

UCH-FC  
Biotecnología  
K 146  
c.2

iii



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**



**"Glucosa genera un microambiente pro-  
inflamatorio que favorece la malignidad  
epitelial mamaria"**

**VIOLETA NATALIA KALLENS MEZA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Jorge Martínez Winkler. Laboratorio de Biología Celular.  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile.

**PATROCINANTE:**

Dr. Miguel Allende Connelly. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

**Mayo de 2016**  
**Santiago de Chile**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO



**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. Violeta Natalia Kallens Meza**

**"Glucosa genera un microambiente pro-inflamatorio que favorece la malignidad epitelial mamaria"**

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

Dr. Jorge Martinez Winkler  
**Director Seminario de Título**

Dr. Miguel Allende Connelly  
**Patrocinante**

Dr. Daniela Sauma Mahaluf  
**Presidenta de la Comisión**

Dr. Marco Tulio Nuñez Gonzalez  
**Evaluador**

**Santiago de Chile, Mayo de 2016**

*“Un sabio en su laboratorio no es sólo un teórico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

*Marie Curie*

## AGRADECIMIENTOS

El control de los niveles de glucosa ha sido un tema muy importante para mí y mi familia desde hace muchos años, debido ello, el enfoque que se logró dar a mi tema de tesis tiene una significancia muy grande para mí. Por lo que en primer lugar quiero agradecer a mi tutor de tesis, el Profesor Jorge Martinez, por el apoyo brindado durante estos años y por darme la oportunidad de aprender y de llevar a cabo este Seminario de Título en su Laboratorio.

También a todos con quienes compartí en el Laboratorio de Biología Celular del INTA, que me brindaron su cariño, buena onda y consejos para, además de lograr realizar mi trabajo, alegrar mi estadía en él. En particular agradecer a mi grupo de trabajo más cercano, a Arantzazú, Jessica y en especial Nicolás Tobar, quien fue un co-tutor en el desarrollo de mi tesis, enseñándome las técnicas de trabajo en laboratorio y transmitiéndome el espíritu crítico que un científico debe tener.

Quiero agradecer a mis amigas Coni, Farah, Jazz y Mona, por estar siempre a mi lado y soportar mi ausencia en tiempos de pruebas.

A mis compañeros de carrera, en donde conocí muchos amigos, y que junto a los profesores de la Facultad de Ciencias, con sus preguntas y conocimientos, fueron esenciales en mi formación científica.

A mi familia por su apoyo incondicional, que mediante sus críticas, conocimiento y consejo en decisiones en momentos claves de mi vida, me forjaron como la persona que soy y me han llevado a estar donde estoy.

Finalmente agradecer a Mario, el mejor compañero que pude encontrar. Que me ha apoyado desde el primer año de la carrera, tanto en ámbito académico como personal y que ha sido un pilar fundamental en mi vida.

Este Seminario de Título fue financiado por el proyecto FONDECYT 1120187.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>vi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>vii</i>
ABREVIATURAS.....	<i>viii</i>
RESUMEN.....	<i>ix</i>
ABSTRACT.....	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN.....	<i>1</i>
1. Cáncer de mamas.....	<i>1</i>
2. Microambiente tumoral y papel del Estroma.....	<i>2</i>
3. Inflamación, estrés oxidativo y cáncer de mamas.....	<i>7</i>
3.i) Prostaglandinas y Cox-2.....	<i>8</i>
4. Cáncer de mamas y diabetes.....	<i>11</i>
5. Hipótesis.....	<i>15</i>
6. Objetivos.....	<i>15</i>
6.i) Objetivo General.....	<i>15</i>
6.ii) Objetivos Específicos.....	<i>15</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	<i>17</i>
1. Cultivo celular.....	<i>17</i>
2. Medios condicionados.....	<i>18</i>
3. Ensayo MTT de Proliferación.....	<i>18</i>
4. Uso del Biosensor Hyper.....	<i>20</i>
5. Expresión de mediadores pro-inflamatorios estromales.....	<i>22</i>

6. Expresión de mediadores pro-inflamatorios y de malignidad epitelial.....	23
7. PCR cuantitativo (qPCR).....	23
8. Western Blot.....	24
9. Ensayos de Migración.....	26
10. Análisis y procesamiento de datos.....	28
 RESULTADOS.....	 29
1. Efecto de la concentración de glucosa en la supervivencia de células estromales RMF.....	31
2. La exposición a glucosa genera un ambiente oxidativo.....	32
3. La exposición a glucosa genera un ambiente pro- inflamatorio.....	36
4. Factores solubles epiteliales favorecen la generación de un ambiente pro-inflamatorio y son favorecidos por la glucosa.....	38
5. IL-1 $\beta$ es el factor epitelial que promueve el aumento de Cox-2 estromal.....	41
5 i) IL-1 $\beta$ promueve un aumento en expresión de Cox-2 estromal adicionalmente al estímulo de glucosa.....	41
5 ii) IL-1 $\beta$ presente en medios condicionados por células epiteliales MDA-MB231 estimula la expresión de Cox-2.....	43
6. Factores solubles estromales promueven la expresión de IL-1 $\beta$ epitelial.....	45
6 i) PGE <sub>2</sub> es el factor estromal que produce un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$ .....	47
7. Glucosa favorece la migración de células tumorales por medio del aumento de la expresión de Cox-2.....	48
8. Prostaglandina E <sub>2</sub> promueve la migración de células tumorales.....	50

8 i) Pre-estimulación y migración en presencia de PGE <sub>2</sub> .....	50
8 ii) Inhibidor de receptor de PGE <sub>2</sub> disminuye el aumento de la migración provocado por factores estromales.....	51
8 iii) PGE <sub>2</sub> produce un aumento de factor transcripcional involucrado en la EMT.....	53
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIÓN.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	66

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Partidores qPCR.....	24
Tabla 2: Anticuerpos Primarios.....	26
Tabla 3: Anticuerpos Secundarios.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Activación del Fibroblasto.....	4
Figura 2: Funciones de los Fibroblastos activados en el estroma tumoral.	6
Figura 3: Ruta de síntesis de las Prostaglandinas.....	9
Figura 4: Esquema del Biosensor Hyper y su espectro de emisión fluorescente.....	21
Figura 5: Sistema de doble cámara (Transwell®).....	28
Figura 6: Cultivo de células estromales RMF-EG en condiciones basales....	29
Figura 7: Ensayo de MTT y de concentración de glucosa remanente para las células estromales crecidas en baja y alta concentración de glucosa.....	31
Figura 8: Células RMFs cultivadas en alta glucosa presentan un estado oxidativo citoplasmático mayor a las cultivadas en baja glucosa.....	34
Figura 9: Células estromales crecidas en alta glucosa sobre-expresan Cox- 2.....	36
Figura 10: Factores solubles epiteliales promueven la expresión de Cox-2 y esta es mayor en células crecidas en alta glucosa.....	39
Figura 11: IL-1 $\beta$ promueve la expresión de Cox-2 estromal y es mayor en alta concentración de glucosa.....	41
Figura 12: Anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$ inhibe la expresión de Cox-2 estimulada por factores solubles epiteliales.....	43
Figura 13: Factores estromales promueven el aumento de IL-1 $\beta$ epitelial.	45
Figura 14: PGE <sub>2</sub> promueve el aumento de IL-1 $\beta$ epitelial.....	46

Figura 15: Cox-2 estromal promueve la migración de células epiteliales.....	49
Figura 16: PGE <sub>2</sub> favorece la migración de células epiteliales.....	51
Figura 17: Inhibidor de EP4 disminuye la migración de células epiteliales.....	52
Figura 18: PGE <sub>2</sub> favorece la expresión de factores de EMT en células epiteliales.....	54
Figura 19: El daño genómico de la célula epitelial produce cambios fenotípicos en los fibroblastos vecinos.....	56
Figura 20: β-catenina se une al promotor de Cox-2.....	60
Figura 21: Modelo de interacción epitelio-estroma propuesto.....	64

**ABREVIATURAS**

**15-PGDH:** 15-hidroxyprostaglandina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**cADN:** ADN complementario

**CAFS:** Fibroblastos asociados a tumor

**CAT:** Catalasa

**CFP:** Proteína fluorescente cian

**COX-1:** Ciclooxygenasa 1

**COX-2:** Ciclooxygenasa 2

**DM:** Diabetes Mellitus

**EMT:** Transición epitelio mesénquima

**EP1-4:** Receptores de Prostaglandina 1-4

**ERO:** Especie reactiva de oxígeno

**FRET:** Transmisión de energía de resonancia

**GPX:** Glutación Peroxidasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrógeno

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1 beta

**IL-4:** Interleuquina 4

**IL-6:** Interleuquina 6

**MEC:** Matriz extra celular

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NOS:** Especies reactivas de nitrógeno

**PBS:** *buffer fosfato salino*

**PGE2:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PGD2:** Prostaglandina D<sub>2</sub>

**PGI2:** Prostaglandina I<sub>2</sub>

**PGF2:** Prostaglandina F<sub>2</sub>

**q-PCR:** *Reacción en cadena de la polimerasa* cuantitativa

**RMF:** Fibroblastos de reducción mamaria (línea celular)

**RT-qPCR:** *Reacción en cadena de la polimerasa* cuantitativa con *transcriptasa inversa*

**SDS PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SFB:** Suero fetal bovino

**SNAIL:** Proteína dedos de zinc SNAI1

**SOD:** Superóxido Dismutasa

**TAMS:** macrófagos asociados a tumor

**TBS-T:** Buffer Salino Tris y Tween

**TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF-ALFA:** Factor de necrosis tumoral alfa

**Trx:** Tiorredoxinas

**YFP: Proteína fluorescente amarilla**

## RESUMEN

La exposición crónica a una alta concentración de glucosa ha sido asociada con el desarrollo de estrés oxidativo, inflamación, ambos precursores potenciales de cáncer mamario. Datos epidemiológicos han permitido asociar la prevalencia de hiperglicemia (característico de la diabetes mellitus) con el desarrollo tumoral mamario.

El microambiente tumoral mamario está compuesto principalmente por un componente epitelial y otro estromal. Entre ambos se establecen interacciones bidireccionales que favorecen el desarrollo del tumor, su estabilización y su posterior metástasis a otros tejidos. La interacción entre el estroma y el epitelio es responsable de la textura y rigidez del tumor, fenómeno conocido como desmoplasia, y de la adquisición de propiedades malignas por el epitelio. Muchos tipos tumorales humanos –entre los que se cuenta el tumor mamario- se desarrollan asociados a un proceso inflamatorio que, se presume, es responsable de esta interacción.

En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de una larga exposición de células estromales mamarias a concentraciones altas de glucosa (25mM) y analizar el efecto de esta exposición en el desarrollo de un microambiente pro-oxidante e inflamatorio. Datos obtenidos muestran que células estromales mamarias cultivadas en alta glucosa generan un ambiente pro-oxidante evaluado mediante el uso de Hyper, un biosensor sensible a Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas células también expresan niveles elevados de ciclooxigenasa-2 (Cox-2) enzima clave de la ruta de síntesis de las Prostaglandinas (PG), moléculas que promueven la inflamación. También se mostró que IL-1 $\beta$  de origen epitelial (citoquina que se sobre-expresa en el fenotipo maligno) estimula la expresión de Cox-2 estromal, y que PGE<sub>2</sub> estromal retroalimenta la interacción estroma-epitelio estimulando la expresión de IL-1 $\beta$ . Se propone que la expresión aumentada de Cox-2 y el aumento consecuente de PGE<sub>2</sub> puede ser responsable de la adquisición de propiedades migratoria en las células epiteliales.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que células estromales mamarias cultivadas en alta concentración de glucosa presentan un estado oxidativo/inflamatorio que predispone a la adquisición de propiedades malignas por el epitelio.

## ABSTRACT

Chronic exposition to high concentration of glucose has been associated with cellular and tissue deregulations such as oxidative stress and inflammatory processes, both potential precursors of breast cancer. Additionally, hyperglycemia (characteristic of diabetes disease) has been associated with breast tumor development in epidemiological research.

Breast tumor micro-environment comprises of two components: epithelia and stroma. Bidirectional interactions between these constituents promote tumor development, stabilization and subsequent metastasis to other tissues. These interactions are responsible for the texture and stiffness of the tumor, phenomenon known as desmoplasia, and acquisition of epithelial malignancy. Several types of human tumors –including the breast tumor – develop an associated inflammatory process, which is thought to be responsible for this interaction.

The present work studied the effect of long-term exposure of mammary stromal cells to a high glucose environment (25 mM). Specifically, the potential impact of this treatment on the development of pro-oxidant and inflammatory microenvironment was assessed. The results showed that mammary stromal cells cultured in high glucose medium generate a pro-oxidative environment evaluated using a biosensor which is sensitive to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Hyper). These cells also expressed high levels of cyclooxygenase-2 (Cox-2) a key enzyme involved in the synthesis of prostaglandins (PG), a typical pro-inflammatory molecule. We showed that IL-1 $\beta$  of epithelial origin (overexpressed cytokine in malignant phenotype) stimulates stromal Cox-2 expression and generating a stromal-epithelial interaction stimulating expression of IL-1 $\beta$ . The results indicate that the increased expression of Cox-2 and the consequent increase of PGE<sub>2</sub> may be responsible for the acquisition of migratory properties in epithelial cells.

In summary, the results strongly suggest that mammary stromal cells cultured in high glucose concentration develop an oxidative/inflammatory condition which could predispose epithelial cells to acquire malignant properties.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer de mamas

El cáncer, de manera genérica, corresponde a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la pérdida de control sobre la proliferación celular. La explicación convencional a este hecho es que la pérdida de control es producto de mutaciones en el ADN, en particular en proto-oncogenes que controlan la proliferación (Weinberg, 2007). Dado que el daño es acumulativo, la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en gran medida conforme ha aumentado la expectativa de vida.

El cáncer de mamas se posiciona como el segundo cáncer más común a nivel mundial, después del cáncer a pulmón, y como la quinta causa más común de muerte por cáncer. Sin embargo, en mujeres este ocupa el primer lugar (Hutchinson, 2010). En Chile por su parte, se estima que cada año los casos de cáncer de mamas aumentan en un 20%, provocando alrededor de 1300 muertes por año (Serra y col., 2014).

El cáncer mamario se origina en su mayoría en el epitelio que recubre el interior del conducto mamario o en los lóbulos que proveen de leche al ducto mamario, denominados carcinoma ductal y lobular, respectivamente. Estos tumores, dependiendo de su grado (potencial invasivo) se pueden clasificar como in situ o invasivos.

En las últimas décadas el conocimiento de la biología celular del cáncer de mamas se ha ampliado notablemente y variados estudios han comenzado a abordar el tema

enfocados no sólo en el compartimento epitelial sino en una entidad funcional conocida como nicho tumoral, en el que coexisten muchos tipos celulares. Esta aproximación ha generado un nuevo enfoque en el proceso tumoral y ofrece alternativas de explicación sobre como alteraciones en este compartimento estarían promoviendo el desarrollo de tumorigénesis y metástasis en cáncer de mama (Mao y col., 2013).

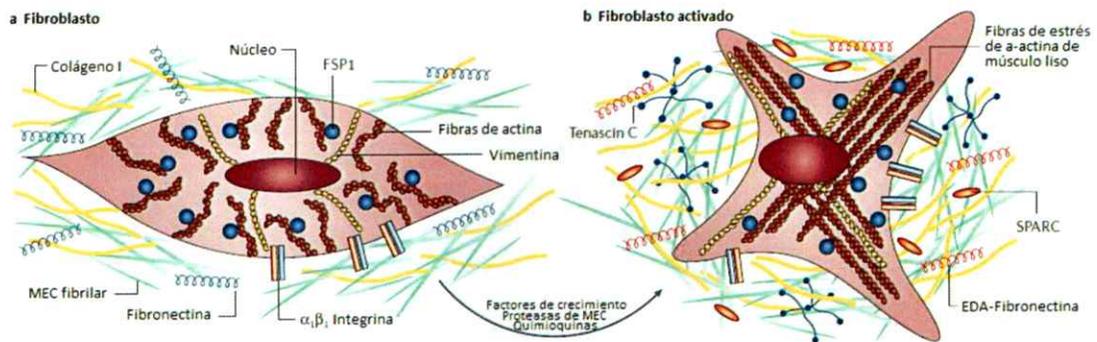
## **2. Microambiente tumoral y papel del estroma**

El nicho tumoral mamario está compuesto básicamente por células cancerosas de origen epitelial y estroma mamario, que incluye adipocitos, fibroblastos, células mesenquimales, células del sistema inmune, células endoteliales, matriz extracelular (MEC), factores de crecimiento y moléculas de señalización (Yamaguchi & Sakai, 2015).

Los fibroblastos son el componente mayoritario en el nicho tumoral mamario. En condiciones fisiológicas normales, estos son una importante fuente de proteasas degradadoras de MEC, enzimas que cumplen un papel prominente en la reparación de heridas y cicatrización, y en el mantenimiento de la homeostasis con el epitelio, a través de la activación de factores de crecimiento residentes e interacciones entre epitelio-mesénquima (Kalluri & Zeisberg, 2006). De hecho se ha propuesto que podrían ejercer un efecto protector en el epitelio mamario sano (Kuperwasser y col., 2004). Por otro lado, en el microambiente tumoral, los fibroblastos brindan una consistencia rígida fibrótica a la mayoría de estos, resultado de la interacción entre la célula tumoral y el estroma, en un proceso llamado estromagénesis (Kalluri &

Zeisberg, 2006). La estromagénesis es un proceso dinámico en el cual –bajo el control de la célula epitelial- la matriz extracelular es remodelada orquestadamente creando un ambiente más permisivo para el crecimiento tumoral (Beacham & Cukierman, 2005).

En el nicho tumoral el 80% del total de fibroblastos corresponde a fibroblastos asociados a tumor (CAFs) (Yamaguchi & Sakai, 2015) los cuales son fibroblastos activados (Figura 1) que comparten características con los fibroblastos estimulados por condiciones inflamatorias o a los encontrados en heridas (Augsten, 2014). No está definido el origen de los CAFs, sin embargo se sabe que en condiciones en las que el epitelio ha perdido la capacidad de generar contacto célula-célula y ha adquirido propiedades mesenquimales (invasivas y migratorias), denominado epitelio con transición mesenquimal (EMT), se establecen condiciones que favorecen la aparición de éstos (Kalluri & Zeisberg, 2006).



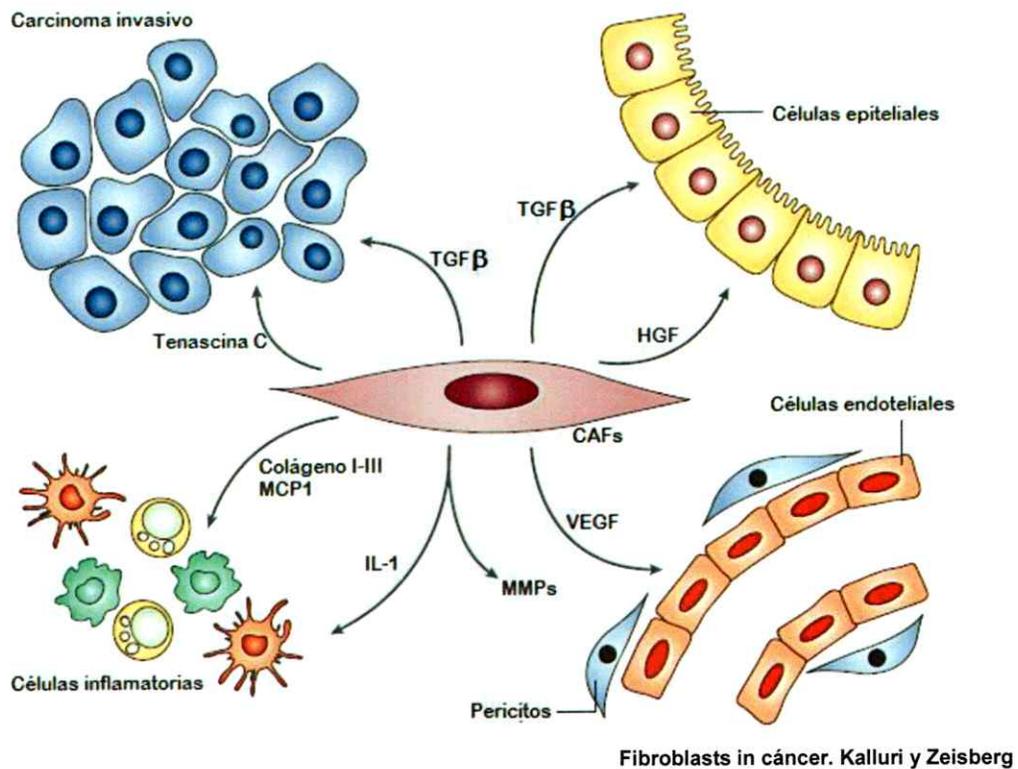
Fibroblasts in cancer. Kalluri y Zeisberg

**Figura 1. Activación del fibroblasto.** **A.** Los fibroblastos normales están embebidos dentro de la matriz extracelular fibrilar del tejido conectivo, en el cual hay colágeno tipo I y fibronectina. Los fibroblastos interactúan a través de integrinas. **B.** Los fibroblastos pueden adquirir un fenotipo activado, el cual es asociado a un aumento en la proliferación y en la secreción de proteínas de la matriz extracelular como colágeno tipo I, tenacina C y fibronectina con un dominio extra (EDA-Fibronectina) y SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteína). Fenotípicamente estos se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -sma y por la expresión de numerosos factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , quimioquinas y proteasas degradadoras de MEC.

Los CAFs aumentan la proliferación de las células tumorales y su angiogénesis mediante el reclutamiento de células endoteliales progenitoras en los carcinomas (Orimo y col., 2005), secretando enzimas metaloproteasas que degradan la MEC lo que libera factores de crecimiento que promueven la invasión de células cancerosas (Kessenbrock y col., 2010).

Se sabe que las células epiteliales con fenotipo EMT producen TGF- $\beta$  y que éste es directamente proporcional a su potencial maligno. Además este factor es capaz de de-diferenciar adipocitos mamarios hacia un fenotipo fibroblastoide (Guerrero y col., 2010). Asimismo la célula estromal estimulada por TGF- $\beta$  es capaz de generar factores solubles que a su vez, estimulan la migración de células epiteliales (Tobar y col., 2010).

Por otro lado, se ha visto que los fibroblastos activados podrían promover la progresión tumoral, mediante a la comunicación con las células epiteliales tumorales, pericitos de las células endoteliales y células inflamatorias mediante la secreción de factores de crecimiento y quimioquinas (Kalluri & Zeisberg, 2006) (Figura 2).



**Figura 2. Funciones de los fibroblastos activados en el estroma tumoral.**

Los fibroblastos interactúan con carcinomas, células epiteliales, endoteliales e inflamatorias y a través de quimioquinas y factores de crecimiento. Alteran el microambiente de la matriz extracelular a través del aumento de la deposición de colágeno tipo I y III y la expresión de Tenascina C, lo cual dirige la aceleración de la progresión del cáncer.

### **3. Inflamación, estrés oxidativo y cáncer de mamas**

La inflamación crónica se ha asociado al desarrollo de cáncer desde el siglo XIX (Garber, 2004). Estudios epidemiológicos actuales apoyan esta idea basados en evidencia estadística y experimental. La evidencia inicial se enfoca en la similitud observada entre los microambientes tumorales y los que se generan en cicatrización de heridas e infecciones. En la actualidad se ha evidenciado una poderosa correlación entre enfermedades inflamatorias y desarrollo de distintos tipos de cánceres, además de la reducción en el desarrollo y disminución en la mortalidad, de cánceres de mama y colon, con el uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (Mantovani y col., 2008).

La inflamación crónica provocada por alguna alteración o daño, puede promover la proliferación celular y la reclutamiento de células inflamatorias, las que liberan especies reactivas de oxígeno (ERO), activas señalizadoras y mediadores de la respuesta inflamatoria en conjunto con especies reactivas de nitrógeno (NOS). Estas especies cumplen múltiples funciones entre las que se encuentran la degradación de bacterias dentro de los fagosomas de los neutrófilos. En un contexto de daño constante y reparación del tejido, ERO pueden interactuar con el ADN y provocar mutaciones puntuales, deleciones y reordenamientos permanentes (Coussens & Werb, 2002).

Es un hecho conocido que las células tumorales producen varios tipos de citoquinas y quimioquinas, que atraen una diversa población de células del sistema inmune, que producen un respuesta variada de mediadores citotóxicos, proteasas, interleuquinas, interferones, TNF- $\alpha$  y ERO, por lo que son parte de la mantención y progresión tumoral (Acharyya & Massague, 2016).

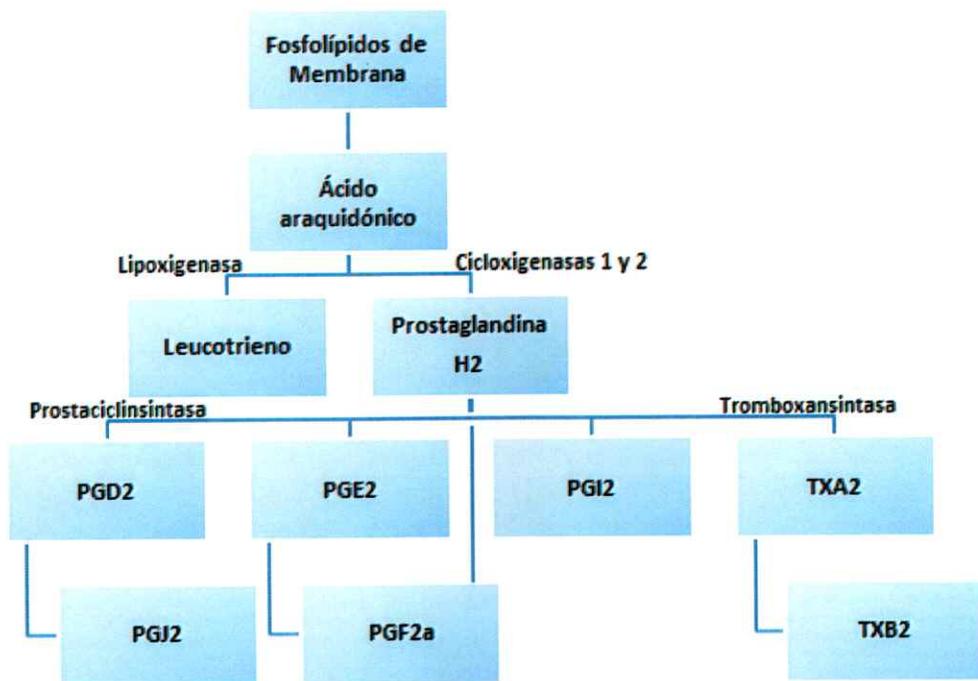
Por otro lado, también es un hecho conocido que la mayoría de los tumores son capaces de generar un ambiente inmunosupresor que inhibe la actividad antitumoral de células del sistema inmune como las Natural Killer (NK), macrófagos asociados a tumor (TAMs) y células T, las que se encuentran en circulación y son reclutados en el tumor para ejercer su acción anti- tumoral (Wahl & Kleinman, 1998; Zelenay y col., 2015). El desarrollo de cáncer, por lo tanto, daría cuenta de una pérdida de inmunogenicidad, debido a un bloqueo en el acceso de células T hacia el tumor, un reclutamiento de células supresoras y/o la producción de factores inmunosupresivos. Recientemente se ha descubierto que el sistema Prostanóide favorecería a la creación de un sitio inmune privilegiado para la formación de tumores, debido que estos aumentan la expresión de factores promotores de tumor (Zelenay y col., 2015). Al igual que se ha encontrado que algunos factores derivados de tumor como las interleuquinas 4 y 6, TGF- $\beta$  y Prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) reducen la actividad citotóxica de los TAMs.

### **3. i Prostaglandinas y Cox-2**

Las Prostaglandinas son moléculas de la familia eicosanoide que se sintetizan a partir de ácido araquidónico, un ácido graso insaturado que es liberado de la membrana plasmática mediante la acción de Fosfolipasas, y luego es metabolizado por la acción de las Prostaglandina sintasas G/H o la Ciclooxygenasa (Cox) y sus respectivas sintasas (Murakami & Kudo, 2004) (Figura 3). Esta secuencia juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, ya que sus productos aumentan en el tejido afectado, participando como señalizadores y participando en la dilatación de

los vasos sanguíneos, facilitando así la llegada de las células que llevan a cabo la respuesta inmune (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Existen 4 prostaglandinas: Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), Prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) y Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Los niveles de estas se ven afectados y varían considerablemente durante la respuesta inflamatoria (Ricciotti & FitzGerald, 2011). De estas la más estudiada ha sido la Prostaglandina E<sub>2</sub>, quien es generada por la Prostaglandina sintasa E.



**Breast Cancer- Carcinogenesis, Cell Growth and Signaling Pathways.**

**Figura 3. Ruta de síntesis de las Prostaglandinas.** Las prostaglandinas se producen tras la oxidación secuencial de ácido araquidónico, mediante ciclooxigenasas (Cox-1 y Cox-2) y prostaglandinas sintasas terminales.

Las prostaglandinas ejercen su efecto uniéndose a receptores de membrana unidos a Proteínas G. Existen 4 tipos de receptores de Prostaglandina, llamados EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> (Reader y col., 2011).

Las enzimas ciclooxigenasas comprenden dos miembros, Ciclooxigenasa-1 (Cox-1), la cual se expresa constitutivamente en la mayoría de las células y tiene funciones de mantenimiento, y Ciclooxigenasa-2 (Cox-2), quien induce el estímulo inflamatorio, hormonas y factores de crecimiento y se le asigna una mayor importancia como precursora de prostanoïdes en la inflamación y en enfermedades en donde hay proliferación descontrolada, como el caso de cáncer (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

El equilibrio en la producción de Prostaglandinas se mantiene por la acción la enzima Cox-2, la cual favorece su síntesis, y la 15-PGDH, encargada de su inactivación biológica (Anggard, 1966). Por esto último, 15-PGDH también ha sido estudiada como un posible objetivo en el tratamiento de cáncer. Se ha descubierto que la expresión de Cox-2 favorece también la producción de la enzima aromatasa, la cual induce la síntesis de las hormonas sexuales estrógenos, los que a su vez inhibe la expresión de 15-PGDH (Wolf y col., 2006).

Se ha identificado que una aberrante activación de la señalización Cox/PG es una característica común a varias neoplasias. La sobreexpresión de Cox-2 se ha identificado en variados tipos de cáncer tales como colorrectales, prostáticos, mamario, de piel, hígado y biliar, entre otros (Reader y col., 2011) (Williams y col., 1999). Particularmente en el cáncer de mamas, altos niveles de proteína de Cox-2 han sido detectados por histoquímica en 40% de carcinomas invasivos. La sobreexpresión de dicha enzima se ha visto correlacionada con las características del tumor, en agresividad, tamaño, grado de malignidad y de proliferación, y se ha

detectado una relación inversa entre los niveles de Cox-2 y la supervivencia libre de la enfermedad (Howe, 2007). Del mismo modo, se ha observado que PGE<sub>2</sub>, en cáncer colorrectal, promueve la proliferación, supervivencia, angiogénesis, la migración e invasión en tumores, junto con suprimir la apoptosis (Greenhough y col., 2009).

La comunicación entre epitelio-estroma y el estatus inflamatorio celular ha sido sugerido por trabajos en los que, Activina A, miembro de la familia de ligandos TGF- $\beta$ , provocó una inducción de Cox-2 en fibroblastos mamarios. Además promovió alteraciones en la expresión y deposición de proteínas de la matriz extracelular, incremento en la expresión de distintas citoquinas y factores de crecimiento y de favorecer la glicólisis aeróbica (Fordyce y col., 2012).

#### **4. Cáncer de mamas y diabetes**

La diabetes mellitus (DM), es una enfermedad caracterizada por un exceso crónico de glucosa en la sangre. Esta enfermedad conlleva variadas complicaciones tanto agudas como crónicas que afectan la calidad de vida y supervivencia de los individuos afectados (Vigneri y col., 2009).

Varios estudios han correlacionado la DM a diversos tipos de cáncer, tales como al de hígado, vejiga, páncreas, riñones, colorrectal, endometrial y mamario. Además de aumentar la mortalidad de quienes lo padecen (Vigneri y col., 2009).

Los mecanismos que subyacen a esta asociación no han sido elucidados, sin embargo las conexiones más plausibles refieren a la hiperinsulinemia, hiperglicemia,

resistencia a la insulina, estrés oxidativo e inflamación como los factores mayormente promovedores de la progresión tumoral (Ryu y col., 2014).

La idea inicial de la asociación entre el consumo de glucosa y el desarrollo de tumores fue sugerida por Warburg en 1930. En sus observaciones notó que la alta concentración de glucosa promovía la selección de clones celulares malignos resistentes a la hipoxia, en los cuales su energía era obtenida principalmente mediante la vía glicolítica. Efectivamente las células tumorales presentan una glicólisis aumentada, una mayor cantidad de transportadores de glucosa, por lo que el consumo de esta es mucho mayor (Garber, 2004; Zhang y col., 2015).

Se ha visto que la alta concentración de glucosa favorece la EMT, provocando la expresión de marcadores de células troncales de cáncer, además de disminuir los niveles de E-caderina, provocando un fenotipo más agresivo (Masur y col., 2011).

El metabolismo de la glucosa también estaría promoviendo una inflamación crónica la cual reduciría la capacidad antioxidante de la célula, predisponiéndola generar radicales libres los cuales dañarían el ADN y las enzimas involucradas en su proceso de reparación (Dandona y col., 1996). Se sabe que el exceso de glucosa promueve un mal funcionamiento mitocondrial, estimulando una mayor producción de ERO (Contreras-Ferrat y col., 2014).

Paralelamente, glucosa aumenta los niveles de las citoquinas inflamatorias en circulación, tales como IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C-reactiva, entre otros marcadores de inflamación, por lo que esta podría estar interfiriendo en la proliferación celular, apoptosis y metástasis (Xu y col., 2014).

También se ha logrado identificar que glucosa produce modulaciones epigenéticas de rutas oncogénicas, aumentando de esta manera la proliferación tumoral. Se ha

descubierto que la memoria de hiperglicemia es un fenómeno epigenético inducido previamente por una exposición prolongada a hiperglicemia, en la cual se activan rutas oncogénicas, las cuales siguen activas una vez pasada la condición, en condiciones de normoglicemia (Ryu y col., 2014).

La glucosa induce también la acetilación de  $\beta$ -catenina aumentando su señalización mediante la vía Wnt, vía normalmente encargada de la renovación de tejido post embrionario, y la mantención de algunas células troncales. Sin embargo, la desregulación de esta conduce a la proliferación celular aberrante en células tumorales y reduce su senescencia y apoptosis. Dentro de los objetivos transcripcionales de esta vía se encuentra la enzima Cox-2, asociada a una mala prognosis y a un aumento en la progresión y metástasis en cáncer. Por lo que la vía Wnt/  $\beta$ -catenina podría representar un fuerte nexo entre la diabetes y el cáncer (Chocarro-Calvo y col., 2013).

Tomando en cuenta todos los antecedentes expuestos, en el presente trabajo de Tesis se desarrolló un modelo de células en cultivo que pretende simular la situación del tejido mamario en un ambiente de hiperglicemia. Para ello, se utilizó una línea celular estromal mamaria humana normal, obtenida desde una reducción mamaria, que fue inmortalizada mediante la incorporación de la subunidad catalítica de la telomerasa. Estas células (RMF) fueron cultivadas en medios de cultivo que contenían una concentración de glucosa alta (25 mM) y otra baja (5 mM). Mediante la técnica de Imaging, con el uso de un biosensor sensible a peróxido, se estudió el estado redox de las células en ambas condiciones de cultivo. Se estudió también la



expresión del factor pro-inflamatorio Cox-2 mediante las técnicas de RT-qPCR y Western Blot.

Con el propósito de emular el microambiente tumoral, en el cual las células estromales están en contacto con las epiteliales tumorogénicas, se estudió la respuesta inflamatoria estromal a factores solubles generados por células epiteliales mamarias con distinto potencial maligno.

Finalmente se investigó de manera funcional si la glucosa y Cox-2 favorecerían la migración celular epitelial, característica asociada a la pérdida de adhesión célula-célula y metástasis, mediante ensayos de Transwell®.

## **5. Hipótesis**

La glucosa promueve la expresión de factores pro-inflamatorios de origen estromal, los cuales favorecen la expresión de características malignas en células tumorales de mamas.

## **6. Objetivos**

### **6.i Objetivo General**

Estudiar el efecto de la glucosa en la expresión de factores pro-inflamatorios en células estromales mamarias.

### **6.ii Objetivos Específicos**

- Evaluar si existen diferencias en los estados oxidativos de las células estromales crecidas en baja y alta concentración de glucosa.
- Estudiar la influencia de glucosa en la expresión de Cox-2 estromal.
- Estudiar si factores solubles provenientes de cultivos de células epiteliales promueven la expresión de Cox-2 en células estromales y si esta depende de la concentración de glucosa en que fueron cultivadas.
- Determinar si IL-1 $\beta$  es el factor epitelial que promueve el aumento de Cox-2 estromal.
- Estudiar si factores estromales promueven el aumento de IL-1 $\beta$  en el epitelio.
- Estudiar si existe un aumento en la movilidad epitelial al ser co-cultivadas con células estromales crecidas en alta glucosa.

- Determinar si la actividad de Cox-2 es responsable del aumento de la migración de las células epiteliales y la expresión de factores que favorecen la transición epitelio mesénquima.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo celular

Como estroma celular se utilizaron fibroblastos de reducción de mama sana, RMF-EG y RMF-621, los cuales fueron inmortalizados por la sobre expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (Kuperwasser y col., 2004) y donados por la Dra. Charlotte Kuperwasser (Tufts University, MA, USA) (Kuperwasser y col., 2004). Se cultivaron en DMEM bajo en glucosa (5,5 mM) y DMEM alto en glucosa (25 mM) (GIBCO, Life technologies). Para la contraparte epitelial se utilizaron células de origen epitelial de distinto grado de malignidad, MCF-7 (débilmente invasiva) y MDA-MB 231(altamente invasiva). Estas células fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA) y mantenidas en DMEM F-12 (GIBCO, Life technologies), que contiene una concentración de glucosa 17,5 mM.

En todos los casos, los medios se suplementaron con 10% suero fetal bovino (SFB) de Hyclone (Logan, UT), 2 mg/L Gentamicina (Laboratorio Sanderson, RM, CL) y 100 unidades/mL de Penicilina y 0,1 mg/mL de Streptomina de Biological Industries (CT, US). Todas las células fueron mantenidas en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2. Medios condicionados**

Se utilizaron células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa, y células MCF-7 y MDA-MB 231, las cuales fueron cultivadas individualmente en su medio de cultivo respectivo con 10% de SFB. Una vez alcanzado un 80% de confluencia, se lavaron las células con Buffer de fosfato salino (PBS) 1X (GIBCO, Life technologies) e incubaron 48 horas en su medio correspondiente libre de SFB.

Luego se colectó el medio y centrifugó a 2600 g por 10 minutos para eliminar posibles células en suspensión, paralelamente se tripsinizaron las células para ser contadas. Los medios colectados se alicuotaron en volúmenes de 1,5 mL y almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

Para comparar los efectos de los medios condicionados entre los distintos tipos celulares y/o tratamientos, se estandarizó por el mismo número de células.

## **3. Ensayo MTT de Proliferación**

Con el fin de verificar que el cultivo prolongado en baja glucosa no afectara la viabilidad de las células estromales RMFs, se realizó el ensayo de actividad metabólica conocido como método del MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El resultado de la reducción es un compuesto coloreado de color azul (formazán), el cual es cuantificable por absorbancia, por lo permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. Este método permite evaluar la cantidad de células vivas

(metabólicamente activas) que resulta ser proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para esto se sembraron 2000 células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa, en cada pocillo de una placa de 96, en su medio correspondiente suplementado con 10% de SFB. Luego de 24 horas se lavaron con PBS y se les agregó su medio correspondiente suplementado con 0% de SFB, 5% SFB y 10% SFB.

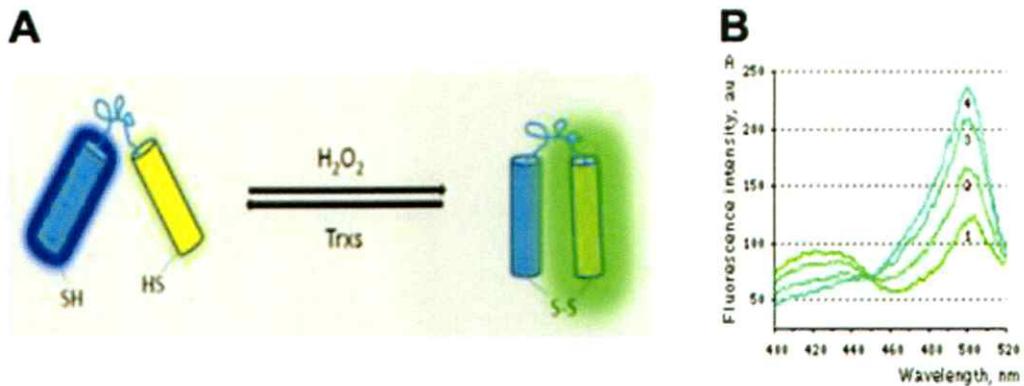
El ensayo se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas, agregándoles 100 uL de medio fresco correspondiente con 1 mg/mL de MTT. Luego de una incubación de 1 hora a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, se aspiró el medio y se resuspendieron las sales de formazán en una solución de DMSO/isopropanol (3:2) durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente se colectaron los productos solubilizados y se determinó la absorbancia a 570 nm.

Paralelamente se midió la glucosa remanente en el medio a las 48 y 96 horas.

#### **4. Uso del Biosensor Hyper**

Para evaluar en tiempo real el estado redox intracelular, se utilizó el biosensor Hyper (Belousov y col., 2006), que se encuentra codificado genéticamente en un vector comercial (Evrogen, Moscú, Rusia) y que fue empaquetado en partículas virales por el Dr. Diego Varela de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Hyper, corresponde a una proteína de fusión que actúa como nanosensor del tipo FRET y está compuesto por un dominio regulador OxyR de la bacteria *Escherichia coli* y está equipado con un par de cisteínas oxidables sólo en presencia de peróxido de hidrógeno ambiental. El cambio conformacional inducido por la oxidación es aprovechado acoplando un par de moléculas fluorescentes que, dependiendo de su cercanía, pueden transferir energía entre sí y emitir fluorescencia (Figura 4A).

El espectro de emisión del biosensor HyPer (Figura 4B) cambia de acuerdo al estado de oxidación de enlaces sulfhídricos intramoleculares que son críticos para la transferencia de energía desde la proteína azul (ciano-fluorescente, CFP) a la Amarilla (YFP). De esta manera, en presencia de peróxido de hidrógeno, aumenta la fluorescencia emitida al excitar con luz de 490 nm, mientras que la emisión disminuye cuando es excitada a 420 nm (Figura 4B).



**Figura 4. Esquema del biosensor HyPer y su espectro de emisión fluorescente.**

**A**, dibujo que ilustra la reducción/oxidación de un par de residuos de cisteína de la molécula HyPer, la reacción de oxidación es promovida por  $H_2O_2$ , en cambio su reducción obedece a la acción de la maquinaria antioxidante específica de la célula.

**B**, espectro de emisión de HyPer frente a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  (1,2,3,4). Nótese la respuesta recíproca, aumenta la fluorescencia a 490 nm mientras que a 420 nm disminuye.

Se sembraron células RMF-621, provenientes de cultivos en baja y alta concentración de glucosa, sobre un cubre-objeto de vidrio de 25 mm de diámetro hasta un 30% de confluencia, y fueron infectadas (1:500) con el adenovirus que codifica para Hyper. 48-72 horas post infección las células fueron transferidas a una cámara abierta en presencia del tampón KRH suplementado con 5 mM glucosa. El registro de imágenes, fue realizado a través de un objetivo de 40X realizando una doble excitación a  $420 \pm 10$  nm y  $490 \pm 10$  nm, mientras que la luz emitida fue recolectada con un filtro LP530 nm (*longPass*). El registro de imágenes fue realizado

con un objetivo de 40X en un microscopio Nikon (Cairn Research, UK), equipado con un monocromador, que permite la excitación discreta a  $430 \pm 10$  nm.

En las mediciones se comparó la respuesta a dos concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), 50 y 500  $\mu M$  y su recuperación después de ser retirado este. Los experimentos de se desarrollaron a temperatura ambiente (23-26°C).

### **5. Expresión de mediadores pro-inflamatorios estromales**

Para estudiar la influencia de la glucosa y factores epiteliales tumorales en la producción de los niveles de transcrito y proteína de Cox-2, se sembraron células RMF-EG cultivadas en baja y alta concentración de glucosa en su medio respectivo suplementado con 10% de SFB, luego de alcanzar una confluencia de 70% se les retiró el SFB y 8 horas más tarde se les agregó 30% medio condicionado de células MCF-7 y MDA-MB23, en el caso de los controles sólo se les agregó medio.

Para evaluar el aporte de IL-1 $\beta$ , como factor epitelial, en el cambio de producción de Cox-2, se realizaron ensayos en similares condiciones agregando 500 pg/mL de IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Además para verificar que los factores presentes en el medio condicionado por células epiteliales, que favorecían la expresión de Cox-2, corresponden a IL-1 $\beta$ , se agregó a los ensayos previos un anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$  recombinante humana (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), el cual se utilizó una concentración de 1  $\mu g/mL$ .

## **6. Expresión de mediadores pro-inflamatorios y de malignidad epitelial**

Para medir los niveles de IL-1 $\beta$  y SNAI1 (Snail) se sembraron 200.000 células MCF-7 y 150.000 de MDA-MB231 en medio DMEM F-12 suplementado con 10% SFB. Luego de alcanzar la confluencia se les retiró el SFB y agregó medio condicionado de células RMF-EG crecidas en baja y alta glucosa o 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub>. 24 horas después se midió IL-1 $\beta$  y Snail mediante qPCR.

## **7. PCR cuantitativo (qPCR)**

Para obtener el ARN mensajero de los ensayos, 24 y 48 horas post-tratamiento se lisaron las células con Trizol Reagent (Ambion, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cADN se generó a partir de 1  $\mu$ g de RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y Oligo-dT como iniciador, según un protocolo estándar. La expresión del mensajero para Cox-2, IL-1 $\beta$  y SNAI1 fue determinada por PCR cuantitativo en tiempo real usando un equipo Light Cycler<sup>®</sup> 96 de Roche. Para la reacción se utilizó 100 ng de ADN complementario y una mezcla de reacción LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche, en un volumen final de 10  $\mu$ L. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado e incluyendo un control negativo con agua. La normalización de los datos fue calculada a partir de la expresión del mensajero para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). Los Partidores utilizados se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1. Partidores qPCR.**

	<b>Secuencia del partidor</b>	<b>Tm</b>	<b>Tamaño</b>
Cox-2 F	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'	59°C	305 pb
Cox-2 R	5'- AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'		
GAPDH F	5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'	69°C	204 bp
GAPDH R	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'		
IL-1 $\beta$ F	5'-AATCCCCAGCCCTTTTGTG-3'	60°C	85 bp
IL-1 $\beta$ R	5'-AAATGTGGCCGTGGTTTCTG-3'		
SNAI1 F	5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3'	60°C	210 bp
SNAI1 R	5'-GCCTTTCCCACTGTCCTCATC-3'		

## 8. Western Blot

Para obtener las proteínas de los ensayos, 48 horas post-tratamiento las células fueron lavadas con PBS 1x frío y lisadas sobre hielo agregando un tampón de lisis (Hepes 50 mM (pH 7,4); NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; EGTA 2 mM; 1% Triton X-100; 10% Glicerol) suplementado con los inhibidores de fosfatasa OV (2 mg/ml) y NaF (20 mM), más el coctel comercial de inhibidor de proteasas Complete Mini de Roche. Luego de 10 minutos, las células se removieron con un rastrillo y se colectó todo el lisado celular, el que se colocó en tubos Eppendorf para separar la fracción insoluble por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos. La fracción soluble (sobrenadante) fue traspasada en un nuevo tubo y luego de separar un alícuota para la determinación de la concentración de proteínas, se le agrego el tampón de carga 4x

(60% glicerol, 40% SDS, 0,01% de azul de bromo fenol y 20% beta-mercapto etanol). Finalmente las muestras fueron calentadas a 80°C para su denaturación y almacenadas a -20°C hasta su uso. Paralelamente se determinó la concentración de proteínas a 570 nm con el kit comercial "Pierce BCA Protein Assay kit" (Thermo, Rockford, IL).

Posteriormente se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, en el cual se cargaron cantidades equivalentes de proteína de cada condición experimental. Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana PDVF previamente activada en metanol, mediante un sistema de transferencia húmeda. Al finalizar la transferencia las membranas se lavaron 3 veces con tampón TBS-T (20 mM Tris-HCl 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20) y fueron bloqueadas con una solución 4% BSA en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmuno-detección indirecta, se realizó incubando el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación constante. A continuación las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 10 min a temperatura ambiente e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente. La marca quimioluminiscente fue visualizada utilizando el kit comercial, Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo, Rockford, IL) y la detección se realizó con películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, C, SE). Los anticuerpos utilizados y las diluciones de uso se resumen en la Tabla 2 y 3.

**Tabla 2. Anticuerpos Primarios.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Código</b>	<b>Marca</b>
Anti-Cox2	cabra	1:500	sc-1745	Santa Cruz
Anti- $\beta$ -Actina	ratón	1:5000	A5441	Sigma

**Tabla 3. Anticuerpos Secundarios.**

<b>Secundarios WB</b>	<b>Dilución</b>	<b>Código</b>	<b>Marca</b>
Anti-Cabra	1:7000	610-1302	Rockland
Anti-Ratón	1:5000	611-1302	Rockland

### **9. Ensayos de Migración**

Para la migración de las células MCF-7 y MDA-MB231 se utilizaron placas Transwell® de 24 pocillos, de diámetro de membrana 6.5 mm y tamaño de poro de 8.0  $\mu$ m (Corning, Corning, NY, USA).

Se realizaron tres experimentos en los cuales se midió la migración de las células epiteliales:

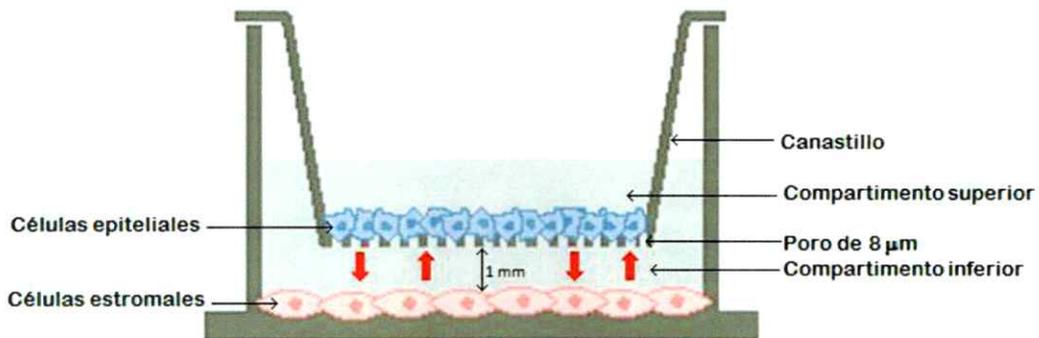
1. En los pocillos inferiores se sembraron 60.000 células RMF-EG crecidas en baja y alta concentración de glucosa, en su respectivo medio suplementado con 10% de SFB por 24 horas, luego se les privó de SFB y en los ensayos con inhibidor de Cox-2 se les agregó 10  $\mu$ M de NS-398 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) por 24 horas y luego se lavaron con PBS 1X.

Posteriormente se agregaron 60.000 células MCF-7 o MDA-MB231, a la cámara superior y dejaron migrar.

2. Se sembraron 200.000 células MCF-7 y MDA-MB231 en placas de 35 mm, luego de 24 horas se les retiró el SFB y agregó 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante, pasadas 24 horas se tripsinizaron las células y contaron y sembraron 60.000 en los pocillos superiores del Transwell®, además se agregó medio DMEMF-12 con 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante y con 2% de SFB para quimioatraer las células.
3. Se sembraron 60.000 células MCF-7 y MDA-MB231 en la cámara superior del Transwell y se agregó medio condicionado por 24 horas de células RMF-EG crecidas en baja y alta concentración de glucosa con 1µM de L-161,982, inhibidor del receptor de prostaglandina EP<sub>4</sub>.

La migración de las células MCF-7 duró 24 horas, mientras que las de células MDA-MB231 5 horas. Finalmente las células epiteliales se tiñeron y fijaron con Cristal Violeta en etanol al 10%, y fotografiaron. Se contaron 4 fotos (20X) por Transwell® divididas en 12 campos cada una.

### Sistema de doble cámara



**Figura 5. Sistema de doble cámara (Transwell®).** En la imagen se destaca: la cámara superior donde son puestas a migrar las células epiteliales, la membrana que separa los dos compartimentos y que posee un poro de 8 µm, y la cámaras inferior donde son puestas las células estromales.

## 10. Análisis y procesamiento de datos

- El cálculo de la expresión relativa de cada uno de los ARN mensajeros estudiados, fue determinado por la ecuación (1) descrita para la determinación de la expresión relativa (Pfaffl, 2001).

$$(1) \quad R = \frac{E_{gen\ blanco}^{\Delta Ct_{gen\ blanco} (Control-tratado)}}{E_{gen\ ref}^{\Delta Ct_{gen\ ref} (Control-tratado)}}$$

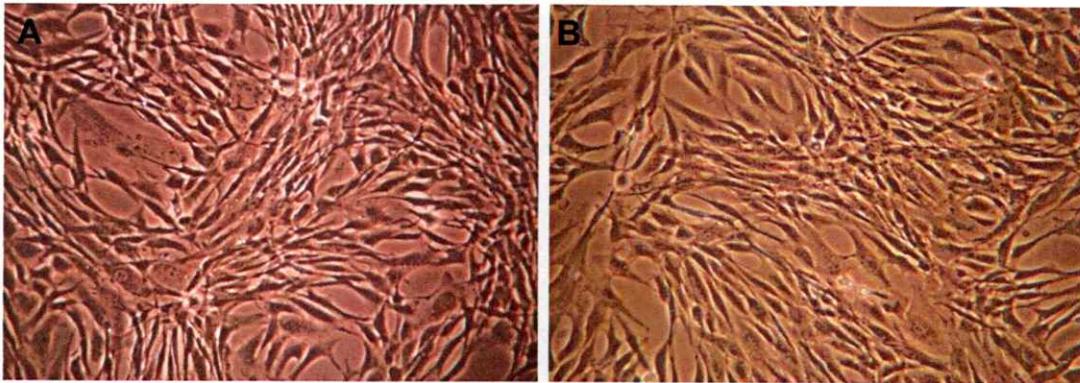
- La cuantificación de la expresión proteica mediante Western blot se realizó utilizando el software ImageJ.

- Para la realización de los gráficos y análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS

### 1. Efecto de la concentración de glucosa en la sobrevivencia de células estromales RMF.

Las células RMF-EG crecidas en baja y alta concentración de glucosa no mostraron diferencias en su apariencia (Figura 6), ni tasa de crecimiento en cultivo. Sin embargo, para asegurar que la disminución en la concentración de glucosa en el cultivo no afectara la sobrevivencia celular, se evaluó el potencial metabólico celular.



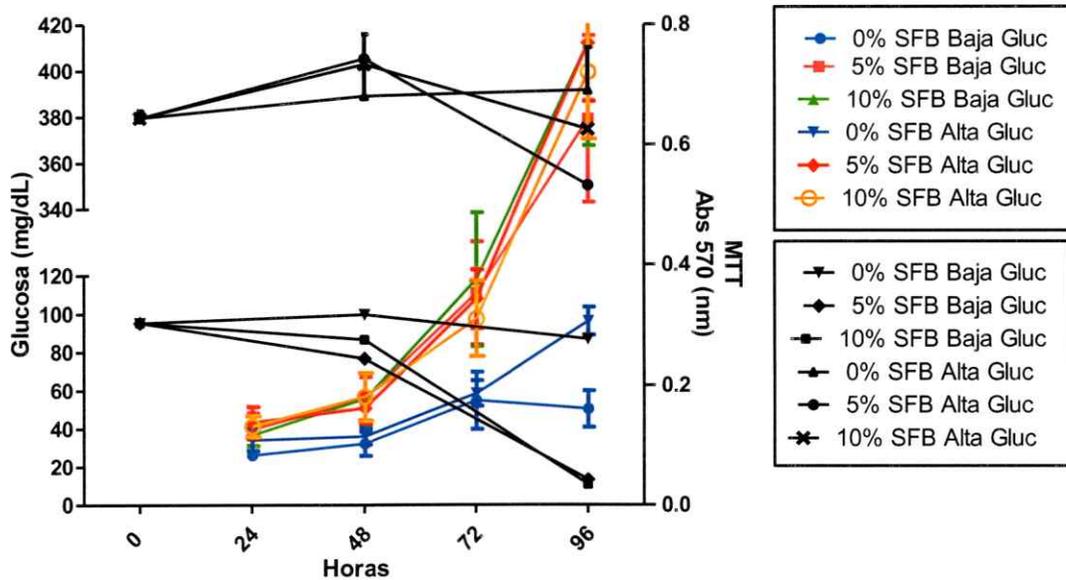
**Figura 6. Cultivo de células estromales RMF-EG en condiciones basales.** Imágenes de RMF-EG cultivadas en baja (A) y en alta (B) concentración de glucosa, en condiciones basales visualizadas a 20X.

Con ese propósito, se estudió la actividad metabólica celular en tres concentraciones de SFB (0%, 5% y 10%), durante cuatro tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Al finalizar estos tiempos se midió la capacidad metabólica mediante el ensayo MTT.

/

Como se observa en la figura 7 los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas en la sobrevivencia celular entre células provenientes de cultivos en baja y alta glucosa cultivadas durante el ensayo con 0%, 5% o 10% SFB las primeras 48 horas. A las 96 horas, sin embargo, se puede observar una declinación en las células cultivadas en baja glucosa con 5% y 10% de SFB. Para las otras concentraciones de SFB, ambos cultivos tuvieron una sobrevivencia similar. Paralelamente, se verificó la posible modificación de los niveles de glucosa en los respectivos cultivos atribuibles al consumo celular. Para ello, se evaluaron los niveles de glucosa presente en los cultivos de células RMFs crecidas por 48 y 96 horas en baja y alta glucosa. En este caso se utilizó un ensayo colorimétrico de punto final y como se aprecia en la figura 7, hasta las 48 horas el consumo de glucosa por células crecidas tanto en baja como alta glucosa no logró disminuir significativamente la concentración en el medio de cultivo. Sin embargo, en los cultivos provenientes de baja glucosa, se observó una gran diferencia en la glucosa remanente en el medio en las 96 horas.

Estos experimentos permiten sostener que las células RMFs cultivadas en baja glucosa, se comportan en cultivo de modo muy similar a las cultivadas en alta glucosa y no presentan ninguna diferencia metabólica que pudiera influir en los experimentos siguientes, por lo menos hasta las 48 horas de ensayo.



**Figura 7. Ensayo de MTT y de concentración de glucosa remanente para las células estromales crecidas en baja y alta glucosa.** El ensayo fue realizado utilizando células RMF-EG en baja y alta glucosa, en distintas concentraciones de SFB y a distintos tiempos. Ambos tipos celulares mantuvieron un crecimiento similar dentro de las 72 horas, para las 3 concentraciones de SFB. Se midió, por otro lado, la glucosa remanente en el medio, en donde se encontró un descenso importante en la cantidad de glucosa en el medio de baja concentración de glucosa a las 96 horas.

## 2. La exposición a glucosa genera un ambiente oxidativo.

Diversos estudios han establecido que la hiperglicemia genera un microambiente metabólico que aumenta los niveles intracelulares de ERO, además de favorecer la modulación de fibroblastos en enfermedades con un componente fibrótico (Bocchino y col., 2010).

Para evaluar si las células RMFs cultivadas en alta glucosa expresan diferencias en su estado oxidativo respecto a las cultivadas en baja concentración de glucosa, se utilizó el biosensor Hyper, el cual es sensible a peróxido. Para ello, se infectaron RMF-621 cultivadas en baja y alta glucosa con un adenovirus que expresa el biosensor y se evaluó la respuesta celular al peróxido aplicando dos pulsos de 50 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y su posterior recuperación realizando lavados post- máxima respuesta al pulso.

Los resultados indican que las células cultivadas en alta concentración de glucosa se encuentran en un estado de oxidación mayor que las cultivadas en baja concentración de glucosa (Figura 8 A y B).

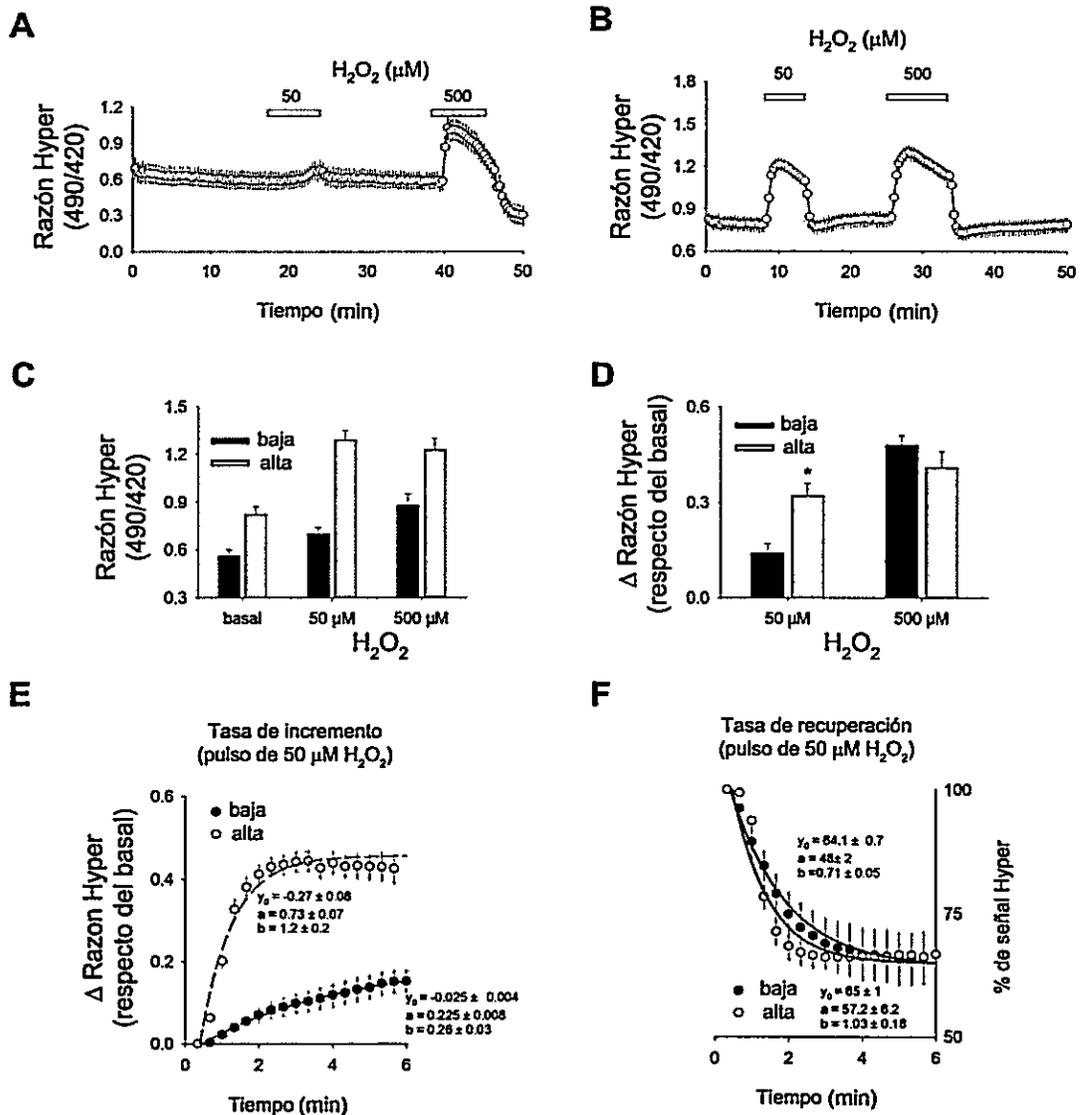
Al analizar los promedios de los valores de la señal de Hyper al pulso de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se observa que células cultivadas en alta glucosa presentan mayores valores máximos de oxidación del biosensor que casi igualan al obtenido para la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentración saturante) (Figura 8 C y D).

El análisis cinético de la respuesta al pulso muestra que la  $V_i$  de respuesta a 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  para células cultivadas en baja glucosa fue de  $5 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  mientras que para células RMF cultivadas en alta glucosa el valor fue de  $78 \pm 16 \text{ s}^{-1}$  (Figura 8 E).

Para evaluar la capacidad antioxidante endógena de las células se analizó la capacidad de las células para reducir los puentes disulfuros del biosensor luego de

remover por lavados sucesivos los 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las curvas de recuperación para las células cultivadas en ambas concentraciones de glucosa no mostraron diferencias significativas (Figura 8 F).





**Figura 8.** Células RMFs cultivadas en alta glucosa presentan un estado oxidativo citoplasmático mayor a las cultivadas en baja glucosa. (A, B) Razón de fluorescencia de células RMFs que expresan Hyper, cultivadas en baja (A) y alta (B) glucosa. Pulsos consecutivos de 50 y 500  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , que son ilustrados por las barras blancas y la línea punteada. En (C, D), promedio  $\pm$  error estándar de los valores máximo de la señal de Hyper en los dos pulsos de  $H_2O_2$  de células cultivadas en baja y alta glucosa. (\*) significa diferencia estadísticamente significativa obtenida

por prueba de t-Student no pareada. **(E)** análisis cinético de la respuesta del biosensor frente al primer pulso de  $H_2O_2$ , los primeros minutos de respuesta fueron graficados tomando como valor de referencia la señal basal, células cultivadas en baja (círculos negros) y alta glucosa (círculos blancos). **(F)** fase de recuperación de Hyper luego del lavado del pulso de  $50 \mu M H_2O_2$ , versus tiempo. Los puntos experimentales fueron ajustados a la función exponencial simple de 3 parámetros para determinar la velocidad inicial de oxidación y recuperación. Los datos corresponden a los promedios  $\pm$  error estándar de 23 células de 3 experimentos independientes en baja glucosa y 24 células de 3 experimentos independientes en alta glucosa.

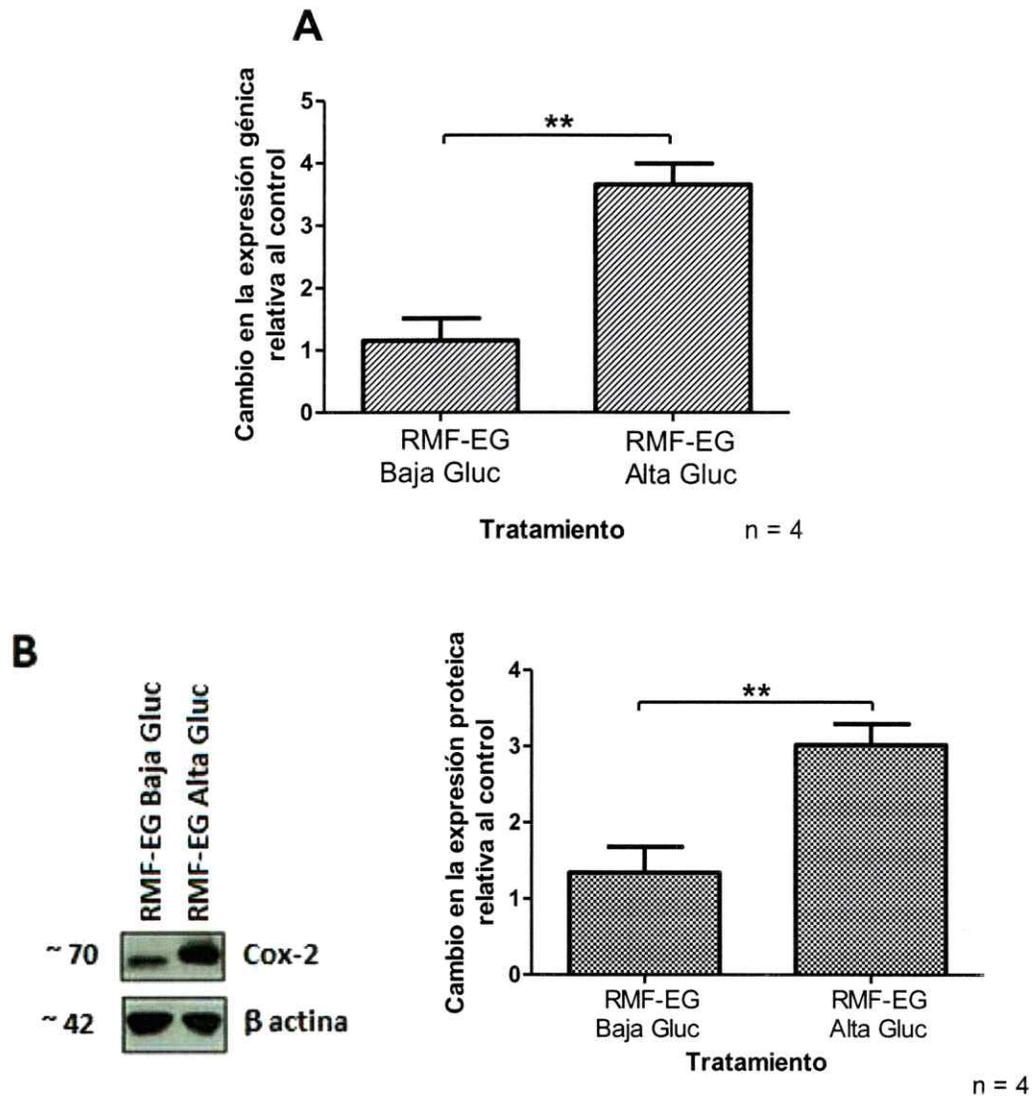
### **3. La exposición a glucosa genera un ambiente pro-inflamatorio.**

En conocimiento de que el cultivo prolongado a altas concentraciones de glucosa promueve un estado de mayor oxidación en las células RMFs, y que la producción de ERO han sido asociadas fenómenos inflamatorios, se evaluó si las células RMFs crecidas en alta concentración de glucosa producían factores pro-inflamatorios, en relación con las células crecidas en baja concentración de glucosa.

Para lo cual se evaluó la expresión como transcrito y proteína, de Cox-2, enzima encargada de producir Prostaglandinas a partir de ácido araquidónico y que constituye un marcador clave del proceso inflamatorio.

La expresión de Cox-2 se ha visto aumentada en variados tipos de cánceres, tales como colorrectales, prostáticos, de mama, de piel, hígado y biliar otros (Reader y col., 2011; Williams y col., 1999).

En primer lugar, se estudió la expresión de Cox-2 en condiciones basales de cultivo para las células RMF-EG crecidas en baja y alta concentración de glucosa, obteniéndose un aumento significativo tanto como ARN mensajero como de proteína en las células estromales cultivadas en alta concentración de glucosa (Figura 9).



**Figura 9. Células estromales crecidas en alta glucosa sobreexpresan Cox-2. A.**

RT- qPCR para Cox-2 de células RMF-EG crecidas en baja y alta glucosa.

**B.** Western Blot representativo de los resultados obtenidos para Cox-2 y b-actina como control de carga y análisis densitométrico de los Western Blot realizados.

(\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,01$ . Se utilizó el test t-student no pareado.

#### **4. Factores solubles epiteliales favorecen la generación de un ambiente pro-inflamatorio y son favorecidos por la glucosa.**

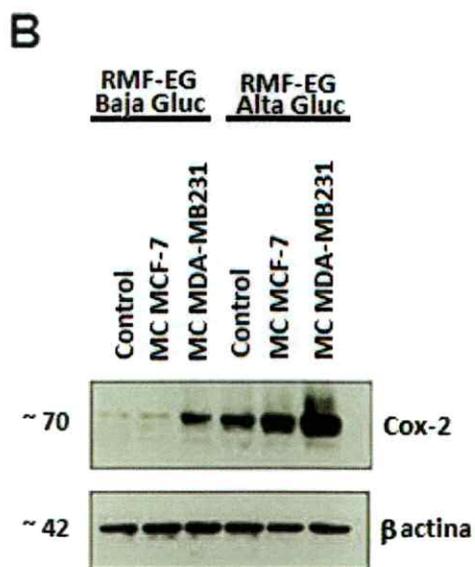
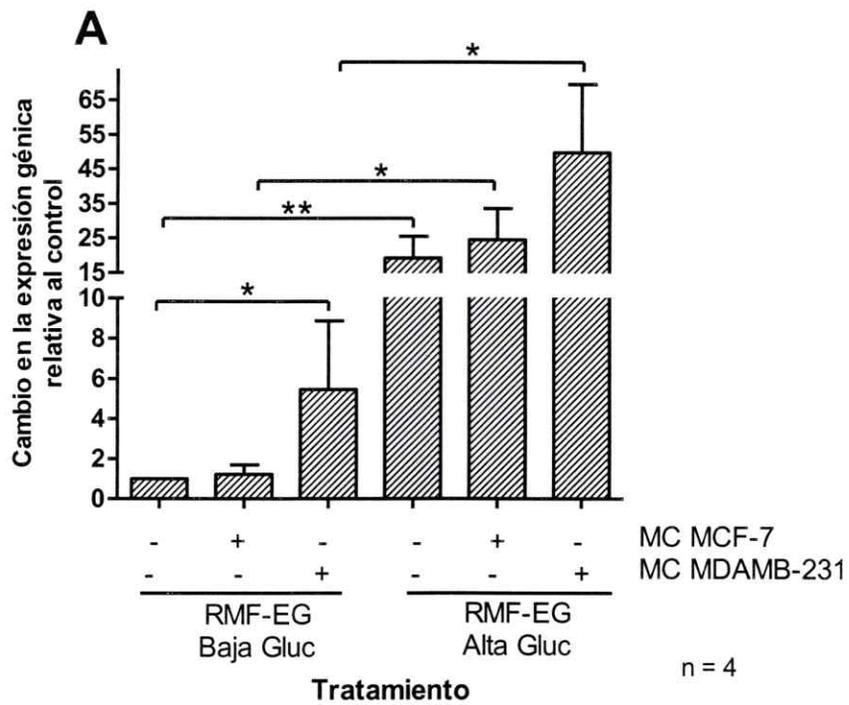
Estudios previos han verificado que la interacción entre los componentes estromales y epiteliales del tumor favorecen la malignidad y progresión tumoral (Beacham & Cukierman, 2005). Con esa información se propuso estudiar si factores de origen epitelial favorecen la expresión de moléculas moduladoras de la inflamación en el estroma, y si esta respuesta depende de la cantidad de glucosa a la que está expuesto el estroma.

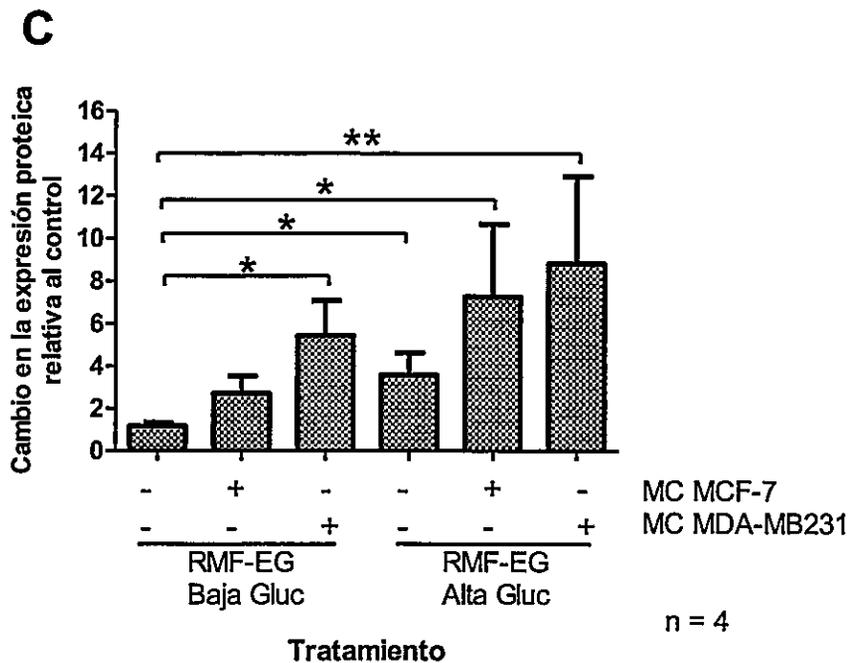
Para ello, se trataron las células RMF-EG, cultivadas en baja y alta concentración de glucosa, con factores solubles presentes en medios condicionados por células MCF-7 y MDA-MB231, células epiteliales mamarias con distinto grado de invasividad.

Los tratamientos se realizaron por 48 horas tanto para obtener la expresión del mensajero como la proteína de Cox-2.

Los resultados muestran que los medios condicionados de las células epiteliales tumorales MCF-7 y MDA-MB231 favorecieron la expresión de Cox-2 tanto de ARN mensajero como en proteína y este aumento se vio mayormente reflejado en las células cultivadas en alta concentración de glucosa (Figura 10).

Las células MDA-MB231, células tumorales altamente invasivas, produjeron una mayor sobreexpresión de Cox-2, que las células MCF-7, débilmente invasivas.





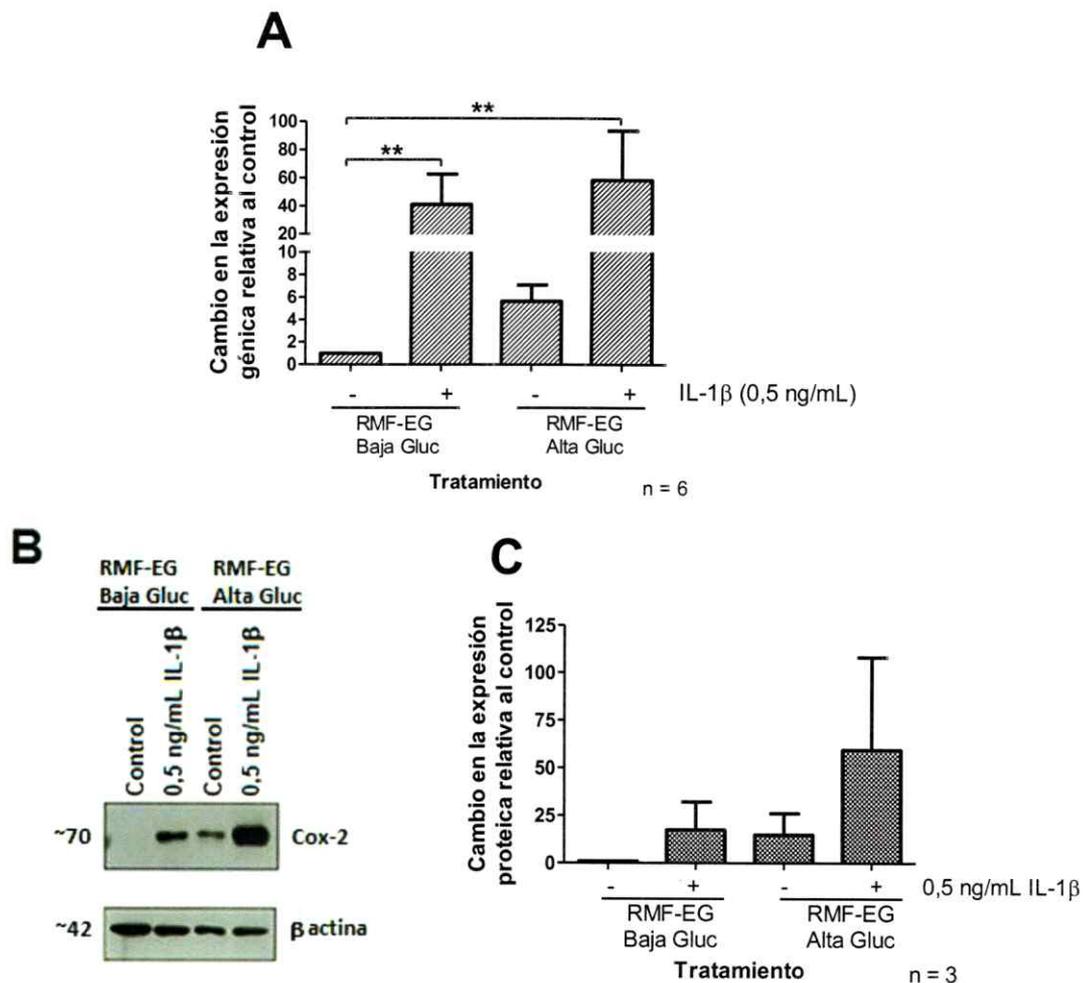
**Figura 10. Factores solubles epiteliales promueven la expresión de Cox-2 y esta es mayor en células crecidas en alta glucosa. A.** RT- qPCR para Cox-2 en células RMF-EG cultivadas en baja y alta glucosa, en 24 y 48 horas, en respuesta a medio condicionado por células epiteliales MCF-7 y MDA-MB231. **B.** Western Blot representativo de los resultados obtenidos para Cox-2 y b-actina como control de carga, y análisis densitométrico de Western Blot realizados. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$ . (\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,01$ . Se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

## **5. IL-1 $\beta$ de origen epitelial promueve el aumento de Cox-2 estromal**

Por su naturaleza, los medios condicionados contienen variados tipos de factores que podrían ser responsables de la sobreexpresión de Cox-2 estromal. De este modo, y dado que se ha identificado que moléculas de la familia de Interleuquina-1 son sobre-expresadas en diversas formas de cáncer (Fordyce y col., 2012) investigamos la participación de IL-1 $\beta$  en el desarrollo de un ambiente pro-inflamatorio en el estroma mamario adicional al provocado por glucosa.

### **5.i IL-1 $\beta$ promueve un aumento en expresión de Cox-2 estromal adicionalmente al estímulo de glucosa**

En primer lugar, se indujo la expresión de Cox-2 en células estromales por IL-1 $\beta$  recombinante. Para ello, Las células estromales se trataron con 500 pg/mL de IL-1 $\beta$  y la respuesta a la expresión de Cox-2 se evaluó mediante qPCR (24 horas) y por Western blot (48 horas). Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, IL-1 $\beta$  indujo la expresión de Cox-2 estromal y que la glucosa favoreció esta respuesta, tanto en su expresión de ARN mensajero como en proteína (Figura 11).



**Figura 11. IL-1 $\beta$  promueve la expresión de Cox-2 estromal y es mayor en alta concentración de glucosa.**

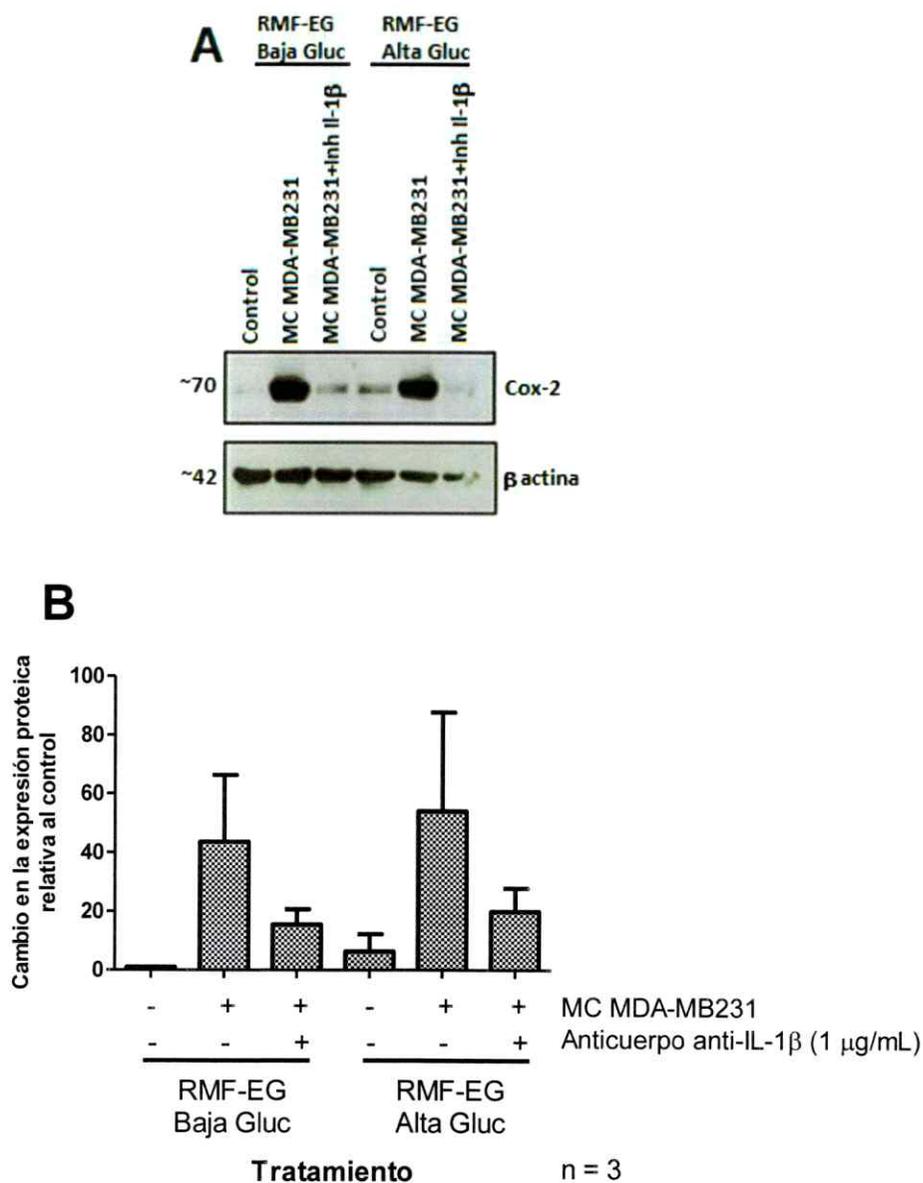
**A.** RT- qPCR para Cox-2 en células RMF-EG cultivadas en baja y alta glucosa, en respuesta a 0,5 ng/mL de IL-1 $\beta$  recombinante. **B.** Western Blot representativos de los resultados obtenidos para Cox-2 y  $\beta$ -actina como control de carga y análisis densitométrico de Western Blot realizados. Estos no fueron significativamente diferentes, sin embargo se observa una tendencia en su comportamiento.

(\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,01$ . Se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

## **5.ii IL-1 $\beta$ presente en medios condicionados por células epiteliales MDA-MB231 estimula la expresión de Cox-2.**

Resultados anteriores sugieren que factores solubles generados por las células MDA-MB231 inducen un cambio significativo en la expresión de Cox-2. Con el propósito de investigar si IL-1 $\beta$  presente en ese medio cumplía un papel en la inducción de Cox-2, se estimularon las células estromales, productoras de Cox-2 con medio condicionado por células epiteliales MDA MB 231 en presencia y ausencia de un anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$ .

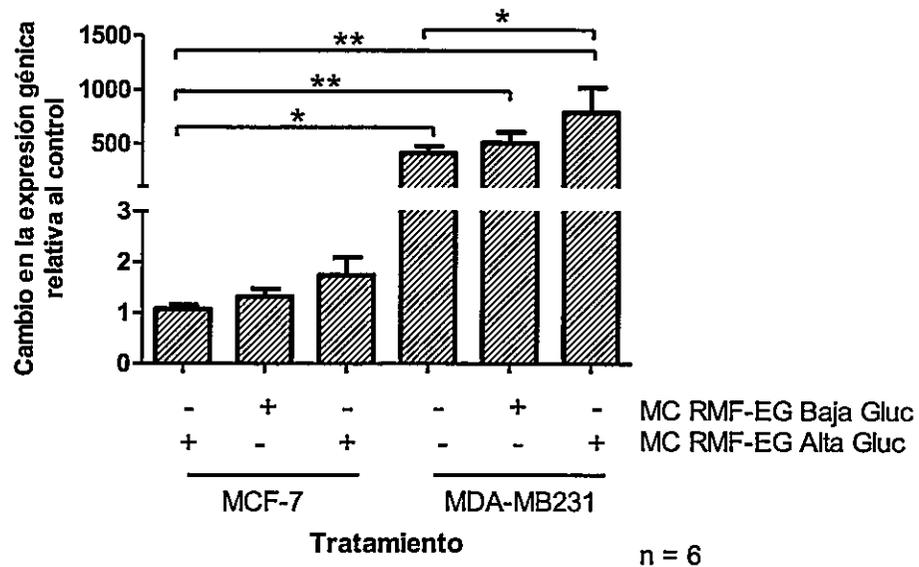
Los resultados obtenidos y que se indican en la Figura 14 muestran que el anticuerpo anti IL-1 $\beta$  disminuyó la expresión proteica de Cox-2 estromal que normalmente es inducida por el medio condicionado de células MDA-MB231 lo que permite proponer un papel de IL-1 $\beta$  epitelial en la expresión de Cox-2 estromal (Figura 12).



**Figura 12. Anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$  inhibe la expresión de Cox-2 estimulada por factores solubles epiteliales.** Western blot para Cox-2 en células RMF-EG cultivadas en baja y alta glucosa, en respuesta a 15% de medio condicionado por células MDA-MB231, en presencia de un anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$ .

## **6. Factores solubles estromales promueven la expresión de IL-1 $\beta$ epitelial**

Con el propósito de estudiar si la concentración de glucosa en la que se cultivan las células estromales afecta en la producción de factores que estimulan la expresión de IL-1 $\beta$  epitelial, se cultivaron células MCF-7 y MDA-MB231 en presencia de medios condicionados por células RMF crecidas en baja y alta concentración de glucosa y se evaluó la expresión de ARN mensajero para IL-1 $\beta$ . Los resultados de la Figura 13 manifiestan la gran diferencia de expresión de IL-1 $\beta$  de ambos tipos celulares y muestran que los factores contenidos en medios estromales provenientes de cultivos en alta glucosa generan un estímulo de mayor magnitud en las células MDA-MB231 que los cultivados en baja glucosa. No se advierten cambios significativos en el ARN mensajero para IL-1 $\beta$  en las células MCF-7.



**Figura 13. Factores estromales promueven el aumento de IL-1 $\beta$  epitelial. RT-qPCR para IL-1 $\beta$  de células MCF-7 y MDA-MB231 estimuladas por medios condicionados de RMF-EG.**

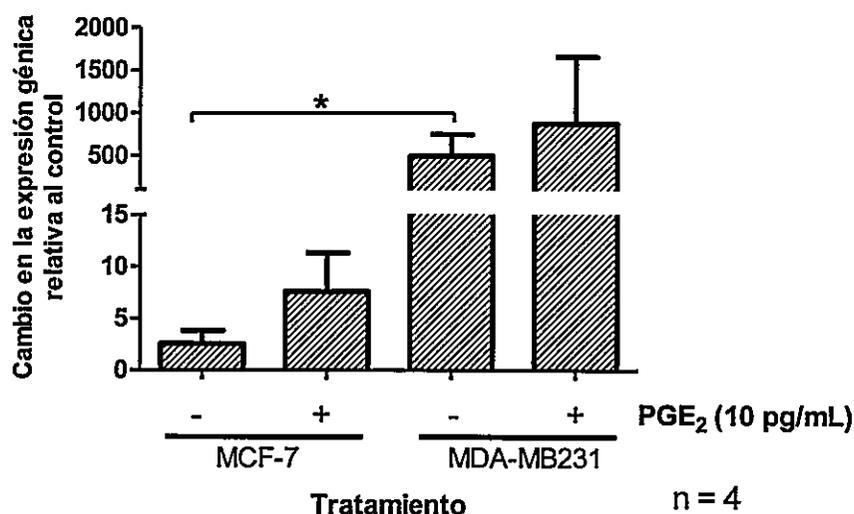
(\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$ .

(\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,01$ .

Se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

### 6.i PGE<sub>2</sub> es el factor estromal que produce un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$

Tomando en cuenta los resultados anteriores que sugieren una activa participación del eje Cox-2/PGE<sub>2</sub> en el establecimiento de un microambiente inflamatorio estromal, nos propusimos investigar el potencial efecto de PGE<sub>2</sub> en la producción de IL-1 $\beta$  epitelial. Para ello, se trataron ambos tipos de células epiteliales con 10 pg/ml de PGE<sub>2</sub> por 24 horas y se evaluó la expresión del transcrito por qPCR. Como la Figura 14 muestra, en ambas líneas celulares se obtuvo un aumento de la expresión de la citoquina, sin embargo no alcanzó significancia estadística.



**Figura 14.** PGE<sub>2</sub> promueve el aumento de IL-1 $\beta$  epitelial. RT- qPCR para IL-1 $\beta$  de células MCF-7 y MDA-MB231 estimuladas por 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante.

(\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$ .

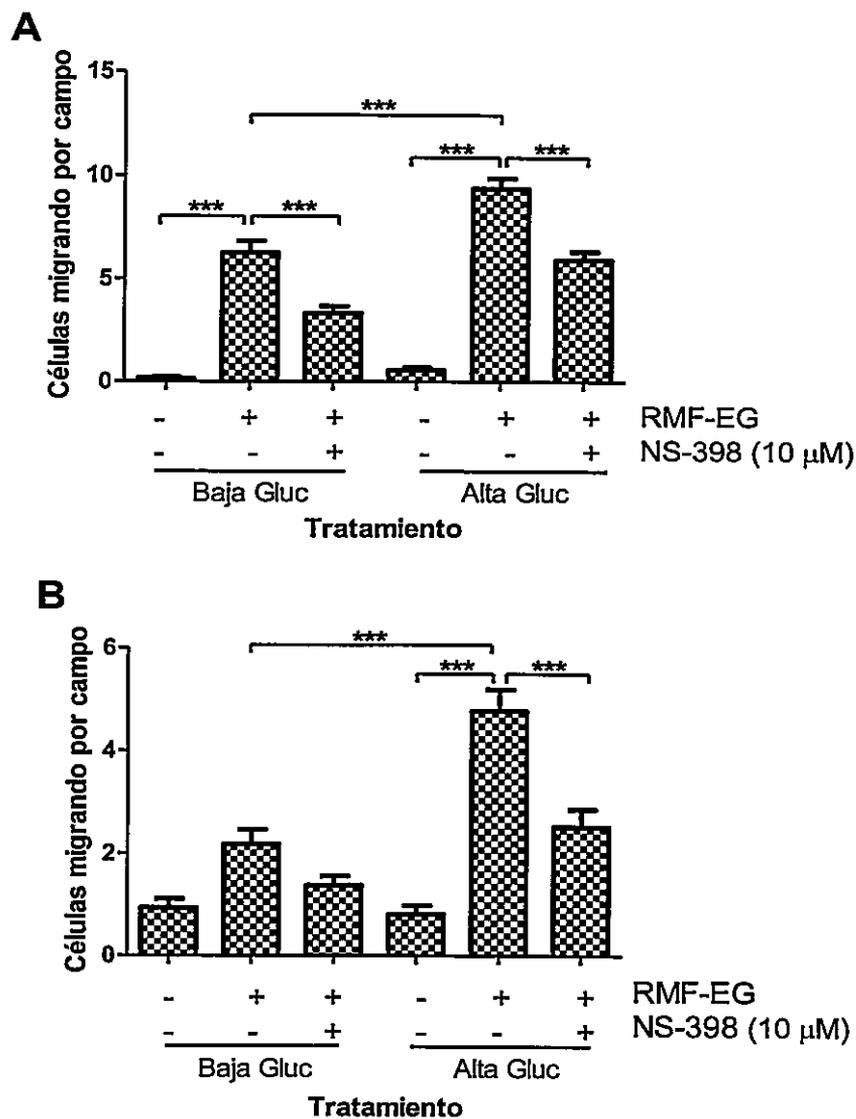
Se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

## **7. La glucosa favorece la migración de células tumorales por medio del aumento de la expresión de Cox-2**

A continuación se estudió si las células estromales crecidas a una alta concentración de glucosa ejercían alguna influencia en el desarrollo de propiedades asociadas con la malignidad epitelial. Para ello, se realizaron estudios de migración epitelial bajo el estímulo de medios solubles generados por células de estroma. El dispositivo de migración Transwell® permite establecer sistemas de co-cultivo en el que células de diferente origen se comunican. En este sistema, las células epiteliales son estimuladas a migrar a través de un filtro poroso bajo el estímulo de células estromales sembradas en el compartimento inferior del dispositivo. Para verificar si la condición inflamatoria del estroma es un elemento modificador de la migración, las células RMF-EG se pretrataron 24 horas con 10  $\mu$ M del inhibidor de Cox-2, NS-398, se lavaron y se aplicaron en el ensayo de migración con las células epiteliales tumorales MCF-7 y MDA-MB231.

Los resultados en la Figura 15 muestran que las células estromales crecidas en alta concentración de glucosa generan factores solubles que son capaces de favorecer la migración epitelial. El pre-tratamiento de las células estromales con NS-398, disminuyó la capacidad estimuladora de las células RMF-EG sobre ambas células epiteliales cultivadas previamente en alta o baja concentración de glucosa.

Cabe mencionar que el inhibidor no estuvo presente durante el ensayo de migración. Por ello, el análisis corresponde sólo a Cox-2 de origen estromal y no incluye la enzima de origen epitelial que, cuya expresión está relacionada con la obtención del fenotipo EMT (Bocca y col., 2014).



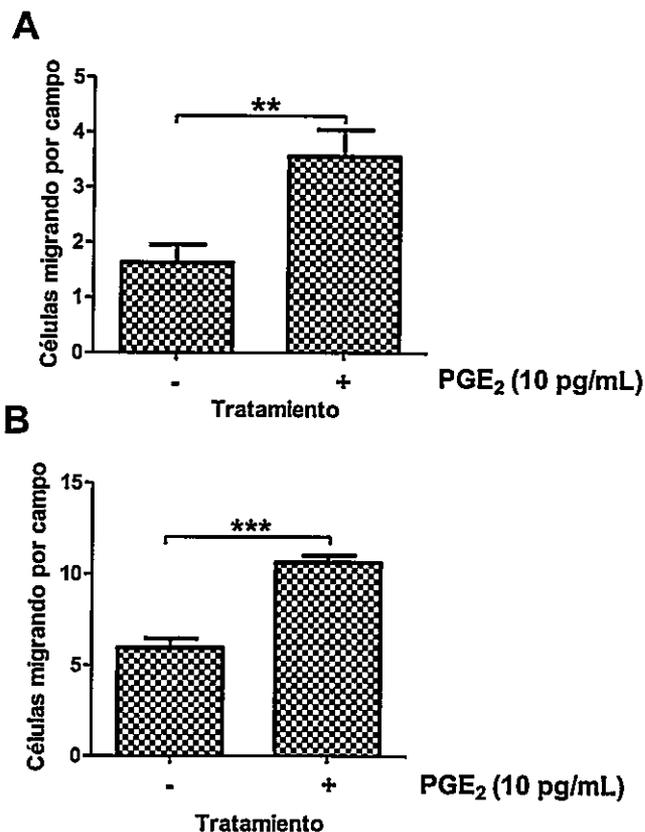
**Figura 15. Cox-2 estromal promueve la migración de células epiteliales.** Células RMF-EG indujeron la migración epitelial de células MCF-7 (A) y MDA-MB231 (B), y esta fue mayor en las células estromales crecidas en alta concentración de glucosa. El inhibidor NS-398 (10  $\mu$ M) disminuyó la migración estimulada por factores solubles estromales en MCF-7 y MDA-MB231. (\*\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,001$ . Se utilizó el test paramétrico de Bonferroni.

## **8. Prostaglandina E<sub>2</sub> promueve la migración de células tumorales**

El resultado anterior sugiere fuertemente que la actividad de COX-2 podría ejercer un papel en el estímulo a la migración epitelial. Por ello se pensó en PGE<sub>2</sub> como candidato debido a la evidencia que la relaciona con la EMT (J. Cao y col., 2014). Con el fin de analizar esta posibilidad, se desarrollaron dos tipos de experimentos:

### **8.i Pre-estimulación y migración en presencia de PGE<sub>2</sub>**

En primer lugar, se pre-trataron células epiteliales MCF-7 y MDA con 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante por 24 horas, y posteriormente se hicieron migrar por 24 y 5 horas, respectivamente, en presencia de medio DMEM-F12 con 2% de SFB (como quimioatrayente) y 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub>. Los resultados mostraron que ambas líneas celulares epiteliales pre-tratadas e incubadas con PGE<sub>2</sub> aumentaron su migración con respecto a las células que migraron contra medio.

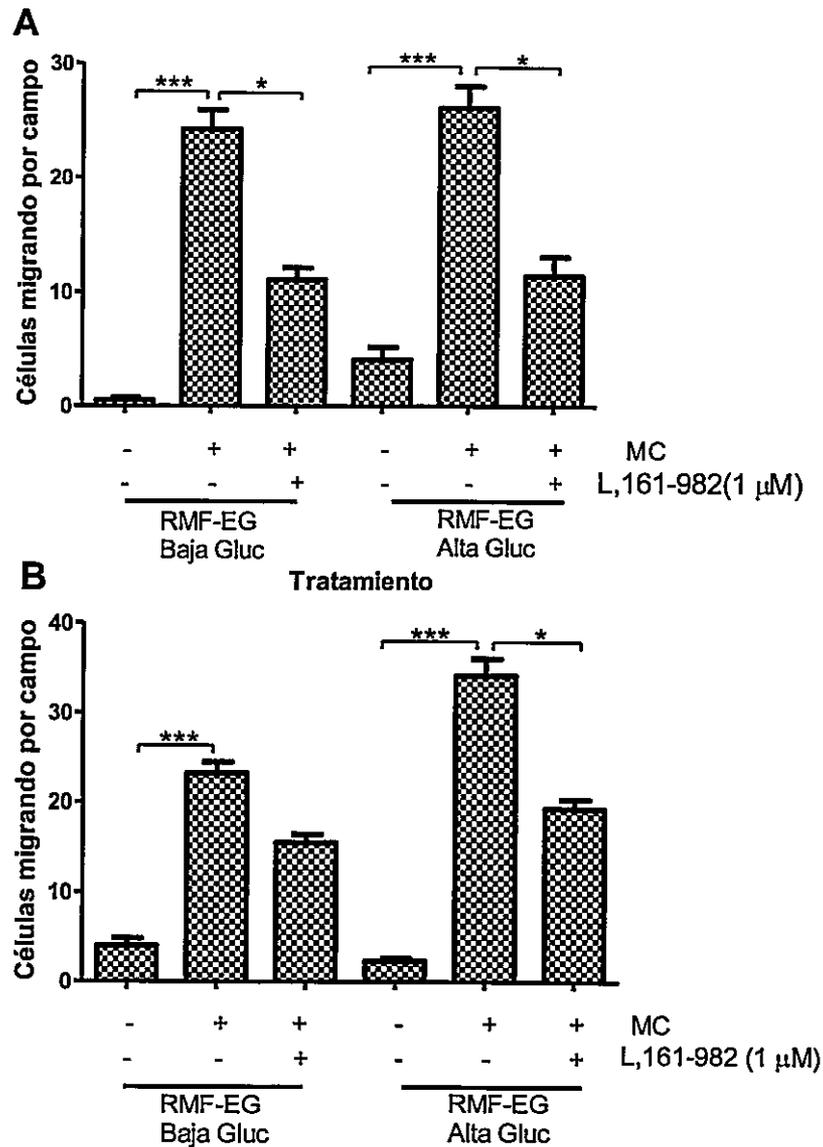


**Figura 16. PGE<sub>2</sub> favorece la migración de células epiteliales.** PGE<sub>2</sub> (10 pg/mL) indujo la migración epitelial de células MCF-7 (A) y MDA-MB231 (B). Las células MCF-7 migraron por 24 horas, mientras que las MDA-MB231 por 5. (\*\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,001$ . (\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,01$ . Se utilizó el t-test paramétrico.

### 8.ii Inhibidor de receptor de PGE<sub>2</sub> disminuye el aumento de la migración provocada por factores estromales

En segundo lugar, utilizando los datos que mostraban que factores solubles generados por células estromales cultivadas en baja y alta glucosa estimulaban la migración epitelial, se realizaron ensayos de migración en los que el estímulo a la migración lo constituía el medio condicionado por células estromales cultivadas en

alta y baja glucosa, y realizados en presencia y ausencia de L-161,982, inhibidor específico del receptor EP<sub>4</sub> de PGE<sub>2</sub>. Como la Figura 17 muestra, la presencia del inhibidor bloquea el estímulo estromal lo que permite asignar un rol a PGE<sub>2</sub> estromal sobre la migración epitelial.



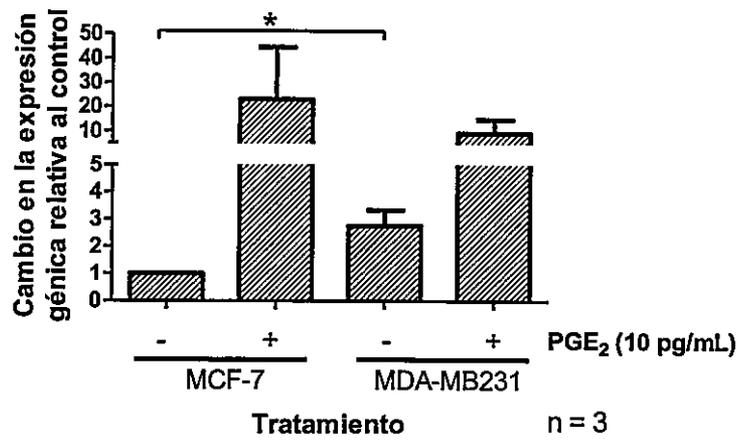
**Figura 17. Inhibidor de EP<sub>4</sub> disminuye la migración de células epiteliales.** L,161-982 disminuyó el aumento de la migración de las células MCF-7 (A) y MDA-

MB231 (B) provocado por el medio condicionado estromal. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$  (\*\*\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,001$ . Se utilizó el test paramétrico de Bonferroni.

### **8.iii PGE<sub>2</sub> produce un aumento de factor transcripcional involucrado en la transición EMT.**

Finalmente, una vez identificada la acción de PGE<sub>2</sub> en la migración celular y considerando que este rasgo constituye un componente de la llamada Transición epitelio-mesénquima, fenómeno que determina la malignidad epitelial, evaluamos el potencial estimulador de PGE<sub>2</sub> en la expresión de Snail, factor transcripcional que regula este complejo proceso (Voutsadakis, 2016; Wang y col., 2013). Para ello, se pre-trataron células epiteliales MCF-7 y MDA-MB231 con 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante por 24 horas para posteriormente extraer sus ARN mensajeros y evaluar el nivel de SNAI1 por qPCR.

Los resultados de la Figura 18 dan cuenta de un aumento en la expresión de SNAI1 epitelial al tratamiento con PGE<sub>2</sub>, sin embargo este lo no logró ser significativo.

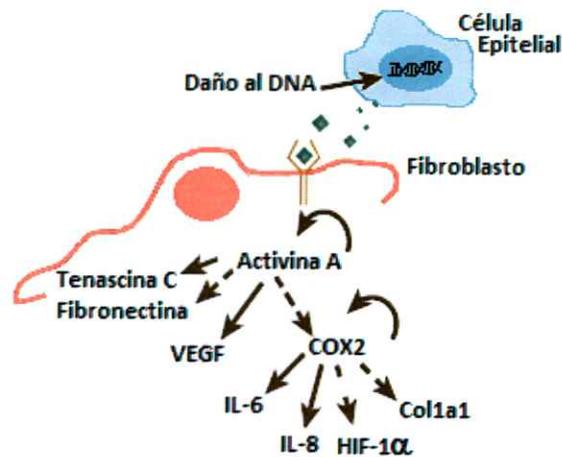


**Figura 18. PGE<sub>2</sub> favorece la expresión de Snail en células epiteliales.** RT- qPCR para SNAI1 de células MCF-7 y MDA-MB231 estimuladas por 10 pg/mL de PGE<sub>2</sub> recombinante. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$ . Se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

## DISCUSIÓN

El desarrollo del proceso tumorigénico ocurre en una entidad que se conoce como “nicho tumoral” que es un territorio en el que interactúan los componentes epiteliales y estromales (Lacina y col., 2015). La proporción en que concurren cada uno de estos componentes celulares es característica de cada tumor. Así, existen tumores en los que el componente estromal es mayoritario y, por ello, presentan una característica conocida como desmoplasia que le otorga variados grados de rigidez (Beacham & Cukierman, 2005).

Es un hecho conocido que los distintos componentes celulares del tumor interactúan de modo que se influyen en forma recíproca. En el caso de la malignidad epitelial, es un hecho probado el papel inductor sobre este rasgo que ejerce el estroma. Así se ha descrito que los fibroblastos asociados al tumor otorgan a las células epiteliales tumorales un aumento de la expresión génica, adquisición de fenotipo EMT, de propiedades migratorias y de célula madre. Por otro lado, es sabido que el epitelio tumoral induce en fibroblastos un cambio en la secreción de las proteínas de matriz, lo que origina el remodelamiento de la matriz extracelular, (Yamaguchi & Sakai, 2015), un estímulo a la angiogénesis, aumento de la afluencia de células del sistema inmune, aumento en la proliferación, favorecimiento del metabolismo anaeróbico sobre el oxidativo, producción de marcadores de midodiferenciación como  $\alpha$ -sma y aumento en la sobreexpresión de factores pro-inflamatorios como Cox-2 (Figura 17) (Fordyce y col., 2012).



Fordyce 2012

**Figura 19. El daño genómico de la célula epitelial produce cambios fenotípicos en los fibroblastos vecinos.** Factores solubles de células epiteliales con daño en su ADN inducen la expresión de marcadores asociados a malignidad en fibroblastos.

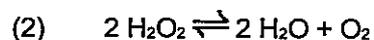
Datos clínicos y epidemiológicos han permitido establecer una relación entre la hiperglicemia y el desarrollo de cáncer mamario (Vigneri y col., 2009). Con el propósito de aproximar el trabajo celular a la realidad clínica, se sometió la línea celular de estroma mamario RMF a incubaciones prolongadas de dos concentraciones de glucosa: una baja (5 mM) que corresponde a una glicemia normal y una alta (25 mM) que corresponde a una hiperglicemia franca. En esas condiciones experimentales se intentó probar la asociación entre la hiperglicemia, la inflamación y el estímulo a la malignidad epitelial.

Estudios previos han descrito la existencia de una asociación entre hiperglicemia, estrés oxidativo y generación de un ambiente pro-inflamatorio (Isfort y col., 2014;

Pacher y col., 2007). Debido a la enorme cantidad de reacciones que dependen de un tenor oxidativo característico, se investigó si la glucosa, como componente del medio de cultivo, tenía alguna participación en el establecimiento de un ambiente oxidativo intracelular. Con esos fines se utilizó un biosensor sensible a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se analizó la influencia de glucosa en la respuesta a dos concentraciones de peróxido de hidrógeno en cuanto a oxidación y recuperación.

Los resultados indicaron que en las células cultivadas en alta concentración de glucosa al ser estimuladas con  $50 \mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno, la razón entre las longitudes de onda 490/420 fue mayor, dando cuenta de un aumento en la oxidación de los puentes disulfuro del sensor Hyper, en relación a las células cultivadas en baja concentración de glucosa. Esto sugiere un estado oxidativo mayor de las células cultivadas en alta glucosa (Figura 8 A, B, D).

En los sistemas celulares existe una maquinaria antioxidante que regula los niveles de ERO en el citoplasma y organelos, la cual está compuesta por enzimas dedicadas a eliminar sustancias oxidantes derivados de la respiración celular: las tiorredoxinas (Trx), la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT) (Mates & Sanchez-Jimenez, 1999; Shao y col., 2016), donde esta última en particular cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ).



Se propone que el aumento en el estado oxidativo de las células RMFs cultivadas en alta concentración de glucosa podría deberse a un déficit en la maquinaria celular para contrarrestar el exceso de ERO que estaría oxidando moléculas blanco en el citoplasma. De esta manera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidaría directamente al sensor Hyper, en vez de dividir su acción oxidando las otras moléculas normalmente reducidas.

Los resultados obtenidos luego del lavado seguido de la exposición a 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugieren que la exposición a glucosa no afecta el correcto funcionamiento de las enzimas tiorredoxinas, enzimas responsables de reducir los puentes disulfuro del biosensor originalmente oxidados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La relación entre la hiperglicemia, niveles elevados de ERO y la inflamación ha sido estudiada en el contexto de la expresión de Cox-2 (Kiritoshi y col., 2003). Con el propósito de constatar si esta secuencia también se producía en las células estromales mamarias RMFs crecidas en alta concentración de glucosa, se analizó los niveles de Cox-2 en esas condiciones experimentales. Cox-1 y Cox-2 son dos enzimas fundamentales en la ruta de síntesis de Prostaglandinas y Tromboxanos a partir del Ácido Araquidónico presente en las membranas celulares. Las prostaglandinas cumplen un gran número de funciones en procesos fisiológicos normales, entre los cuales se encuentran la promoción de la inflamación, la hinchazón, el dolor y la fiebre (Greenhough y col., 2009).

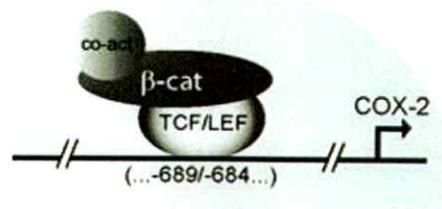
Los resultados confirmaron que las células RMFs crecidas en alta concentración de glucosa produjeron en estado basal una mayor cantidad de Cox-2, lo cual se tradujo en la expresión de su ARN mensajero y de proteínas. Adicionalmente, y en el contexto de la relación funcional entre epitelio-estroma, se investigó si un estímulo

generado por el epitelio era capaz de modular la expresión de Cox-2 y si el estímulo de glucosa se mantenía en estas condiciones. Los resultados en la Figura 10 muestran que los medios condicionados por células epiteliales tumorales provocaron un aumento en la expresión de Cox-2 evaluados tanto como ARN mensajero (qPCR) como proteína (Western blot). Las células MDA-MB231, de mayor malignidad, provocaron un aumento mucho mayor que las células MCF-7, de baja malignidad. Así se sugiere que la malignidad intrínseca se asocia a la producción de factores solubles que estimulan la expresión de Cox-2. El aumento de la producción de Cox-2 obtenido fue mayor en las células cultivadas en alta concentración de glucosa, lo que sugiere un estímulo basal previo del exceso de glucosa en el medio de cultivo.

Posteriormente, se propuso identificar si IL-1 $\beta$  se encontraba entre los factores solubles generados por las células epiteliales que promueven la expresión de Cox-2. La elección de esta citoquina está respaldada por su alta expresión en células tumorales malignas y su papel central en el establecimiento de un microambiente inflamado (C. Cao y col., 1996; Molina-Holgado y col., 2000; Tsuzaki y col., 2003). Para esto se realizaron dos tipos de experimentos: por un lado se estudió el efecto que la citoquina recombinante tenía sobre la expresión de Cox-2 estromal y por otro, utilizando un anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$  se investigó si parte del estímulo sobre la expresión de Cox-2 de los medios condicionados epiteliales era anulado cuando el ensayo se realizaba en presencia del anticuerpo. Los resultados mostraron que, efectivamente IL-1 $\beta$  recombinante estimuló la expresión de Cox-2 estromal y además, que la presencia del anticuerpo bloqueante inhibió parte de la respuesta estimuladora del medio condicionado por las células MDA MB-231. Estos resultados

sugieren que IL-1 $\beta$  es un factor epitelial que tiene una función importante en la expresión de Cox-2 estromal.

Se ha propuesto que una de las funciones de glucosa es a la activación de la vía canónica de Wnt (Wnt/ $\beta$ -catenina) en varios tipos de células tumorales (Anagnostou & Shepherd, 2008; Lee, 2014) tales como de colon, ovarios, páncreas y mamas.(Chocarro-Calvo y col., 2013; Garcia-Jimenez y col., 2014). Esta vía de señalización es esencial en el desarrollo, el mantenimiento de células troncales y la regeneración de tejidos. Sin embargo su sobre-expresión anómala ha sido asociada al inicio y progresión de múltiples tipos de cáncer (Beachy y col., 2004), entre ellos el mamario (Anastas & Moon, 2013). Uno de los blancos demostrados de la activación de la ruta Wnt es la expresión de Cox-2 y el aumento consistente de PGE<sub>2</sub>, (Figura 20) (Araki y col., 2003; Nunez y col., 2011; Yefi y col., 2011). De ahí se deduce que esta vía de señalización, respondiendo al exceso de glucosa, podría ser responsable de la expresión de Cox-2 y del establecimiento de un microambiente celular inflamado.



Núñez y col, 2011

**Figura 20.  $\beta$ -catenina se une al promotor de Cox-2.** Modelo que representa el mecanismo molecular por el que la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina contribuye a la expresión del gen de la Cox- 2 humano.

Se ha propuesto que IL-1 $\beta$  corresponde a una molécula pro-inflamatoria que cumple un papel central en el proceso carcinogénico; incluso se ha sugerido que su expresión se correlaciona con la progresión maligna y fenotipos más agresivos en distintos tipos celulares (Dinarelo, 2010; Filippi y col., 2015; Li y col., 2012). Los resultados obtenidos, en acuerdo con los de otros autores, indican que IL-1 $\beta$  de origen epitelial es capaz de estimular la expresión de factores claves en el proceso inflamatorio como es Cox-2 (Li y col., 2012; Paquette y col., 2011), por lo que los resultados darían cuenta de una retroalimentación positiva entre la producción de PGE<sub>2</sub> estromal y el estímulo de IL-1 $\beta$  epitelial lo que se vería favorecido por una hiperglicemia.

Se evaluó, además, la posibilidad que la generación de un ambiente inflamatorio tenga consecuencias en la obtención de capacidades migratorias en las células epiteliales. Para ello, utilizando es sistema bicameral de Transwell®, se sometieron ambas líneas celulares epiteliales a ensayos de migración bajo el estímulo de las células estromales. En síntesis, los resultados indican que el estímulo estromal que favorece la migración depende de la actividad de Cox-2 y de la unión de PGE<sub>2</sub> a la célula epitelial migratoria.

El incremento de la motilidad celular se relaciona directamente con la adquisición de propiedades malignas y pérdida de propiedades epiteliales, como la polaridad apical basal, las uniones célula-célula que caracteriza el proceso conocido como EMT. El fenómeno EMT es un proceso activo en varias etapas de la embriogénesis durante el desarrollo y en organismos adultos se ha asociado predominantemente a la progresión tumoral y el fenómeno metastásico (Hay, 1995). Los resultados de

migración obtenidos a partir de los ensayos Transwell® permiten sugerir que la acción que está ejerciendo la PGE<sub>2</sub> estromal sobre el epitelio podría deberse a modificaciones a nivel transcripcional de factores involucrados en la EMT.

Al evaluar el efecto de PGE<sub>2</sub> sobre la expresión de Snail, factor transcripcional característico de la EMT y que reprime la expresión de E-cadherina, se pudo confirmar un estímulo que es más expresivo en la célula menos invasiva (MCF-7) que, a su vez, expresa menores niveles basales de Snail. Este resultado, unido al hecho que PGE<sub>2</sub> estimula en menor medida la expresión de Snail en células MDA-MB231, podría ser explicado por el alto grado de diferenciación mesenquimal que tiene la célula MDA-MB231 y la expresión anómala previa de otros factores transcripcionales que dirigen la EMT, tales como Slug, Twist, ZEB1 y ZEB2 (Voutsadakis, 2016).



## CONCLUSIÓN

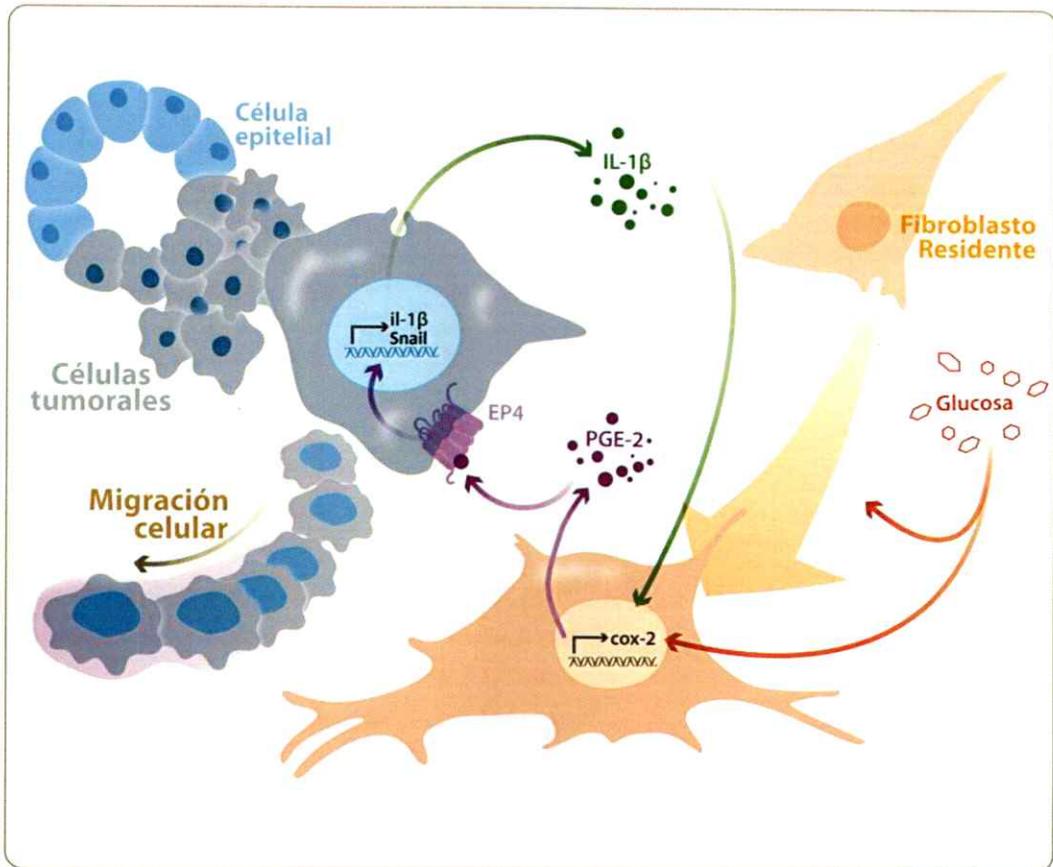
La relevancia del presente estudio radica en la alta prevalencia de diabetes tipo 2 en la población y el hecho que esta patología constituya un factor de riesgo del cáncer mamario.

En este trabajo se mostró que células estromales mamarias, cultivadas de manera crónica en altas concentraciones de glucosa, adquieren propiedades inflamatorias y oxidativas (fenotipo activado) caracterizadas por la elevada expresión de Cox-2 y una respuesta exacerbada al desafío oxidativo del peróxido de hidrógeno.

En la búsqueda del mecanismo responsable de este fenómeno, se identificó que el estroma "activado" por la hiperglicemia estimula la expresión de Cox-2 en presencia de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  de origen epitelial.

Por otro lado, Prostaglandina E<sub>2</sub>, producto de la actividad Cox-2, favorece la expresión de características asociadas a malignidad, como un aumento en la migración celular y la sobre-expresión de IL-1 $\beta$  y Snail epiteliales.

De esta manera, los resultados permiten proponer un modelo de interacción bidireccional epitelio-estroma, resumido en la Figura 21, que estimula la expresión de características malignas en el epitelio que se favorece por una sobreoferta de glucosa sostenida en el tiempo.



**Figura 21. Modelo de interacción epitelio-estroma propuesto.** Glucosa produce una activación de fibroblastos mamarios los que sobre-expresan Cox-2, produciendo una mayor cantidad de PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> produce en las células tumorales un aumento de la expresión de IL-1β y de su motilidad, favoreciendo características malignas.

## BIBLIOGRAFÍA

Acharyya, S., & Massague, J., 2016. Arresting supporters: targeting neutrophils in metastasis. *Cell Res*, doi: 10.1038/cr.2016.17.

Anastas, J. N., & Moon, R. T., 2013. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*, **13**: 11-26.

Anggard, E., 1966. The biological activities of three metabolites of prostaglandin E 1. *Acta Physiol Scand*, **66**: 509-510.

Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S. P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., & Harris, C. C., 2003. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res*, **63**: 728-734.

Augsten, M., 2014. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*, **4**: 62.

Beacham, D. A., & Cukierman, E., 2005. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*, **15**: 329-341.

Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., & Berman, D. M., 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, **432**: 324-331.

Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S., 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods*, **3**: 281-286.

Bocca, C., Ievolella, M., Autelli, R., Motta, M., Mosso, L., Torchio, B., Bozzo, F., Cannito, S., Paternostro, C., Colombatto, S., Parola, M., & Miglietta, A., 2014. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets*, **18**: 121-135.

Bocchino, M., Agnese, S., Fagone, E., Svegliati, S., Grieco, D., Vancheri, C., Gabrielli, A., Sanduzzi, A., & Avvedimento, E. V., 2010. Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, **5**: e14003.

Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., & Watanabe, Y., 1996. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res*, **733**: 263-272.

Cao, J., Yang, X., Li, W. T., Zhao, C. L., & Lv, S. J., 2014. Silencing of COX-2 by RNAi modulates epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells partially dependent on the PGE2 cascade. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**: 9967-9972.

Chocarro-Calvo, A., Garcia-Martinez, J. M., Ardila-Gonzalez, S., De la Vieja, A., & Garcia-Jimenez, C., 2013. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol Cell*, **49**: 474-486.

Contreras-Ferrat, A., Llanos, P., Vasquez, C., Espinosa, A., Osorio-Fuentealba, C., Arias-Calderon, M., Lavandero, S., Klip, A., Hidalgo, C., & Jaimovich, E., 2014. Insulin elicits a ROS-activated and an IP(3)-dependent Ca(2)(+) release, which both impinge on GLUT4 translocation. *J Cell Sci*, **127**: 1911-1923.

Coussens, L. M., & Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, **420**: 860-867.

Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., & Nicotera, T., 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, **347**: 444-445.

Dinarelli, C. A., 2010. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev*, **29**: 317-329.

Filippi, I., Carraro, F., & Naldini, A., 2015. Interleukin-1beta Affects MDAMB231 Breast Cancer Cell Migration under Hypoxia: Role of HIF-1alpha and NFkappaB Transcription Factors. *Mediators Inflamm*, **2015**: 789414.

Fordyce, C. A., Patten, K. T., Fessenden, T. B., DeFilippis, R., Hwang, E. S., Zhao, J., & Tlsty, T. D., 2012. Cell-extrinsic consequences of epithelial stress: activation of protumorigenic tissue phenotypes. *Breast Cancer Res*, **14**: R155.

Garber, K., 2004. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **96**: 1805-1806.

Garcia-Jimenez, C., Garcia-Martinez, J. M., Chocarro-Calvo, A., & De la Vieja, A., 2014. A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/beta-catenin signaling by high glucose. *J Mol Endocrinol*, **52**: R51-66.

Greenhough, A., Smartt, H. J., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A., 2009. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, **30**: 377-386.

Guerrero, J., Tobar, N., Caceres, M., Espinoza, L., Escobar, P., Dotor, J., Smith, P. C., & Martinez, J., 2010. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF-beta1 and TNF-alpha. *Breast Cancer Res Treat*, **119**: 497-508.

Hay, E. D., 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, **154**: 8-20.

Howe, L. R., 2007. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res*, **9**: 210.

Hutchinson, L., 2010. Breast cancer: challenges, controversies, breakthroughs. *Nat Rev Clin Oncol*, **7**: 669-670.

Isfort, M., Stevens, S. C., Schaffer, S., Jong, C. J., & Wold, L. E., 2014. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*, **19**: 35-48.

Kalluri, R., & Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**: 392-401.

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z., 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, **141**: 52-67.

Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., Matsumura, T., Tokunaga, H., Brownlee, M., & Araki, E., 2003. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*, **52**: 2570-2577.

Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J. W., Carey, L., Richardson, A., & 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.

Lacina, L., Plzak, J., Kodet, O., Szabo, P., Chovanec, M., Dvorankova, B., & Smetana, K., Jr., 2015. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci*, **16**: 24094-24110.

Li, H. J., Reinhardt, F., Herschman, H. R., & Weinberg, R. A., 2012. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov*, **2**: 840-855.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**: 436-444.

Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J., 2013. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **32**: 303-315.

Masur, K., Vetter, C., Hinz, A., Tomas, N., Henrich, H., Niggemann, B., & Zanker, K. S., 2011. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer*, **104**: 345-352.

Mates, J. M., & Sanchez-Jimenez, F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci*, **4**: D339-345.

Molina-Holgado, E., Ortiz, S., Molina-Holgado, F., & Guaza, C., 2000. Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br J Pharmacol*, **131**: 152-159.

Murakami, M., & Kudo, I., 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*, **43**: 3-35.

Nunez, F., Bravo, S., Cruzat, F., Montecino, M., & De Ferrari, G. V., 2011. Wnt/beta-catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells. *PLoS One*, **6**: e18562.

Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A., 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, **121**: 335-348.

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **87**: 315-424.

Paquette, B., Therriault, H., Desmarais, G., Wagner, R., Royer, R., & Bujold, R., 2011. Radiation-enhancement of MDA-MB-231 breast cancer cell invasion prevented by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Br J Cancer*, **105**: 534-541.

Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**: e45.

Reader, J., Holt, D., & Fulton, A., 2011. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **30**: 449-463.

Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A., 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**: 986-1000.

Ryu, T. Y., Park, J., & Scherer, P. E., 2014. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J*, **38**: 330-336.

Serra, I., Maya, D., & 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.

Shao, F. Y., Wang, S., Li, H. Y., Chen, W. B., Wang, G. C., Ma, D. L., Wong, N. S., Xiao, H., Liu, Q. Y., Zhou, G. X., Li, Y. L., Li, M. M., Wang, Y. F., & Liu, Z., 2016. EM23, a natural sesquiterpene lactone, targets thioredoxin reductase to activate JNK and cell death pathways in human cervical cancer cells. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.6828.

Tobar, N., Guerrero, J., Smith, P. C., & Martinez, J., 2010. NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration. *Br J Cancer*, **103**: 1040-1047.

Tsuzaki, M., Guyton, G., Garrett, W., Archambault, J. M., Herzog, W., Almekinders, L., Bynum, D., Yang, X., & Banes, A. J., 2003. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res*, **21**: 256-264.

Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., & Vigneri, R., 2009. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer*, **16**: 1103-1123.

Voutsadakis, I. A., 2016. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J Clin Med*, **5**:

Wahl, L. M., & Kleinman, H. K., 1998. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, **90**: 1583-1584.

Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. P., 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, **13**: 963-972.

Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York: Garland Science. Williams, C. S., Mann, M., & DuBois, R. N., 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, **18**: 7908-7916.

Wolf, I., O'Kelly, J., Rubinek, T., Tong, M., Nguyen, A., Lin, B. T., Tai, H. H., Karlan, B. Y., & Koeffler, H. P., 2006. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res*, **66**: 7818-7823.

Xu, C. X., Zhu, H. H., & Zhu, Y. M., 2014. Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. *World J Diabetes*, **5**: 372-380.

Yamaguchi, H., & Sakai, R., 2015. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers (Basel)*, **7**: 2054-2062.

Yefi, R., Ponce, D. P., Niechi, I., Silva, E., Cabello, P., Rodriguez, D. A., Marcelain, K., Armisen, R., Quest, A. F., & Tapia, J. C., 2011. Protein kinase CK2 promotes cancer cell viability via up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and enhanced prostaglandin E2 production. *J Cell Biochem*, **112**: 3167-3175.

Zelenay, S., van der Veen, A. G., Bottcher, J. P., Snelgrove, K. J., Rogers, N., Acton, S. E., Chakravarty, P., Girotti, M. R., Marais, R., Quezada, S. A., Sahai, E., & Reis, E. S. C., 2015. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*, **162**: 1257-1270.

Zhang, T. B., Zhao, Y., Tong, Z. X., & Guan, Y. F., 2015. Inhibition of glucose-transporter 1 (GLUT-1) expression reversed Warburg effect in gastric cancer cell MKN45. *Int J Clin Exp Med*, 8: 2423-2428.