresión de marcadores de mio-diferenciación fibroblástica en células estromales mamarias.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión del receptor de IL-1 β en células RMF-EG cultivadas en diferentes concentraciones de glucosa a nivel basal y estimulado por factores de tipo epitelial.
2. Estudiar el efecto de glucosa y factores epiteliales en la señalización del receptor de IL-1 β en células RMF-EG.
3. Evaluar el rol de glucosa en la diferenciación mio-fibroblástica y la influencia de esta última en la abundancia del receptor de IL-1 β en células RMF-EG.
4. Estudiar el efecto de la rigidez de la matriz extracelular en la expresión del receptor de IL-1 β en células RMF-EG crecidas en distintas concentraciones de glucosa.
5. Estudiar la posible correlación entre abundancia del receptor de IL-1 β y grado de malignidad en muestras de pacientes portadores de tumores mamarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales

1.1 Líneas celulares

-RMF-EG: Fibroblastos mamarios provenientes de una paciente sometida a una reducción mamaria donados por la Dra. Charlotte Kuperwasser (Tufts University, MA). Estos fibroblastos se immortalizaron mediante la sobre expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (Kuperwasser y col., 2004).

-MCF-7: Línea celular epitelial humana de origen tumoral débilmente invasiva adquirida en ATCC (Manassas, VA, US).

-MDA-MB231: Línea celular epitelial humana de origen tumoral fuertemente invasiva adquirida en ATCC (Manassas, VA, US).

1.2 Muestras mamarias de pacientes

Las muestras fueron obtenidas de pacientes sometidas a cirugía para la extirpación de un tumor mamario. Los cortes seriados fueron obtenidos del registro oncológico de la Fundación Arturo López Pérez (FALP) como parte de una colaboración con el proyecto de investigación FONDECYT 1120187. Todas las muestras utilizadas cuentan con la autorización debidamente registrada en un consentimiento informado autorizado por el comité de bioética del INTA y de la FALP.

1.3 Materiales de cultivo

Los siguientes materiales utilizados en cultivo celular se obtuvieron de Nest Biotechnology (Rahway, NJ, USA): Frascos de cultivo de 25 y 75 cm², placas de 35 y 60 mm, placas de 6 pocillos, placas de 96 pocillos, tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 ml.

Las placas de 6 pocillos con sustratos de rigidez variable (2, 16 y 64 kPa) fueron obtenidas de Advanced Biomatrix (San Diego, CA, US).

1.4 Materiales generales

Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y los rastrillos estériles desechables fueron adquiridos de Thermo (Rockford, IL, US). La película fotográfica Amersham Hyperfilm ECL se adquirió de GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, SE, US).

1.5 Anticuerpos

Los anticuerpos y compuestos fluorescentes utilizados en el desarrollo experimental de este seminario de título se presentan con detalle en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1: Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Código	Marca	Técnica
Anti-IL1R1	conejo	1:500 / 1:300	ab106278	Abcam	IF / IHQ
Anti-IL1R1	conejo	1:1000	ab106278	Abcam	WB
Anti- α SMA	ratón	1:300	ab7817	Abcam	WB

Anti-Fibronectina	ratón	1:1000	ab6328	Abcam	WB
Anti- α -Tubulina	ratón	1:5000	T5168	Sigma- Aldrich	WB
Anti- β -Actina	ratón	1:5000	A5441	Sigma- Aldrich	WB

Tabla 2: Anticuerpos secundarios para western blot.

Anticuerpo	Dilución	Código	Marca
Anti-Ratón	1:5000	610-1302	Rockland
Anti-Conejo	1:7000	611-1302	Rockland

Tabla 3: Anticuerpos fluorescentes.

Anticuerpo	Fluoróforo	Color	Dilución	Marca
Anti-Conejo	Alexa Fluor-488	verde	1:500	Jackson Immuno Research

1.6 Partidores para RT-PCR cuantitativo

Los partidores para RT-PCR cuantitativo utilizados para el desarrollo experimental de este seminario de título se muestran en la tabla 4 y fueron obtenidos de Integrated DNA Technologies IDT (Coralville, IA, US).

Tabla 4: Partidores qPCR.

Partidor	Secuencia	Tm	Tamaño
il1r1 F	5'-GGAGACGGAGGACTTGTGTG-3'	60°C	278 pb
il1r1 R	5'-ATCACAGGCCTTGTGGGTTT-3'		
α -sma F	5'-GCCGACCGAATGCAGAAGGA-3'	63°C	190 pb
α -sma R	5'-TGCGGTGGACAATGGAAGGC-3'		
mmp-1 F	5'-TCCAAGCCATATATGGACGTT-3'	58°C	253 pb
mmp-1 R	5'-ACTTCATCTCTGTCGGCAAAT-3'		
gapdh F	5'-CAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'	69°C	283 pb
gapdh R	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'		

2 Reactivos

2.1 Reactivos para cultivo celular

Los medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) provienen de GIBCO (Grand island, NY, US). Suero fetal bovino (SFB) de Corning (Chelmsford, MA, US) y Tripsina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). La Gentamicina fue comprada a Laboratorios Sanderson (Santiago, RM, CL). Los antibióticos Penicilina/Streptomycin y la Anfotericina B fueron adquiridos de Biological industries (Cromwell, CT, US). IL-1 β y TGF- β 1 recombinante humano fueron adquiridos de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, US).

2.2 Reactivos para PCR cuantitativo, western blot y zimografía.

El reactivo Trizol fue adquirido de Life Technologies (Waltham, MA, US). La enzima transcriptasa reversa M-MLV, el oligo-dT y el mix de dNTPs son productos de Promega (Madison, WI, US). El el reactivo LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I es de Roche (Indianápolis, IN, US). La albúmina de suero bovino de Winkler (Santiago, RM, CL). El coctel de inhibidores de proteasas en tabletas Complete Mini fue obtenido de ROCHE (Indianápolis, IN, US). La solución acrilamida bis 30% fue adquirida de Bio-Rad (Hercules, CA, US). El tetrametiletilendiamina (TEMED) y el dodecilsulfato sódico (SDS) provienen de Merck Milipore (Billerica, MA, US). El estándar de proteínas Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder fue adquirido de Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). El 2-Mercaptoetanol es de GIBCO (Carisbad, CA, US). El azul de coomasie proviene de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). El sustrato quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Substrate es de Thermo (Rockford, IL, US). Finalmente, el Pierce™ BCA Protein Assay Kit fue adquirido de Thermo Fisher (Waltham, MA, US).

2.3 Reactivos generales

Los solventes de grado analítico cloroformo, etanol y 2-propanol fueron adquiridos de Merck Milipore (Billerica, MA, USA). El alcohol 70%, metanol y cloruro de potasio fueron comprados a TCL (Santiago, RM, CL). Tris base, glicina, cloruro de sodio, bicarbonato, fosfato disódico, tritón X-100 y tween 20 pertenecen a Winkler (Santiago, RM, CL). El agua libre de nucleasas proviene de Integrated DNA technologies (Coralville, IA, US).

3 Metodología

3.1 Cultivo celular

La línea celular estromal mamaria RMF-EG fue cultivada en medio DMEM en condiciones de baja (5,5 mM) o alta (25 mM) glucosa durante al menos cuatro semanas previo a la realización de los experimentos. Las líneas epiteliales MCF-7 y MDA-MB231 fueron cultivadas en medio DMEM/F12. Todas las líneas celulares fueron mantenidas con 10% suero fetal bovino, 1% Penicilina/Streptomycin/fungizona y 80mg/l Gentamicina en botellas de 75cm² de superficie a una temperatura de 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂.

En los ensayos de western blot las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro. En los ensayos de qPCR las células se sembraron en placas de 35 mm. Para el ensayo de inmunofluorescencia las células se sembraron en placas con sustratos rígidos de 6 pocillos. Para las zimografías las células se sembraron en placas de 12 pocillos.

3.2 Medios condicionados

Para la generación de medios condicionados (MC) se sembraron células epiteliales en botellas de 75 cm² de área. Una vez alcanzado un 70% confluencia las células fueron cultivadas por 48 horas en 9 ml de medio de cultivo DMEM/F12 libre de SFB. Una vez colectados los MC se clarificaron por centrifugación a 4000 rpm por 10 min y se determinó el número de células adheridas a la botella. Alícuotas de 1 ml fueron separadas y preservadas a -20 °C hasta su uso. Al momento de utilizar los MC se utilizaron volúmenes normalizados por el número de células que lo produjo.

3.3 RT-PCR cuantitativo

3.3.1 Extracción RNA y síntesis cDNA

Se sembraron aproximadamente 250.000 células y se mantuvieron en cultivo durante 24 h. Luego, fueron deprivadas de suero durante 8 h para posteriormente ser estimuladas durante 24 h.

El ARN total fue aislado con el reactivo Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA fue generado a partir de 1 µg de RNA total utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV, 3,3 µM Oligo-dT y 1 mM de dNTPs.

3.3.2 qPCR

La expresión del mensajero fue determinada por PCR cuantitativo en tiempo real usando un equipo Light Cycler® 96 de Roche (Indianápolis, IN, US). La amplificación fue llevada a cabo con 100 ng de cDNA en el caso del gen de referencia y 200 ng en el caso de los genes estudiados. El cDNA fue mezclado con los partidores correspondientes y el FastStart DNA Master SYBR Green I en un volumen final de 10 µl. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado y con el control negativo correspondiente. El gen que codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como referencia para la normalización de los datos. El cálculo de la expresión relativa de cada uno de los mensajeros estudiados fue determinado mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.4 Western Blot

3.4.1 Extractos proteicos

Aproximadamente 350.000 células fueron sembradas y mantenidas en cultivo durante 24 h. Luego, fueron deprivadas de suero durante 8 h para posteriormente ser estimuladas durante 48 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino frío PBS 1X (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) y lisadas sobre hielo agregando un Buffer de lisis (50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100 y 10% Glicerol) suplementado con los inhibidores de fosfatasa OV (2 mg/ml) y NaF (20 mM) y el coctel comercial de inhibidores de proteasas. Luego de 10 min las placas fueron raspadas con rastrillo y el lisado celular fue colectado. Las muestras fueron sonicadas durante 2 min en un sonicador Elmasonic S 10 (H) y luego centrifugadas a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue traspasado a tubos nuevos y la concentración de proteínas fue determinada utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay kit y midiendo la absorbancia de las muestras a 570 nm en el lector de absorbancia de microplacas infinite F50 TECAN. Finalmente, el tampón de carga 4X (240 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 0,04% de azul de bromo fenol y 10% β-mercaptoetanol) fue agregado y las muestras fueron calentadas a 80°C durante 5 min y almacenadas a -20°C para su posterior uso.

3.4.2 Electroforesis denaturante

Cantidades equivalentes de proteína de cada condición experimental fueron cargadas en un gel al 10% de poliacrilamida 0.1% SDS y separadas mediante electroforesis en condiciones denaturantes en buffer de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) a 80V por 30 min a temperatura ambiente y luego 120V por 2 h a

4°C. Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a una membrana PVDF previamente activada en metanol, mediante un sistema de transferencia húmeda en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol). Luego, las membranas se lavaron con tampón TBS-T (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween20, pH 7,6) y se bloqueó con una solución 4% BSA en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Pasado este tiempo, fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 5 min y luego incubadas con anticuerpos secundarios durante 1h a temperatura ambiente. La marca quimioluminiscente se visualizó utilizando el kit comercial Pierce ECL Western Blotting Substrate y la detección se realizó con películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL.

3.5 Zimografía

Se sembraron aproximadamente 100.000 células y se mantuvieron en cultivo durante 24 h. Luego, fueron deprivadas de suero y al mismo tiempo estimuladas durante 24 h. Transcurrido este tiempo, 500 µL de medio fresco sin suero fueron agregados a cada pocillo para ser condicionado durante 6 h. Estos medios obtenidos fueron clarificados por centrifugación y guardados a -20°C. Las células presentes en cada pocillo fueron contadas. Los medios fueron mezclados con tampón de carga 4X sin β-mercaptoetanol y cargados en un gel 10% de poliacrilamida 0.1% SDS con 1 mg/ml de gelatina. Una vez separadas las proteínas el gel fue lavado con tritón X-100 por 20 min dos veces a temperatura ambiente e incubado con tampón de activación (10mM Tris HCl pH 8.0, 1.25% Tritón X-100 y 5mM CaCl₂) durante 5 h a 37°C. Una vez activado el gel fue teñido con Coomassie (0.25% Azul de coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético) por 1 h y luego desteñido (50% metanol y 10% ácido acético) durante 10 min para quitar

el exceso de tinción. Finalmente, fue almacenado a 4°C en agua destilada hasta su digitalización.

3.6 Densitometría digital de las bandas de WB y zimografía

Una vez obtenidos los revelados de la señal quimioluminiscente, las películas fueron digitalizadas con un escáner. Los zimogramas fueron digitalizados con la cámara Nikon Coolpix 4500. La intensidad de las bandas obtenidas fue analizada utilizando el software ImageJ. Los valores obtenidos en cada experimento se normalizaron respecto a la proteína control de carga (Actina o Tubulina) en el caso de WB. En el caso de las zimografías el volumen de medio condicionado cargado en el gel fue normalizado respecto al número de células que lo produjo.

3.7 Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia 70.000 células fueron sembradas en las placas con sustrato rígido y pasadas 24 h fueron privadas de suero durante 48 h. Luego, las células fueron lavadas una vez con tampón fosfato salino PBS 1X, fijadas con paraformaldehído 4% por 15 min y lavadas dos veces con PBS. Luego, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.25% en PBS durante 5 min, lavadas una vez con PBS y bloqueadas con BSA 4%-0.1% Tritón por 1 h. A continuación las células fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en BSA 1%-0.1% Tritón durante 2 h, lavadas tres veces por 5 min con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario diluido en BSA 1%-0.1% Tritón durante 1 h en condiciones de oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con PBS, incubadas con DAPI 1:1000 en PBS por 5 min y lavadas nuevamente con PBS. Por último, un cover con medio de montaje fue colocado sobre las células y pasados 30 min se observaron al microscopio.

3.8 Inmunohistoquímica

Los cortes seriados obtenidos del registro oncológico de la fundación Arturo López Pérez fueron desparafinados e hidratados mediante un protocolo estándar. Se utilizó el tampón Tris-EDTA (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, 0.05% Tween 20, pH 9.0) como rescate antigénico. Los cortes fueron pre-incubados en una solución de 0,3% H₂O₂ en metanol durante 20 min y lavados dos veces en PBS 0,25% Tritón (PBS-T) durante 10 min. Posteriormente, fueron incubados durante 30 min con PBS-T 1% BSA para luego agregar el anticuerpo primario durante 1 h. Las secciones fueron lavadas con PBS-T dos veces durante 10 min e incubadas por 30 min con el anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente. Luego, los cortes fueron lavados dos veces durante 10 min con PBS, incubados con el complejo avidina-biotina (ABC) durante 30 min a temperatura ambiente y lavados nuevamente con PBS-T por 10 min. Las secciones fueron lavadas con tampón Tris-HCl 0,1M pH 7,2 durante 10 min e incubadas en una solución de 3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride (DAB) al 0,05% en el tampón Tris-HCl conteniendo 0,025% H₂O₂ durante 5 min. Finalmente, los cortes fueron embebidos en tinción Hematoxilina, deshidratados y montados en cubreobjetos para ser observados al microscopio.

3.9 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los promedios de dos grupos experimentales fue evaluada usando el análisis t de Student. Para el análisis de las diferencias entre las medianas de más de dos grupos experimentales la significancia estadística fue evaluada mediante el análisis no paramétrico Kruskal-wallis con una prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunns. Finalmente, para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre la media de más de dos grupos

experimentales en presencia de dos variables se utilizó el ANOVA de dos vías con una prueba posterior de Bonferroni.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. La exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa aumenta la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.

Diversos estudios han determinado que las citoquinas inflamatorias IL-1 α y β , ligandos del receptor de interleuquina-1 tipo 1 (IL1R1), son necesarias para la invasión y angiogénesis tumoral en la mama. Incluso, se ha propuesto a IL-1Ra, antagonista de IL1R1, como posible estrategia terapéutica ya que su uso se ha relacionado con la disminución del crecimiento tumoral y metástasis (Voronov y col., 2003; Panticenko y col., 2003).

Por otra parte, estudios previos en nuestro laboratorio han evaluado la expresión de IL-1 β por líneas celulares tumorales de tipo epitelial con distinto grado de malignidad: T47 (levemente invasiva), MCF-7 (moderadamente invasiva) y MDA-MB231 (altamente invasiva). Se observó que el único tipo celular que expresa esta citoquina inflamatoria corresponde a la línea altamente invasiva, relacionando así, la expresión de IL-1 β con un fenotipo tumoral maligno (Kallens y col., 2016).

Con el propósito de determinar si glucosa ejerce un efecto en la biodisponibilidad estromal del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos, se evaluó la expresión como transcrito y proteína del IL-1R en condiciones basales de cultivo en células RMF-EG crecidas en baja (5,5 mM) o alta (25 mM) concentración de glucosa, correspondiendo a una normoglicemia (90 mg/dl) e hiperglicemia (450 mg/dl) fisiológica respectivamente. Se observó un aumento significativo en la expresión de IL1R1 tanto a nivel de mensajero como proteína en fibroblastos crecidos en alta concentración de glucosa (Figura 5).

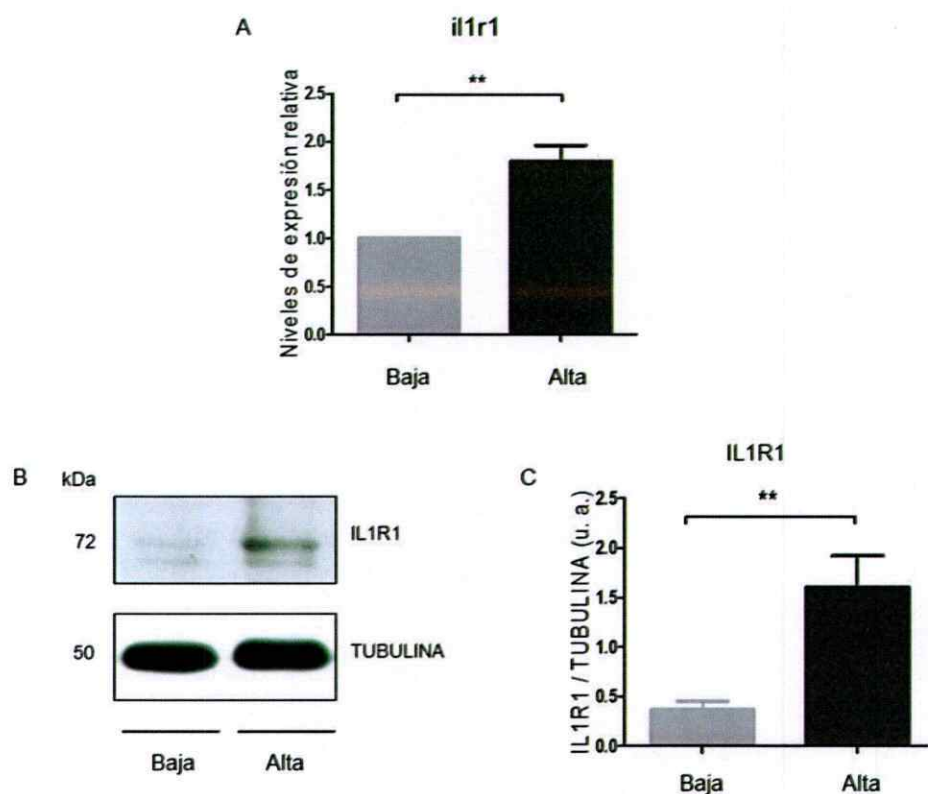


Figura 5: La expresión del receptor de IL-1 β es inducida por la exposición prolongada a una alta concentración de glucosa en fibroblastos mamarios humanos. A) Cambio relativo en la expresión del mRNA del receptor de IL-1 β medido por RT-PCR cuantitativo en células RMF-EG crecidas en condiciones de baja (5,5 mM) o alta (25 mM) glucosa, n=10. B) Expresión de la proteína IL1R1 en células RMF-EG cultivadas en baja y alta glucosa, n=6. C) Análisis densitométrico de las bandas de western blot obtenidas. Los valores graficados corresponden al promedio \pm error estándar. (**) Representa diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,01$ en test t de student.

2. Factores solubles epiteliales favorecen la expresión estromal de IL1R1 y ésta es favorecida por glucosa.

Diversos estudios han mostrado que la interacción entre los componentes estromales y epiteliales del tumor favorecen la malignidad y progresión tumoral (Beacham y Cukierman, 2005). Para determinar si los factores de origen epitelial ejercen un efecto en la expresión de IL1R1 en el estroma y si esta respuesta depende de la cantidad de glucosa a la que está expuesto se trataron las células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa con factores solubles presentes en medios condicionados por células epiteliales mamarias MCF-7 y MDA-MB231.

Los resultados muestran que los medios condicionados de las células epiteliales tumorales MCF-7 y MDA-MB231 presentan una tendencia a favorecer la expresión del receptor de IL-1 β a nivel de ARN mensajero y este aumento se ve mayormente reflejado en las células cultivadas en alta concentración de glucosa (Figura 6A). Además, se observa una mayor respuesta frente a factores epiteliales provenientes de las células con mayor grado de invasividad (MDA-MB231) respecto a las de bajo grado (MCF-7).

Dado que entre los factores epiteliales secretados por las células tumorales altamente invasivas se encuentra la IL-1 β , se propuso evaluar su efecto sobre la expresión de su receptor en el estroma realizando un ensayo de dosis respuesta (0,1 a 2,0 ng/ml IL-1 β) en células RMF-EG crecidas en condiciones de baja y alta glucosa. Se observó un incremento en los niveles de ARN mensajero del gen *il1r1* a medida que aumentaba la concentración del ligando tanto en baja como en alta glucosa, siendo mayor la respuesta en la última condición (Figura 6B).

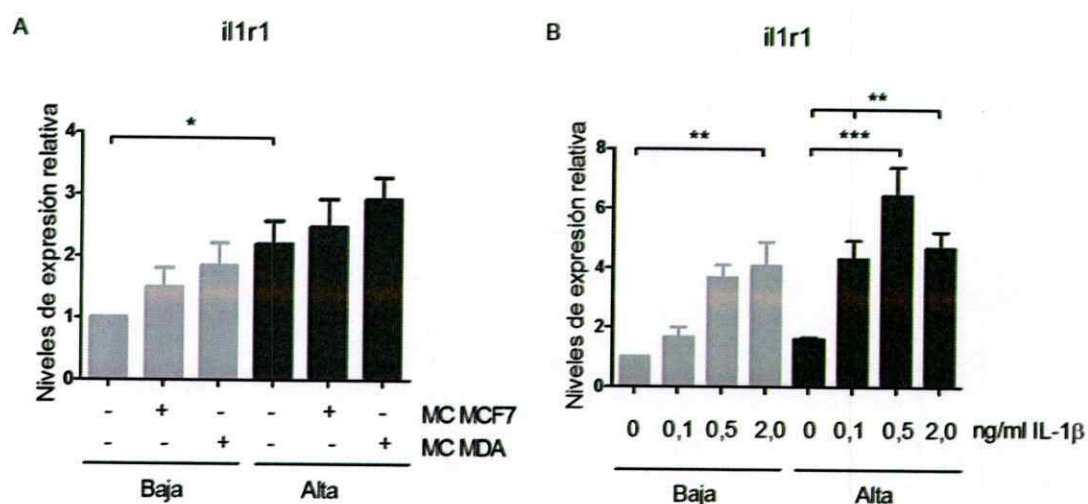


Figura 6: Factores de origen epitelial y el ligando IL-1 β inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos. Expresión relativa del mRNA del receptor de IL-1 β medido por RT-PCR cuantitativo en células RMF-EG crecidas en condiciones de baja y alta concentración de glucosa estimuladas con A) 30% de MC por células epiteliales MCF-7 o MDA-MB231 y B) 0,1-2,0 ng/ml IL-1 β . Los valores graficados corresponden al promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ se representan con (*), (**) y (***) respectivamente analizado mediante un test ANOVA de dos vías.

3. Factores solubles epiteliales favorecen la secreción de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) en fibroblastos mamarios humanos.

La invasión local en los tejidos circundantes y la posterior propagación a órganos distantes son características importantes de los tumores mamarios malignos. Ambos procesos incluyen, entre muchos otros factores, la actividad proteolítica de

metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales en la mayoría de los casos no son producidas por el epitelio sino por el estroma (Davies, 2014).

Se ha descrito que la secreción de MMPs se ve aumentada bajo el estímulo de IL-1 β en fibroblastos de piel y tendón (Bauer y col., 2009; Tsuzaki y col., 2003). Teniendo esto en cuenta y considerando que la condición de alta glucosa genera una mayor biodisponibilidad del receptor IL1R1 se quiso estudiar el efecto de factores epiteliales en la señalización del receptor de IL-1 β , observado como la secreción de MMPs, en fibroblastos mamarios crecidos en baja y alta concentración de glucosa.

Para esto, se analizaron mediante un ensayo de Zimografía en gelatina los medios condicionados por células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa y previamente tratadas con (i) factores solubles epiteliales provenientes de las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB231 y (ii) concentraciones crecientes de IL-1 β (0,1 a 2,0 ng/ml). Los resultados obtenidos muestran que los medios condicionados por las células epiteliales tumorales inducen la secreción de la metaloproteína-2 (MMP-2), determinada por su actividad gelatinasa y tamaño cercano a los 70 kDa, y esta respuesta es mayor frente al estímulo de la línea celular con mayor grado de invasividad (Figura 7 A y C). Por otra parte, se observó que IL-1 β genera un aumento en los niveles de MMP-1 y MMP-2 secretados por el estroma (Figura 7B y D). Debido a que MMP-1 posee una mayor actividad colagenasa que gelatinasa se dificulta su detección y cuantificación en un zimograma en gelatina. Es por esto, que se evaluaron los niveles de ARN mensajero del gen *mmp-1* en las mismas condiciones previamente analizadas. Se observó que mayores concentraciones de IL-1 β producen un mayor aumento en los niveles de transcrito de MMP-1, lo cual es consistente con los resultados previamente obtenidos (Figura 7E).

Finalmente, tanto en las células controles como en las tratadas con estímulos no se observaron diferencias significativas entre la condición de baja y alta glucosa respecto a la expresión y secreción de MMPs.

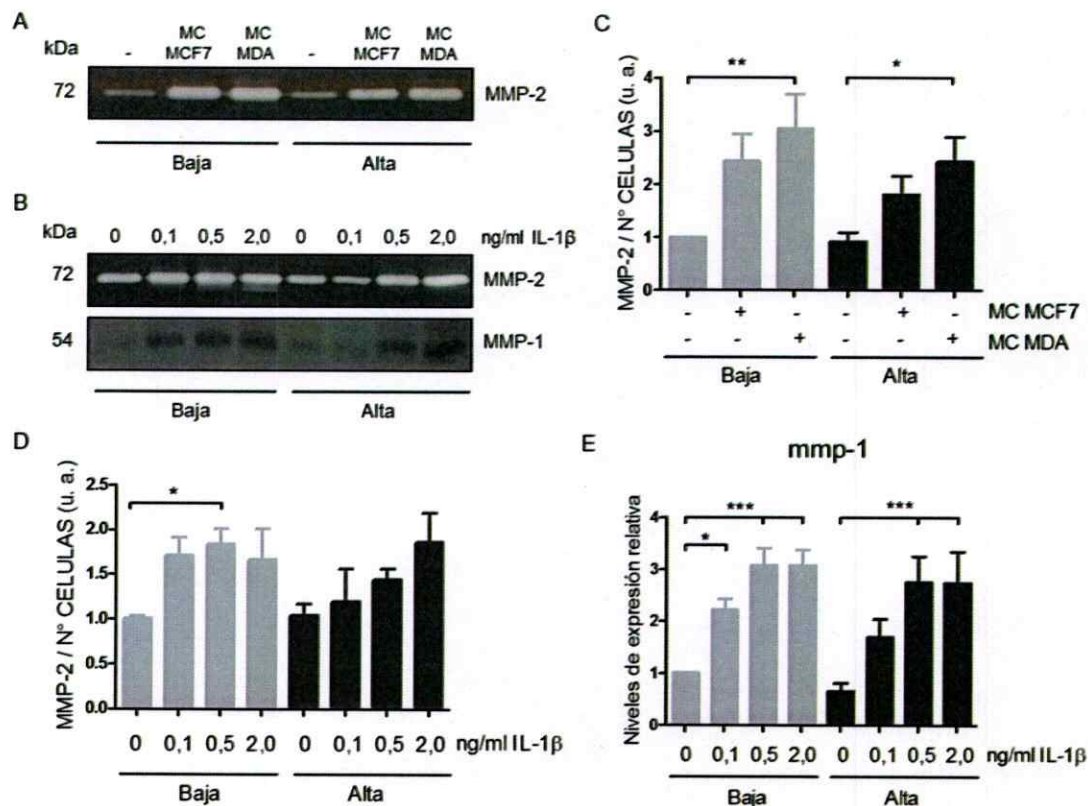


Figura 7: La expresión y secreción de MMPs es inducida por IL-1 β y por factores epiteliales en células estromales mamarias. Zimografía en gelatina para MMP-1 y MMP-2 secretados por células RMF-EG cultivadas en baja y alta glucosa estimuladas con A) 30% de MC por células epiteliales MCF-7 y MDA-MB231 y B) 0,1-2,0 ng/ml IL-1 β . C) D) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el zimograma. E) Cambio relativo en la expresión del mRNA de la metaloproteinas-1 medido por qPCR en células RMF-EG cultivadas en baja o alta glucosa y estimuladas con 0,1-2,0 ng/ml IL-1 β . Los valores graficados corresponden al promedio \pm ES de tres experimentos independientes.

(*) (**) (***) Representa diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente en test ANOVA de dos vías.

4. La mio-diferenciación fibroblástica es favorecida por la prolongada exposición a altas concentraciones de glucosa en células estromales mamarias.

Diversos estudios han demostrado que los fibroblastos residentes pueden inhibir el crecimiento de las células neoplásicas. Sin embargo, la célula tumoral tiene la capacidad de reclutar y reprogramar fibroblastos asociados al tejido normal (NAF) de manera tal, de convertirlos en fibroblastos asociados a cáncer (CAF), pasando así de un fenotipo supresor tumoral a uno de soporte tumoral (Öhrlund y col., 2014). Los CAF están compuestos en su mayoría por miofibroblastos, los cuales se caracterizan por tener un fenotipo contráctil, por la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular (MEC), por la expresión de actina α de músculo liso (α -SMA) y la presencia de FN-EDA, fibronectina celular que contiene el dominio EDA (Kohan y col., 2010).

Por otra parte, diversos estudios han relacionado la adquisición del fenotipo miofibroblasto con bajos niveles de secreción de MMP-2 (Risinger y col., 2006; Risinger y col., 2010; Howard y col., 2012). Debido a que no se encontraron diferencias en la secreción de MMPs entre las condiciones de baja y alta glucosa a pesar de los altos niveles de IL1R1 encontrados en esta última condición, se quiso determinar si la glucosa posee un rol en la mioidiferenciación de fibroblastos mamarios humanos.

Para esto, se analizaron células RMF-EG provenientes de cultivos crecidos en condiciones de baja y alta glucosa, tratadas o no con 5 ng/ml de factor transformante de crecimiento β (TGF- β), un conocido inductor de la mioidiferenciación de fibroblastos

(Öhlund y col., 2014). Para determinar la adquisición del fenotipo miofibroblasto por las células RMF-EG, se analizaron mediante western blot los niveles de proteína de α -SMA y FN-EDA, conocidos marcadores moleculares (Kohan y col., 2010).

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la expresión de α -SMA y FN-EDA en las células provenientes de cultivos crecidos en condiciones de alta glucosa y estimuladas con TGF- β respecto a la condición de baja glucosa con el mismo estímulo, estableciendo entonces el rol de la glucosa como un potenciador de la mioidiferenciación mediada por TGF- β (Figura 8).

Una vez determinado el rol de la glucosa en la expresión de marcadores de mioidiferenciación, se evaluó la expresión de IL1R1 en respuesta a la adquisición de este fenotipo maligno. Para esto, se utilizaron células RMF-EG provenientes de cultivos crecidos en baja y alta glucosa las cuales fueron tratadas o no con 5 ng/ml de TGF- β . Los resultados muestran que el TGF- β es un potente inductor de la expresión del receptor de IL-1 β tanto en condiciones de baja como alta glucosa (Figura 9).

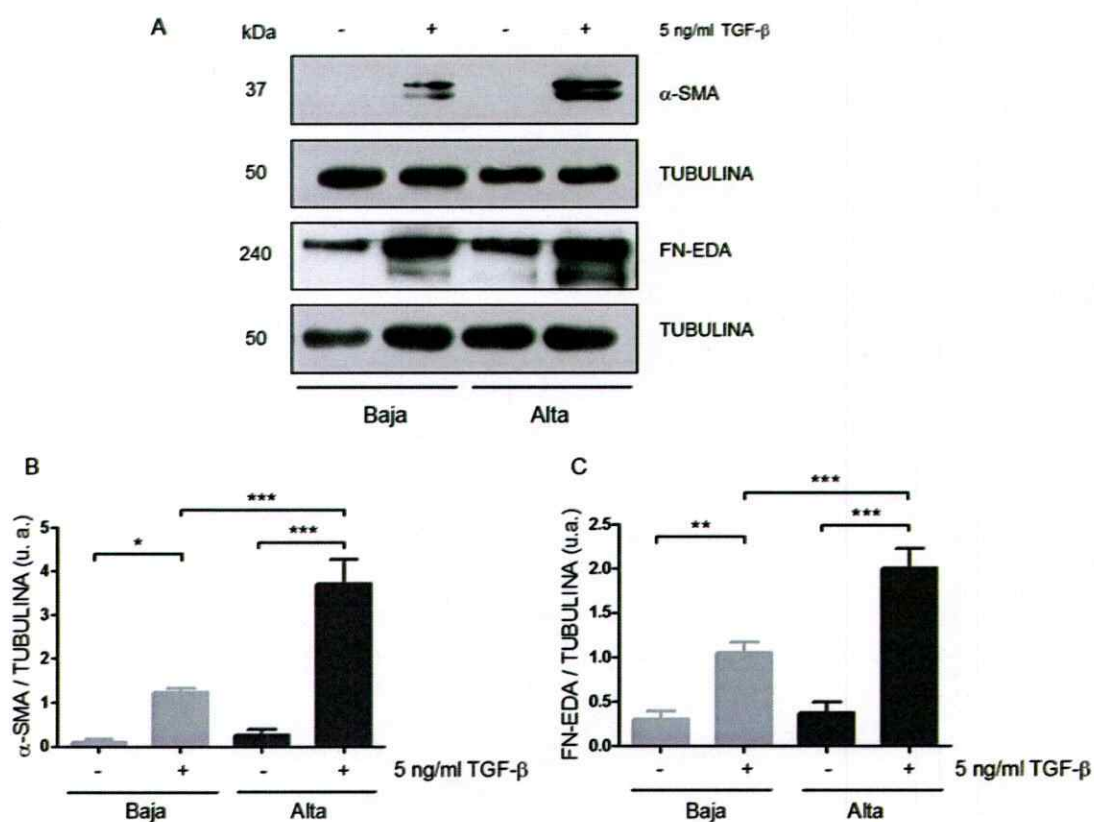


Figura 8: Fibroblastos humanos de origen mamario cultivados en condiciones de alta glucosa presentan un aumento en la expresión de marcadores de mio-diferenciación. A) Western blot para las proteínas α -SMA y FN-EDA en células RMF-EG cultivadas en baja o alta glucosa y tratadas con 5 ng/ml TGF- β por 72h. B) C) Análisis densitométrico de las bandas de western blot. Los valores graficados corresponden al promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ se representan con (*), (**) y (***) respectivamente en test ANOVA de dos vías.

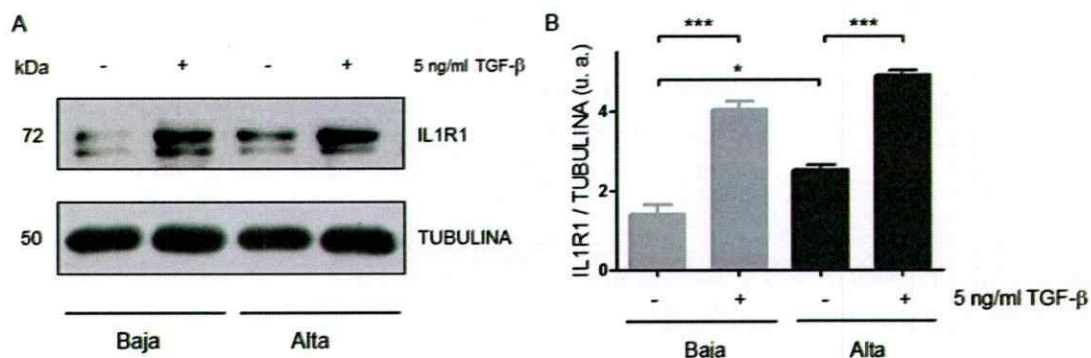


Figura 9: La expresión del receptor de IL-1 β es inducida por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en células estromales mamarias. A) Cambio relativo en la expresión del mRNA *il1r1* y B) Western blot para la proteína IL1R1 en células RMF-EG crecidas en condiciones de baja o alta glucosa y tratadas con 5ng/ml TGF- β por 72h. B) Análisis densitométrico de las bandas de western blot obtenidas. Los valores graficados corresponden al promedio \pm ES de tres experimentos independientes. (*) (*) Representan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente en test ANOVA de dos vías.**

Finalmente, determinamos si el estímulo de IL-1 β era capaz de inducir el fenotipo miofibroblasto y si éste se vería aumentado por la glucosa. Para esto, células RMF-EG cultivadas en condiciones de baja y alta glucosa fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IL-1 β (0,1 a 2,0 ng/ml) y se analizó la expresión relativa de α -sma mediante RT-PCR cuantitativo. La Figura 10 muestra que IL-1 β no es un estímulo suficiente para inducir la expresión de α -sma, a diferencia de la glucosa la cual induce un aumento significativo en los niveles de ARN mensajero.

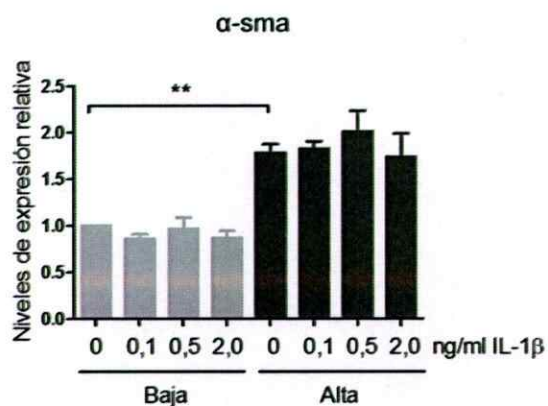


Figura 10: IL-1 β no induce la expresión del marcador de mio-diferenciación α -SMA en células estromales mamarias. Niveles de expresión relativa de α -sma medido por RT-PCR cuantitativo en células RMF-EG cultivadas en condiciones de baja o alta concentración de glucosa y estimuladas con 0,1-2,0 ng/ml IL-1 β por 24h. Los valores graficados corresponden al promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. (**) A nivel basal, se observan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,01$ en test ANOVA de dos vías.

5. La rigidez de la matriz extracelular modula la expresión de IL1R1.

Durante la regeneración de heridas se induce la proliferación y migración de miofibroblastos como respuesta al daño tisular. Este proceso es transitorio, pero en patologías como el cáncer puede mantenerse en el tiempo y conducir a una acumulación persistente de estas células con una producción excesiva de colágeno en la MEC. Este proceso conocido como desmoplasia es característico del cáncer de mama, genera una mayor densidad mamaria y se asocia con un mal pronóstico (Weber y col., 2008).

Se ha descrito que en células mesenquimales la señalización de IL-1R está restringida a que el receptor se encuentre formando parte de las adhesiones focales (McCulloch y

col., 2006). De hecho, se ha observado que los IL1R1 colocalizan con vinculina, talina y la quinasa de adhesión focal (FAK). Como parte de esta restricción se ha descrito que el estímulo de IL-1 β induce la fosforilación de FAK (p-FAK) (Arora y col., 1995; MacGillivray y col., 2000). Estos datos sugieren que podría existir una relación estrecha entre la remodelación de la MEC, la adhesión de fibroblastos a ésta y una alteración en la vía de señalización de IL1R1.

Por ello se propuso evaluar el efecto de la rigidez de la matriz extracelular, en conjunto con la glucosa, en la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios. Para esto se sembraron células RMF-EG crecidas en condiciones de baja y alta glucosa sobre placas con sustratos rígidos con valores de E (Modulo de elasticidad de Young) equivalentes a 2, 16 y 64 kPa correspondientes a la rigidez de un tejido normal blando, rigidez asociada a una herida y fibrosis rígida respectivamente (Talele y col., 2015).

En la Figura 11a se muestra que tanto a nivel de transcrito como proteína la expresión de IL1R1 tiende a aumentar a medida que las células son expuestas a rigideces más altas en la condición de baja glucosa. Por otro lado, en la condición de alta glucosa se observa un aumento significativo al pasar de una matriz blanda (2 kPa) a una matriz medianamente rígida (16 kPa), el cual se revierte completamente en una matriz más rígida (64 kPa). Además, es posible notar que los niveles del receptor de IL-1 β son mayores en la condición de alta glucosa respecto a la baja glucosa en las rigideces más bajas (2 y 16 kPa), pero al llegar a una rigidez mayor (64 kPa) los niveles se equiparan.

Resultados similares se muestran en la Figura 11b en la cual se analizó la expresión de IL1R1 mediante un ensayo de inmunofluorescencia.



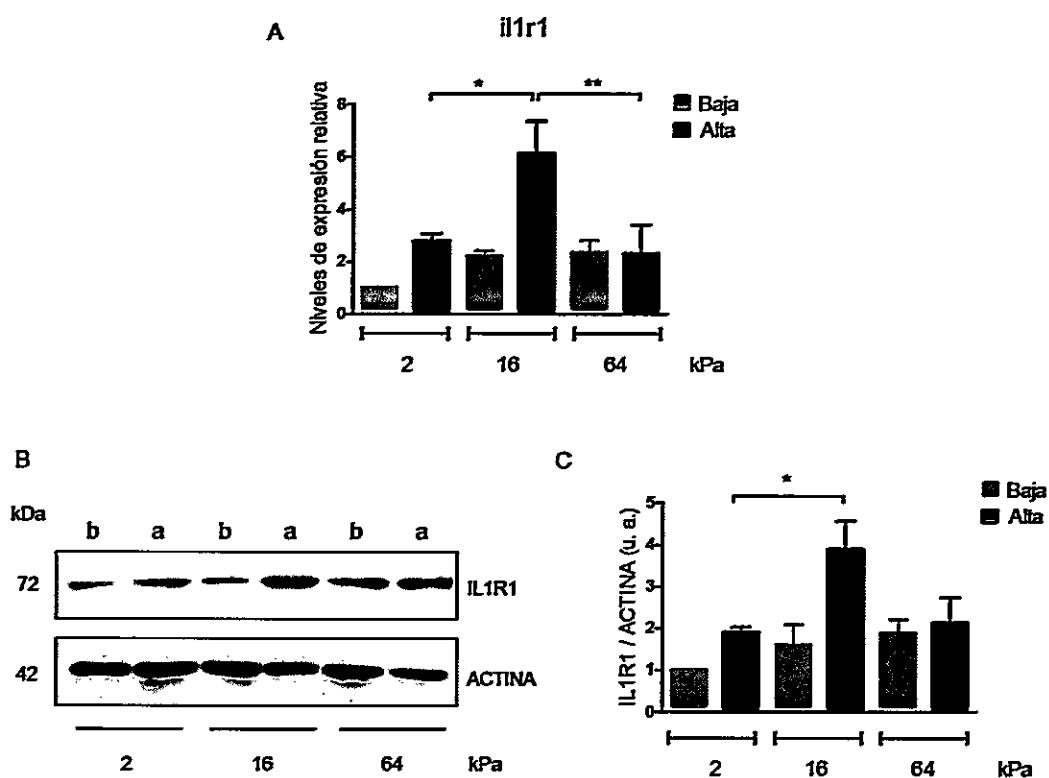


Figura 11a: La rigidez de la matriz extracelular y la exposición a una alta concentración de glucosa inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos. A) RT-qPCR y B) Western blot para IL1R1 en células RMF-EG crecidas en condiciones de baja o alta glucosa y sembradas en placas con rigidez de 2, 16 y 64 kPa. b: condición de baja glucosa; a: condición de alta glucosa. C) Cuantificación de las bandas de proteínas. Todos los datos graficados provienen de tres experimentos independientes y corresponden al promedio \pm ES. Las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ se representan con (*), (**) y (***) respectivamente analizado mediante un test ANOVA de dos vías.

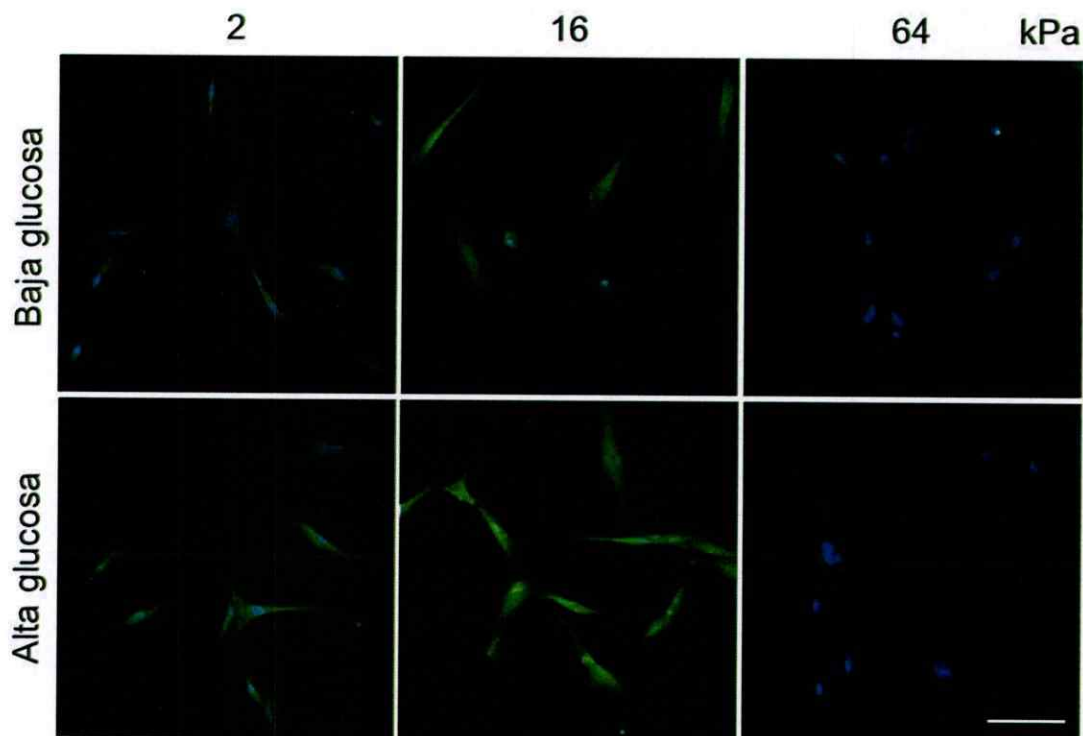


Figura 11b: La rigidez de la matriz extracelular y la exposición a una alta concentración de glucosa inducen la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de IL1R1 en condiciones de baja y alta glucosa en células RMF-EG crecidas en placas con sustratos rígidos de 2, 16 y 64 kPa. La barra blanca representa 100 μ m.

6. El receptor de interleuquina-1 β es un potencial marcador molecular de malignidad en carcinomas mamarios del tipo ductal infiltrante.

El cáncer de mamas es una enfermedad heterogénea que comprende diversos tipos histológicos. Los más comunes son los que se originan en el epitelio o carcinomas, los cuales pueden generarse en el conducto lácteo (carcinoma ductal) o en los lobulillos productores de la leche (carcinoma lobulillar). Cuando las células neoplásicas no han

invadido el tejido mamario que las rodea ambos tipos tumorales pueden catalogarse como carcinomas *in situ*. Por el contrario, cuando las células epiteliales invaden el tejido circundante, se habla de carcinoma infiltrante. Dentro de estos tipos de cáncer de mama el que posee mayor incidencia es el carcinoma ductal infiltrante representando el 80% de los diagnósticos (Li y col., 2005).

Niveles elevados de IL-1 β en el nicho tumoral mamario se asocian con un mal pronóstico y potencial desarrollo de metástasis (Perrier y col., 2009). Por esta razón, se estudió la posible correlación entre abundancia del receptor de IL-1 β y el grado de malignidad en muestras de pacientes portadores de tumores mamarios. Para esto, se utilizaron cortes de tejido mamario, provenientes de pacientes portadoras de un carcinoma ductal invasor con distinto grado de Elston, un indicador histológico de la malignidad tumoral. La clasificación de Elston va desde el Grado I al III, siendo este último el de mayor potencial agresivo, y considera tres aspectos: Grado de formación de túbulos, características nucleares y actividad mitótica (Ellis y col., 1998).

Los cortes de tejido mamario fueron analizados mediante un ensayo de inmunohistoquímica específico para la detección de IL1R1, observándose una marca de color pardo. Además, mediante la tinción hematoxilina es posible diferenciar los núcleos celulares teñidos de color azul.

Los resultados obtenidos muestran que en los tumores benignos, en los que es posible diferenciar claramente los ductos mamarios del estroma, la marca parda para IL1R1 es prácticamente imperceptible. Por otra parte, se puede observar que a medida que aumenta el grado de malignidad del tumor se hace imposible diferenciar el epitelio del estroma, ya que las células tumorales han invadido el estroma subyacente a través de la membrana basal. Finalmente, es posible correlacionar la expresión de IL1R1 con un

fenotipo maligno, obteniéndose la mayor expresión en las muestras clasificadas con grado III de Elston (Figura 12).

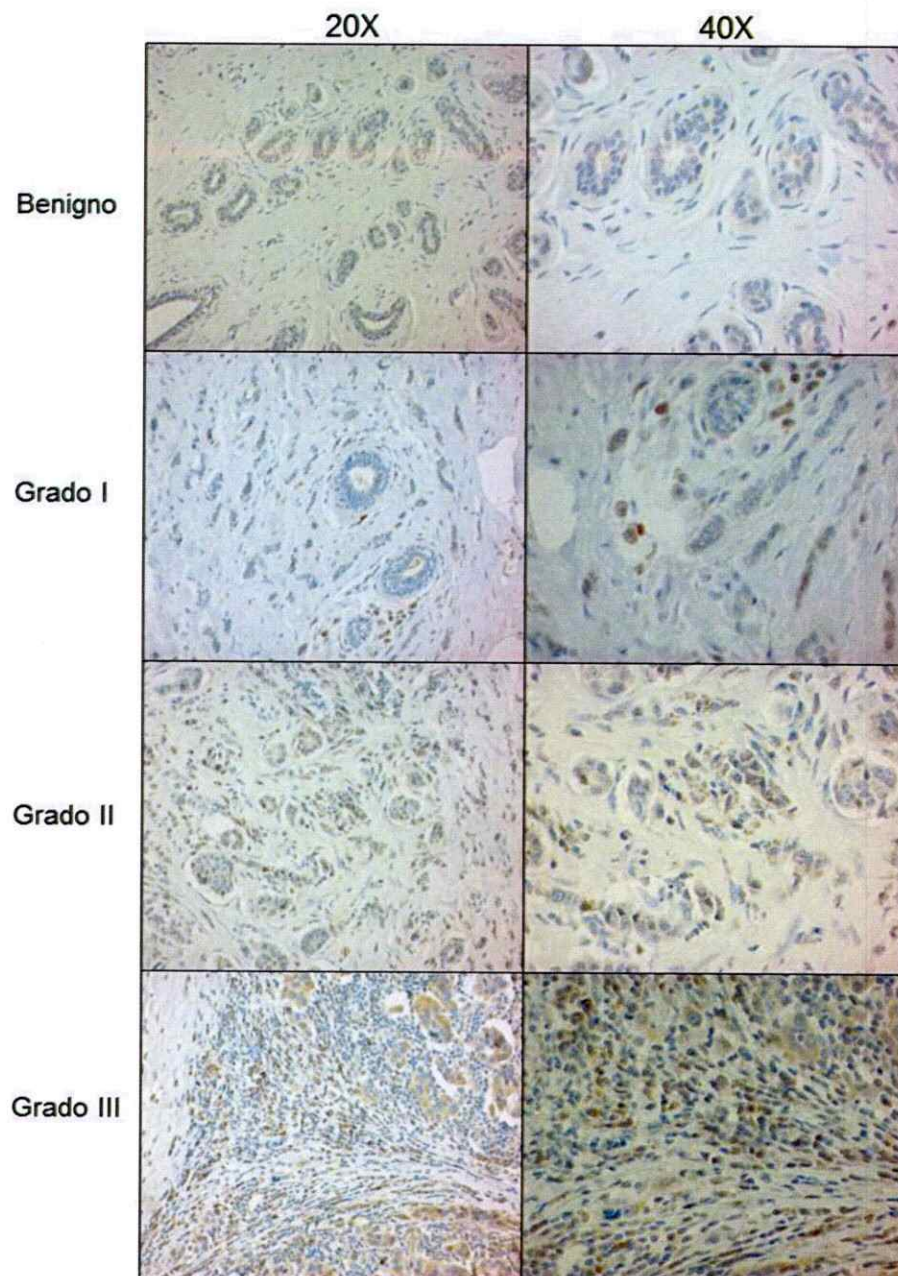


Figura 12: La expresión de IL1R1 se correlaciona con el grado de malignidad del tumor mamario. Imágenes de inmunohistoquímica para la detección de IL1R1 en

muestras de tumor mamario con distintos grados de malignidad (Grado de Elston I-III).
Las microfotografias representan lo observado en el estudio de 7 muestras y fueron
tomadas con un aumento 20X y40X.

DISCUSIÓN

Frecuentemente, el desarrollo de un tumor primario se relaciona con una adquisición gradual de mutaciones genéticas por células del epitelio tisular (Shen y Abate-Shen, 2010). Sin embargo, existe cada vez más evidencia que apoya la noción de que el microambiente tumoral posee un papel crítico en la progresión del cáncer en diversos tipos de neoplasias, incluido el cáncer de mamas (Elenbaas y Weinberg, 2001). Dentro de los fenómenos de señalización que participan en la comunicación entre los componentes de este microambiente, la inflamación y el metabolismo son dos factores críticos que contribuyen a las propiedades pro-tumorigénicas (Valencia y col., 2014). En este contexto, se ha propuesto que existe una colaboración metabólica entre estroma y epitelio en el que los fibroblastos se comportan como células esencialmente catabólicas que proveen del combustible (lactato, cuerpos cetónicos, ácidos grasos, glutamina, etc.) a las células tumorales para consumo mitocondrial (Lisanti y col., 2013).

Por otra parte, la exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa puede inducir cambios en una diversidad de vías de señalización asociadas al cáncer mediante la amplificación de sus respuestas normales (Chocarro-Calvo y col., 2013). Con este concepto en mente, es posible proponer que un ambiente tumoral hiperglicémico está relacionado con un mal pronóstico. Esta hipótesis es consistente con diversos estudios clínicos que han permitido establecer una relación entre la hiperglicemia, principal característica de la DMT2, y el desarrollo de cáncer de mamas (Vigneri y col., 2009; Ryu y col., 2014; Lipscombe y col., 2015).

Para dilucidar algunos de los mecanismos moleculares mediante los cuales la hiperglicemia actúa como un factor de riesgo para la adquisición de cáncer de mamas, se intentó simular un microambiente tumoral mamario simplificado utilizando una línea celular de fibroblastos mamarios normales no transformados (células RMF-EG) y placas con sustratos de rigidez variable (que simulan cambios en los componentes de la MEC), que dan cuenta del componente estromal y líneas celulares tumorales con distinto grado de malignidad, que dan cuenta del componente epitelial. Con el propósito de aproximar este trabajo a una realidad clínica, la línea celular RMF-EG fue sometida a dos concentraciones de glucosa, una baja (5,5 mM) que se asemeja a una glicemia normal (90 mg/dl) y una alta (25 mM) que representa una condición francamente hiperglicémica (450 mg/dl). En estas condiciones experimentales se intentó probar la asociación entre hiperglicemia, inflamación y malignidad tumoral.

Experimentos previos en nuestro laboratorio muestran que las células estromales mamarias RMF-EG crecidas en baja y alta concentración de glucosa no muestran diferencias en su apariencia, tasa de crecimiento, ni sobrevida celular. Además, en ambas condiciones la concentración de glucosa en el medio se mantiene hasta las 48 h en cultivo. Esto, permite sostener que las células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa, se comportan de manera similar y no presentan diferencias metabólicas (Kallens, 2016).

Se ha descrito a IL-1 β como una citoquina pro-inflamatoria que cumple un rol central en el proceso carcinogénico y su expresión se correlaciona con fenotipos tumorales mamarios más agresivos (Voronov y col., 2003). La hiperglicemia por su parte, también se relaciona con en el establecimiento de un microambiente inflamado y con niveles elevados de IL-1 β (Boni-Schnetzler y col., 2009). De este modo, en la búsqueda de

mecanismos que den sustento al establecimiento del cuadro diabético/hiperglicémico como factor de riesgo para la adquisición de un cáncer mamario, se hace innegable la elección de IL1R1, receptor de esta citoquina, como objetivo de estudio frente al estímulo de glucosa.

Los resultados obtenidos muestran que la condición de hiperglicemia induce una mayor expresión de IL1R1 en las células estromales mamarias. Adicionalmente, y en el contexto de una relación funcional entre epitelio-estroma, se determinó que estímulos epiteliales tumorales contenidos en los medios condicionados por células epiteliales aumentan los niveles de IL1R1 acorde a su potencial maligno, ya que los factores provenientes de la línea tumoral con mayor grado de malignidad fueron los que generaron mayores niveles de IL1R1, obteniéndose siempre los niveles más altos de expresión en la condición de alta glucosa (Figuras 5 y 6).

Estos datos se correlacionan con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales se observa un gran aumento en la expresión de COX-2 (blanco transcripcional de la vía de señalización de IL-1 β) en la condición de hiperglicemia, así como también se ve aumentada su expresión por factores epiteliales respecto a su grado de malignidad (Kallens y col., 2016).

Estos resultados muestran que el estroma mamario sano sometido a una hiperglicemia, posee una mayor biodisponibilidad de IL1R1 en la membrana, sugiriendo un estado basal con mayor potencial de señalización frente a estímulos epiteliales.

La pérdida de la membrana basal es uno de los pasos clave en la transición de un carcinoma in situ a uno invasivo. Las MMPs son capaces de degradar componentes tanto de la membrana basal como de la MEC, inducen la secreción de factores de

crecimiento, degradan moléculas relacionadas a la adhesión célula-célula y célula-ECM y movilizan citoquinas que poseen un rol fundamental en la progresión tumoral y metástasis (Cichon y col., 2010).

Por otro lado, las prostaglandinas son moléculas de la familia eicosanoide que se sintetizan a partir de ácido araquidónico y en cuya síntesis participa la enzima COX-2, cuyo principal producto de síntesis es la prostaglandina E2 (PGE2). Esta molécula, a su vez, se relaciona funcionalmente con el proceso angiogénico, mediante la producción de VEGF, MMP-2 y MMP-9 (Gately y Li, 2004). Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización de IL-1 β induce la expresión de COX-2 y por consecuencia podría inducir también la expresión de MMPs. A pesar de que estas vías han sido ampliamente estudiadas en el componente tumoral, es poco lo que se sabe de éstas y su relación con la hiperglicemia en el estroma. Es por esto que se estudió la secreción de estas metaloproteinasas por los fibroblastos mamarios RMF-EG crecidos en condiciones de baja y alta glucosa y frente a estímulos epiteliales.

El estudio de Singer y col. en 2002, en el que se analizó la expresión de gelatinasas en cultivos primarios de fibroblastos derivados de biopsias de cáncer mamario, mostró que el estroma sólo expresaba MMP-2 cuyo nivel aumentaba frente a estímulos epiteliales tumorales. No obstante, cuando el estímulo epitelial correspondía a una interacción directa (co-cultivo), el estroma era capaz de expresar MMP-9. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos (Figura 7), ya que una vez realizado los zimogramas sólo fue posible identificar a MMP-2 debido a que el estímulo epitelial aplicado no correspondía a una interacción directa. Por otra parte, en los zimogramas también fue posible detectar una banda más tenue con un tamaño de aproximadamente 50 kDa, que sumado a su actividad gelatinasa, identificamos como MMP-1. Para corroborar este hallazgo, se

realizó un RT-PCR cuantitativo para analizar los niveles de transcrito de esta metaloproteinasa, obteniéndose resultados similares a los observados mediante la zimografía. Finalmente, los estímulos epiteliales y el estímulo de IL-1 β aumentaron la expresión tanto de MMP-1 como MMP-2, confirmando su rol en la progresión tumoral, ya que la expresión aumentada de ambas metaloproteinasas se ha asociado con un fenotipo invasivo en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mamas (Liu y col., 2012).

A pesar de que previamente se habían obtenido diferencias significativas en los niveles de expresión de IL1R1 entre la condición de normoglicemia e hiperglicemia, frente al estímulo de IL-1 β no fue posible observar diferencias en la secreción de MMPs, blanco del estímulo de IL-1 β . Esto podría explicarse por la relación que existe entre la adquisición de un fenotipo miodiferenciado y bajos niveles de secreción de MMP-2 (Risinger y col., 2006; Risinger y col., 2010; Howard y col., 2012). Es por esto que se procedió a determinar el rol de glucosa en la miodiferenciación de fibroblastos mamarios humanos.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citoquina que controla diversos procesos tales como: división, diferenciación, migración, adhesión, organización, metabolismo y apoptosis celular (Massague y Gomis, 2006). Ya que las células tumorales expresan altas cantidades de TGF- β y los fibroblastos expresan niveles elevados de su receptor, se ha propuesto que este factor estimula la respuesta fibroblástica en etapas tempranas de la estromagénesis y se considera, por tanto, un factor clave en la progresión tumoral promoviendo la miodiferenciación estromal (De Wever y Mareel, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 8), establecen el rol de glucosa como potenciador de la midiferenciación mediada por TGF- β , ya que en la condición de hiperglicemia y frente al estímulo de TGF- β se obtuvieron los niveles más altos de expresión de α -SMA y FN-EDA. Frecuentemente, se atribuye la activación fibroblástica a un proceso paralelo a la tumorigénesis, en el cual la conversación cruzada entre el epitelio y el estroma llevan a la generación de un fenotipo activado (Beacham y Cukierman, 2005). De este modo, es posible postular que los fibroblastos expuestos a una condición de hiperglicemia prolongada experimentan el fenómeno de estromagénesis de una manera más eficiente una vez que llega el estímulo de TGF- β epitelial.

La midiferenciación fibroblástica se asemeja a un proceso de cicatrización, el cual implica la puesta en marcha de un proceso inflamatorio. Una de las consecuencias fundamentales de este proceso es la producción elevada de especies reactivas del oxígeno (ERO) que contribuyen al desarrollo de diversas alteraciones fibróticas y la malignización de carcinomas (Blanchetot y Boonstra, 2008).

Por otra parte, la hiperglicemia crónica observada en la diabetes induce el estrés oxidativo, que se manifiesta no sólo por un aumento en la producción de ERO, sino también por una disminución en la capacidad antioxidante de la célula (Bonfont-Rousselot, 2002).

Específicamente, fibroblastos mamarios sanos (RMF-EG) cultivados en una condición de hiperglicemia prolongada muestran un estado de oxidación mayor, dado por niveles elevados de especies reactivas del oxígeno, respecto a los fibroblastos crecidos en la condición de baja glucosa (Kallens y col., 2016). Respecto a la activación de fibroblastos, se ha observado que en células RMF-EG el estímulo de TGF- β promueve un ambiente

oxidativo, dado por un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno, que favorecen la mioidiferenciación fibroblástica (Tobar y col., 2014). De este modo, el rol de glucosa como potenciador de la mioidiferenciación fibroblástica podría estar dado, entre otros factores, por el elevado estado de oxidación que poseen las células crecidas en condiciones hiperglicémicas.

Los tumores mamarios corresponden a lesiones neoplásicas rígidas o desmoplásicas que se caracterizan por una alta proporción del componente estromal que está compuesto principalmente por fibroblastos (Walker, 2001). En el cáncer de mama, más del 80% de los fibroblastos del estroma adquiere un fenotipo activado (CAFs) lo que les permite ejercer un rol en la supervivencia, crecimiento e invasión tumoral (Shiga y col., 2015). Estos CAFs son responsables de sintetizar componentes de la MEC, especialmente colágeno, que modificarán la rigidez del estroma generando el fenómeno desmoplásico (Boyd y col., 2011). Esta MEC rígida estaría promoviendo mediante señales mecánicas, la proliferación, invasión y metástasis tumoral (Ironsides y Jones, 2016).

Dvorak en 1986 propuso que “el tumor es una herida que nunca sana”. Hoy se sabe que histopatológicamente los tumores se asemejan a un tejido inflamado y en proceso de cicatrización y que la principal diferencia entre ambos fenómenos es que en la cicatrización la activación del estroma es transitoria y en el tumor esta activación es permanente (McAllister and Weinberg, 2014).

Para determinar el rol de glucosa y de la MEC en la expresión de IL1R1 se sembraron fibroblastos mamarios humanos sobre placas con módulo de elasticidad de Young equivalente a 2, 16 y 64 kPa. Los resultados obtenidos (Figuras 11a y 11b) muestran que no hubo diferencias significativas en la expresión de IL1R1 frente al estímulo de la

rigidez en la condición de normoglicemia. Respecto a la condición de hiperglicemia, los niveles más altos de expresión de IL1R1 se obtuvieron al sembrar las células en placas de cultivo con sustrato rígido correspondiente a 16 kPa, que es la rigidez que más se asemeja a la de una herida en cicatrización (Talele y col., 2015). Además, se observaron bajos niveles de IL1R1 al cultivar las células sobre una matriz con rigidez similar a la de un tejido blando (2 kPa) y a la de un proceso fibrótico (64 kPa). Esto podría sugerir que la acción de IL-1 β está regulada por las distintas etapas de la tumorigénesis. Cuando aún no ha ocurrido la malignización del epitelio, éste no expresa IL-1 β y el estroma no expresa el fenómeno de activación necesario para que ocurra la fibrosis. Por lo tanto, el estroma no posee el estímulo necesario para inducir la expresión de IL1R1. Luego, una vez que ha comenzado el proceso tumorigénico, los factores epiteliales inducirán la expresión de IL1R1 y debido a que se promoverá la estromagénesis, dada por la interacción entre el epitelio y el estroma, comenzará a aumentar la síntesis de componentes de la MEC y por tanto, aumentará la rigidez del microambiente tumoral. Una vez que se ha establecido el proceso fibrótico es posible que la mantención de la supervivencia y crecimiento tumoral sea debido a señales río abajo de la vía IL-1 β .

Se ha observado una correlación entre la activación de miofibroblastos y el aumento en la rigidez de la matriz en fibroblastos dérmicos humanos (Achterberg y col., 2014). Para corroborar que el fenómeno fibrótico está ocurriendo en el modelo utilizado en este trabajo, se podrían analizar los niveles de α -SMA frente al estímulo de la rigidez tanto en baja como alta glucosa, para posteriormente relacionar estos resultados con la expresión de IL1R1 observada. Además, sería importante determinar si la vía de señalización de IL-1 β se encuentra activa en las condiciones en las que se evaluaron los niveles de IL1R1, ya que la presencia del receptor no da cuenta de ésta. Para esto, se

podrían analizar los niveles de COX-2, iNOS y PLA2, que son blancos transcripcionales de la vía de señalización de IL-1 β (Risbud y Shapiro, 2014).

El tipo de cáncer de mama con mayor incidencia es el carcinoma ductal infiltrante que representa el 80% de los diagnósticos (Li y col., 2005). Este tumor se origina en los conductos lácteos y cursa con etapas de creciente proliferación, hiperplasia atípica y carcinoma *in situ* antes de adquirir capacidades invasivas y metastásicas. Poca atención se ha prestado a la función específica del estroma en esta progresión, sin embargo, estudios recientes han identificado que la función de las células estromales puede ser crítica para la progresión de la enfermedad benigna a un carcinoma infiltrante (Chichon y col., 2010).

Niveles elevados de IL-1 β en el nicho tumoral mamario se han asociado con un mal pronóstico y desarrollo tumoral, ya que en biopsias de mama normal no se detecta la presencia de IL-1 β , citoquina que está sobre-expresada en biopsias de carcinomas mamarios (Perrier y col., 2009). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de IHQ en muestras de pacientes portadoras de carcinomas ductales infiltrantes (Figura 12) determinaron que no sólo hay una relación entre los niveles de IL-1 β y progresión tumoral, sino que también entre los niveles de su receptor y el grado de malignidad tumoral, corroborándose la retroalimentación positiva que existe entre ligando y receptor observada previamente (Figura 6b).

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que la sobreoferta de glucosa actúa sobre el estroma como un agente promotor de la inflamación mediante el aumento en la expresión del receptor de IL-1 β y la modulación de la diferenciación fibroblástica, permitiendo aceptar la hipótesis planteada y corroborando el papel del estroma en la progresión tumoral. Finalmente, estos datos contribuyen a una mejor comprensión de la compleja relación entre hiperglicemia, inflamación y progresión del cáncer mamario.

CONCLUSIONES

- La exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa induce el aumento en la expresión del receptor de IL-1 β en fibroblastos mamarios humanos.
- Factores solubles epiteliales tumorales favorecen la expresión del receptor de IL-1 β y la secreción de metaloproteinasas de matriz extracelular en fibroblastos mamarios humanos.
- La exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa induce un fenotipo activado en células estromales mamarias humanas, dado por un aumento en el potencial de miodiferenciación de éstos.
- La composición de la matriz extracelular, que da cuenta de su rigidez, induce cambios en la expresión del receptor de IL-1 β en células del estroma mamario humano.

Los resultados obtenidos permiten proponer el siguiente modelo de interacción epitelio-estroma (Figura 13), en el cual se plasman los aspectos más importantes concluidos en este trabajo.

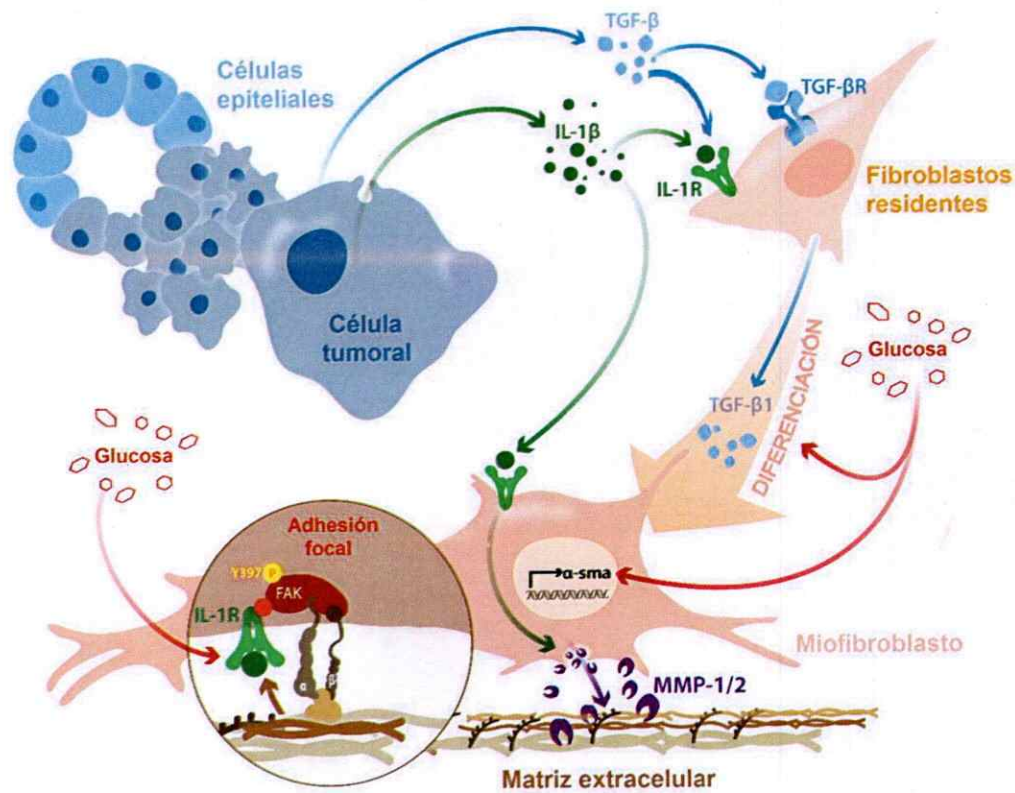


Figura 13: Modelo de interacción entre epitelio y estroma mamario. El esquema representa la interacción entre las células epiteliales tumorales y los fibroblastos mamarios que las acompañan. La glucosa induce una mayor mioidiferenciación fibroblástica mediada por el estímulo de TGF- β , proveniente de la célula tumoral, que se observa como una mayor expresión de α -SMA. Otro de los factores secretados por el tumor es IL-1 β , el cual se une a su receptor en los fibroblastos. Tanto glucosa como TGF- β son capaces de inducir la expresión de IL1R1. Éste, forma parte de las adhesiones focales, y al unírsele IL-1 β se induce una cascada de señalización que finalmente culmina en la secreción de MMP-1 y MMP-2 a la MEC, la cual también puede inducir un cambio en la expresión de IL1R1 dependiendo de su composición.

BIBLIOGRAFÍA

- Achterberg, V. F., Buscemi, L., Diekmann, H., Smith-Clerc, J., Schwengler, H., Meister, J. J. and Hinz, B. **2014**. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *Journal of Investigative Dermatology*. 134(7): 1862-1872.
- Arora, P. D., Ma, J., Min, W., Cruz, T. and McCulloch, C. A. **1995**. Interleukin-1-induced calcium flux in human fibroblasts is mediated through focal adhesions. *Journal of Biological Chemistry*. 270(11): 6042-6049.
- Bauer, J., Huy, C., Brenmoehl, J., Obermeier, F., and Bock, J. **2009**. Matrix metalloproteinase-1 expression induced by IL-1 β requires acid sphingomyelinase. *FEBS Lett*. 583(5): 915-920.
- Beacham, D. and Cukierman, E. **2005**. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 15: 329-341.
- Blanchetot, C. and Boonstra, J. **2008**. "The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 18(1): 35-45.
- Boni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D. T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehses, J. A., Schuit, F. C., and Donath, M. Y. **2009**. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*. 150: 5218-5229.
- Bonnefont-Rousselot, D. **2002**. Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 5(5): 561-568.
- Bowers, L. W., Maximo, I. X., Brenner, A. J., Beeram, M., Hursting, S. D., Price, R. S., Tekmal, R. R., Jolly, C. A., and deGraffenried, L. A. **2014**. NSAID use reduces breast cancer recurrence in overweight and obese women: role of prostaglandin-aromatase interactions. *Cancer research*. 74: 4446-4457.
- Boyd, N.F., Martin, L.U., Yaffe, M.J., Minkin, S. **2011**. Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. *Breast Cancer Res*. 13: 223.
- Chocarro-Calvo, A., García-Martínez, J. M., Ardila-González, S., De la Vieja, A. and García-Jiménez, C. **2013**. Glucose-induced β -catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Molecular cell*. 49(3): 474-486.
- Cichon, M., Degnim, A., Visscher, D. and Radisky, D. **2010**. Microenvironmental Influences that Drive Progression from Benign Breast Disease to Invasive Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15: 389-397.
- Davies, K. J. **2014**. The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma. *Int. J. Breast Cancer*. 2014:839094.
- De Wever, O. and Mareel, M. **2003**. "Role of tissue stroma in cancer cell invasion." *J Pathol*. 200(4): 429-47.

- Dinareello, C. A. **2011**. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117: 3720-3732.
- Dvorak, H.F. **1986**. Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315: 1650-1659.
- Elenbaas, B. and Weinberg, R. A. **2001**. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblast in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 264(1): 169-184.
- Ellis, O., Elston, C. W. and Evans, A. J. **1998**. Diagnostic techniques and examination of pathological specimens. In *The Breast* Edinburgh Churchill Livingstone. 21-46.
- Garlanda, C., Dinareello, C. A. and Mantovani, A. **2013**. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 39(6): 1003-1018.
- Gately, S. and Li, W.W. **2004**. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Seminars in Oncology*. 31(2): 2-11.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. **2004**. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11): 891-899.
- Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A., Pollak, M., Regensteiner, J. G. and Yee, D. **2010**. Diabetes and cancer: a consensus report. *CA: a cancer journal for clinicians*. 60: 207-221.
- Gonzalez, Y., Herrera, M. T., Soldevila, G., Garcia-Garcia, L., Fabian, G., Perez-Armendariz, E. M., Bobadilla, K., Guzman-Beltran, S., Sada, E. and Torres, M. **2012**. High glucose concentrations induce TNF-alpha production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. *BMC immunology*. 13: 19.
- Gupta, G. P. and Massagué, J. **2006**. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127(4): 679-695.
- Hahn, T., Barth, S., Hofmann, W., Reich, O., Lang, I. and Desoye, G. **1998**. Hyperglycemia regulates the glucose-transport system of clonal choriocarcinoma cells in vitro. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int J Cancer*. 78(3): 353-60.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. **2011**. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.
- Heiden, M., Cantley, L. and Thompson, C. **2009**. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 324(5930): 1029-1033.
- Howard, E. W., Crider, B. J., Updike, D. L., Bullen, E. C., Parks, E. E., Haaksma, C. J., Sherry, D. M. and Tomasek, J. J. **2012**. MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype. *Exp Cell Res*. 318(13): 1542-1553.
- Ironside, A. J. and Jones, J. L. **2016**. Stromal characteristics may hold the key to mammographic density: The evidence to date. *Oncotarget*. 7(21): 31550-31562.
- Jang, M., Kim, S. S. and Lee, J. **2013**. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 45(10): e45.

- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. **2010**. Cancer Statistics. CA: Cancer J Clin. 60(5): 277–300.
- Kallens, V. N. **2016**. Glucosa genera un ambiente pro-inflamatorio que favorece la malignidad epitelial mamaria. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Kallens, V. N., Tobar, N., Molina, J., Bidegain, A. B., Smith, P., Porras, O. and Martínez, J. **2016**. Glucose promotes a pro-oxidant and pro-inflammatory stromal microenvironment which favors motile properties in breast tumor cells. Journal of Cellular Biochemistry. Enviado a publicación.
- Kalluri, R. and Weinberg, R. A. **2009**. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest. 119:1420–1428.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M. **2006**. Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer. 6: 392-401.
- Kohan, M., Muro, A. F., White, E. S. and Berkman, N. **2010**. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. FASEB J. 24(11): 4503–4512.
- Koujan, S. E., Gargarib, B. P. and Khalili, M. **2015**. Matrix Metalloproteinases and Breast Cancer. Thrita. 4(1):e21959.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J. W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R. A. **2004**. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 4966-4971.
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehses, J. A., Seifert, B. and Donath, M. Y. **2007**. Interleukin-1–receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 356(15): 1517-1526.
- Li, C. I., Uribe, D. J. and Daling, J. R. **2005**. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. British Journal of Cancer. 93: 1046-1052.
- Li, H. J., Reinhardt, F., Herschman, H. R. and Weinberg, R. A. **2012**. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. Cancer discovery. 2: 840-855.
- Lindahl, G., Saarinen, N., Abrahamsson, A. and Dabrosin, C. **2011**. Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell–derived IL-1Ra and decrease tumor angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer. Cancer research. 71(1): 51-60.
- Lipscombe, L., Fischer, H., Austin, P., Fu, L., Jaakkimainen, L., Ginsburg, O., Rochon, P., Narod, S. and Paszat, L. **2015**. The association between diabetes and breast cancer stage at diagnosis: a population-based study. Breast Cancer Res Treat. 150: 613–620.
- Lisanti, M. P., Martinez-Outschoorn, U. E. and Sotgia, F. **2013**. Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype: metabolic symbiosis and “fibroblast addiction” are new therapeutic targets for drug discovery. Cell Cycle. 12(17): 2723-2732.

- Liu, H., Kato, Y., Erzinger, S. A., Kiriakova, G. M., Qian, Y., Palmieri, D., Steeg, P. S. and Price, J. E. **2012**. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC cancer*. 12(1): 1.
- MacGillivray, M. K., Cruz, T. F. and McCulloch, C. A. **2000**. The recruitment of the interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase (IRAK) into focal adhesion complexes is required for IL-1 β -induced ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*. 275(31): 23509-23515.
- Massague, J. and Gomis, R. R. **2006**. "The logic of TGF β signaling." *FEBS Lett*. 580(12): 2811-20.
- McAllister, S. S. and Weinberg, R. A. **2014**. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nature cell biology*. 16: 717-727.
- McCulloch, C. A., Downey, G. P. and El-Gabalawy, H. **2006**. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5(10): 864-876.
- Menter, D. G., Schilsky, R. L. and DuBois, R. N. **2010**. Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 16: 1384-1390.
- Miller, L. J., Kurtzman, S. H., Anderson, K., Wang, Y., Stankus, M., Renna, M., Lindquist, R., Barrows, G., and Kreutzer, D. L. **2000**. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer investigation*. 18: 293-302.
- Nishida, Y., Miyamori, H., Thompson, E. W., Takino, T., Endo, Y. and Sato, H. **2008**. Activation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase through an Artificial Receptor for ProMMP-2 Generates Active MMP-2. *Cancer Res*. 68(21): 9096-9104.
- Öhlund, D., Elyada, E. and Tuveson, D. **2014**. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med*. 211(8): 1503-1523.
- Pantschenko, A. G., Pushkar, I., Anderson, K. H., Wang, Y., Miller, L. J., Kurtzman, S. H., Barrows, G. and Kreutzer, D. L. **2003**. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int J Oncol*. 23: 269-284.
- Perrier, S., Caldefie-Chézet, F., and Vasson, M. P. **2009**. IL-1 family in breast cancer: Potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS letters*. 583(2): 259-265.
- Pfaffl, M. W. **2001**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 29: e45.
- Prieto, M. **2011**. Epidemiología del cáncer de mama en Chile. *Rev Med Clin Condes*. 22(4): 428-435.
- Richie, R. C. and Swanson, J.O. **2003**. Breast cancer: a review of the literature. *J Insur Med*. 35(2): 85-101.

- Risbud, M. V. and Shapiro, I. M. **2014**. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nature Reviews Rheumatology*. 10(1): 44-56.
- Risinger, G. M., Hunt, T. S., Updike, D. L., Bullen, E. C. and Howard, E. W. **2006**. Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated by Both Stimulatory and Inhibitory Signals in Response to Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 281(36): 25915-25925.
- Risinger, G. M., Updike, D. L., Bullen, E. C., Tomasek, J. J. and Howard, E. W. **2010**. TGF-beta suppresses the upregulation of MMP-2 by vascular smooth muscle cells in response to PDGF-BB. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 298(1): 191-201.
- Roomi, M., Kalinovsky, T., Monterrey, J., Rath, M. and Niedzwiecki, A. **2013**. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in adult human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Int J Onc.* 43: 1787-1798.
- Ryu, T. Y., Park, J., and Scherer, P. E. **2014**. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J.* 38: 330-336.
- Serra, I., Maya, D. and Aguayo, C. **2014**. Cáncer de mama en Chile: Mortalidades comparadas: Niveles nacional, regional y comunal, 1990-2011. Análisis programático. *Revista chilena de cirugía.* 66(2): 118-126.
- Shen, M. M. and Abate-Shen, C. **2010**. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development.* 24(18): 1967-2000.
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., and Takeyama, H. **2015**. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers.* 7(4): 2443-2458.
- Sims, J. E. and Smith, D. E. **2010**. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology.* 10(2): 89-102.
- Singer, C. F., Kronsteiner, N., Marton, E., Kubista, M., Cullen, K. J., Hirtenlehner, K., Seifert, M. and Kubista, E. **2002**. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat.* 72(1):69-77.
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A. F. **2003**. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 52: 812-817.
- Talele, N., Fradette, J., Davies, J., Kapus, A. and Hinz, B. **2015**. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports.* 4:1016-1030.
- Tobar, N., Toyos, M., Urra, C., Méndez, N., Arancibia, R., Smith, P. C. and Martínez, J. **2014**. c-Jun N terminal kinase modulates NOX-4 derived ROS production and myofibroblasts differentiation in human breast stromal cells. *BMC cancer.* 14(1): 640.

- Tsuzaki, M., Guyton, G., Garrett, W., Archambault, J. M., Herzog, W., Almekinders, L., Bynum, D., Yang, X., and Banes, A. J. **2003**. IL-1 β induces COX2, MMP-1, -3, -13, ADAMTS-4, IL-1b and IL-6 in human tendon. *J Orthop Res.* 21: 256–264.
- Turina, M., Fry, D. E., and Polk, H. C. **2005**. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. *Critical care medicine.* 33(7): 1624–1633.
- Valencia, T., Kim, J. Y., Abu-Baker, S., Moscat-Pardos, J., Ahn, C. S., Reina-Campos, M., Duran, A., Castilla, E. A., Metallo, C. M., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. **2014**. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 26(1): 121–135.
- Vaughn, A. and Deshmukh, M. **2008**. Glucose Metabolism Inhibits Apoptosis in Neurons and Cancer Cells by Redox Inactivation of Cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 10(12): 1477–1483.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., and Vigneri, R. **2009**. Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer.* 16(4): 1103–1123.
- Visse, R. and Nagase, H. **2003**. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res.* 92: 827–839.
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. and Apte, R. N. **2003**. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 100(5): 2645–2650.
- Walker, R. **2001**. The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res.* 3: 143–145.
- Warburg, O. **1956**. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 124: 269–270.
- Weber, O., Demetter, P., Mareel, M. and Bracke, M. **2008**. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer.* 123: 2229–2238.