

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PAPEL DE ADAR1p110 EN LA PROGRESIÓN DEL
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO A TRAVÉS DE
LA REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT
CANÓNICA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctora
en Bioquímica por:**

FERNANDA NICOLE MORALES ALONSO

**Directores de Tesis: Dr. Ricardo Armisen Yáñez
Dr. Julio Tapia Pineda**

Santiago - CHILE

2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

FERNANDA NICOLE MORALES ALONSO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Armisen Y. _____

Co-director de Tesis:

Dr. Julio Tapia P. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Chiong L. (Presidente) _____

Dra. Carmen Romero O. _____

Dra. Roxana Pincheira B. _____

Dr. Giancarlo de Ferrari V. _____

Dedicado a mi familia.

Agradecimientos

Al recorrer las distintas vivencias que tuve a lo largo de mi formación doctoral, estoy muy contenta y agradecida de decir que participaron de ella muchas personas. Primero agradecer a mis padres, Pilar y Carlos, por acompañarme incondicionalmente en cada proyecto, cada idea, cada desafío, sin importar lo complejo o arriesgado que fuera. Agradezco infinitamente a mis hermanos, por ser parte del constante aprendizaje y llenar de historias este largo camino. Gracias a los padres de mi pareja, Helga y Fernando, por su cariñoso apoyo.

Agradezco a mis tutores de tesis, Dr. Ricardo Armisen y Dr. Julio Tapia, por su confianza e impulsar los nuevos desafíos que fueron parte de mi crecimiento profesional. Junto con ello, agradezco a la Dra. Marcelain y a su equipo de laboratorio, por su constante disponibilidad y apoyo en la realización de mi tesis. También, agradezco a la Dra. Lobos y a la Dra. Pérez por sus enseñanzas y colaboración investigativa.

Gracias a los distintos medios de financiamiento que hicieron posible la realización de mi tesis doctoral:

- Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, beca de Doctorado Nacional N° 21130317; beca de Gastos Operacionales de Tesis Doctoral N° 21130317; y beca de Extensión de Tesis N° 21130317).
- Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT regular, N° 1151446, N° 1151435 y N° 1160889)
- Anillo en Ciencia y Tecnología (N° ACT172101)
- Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF, N° IT16I10051)
- Fondo de Financiamiento de Centros de Investigación en Áreas Prioritarias (FONDAP, N° 15130011)
- Corporación de Fomento de la Producción (CORFO, N° 13CEE2-21602).

Quisiera agradecer a todas/os mis amigas/os con los cuales compartí y/o conocí en los distintos laboratorios donde tuve la oportunidad de trabajar chiquillas/os: Rodrigo, Pablo, Marisel, Óscar, Valentina, Pamela, Daniela, Jéssica y Vanesa, gracias por los momentos tan lindos, tantas risas, por su cariño y apañó. Gracias Paola, Francisca, Esteban, José Manuel y a todas/os quienes participaron de una u otra forma con apañó, buena onda y disponibilidad en este proyecto.

Gracias a mi pareja, Francisco, siempre me acompañaste, siempre creíste en mí, siempre estuviste ahí, cuando había que tener más fuerza y amor.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	V
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
<u>1.1.- El cáncer de mama</u>	1
<i>1.1.1.- Estadísticas en cáncer de mama</i>	2
<i>1.1.2.- Diagnóstico histológico del cáncer de mama</i>	3
<i>1.1.3.- Clasificación del cáncer de mama según perfil molecular</i>	3
<i>1.1.4.- Cáncer de mama triple negativo (TNBC)</i>	4
<u>1.2.- Proteínas ADARs ("<i>Adenosine Deaminases Acting on RNA</i>")</u>	6
<i>1.2.1.- Integrantes de la familia de las ADARs y sus características</i>	7
<u>1.3.- Participación de ADAR1 en procesos moleculares</u>	10
<i>1.3.1.- Roles de ADAR1 dependientes de su actividad de edición</i>	10
<i>1.3.2.- Roles de ADAR1 independientes de su actividad de edición</i>	13
<u>1.4.- ADAR1 en cáncer</u>	14
<i>1.4.1.- Participación de ADAR1 en el cáncer de mama</i>	16
<u>1.5.- La vía de señalización Wnt canónica en cáncer de mama</u>	20
<u>1.6.- ADAR1 y su relación con la vía Wnt canónica</u>	23
<u>1.7.- Rol de las cadherinas en cáncer</u>	25
<u>1.8.- Angiogénesis y su relación con la vía Wnt canónica en cáncer de mama</u>	26

2. HIPÓTESIS.....	28
3. OBJETIVO GENERAL.....	28
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
<u>5.1.- Cultivo celular</u>	29
<u>5.2.- Estudio de sobreexpresión de ADAR1p110.....</u>	30
<u>5.3.- Estudio del silenciamiento de ADAR1</u>	31
<u>5.4.- Aislación de ARN</u>	32
<u>5.4.1.- Procedimiento de eliminación de ADN.....</u>	33
<u>5.5.- Síntesis de ADNc</u>	33
<u>5.6.- RT-qPCR.....</u>	34
<u>5.7.- Extracción de proteínas</u>	37
<u>5.8.- Cuantificación de proteínas</u>	38
<u>5.9.- Western blot.....</u>	38
<u>5.10.- Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta</u>	43
<u>5.11.- Ensayo reportero de luciferasa TOP/FOP</u>	44
<u>5.13.- Ensayo de cierre de herida</u>	45
<u>5.14.- Ensayo de Migración celular en cámara de Boyden</u>	45
<u>5.15.- Ensayo de Invasión celular en Matrigel</u>	46
<u>5.16.- Ensayo de exclusión por azul de tripán</u>	47
<u>5.17.- Animales.....</u>	48
<u>5.18.- Estudio de crecimiento de tumor <i>in vivo</i></u>	48

5.18.1.- Tratamiento de células para inoculación en animales	48
5.18.2.- Evaluación del comportamiento tumoral en el tiempo	49
5.18.3.- Evaluación de invasión celular en TSCs.....	49
<u>5.19.- Inmunohistoquímica</u>	50
5.19.1.- Análisis de las inmunotinciones	51
<u>5.20.- Análisis Estadísticos</u>	51
6. RESULTADOS	53
6. 1.- Objetivo específico 1. Estudiar <i>in vitro</i> la función de la isoforma p110 de ADAR1 como regulador positivo de β -catenina en células de cáncer de mama.....	53
6.1.1.- Niveles de ADAR1 en líneas celulares representativas de distintos subtipos de cáncer de mama y regulación lentiviral de su expresión	53
6.1.2.- Determinación del nivel basal de ADAR1p110 y de ADAR1p150 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10.....	57
6.1.3.- Caracterización de la sobreexpresión de ADAR1p110 en el modelo celular MDA-MB-231	59
6.1.4.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre componentes claves de la vía Wnt canónica.....	62
6.1.5.- Efecto del silenciamiento de ADAR1p110 sobre β -catenina en células MDA-MB-231	66
6.1.6.- La sobreexpresión de ADAR1p110 induce la activación de β -catenina en células MDA-MB-231	69
6.1.7.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre algunos blancos de la vía Wnt canónica.....	74

6.1.8.- Efecto del silenciamiento de ADAR1 sobre blancos de la vía Wnt canónica	76
6.2.- Objetivo específico 2. Evaluar el efecto in vitro de ADAR1p110 en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis en células de cáncer de mama triple negativo.	79
6.2.1.- Viabilidad en células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110	79
6.2.2.- Regulación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre el contenido proteico de Cadherina-11.....	81
6.2.3.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la migración celular.....	83
6.2.4.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la invasión celular	86
6.2.5.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la angiogénesis	88
6.3.- Objetivo específico 3. Estudiar el efecto in vivo de ADAR1p110 en la formación de tumores y metástasis en ratones inmunodeficientes.	92
6.3.1.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre el comportamiento tumoral in vivo en animales BALB/c NOD-SCID	92
6.3.2.- Estudio de invasión de células tumorales y lesión epitelial en tumores primarios ...	97
6.3.3.- Estudio de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre recurrencias tumorales in vivo en animales BALB/c NOD-SCID.....	97
6.3.4.- Evaluación ex vivo de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la metástasis pulmonar en animales BALB/c NOD-SCID	100
6.4.- Objetivo específico 4. Estudiar el efecto in vivo de ADAR1p110 (SE) sobre el proceso de neoangiogénesis en tumores subcutáneos.....	103
6.4.1.- Regulación de la expresión de Survivina por ADAR1p110 en tumores subcutáneos	103

6.4.2.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos en tumores primarios.....	108
7. DISCUSIÓN.....	110
8. CONCLUSIONES	118
9. BIBLIOGRAFÍA	120

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Anatomía de la mama.	2
Figura 2: Interacción de ADAR1 con dsRNAs. La enzima ADAR1 edita adeninas específicas presentes en secuencias que forman dúplex de ARNs inmaduros (pre-mRNAs).	7
Figura 3: Isoformas de ADAR1.	8
Figura 4: Edición de IRAlus por ADAR.	11
Figura 5: Vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina.	19
Figura 6: Los transcritos de β -catenina y de GSK-3 β son blancos de edición A por I en cáncer de mama.	21
Figura 7: Caracterización de la expresión de ADAR1 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.	24
Figura 8: Estructura de vectores lentivirales usados para transducir células de la línea celular MDA-MB-231.	31
Figura 9: Determinación del transcrito de ADAR1p110 y de ADAR1p150 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.	54
Figura 10: Caracterización de ADAR1p110 y ADAR1p150 en la línea celular MDA-MB-231.	56

Figura 11:	Determinación del nivel basal de la isoforma p150 y p110 de ADAR1 en diferentes líneas celulares de mama.	58
Figura 12:	Determinación de la sobreexpresión de ADAR1p110 en la línea celular MDA-MB-231.	60
Figura 13:	Localización celular de ADAR1 en células MDA - MB - 231.	61
Figura 14:	Aumento de ADAR1p110 induce cambios en el contenido proteico total de GSK-3 β y de AKT en la línea celular MDA-MB-231.	63
Figura 15:	Sobreexpresión de ADAR1p110 promueve la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la línea celular MDA-MB-231.	64
Figura 16:	Localización celular de β -catenina en células MDA - MB - 231.	65
Figura 17:	Evaluación del silenciamiento de ADAR1p110 en la línea celular MDA-MB-231.	67
Figura 18:	El <i>knockdown</i> de ADAR1 genera disminución en el nivel proteico de β -catenina en la línea celular MDA - MB - 231.	68
Figura 19:	Estandarización de ensayo reportero luciferasa TOP/FOP en células MDA-MB-231.	72

Figura 20:	Sobreexpresión de ADAR1p110 promueve la actividad co-transcripcional de β -catenina en células MDA-MB-231.	73
Figura 21:	Estudio de niveles basales de Survivina y de Snail en distintas líneas celulares de cáncer de mama.	75
Figura 22:	Incremento de ADAR1p110 induce la activación de vía de señalización Wnt/ β -catenina en la línea celular MDA-MB-231.	77
Figura 23:	El “ <i>knockdown</i> ” de ADAR1 en la línea celular MDA-MB-231 induce la disminución en el nivel proteico de algunos blancos de la Vía Wnt canónica.	78
Figura 24:	Células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110 no presentan cambios en la proliferación celular.	80
Figura 25:	Análisis de E-cadherina y de Cadherina-11 en cáncer de mama.	82
Figura 26:	Migración basal de células MDA-MB-231 y MCF-7.	84
Figura 27:	Evaluación de la sobreexpresan ADARp110 sobre la migración celular mediante ensayo de cierre de herida en células MDA-MB-231.	85
Figura 28:	Sobreexpresión de ADAR1p110 induce la migración celular en células MDA-MB-231.	87

Figura 29:	Aumento de ADAR1p110 induce la invasión de células MDA-MB-231.	89
Figura 30:	Sobreexpresión de ADAR1p110 induce el incremento del transcrito de MMP-9 en células MDA-MB-231.	90
Figura 31:	Evaluación de la expresión de VEGF-A frente a la modulación de la sobreexpresión de ADAR1p110 en células MDA-MB-231.	91
Figura 32:	Diseño experimental del ensayo de tumorigénesis <i>in vivo</i> .	93
Figura 33:	Sobreexpresión de ADAR1p110 en TSCs induce lesión epitelial <i>in vivo</i> .	94
Figura 34:	Células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110 muestran habilidad para formar tumores <i>in vivo</i> .	96
Figura 35:	Sobreexpresión de ADAR1p110 en TSCs induce lesión epitelial <i>in vivo</i> .	98
Figura 36:	Comportamiento <i>in vivo</i> de recurrencias formadas post-cirugía.	99
Figura 37:	Estudio de metástasis pulmonar en animales BALB/c NOD-SCID.	101
Figura 38:	Determinación de abundancia de ADAR1p110 en TSCs.	103

Figura 39:	Sobreexpresión de ADAR1p110 induce el aumento de Survivina en TSCs.	104
Figura 40:	Determinación de ADAR1p110, Survivina y CD-31 en lisados de TSCs.	105
Figura 41:	Sobreexpresión de ADAR1p110 induce neoangiogénesis en TSCs.	107
Figura 42:	ADAR1p110 activa la vía de señalización Wnt canónica que promueve la migración e invasión celular en células MDA-MB-231.	117

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1:	Lista de secuencia de partidores usados en RT-qPCR	35
Tabla 2:	Programas de RT-qPCR	36
Tabla 3:	Lista de anticuerpos primarios	41
Tabla 4:	Lista de anticuerpos secundarios	42

ABREVIATURAS

ADAR1	<i>“Adenosine Deaminases Acting on RNAI”</i>
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ANOVA	Análisis de varianza
BCA	Ácido bicinconínico
BL	<i>“Basal-like”</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CD-31	<i>“Cluster of Differentiation-31”</i>
CEs	Células endoteliales
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular Invasivo <i>In Situ</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
cPPT	<i>“central Polypurine Tract”</i>
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-cadherina	Cadherina epitelial
EGF	<i>“Epidermal Growth Factor”</i>
EMT	<i>“Epithelial–Mesenchymal Transition”</i>

FDA	<i>“US Food and Drug Administration”</i>
GFP	<i>“Green Fluorescent Protein”</i>
GSK-3 β	Glicógeno Sintetasa Kinasa-3 β
h	Hora (s)
H/E	Hematoxilina/Eosina
HER2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2
HIF-1 α	<i>“Hypoxia-inducible factor-1α”</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
INF	Interferón
IRAlus	<i>“Inverted-Repeat Alus”</i>
LiCl	Cloruro de Litio
LINES	<i>“Long interspersed nuclear elements”</i>
LRP5/6	<i>“Low-Density Lipoprotein-Related Proteins-5/6”</i>
LTR	<i>“Long Terminal Repeat”</i>
mA	Miliamperes
mL	Mililitro (s)
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
MOI	Multiplicidad de infección
nm	Nanómetro (s)
N ₂	Nitrógeno

NaCl	Cloruro de Sodio
NES	<i>“Nuclear Localization Signal”</i>
NLS	<i>“Nuclear Export Signal”</i>
ng	Nanogramo (s)
PAGE	<i>“Polyacrylamide gel electrophoresis”</i>
PBS	Tampón Fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PECAM-1	<i>“Platelet endothelial cell adhesion molecule-1”</i>
PARP	<i>“Poly (ADP-ribose) polymerase”</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Receptor de Estrógeno
RIPA	Ensayo de Radioinmunoprecipitación
RP	Receptor de Progesterona
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RRE	<i>“Rev Response Element”</i>
Rsv	<i>“Rous sarcoma virus”</i>
RT	<i>“Reverse transcriptase”</i>
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Sobreexpresión
SFC	Suero de caballo
SINEs	<i>“Short Interspersed Nuclear Elements”</i>
suCMV	<i>“super Cytomegalovirus”</i>

TAE	Tampón Tris, ácido acético
TBS	<i>“Tris-buffered saline”</i>
TCF/LEF	<i>“T-cell factor/lymphoid enhancer factor”</i>
TNBC	<i>“Breast Cancer Triple Negative”</i>
TSC	Tumor subcutáneo (s)
µg	Microgramo (s)
µL	Microlitro (s)
UTR	<i>“Untranslated region”</i>
V	Volts
VEGF	<i>“Vascular Endothelial Growth Factor”</i>
WB	<i>“Western blot”</i>
Wnt	<i>“Wingless”</i>
WPRES	<i>“Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element”</i>
WT	<i>“Wild type”</i>

RESUMEN

Introducción: El cáncer más diagnosticado en mujeres en el mundo y en nuestro país es el cáncer de mama, siendo la primera causa de muerte en mujeres chilenas. Entre los distintos subtipos existentes de cáncer de mama, se encuentra el subtipo triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés: “*Triple-negative breast cancer*”) que es considerado el más agresivo dada su capacidad invasiva y de propagación hacia otras partes del cuerpo. TNBC, es un cáncer heterogéneo que en la actualidad es tratado primordialmente con quimioterapia en sus distintos estadios. Sin embargo, si bien la quimioterapia es la opción principal, algunos tumores de TNBC generan resistencia a ella. Lo anterior, impulsa a determinar nuevos objetivos terapéuticos para diseñar nuevas estrategias de tratamientos, ya sean dirigidas a blancos específicos o que puedan complementar las terapias existentes. Al respecto, se ha reportado que tumores de pacientes TNBC con mal pronóstico presentan un alto nivel de “*Adenosine Deaminases Acting on RNA1*” (ADAR1). Adicionalmente, células MDA-MB-231 donde se ha silenciado ADAR1 pierden su capacidad de generar tumores *in vivo*; y en cáncer de mama lobular positivo al receptor α -estrógeno el gen de ADAR1 es uno de los genes mayormente expresados. Estudios preliminares en nuestro laboratorio usando la línea celular MDA-MB-231 evidencian un mayor nivel proteico de la isoforma corta p110 de ADAR1, en relación a su isoforma larga p150. Por otro lado, la disfunción de las moléculas involucradas en la vía de señalización Wnt canónica también desempeñan un papel importante en la progresión del cáncer de mama, siendo β -catenina un componente clave de estudio en cáncer. Por lo anteriormente expuesto, la hipótesis propuesta en este trabajo investigativo fue: “La isoforma p110 de ADAR1 promueve la activación de la vía Wnt canónica en cáncer de mama

triple negativo y como consecuencia un aumento de la progresión maligna tanto *in vitro* como *in vivo*". Teniendo como objetivo general: Estudiar el mecanismo por el cual la isoforma p110 de ADAR1 promueve la malignidad *in vitro* en células de cáncer de mama triple negativo e *in vivo* en ratones inmunodeficientes. Los objetivos específicos planteados para abordar este estudio fueron los siguientes: 1. Estudiar *in vitro* la función de la isoforma p110 de ADAR1 como regulador positivo de β -catenina en células de cáncer de mama; 2. Evaluar el efecto *in vitro* de ADAR1p110 en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis en células de cáncer de mama triple negativo; 3. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 en la formación de tumores y metástasis en ratones inmunodeficientes; y 4. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 (SE) sobre el proceso de neoangiogénesis en tumores subcutáneos.

Metodología: Para responder la hipótesis propuesta se generaron lentiviralmente células MDA-MB-231 donde se sobreexpresó o silenció ADAR1, junto con sus respectivas células control (Mock y shControl). Se caracterizó la sobreexpresión (SE) y el silenciamiento de ADAR1, mediante *Western blot* y RT-qPCR, para evaluar su abundancia proteica y el nivel de transcrito, respectivamente. A continuación, la abundancia de diferentes proteínas relacionadas con la vía Wnt/ β -catenina y la actividad de la β -catenina nuclear se analizaron mediante *Western blot* y ensayo indicador de luciferasa TOP/FOP, respectivamente. La migración e invasión celular se analizaron mediante ensayos funcionales de migración en cámara de Boyden y ensayos de invasión en matrigel, respectivamente. A continuación, en ratones BALB/c NOD-SCID inmunodeficientes, estudiamos el comportamiento de tumores generados a partir de células ADAR1p110 (SE) y se analizó la inmunotinción de vascularización tumoral.

Resultados: La sobreexpresión de ADAR1p110 disminuyó GSK-3 β , al tiempo que aumentó los niveles proteicos totales de AKT, β -catenina y la forma no fosforilada de β -catenina. La sobreexpresión de ADAR1p110 también aumentó la actividad co-transcripcional de β -catenina, junto con el consecuente incremento de sus blancos Ciclina-D1, c-Myc y Survivina. Mientras, la reducción de ADAR1 tuvo el efecto contrario. Adicionalmente, las células MDA-MB-231 ADAR1 (SE) mostraron una aumentada capacidad de migración e invasión celular. Por su parte, en el estudio de comportamiento tumoral *in vivo* se observó que tejidos de tumores subcutáneos derivados de células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) teñidos con Hematosilina/Eosina, evidenciaron aumentada invasión hacia el epitelio, mientras que algunos ratones presentaron lesiones en la piel. Adicionalmente, análisis de inmunotinción evidenciaron que estos tumores contenían niveles aumentados de Survivina y CD-31, esta última siendo un reconocido marcador de células de endotelio vascular y por ende de angiogénesis.

Conclusiones: En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que ADAR1p110 altera la expresión de algunos componentes claves de la vía Wnt canónica, favoreciendo la invasión y la neovascularización, posiblemente a través de la activación de la vía de señalización Wnt canónica, lo que podría sugerir un papel desconocido de ADAR1p110 en la agresividad del cáncer de mama triple negativo.

ABSTRACT

Introduction: The most diagnosed cancer in women in the world and in our country is breast cancer, being the leading cause of death in Chilean women. Among the different existing subtypes of breast cancer, there is the triple negative subtype (TNBC), which is considered the most aggressive given its inability to spread and spread to other parts of the body. TNBC is a heterogeneous cancer that is currently treated primarily with chemotherapy in its different stages. However, while chemotherapy is the main option, some TNBC tumors develop resistance to it. The foregoing encourages the determination of new therapeutic objectives to design new treatment strategies, either directed at specific targets or that can be complemented with existing therapies. In this regard, it has been reported that tumors from TNBC patients with a poor prognosis present a high level of "Adenosine Deaminases Acting on RNA1" (ADAR1). Furthermore, MDA-MB-231 cells where ADAR1 has been silenced lose their ability to generate tumors *in vivo*; and in α -estrogen receptor positive lobular breast cancer, the ADAR1 gene is one of the most widely expressed genes. Preliminary studies in our laboratory using the MDA-MB-231 cell line show a higher protein level of the short p110 isoform of ADAR1, in relation to its long p150 isoform. On the other hand, the dysfunction of the molecules involved in the canonical Wnt signaling pathway also play an important role in the progression of breast cancer, with β -catenin being a key component of study in cancer. We propose the following hypothesis: "The p110 isoform of ADAR1 promotes the activation of the canonical Wnt pathway in triple negative breast cancer and as a consequence an increase in malignant progression both *in vitro* and *in vivo*" with the general aim "to study the mechanism by which the p110 isoform of ADAR1 promotes malignancy *in vitro* in triple

negative breast cancer cells and *in vivo* in immunodeficient mice”. The specific objectives set to tackle this study were the following: 1. To study *in vitro* the function of the ADAR1 p110 isoform as a positive regulator of β -catenin in breast cancer cells; 2. To evaluate the *in vitro* effect of ADAR1p110 on proliferation, migration, invasion and angiogenesis in triple negative breast cancer cells; 3. Study the *in vivo* effect of ADAR1p110 on tumor formation and metastasis in immunodeficient mice; 4. Study the *in vivo* effect of ADAR1p110 (OE) on the neoangiogenesis process in subcutaneous tumors.

Methodology: To answer the proposed hypothesis, we lentivirally generated a TNBC cell line that overexpress ADAR1p110, an ADAR knockdown cell and mock controls. The overexpression and silencing of ADAR1 was characterized by Western blot and RT-qPCR, to evaluate its protein abundance and the level of transcript, respectively. Next, the abundance of different proteins related to the Wnt/ β -catenin pathway and the nuclear β -catenin activity were analyzed by Western blot and TOP/FOP luciferase reporter assay, respectively. Cell migration and invasion were analyzed by Boyden chamber migration functional assays and matrigel invasion assays, respectively. Next, in immunodeficient BALB/c NOD-SCID mice, we studied the behavior of tumors generated from ADAR1p110 (OE) cells and immunostaining for tumor vascularization was analyzed.

Results: The overexpression of ADAR1p110 decreased GSK-3 β , while increasing the total protein levels of AKT, β -catenin and the non-phosphorylated form of β -catenin. The overexpression of ADAR1p110 also increased the co-transcriptional activity of β -catenin, along with the consequent increase in its targets Cyclin-D1, c-Myc and Survivin. Meanwhile, the reduction of ADAR1 had the opposite effect. Additionally, MDA-MB-231 ADAR1 (OE) cells showed an increased capacity for cell migration and invasion. For its part, in the study of

tumor behavior in vivo it was observed that subcutaneous tumor tissues derived from MDA-MB-231 ADAR1p110 (OE) cells stained with Hematoxylin/Eosin showed increased invasion into the epithelium, while some mice presented lesions on the skin. Additionally, immunostaining analysis showed that these tumors contained increased levels of Survivin and CD-31, the latter being a recognized marker of vascular endothelial cells and therefore of angiogenesis.

Conclusions: Taken together, our results suggested that ADAR1p110 alters the expression of some key components of the canonical Wnt pathway, favoring invasion and neovascularization, possibly through activation of the canonical Wnt signaling pathway, which could suggest an unknown role. of ADAR1p110 in the aggressiveness of triple negative breast cancer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- El cáncer de mama

El cáncer de mama se origina cuando las células que conforman la glándula mamaria comienzan a crecer desmedidamente, adquiriendo la capacidad de formar un tumor que podrá ser palpado como un bulto o visualizado mediante radiografías (1). Es un tipo de cáncer que se presenta mayoritariamente en mujeres que en hombres (2). En mujeres la glándula mamaria está formada por lóbulos y conductos, donde las ramificaciones sucesivas de los conductos principales dan lugar a glándulas túbulo-alveolares organizadas en lóbulos (3) (**Figura 1**). Los conductos y los lóbulos están revestidos por dos tipos celulares, uno corresponde a las células luminales que van a recubrir el conducto terminal y los lobulillos que se encargan de la producción de leche. El otro tipo corresponde a las células epiteliales contráctiles (células mioepiteliales) que permiten la eyección de la leche (2). Es así como el cáncer de mama puede comenzar en diferentes regiones de la mama (1). Las células tumorales de mama son malignas cuando crecen y se dividen sin control, pudiendo algunos tumores permanecer localizados o encapsulados; un ejemplo de ello es el carcinoma *in situ* de mama (4, 5). Sin embargo, las células tumorales malignas pueden adquirir la capacidad de invadir regiones circundantes o diseminarse hacia otras áreas del cuerpo desarrollando finalmente metástasis (1, 4, 5). Por lo tanto, la presencia de células invasoras en una muestra de tejido normal evidencia el diagnóstico de un tumor maligno (4, 5).

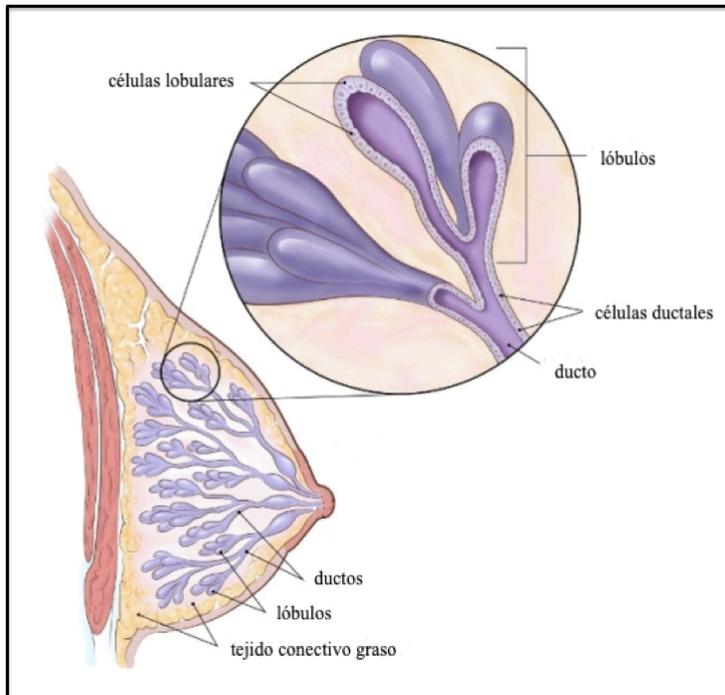


Figura 1: Anatomía de la mama. La ilustración muestra la ubicación de los ductos o conductos, lóbulos y tejido conectivo graso. En la ampliación se muestra la estructura de los lóbulos y ductos, conformados por células lobulares y ductales, respectivamente. Imagen adaptada desde *American Cancer Society* (1).

1.1.1.- Estadísticas en cáncer de mama

En mujer el cáncer de mama es el más diagnosticado en el mundo. En el año 2020, de 19,3 millones de nuevos casos y ~ 10 millones de muertes registrados en 185 países, este cáncer muestra una incidencia del 11,7% (~2.3 millones) y es responsable de 684.996 muertes, lo cual lo posiciona como la principal causa de muerte en el mundo (6). En Chile su situación ha experimentado cambios en las últimas décadas. En el año 1990 la primera causa de muerte por cáncer en mujeres era el cáncer de vesícula, luego el de estómago y en tercer lugar el de mama, pero en el año 2010 esta situación cambia, pasando el cáncer de mama a ocupar el primer lugar (7). En la actualidad, en mujeres de todas las edades los nuevos casos de cáncer de mama corresponden a un 20,9% (5.331 casos) de un total de 25.448 casos, y posee la mayor tasa de incidencia con un 37.4 en 100.000 mujeres (6).

1.1.2.- Diagnóstico histológico del cáncer de mama

El cáncer de mama puede ser diagnosticado siguiendo un criterio histopatológico, siendo más común el carcinoma ductal invasivo (CDI) que comienza en el revestimiento de los conductos que llevan la leche desde los lóbulos de la mama hacia el pezón (1, 2). Este tipo de cáncer afecta entre el 50% al 70% de los pacientes (8). Otro tipo de cáncer es el carcinoma lobular invasivo *in situ* (CLIS) que comienza en los lobulillos de la mama y que puede progresar a carcinoma lobular invasivo (CLI) que comprende entre el 5% al 15% de los pacientes (1, 2, 8).

1.1.3.- Clasificación del cáncer de mama según perfil molecular

Las alteraciones en el genoma son sin duda una de las causas más relevantes del cáncer de mama. El desarrollo del cáncer ocurre en muchos casos en respuesta a la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que podrían acompañar o ser requeridas para transiciones morfológicas durante el desarrollo y progresión del cáncer (9). Estudios moleculares basados en perfiles de expresión del transcriptoma en cáncer de mama invasivo han identificado distintos subtipos de tumor. El tumor subtipo Luminal A es positivo al receptor de estrógenos (RE⁺) y al receptor de progesterona (RP⁺), siendo el subtipo más común con una frecuencia de 28% al 31%. El subtipo Luminal B es RE⁺, RP⁺ y se caracteriza por la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*HER2/ERBB2*), presentándose en alrededor del 20% de los pacientes. Ambos subtipos Luminal A y B están asociados a un buen pronóstico y sobrevida. El subtipo positivo al HER2 (HER2⁺) presenta sobreexpresión del oncogén HER2, tiene una frecuencia del 12% al 21%, y pobres resultados clínicos (10, 11). Otro subtipo es el cáncer de mama tipo-basal (*Basal-like*,

BL) caracterizado por ausencia o bajo nivel del RE, carece de sobreexpresión de HER2 y presenta un perfil de expresión génica similar al de las células normales de mama basal o mioepiteliales. El pronóstico del cáncer BL es generalmente adverso después de los primeros 5 años de haber sido diagnosticado (12, 13). La mayoría de los tumores BL no muestran expresión de RE, RP y HER2, recibiendo el nombre de cáncer de mama triple negativos (*Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) (11). Aunque los términos de cáncer BL y TNBC han sido utilizados como sinónimos, se ha demostrado mediante estudios de microarreglos e inmunohistoquímicos (IHQs) que corresponden a dos tipos distintos de cáncer (13), dado que presentan una discordancia de un 25% (14). Ambos subtipos de cáncer representan alrededor del 15% de todos los cáncer de mama invasivos (13).

1.1.4.- Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

El subtipo de cáncer de mama triple negativo (RE⁻, RP⁻ y HER2⁻) es diagnosticado mediante análisis inmunohistoquímicos de biopsias tumorales (15). Los tumores TNBC son altamente heterogéneos, compuestos mayoritariamente por tumores BL entre un 70% al 80%, y por tumores no-BL (Luminal A y B, HER2⁺) entre un 20% al 30% (14). El TNBC representa aproximadamente el 12% de todos los cáncer de mama (16), siendo reconocido por presentar mal pronóstico y baja sobrevida después de la recurrencia (17). Su comportamiento es agresivo (18) debido a la alta incidencia de infiltración, invasión y metástasis hacia órganos secundarios que se genera principalmente en pulmón, hueso y cerebro (19). Incluso se ha reportado el compromiso de la piel en TNBC metastásico avanzado, llegándose a la formación de úlceras (20). Debido a su heterogeneidad y complejidad, los actores que regulan estos procesos en TNBC son aún poco conocidos (21).

En lo concerniente a los tratamientos actuales, dado que TNBC es RE⁻ y RP⁻, no es posible utilizar terapia hormonal (hormonoterapia) como tampoco es factible usar anticuerpos monoclonales anti-HER2 (por ejemplo, Trastuzumab). En consecuencia, durante las últimas décadas tanto en estadios tempranos como tardíos de esta enfermedad, los pacientes han sido principalmente tratados con quimioterapia, usando comúnmente Doxorubicina y Taxanos (13, 19).

En nuestro país un estudio reciente llevado a cabo con información rescatada desde seis centros públicos de salud de la Región Metropolitana, reveló que la frecuencia de casos con TNBC es de 10,5% (67 de 637 casos) y que estos datos se asocian a una disminución en la sobrevida global de los pacientes en 5 años, respecto a los casos no-triple negativos, observada entre los años 2000 y 2010 (22). En la actualidad, un estudio publicado el año 2020 por César Sánchez y colaboradores, analizó registros médicos de 2.723 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, evidenciando que un 11% de las pacientes presentan cáncer de mama del subtipo triple negativo (23). Los autores estiman que alrededor de “600 mujeres serán diagnosticadas con TNBC anualmente” en nuestro país (24).

En los últimos años ha habido destacados avances para el tratamiento de TNBC enfocados a dos áreas de estudio: inhibidores de “*Poly (ADP-ribose) polymerase*” (PARP) e inhibidores de punto de control inmunitario (25). En el año 2018 la “*US Food and Drug Administration*” (FDA) aprobó el inhibidor de PARP Talazoparib, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2⁻ y con mutaciones en las proteínas “*Breast Cancer 1 y 2*” (BRCA 1/2) de la línea germinal (26). A la fecha, se encuentran en estudios clínicos activos para estudiar el efecto de la droga Talazoparib en TNBC (27). En relación a la inmunoterapia, la FDA aprobó el tratamiento de Atezolizumab en combinación con nab-paclitaxel, para

pacientes de TNBC metastásicos que expresen el Ligando 1 de muerte programada (PD-L1) (25). Sin embargo, pese a los nuevos avances las pacientes de TNBC metastásicos presentan mal pronóstico (25), siendo un desafío el estudio de este cáncer. Las investigaciones continúan en busca de potenciales blancos terapéuticos o vías de señalización celular que participen en la elevada agresividad de este cáncer. Por tal razón, este estudio se ha centrado en el cáncer de mama triple negativo, dirigiendo su atención en el rol que puede desempeñar la isoforma p110 de ADAR1.

1.2.- Proteínas ADARs (“Adenosine Deaminases Acting on RNA”)

En las células eucariontes los transcritos de ARN pueden ser modificados mediante diversos procesamientos post-transcripcionales, entre los que se incluyen el “*splicing*” alternativo y la edición de ARNs (28). Estas modificaciones resultan en un aumento de la diversidad transcriptómica y, eventualmente, de la proteómica de los organismos.

La edición de un simple nucleótido es un proceso enzimático donde selectivamente se convierte un nucleótido en otro alterando la secuencia nucleotídica de un transcrito de ARN (29, 30). Este proceso se realiza a través de la desaminación hidrolítica de adenosina (A) para obtener como producto inosina (I) catalizado por las proteínas ADARs (28-30). Las ADARs son enzimas que tienen como sustrato ARN de doble hebra (dsRNAs, en inglés “*double-stranded RNAs*”) presentes tanto en ARNs codificantes como no codificantes. Estudios filogenéticos han revelado que sus genes se encuentran en mamíferos y en otras especies de eucariotas multicelulares como las anémonas, calamares y esponjas; mientras que están ausentes en protozoos, levaduras y plantas (31, 32).

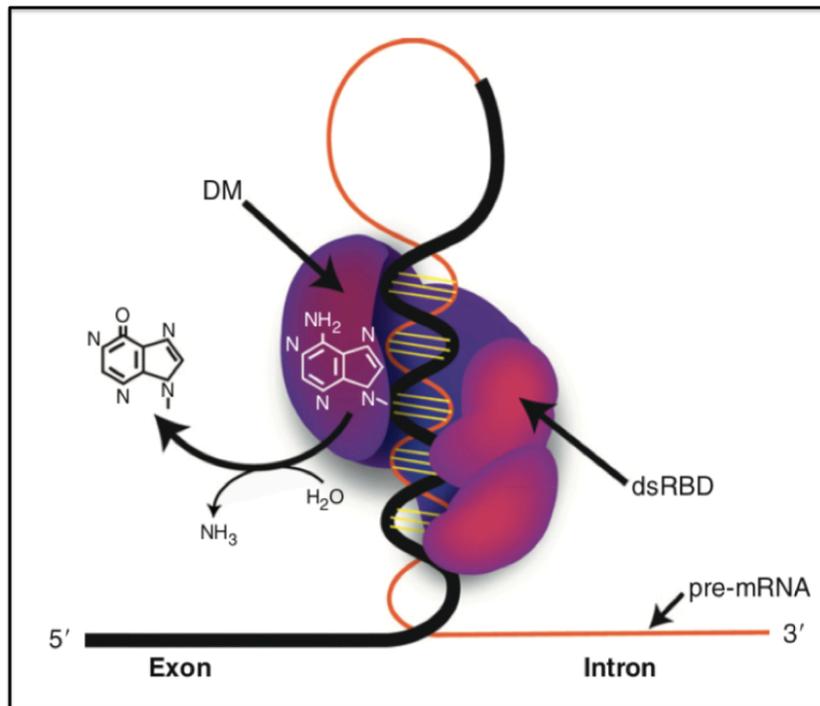


Figura 2: Interacción de ADAR1 con dsRNAs. La enzima ADAR1 edita adeninas específicas presentes en secuencias que forman dúplex de ARNs inmaduros (pre-mRNAs). La ADAR1 posee un dominio de desaminación (DM) donde cataliza la reacción hidrolítica de desaminación de A para producir I. Imagen adaptada desde Hogg., et al 2011 (33).

1.2.1.- Integrantes de la familia de las ADARs y sus características

La familia de las ADARs está constituida por tres miembros: ADAR1 (también conocida como ADAR), ADAR2 (ADARB1) y ADAR3 (ADARB2). Las tres proteínas son expresadas en humanos y están formadas por dominios de unión a dsRNAs, junto con un dominio catalítico de desaminación. En particular, ADAR1 es la única integrante de la familia que posee sitios de unión a ADN del tipo Z (28, 34), junto con dos isoformas formadas mediante el proceso de “*splicing*” alternativo (35). Una de sus variantes llamada p110 es corta y es expresada de manera constitutiva, mientras la segunda isoforma denominada p150 es larga y su expresión es inducible por interferón (35, 36) (**Figura 3**).

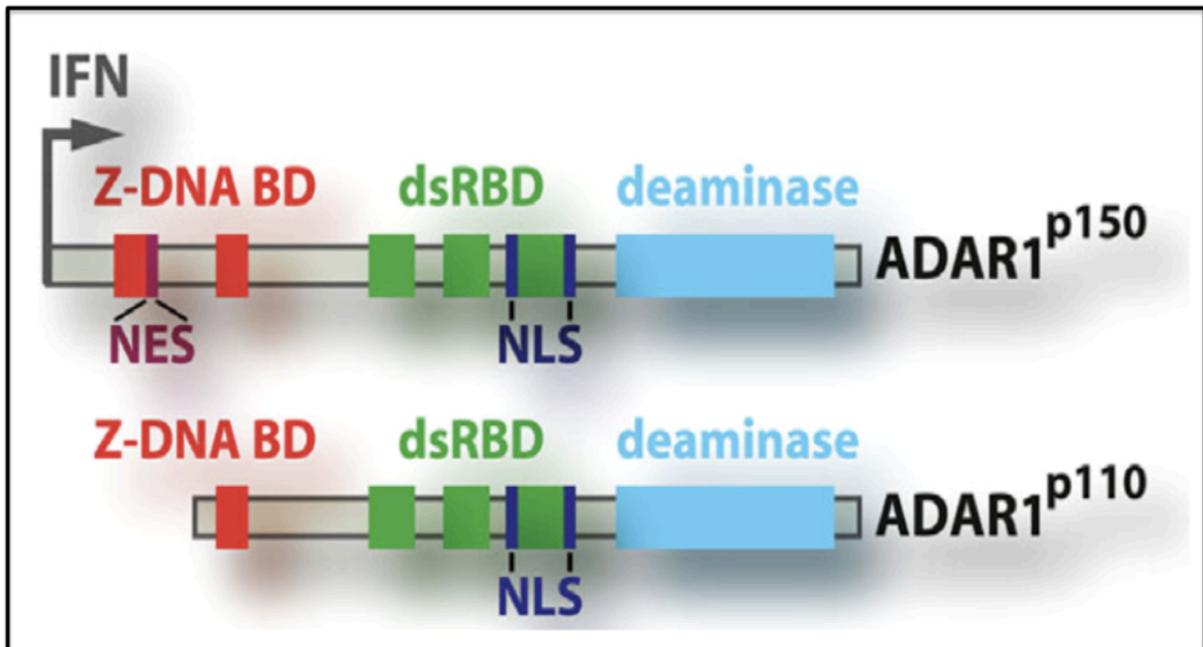


Figura 3: Isoformas de ADAR1: La isoforma larga ADAR1p150 es inducida por interferón (IFN, arriba), en cambio, la isoforma corta ADAR1p110 es expresada constitutivamente (de abajo). Ambas isoformas poseen un dominio catalítico de desaminación (“*deaminase*”, en celeste) y tres dominios de unión a dsRNAs (*dsRBD*, en verde), mientras la ADAR1p150 consta de dos dominios de unión a ADN del tipo Z y ADAR1p110 solo uno (*Z-DNA BD*, en rojo). La ADAR1 posee una secuencia bi-modular de localización nuclear (NLS, en azul), mientras específicamente, la ADAR1p150 presenta una señal de exporte nuclear (NES, en morado). Imagen obtenida desde Licht., et al 2017 (37).

En mamíferos se ha corroborado que las proteínas ADAR1 y ADAR2 son enzimas catalíticamente activas presentes en diversos tejidos (28), capaces de editar selectivamente secuencias codificantes como las de los pre-mRNAs del receptor de serotonina del subtipo B (5-HT_{2C}) (38). En cambio, se ha descrito que ADAR3 se expresa exclusivamente en tejido cerebral, específicamente en las regiones de la amígdala y del tálamo, encontrándose en estudios *in vitro* que no posee la actividad catalítica de edición de A por I (39). En lo que respecta a sus mecanismos de acción, las enzimas ADAR1 y ADAR2 deben homodimerizar para actuar como desaminasas, en cambio, ADAR3 permanece como un monómero inactivo enzimáticamente (40).

Varias investigaciones que se han dirigido a estudiar la localización intracelular de ADAR1. Entre ellas se reporta que ambas isoformas de ADAR1 poseen una señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS) que les permite ingresar al núcleo desde el citoplasma (41-44). En particular, ADAR1p150 además posee una señal de exporte nuclear (*Nuclear Export Signal*, NES) que le permite salir hacia al citoplasma desde el núcleo (45). Por otro lado, aunque ADAR1p110 carece de una región de NES (46) (**Figura 2**), también puede ser exportada desde el núcleo hacia el citoplasma gracias a que interactúa con la proteína de transporte celular exportina-5 (42). De este modo, ADAR1p150 y ADAR1p110 pueden movilizarse entre ambos compartimentos subcelulares (42, 46).

Es importante destacar que en los mamíferos el principal mecanismo de edición del ARN es realizado por las enzimas ADARs (33), por esta razón no es de extrañar que tanto ADAR1 como ADAR2 sean esenciales para la vida. Estudios *in vivo* efectuados en ratones evidencian que la delección homocigota de ADAR1 (ADAR1^{-/-}) resulta en letalidad embriogénica (47-49) con incrementada apoptosis en hepatocitos y células hematopoyéticas además de una deficiente hematopoyesis, demostrando que ADAR1 es necesaria para la supervivencia y la mantención de diversos tejidos embrionarios (47, 50). Del mismo modo, la ausencia de ADAR2 *in vivo* desencadena la muerte temprana en estadio postnatal, aunque en este caso los ratones fueron propensos a convulsionar (51), lo cual podría estar estrechamente relacionado a que el transcrito de ADAR2 se expresa mayoritariamente en el cerebro, sugiriendo que es la principal enzima editora en este tejido (52).

1.3.- Participación de ADAR1 en procesos moleculares

1.3.1.- Roles de ADAR1 dependientes de su actividad de edición

La modificación post-transcripcional de edición de A por I realizado por las ADARs puede conducir a importantes cambios en la expresión génica ya que I es reconocida como guanosina (G) (53), tanto por la maquinaria de “*splicing*” celular (54) como por los ribosomas durante el proceso de traducción (55).

A la fecha varias investigaciones han concordado que los principales blancos de edición de las ADARs corresponden a las secuencias Alu, que son elementos cortos intercalados (SINEs) de alrededor de 300 pb, insertadas en secuencias no codificantes como intrones, regiones 3' no traducidas (3'UTRs) y en elementos largos intercalados (LINEs) (29, 56-59). Los elementos Alu son secuencias repetitivas que pueden encontrarse dentro de un mismo transcrito orientados invertidamente (“*Inverted-Repeat Alus*”, IRAlus), lo cual les permite que puedan interactuar entre sí formando una estructura secundaria de dsRNA (55) (**Figura 4**). Interesantemente, un estudio focalizado en analizar ediciones en el ARN muestra que cerca del 1,4% de los ARNm son editados (1.445 transcritos de un total que supera los 100.000 ARNm), mientras que más del 85% de los pre-mRNAs son editados en sus secuencias intrónicas (57). Adicionalmente, el 95% de las ediciones A por I ocurre de manera co-transcripcional en ARNs nacientes (60).

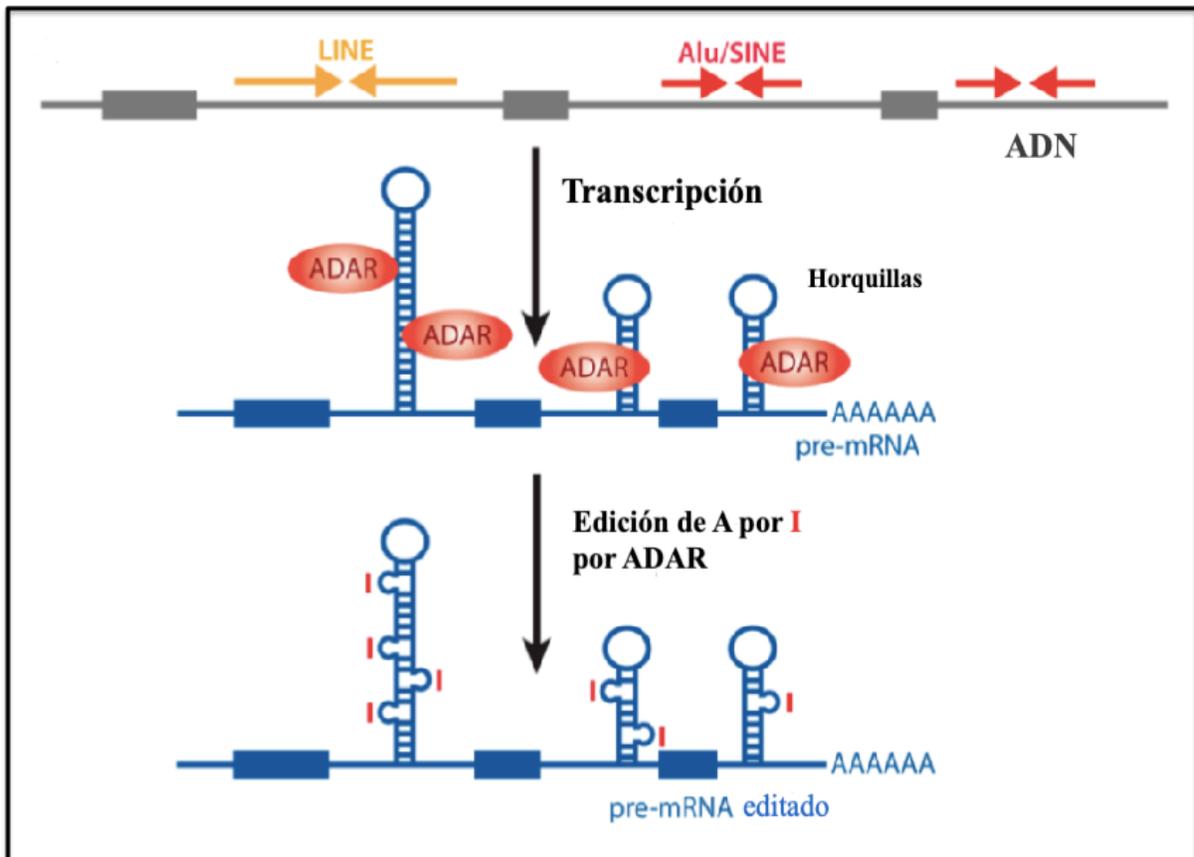


Figura 4: Edición de IRAlus por ADAR1. Se muestra una región de ADN (en gris) que contiene secuencias LINEs (en amarillo) y elementos Alu/SINEs (en rojo) orientados en oposición. Estos elementos repetitivos luego del proceso de transcripción forman estructuras complementarias u horquillas que serán reconocidas por ADAR1. Esta enzima de edición del ARN tiene como sustrato adenosinas (A) en los transcritos (en azul) que son sustituidas por inosinas (I, en rojo), alterando la secuencia de pre-mRNAs. Imagen adaptada desde Nishikura., et al 2010 (28).

Cuando la edición del ARN ocurre en una secuencia no codificante puede causar una activación o inactivación de un sitio de “*splicing*” (28, 54). Por ejemplo, la edición de secuencias Alu presentes en el transcrito del gen “*Nuclear Prelamin A Recognition Factor*” (*NARF*) crea un sitio aceptor de *splicing* 3’ funcional (61). Particularmente, la proteína ADAR2 genera un sitio aceptor de *splicing* 3’ funcional editando su propio pre-mRNA, auto-regulando su “*splicing*” alternativo y de este modo su expresión génica (54). Es por ello que

se han realizado análisis de secuenciación del ARN (RNA-seq) y de microarreglos específicos para exones con el objetivo de estudiar el rol de la edición del ARN en el “*splicing*”, sugiriendo que ADAR1 participa a escala global en la regulación del “*splicing*” alternativo, principalmente editando elementos regulatorios del “*splicing*” (62). Adicionalmente, se ha encontrado que la edición realizada por ADAR1 también afecta el proceso de “*splicing*” impactando en la omisión de exones (“*exon skipping*”) (60).

Las ADARs también participan en la regulación de la biosíntesis de micro-ARNs (miRNAs), proceso que requiere la participación de dos componentes claves pertenecientes a la familia de las RNAsas III: Drosha y DICER (63). En este contexto, se ha reportado que ADARs editan precursores de miRNAs (pri-miRNAs) como es el caso del pri-miR-142, en donde la sustitución de bases inhibe el procesamiento de este miR en el núcleo por Drosha (64). De igual modo, la edición del pri-miR-151 impide que pueda ser procesado en el citoplasma por DICER (65).

Por otro lado, cuando la reacción de desaminación ocurre en una región codificante del mensajero, el reconocimiento de I por G podría llevar a cambios de codón que se traducirían en cambios aminoacídicos (34). Respecto a ello, en estudios *in vitro* se ha encontrado que la sustitución de una base en la secuencia del transcrito de “*Glioma associated oncogene 1*” (GLI1) resulta en un cambio aminoacídico de arginina por glicina en la posición 701 ubicada en medio del dominio C-terminal de esta proteína, con el consecuente aumento de su actividad transcripcional (66).

La ADAR1 también participa en la modulación del sistema inmune. ADAR1 se relaciona con el sistema inmune no solo porque ADAR1p150 es inducible por interferón, sino también porque ADAR1 edita dsRNAs “marcándolos” como endógenos (67). De esta forma,

la edición A por I es capaz de imposibilitar el reconocimiento de los dsRNAs por el sensor citosólico de dsRNAs “*Melanoma Differentiation Associated gene 5*” (MDA5), proteína que induce interferones (IFNs) luego de reconocer dsRNAs. Así, ADAR1 previene una respuesta inmune innata aberrante mediante la distinción de los dsRNAs foráneos de los propios (49, 55, 67).

Finalmente, otro efecto de las ADARs es que la conversión de A por I produce modificación de la estabilidad de los dsRNAs, generando posibles cambios en su estructura secundaria que conllevarían a un aumento o disminución de su estabilidad (28, 34, 59).

1.3.2.- Roles de ADAR1 independientes de su actividad de edición

En general, varios estudios se han dirigido a estudiar los efectos de la edición sobre el ARN, sin embargo, existen distintas funciones de las ADARs que son independientes de su actividad de edición (37). Una de ellas se relaciona nuevamente con el procesamiento de miRNAs, en donde ADAR1 interactúa con DICER induciendo su velocidad de corte o procesamiento en pre-miRNAs para obtener miRNAs maduros. De este modo, la ADAR1 mediante una interacción proteína-proteína induce la generación de miRNAs aumentando la actividad catalítica de DICER (48).

Otra función de ADAR1 independiente de su actividad de edición, se asocia al metabolismo celular del ARN. Un estudio revela que células estresadas mediante la exposición a radiación ultravioleta (UV) induce el transporte nuclear de ADAR1p110 hacia el citoplasma, debido a que el estrés celular aumentaría su interacción con exportina-5 en el núcleo, a través de la inducción de su forma fosforilada (68). En el citoplasma ADAR1p110 se

une a IRAlus insertos en transcritos que codifican a proteínas anti-apoptóticas, participando en la evasión de la muerte celular (55, 68).

En conjunto, los antecedentes descritos muestran que las ADARs participan en diversos procesos celulares, distintas vías de señalización y poseen diversos blancos moleculares. Es por esta razón, que su participación se ha investigado en distintas enfermedades, mientras que varios estudios vinculan directamente la acción de ADAR1 en diversos tipos de cáncer (69).

1.4.- ADAR1 en cáncer

Hace más de una década se comenzó a estudiar el rol de ADAR1 en la carcinogénesis, destacándose en diversos estudios como un factor relevante en el mecanismo post-transcripcional de edición A por I en estas células (69-72). En este sentido, el equipo de Levanon y colaboradores analizó un total de 712 secuenciaciones del ARN, recolectados desde la base de datos pública “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA). Los RNA-seq se realizaron con muestras provenientes de 356 pacientes abarcando un total de nueve tipos de cáncer distintos. De esta forma, los investigadores analizaron los datos para conocer el perfil de edición en elementos repetitivos Alu, tanto en muestras de tumor como en tejido normal (extraído del tejido colindante al tumor). Los resultados revelaron un aumento del índice de edición en cáncer de vejiga, mama, colon, pulmón y tiroides, comparado a sus respectivos tejidos normales (71). Junto a ello, encontraron que los altos niveles de edición se asociaban a altos niveles de ADAR1 y bajos niveles de ADAR2, proponiendo a la enzima ADAR1 como el principal editor en estos tipos de cáncer y posicionando, a su vez, la edición A por I en

elementos repetitivos Alu, como uno de los mayores contribuyentes a la diversidad transcriptómica en el cáncer (71).

Por otro lado, se han descrito niveles aumentados de esta enzima tanto en el carcinoma celular esofageal escamoso (ESCC), como en el carcinoma hepatocelular (HCC). En el ESCC se ha propuesto que ADAR1 funciona como un oncogén durante la progresión de la enfermedad, debido a que su sobreexpresión promueve la velocidad de crecimiento celular y el crecimiento independiente de anclaje. En cambio, silenciando ADAR1 se obtiene una disminución en la velocidad de crecimiento celular, migración e invasión (73).

Por su parte, estudios en HCC sugieren a ADAR1p110 como el responsable de la elevada edición (hiper-edición) del transcrito del inhibidor 1 de la antienzima (AZIN1), que guía a la sustitución de serina por glicina. Esta sustitución induce un cambio conformacional en la estructura de AZIN1, volviéndola más estable e induciendo su translocación hacia el núcleo, que conlleva a la disminución de la degradación de Ciclina D1, importante regulador de la proliferación celular (74). Consistentemente, en tejido tumoral de HCC se ha encontrado sobreexpresión de ADAR1, aunque bajos niveles de ADAR2, donde ambos se relacionan clínicamente a un pobre pronóstico de los pacientes (75).

Siguiendo la misma línea, en tumores de cáncer gástrico y de cáncer de pulmón, ADAR1 se encuentra sobreexpresada como resultado de la amplificación de su gen, lo que se relaciona con la disminución en sobrevida (76, 77). Particularmente, en cáncer gástrico la baja sobrevida también se asocia a la delección de *ADAR2* (76).

En contraste, existen otros cánceres que poseen una disminuida expresión de ADAR1, como por ejemplo glioblastoma (78) y melanoma (79). A diferencia de los cánceres anteriormente mencionados, la reducción de ADAR1 es una característica común observada

en sus fenotipos agresivos. Al respecto, en tumores de cerebro se ha cuantificado un menor número de ediciones en secuencias Alu, en comparación a su tejido normal y, además, al sobreexpresar ADAR1 en la línea celular de glioblastoma U87 se reduce la proliferación celular (78).

Por su parte, en melanoma, un cáncer de piel agresivo, se ha descrito que el silenciamiento de ADAR1 en la línea celular SB2, que presenta alto nivel proteico de ADAR1 y características poco metastásicas, induce *in vivo* el crecimiento de los tumores subcutáneos, junto con metástasis pulmonar (79). Por el contrario, al sobreexpresar ADAR1 en células C8161 del mismo tipo de cáncer, las cuales presentan bajo nivel de ADAR1 y son altamente metastásicas, se reduce este fenotipo agresivo (79).

1.4.1.- Participación de ADAR1 en el cáncer de mama

Un estudio efectuado por Shah y colaboradores en el año 2009 abrió las puertas a la implicancia que podría tener ADAR1 en esta enfermedad. En esta investigación se secuenció el genoma y transcriptoma del cáncer de mama lobular positivo al receptor α -estrógeno, donde se encontró que ADAR1 estaba dentro del 5% de los genes más altamente expresados (80).

Seis años más tarde, el equipo de Detours comparó la edición de A por I en muestras de tumor de cáncer de mama con la de tejido normal, a través de análisis de RNA-seq, reportando que la frecuencia de edición del ARN en tumores de cáncer de mama era mayor en comparación al tejido de mama normal (81). También reportaron que de todos los miembros de la familia ADAR, ADAR1 era el más expresado en esta enfermedad, siendo su ARNm nueve veces mayor al de ADAR2 y más de 1000 veces mayor al de ADAR3 (81).

Interesantemente, en estudios *in vitro* con células MDA-MB-231 (subtipo TNBC), MCF-7 (subtipo Luminal A) y BT474 (subtipo Luminal B), el silenciamiento de ADAR1 llevó a una disminución de la proliferación, mientras que la apoptosis aumentó, sugiriendo que ADAR1 en cáncer de mama está envuelta en ambos procesos celulares (81).

Consistentemente, una investigación en cáncer de mama del subtipo basal, donde se analizó el transcriptoma de 81 líneas celulares de cáncer de mama, se encontró una correlación entre la expresión de ADAR1 con la edición de adenina a inosina y con el número de copias de su gen (82). Respecto a las secuencias editadas por ADAR1, se observó un aumento de ellas en las regiones 3'UTR de los transcritos (82). Asimismo, pacientes con alto nivel de ARNm de ADAR1 presentaban una menor sobrevida en comparación de pacientes con bajo nivel de ARNm. Cabe señalar que los tumores que presentaban alta expresión de ADAR1, además tenían aumentados los sitios de edición en regiones UTR (82).

Hasta el momento, solo dos investigaciones se han desarrollado respecto al rol de ADAR1 en TNBC. El equipo de Hee Jin Lee, examinó el contenido de ADAR1 en 679 tumores mediante la técnica de “*Tissue Microarray*”. La marcación positiva para ADAR1 se observó a nivel nuclear, encontrándose que el 46% de los tejidos tumorales presenta una alta expresión de ADAR1, que a su vez estuvo asociado a una elevada infiltración de linfocitos (83). Por su parte, el equipo de Jason D. Weber estudió la participación de ADAR1 en la formación de tumores *in vivo* usando un modelo de glándula mamaria ortotópico, observando que células MDA-MB-231 deficientes de ADAR1 pierden la capacidad de generar tumores, demostrando que células de cáncer triple negativo requieren de esta enzima de edición del RNA para formar tumores en animales transplantados (84).

En busca de conocer el rol de ADAR1 en TNBC, estudios preliminares de nuestro laboratorio evidencian que la isoforma p110 de ADAR1 posee un contenido proteico mayor a ADAR1p150 en las líneas celulares que fueron analizadas. Mediante *Western blot* se obtuvieron niveles cuantificables de ADAR1p110 y de ADAR1p150, tanto en la línea MCF-10 (normal) y MDA-MB-231 (subtipo TNBC), encontrando que el contenido de ADAR1p110 es alrededor de 15 veces mayor, respecto al contenido de ADAR1p150 en ambas líneas celulares (**Figura 5**). El resultado expuesto impulsa a evaluar empíricamente cual sería el rol que ADAR1p110 podría ejercer en células de cáncer de mama del subtipo triple negativo.

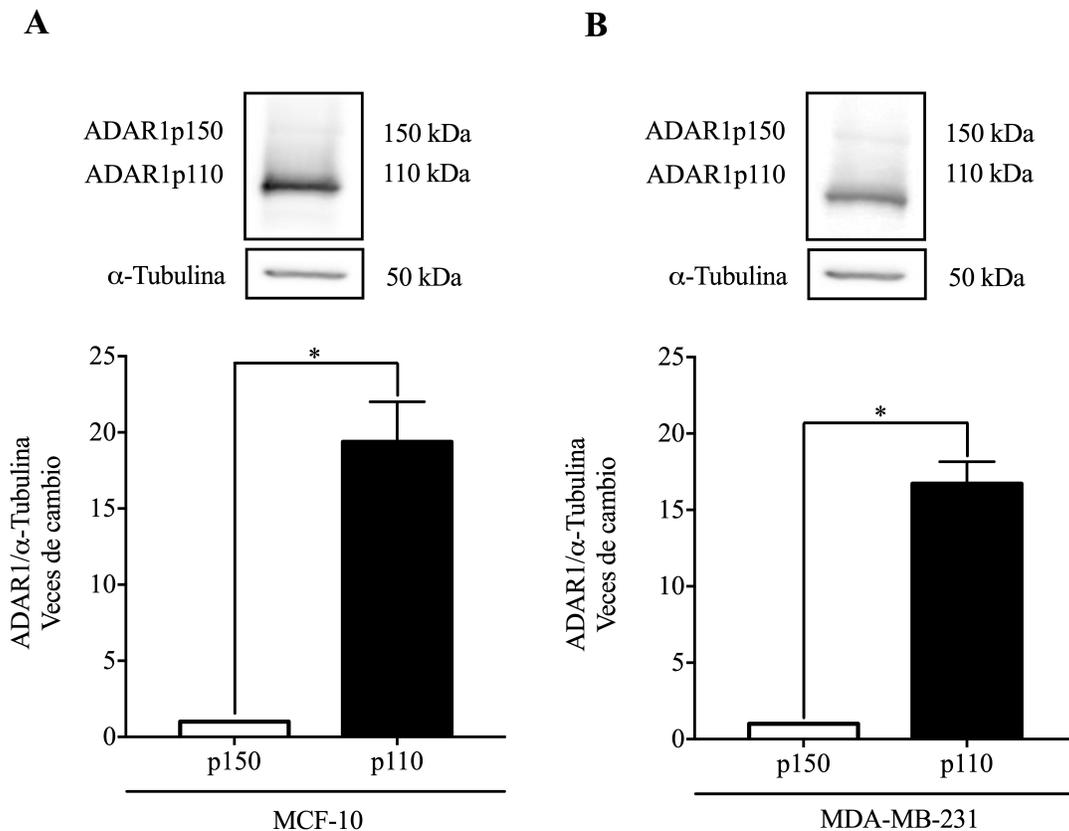


Figura 5: Caracterización de ADAR1p110 y ADAR1p150 en la línea celular MDA-MB-231. Se determinó el nivel proteico de ADAR1p150 y de ADAR1p110 en la línea celular epitelial de mama MCF-10 (**A**) y en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (**B**), mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se utilizó la proteína α -Tubulina como control de carga. Se muestran representativos *blots* sobre las gráficas que presentan la cuantificación de las densitometrías obtenidas en los *Western blot*. Los datos se expresan como el promedio de las veces de cambio, relativos al nivel de ADAR1p150 \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes (n = 4); * p < 0.05; prueba de *Mann-Whitney*.

Tomando en consideración que las modificaciones post-transcripcionales en cáncer de mama corresponden a un proceso epigenético que crea gran variabilidad en el transcriptoma humano, surge la interrogante de cuál o cuáles vías de señalización son afectadas o alteradas por la edición de ADAR1. En este sentido, se ha corroborado que la edición altera transcritos que participan en vías de señalización involucradas en la respuesta inmune (81), en el ciclo celular (82) y en la vía de señalización Wnt canónica (85).

1.5.- La vía de señalización Wnt canónica en cáncer de mama

En la vía de señalización Wnt canónica (o Wnt/ β -catenina) el componente clave es la proteína β -catenina. Una de las funciones de β -catenina es mantener la integridad del epitelio mamario por medio de su interacción con E-cadherina en la membrana plasmática, formando uniones adherentes entre células (86). La presencia de un ligando Wnt unido a su receptor “*Frizzled*” (Fz) y co-receptor “*Low-Density Lipoprotein-Related Proteins-5/6*” (LRP5/6), permite disminuir la localización de β -catenina en las uniones adherentes e inducir su translocación hacia el núcleo, participando como un co-activador transcripcional en la vía de señalización (86, 87). En el núcleo, β -catenina interactúa con los factores de transcripción “*T-Cell Factor1/Lymphoid Enhancer Factor*” (TCF/LEF) activando conocidos genes blanco, como Ciclina D1 (88), c-Myc (89) y MMP-9 (90) (**Figura 6**). Por otro lado, cuando Wnt no está presente, la β -catenina se encuentra unida a un complejo de destrucción donde puede ser fosforilada por “*Glycogen Synthase Kinase 3*” (GSK-3 β), que gatillará su posterior degradación en el proteosoma (87).

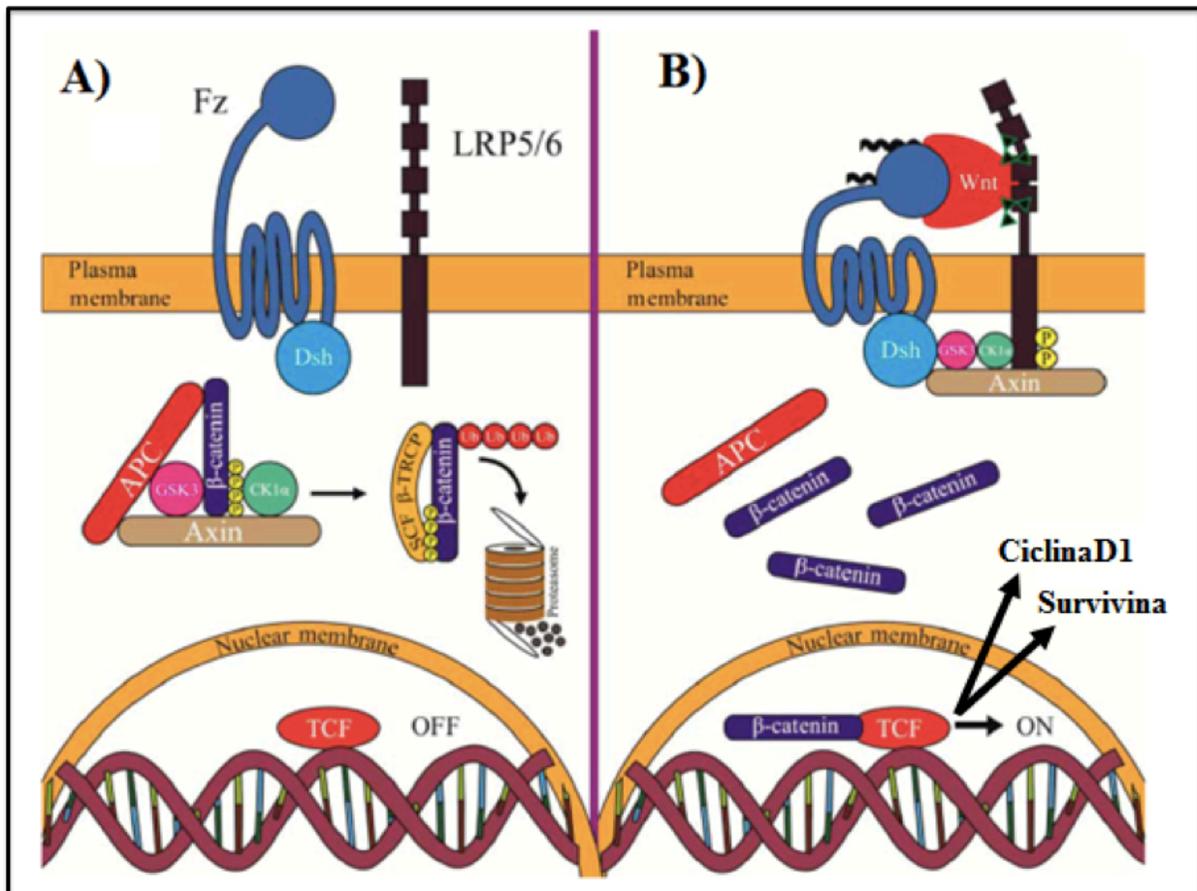


Figura 6: Vía canónica de señalización Wnt/ β -catenina. **A)** Wnt tiene como receptores en la membrana celular a las proteínas *Frizzled* y a una de las dos proteínas: LRP5 o LRP6. Cuando Wnt no está presente, la β -catenina se encuentra unida a un complejo de destrucción compuesto por las proteínas Axina y APC. La β -catenina unida a este complejo puede ser fosforilada por CK1 y GSK-3 β , que guiará a su posterior degradación en el proteosoma. **B)** Cuando Wnt está presente, este ligando interactúa con sus receptores induciendo la inhibición del complejo de destrucción y provocando que la β -catenina no pueda ser fosforilada. De esta manera los niveles de la β -catenina aumentan en el citoplasma, translocando al núcleo donde interactúa con los factores de transcripción LEF/TCF activando genes blanco, dentro de los que se incluyen Ciclina D1 (88), c-Myc (89), MMP-9 (90) y Survivina (91). Imagen adaptada desde Saito-Diaz., et al 2013 (87).

Adicionalmente, la señalización aberrante de β -catenina puede producirse por diferentes razones en células cancerosas. El equipo de Shimizu y colaboradores en el año 1997 mostró que el potencial de transformación de miembros de la familia Wnt se asocia a incrementos citosólicos de β -catenina, sugiriendo que algunos Wnt (oncogénicos)

promoverían la estabilización de β -catenina (92). Además, β -catenina puede volverse oncogénica debido a mutaciones en su gen (*CTNNB1*), las cuales han sido encontradas en diversos tipos de cáncer (hepatocelular, colorrectal, ovario, meduloblastoma, próstata, útero, melanoma), sugiriendo que algunas mutaciones promoverían su estabilidad (93). Particularmente, se ha identificado que el 25% de cáncer de mama metaplásico posee mutaciones en β -catenina (94).

La desregulación de la vía Wnt canónica se encuentra involucrada en la progresión del cáncer de mama (95). Al respecto, altos niveles de β -catenina (citoplasmático y nuclear) y de Ciclina D1 se han encontrado en el 40% de 123 tumores primarios de cáncer de mama, relacionados a un pobre pronóstico con disminución en la supervivencia de los pacientes (86, 88). En coherencia con estos resultados, en tumores *in vivo* formados a partir de la inoculación de células de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231, en ratones *nude* y en tumores mamarios formados en ratones transgénicos MMTV-Wnt1, se ha mostrado que el bloqueo de la vía Wnt/ β -catenina inhibe el crecimiento tumoral e induce su regresión, respectivamente (96).

Como se mencionó anteriormente, la activación de la vía Wnt canónica induce la expresión de diversos genes, uno de ellos es Ciclina D1 que se encuentra sobreexpresada en pacientes con cáncer de mama, reportándose en distintas líneas celulares que la transactivación de β -catenina se correlaciona significativamente con la expresión de Ciclina D1 (88). Otro gen blanco de TCF/ β -catenina es la proteína Survivina (**Figura 6**) que inhibe la apoptosis (97) y está involucrada en la regulación del ciclo celular (91). Survivina controla la estabilidad de los microtúbulos y progresión de la mitosis (98), siendo de este modo considerado como un blanco terapéutico, para frenar la proliferación de las células de cáncer (99). Además, cabe

mencionar que Survivina está presente durante el desarrollo embrionario y en células cancerígenas, no así en células de adultos normales (91). Igualmente a Ciclina D1, Survivina se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los cáncer de mama, asociándose a la resistencia a quimioterapia y radiación (100).

Adicionalmente, la vía Wnt canónica también participa en el proceso de invasión celular. En células de cáncer se ha mostrado que la activación de β -catenina favorece este proceso (101, 102), donde es clave la participación de las metaloproteinasas (MMPs), que son enzimas capaces de degradar proteínas de la matriz extracelular, permitiendo la movilización de las células tumorales hacia otros tejidos. En células T se ha demostrado que la “*Matrix Metalloproteinase-9*” (MMP-9) es un blanco transcripcional dependiente de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (90). Por su lado, en células metastásicas MDA-MB-231, el silenciamiento de MMP-9 reduce en un 90% la capacidad invasiva característica de estas células (103).

1.6.- ADAR1 y su relación con la vía Wnt canónica

La ADAR1 se ha relacionado con la ruta de señalización Wnt canónica en leucemia mieloide crónica (CML), donde esta ruta sirve como una vía de autorrenovación en los progenitores de CML durante la progresión a crisis blástica (CB). En muestras de CB se ha encontrado que GSK-3 β posee una delección en el dominio quinasa producto de un “mal empalme” (“*mis-splicing*”). La desregulación de GSK-3 β promovería la activación de β -catenina en CML-CB, un aumento de su translocación al núcleo y una alta actividad transcripcional (104).

En cáncer de mama no está claro en qué proceso celular podría participar la isoforma ADAR1p110. En la base de datos pública de edición de ARN, DARNED (105), se encontró que los transcritos de β -catenina (CTNNB1) y GSK-3 β (GSK3B) presentan edición de adenina a inosina (106) (**Figura 7**). Además, interesantemente, un análisis de secuenciación de la inmunoprecipitación de ARN (RIP-seq) desde células HeLa indicó que ADAR1p110 interactúa con los transcritos de CTNNB1 y GSK3B (107).

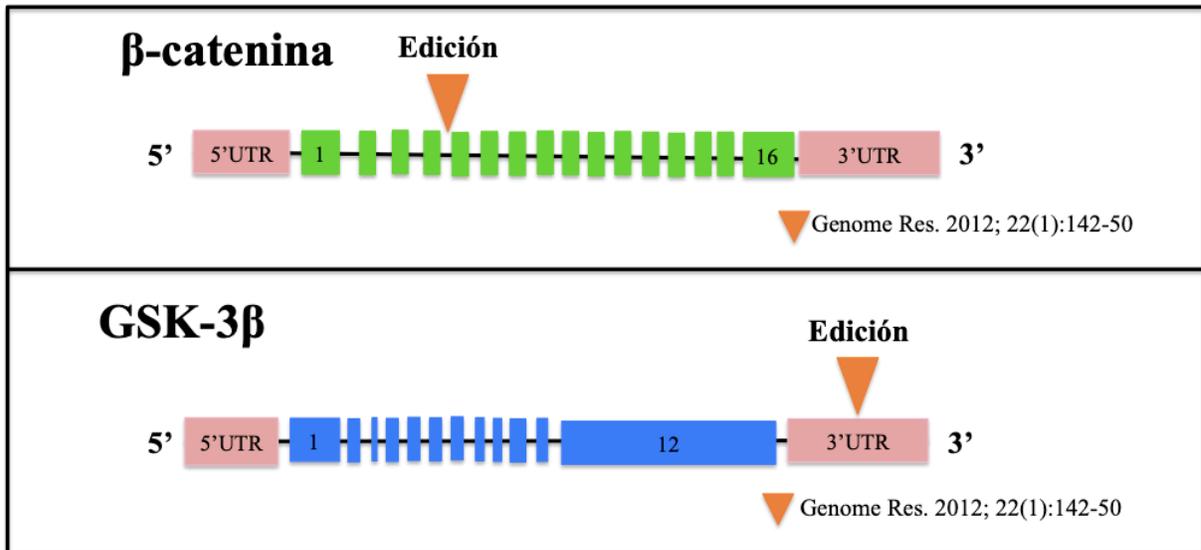


Figura 7: Los transcritos de β -catenina y de GSK-3 β son blancos de edición A por I en cáncer de mama. Se presenta un esquema de los transcritos inmaduros de β -catenina y GSK-3 β . Los pre-mRNAs contienen las regiones 5'UTR y 3'UTR a sus extremos, los exones (enumerados al inicio y al final) son representados en cajas verdes y azules para β -catenina y GSK-3 β , respectivamente. Los espacios entre las cajas corresponden a las regiones intrónicas. La edición en el pre-mRNA de β -catenina se localiza en una región intrónica (106), mientras que la edición del pre-mRNA de GSK-3 β se encuentra en la región 3'UTR (Bahn., et al 2012 (106)). Las ediciones son señaladas con triángulos (en naranja) junto a sus respectivas referencias.

1.7.- Rol de las cadherinas en cáncer

Según lo anteriormente expuesto, las alteraciones en la ruta Wnt canónica pueden generar consecuencias en la progresión del ciclo celular, evasión a la muerte celular programada y en la invasión celular. Sin embargo, son diversos los procesos necesarios para que células normales lleguen progresivamente a un estado oncogénico (108). Estos mecanismos traen consigo cambios morfológicos y alteraciones en la interacción célula-célula, siendo una de las alteraciones mejor caracterizada la disminución en los contenidos de E-cadherina presente en células epiteliales (108). Esta disminución se asocia a aumentos en la invasión y migración, y a la sobreexpresión de N-cadherina, expresada principalmente en células mesenquimáticas durante la organogénesis.

Las células mesenquimáticas son altamente móviles e invasivas, al contrario de las células epiteliales que proveen la cohesión célula-célula necesaria para la integridad de los tejidos. La conversión del fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimático corresponde al proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (“*Epithelial–Mesenchymal Transition*”, EMT), relacionado patológicamente con el cáncer (108, 109).

La EMT puede ser activada de una forma transitoria o estable, y en diferentes grados, promoviendo la invasión y migración a través de factores de transcripción que reprimen la expresión de E-cadherina, como por ejemplo la proteína Snail (110). Esto provoca la disminución de las uniones adherentes, asociado a una conversión del fenotipo epitelial hacia una morfología similar a un fibroblasto y con pérdida de la polaridad ápico-basal (109).

En líneas celulares de cáncer de mama humanas se ha encontrado que cadherina-11 participa de la interacción célula-célula, mientras E-cadherina disminuye en células invasivas (111). Igualmente, en tumores malignos de mama el nivel proteico de cadherina-11 es mayor

que el observado en tumores benignos, encontrándose principalmente en la membrana de las células tumorales (112). De este modo la expresión de cadherina-11 en cáncer de mama se relaciona a un fenotipo agresivo e invasivo.

1.8.- Angiogénesis y su relación con la vía Wnt canónica en cáncer de mama

La angiogénesis se refiere al proceso de formación de vasos sanguíneos, que crecen y se distribuyen en el organismo, a partir de un vaso preexistente (113). En los tumores, la angiogénesis permite que las células puedan abastecerse de nutrientes y oxígeno, junto con evacuar sus desechos metabólicos (108). Los vasos sanguíneos están conformados en su capa interna por células endoteliales (CEs) que entregan sostén al tejido y pueden sensor señales que inducen la angiogénesis, como es el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (“*Vascular Endothelial Growth Factor*”, VEGF) (113).

Las CEs se mantienen unidas gracias a moléculas de adhesión célula-célula. Una de ellas es la proteína de membrana y miembro de la super-familia de las inmunoglobulinas CD-31/PECAM-1 (“*Cluster of Differentiation 31/Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*”) (114). CD-31, además de participar en el contacto intercelular de las CEs, puede interactuar a través de su dominio citoplasmático con β -catenina fosforilada en tirosina (115). En carcinoma de mama ductal *in situ* se ha encontrado mediante IHQ una marcación positiva de CD-31 (CD-31⁺), pero no así en células epiteliales normales y en tejido hiperplásico epitelial (116), siendo usado como un marcador para evaluar la presencia de CEs en tejidos (117).

Para que la ramificación o extensión de los vasos sanguíneos se lleve a cabo, las células deben movilizarse abriéndose paso entre el tejido, por medio de la degradación de la matriz extracelular que compone la membrana basal y que a su vez rodea los túbulos endoteliales (113). Este proceso es realizado por las metaloproteinasas de matriz (MMPs) que permiten remover la matriz extracelular que funciona como barrera fisiológica, permitiendo la invasión celular (118). Un integrante de la familia de las MMPs ampliamente estudiado en cáncer es la enzima MMP-9, una gelatinasa de tipo B (118), blanco de la vía Wnt canónica (90), y que además actúa como un factor antigénico que participa en el proceso de microvascularización de CEs humanas (119). En ensayos con células HUVEC (“*Human umbilical vein endothelial cell*”) la activación de la vía Wnt/ β -catenina induce la formación *in vitro* de redes de capilares (120) y en CEs de ratones transgénicos se ha demostrado que la señalización de Wnt se encuentra activa (121).

Por otro lado, ADAR1 también participa del proceso de angiogénesis en cáncer. Al analizar ADAR1 en tejido proveniente de pacientes de cáncer cervical mediante IHQ, se observa marcación positiva de ADAR1 (ADAR1⁺) en citoplasma y en núcleo. Adicionalmente, se encontró una aumentada invasión vascular, menor supervivencia, y peor pronóstico clínico en pacientes que sobreexpresan ADAR1, comparado a pacientes ADAR1 negativos (122).

Hasta el momento se desconoce si ADAR1 participa en la progresión del cáncer de mama triple negativo a través de la modulación de la vía Wnt/ β -catenina y si ello influye o tiene alguna repercusión en los procesos celulares de migración, invasión o angiogénesis.

2. HIPÓTESIS

La isoforma p110 de ADAR1 promueve la activación de la vía Wnt canónica en cáncer de mama triple negativo y como consecuencia un aumento de la progresión maligna tanto *in vitro* como *in vivo*.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo por el cual la isoforma p110 de ADAR1 promueve la malignidad *in vitro* en células de cáncer de mama triple negativo e *in vivo* en ratones inmunodeficientes.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar *in vitro* la función de la isoforma p110 de ADAR1 como regulador positivo de β -catenina en células de cáncer de mama.
2. Evaluar el efecto *in vitro* de ADAR1p110 en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis en células de cáncer de mama triple negativo.
3. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 en la formación de tumores y metástasis en ratones inmunodeficientes.
4. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 (SE) sobre el proceso de neoangiogénesis en tumores subcutáneos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Cultivo celular

El principal modelo celular utilizado en este trabajo fue la línea celular humana de adenocarcinoma de mama metastásico triple negativo, MDA-MB-231. Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM/F12 (cat N° 10-092-CM, “*Dulbecco’s Modified of Eagle’s Medium/Ham’s F-12 50/50 Mix*”, Corning, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (cat N° 35-010-CV, Corning, EE.UU.) previamente inactivado mediante calor, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/mL (cat N° 30-002-CI, Corning, EE.UU.). Como control para algunos experimentos se utilizó la línea celular epitelial humana, MCF-10. Estas células se cultivaron en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de suero de caballo (SBC, Cat N°35-030-CV, Corning, EE.UU.), penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL, “*Recombinant Human*” EGF 20 ng/mL (cat N° 236-EG-200, R&D Systems, EE.UU.), insulina 10 µg/mL (cat N° I0516-5ML, Sigma-Aldrich, EE.UU.) e hidrocortisona 100 µg/mL (cat N° H4001, Sigma-Aldrich, EE.UU.). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Las líneas celulares se testearon rutinariamente para contaminación con micoplasma utilizando el kit *EZ-PCR™ Mycoplasma Detection* (Cat N° 20-700-20, *Biological Industries*, EE.UU.).

Los cultivos de líneas celulares una vez alcanzado el 80-90% de confluencia (los cambios en porcentaje de confluencia serán especificados para algunos de los experimentos realizados en este estudio), se lavaron una vez con 4 mL de PBS 1X (cat N° 21-040-CVR, Corning, EE.UU.) y luego para levantar las células se les adicionó 1 mL de Tripsina 1X (cat N° 25-054-CI, Corning, EE.UU.). Después de incubar las células durante 5 minutos a 37°C,

para inactivar la tripsina se resuspendieron en medio suplementado con SFB o SFC (dependiendo de la línea celular utilizada) mediante pipeteo y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y los “*pellet*” celulares se resuspendieron en medio de cultivo suplementado, para posteriormente ser sembradas en frascos o en un número determinado de placas “*Petri*”, dependiendo del experimento a efectuar.

5.2.- Estudio de sobreexpresión de ADAR1 p110

La línea celular MDA-MB-231 parental o “*Wild Type*” (WT) se transdujeron con el vector lentiviral (NM_001025107, *GenTarget Inc*, EE.UU.) o con el vector control (Mock, Null-Control, *GenTarget Inc*, EE.UU.) a una multiplicidad de infección (MOI) de 5; generando de esta manera dos líneas celulares: células MDA-MB-231 que sobreexpresan (SE) ADAR1p110 y células MDA-MB-231 Mock que contienen el vector vacío, respectivamente. La selección de las células establemente transducidas se efectuó mediante el antibiótico Blasticidina 10 µg/ml (cat N° ant-bl-05, InvivoGen, EE.UU.) durante 48 horas. Se muestra mapa del constructo del vector de sobreexpresión de ADAR1 p110 en **Figura 8A**.

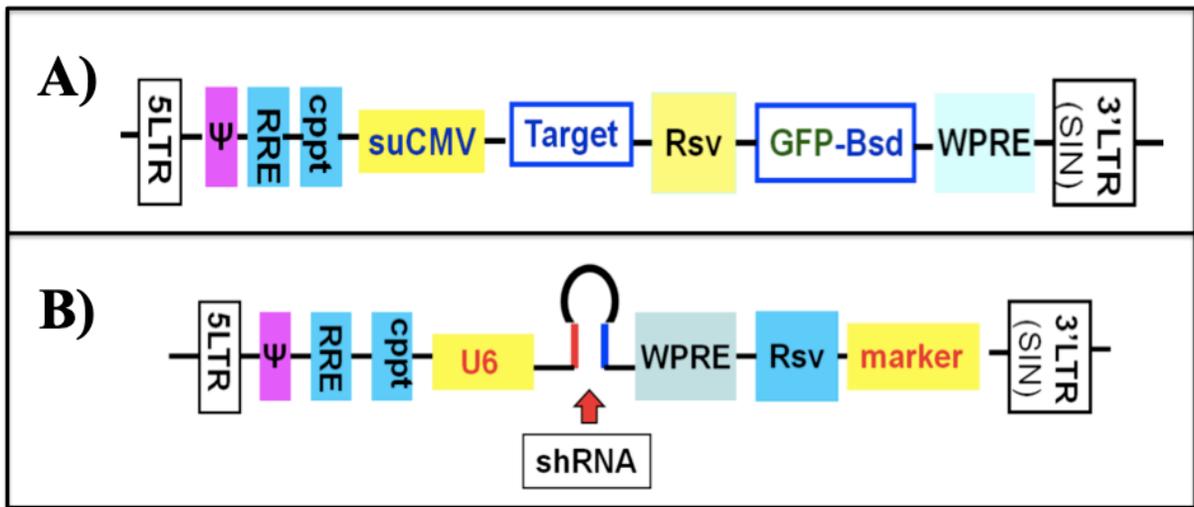


Figura 8: Estructura de vectores lentivirales usados para transducir células de la línea celular MDA-MB-231. La secuencia del transgen (“*Target*”), se encuentra flanqueado por la secuencia de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 5’ y la secuencia 3’LTR contiene una delección adicional que genera que el virus se auto-inactive (SIN) después de su integración en el genoma del hospedador. También el vector consta de una señal de empaquetamiento (ψ), un elemento de respuesta a Rev (RRE) y un Tracto central de Polipurina (cPPT). **A)** Vector lentiviral de sobreexpresión de ADAR1p110. La secuencia “*Target*” esta bajo el promotor constitutivo super Citomegalovirus (suCMV) y, a su vez, el marcador dual de fusión GFP-Blasticidina (GFP-Bsd) está bajo el promotor del virus del sarcoma de Rous (Rsv), seguido del elemento regulador post-transcripcional del virus de la Hepatitis de la Marmota (WPRE). **B)** Vector lentiviral de silenciamiento de ADAR1 total. El shRNA está bajo el promotor constitutivo humano U6 seguido del elemento regulador WPRE. El vector presenta un marcador dual de fusión RFP-puromicina (RFP-Puro/“*Marker*”) bajo un promotor Rsv. Imágenes obtenidas desde reporte entregado por *GenTarget Inc.*

5.3.- Estudio del silenciamiento de ADAR1

La línea celular MDA-MB-231 se transdujo usando vectores lentivirales (*GenTarget Inc*) que expresan una horquilla de ARN (shRNA) dirigido contra el transcrito *ADAR1* en una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Los vectores lentivirales y sus respectivas secuencias corresponden a: pLenti-U6-shRNA (TRCN0000336832) y pLenti-U6-shRNA (TRCN0000336886), llamados shRNA#1 y shRNA#2, respectivamente, utilizando como control el vector pLenti-U6-shRNA (shControl) que carece del inserto shRNA. Se usó

Puromicina 1.5 µg/mL (InvitroGen) durante 48 horas para seleccionar las células transducidas de manera estable, para luego realizar un “*cell sorting*” de las células monitoreando la señal de la Proteína Fluorescente Roja (*Red Fluorescent Protein*, RFP) codificada lentiviralmente. Se muestra mapa del constructo del vector usado para el silenciamiento de ADAR1 total en **Figura 8B**.

5.4.- Aislación de ARN

Las células se lavaron dos veces con 4 mL PBS 1X frío y se homogeneizaron en 1 mL de Trizol® (cat N° 5596018, Life Technologies, EE.UU.) mediante pipeteo. Luego, se depositó la muestra en un tubo “*ependorf*” de 1,5 mL libre de nucleasas y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se les adicionó 200 µL de Cloroformo (cat N° 102447, Merck, Alemania) frío, luego la mezcla se agitó suavemente y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Después, se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos, para posteriormente descartar la fase orgánica y obtener la fase acuosa que se traspasó a un tubo nuevo. Desde la fase acuosa se precipitó el ARN utilizando 500 µL de isopropanol frío (cat N° 107022, Merck, Alemania), se agitó mediante inversión y se dejó incubar durante 15 minutos en hielo. Luego, se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante obteniendo de este modo el “*pellet*” de ARN. El ARN se lavó con 1 mL de etanol al 100% frío y se centrifugó 5 minutos a 10.000 r.p.m., para luego eliminar el sobrenadante. Después el ARN se lavó nuevamente con 1 mL de etanol al 75% (cat N° 100986, Merck, Alemania) frío, se agitó mediante inversión y se centrifugó 5 minutos a 14.000 r.p.m. Finalmente, se agregó a la muestra H₂O libre de nucleasas

(cat N° AM9932, Ambion, EE.UU.) para resuspender suavemente el “*pellet*” de ARN mediante pipeteo.

5.4.1.- Procedimiento de eliminación de ADN

Con el propósito de eliminar trazas de ADN en las muestras de ARN total, se utilizó el kit *TURBO DNA-free™ Kit*” (cat N°, Ambion, EE.UU.). El ARN total fue tratado con 0,1 volumen 10X de turbo DNase *buffer* y 1 µL de TURBO DNAsa. Luego, se homogeneizó suavemente mediante pipeteo y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después, para inactivar la DNAsa se adicionó 0,1 volumen del reactivo de inactivación, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 g durante 1,5 minutos. Posteriormente, se descartó el precipitado y se obtuvo el sobrenadante que fue transferido a un tubo “*ependorf*” de 1,5 mL libre de nucleasas nuevo. Finalmente, con 2 µL de la muestra se cuantificó el ARN total en el equipo *BioTek™ Cytation 3™* (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.*).

5.5.- Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total mediante el kit *AffinityScript™ qRT-PCR cDNA synthesis* (cat N° 600559, Agilent Technologies, EE.UU.). La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo con 10 µL de tampón de mezcla 2X, 1,75 µL partidores Oligo (dt) (0,5 µg/µL), 0,25 µL de “*Random primers*” (0,5 µg/µL), 1 µL de enzima transcriptasa reversa (RT) “*Affinity script*”, que viene en combinación de la RNAsa “*Block*”, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µL. La mezcla de reacción se condujo en un termociclador con un ciclo inicial a 25°C durante 5 minutos, para permitir unión de los

partidores seguido de un ciclo a 42°C durante 45 minutos, para permitir la reacción enzimática, y finalmente, un ciclo a 95°C durante 5 minutos, para terminar la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *MaxyGene II Thermal Cycler* (cat N° THERM-1000, Axygen , EE.UU.).

5.6.- RT-qPCR

La reacción cuantitativa de polimerización en cadena (qPCR) se realizó mediante *Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix* (cat N° 600828, Agilent Technologies, EE.UU.), utilizando para cada reacción 5 µL de *SYBR® Green QPCR*, 3,75 µL de H₂O libre de nucleasas, 0,25 µL de mezcla de partidores sentido/antisentido (10 µM) y 1 µL de ADNc diluido 4 veces. Los partidores de oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar ADAR1, β-catenin, MMP-9 y β-actina fueron obtenidos desde “*Integrated DNA Technologies*” (IDT, EE.UU.), sus secuencias y programas de qPCR son listados en la **Tabla 1** y la **Tabla 2**, respectivamente. Para estudiar el nivel de los transcritos se realizaron tres experimentos independiente, además se consideraron triplicados técnicos y se condujeron las reacciones utilizando un control negativo, constituido por la mezcla de reacción ausente de templado. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *Eco Real-Time PCR System* (*Illumina*, San Diego, California, EE.UU.). La abundancia relativa de cada ARNm se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados fueron normalizados utilizando como control interno β-actina (“*housekeeping*”) y se expresaron como las veces de cambio relativos a los valores obtenidos por las células transducidas Mock.

Tabla 1.- Lista de secuencia de partidores usados en RT-qPCR

Nombre del Gen	Secuencia de partidores (3'→5')	Tamaño del Amplicón (pb)	Referencia
<i>ADARI</i>	Sentido: AAGGCAGAACGCATGGGTTTCA	107	(82)
	Antisentido: AGTGTCTTTGGCTGTGCTTCTGG		
<i>ADARI</i>	Sentido: AGCACAGACAGCTCAGGTACCA	131	Laboratorio Dr. Armisén
	Antisentido: CAGTGACGGTGTCTGCTTTCCA		
<i>ADARI p150</i>	Sentido: CTTTCCGAGGAAACGAAAGCGA	113	(82)
	Antisentido: CCGCTACTCCGCACTGGAA		
<i>ADARI p110</i>	Sentido: GACTGAAGGTAGAGAAGGCTACG	100	(85)
	Antisentido: TGCACTTCCCTCGGGACAC		
<i>CTNNB1</i>	Sentido: CCACTGGCCTCTGATAAAGG	79	Laboratorio Dr. Armisén
	Antisentido: ACGCAAAGGTGCATGATTTG		
<i>MMP-9</i>	Sentido: AGAATCGCCAGTACTTCCCA	85	Laboratorio Dr. Armisén
	Antisentido: GCCTGCAACGTGAACATCTT		
<i>BIRC5</i>	Sentido: GCTTCGCTGGAAACCTCTGGA	79	(123)
	Antisentido: TCTGGGCAGATGGCTGTTGG		
<i>VEGF-A</i>	Sentido: ATGCGGATCAAACCTCACCA	165	Laboratorio Dra. Marcelain
	Antisentido: ACACGTCTGCGGATCTTGTA		
<i>GADPH</i>	Sentido: GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT	127	(123)
	Antisentido: GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA		
<i>ACTIN</i>	Sentido: AACGGCTCCGGCATGTGCAAG	189	(82)
	Antisentido: GCCGTGCTCGATGGGGTACTT		

Tabla 2.- Programas de RT-qPCR

Gen blanco	Pasos de programa de RT-qPCR				N° de Ciclos	Referencia
	1st	2nd	3rd	4th		
<i>ADARI</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	58 °C/15 s	72 °C/15 s	40	(82)
<i>CTNNB1</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	58 °C/15 s	72 °C/15 s	40	Laboratorio Dr. Armisén
<i>MMP-9</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	60 °C/15 s	72 °C/15 s	40	Laboratorio Dr. Armisén
<i>ADARI</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	58 °C/15 s	72 °C/15 s	40	Laboratorio Dr. Armisén
<i>ADAR1p110</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	60 °C/15 s	72 °C/15 s	45	Laboratorio Dr. Armisén
<i>ADAR1p150</i>	95 °C/10 min	95 °C/15 s	60 °C/15 s	72 °C/15 s	45	Laboratorio Dr. Armisén

5.7.- Extracción de proteínas

Las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio fueron sembradas en placas “Petri” de 100 mm² y luego de que alcanzaron 80% de confluencia se lavaron dos veces con 4 mL de PBS 1X y se homogeneizaron en 1 ml de tampón RIPA (cat N° 89901, *Thermo Scientific*, EE.UU.) compuesto por Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, 1% NP-40, deoxicolato de sodio de sodio al 1%, pH 7.6 y SDS al 0.1%, complementado con *PhosSTOP* (cat N° 04906837001, Roche, Suiza) y con “*Protease Inhibitor Cocktail set I*” (cat N°539131-10VL, Calbiochem®, EE.UU.). A continuación, los homogeneizados se llevaron a “vortex” y se incubaron durante 30 minutos en hielo (4°C). Posteriormente, para degradar las trazas de ADN, los extractos proteicos se sonicaron mediante el equipo “*Ultrasonic Homogenizer Systems*” (Sonic Ruptor 250, MundoLab, EE.UU.) tres veces durante 5 segundos manteniendo las muestras en hielo. Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sedimento y se recuperó el sobrenadante que fue traspasado a un tubo nuevo. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

Respecto a los tumores primarios provenientes de roedores, obtenidos durante el desarrollo del estudio *in vivo*, una vez fueron extraídos mediante cirugía, la mitad de cada tumor fue congelado en nitrógeno (N₂) líquido hasta su posterior uso. Luego de retirar las muestras desde el N₂ líquido se dejaron durante 1 hora a -80°C, para después cortar con bisturí trozos de ~ 3 mm³ que se depositaron en un termo con N₂ líquido. A continuación, los trozos de tejidos se disrumpieron mediante un BioPulverizer (cat N° 59012N, Biospec Products, EE.UU.), para obtener un tejido pulverizado que fue disuelto en tampón RIPA a 4°C, para continuar con la extracción de proteínas mediante el mismo procedimiento detallado para las líneas celulares.

5.8.- Cuantificación de proteínas

En una placa de 96 pocillos se añadieron 18 μ L de agua, 2 μ L de extracto de proteínas, y 180 μ L de ácido bicinónico (BCA) proveniente del kit Pierce™ BCA Protein Assay (cat N° 23227, Thermo Scientific™, EE. UU.). Luego, se dejó incubar 30 minutos a 37°C en oscuridad. Al momento de finalizar la incubación se procedió a realizar las lecturas de las absorbancias a 562 nm en el equipo BioTek™ Cytation 3™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Adicionalmente, se realizó una curva de calibración a partir de BSA, donde se interpolaron los resultados de las absorbancias de cada muestra, para obtener la concentración de las proteínas totales.

5.9.- Western blot

Los niveles proteicos se estudiaron usando 25 - 45 μ g de extractos proteicos totales que se resolvieron en electroforesis de geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones denaturantes mediante el uso de dodecilsulfato sódico (SDS). El gel concentrador se utilizó al 4% y el gel resolvidor a 8 - 12% dependiendo del peso molecular (kDa) de la proteína a evaluar. Las proteínas fueron resueltas con tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1 %, pH = 8.3; cat N° 161-0732, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) diluido a 1X en agua destilada, y se utilizó un estándar de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (cat N° 26616, Thermo Scientific, EE.UU.). Luego se realizó transferencia en fase líquida desde el gel SDS-PAGE hacia una membrana de nitrocelulosa 0,2 μ m de poro (cat N° 162-0115, Bio-Rad, EE.UU.) utilizando tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, Metanol al 20%, pH = 8,3, cat N° 161-0734, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) diluido a 1X en agua destilada a 100 V o 300 mA dependiendo de la proteína a estudiar. Todos los

anticuerpos fueron diluidos en solución de BSA al 5% (cat N° BM-0150, Winkler, Chile) en tampón T-TBS (Tris 20 mM; NaCl 500 mM; pH=7,5, cat N° 170-6435, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) suplementado con Tween-20 al 0,1% y diluido a 1X en agua destilada. Una vez finalizada la transferencia se enjuagaron las membranas con solución T-TBS 1X durante 15 minutos. Para verificar la transferencia de proteínas hacia la membrana y proceder a cortarlas mediante un bisturí, se sumergieron en “*Rojo Ponceau*” (cat N° BM-1492, Winkler, Chile) durante 15 minutos en agitación. Posteriormente, las membranas se enjuagaron con T-TBS 1X hasta retirar completamente el *Rojo Ponceau*. Para bloquear los sitios de unión inespecífica del anticuerpos primario en la membrana, se procedió a sumergirlas en BSA al 5% en tampón T-TBS 1X durante 30 minutos. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla 3**) toda la noche a 4°C en agitación suave. Después de enjuagar las membranas en T-TBS 1X durante 30 minutos, se incubaron en anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (**Tabla 4**) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego, las membranas se enjuagaron en T-TBS 1X durante 15 minutos y para detectar la señal de los anticuerpos las membranas se sumergieron en el reactivo de quimioluminiscencia “*SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate*” (cat N° 34077, *Thermo Scientific*, EE.UU.) durante 1 minuto y se revelaron las imágenes exponiendo las membranas a distintos tiempos en el equipo “*Chemiluminescence Imaging System*” (Clinx Science Instruments Co., Ltd., Shanghai, China). A continuación, la intensidad de la señal se detectó mediante “*Image Studio™ Lite Western Blot Analysis software*” (Versión 4.0, LI-COR, EE.UU.). Para el análisis de los resultados, la intensidad de las señales obtenidas para cada banda proteica, se normalizaron con el nivel proteico de α -Tubulina o β -Actina, según correspondiese.

Para estudiar en la misma membrana el nivel proteico de β -catenina total o desfosforilada (β -catenina activa), debido a que ambas formas de la proteína poseen similar peso molecular (kDa), se realizó “*stripping*” de la membrana revelada utilizando el reactivo “*Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer*” (cat N° 46430, *Thermo Scientific*, EE.UU.), para luego continuar con la evaluación del segundo anticuerpo.

Tabla 3.- Lista de anticuerpos primarios

Proteína	Dilución	Clonogenicidad	Proveedor/ N° de Catálogo (Cat #)	Uso
ADAR1	1:200/1:200	Monoclonal	<i>Cell Signaling Technology</i> 14175	WB/IFI
ADAR1	1:750/1:5000	Policlonal	Abcam Ab168809	IHQ/WB
GSK-3 β	1:1000	Monoclonal	<i>BD Transduction Laboratories</i> 610201	WB
AKT	1:2000	Policlonal	<i>Cell Signaling Technology</i> 9272	WB
β -catenina	1:1000/1:200	Monoclonal	<i>BD Transduction Laboratories</i> 610154	WB/IFI
β -catenina (Ser33/Thr41)	1:200	Monoclonal	Millipore 05-665	WB
Survivina	1:1000/1:100	Policlonal	<i>R&D Systems</i> AF886	WB/IHQ
Ciclina D1	1:1000	Monoclonal	<i>Cell Signaling Technology</i> 2978	WB
Ciclina D1	1:50	Monoclonal	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> sc-6281	WB
c-Myc	1:1000	Policlonal	<i>Cell Signaling Technology</i> 9402	WB
E-cadherina	1:1000	Monoclonal	Invitrogen 33-4000	WB
Cadherina-11	1:1000	Monoclonal	<i>Cell Signaling Technology</i> 13577S	WB
CD-31	1:50	Policlonal	Abcam Ab28364	IHQ
α -Tubulina	1:6000	Monoclonal	Sigma-Aldrich T5168	WB
β -Actina	1:10000	Monoclonal	Sigma-Aldrich A5441	WB

Tabla 4.- Lista de anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Proveedor/ N° de catálogo (Cat N°)	Uso
<i>Goat anti-Rabbit HRP Conjugate</i>	1:6000	Bio-Rad 170-5046	WB
<i>Goat anti-Mouse HRP Conjugate</i>	1:6000	Bio-Rad 170-5047	WB
<i>Alexa Fluor® 555 Anti-Rabbit</i>	1:500	<i>ThermoFisher</i> A21429	IFI
<i>Alexa Fluor® 555 Anti-mouse</i>	1:500	<i>ThermoFisher</i> A21424	IFI
<i>Anti-Mouse IgG</i>	1:500	<i>Rockland Immunochemicals, Inc</i> 610-4302	IHQ
<i>Anti-Rabbit IgG</i>	1:500	<i>Rockland Immunochemicals, Inc</i> 611-1302	IHQ

WB: *Western Blot*; IFI: Inmunofluorescencia Indirecta; IHQ: Inmunohistoquímica.

5.10.- Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta

Las células se sembraron y cultivaron en *Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System* (cat N° 177445, *ThermoFisher*, EE.UU.) hasta alcanzar 90% de confluencia. Luego, las células se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS 1X frío, para posteriormente fijarlas utilizando 250 μ L de una solución de 3.7% formaldehído (cat N° 47608, Sigma-Aldrich, EE.UU.) durante 15 minutos en hielo. Luego de la fijación se enjuagó dos veces con 200 μ L de PBS 1X frío durante 5 minutos, y para permeabilizar las células se adicionaron 250 μ L de Tritón X-100 al 0.2% (cat N° BM 2020, Winkler, Chile) en PBS durante 10 minutos. Después, se utilizó la solución de bloqueo de 3% BSA (cat N° BM-0150, Winkler, Chile) en Tritón X-100 al 0.2% PBS 1X durante 45 minutos en cámara húmeda a 4°C. A continuación, se incubaron las células con 60 μ L de anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (**Tabla 3**). Las células se enjuagaron 3 veces con 200 μ L de PBS 1X frío durante 5 minutos en agitación suave, para luego incubarlas con 60 μ L de anticuerpo secundario durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Nuevamente, las células se enjuagaron tres veces con 200 μ L de PBS 1X frío durante 3 minutos en agitación suave, luego se retiraron las trazas de PBS 1X y se adicionó sobre las células fijadas una gota de “*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI*” (cat N° P36935, *Thermo Fisher Scientific*, EE.UU.), para posteriormente montar los cubreobjetos. Las imágenes se capturaron mediante un microscopio de fluorescencia (*System Microscope BX53*, Olympus, Japón) y se utilizó el “*software ImageJ*” (NIH, 1.47v, EE.UU.) para analizar las imágenes.

5.11.- Ensayo reportero de luciferasa TOP/FOP

En placas de 6 pocillos se sembraron 4×10^5 células MDA-MB-231 y luego de 24 horas de post-siembra, cuando las células alcanzaron ~70% de confluencia se transfectaron con 1200 ng de plásmido TOP-Flash o con el plásmido Fop-Flash. En paralelo las células se co-transfectaron con 200 ng del plásmido pRL-TK (cat N° E2231, Promega, EE.UU.) utilizado para la normalización de los ensayos reporteros. Las transfecciones se realizaron utilizando *Lipofectamine 3000* (cat N° L3000008, InvitroGen, EE.UU.) acorde a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 48 horas post-transfección la actividad luciferasa fue medida mediante el kit “*Dual Luciferase® Reporter Assay*” (cat N° E1910, Promega, EE.UU.), utilizando 40 µL de extracto proteico. La luminiscencia producida gracias a la actividad luciferasa fue capturada mediante el equipo *BioTek™ Cytation 3™* (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.*). La actividad de la luciferasa de luciérnaga expresada a partir de los plásmidos TOP-Flash y FOP-Flash, se normalizaron con la actividad luciferasa de Renilla, para finalmente obtener la razón de TOP/FOP. Como controles positivos de los ensayos reporteros luego de 24 horas post-transfección, las células MDA-MB-231 se estimularon 24 horas con 25 mM de LiCl (cat N° L-8895, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 20 µM de SB-2167631 (cat N° 1615, Tocris Bioscience, Reino Unido) (124), utilizando como control de este procedimiento células tratadas con NaCl (cat N° 106404, Merck, Alemania) y DMSO (cat N° D2650, Sigma-Aldrich, EE.UU.) según el inhibidor, respectivamente. Cada experimento fue realizado por triplicado y para cada medición también se realizaron triplicados técnicos.

Adicionalmente, para evaluar la eficiencia de transfección, las células MDA-MB-231 se transfectaron con el plásmido de GFP (cat N° EX-EGFP-M13, *GeneCopoeia, EE.UU.*).

Luego de 48 post-transfección las células fueron chequeadas mediante el equipo “*BioTek™ Cytation 3™*” (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.*).

5.13.- Ensayo de cierre de herida

En placas de 6 pocillos se sembraron células en medio DMEN/F12 suplementado con SBF al 2,5% y se cultivaron hasta que alcanzaron ~90% de confluencia. Luego sobre la monocapa celular se realizó una herida (tiempo cero) de esquina a esquina en el medio del pocillo con una punta de 200 µL, para luego retirar las células que se levantaron mediante 2 lavados con PBS 1X. Después con la finalidad de observar la migración de las células, se capturaron imágenes 100 X a las 0, 6, 8 y 12 horas después de realizada la herida, utilizando el equipo *BioTek™ Cytation 3™* (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.*). La medición de cierre de herida se obtuvo mediante el “*software ImageJ*” (NIH, 1.47v, EE.UU.).

5.14.- Ensayo de Migración celular en cámara de Boyden

En la zona inferior de las cámaras (o insertos) de Boyden se adicionaron 80 µL de Fibronectina (2 µg/mL, cat N° F1141, Sigma-Aldrich, EE.UU.) diluida en PBS 1X y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C. Luego en la parte superior de las cámaras de Boyden (cat N° 3458, *Transwell®*, Corning, EE.UU.) se sembraron 2×10^5 células homogenizadas en 200 µL de medio DMEN/F12 libre de SBF; y se adicionó debajo de los insertos en cada pocillo 500 µL de medio DMEN/F12 suplementado con 10% SBF, utilizado como quimioattractante (125). Después de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada y 5% CO₂, se retiró el medio de cultivo de las cámaras y las células que no migraron se retiraron suavemente con un bastoncillo de algodón. A continuación, las cámaras

se sumergieron en 250 μ L de solución de PFA al 3.7% y se dejó incubar durante 15 minutos. Después, para teñir las células que migraron, las cámaras se sumergieron en una solución de cristal violeta al 0,1% (cat N° C-6158, Sigma-Aldrich, EE.UU.) con metanol (cat N° 1060095000, Millipore, EE.UU.) al 20% (cat N° 106009, Millipore, EE.UU.) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las cámaras se lavaron 3 veces con PBS 1X, se dejaron secar durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego capturar 10 imágenes a 20 X de cada condición a distintos campos mediante el equipo *BioTek™ Cytation 3™* (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.*) el “software *ImageJ*” (NIH, 1.47v, EE.UU.).

5.15.- Ensayo de Invasión celular en Matrigel

La invasión celular se estudió utilizando insertos de “*Transwell*” compuestos por una membrana de policarbonato (PET) con poros de 8.0 μ m cubiertos con matrigel (cat N° 354480, Corning, EE.UU.). Para hidratar el matrigel se adicionó sobre los insertos 500 μ L de medio DMEN/F12 deprivado de SBF, para luego incubar a 37°C durante 2 horas. A continuación, 2 x 10⁴ células MDA-MB-231 se resuspendieron en 500 μ L de medio DMEM/F12 en ausencia de SBF y se sembraron sobre cada inserto. A su vez, se utilizó como quimioattractante 500 μ L de medio DMEN/F12 suplementado con 10% SBF, que se adicionó debajo de los insertos en cada uno de los pocillos. El sistema se mantuvo durante 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada y 5% de CO₂ como fue descrito previamente por Mendoza., et al 2013 (125). Las células que no invadieron el matrigel, se removieron suavemente con un bastoncillo de algodón. Las células embebidas en los insertos se fijaron con 250 μ L de solución de PFA al 3.7% y se dejó incubar durante 15 minutos. Luego, se lavaron las membranas con 200 μ L de

PBS 1X dos veces durante 5 minutos, para después permeabilizar las células con Tritón X-100 al 0.2% diluido en PBS 1X. Posteriormente, las membranas se separaron desde los insertos mediante un bisturí, para ser depositadas sobre un portaobjeto. Después, para marcar los núcleos celulares se adicionó sobre las membranas una gota de “*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI*” (cat N° P36935, *Thermo Fisher Scientific*, EE.UU.) y se montó con cuidado un cubre-objeto cuidando de no dejar burbujas. Se capturaron 10 imágenes por cada condición utilizando un microscopio de fluorescencia (*System Microscope BX53*, Olympus, Japón). Finalmente, se cuantificó el número de núcleos por campo mediante el “*software ImageJ*” (NIH, 1.47v, EE.UU.).

5.16.- Ensayo de exclusión por azul de tripán

Un número de 100.000 células se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio DMEN/F12 suplementado con BSA al 10%. A las 24 horas post-siembra comenzó la evaluación de la proliferación y viabilidad celular. Las células se lavaron con PBS 1X, se les adicionó 1 mL de tripsina 1X, y se dejó incubar durante 5 minutos a 37°C. Luego, en tubos de 15 ml se resuspendieron las células en medio DMEN/F12 suplementado con BSA al 10% (razón 1:1) y se sometieron a centrifugación. Posteriormente, el precipitado de células se resuspendió suavemente en 1 mL de medio DMEN/F12 fresco y en un tubo de 1,5 mL se mezclaron 15 µL del homogeneizado celular con 15 µL de azul de tripán (cat N° 25-900-CI, Corning, EE.UU.) al 0,4% (razón 1:1). A continuación, las células se contaron en el equipo “*Luna-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter*” (*Logos Biosystems*, Gyeonggi-do, Corea del sur), en duplicado, obteniendo el número de células vivas, células muertas y viabilidad celular expresada en porcentaje (%). Estos pasos se repitieron a las 48, 96 y 72 horas post-siembra.

5.17.- Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c NOD-SCID libres de patógenos de 12 semanas de edad. Los animales se obtuvieron desde “*Jackson Laboratories*” (Bar Harbor, Maine, EE.UU.) y se mantuvieron en el Bioterio de “*Andes Biotechnologies*”. Todos los procedimientos y condiciones experimentales se aprobaron por el Comité de Bioética local.

5.18.- Estudio de crecimiento de tumor *in vivo*

5.18.1.- Tratamiento de células para inoculación en animales

Las células MDA-MB-231 de la condición WT, Mock y ADAR1p110 (SE) se sembraron en frascos T150, y se cultivaron hasta que alcanzaron un máximo de 70% de confluencia. Después las células se levantaron con 2 ml de Tripsina 1X (cat N° 25-054-CI, Corning, EE.UU.) a 37°C, y para inactivar la enzima se utilizaron 4 ml de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con SBF al 10% (razón 2:1). Posteriormente, se depositaron las células en un tubo de 15 ml, y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Una vez obtenido el “*pellet*” celular, se lavó dos veces con NaCl al 0.9% estéril y subsecuentemente, las células se resuspendieron suavemente mediante pipeteo suave en la misma solución salina fisiológicamente estéril. A continuación, las células se contaron utilizando el equipo “*Luna-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter*” (*Logos Biosystems*, Gyeonggi-do, Corea del sur), en duplicado. Finalmente, se llevaron a una concentración de 2.5×10^6 de células/100 μ L de solución NaCl al 0,9% estéril.

5.18.2.- Evaluación del comportamiento tumoral en el tiempo

Los animales se distribuyeron aleatoriamente para formar tres condiciones de estudio según el tipo de células MDA-MB-231 (WT, Mock o ADAR1p110 (SE)) que fueron inoculadas en los animales. Los ratones se inocularon en el lomo subcutáneamente con 2.5×10^6 células homogeneizadas en 100 μ L de solución fisiológicamente estéril siguiendo el regular protocolo descrito por Lobos-González., et al 2014 (126), en ciego. La presencia de los tumores se detectó por palpación y luego utilizando un pie de metro digital se midió el diámetro largo y el diámetro corto de los tumores. El volumen de los tumores se determinó empleando la siguiente fórmula: Volumen Tumoral = ancho² \times largo \times $\pi/6$. Las recurrencias tumorales se detectaron mediante palpación de la misma manera que los tumores primarios.

5.18.3.- Evaluación de invasión celular en TSCs

Una vez desarrollados los tumores fueron evaluados periódicamente y cuando se observó en los TSCs los siguientes síntomas: crecimiento de la piel, pérdida de pelo y presencia de costra; los animales se anestesiaron con Ketamina/Xilacina (100:10 v/v), para extraer mediante cirugía los tumores. Después de efectuada la cirugía, los animales se trataron con medicación paliativa. Los animales se mantuvieron bajo estrecha observación y se realizaron todos los procedimientos de acuerdo con los criterios establecidos para los modelos de tumores *in vivo* (127-129). En consecuencia, los animales que presentaron señales de agresividad tumoral recibieron eutanasia antes del día 58 post-inoculación, día en que finalizó el estudio *in vivo*. Luego de eutanasiar los animales, se procedió a extraer los TSCs que no habían sido previamente retirados y con la finalidad de evaluar la invasión celular, por parte de las células tumorales hacia el epitelio del lomo de los animales, se realizó en ciego un análisis

histopatológico de tejido proveniente de los tumores primarios, a través, de tinciones de Hematoxilina/Eosina (H/E). Imagen de diagrama experimental obtenido desde <https://biorender.com/>

5.19.- Inmunohistoquímica

Una mitad de cada uno de los tumores se fijaron en solución de PFA al 4% y luego se embebieron en parafina. Brevemente, cortes de 5 µm de grosor se secaron a vapor a 60°C durante 1 hora, para luego desparafinarlas en xileno y re-hidratarla en una batería de alcoholes. Luego, se realizó la recuperación del antígeno utilizando la solución “*Target Retrieval*” (cat N° S1699, DAKO, EE.UU.) durante 20 minutos en vapor. Para neutralizar la peroxidasa endógena se trataron los tejidos con H₂O₂ al 0,3% diluido en PBS 1X durante 10 minutos, para después bloquear con una solución de suero normal de cabra al 2% (cat N° 71-00-27, KPL, EE.UU.), Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 30 minutos. Los cortes de tejido entre cada paso se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, las muestras se incubaron en anticuerpo primario toda la noche a 4°C (**Tabla 1**). Luego de lavar nuevamente los tejidos con PBS 1X, se incubaron con el anticuerpo secundario (**Tabla 2**) conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los cortes de tejido se lavaron, para obtener la marcación positiva usando el kit “*DAB Substrate Kit*” (cat N° ab94665, Abcam, EE.UU.). La co-tinción de los tejidos se realizó adicionando “*Contrast Blue*” (cat N° 71-00-06, KPL, EE.UU.). Finalmente, los tejidos se deshidrataron y los cubreobjetos se montaron con Entellan® (cat N° 1079610100, Sigma-Aldrich, EE.UU.).

5.19.1.- Análisis de las inmunotinciones

En la evaluación histológica de ADAR1 y Survivina, se utilizó un corte por cada muestra de tumor, y con la finalidad de estudiar la formación de vasos sanguíneos en los tumores primarios, se consideró examinar el marcador de angiogénesis, CD-31, en tres cortes provenientes de diferentes zonas del tejido: al inicio, al centro y al final de la muestra. En paralelo, se realizó un control negativo sin anticuerpo primario. Para cada IHQ de ADAR1 y de Survivina se capturaron 5 imágenes y para cuantificar CD-31 en todos los vasos sanguíneos generados en los tumores primarios, se obtuvieron 5 a 45 imágenes mediante el microscopio óptico “*Leica Microsystems CMS GmbH*” (DM1000 LED, Wetzlar, Germany). Adicionalmente, en el estudio de neoangiogénesis de los tumores primarios, se realizó una evaluación histopatológica para corroborar primero la existencia de los vasos y discriminar los vasos sanguíneos provenientes de los TSCs, de los vasos sanguíneos formados desde el propio tejido del animal (que circundan los TSCs) y que por lo tanto, fueron descartados del estudio. El análisis densitométrico se llevó a cabo mediante el “*software Image Pro Plus 6.0v*” (*Media Cybernetics Inc*, Inglaterra) y las imágenes representativas se capturaron con el escáner digital de diapositivas “*NanoZoomer XR*” (*Hamamatsu Photonics*, Japón).

5.20.- Análisis Estadísticos

Los análisis de los datos se realizaron utilizando el “*software Graph Pad Prism*” (Versión 7.02v). Los datos se presentan como valores medios de al menos tres experimentos independientes con S.D. o S.E.M. Los datos se analizaron primeramente con la prueba de “*Kolmogorov-Smirnov*” para establecer si la distribución de los datos era normal.

Posteriormente, si los datos eran no paramétricos se analizaron con la prueba de “*Mann-Whitney*”, mientras que los datos paramétricos se analizaron con la prueba-t pareada. Los comportamientos tumorales se estudiaron con ANOVA de una vía, seguido de la post-prueba de “*Tukey*” de múltiples comparaciones. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6. 1.- Objetivo específico 1. Estudiar *in vitro* la función de la isoforma p110 de ADAR1 como regulador positivo de β -catenina en células de cáncer de mama.

6.1.1.- Niveles de ADAR1 en líneas celulares representativas de distintos subtipos de cáncer de mama y regulación lentiviral de su expresión

Dado que nuestro estudio se centra en el rol que desempeña ADAR1 en el cáncer de mama triple negativo, si bien no formó parte de alguno de los objetivos específicos, consideramos relevante comenzar con la evaluación de la expresión de ADAR1 en diferentes líneas celulares que corresponden, a su vez, a distintos subtipos de cáncer de mama. Las líneas celulares utilizadas fueron la MCF-7 y ZR-75-1 (subtipo Luminal A) y MDA-MB-231 (subtipo TNBC).

En primer lugar, se aisló el ARN total y se encontró que el nivel de transcrito de ADAR1 usando RT-qPCR no varía entre una línea celular y otra (**Figura 9A**). Luego, usando extractos proteicos totales se estudió el nivel de la isoforma p110 de ADAR1 mediante *Western blot*. De forma similar a lo observado con el nivel de transcrito de ADAR1, el nivel proteico de ADAR1p110 no presenta una diferencia significativa entre los distintos tipos de líneas celulares evaluadas (**Figura 9B**).

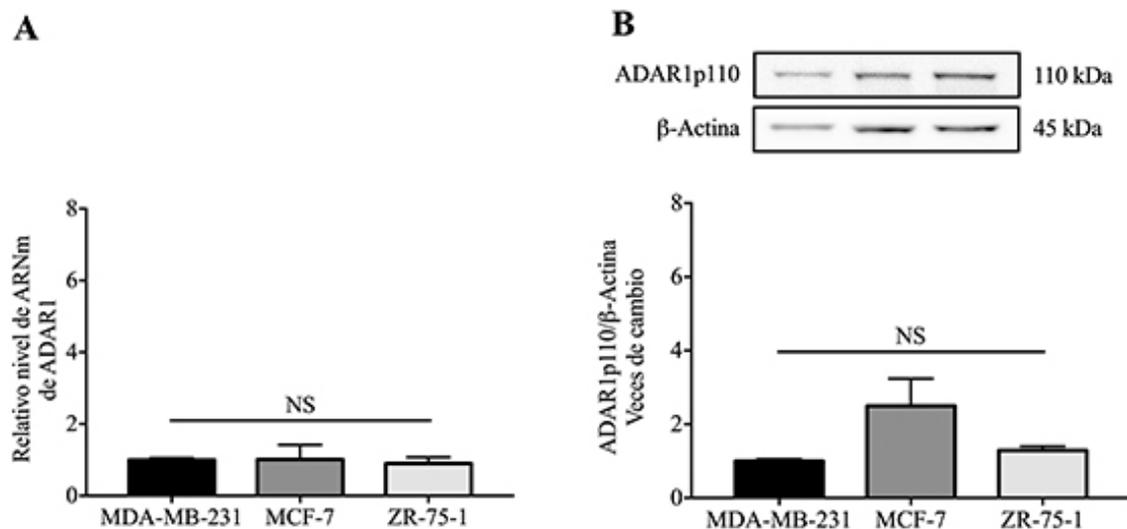


Figura 9: Caracterización de la expresión de ADAR1 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Se utilizaron células de cáncer de mama del subtipo triple negativo (MDA-MB-231) y Luminal A (MCF-7 y ZR-75-1), para aislar el ARN y extraer proteínas totales. **(A)** Análisis del nivel de transcrito de ADAR1, mediante RT-qPCR. Los resultados se normalizaron por la expresión de β -Actina usado como “housekeeping”. **(B)** Evaluación del nivel proteico de ADAR1p110, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó la proteína β -Actina como control de carga. Se muestran representativas *blots* sobre la gráfica que muestran el análisis de las densitometrías obtenidas en los *Western blot*. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativas a los valores obtenidos para la línea celular MDA-MB-231 \pm S.E.M de tres experimentos independientes (n = 3); análisis de *Kruskal-Wallis*, con post test de *Dunn's* ; NS: no se encontraron diferencias significativas.

Por otro lado, como ADAR1 posee dos isoformas en mamíferos, ADAR1p110 y ADAR1p150 (28), se analizó el nivel de transcrito de ambas isoformas de ADAR1 mediante RT-qPCR, no observándose cambios de ADAR1p110 en las distintas líneas celulares analizadas (**Figura 10A**). Sin embargo, el nivel de ADAR1p150 en las células MCF-7 es mayor en comparación al encontrado en células MDA-MB-231 (**Figura 10B**). En el caso de las células ZR-75-1, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ARNm de ADAR1p150 respecto a las otras líneas celulares evaluadas (**Figura 10B**).

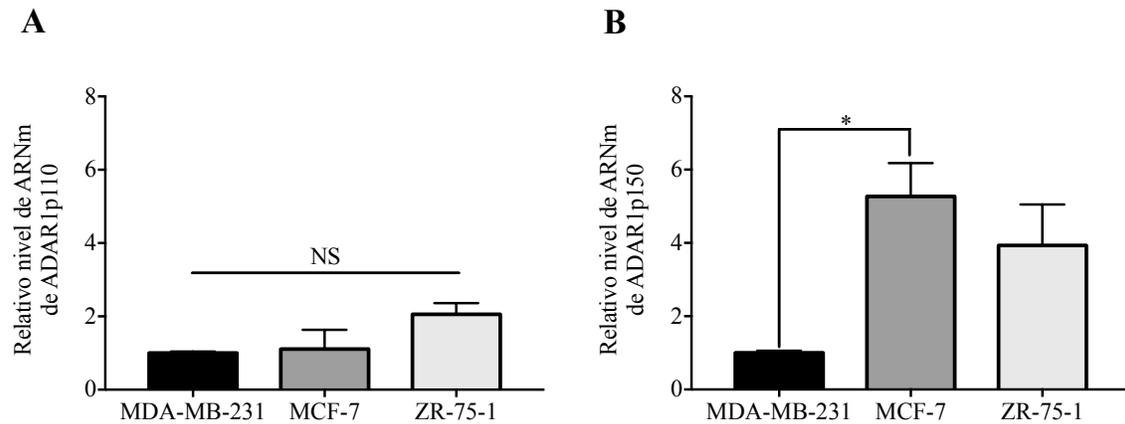


Figura 10: Determinación del transcrito de ADAR1p110 y de ADAR1p150 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Se aisló ARN total de células de cáncer de mama del subtipo triple negativo (MDA-MB-231) y Luminal A (MCF-7 y ZR-75-1), para evaluar el nivel de transcrito de ADAR1p110 (**A**), y de ADAR1p150 (**B**), por medio de RT-qPCR. Los resultados se normalizaron por la expresión de β -Actina usado como “housekeeping”. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos a los valores obtenidos en la línea celular MDA-MB-231 \pm S.E.M de al menos tres experimentos independientes (n = 3); *Kruskal-Wallis*, con post test de *Dunn`s*; NS: no se encontraron diferencias significativas.

6.1.2.- Determinación del nivel basal de ADAR1p110 y de ADAR1p150 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10

Como este estudio se focaliza en el cáncer de mama del subtipo triple negativo, decidimos usar la línea celular MDA-MB-231, que es un modelo ampliamente aceptado para estudiar este subtipo de cáncer de mama (130). Dado que no se observaron diferencias en la expresión de ADAR1p110 en las distintas líneas celulares de cáncer de mama evaluadas (**Figura 9B** y **Figura 10A**), decidimos extender nuestro estudio usando a modo de comparación una línea celular epitelial no tumoral (MCF-10). Mediante *Western blot* se encontró que el nivel de ADAR1p110 es mayor, en relación al contenido de ADAR1p150 en ambas líneas celulares (ver resultado en sección de Introducción, **Figura 5**). Luego, al comparar el nivel proteico de ADAR1p150 y de ADAR1p110 en ambos tipos celulares, encontramos que la línea de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 posee un menor contenido de ADAR1p150 y de ADAR1p110 en comparación a la línea no tumoral MCF-10 (**Figura 11A** y **11B**, respectivamente).

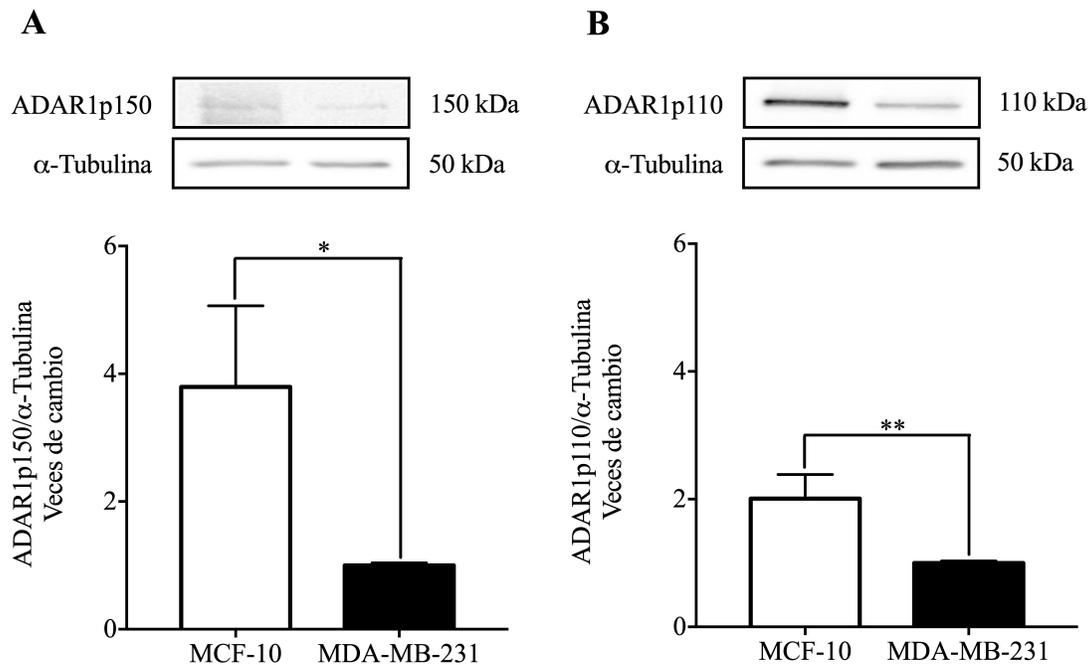


Figura 11: Determinación del nivel basal de la isoforma p150 y p110 de ADAR1 en diferentes líneas celulares de mama. Se determinó el nivel proteico de ADAR1p150 y de ADAR1p110 en la línea celular epitelial de mama MCF-10 (**A**) y en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (**B**), mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se utilizó la proteína α -Tubulina como control de carga. Se muestran *blots* representativos sobre cada una de las gráficas que muestran el análisis densitométrico de los *Western blot*. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos a las células MDA-MB-231 \pm S.E.M; en (**A**) de cuatro experimentos independientes (n = 4) y en (**B**) de cinco experimentos independientes (n = 5); * p < 0.05; ** p < 0.01; prueba de *Mann-Whitney*.

6.1.3.- Caracterización de la sobreexpresión de ADAR1p110 en el modelo celular MDA-MB-231

Con el objetivo de conocer el posible efecto de ADAR1p110 sobre la activación de β -catenina y considerando que su nivel proteico se encuentra disminuido en la línea tumoral MDA-MB-231 en relación a la línea no tumoral MCF-10, se sobreexpresó de forma estable ADAR1p110 mediante transducción lentiviral, generando dos líneas de MDA-MB-231: una que sobreexpresa ADAR1p110 (ADAR1p110 (SE)) y otra que fue transducida con el vector vacío que no codifica a la proteína ADAR1p110 (Mock), usada como control.

Para seleccionar las células que habían sido transducidas con el vector lentiviral, se suplementó el medio de cultivo con el antibiótico Blasticidina. De las células seleccionadas se aisló ARN total y extractos proteicos totales con la finalidad de evaluar la cantidad de ADAR1. De este modo, el aumento de ADAR1 fue confirmado por la cuantificación del nivel de transcrito mediante RT-qPCR (**Figura 12A**) y nivel proteico mediante *Western blot* (**Figura 12B**). Los datos mostraron que la sobreexpresión duplicó el nivel basal de ADAR1p110, tanto del transcrito como del proteico.

También, analizamos mediante microscopía de fluorescencia la localización de ADAR1, la cual ha sido ampliamente reportada que es principalmente a nivel nuclear (43, 44, 46). Como era de esperar, observamos que ADAR1 aumentó su localización en el núcleo y además el análisis densitométrico corroboró que es mayor en células ADAR1p110 (SE), respecto a las células Mock (**Figura 13**).

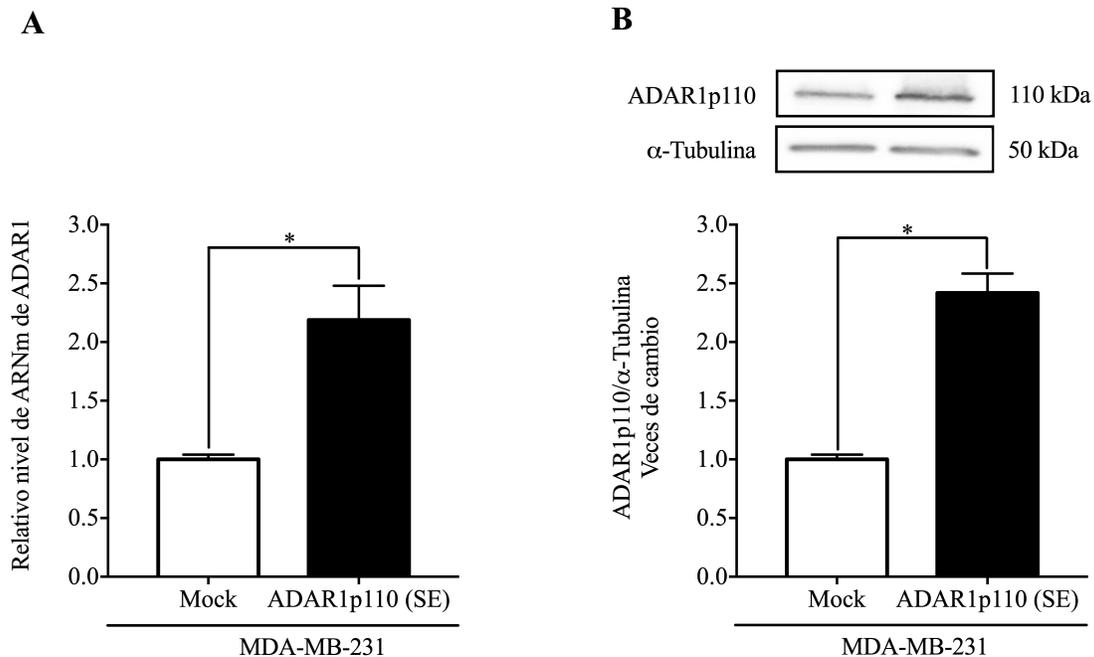


Figura 12: Determinación de la sobreexpresión de ADAR1p110 en la línea celular MDA-MB-231. Las células de cáncer de mama del subtipo triple negativo, MDA-MB-231, se transdujeron lentiviralmente con un vector control (Mock) o con un vector para sobreexpresar la isoforma p110 de ADAR1 (ADAR1p110 (SE)). Posteriormente, las células fueron seleccionadas con Blasticidina (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas (ver materiales y métodos). **(A)** Evaluación del nivel de transcrito de ADAR1, mediante RT-qPCR. Los resultados se normalizaron por la expresión de β -Actina usado como “housekeeping”. **(B)** Evaluación del nivel proteico de ADAR1p110, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó la proteína α -Tubulina como control de carga. Se muestran representativos *blots* sobre las gráficas que muestran el análisis de las densitometrías obtenidas en los *Western blot*. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativas al control Mock \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes (n = 4); * $p < 0.05$; prueba de *Mann-Whitney*.

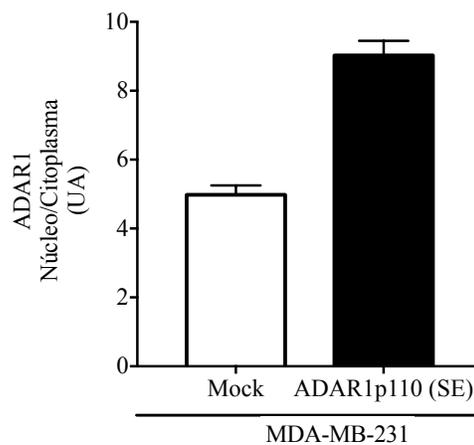
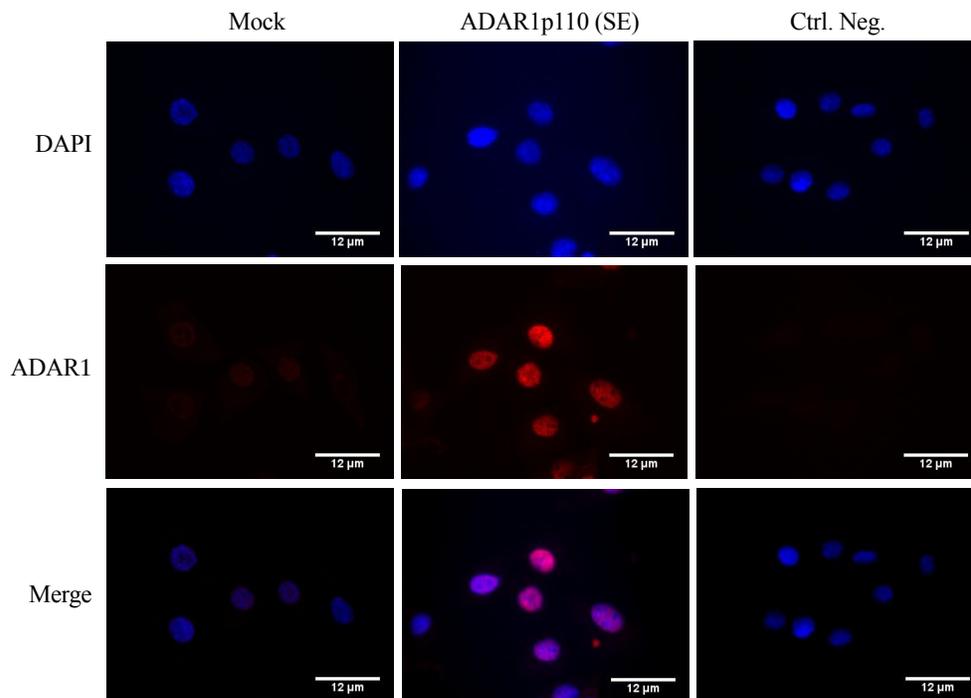


Figura 13: Localización celular de ADAR1 en células MDA-MB-231. Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudió la localización celular de ADAR1 en el citoplasma y núcleo de células MDA-MB-231 Mock y en células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). **(A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de ADAR1 mostrada en color rojo de un experimento independiente ($n = 1$). Los núcleos se tiñeron con DAPI y son visualizados en color azul. **(B)** Gráfica de la cuantificación densitométrica de la inmunofluorescencia de ADAR1 que muestra la razón Núcleo/Citoplasma como unidades arbitrarias (UA). Las imágenes se obtuvieron a 60X y la barra de escala corresponde a 12 μm .

6.1.4.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre componentes claves de la vía Wnt canónica

A continuación, para estudiar la activación de la vía Wnt canónica examinamos mediante *Western blot* la cantidad proteica relativa de algunos componentes claves que participan en esta vía de señalización, GSK-3 β y β -catenina, así como de AKT/PKB que es una enzima que inhibe la activación de GSK-3 β mediante fosforilación (131). En células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se observó que GSK-3 β disminuye respecto a las células Mock (**Figura 14A**), en cambio, el nivel de AKT total aumenta alrededor de 2 veces sobre el nivel basal detectado en células Mock (**Figura 14B**).

La sobreexpresión de ADAR1 no produjo cambios en el ARNm de β -catenina respecto a las células Mock (**Figura 15A**), sin embargo, generó el aumento de β -catenina total (**Figura 15B**). Luego, se analizó el nivel de β -catenina activa (ie. no fosforilada en los residuos de Ser37/Thr41) encontrándose un aumento de 1,7 veces en células ADAR1p110 (SE) respecto a células Mock (**Figura 15C**).

Por otro lado, se evaluó el impacto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la localización de β -catenina mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que la localización de β -catenina aumenta en el núcleo de células ADAR1p110 (SE) comparado a células Mock (**Figura 16**).

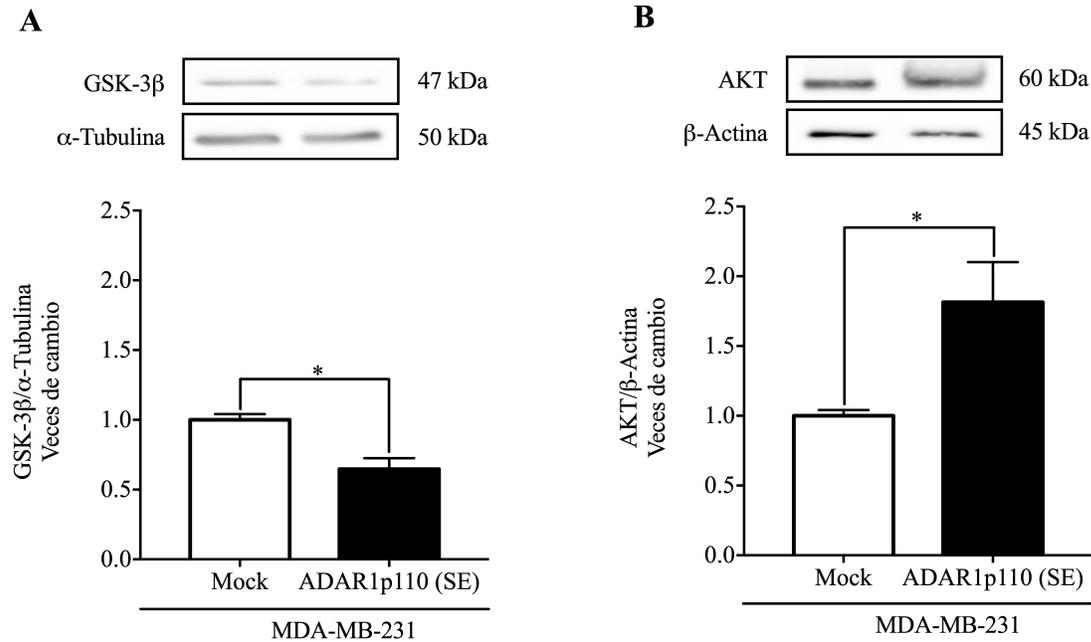


Figura 14: Aumento de ADAR1p110 induce cambios en el contenido proteico total de GSK-3 β y de AKT en la línea celular MDA-MB-231. En células MDA-MB-231 Mock y en células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se evaluó el nivel proteico de GSK-3 β (**A**) y de AKT total (**B**), mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó como control de carga la proteína α -Tubulina y β -Actina, respectivamente. Se presentan *blots* representativos sobre las gráficas que muestran el análisis densitométrico de los *Western blot* efectuados para cada una de las proteínas estudiadas. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos al control Mock \pm S.E.M; en (**A**) de cuatro experimentos independientes (n=4) y en (**B**) de tres experimentos independientes (n = 3); * p < 0.05; prueba de *Mann-Whitney*.

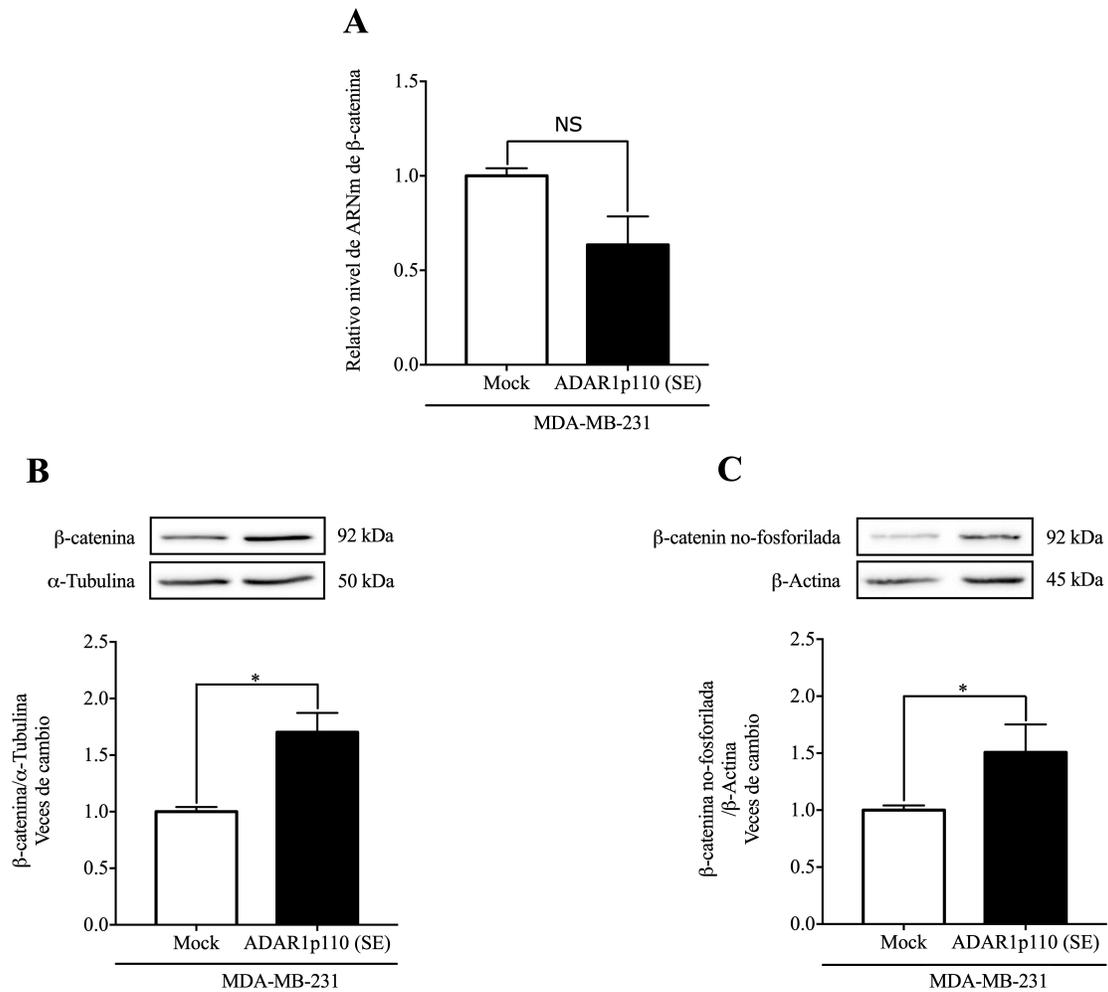


Figura 15: Sobreexpresión de ADAR1p110 promueve la activación de la vía de señalización Wnt/β-catenina en la línea celular MDA-MB-231. En células MDA-MB-231 control (Mock) y en células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se estudió la expresión de β-catenina. **(A)** Análisis mediante RT-qPCR del transcrito de β-catenina. Los datos se normalizaron por la expresión de β-Actina usado como “housekeeping”. **(B)** Estudio del nivel proteico de β-catenina total y de β-catenina no-fosforilada en **(C)**, mediante *Western blot* usando como control de carga la proteína α-Tubulina y β-Actina, respectivamente. Se presentan *blots* representativos sobre las gráficas que muestran el análisis densitométrico de los *Western blot* efectuados para cada una de las proteínas estudiadas. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos al control Mock ± S.E.M de cuatro experimentos independientes (n = 4); **(A)**, no significancia (NS), $p > 0.05$, prueba t pareado; **(B)** y **(C)**, * $p < 0.05$, prueba de *Mann-Whitney*.

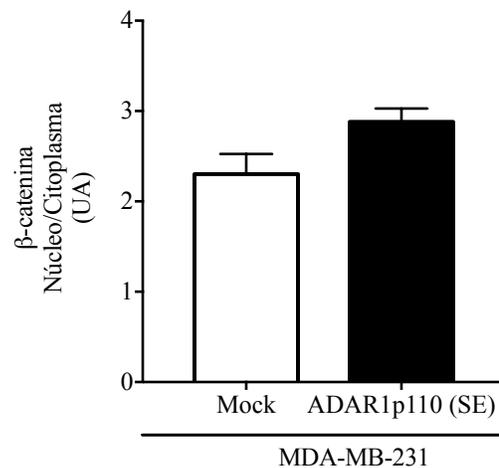
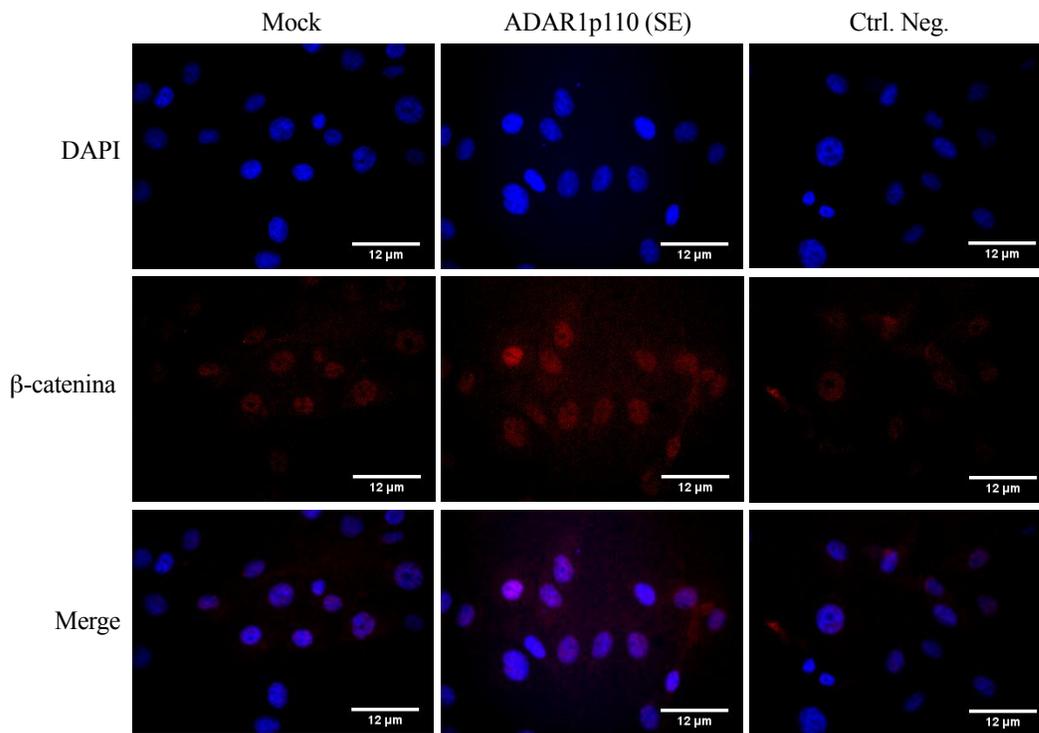


Figura 16: Localización celular de β -catenina en células MDA-MB-231. Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudió la localización celular de β -catenina en el citoplasma y núcleo de células MDA-MB-231 Mock y en células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). **(A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de β -catenina mostrada en color rojo de un experimento independiente ($n = 1$). Los núcleos se tiñeron con DAPI y son visualizados en color azul. **(B)** Gráfica de la cuantificación densitométrica de la inmunofluorescencia de β -catenina que muestra la razón Núcleo/Citoplasma como unidades arbitrarias (UA). Las imágenes se obtuvieron a 60X y la barra de escala corresponde a 12 μ m.

6.1.5.- Efecto del silenciamiento de ADAR1p110 sobre β -catenina en células MDA-MB-231

Para estudiar el efecto de la disminución intracelular de ADAR1 sobre el contenido de β -catenina total, las células MDA-MB-231 se transdujeron de forma estable por medio de vectores lentivirales que expresan “*short hairpin RNA*” (shRNA) dirigidos contra el ARNm de ADAR1. Como control negativo se usó un vector lentiviral que codifica un shRNA “*scramble*” (shControl). Una vez las células fueron transducidas, se seleccionaron suplementando el medio de cultivo con el antibiótico Puromicina y posteriormente se realizó un “*Cell Sorting*” de las células que sobrevivieron al antibiótico, monitoreando la presencia de la proteína fluorescente roja RFP (“*Red fluorescent protein*”) expresada por los vectores lentivirales.

Para determinar el porcentaje de silenciamiento de ADAR1 se realizaron *Western blots*, obteniéndose una reducción de un 42% y 34% con el uso de shRNA#1 y shRNA#2, respectivamente (**Figure 17**).

El silenciamiento de ADAR1 obtenido de forma independiente por cada shRNA generó alrededor de un 45% de disminución en el nivel de β -catenina total respecto a células shControl (**Figura 18**).

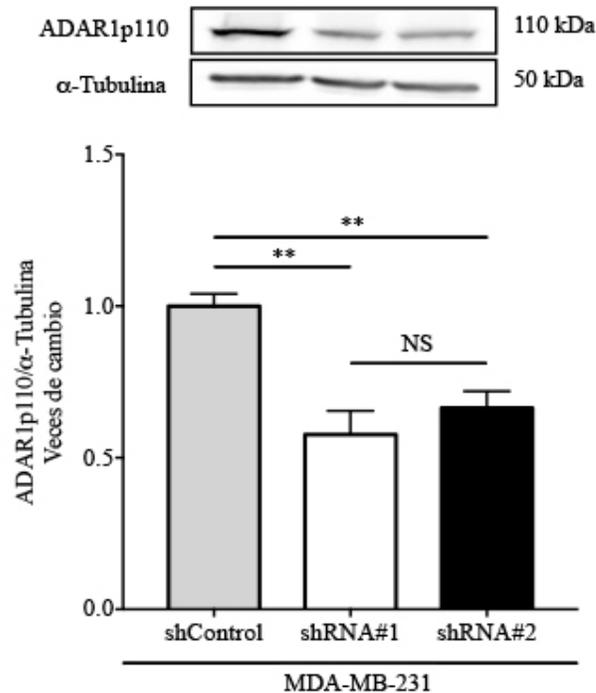


Figura 17: Evaluación del silenciamiento de ADAR1p110 en la línea celular MDA-MB-231. Las células de cáncer de mama del subtipo triple negativo, MDA-MB-231, se transdujeron lentiviralmente con un vector control (shControl) o con vectores que codifican “short hairpin RNA” (shRNA#1 y shRNA#2) para silenciar el transcrito de ADAR1. Posteriormente, las células fueron seleccionadas con Puomicina (1,5 μ g/mL) durante 48 horas y luego sorteadas mediante citometría de flujo (ver materiales y métodos). La evaluación del nivel proteico de ADAR1p110 se realizó usando extractos proteicos totales, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó la proteína α -Tubulina como control de carga. Se muestran representativas *blots* sobre las gráficas que muestran el análisis de las densitometrías obtenidas en los *Western blot*. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativas a la condición shControl \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes (n = 4); No se encontraron diferencias (NS) entre las distintas condiciones, $p > 0.5$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*.

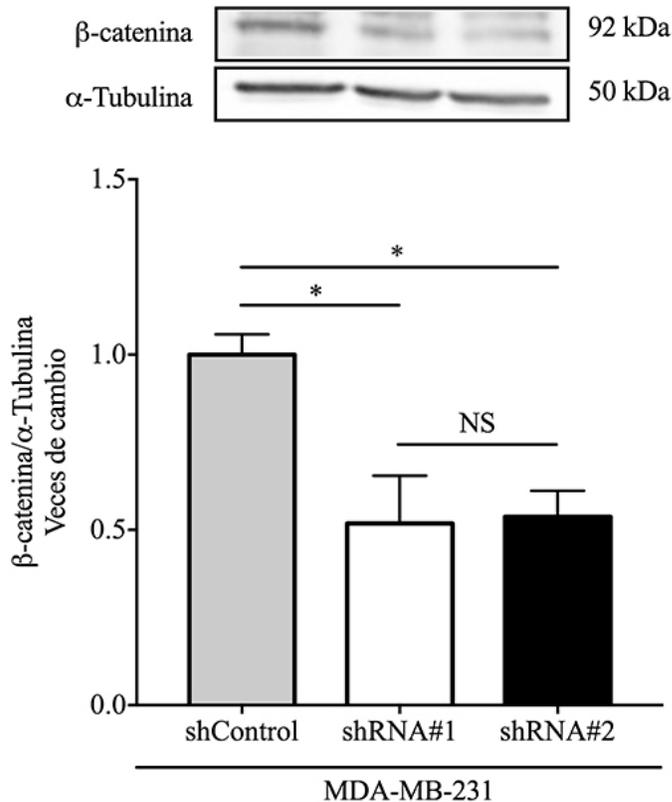


Figura 18: El “knockdown” de ADAR1 genera disminución en el nivel proteico de β -catenina en la línea celular MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231, se transdujeron lentiviralmente con un vector control (shControl) o con vectores que codifican un “*short hairpin RNA*” (shRNA#1 y shRNA#2) para silenciar el ARNm de ADAR1. Posteriormente, las células fueron seleccionadas con Puromicina (1,5 µg/mL) durante 48 horas y luego sorteadas mediante citometría de flujo (ver materiales y métodos). Se analizó del nivel proteico de β -catenina, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó la proteína α-Tubulina como control de carga. Se muestran representativos *blots* sobre las gráficas que muestran el análisis de las densitometrías obtenidas en los *Western blot*. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativas a la condición shControl ± S.E.M de cuatro experimentos independientes (n = 3); No se encontraron diferencias (NS) entre las distintas condiciones, $p > 0.5$; * $p < 0.05$, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*.

6.1.6.- La sobreexpresión de ADAR1p110 induce la activación de β -catenina en células MDA-MB-231

Para confirmar la activación de β -catenina, analizamos su actividad co-transcripcional utilizando el ensayo reportero de luciferasa TOP/FOP. Antes de realizar este experimento en células que sobreexpresan ADAR1p110 se estandarizó el ensayo reportero.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de transfección de las células MDA-MB-231 usando distintas cantidades (1000, 1500 y 2000 ng) del plásmido que codifica para la expresión de la proteína fluorescente verde GFP (pGFP) empleando como método de transfección el agente Lipofectamina (ver Materiales y Métodos). Luego, para evaluar la eficiencia de transfección se examinó la expresión de GFP 48 horas post-transfección mediante microscopía de fluorescencia. En las imágenes es posible observar que las células MDA-MB-231 se transfectaron eficientemente usando distintas cantidades de plásmido (**Figura 19A**).

Dado que el ensayo reportero TOP/FOP consiste en transfectar las células de forma independiente con los plásmidos TOP-Flash y FOP-Flash, además se debe usar como control interno de transfección otro plásmido reportero que dará cuenta si en cada condición las células han sido transfectadas de forma similar. El plásmido pRL-TK expresa la proteína Renilla Luciferasa y fue usado como control interno en las co-transfecciones. Similarmente a la transfección con pGFP, las células MDA-MB-231 se transfectaron usando diferentes cantidades de pRL-TK (100, 200 y 400 ng), para luego medir la luminiscencia de Renilla Luciferasa en 20, 40 y 60 μ L de extractos proteicos totales. Se detectaron valores de luminiscencia muy reducidos usando 20 μ L de extracto proteico, en cambio, con 40 y 60 μ L se

determinaron valores mayores de luminiscencia en forma creciente según la cantidad de pRL-TK transfectado (**Figura 19B**).

A continuación, se realizó un control positivo del ensayo reportero TOP/FOP transfectando las células de forma independiente con 1200 ng de TOP-Flash y de FOP-Flash, usando para la co-transfección 200 ng de pRL-TK. También se transfectaron las células MDA-MB-231 de forma independiente únicamente con 1200 ng de pGFP para medir posteriormente la eficiencia de transfección.

A las 24 horas post-transfección se le adicionó al medio de cultivo 20 μ M de SB-216763, un inhibidor de GSK-3 β , evitando de este modo la degradación de β -catenina por fosforilación en Ser33 y Ser37 (132). Como control del ensayo TOP/FOP se trataron las células usando el vehículo DMSO.

La eficiencia de transfección evaluada por la emisión de fluorescencia de GFP fue de alrededor de un 50% (**Figura 19C**), detectando un aumento en la luminiscencia de la luciferasa, enzima expresada a partir del plásmido reportero TOP-Flash en las células tratadas con el inhibidor SB-216763, en comparación a la condición control (DMSO) a las 24 h y 48 h post-tratamiento (**Figura 19D**).

Una vez estandarizado el ensayo reportero de luciferasa TOP/FOP evaluamos si la sobreexpresión de ADAR1p110 induce un posible aumento en la actividad co-transcripcional de β -catenina. La eficiencia de co-transfección del ensayo fue mayor a un 50% (**Figura 20A**). El análisis de la actividad luciferasa entregó como resultado que la sobreexpresión de ADAR1p110 indujo sobre un 20% la actividad co-transcripcional de β -catenina comparado con células Mock (**Figura 20B**). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de

ADAR1p110, además de promover la translocación de β -catenina al núcleo (ver **Figura 16**), provoca un aumento de su actividad co-transcripcional.

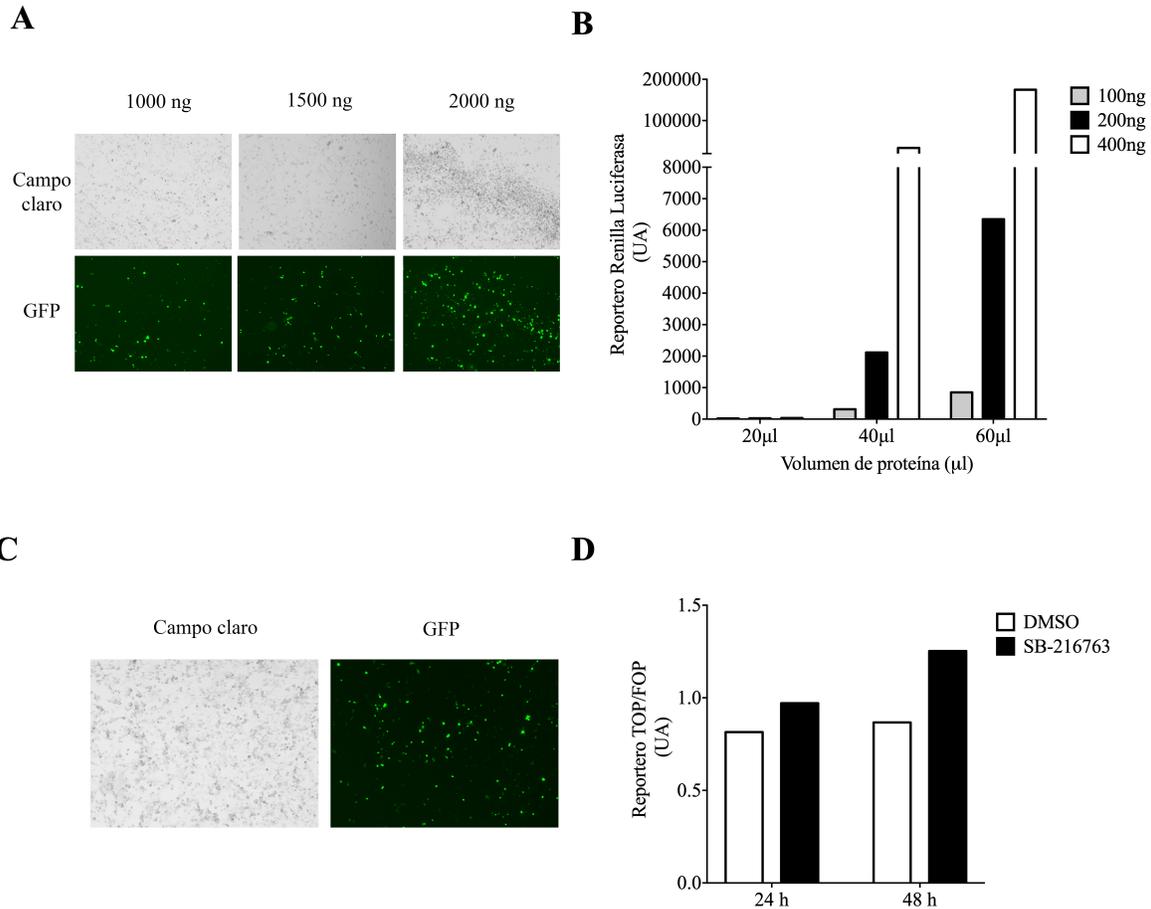


Figure 19: Estandarización de ensayo reportero luciferasa TOP/FOP en células MDA-MB-231. (A) Eficiencia de transfección en células MDA-MB-231. Las células se transfectaron con el plásmido de expresión de GFP (pGFP) en distintas cantidades (1000 ng, 1500 ng y 2000 ng) por separado. Luego de 48 horas (h) post-transfección se examinó la emisión de fluorescencia en células de color verde que expresan GFP, en comparación a las células mostradas en campo claro. (B) Evaluación de transfección en células MDA-MB-231 con el plásmido pRL-TK. Se transfectaron células con 100, 200 y 400 ng del plásmido pRL-TK por separado usando distintos volúmenes de extractos proteicos (20, 40 y 60 μL). Luego de 48 h post-transfección se examinó la luminiscencia producida por la actividad de Renilla luciferasa expresada en unidades arbitrarias (UA). (C) Eficiencia de transfección de ensayo reportero TOP/FOP. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con 1200 ng de pGFP y luego de 48 h post-transfección se examinó la emisión de fluorescencia. (D) Control positivo del ensayo reportero luciferasa TOP/FOP. Las células se transfectaron con 1200 ng de los plásmidos TOP-Flash y FOP-Flash y a las 24 h de post-transfección, las células se trataron con 20 μM de SB-216763 usando como control interno DMSO. La luminiscencia de la luciferasa se midió a las 24 h y 48 h post-tratamiento las que se normalizaron con la luminiscencia de Renilla expresada en UA. Las imágenes se capturaron a 4X y cada una de las mediciones se efectuó en triplicados técnicos.

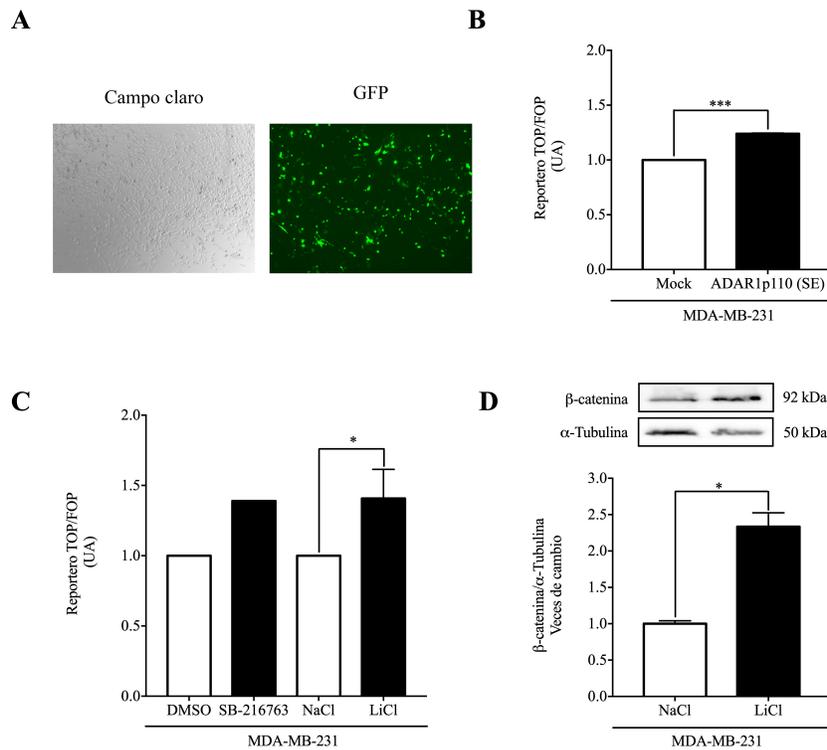


Figure 20: Sobreexpresión de ADAR1p110 promueve la actividad co-transcripcional de β -catenina en células MDA-MB-231. (A) Eficiencia de transfección de ensayo reportero TOP/FOP. Se muestra una imagen representativa de la co-transfección de pGFP/pRL-TK. En color verde se muestran las células que expresan GFP, en comparación de las células mostradas en campo claro. Las imágenes se capturaron a 4X. (B) Ensayo reportero luciferasa TOP/FOP. Las células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se transfectaron con los plásmidos TOP-Flash y FOP-Flash, a su vez, se co-transfectaron con el plásmido de pRL-TK usado como normalizador de las transfecciones. Luego de 48 h post-transfección se analizaron las luminiscencias para obtener la razón de TOP/FOP expresado en unidades arbitrarias (UA). Las mediciones de luminiscencia se realizaron en triplicados técnicos y los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos al control Mock \pm S.D de tres experimentos independientes ($n = 3$), *** $p < 0.05$, prueba t pareado. En el gráfico la S.D es un valor bajo, por lo que las desviaciones son imperceptibles. (C) Ensayo reportero luciferasa TOP/FOP en células MDA-MB-231 estimuladas con 20 μ M de SB-216763 y 25 mM de LiCl. Los resultados son expresados como TOP/FOP (UA) y los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos a sus respectivos controles internos (DMSO y NaCl, respectivamente) \pm S.D, con $n = 2$ para el inhibidor SB-216763 y $n = 3$ para el inhibidor LiCl, * $p < 0.05$, prueba t pareado. (D) Estudio del nivel proteico de β -catenina total en células MDA-MB-231 tratadas con LiCl mediante *Western blot* usando como control de carga α -Tubulina. Se presentan *blots* representativos sobre la gráfica que muestran el análisis densitométrico de los *Western blot* efectuados. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos al control Mock \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes ($n = 4$); * $p < 0.05$, prueba de *Mann-Whitney*.

En el ensayo TOP/FOP se utilizaron como controles positivos dos inhibidores de GSK-3 β , LiCl y SB-216763 (124). Con 25 mM de LiCl y 20 μ M de SB-216763 se alcanzó una activación de un 39 y 41%, respectivamente (**Figura 20C**). También, se examinó el nivel de β -catenina en extractos proteicos totales de células MDA-MB-231 tratadas con 25 mM LiCl, encontrándose que este inhibidor incrementa alrededor del doble el nivel de β -catenina respecto al nivel basal en las células tratadas con NaCl (**Figura 20D**).

6.1.7.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre algunos blancos de la vía Wnt canónica

El siguiente paso fue evaluar el contenido proteico de algunos de los blancos conocidos de la vía Wnt canónica. A través de *Western blot* se examinó el nivel basal de Survivina (**Figura 21A**) y de Snail (**Figura 21B**) en extractos proteicos totales obtenidos desde células MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1. La **Figura 21A** muestra que el nivel proteico de Survivina no varía entre una línea celular y otra. Contrariamente a Survivina, la proteína Snail fue prácticamente solo detectada en la línea celular ZR-75-1, siendo indetectable en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 (**Figura 21B**).

Dado que Snail fue indetectable en la línea MDA-MB-231, para evaluar el efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre los blancos de la Vía Wnt canónica, se consideró analizar además otros dos blancos de esta vía, Ciclina D1 (88) y c-Myc (89).

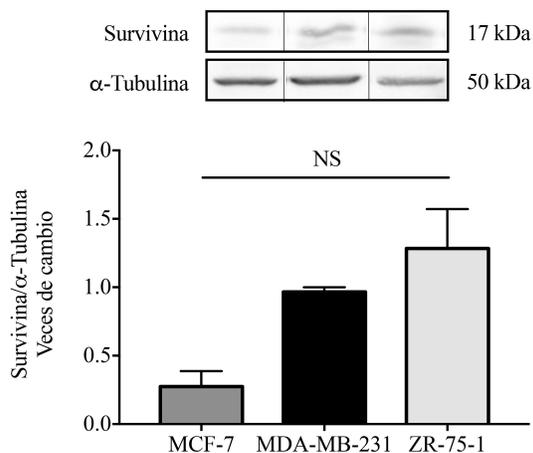
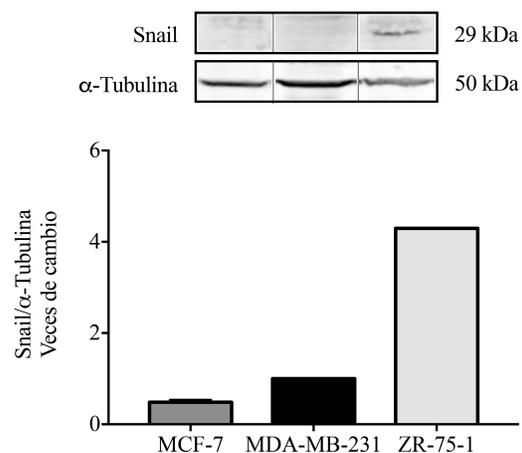
A**B**

Figura 21: Estudio de niveles basales de Survivina y de Snail en distintas líneas celulares de cáncer de mama. Se analizó el nivel proteico de Survivina (**A**) y de Snail (**B**) en las líneas celulares: MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1, mediante *Western blot*. Se utilizó la proteína α -Tubulina como control de carga, para normalizar los resultados. Se muestran *blots* representativos sobre las gráficas. Los valores corresponden a experimentos independientes de $n = 3$ en (**A**) y de $n = 2$ en (**B**), expresados como el promedio \pm S.E.M; análisis de *Kruskal-Wallis*, con post test de *Dunn`s*; NS: no se encontraron diferencias significativas.

Así, la sobreexpresión de ADAR1p110 indujo un aumento significativo de Survivina, Ciclina D1 y c-Myc en comparación a las células Mock (**Figura 22**). Colectivamente, estos resultados sugieren que ADAR1p110 podría actuar como un modulador positivo de la vía Wnt canónica en TNBC.

6.1.8.- Efecto del silenciamiento de ADAR1 sobre blancos de la vía Wnt canónica

El silenciamiento de ADAR1 mediante dos “*short hairpin RNA*” (shRNA#1 y shRNA#2) dirigidos contra el ARNm de ADAR1 mostró que la disminución de ADAR1 genera la reducción de Survivina y c-Myc con ambos shRNAs, mientras que solo shRNA#2 produjo la disminución del contenido proteico de Ciclina D1 comparado a las células shControl (**Figura 23**). En las células transducidas con el vector que expresa el shRNA#1 se observó una tendencia a la disminución de Ciclina D1, pero sin diferencia estadísticamente significativa (**Figura 23**).

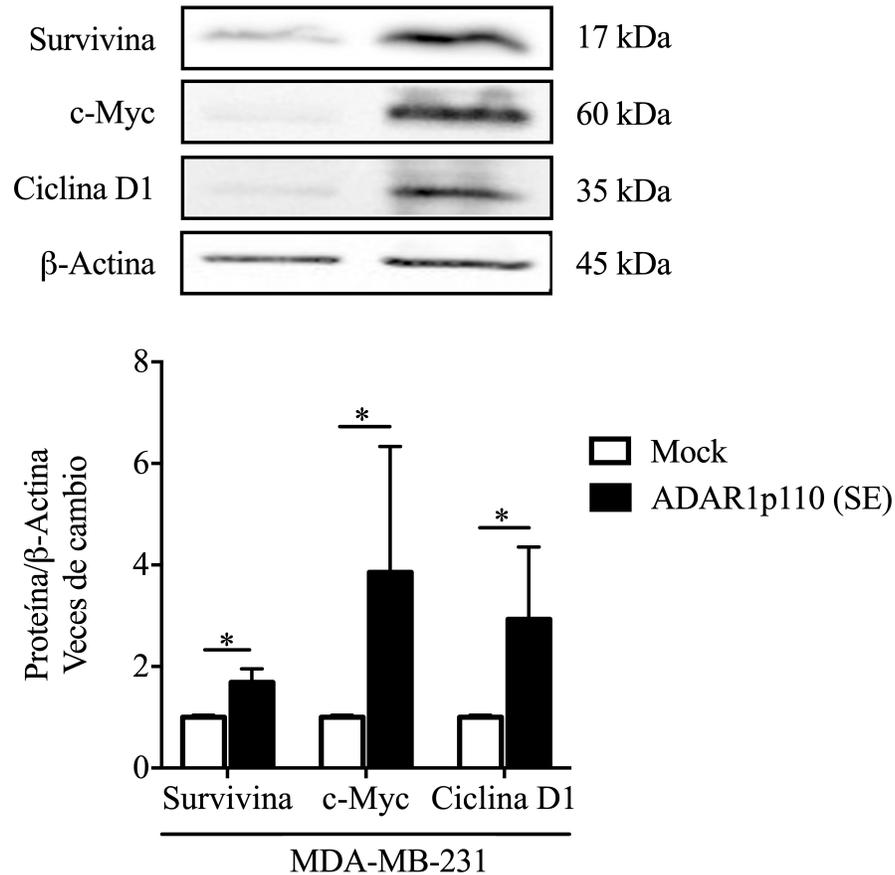


Figura 22: Incremento de ADAR1p110 induce la activación de vía de señalización Wnt/ β -catenina en la línea celular MDA-MB-231. En células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se evaluó el nivel proteico de Survivina, c-Myc y Ciclina D1, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó como control de carga la proteína β -Actina. Se presentan *blots* representativos sobre la gráfica que muestra el análisis densitométrico de los *Western blot* efectuados para cada una de las proteínas estudiadas. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos al control Mock \pm S.E.M en cuatro experimentos independientes (n = 4); * p < 0.05; prueba de *Mann-Whitney*.

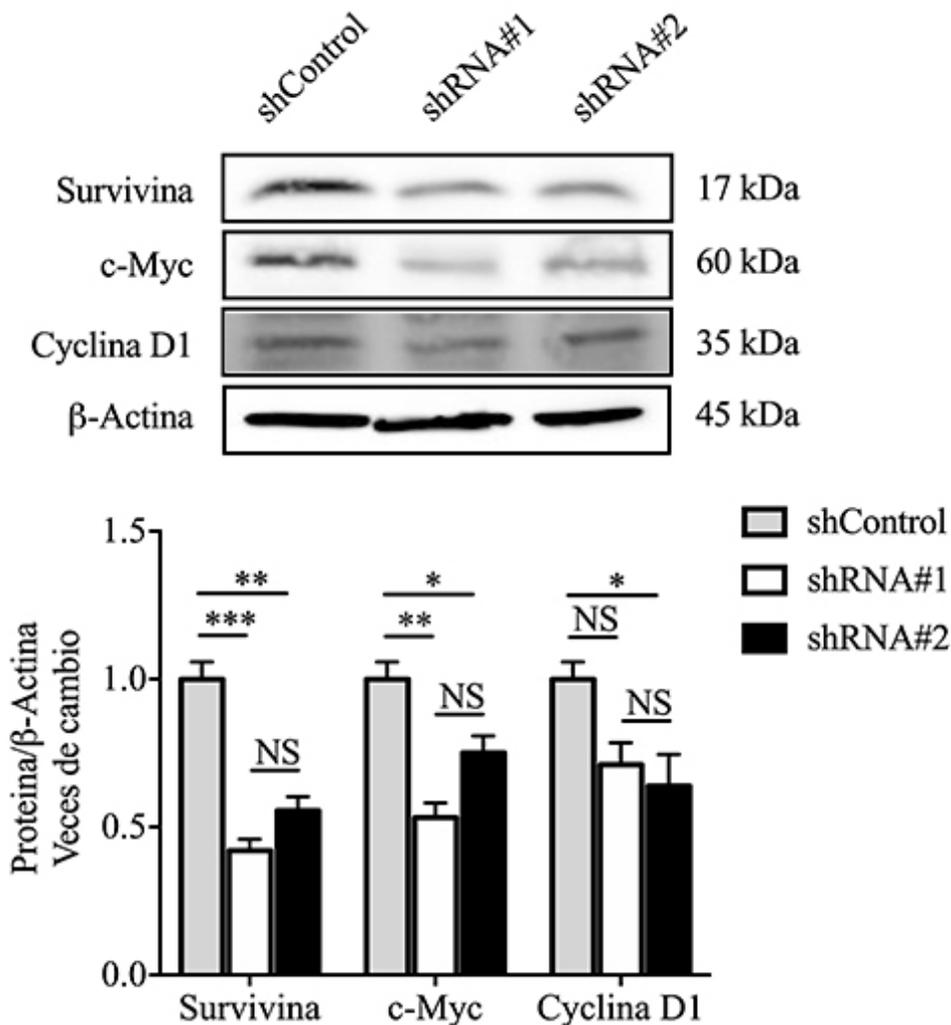


Figura 23: El “*knockdown*” de ADAR1 en la línea celular MDA-MB-231 induce la **disminución en el nivel proteico de algunos blancos de la Vía Wnt canónica**. En células MDA-MB-231 transducidas con un vector lentiviral control (shControl) y células MDA-MB-231 transducidas con un vectores que expresan de forma independiente dos shRNAs (shRNA#1 y shRNA#2) contra el ARNm de ADAR1 se evaluó el nivel proteico de Survivina, c-Myc y Ciclina D1, mediante *Western blot*. Para normalizar los resultados se usó como control de carga la proteína β -Actina. Se presentan *blots* representativos sobre la gráfica que muestra el análisis densitométrico de los *Western blot* efectuados para cada una de las proteínas estudiadas. Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativos a la condición shControl \pm S.E.M en tres experimentos independientes (n = 3); NS: no se encontraron diferencias entre las distintas condiciones; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*.

6.2.- Objetivo específico 2. Evaluar el efecto *in vitro* de ADAR1p110 en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis en células de cáncer de mama triple negativo.

6.2.1.- Viabilidad en células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110

Se exploró el efecto que podría ejercer la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la viabilidad celular mediante ensayo de exclusión del colorante azul tripán. Las **Figuras 24A y 24B** muestran el número de células vivas y muertas, es decir, aquellas que dependiendo de su membrana celular son capaces de excluir o permear el ingreso del colorante azul tripán, respectivamente, a las 24, 48, 72 y 96 h. En estas condiciones las células no presentaron cambios en viabilidad comparado a la condición control (Mock).

Por otro lado, la viabilidad celular a los diferentes tiempos de estudios se evaluó en el ensayo de exclusión del colorante azul tripán mediante un equipo automatizado (ver materiales y métodos) no encontrándose tampoco cambios significativos entre las dos condiciones estudiadas (**Figura 24C**).

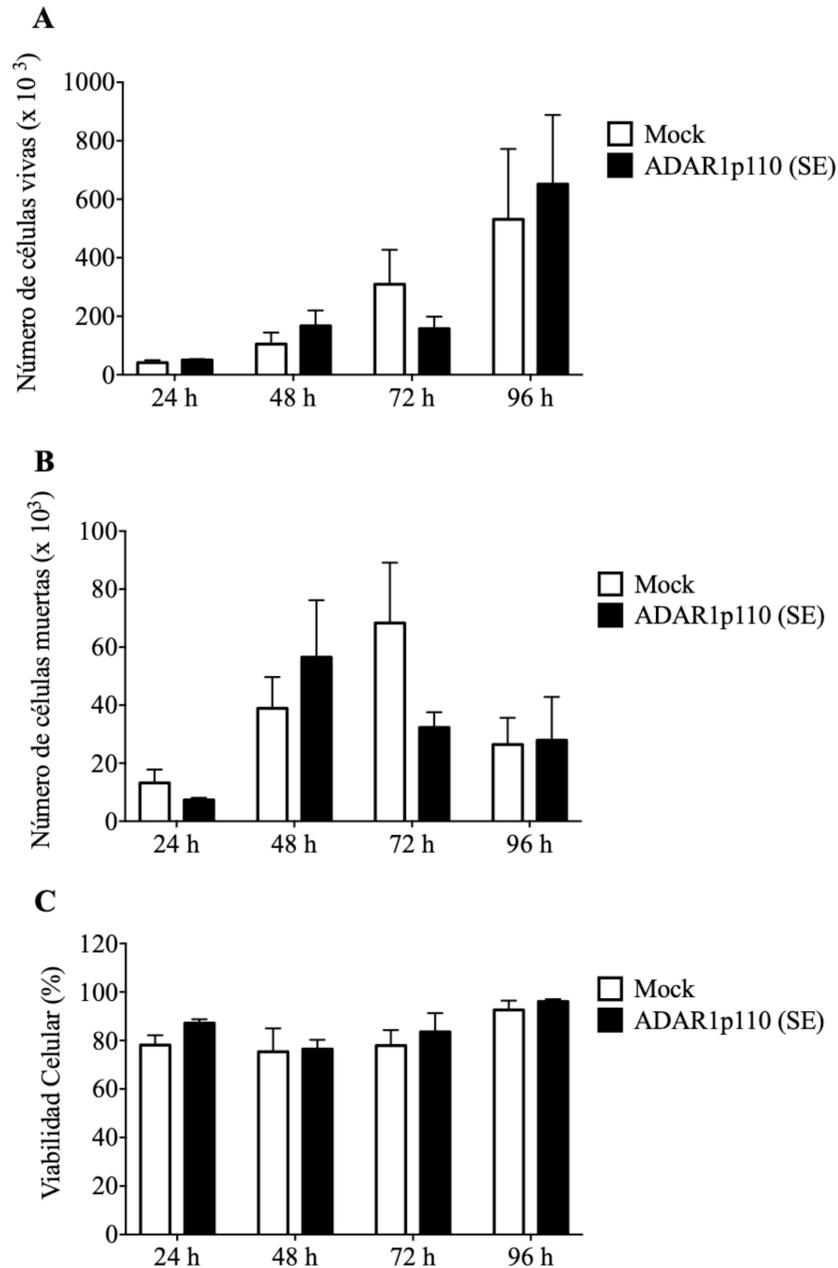


Figura 24: Células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110 no presentan cambios en la proliferación celular. Las células MDA-MB-231 Mock y MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se cultivaron en medio DMEN/F12 suplementado con BSA al 10% y a las 24, 48, 72 y 96 horas (h) post-siembrar se tiñeron con azul de tripán para evaluar: **(A)** el número de células vivas, **(B)** el número de células muertas y **(C)** la viabilidad celular expresada en porcentaje (%). Para cada tiempo de estudio las células se contaron por duplicado (ver materiales y métodos). Los datos son expresados como el promedio \pm S.E.M, de tres experimentos independientes ($n = 3$); $p > 0.05$; análisis ANOVA de dos vías, con post-test de *Sidak*.

6.2.2.- Regulación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre el contenido proteico de Cadherina-11

E-cadherina es una glicoproteína de transmembrana que interactúa con β -catenina en la membrana celular conformando las uniones adherentes que permiten la interacción célula-célula en el tejido epitelial (133). La pérdida de expresión de E-cadherina ha sido ampliamente reportada en la transición desde un tejido normal a uno de carcinoma indiferenciado (102, 133, 134). De este modo, la pérdida de E-cadherina resulta en la disminución de la densidad de uniones adherentes favoreciendo la migración celular (133).

Se procedió a estudiar mediante *Western blot* el nivel proteico de E-cadherina en distintas líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1) obteniendo niveles cuantificables de E-cadherina en las líneas MCF-7 y ZR-75-1. Al contrario, E-cadherina en la línea MDA-MB-231 no fue detectada con el anticuerpo primario utilizado (**Figura 25A**). La ausencia de E-cadherina en células MDA-MB-231 es un resultado consecuente con lo reportado en la literatura, la cual señala que el promotor se encuentra metilado y en consecuencia esta proteína no se expresa (135).

La carencia de E-cadherina nos llevó a estudiar el nivel proteico de otra molécula de adhesión, Cadherina-11, que es regulada por GSK-3 β en células de cáncer de mama (136). En células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se encontró un nivel de Cadherina-11 reducido en comparación a las células Mock (**Figura 25B**).

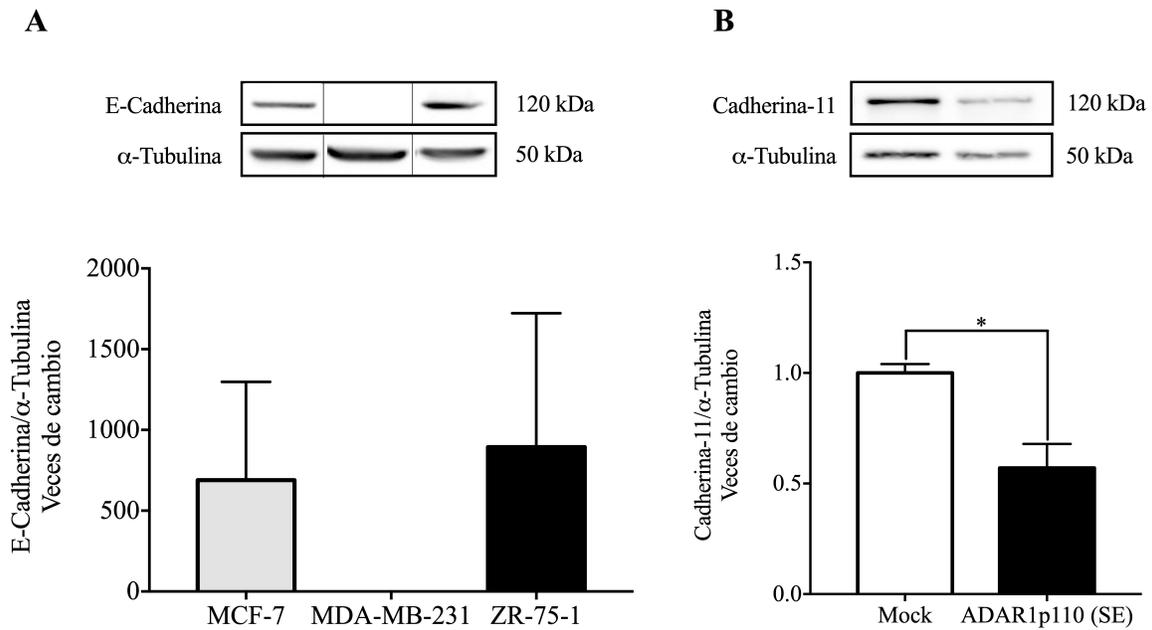


Figura 25: Análisis de E-cadherina y de Cadherina-11 en cáncer de mama. (A) Mediante *Western blot* se analizó el nivel basal de E-cadherina en las líneas celulares: MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1, de tres experimentos independientes (n = 3). **(B)** Estudio de nivel proteico de Cadherina-11 en células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) analizado mediante *Western blot* en cuatro experimentos independientes (n = 4). Para normalizar los resultados se utilizó la proteína α -Tubulina como control de carga. Se presentan representativos *blots* sobre las gráficas que muestran el análisis de la cuantificación densitométrica de los *Western blot* realizados para cada una de las proteínas analizadas. Los datos son expresados como el promedio \pm S.E.M, en **(A)** análisis de *Kruskal-Wallis*, con post test de *Dunn's* y en **(B)** * p < 0.05; prueba de *Mann-Whitney*.

6.2.3.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la migración celular

Primero se estudió la capacidad de migración basal de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. Esta se evaluó mediante ensayos de cierre de herida *in vitro* donde las heridas se realizaron una vez formada la monocapa celular usando la punta de pipeta y se capturaron imágenes a las 0, 6, 8, 12 y 24 h.

En la **Figura 26A** se puede observar una tendencia al aumento de la migración celular a las 24 h en las células MDA-MB-231, aunque no presentó diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, en células MCF-7 se encontró un aumento significativo de la migración a las 24 h respecto a la medida a las 6 h (**Figura 26B**).

Después de determinada la migración basal de las células MDA-MB-231, se realizaron ensayos de cierre de herida usando la línea celular MDA-MB-231 que sobreexpresa ADAR1p110, utilizando como control células Mock y células WT o no transducidas. Las imágenes se capturaron a las 6, 8 y 12 h post-herida, encontrándose desde las 6 h una mayor tendencia a la migración en células que sobreexpresan ADAR1p110 en comparación a las células Mock y WT (**Figura 27**).

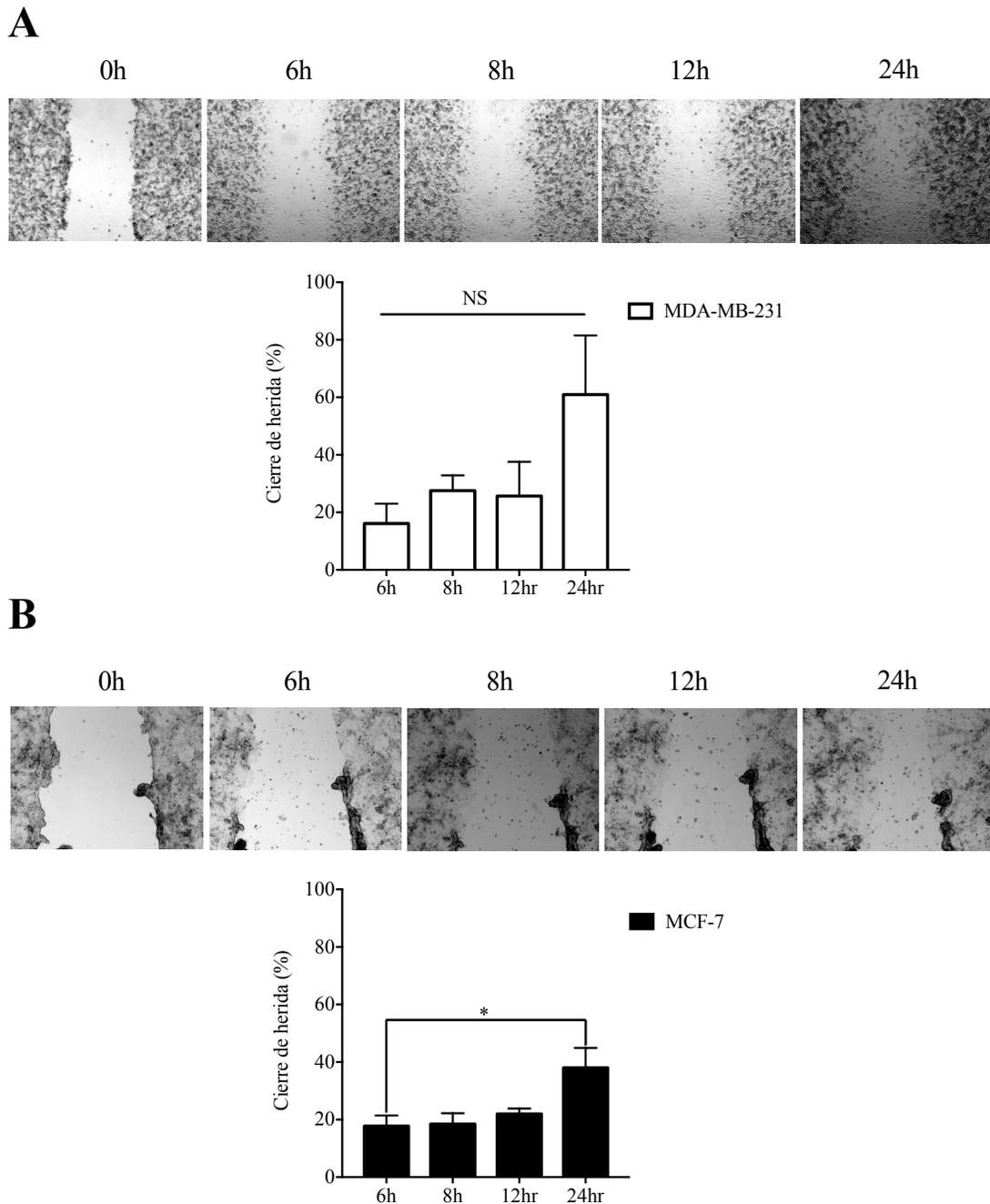


Figura 26: Migración basal de células MDA-MB-231 y MCF-7. Las células se cultivaron en medio DMEN/F12 suplementado con BSA al 1%. Cuando alcanzaron alrededor de un 80% de confluencia se realizó una herida en la monolapa celular, para analizar la migración celular a las 6, 8, 12 y 24 horas (h). Sobre las gráficas se muestran imágenes representativas obtenidas a 10X. **(A)** Ensayo de cierre de herida en células MDA-MB-231. **(B)** Ensayo de cierre de herida en células MCF-7. Los datos son expresados como la media del porcentaje (%) \pm S.E.M, de tres experimentos independientes (n = 3); * p < 0.05; análisis ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*.

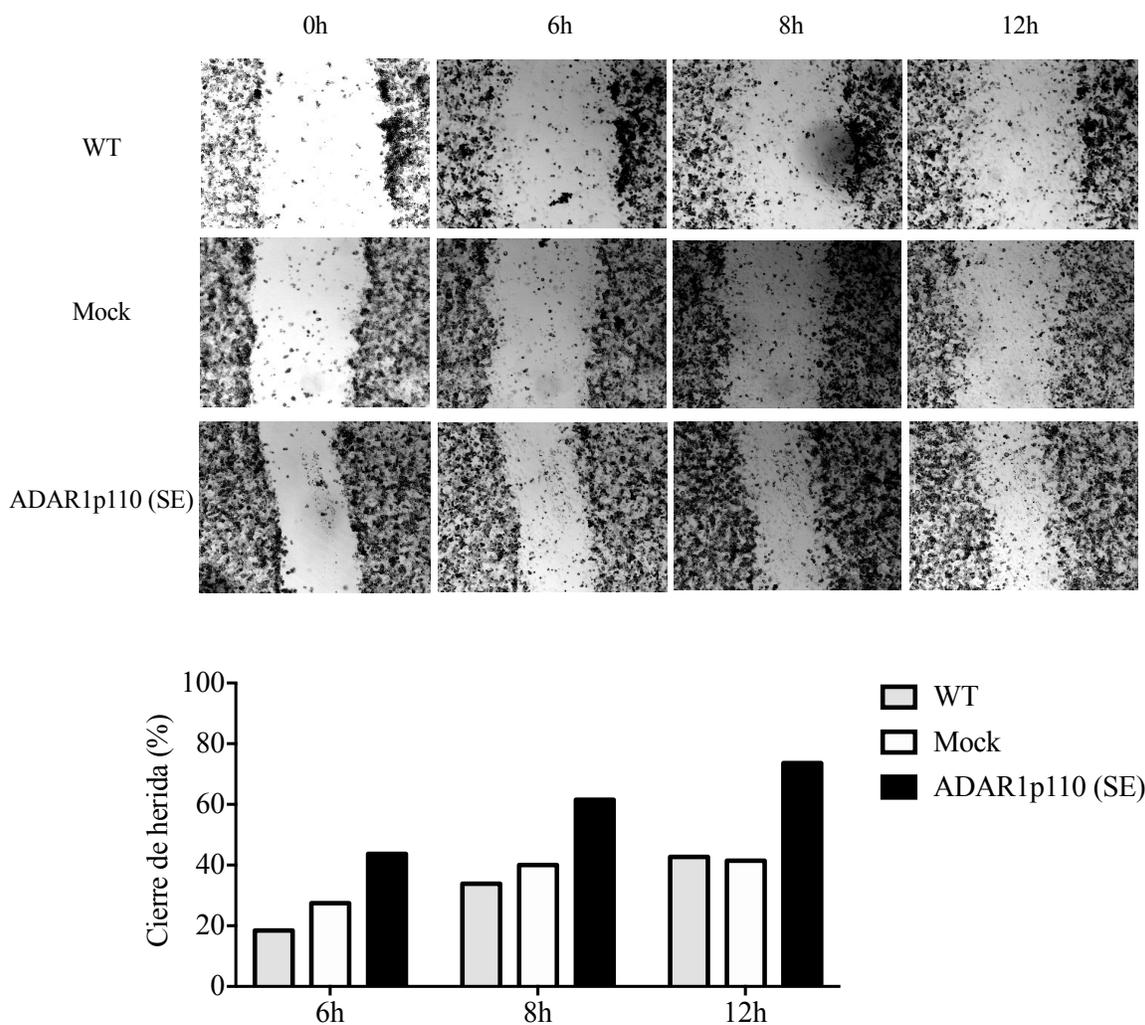


Figura 27: Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la migración celular mediante ensayo de cierre de herida en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 *wild type* (WT), MDA-MB-231 Mock y MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se cultivaron en medio DMEN/F12 suplementado con BSA al 2%. Cuando alcanzaron alrededor de un 80% de confluencia se realizó una herida en la monocapa de células, para analizar la migración celular a las 6, 8, 12 y 24 horas (h). Sobre las gráficas se muestran imágenes representativas obtenidas a 10X. Los datos son expresados como la media del porcentaje (%) de dos experimentos independientes (n = 2).

El efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la migración celular además se evaluó mediante ensayos en cámara de Boyden, también conocido como ensayo “*Transwell*”. Las células resuspendidas en medio de cultivo privado de BSA se sembraron en los insertos y en el exterior se usó como quimioattractante medio de cultivo suplementado con BSA al 10%. Luego de 24 horas post-siembra las células que migraron por los poros de la membrana ubicadas en la base de los insertos se tiñeron con el colorante cristal violeta, registrándose imágenes en diferentes áreas de la membrana.

En la **Figura 28** se presentan imágenes representativas del ensayo en “*Transwell*” donde es posible observar las células que migraron en color gris oscuro. Las células fueron cuantificadas y posteriormente graficadas evidenciando que la sobreexpresión de ADAR1p110 induce un incremento significativo de la migración celular respecto a las células Mock, sugiriendo que ADAR1p110 promueve el proceso de migración en células TNBC.

6.2.4.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la invasión celular

Con el propósito de explorar el efecto de ADAR1p110 sobre el proceso de invasión celular en TNBC, llevamos a cabo ensayos de invasión en matrigel con células MDA-MB-231. Para realizar los ensayos de invasión en matrigel se usaron insertos de “*Transwell*” que poseen una capa de matrigel, simulando la matriz extracelular (137). Para cuantificar el número de células que lograron invadir y traspasar la capa de matrigel se tiñeron los núcleos celulares con el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

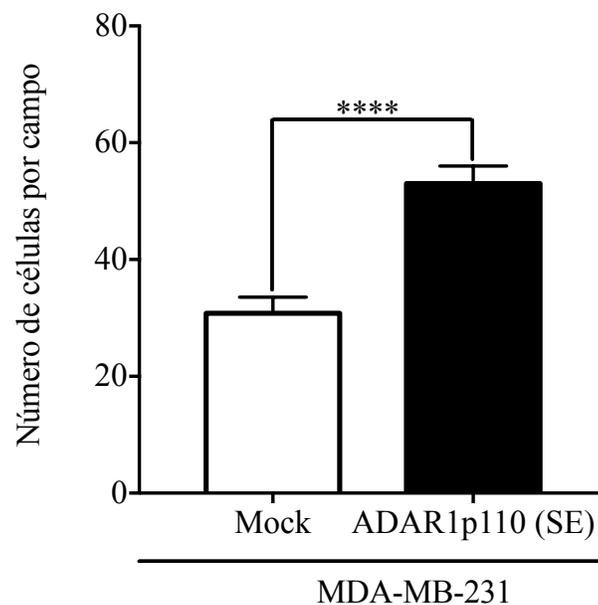
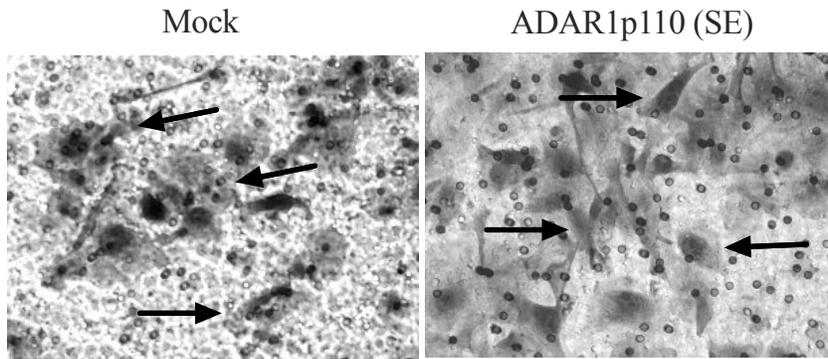


Figura 28: Sobreexpresión de ADAR1p110 induce la migración celular en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) en medio DMEN/F12 deprivado de BSA, se sembraron sobre la membrana que compone las cámaras de Boyden usando como quimioattractante medio DMEN/F12 con BSA al 10%. Luego de 24 post-siembra se tiñeron las células que migraron a través de la membrana con cristal violeta (mostradas en color gris oscuro) y se cuantificó el número de células por campo. Sobre las gráficas se muestran imágenes representativas obtenidas a 10X. Los datos son expresados como la media del porcentaje (%) \pm S.E.M, de tres experimentos independientes (n = 3); **** p < 0.05; prueba de *Mann-Whitney*.

El ensayo en matrigel reveló que las células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) poseen mayor capacidad de invasión respecto de las células Mock (**Figura 29**). Además, este aumento de invasión celular se asoció al incremento del transcrito de la metaloproteínasa de matriz MMP-9 (**Figura 30**). Estos resultados sugieren que ADAR1p110 sería un inductor de la invasión celular en células TNBC, lo que podría estar mediado al menos por la sobreexpresión de la metaloproteínasa de matriz MMP-9.

6.2.5.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la angiogénesis

Se examinó un posible efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 *in vitro* sobre la expresión de un reconocido factor pro-angiogénico en cáncer, el factor de crecimiento de endotelio vascular VEGF-A (*“Vascular Endothelial Growth Factor-A”*) (138). En la **Figura 31A** se puede observar que, contrariamente a lo esperado, la sobreexpresión de ADAR1p110 produjo la disminución del transcrito de VEGF-A en comparación a las células Mock. Luego, se analizó el nivel de VEGF-A en lisados proteicos de células MDA-MB-231 que se han transducido lentiviralmente, para sobreexpresar o silenciar ADAR1p110. Los resultados evidencian que la modulación del nivel proteico de ADAR1p110 no genera cambios en el nivel proteico de VEGF-A (**Figura 31B**).

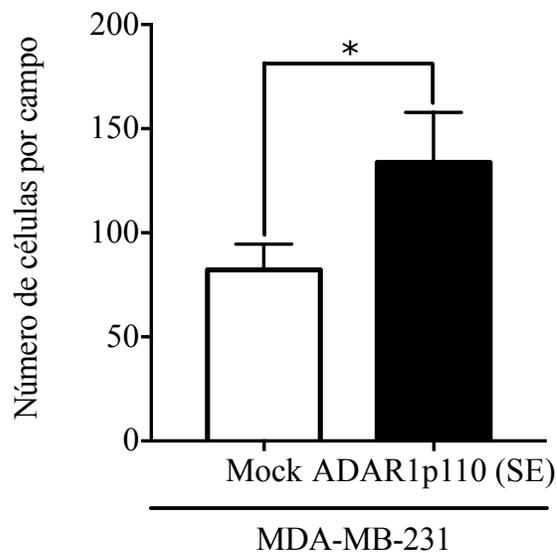
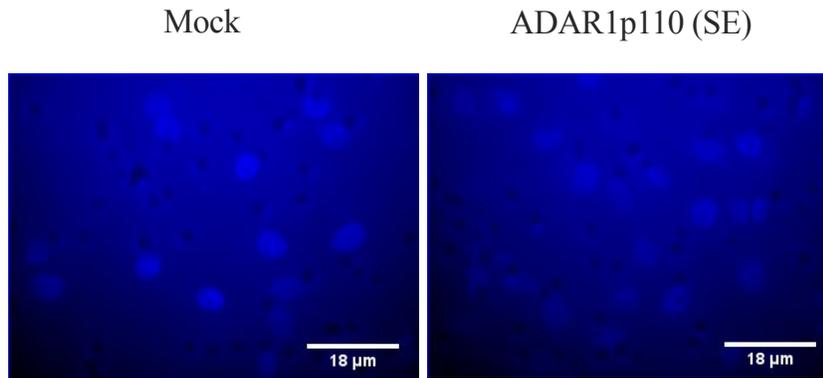


Figura 29: Aumento de ADAR1p110 induce la invasión de células MDA-MB-231. Se evaluó el proceso de invasión celular a través de ensayos en matrigel. La gráfica muestra la cuantificación del número de células por campo de células MDA-MB-231 Mock y de células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). Sobre la gráfica se presentan imágenes representativas de núcleos teñidos con DAPI y visualizadas en color azul, correspondientes a células que invadieron la capa de matrigel. Las imágenes se obtuvieron a 60X y la barra de escala corresponde a 12 μm . Los datos corresponden al promedio \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes ($n = 4$); * $p < 0.05$; prueba t pareado.

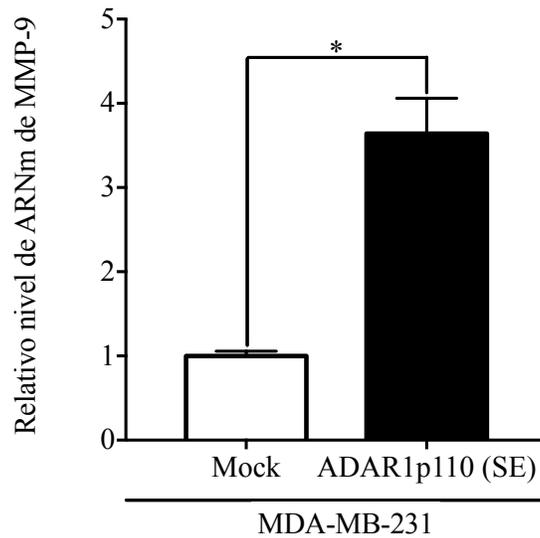


Figura 30: Sobreexpresión de ADAR1p110 induce el incremento del transcrito de MMP-9 en células MDA-MB-231. En células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se analizó el transcrito de MMP-9 mediante RT-qPCR usando para normalizar los resultados la expresión de β -Actina (“housekeeping”). Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio relativas a Mock \pm S.E.M de tres experimentos independientes (n = 3); * p < 0.05; prueba t pareado.

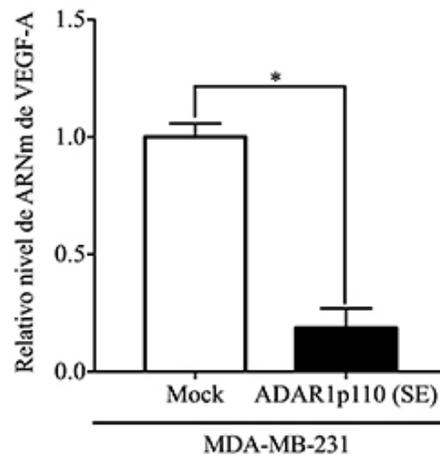
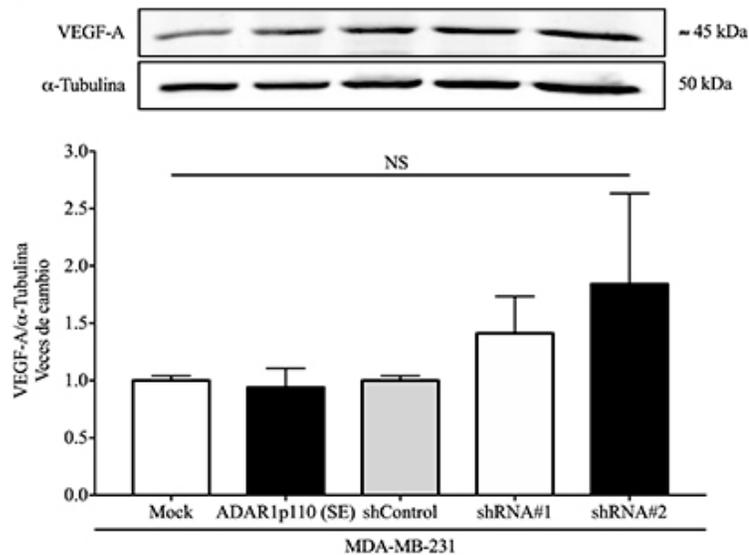
A**B**

Figura 31: Evaluación de la expresión de VEGF-A frente a la modulación de la sobreexpresión de ADAR1p110 en células MDA-MB-231. (A) En células MDA-MB-231 Mock y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) se analizó el transcrito de VEGF-A mediante RT-qPCR usando para normalizar los resultados la expresión de β -Actina (“housekeeping”), en tres experimentos independientes (n = 3). (B) Estudio del nivel proteico de VEGF-A, mediante *Western blot* usando como control de carga la proteína α -Tubulina, para normalizar los resultados. Los extractos proteicos totales se obtuvieron desde células MDA-MB-231 Mock (control), células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), células MDA-MB-231 shControl, células MDA-MB-231 shRNA#1 y células MDA-MB-231 shRNA#2. Se muestran representativos *blots* sobre las gráficas que muestran el análisis de las densitometrías obtenidas desde cuatro experimentos independientes (n = 4). Los datos corresponden al promedio de las veces de cambio, relativas a cada condición control \pm S.E.M; * p < 0.05, prueba t pareado en A; p > 0.5, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de Tukey en B.

6.3.- Objetivo específico 3. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 en la formación de tumores y metástasis en ratones inmunodeficientes.

6.3.1.- Evaluación de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre el comportamiento tumoral *in vivo* en animales BALB/c NOD-SCID

Con el propósito de evaluar si ADAR1 modula el proceso de invasión de tumores *in vivo*, continuamos nuestro estudio en animales inmunosuprimidos BALB/c NOD-SCID. Para ello inoculamos células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) subcutáneamente en el lomo de ratones usando como control células WT y células Mock. A diario se examinó la formación del tumor en cada animal mediante palpación, observándose la presencia de tumores desde el día 10 post-inoculación, como se detalla en el esquema de la **Figura 32**.

Notablemente, el día 24 se observó la aparición de un leve enrojecimiento de la piel y leve pérdida de pelo en el tumor primario de 2 de 5 animales (40%) de la condición WT, en 3 de 5 animales (60%) de la condición Mock, y en 8 de 9 animales (88,9%) de la condición ADAR1p110 (SE). Esto se especificó para cada animal en las curvas de comportamiento tumoral, señalado en las gráficas con puntos naranjos (**Figura 33**). Además, se evaluó el 100% de los tumores subcutáneos (TSCs) en cada condición hasta el día 26 post-inoculación, dado que un animal de cada condición presentó acentuación del enrojecimiento de la piel, pérdida de pelo y presencia de costra, síntomas que en conjunto podrían evidenciar una alta probabilidad de invasión por parte de las células tumorales hacia el epitelio (**Figura 33A y 33B**).

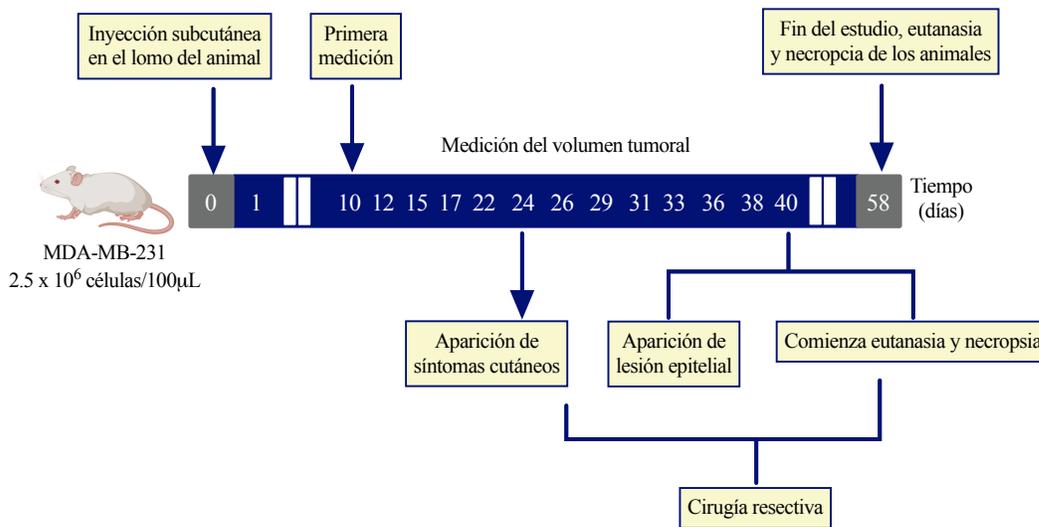


Figure 32 Diseño experimental del ensayo de tumorigénesis *in vivo*. Ratones hembra BALB/c NOD-SCID se inocularon subcutáneamente en el lomo con células MDA-MB-231 y una vez formados los tumores subcutáneos comenzó la medición del volumen tumoral a lo largo de los días. La extracción de los tumores y eutanasia de los animales se realizó a partir del día 26 luego de observar síntomas o aparición de lesión epitelial, concluyendo el ensayo el día 58 post-inoculación de las células.

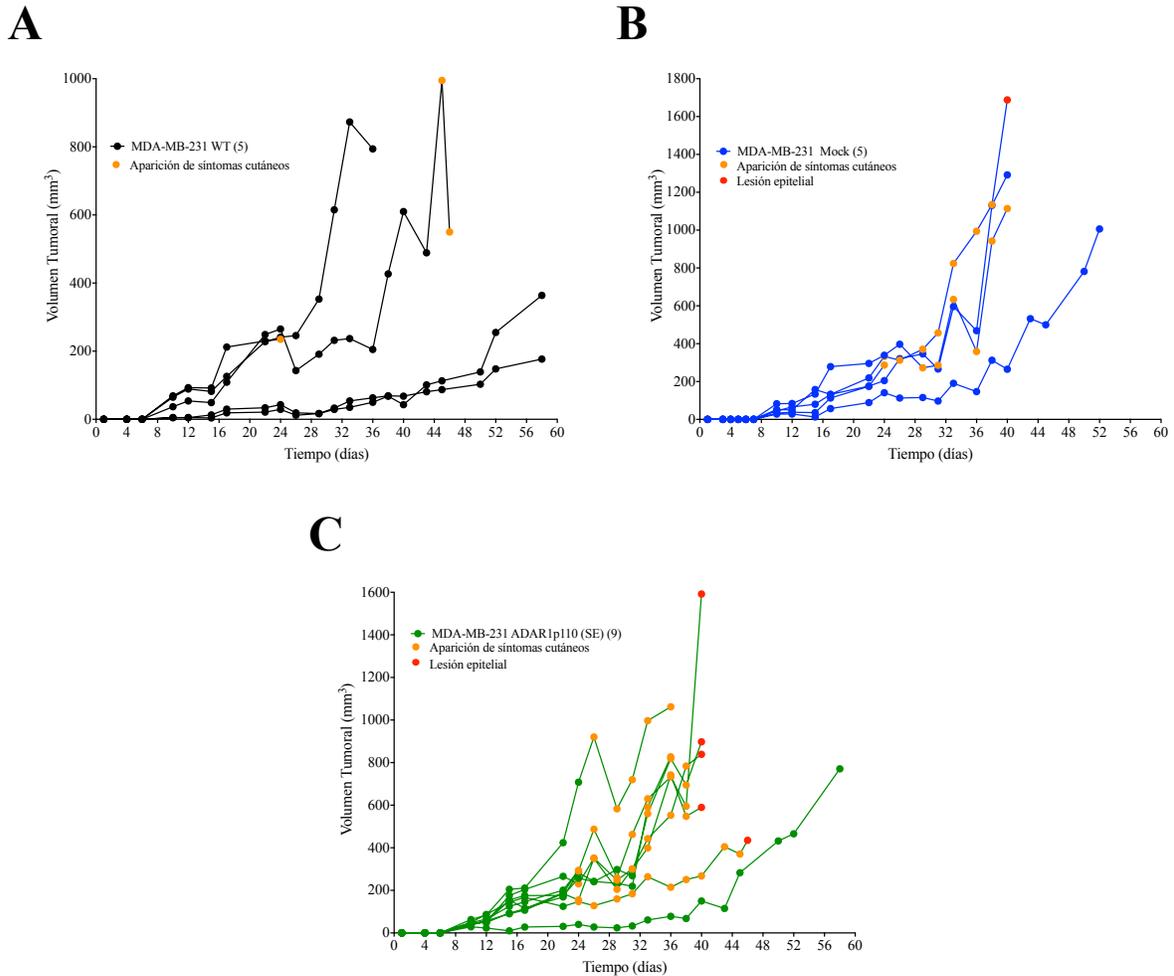


Figure 33: Sobreexpresión de ADAR1p110 en TSCs induce lesión epitelial *in vivo*. (A) Curso temporal del volumen tumoral para cada animal inoculado con células MDA-MB-231 WT (curvas en color negro) (n = 5 ratones por grupo), (B) inoculados con células MDA-MB-231 Mock (curvas en color azul) (n = 5 ratones por grupo); y en (C) se muestra el curso temporal de cada animal inoculado con células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (n = 9 ratones por grupo). Los puntos en color naranja indican cuando aparecieron los síntomas (a partir del día 24 post-inoculación) y los puntos en rojo indican cuando se produjo lesión epitelial. En un animal de la condición Mock, se presentó lesión epitelial a un volumen tumoral de 1688 mm³, mientras que en la condición ADAR1p110 (SE), 5 animales presentaron lesión epitelial a un volumen tumoral de $870,8 \pm 198,8$ mm³.

Por consiguiente, siguiendo los criterios de Morton (127), para asegurar el bienestar de los animales se realizó la extracción del tumor primario a todo animal que presentara los síntomas anteriormente señalados. Acorde a estos criterios, durante el desarrollo del estudio se removió el tumor a 3 de 5 animales (60%) de la condición WT, 4 de 5 animales (80%) de la condición Mock, y 8 de 9 animales (88.8%) de la condición ADAR1p110 (SE). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los volúmenes de los tumores observados (**Figura 34**).

Con el objetivo de visualizar y corroborar la invasión de las células tumorales hacia el epitelio, se analizaron histopatológicamente cortes de los tumores con las tinciones Hematoxilina/Eosina (H/E). El análisis mostró que ninguno de los animales inoculados con células WT presentó lesión (0 de 5), 1 de 5 animales (20%) inoculados con células Mock presentó lesión a un volumen tumoral de 1688 mm³, mientras que 5 de 9 animales (55,6 %) inoculados con células ADAR1p110 (SE) presentaron lesión visible en la piel a un volumen tumoral de 870,8 ± 198,8 mm³ (**Figura 33A y 33B**).

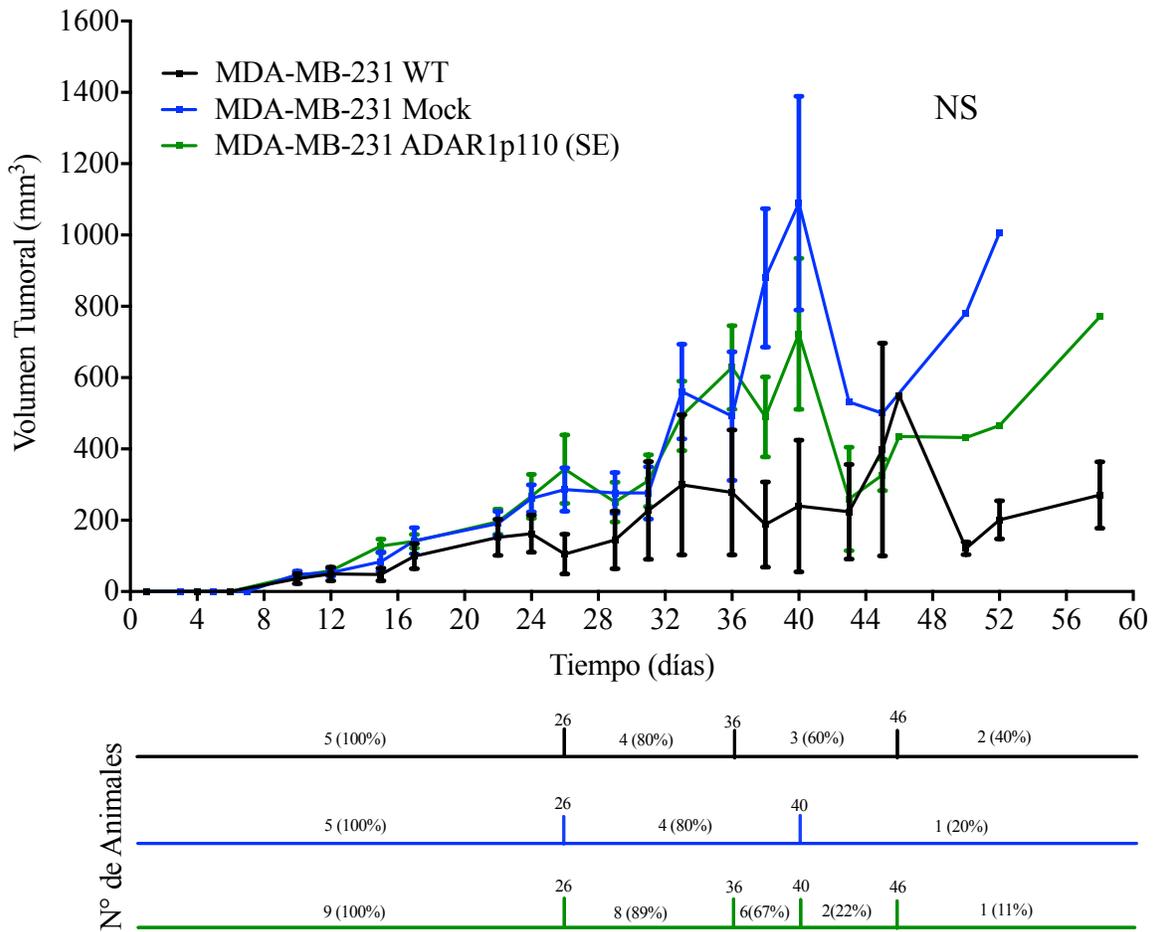


Figura 34: Células MDA-MB-231 que sobreexpresan ADAR1p110 muestran habilidad para formar tumores *in vivo*. Comportamiento *in vivo* del volumen de TSCs en el tiempo formados desde células MDA-MB-231 WT (curva en color negro), células MDA-MB-231 Mock (curva en color azul) (n = 5 ratones en ambos grupos); y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (curva en color verde) (n = 9 ratones por grupo). Las líneas bajo la gráfica muestran el número de los animales estudiados y sus respectivos porcentajes a lo largo del tiempo del estudio. Los datos representan el promedio \pm S.E.M; NS = no se encontraron diferencias entre las distintas condiciones.

6.3.2.- Estudio de invasión de células tumorales y lesión epitelial en tumores primarios

En los cortes de tejido teñidos con H/E es posible apreciar la conservación de la piel en los tumores formados a partir células WT y Mock. En cambio, se observa una masiva invasión de las células ADAR1p110 (SE) desde el interior del tumor hacia la piel del animal, produciéndose la pérdida del epitelio focalmente. En color púrpura se observan las células tumorales vivas, mientras que hacia el centro del tumor en color rosado se presenta el tejido necrótico, con la pérdida de núcleo de las células tumorales. Hacia las orillas de la lesión se observa hiperqueratinización (**Figura 35**).

6.3.3.- Estudio de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre recurrencias tumorales *in vivo* en animales BALB/c NOD-SCID

Luego de la resección de los tumores primarios, los animales recibieron tratamiento paliativo y se continuó con la evaluación de los animales para estudiar la progresión del cáncer post-cirugía. Se observó recidiva tumoral en 2 de 9 animales (22,2%) de la condición MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), 2 de 5 animales (40%) de la condición Mock, y 1 de 5 animales (20%) de la condición WT (**Figura 36**).

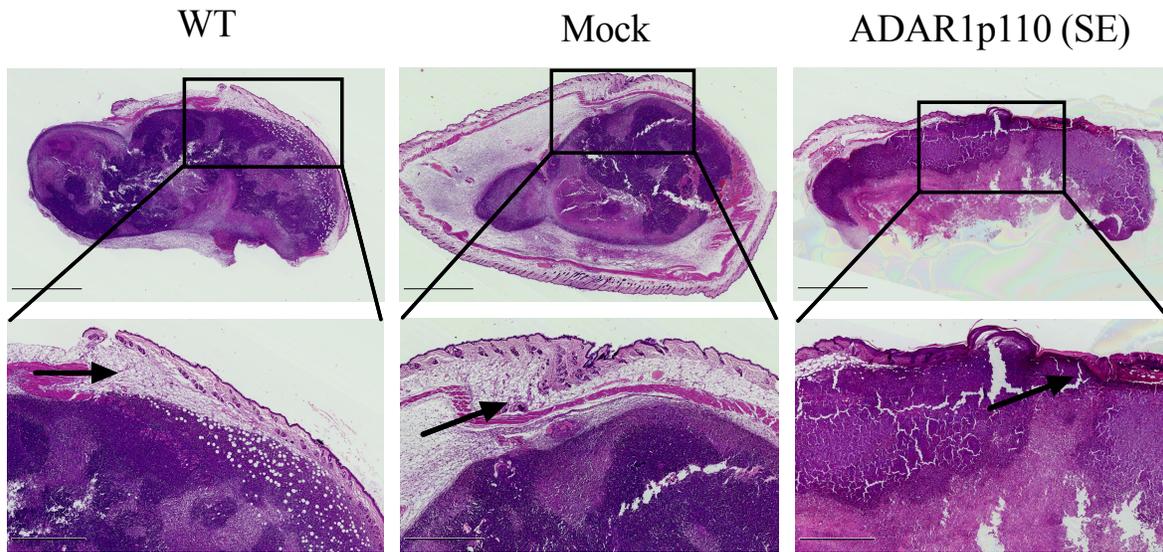


Figure 35: Sobreexpresión de ADAR1p110 en TSCs induce lesión epitelial *in vivo*. Imágenes de tinción H/E de secciones de tumor observadas en las diferentes condiciones se muestran de derecha a izquierda (WT, Mock, ADAR1p110 (SE)). La barra de escala corresponde a 2.5 mm. Las áreas seleccionadas (enmarcadas en una caja negra) fueron magnificadas. Flechas en negro indican el epitelio conservado, donde el epitelio se ha preservado en tumores formados a partir desde células MDA-MB-231 WT y células MDA-MB-231 Mock, y la invasión epitelial con pérdida de la estructura del epitelio de tumor formado desde células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). La barra de escala en las ampliaciones corresponde a 1 mm.

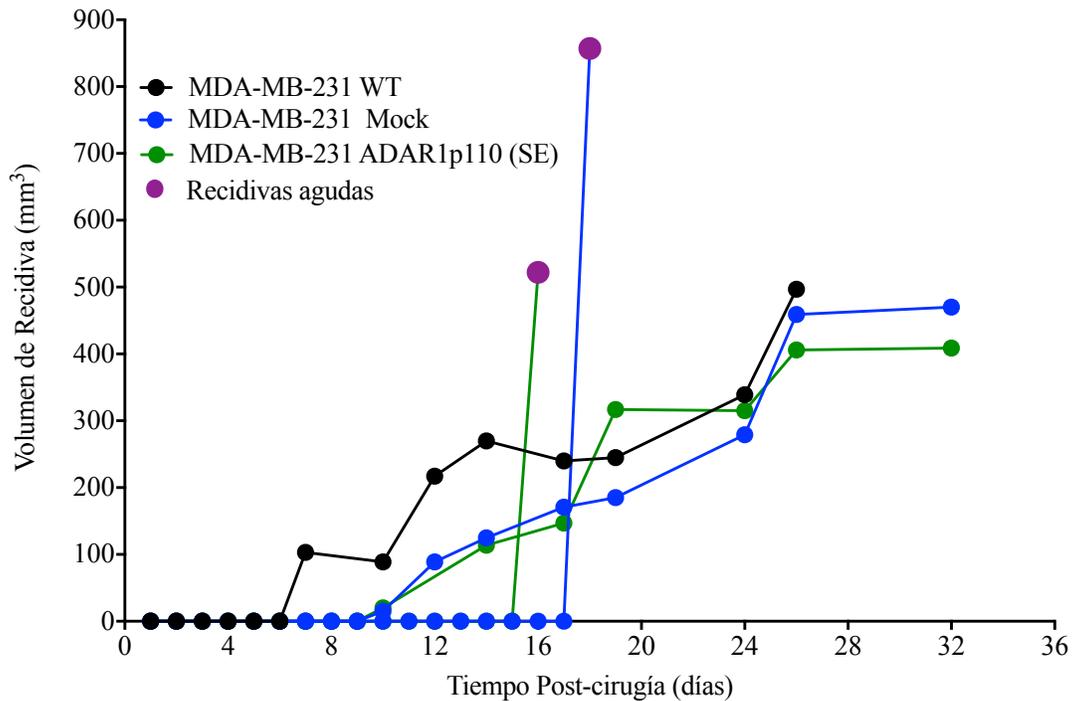


Figure 36: Comportamiento *in vivo* de recurrencias formadas post-cirugía. Ratones hembras BALB/c NOD-SCID se inocularon en el lomo con células MDA-MB-231 WT (curva en color negro), y células MDA-MB-231 Mock cells (curvas en color azul); y en verde cada animal inoculado con MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). Cuando aparecieron sobre la piel de los tumores primarios una costra o herida, se realizó la resección de los tumores (desde el día 26 después de la inoculación de las células). En la gráfica, el tiempo cero consiste en el día en que se realizó la extracción de los tumores mediante cirugía. Después de la resección de los tumores, el 22,2% de los animales de la condición MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (n = 2 ratones), el 40% de los animales de la condición MDA-MB-231 Mock (n = 2 ratones) y el 20% de los animales de la condición MDA-MB-231 WT (n = 1 ratón), desarrollaron recurrencia. Se consideró como punto final del estudio cuando se observó la presencia de recurrencias agudas (puntos en color morado).

6.3.4.- Evaluación *ex vivo* de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la metástasis pulmonar en animales BALB/c NOD-SCID

En la condición WT se presentó el único caso de muerte de un animal con un volumen de tumor final de 794 mm³ y en el análisis histopatológico del tejido de pulmón, solo 1 animal del estudio de esta condición desarrolló metástasis pulmonar (**Figura 37**). También el estudio histopatológico informó que todos los TSCs de este estudio presentaron inflamación y necrosis.

Durante el desarrollo de este estudio se observó crecimiento tumoral invasivo en 2 de 9 animales (22,2%) inoculados con células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE). Los animales alcanzaron un volumen tumoral final al momento de la cirugía de 839 mm³ y 898 mm³, junto con invasión de células tumorales hacia la caja torácica y peritoneo, respectivamente. En consecuencia, los animales que presentaron características tumorales agresivas recibieron eutanasia. En la condición WT se realizó eutanasia a 1 de 5 animales (20%), en la condición Mock a 2 de 5 animales (40%), y en la condición ADAR1p110 (SE) a 3 de 9 animales (33,3%). Nuestros resultados en conjunto indican que la sobreexpresión de ADAR1p110 en células MDA-MB-231 les confiere una agresiva capacidad invasiva en ratones inmunodeficientes.

Finalmente, al remover quirúrgicamente los tumores primarios se observó una elevada formación de vasos sanguíneos rodeando el tumor en la condición ADAR1p110 (SE), respecto a los tumores de las condiciones control (dato no mostrado). Nuestros resultados en conjunto

indican que la sobreexpresión de ADAR1p110 en células MDA-MB-231 les confiere una agresiva capacidad invasiva en ratones inmunodeficientes.

Finalmente, al remover quirúrgicamente los tumores primarios se observó una elevada formación de vasos sanguíneos rodeando el tumor en la condición ADAR1p110 (SE), respecto a los tumores de las condiciones control, observaciones que no fueron cuantificables fácilmente y motivaron el desarrollo de otros experimentos y análisis en los tumores subcutáneos obtenidos en el estudio *in vivo* que se abordaron en el siguiente objetivo específico.

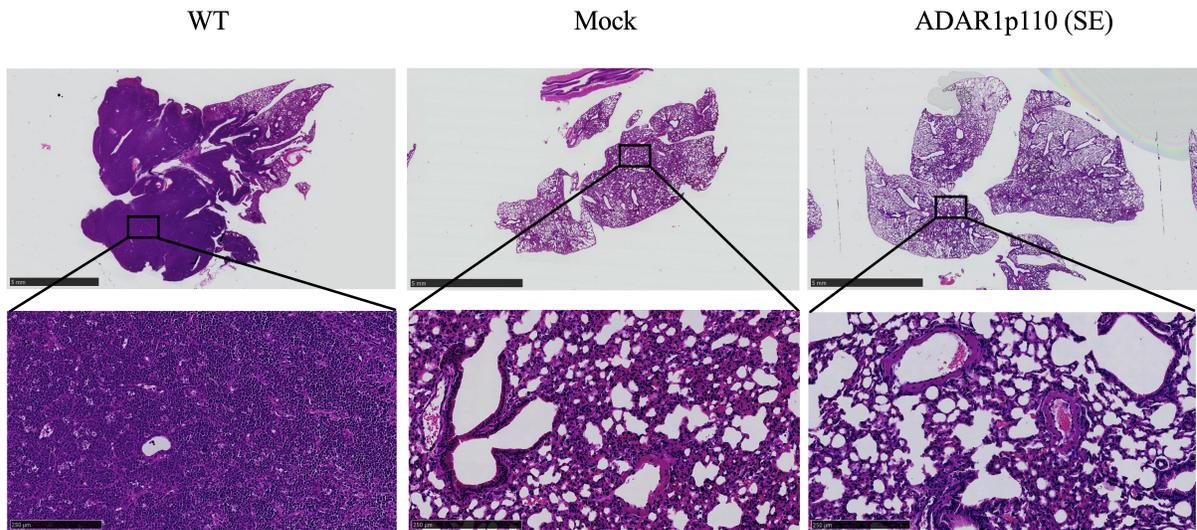


Figura 37: Estudio de metástasis pulmonar en animales BALB/c NOD-SCID. Imágenes representativas de tinción H/E de secciones de tejido pulmonar observadas en las diferentes condiciones se muestran de derecha a izquierda (WT, Mock, ADAR1p110 (SE)). Solo un animal de todo el estudio perteneciente a la condición WT presentó metástasis en pulmón. La barra de escala corresponde a 2.5 mm. Las áreas seleccionadas (enmarcadas en una caja negra) fueron magnificadas. La barra de escala en las ampliaciones corresponde a 1 mm.

6.4.- Objetivo específico 4. Estudiar el efecto *in vivo* de ADAR1p110 (SE) sobre el proceso de neoangiogénesis en tumores subcutáneos.

6.4.1.- Regulación de la expresión de Survivina por ADAR1p110 en tumores subcutáneos

La observación de vasos sanguíneos rodeando los tumores subcutáneos sugirió una relación entre la sobreexpresión de ADAR1p110, su efecto en la vía Wnt canónica y el proceso de angiogénesis *in vivo*. Para abordar experimentalmente, la posible asociación entre la sobreexpresión de ADAR1p110 y el proceso de angiogénesis, primero examinamos cortes de los tumores obtenidos en el estudio anterior mediante inmunohistoquímica (IHQ). La marcación positiva fue cuantificada mediante densitometría y normalizada por el área total del tejido.

Como esperábamos, en los tumores formados a partir de células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) la expresión de ADAR1 se encuentra aumentada respecto a los tumores formados a partir de las células WT y Mock (**Figura 38**). Luego, para examinar la relevancia de ADAR1p110 sobre la vía Wnt canónica en tumores de cáncer de mama, nos enfocamos en Survivina, un blanco de la vía Wnt canónica que se ha relacionado con el proceso de angiogénesis (124, 139). La marcación positiva de Survivina fue mayor en los tumores subcutáneos formados a partir de células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), en comparación a la de los tumores formados a partir de las células WT y Mock (**Figura 39**). Además, en las inmunotinciones se pudo observar la localización de ADAR1p110 y Survivina en núcleo y citoplasma, respectivamente (**Figuras 38 y 39**). A continuación, se determinó la cantidad de ADAR1p110 y Survivina en extractos proteicos de TSCs mediante *Western blot*. Se encontró que los tumores primarios de la condición MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) poseen un

elevado contenido de ADAR1p110 y Survivina en comparación a los tumores de las condiciones control (**Figura 40**).

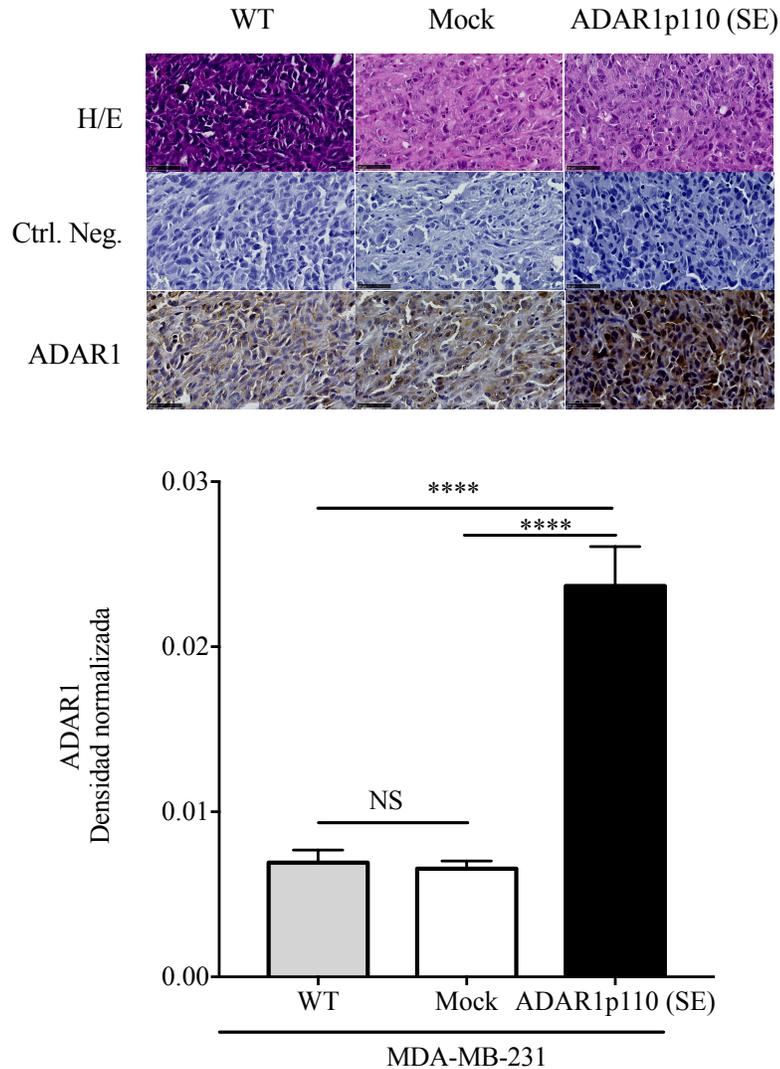


Figura 38. Determinación de abundancia de ADAR1p110 en TSCs. Análisis de inmunohistoquímicas *ex vivo* de ADAR1 en secciones de tumor. Se muestran imágenes representativas de tinciones de secciones tumorales (40X) a lo largo junto con el control negativo y las tinciones de H/E de TSCs formados desde células MDA-MB-231 WT (n = 4 ratones por grupo), células MDA-MB-231 Mock (n = 5 ratones por grupo) y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (n = 9 ratones por grupo). ADAR1 se localiza tanto en núcleo como citoplasma. En la gráfica la medición por densitometría se expresó como Densidad Normalizada, y los datos representan el promedio \pm S.E.M, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*. La barra de escala en todas las imágenes corresponde a 50 μ m.

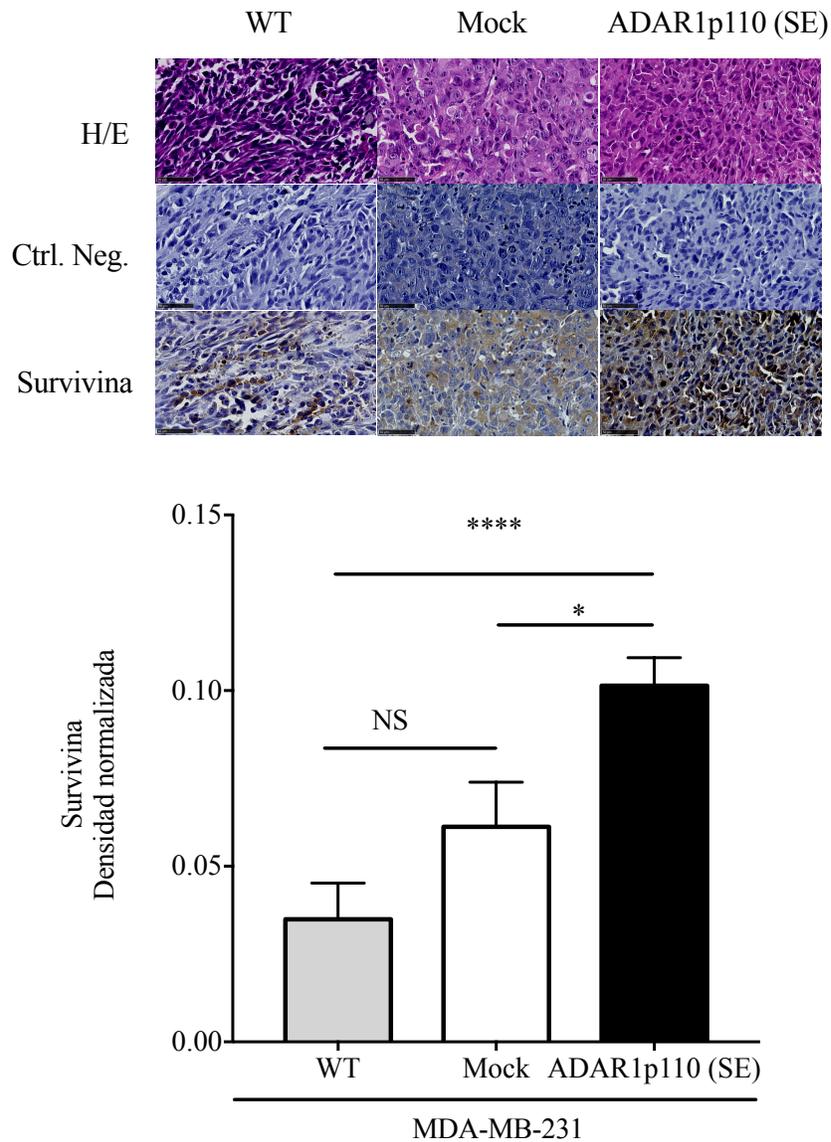


Figura 39. Sobreexpresión de ADAR1p110 induce el aumento de Survivina en TSCs. Análisis de inmunohistoquímicas *ex vivo* de Survivina en secciones de tumor. Se muestran imágenes representativas de tinciones de secciones tumorales (40X) a lo largo junto con el control negativo y las tinciones de H/E de TSCs formados desde células MDA-MB-231 WT (n = 4 ratones por grupo), células MDA-MB-231 Mock (n = 5 ratones por grupo) y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (n = 9 ratones por grupo). Survivina se localiza tanto en núcleo como citoplasma. En la gráfica la medición por densitometría se expresó como Densidad Normalizada, y los datos representan el promedio \pm S.E.M, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*. La barra de escala en todas las imágenes corresponde a 50 μ m.

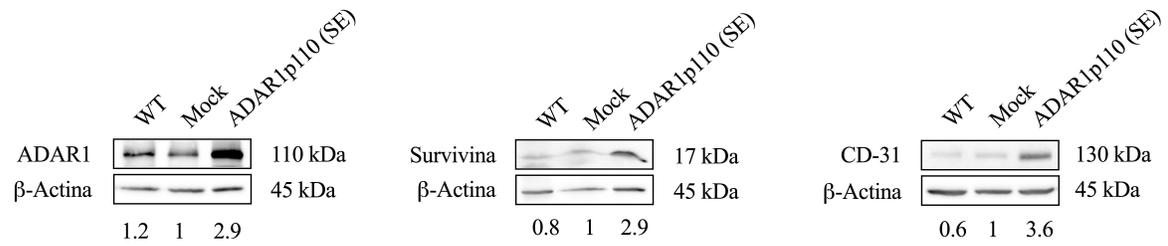


Figura 40. Determinación de ADAR1p110, Survivina y CD-31 en lisados de TSCs. En extractos proteicos provenientes desde muestras de tumor se estudiaron los niveles de ADAR1, Survivina y CD-31 mediante *Western blot*. Se muestran análisis densitométricos debajo de cada *blot* representativo.

6.4.2.- Efecto de la sobreexpresión de ADAR1p110 sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos en tumores primarios

El marcador de angiogénesis CD-31/PECAM-1 (“*Cluster of Differentiation-31/Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*”) es expresado en células endoteliales (140), participa en la adhesión celular (141) e interactúa con β -catenina (142). La asociación dinámica entre CD-31 y β -catenina está involucrada en el proceso de angiogénesis (115), siendo CD-31 ampliamente utilizado como un marcador de este proceso (114). Teniendo en consideración los antecedentes anteriores y nuestros resultados *in vitro* e *in vivo*, dirigimos nuestra investigación a examinar la formación de nuevos vasos sanguíneos en los TSCs.

Al examinar el nivel de CD-31 en extractos proteicos de TSCs mediante *Western blot* se encontró un mayor nivel de esta proteína en los TSCs formados por células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), respecto a los de células WT y Mock (**Figura 41**).

Por otro lado, durante el análisis histológico y observación macroscópica se encontró un aparente aumento en el número de vasos sanguíneos en TSCs formados a partir de células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), lo que se correlacionó con la marcación positiva de CD-31 (**Figura 41**). Así, la densitometría mostró que tumores formados por células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) contienen mayor marcación de CD-31, respecto de tumores formados por células WT y Mock. En total, estos resultados sugieren que ADAR1p110 promueve el proceso de neoangiogénesis asociado a una expresión de Survivina en tumores primarios formados a partir de células MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo.

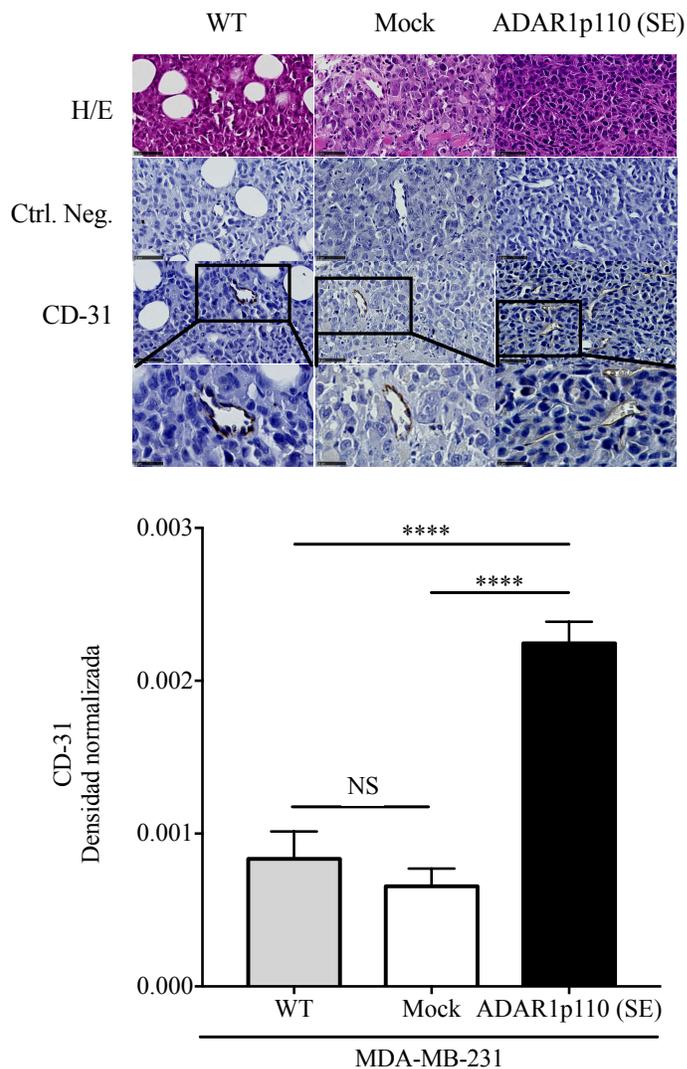


Figura 41: Sobreexpresión de ADAR1p110 induce neoangiogénesis en TSCs. Análisis de inmunohistoquímicas *ex vivo* de CD-31 en secciones de tumor. Se muestran imágenes representativas de tinciones de secciones tumorales (40X) a lo largo junto con el control negativo y las tinciones de H/E de TSCs formados desde células MDA-MB-231 WT (n = 4 ratones por grupo), células MDA-MB-231 Mock (n = 5 ratones por grupo) y células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) (n = 9 ratones por grupo). La marca en café corresponde a CD-31 presente en células endoteliales que forman los micro-vasos. En la gráfica la medición por densitometría se expresó como Densidad Normalizada, y los datos representan el promedio \pm S.E.M, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, análisis de ANOVA de una vía, con post-test de *Tukey*. La barra de escala en todas las imágenes corresponde a 50 μ m. La ampliificación de los vasos sanguíneos son presentadas con una barra de escala a 25 μ m.

7. DISCUSIÓN

El TNBC es reconocido por poseer un comportamiento más agresivo, caracterizado por recurrencias distantes y de pobre pronóstico en comparación a los demás subtipos de cáncer de mama (16). Aproximadamente, el 79% de los tumores TNBC es “*basal-like*” (143) y, a su vez, tumores de TNBC han sido categorizados en otros subtipos según patrones de expresión génica, que dan cuenta de la heterogeneidad de este subtipo de tumor. Lo anterior podría ser la causa de la resistencia a drogas que exhiben los pacientes (144). Sin embargo, hoy en día tanto para estadios tempranos como tardíos de la enfermedad, el principal tratamiento es la quimioterapia (145), siendo un desafío encontrar posibles blancos o vías de señalización que estén involucrados en la progresión del cáncer y que puedan ser abordados terapéuticamente.

Hace pocos años se ha comenzado a estudiar el rol biológico de ADAR1 en cáncer de mama. En el cáncer de mama lobular positivo al receptor α -estrógeno, al examinar la secuencia del genoma y transcriptoma se reportó que ADAR1 se encuentra dentro del 5% de los genes más altamente expresados y que es la única enzima de edición expresada en alto nivel (80). También se ha encontrado mayor frecuencia de edición en los tumores respecto al tejido normal de mama (81). Sin embargo, no existen a la fecha investigaciones que profundicen y evidencien la función que ADAR1p110 desempeña en TNBC. Un reciente estudio muestra que líneas celulares de TNBC requieren de la expresión de ADAR1 y de su actividad de edición, donde el silenciamiento de ADAR1 inhibe la tumorigénesis (84) e, interesantemente, el 46% de los tumores TNBC posee alta expresión de ADAR1 (83). Estas investigaciones dan cuenta del potencial biológico asociado a cambios en la expresión de ADAR1 en TNBC.

En este estudio se sobreexpresó la isoforma p110 de ADAR1 mediante transducción lentiviral en el modelo celular MDA-MB-231, para estudiar su efecto sobre la vía de señalización Wnt canónica. Esta vía se caracteriza por estar activa en TNBC y participar en múltiples procesos que favorecen el desarrollo del cáncer (146). A la fecha solo en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) se ha relacionado ADAR1 con la vía Wnt canónica, donde se ha encontrado que sirve como vía de auto-renovación en progenitores de la LMC durante la progresión a crisis blástica (CB) (85).

ADAR1 se ha asociado a la desregulación de GSK-3 β , un componente importante de la vía Wnt canónica, lo que promovería en LMC CB un aumento en la activación de β -catenina, incremento de su translocación al núcleo, junto con elevada actividad transcripcional (85, 104). Sin embargo, hasta ahora había sido desconocido el rol de ADAR1p110 en la vía Wnt canónica en cáncer de mama.

Si bien la activación de la vía Wnt canónica es dependiente de los ligandos Wnt, nuestra investigación mostró que ADAR1p110 es un nuevo modulador intracelular de ella. Las células MDA-MB-231 con sobreexpresión de ADAR1 presentan un bajo nivel de proteína de GSK-3 β y aumentada activación basal de la vía Wnt canónica en MDA-MB-231.

Por otro lado, GSK-3 β puede ser inactivada por fosforilación en Ser9 (147) mediante AKT (131), una quinasa que se encuentra sobreexpresada en células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE), sugiriendo que el aumento de ADAR1p110 podría promover la inactivación de GSK-3 β de una manera dependiente de AKT. En células de leucemia, la AKT nuclear inhibe mediante fosforilación en Thr738 la actividad desaminasa de ADAR1p110 (148). Sin embargo, cabe agregar que ADAR1 también posee funciones independientes de su actividad de edición (37, 48, 68). En el futuro se podría evaluar si ADAR1 induce la

disminución de GSK-3 β y el incremento de AKT de una manera dependiente o independiente de la actividad desaminasa de ADAR1p110 en TNBC.

En este estudio se observó el incremento de β -catenina desfosforilada mediante *Western blot* y se confirmó la activación de β -catenina por el ensayo TOP/FOP. Asociado a estos resultados, las células que sobreexpresan ADAR1p110 mostraron una elevada expresión de Ciclina D1 y c-Myc, mientras que células silenciadas de ADAR1 mostraron niveles disminuidos de estas proteínas. Contradictoriamente, un estudio en células de cáncer de colon, HCT116, se describe que un mutante de ADAR1 defectivo en edición induce el aumento en la actividad de un reportero de TCF4, mientras que en células del epitelio intestinal la pérdida de ADAR1 induce el transcrito de c-Myc, pero no así el de Ciclina D1 (149). Todos estos hallazgos sugieren que el efecto de ADAR1p110 sobre la vía Wnt canónica podría depender del tipo de cáncer.

Adicionalmente, en la condición de ADAR1p110 (SE) mediante inmunofluorescencia se observó que ADAR1 principalmente se localiza a nivel nuclear. A la fecha, se han encontrado eventos de edición de A - I realizados por ADAR1 en microRNAs de diferentes tipos de cáncer (150, 151) . Por otro lado, también se ha reportado la participación de ADAR1 en la regulación de microRNAs de forma independiente a su actividad de edición (48, 152, 153). Particularmente, en cáncer de mama se han descrito eventos de edición en secuencias de transcritos complementarias a microRNAs mediados por ADAR1 (154). Sin embargo, aún no se han descrito microRNAs específicos regulados por ADAR1 en este tipo de cáncer. Lo anterior, invita a futuras investigaciones a abordar esta área de estudio, para conocer si ADAR1 participa en la regulación de la biosíntesis de microRNAs en cáncer de mama y si ella, es mediada de manera dependiente o independiente de su actividad de edición.

Estudios en líneas celulares de glioblastoma y cáncer de mama señalan que la sobreexpresión de ADAR1 aumenta la proliferación celular (78, 81). Sin embargo, en nuestro modelo de estudio el aumento de ADAR1p110 no llevó a cambios en la proliferación. Recientes análisis muestran que la carencia de ADAR1 reduce la proliferación en células MDA-MB-231, la cual puede ser rescatada con la sobreexpresión de ADAR1p150 pero no ADAR1p110, sugiriendo que ADAR1p150 sería la isoforma requerida para la inducción de la proliferación en células MDA-MB-231 (84).

Aunque en TNBC se ha encontrado que la desregulación de la vía Wnt canónica induce invasión celular, favoreciendo el proceso de metástasis (155), nuestro trabajo es el primero en explorar la participación de ADAR1p110 en la vía Wnt canónica y su efecto sobre la migración e invasión de células de cáncer de mama. Nuestros datos con células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) mostraron una incrementada capacidad migratoria e invasiva.

Similarmente, ADAR1p110 es la isoforma predominante en células de ESCC (“*Esophageal Squamous Cell Carcinoma*”) y su silenciamiento disminuye tanto la migración como la invasión celular (73). También, ADAR1 edita el transcrito de la quinasa de adhesiones focales (FAK) promoviendo la migración e invasión en células de adenocarcinoma de pulmón (156).

De igual forma, en células de carcinoma hepatocelular, ADAR1p110 edita el transcrito de AZIN1 (“*Encoding Antizyme Inhibitor 1*”), edición que provoca la sustitución de serina por glicina, produciendo un cambio conformacional de AZIN1 y volviéndola más estable. Células que expresan AZIN1 editado presentan mayor capacidad invasiva, junto con elevado crecimiento tumoral (74). Se requieren más estudios para determinar si ADAR1p110 es la

isoforma que predominantemente modula el proceso de migración e invasión en cáncer y si ella es dependiente de la actividad de edición del ARN.

En esta tesis se estudió el impacto de la sobreexpresión de ADAR1p110 en células de TNBC inoculadas subcutáneamente en roedores inmunodeficientes. El análisis histopatológico del tejido tumoral dio cuenta de un proceso masivo de invasión por parte de las células tumorales que sobreexpresan ADAR1p110, lo cual inesperadamente generó una lesión epidermal en algunos de los tumores subcutáneos.

Interesantemente, este hallazgo es normalmente observado en etapa IV de cáncer de mama (157) y en TNBC (20). Además, ADAR1p110 induce el aumento de β -catenina activa. En el modelo de escisión murina, β -catenina participa en el proceso de regeneración cutánea de la herida, donde su abundancia se asocia con heridas más grandes (158, 159). En adición, las lesiones epiteliales en tumores formados desde células que sobreexpresan ADAR1p110 se formaron en volúmenes tumorales menores, en comparación al único tumor subcutáneo que presentó lesión epitelial en la condición Mock. Esto podría indicar que ADAR1p110 promovería la malignidad en las células TNBC a través de la activación de la vía de señalización Wnt canónica. Sin embargo, se necesita más estudios para determinar si ADAR1p110 es la isoforma que predominantemente modula el proceso de invasión en cáncer.

Las cadherinas son moléculas de adhesión celular que han sido ampliamente estudiadas en cáncer (160). Particularmente, Cadherina-11 a diferencia de E-cadherina, se expresa en células MDA-MB-231 y además puede interactuar con β -catenina (111). También se ha encontrado sobreexpresión de Cadherina-11 en cáncer de mama invasivo (112), asociándose altos niveles a una disminución en la supervivencia de pacientes TNBC (161). La disminución de Cadherina-11 resulta en la desactivación de la vía Wnt canónica, a través de la reducción de

β -catenina (161). No obstante, nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de ADAR1p110 disminuye el nivel de Cadherina-11, sugiriendo un posible mecanismo compensatorio, dado que el silenciamiento de Cadherina-11 disminuye marcadamente la migración e invasión en células de TNBC (161).

Survivina es una proteína antiapoptótica sobreexpresada tanto *in vitro* como *in vivo* en nuestro modelo de ADAR1p110 (162-164). Esto es consistente con otro estudio en cáncer de mama que revela la inducción de apoptosis después del silenciamiento de ADAR1 (81, 165). En células estresadas se ha encontrado que ADAR1p110 está involucrada en la regulación de Survivina. El aumento de Survivina en el citoplasma se ha examinado en células estresadas, donde ADAR1p110 luego de ser fosforilada en el núcleo interactúa con Exportina-5 que posibilita su exporte (68).

Survivina también participa en el proceso de angiogénesis induciendo VEGF de manera dependiente de β -catenina (124, 139). VEGF a su vez induce la fosforilación en tirosina de β -catenina que le permite interactuar con la proteína de adhesión CD-31, un reconocido marcador de angiogénesis (116). CD-31 es expresada en células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos, donde sirve como reservorio de β -catenina manteniendo su localización en la membrana plasmática (115). Debido a estos antecedentes y a la observación de algunos tumores rodeados de vasos sanguíneos al momento de la extracción quirúrgica, se examinó CD-31 mediante inmunotinción. La marcación positiva de CD-31 evidenció la presencia de pequeños vasos sanguíneos y el posterior análisis densitométrico arrojó un aumento de CD-31 en tumores que sobreexpresan ADAR1p110. Estos resultados son similares a lo observado en carcinoma cervical, donde alrededor del 86% de las muestras positivas a

ADAR1 en pacientes presentan invasión vascular (122). Nuestros datos sugieren que ADAR1p110 propiciaría el desarrollo tumoral contribuyendo a su irrigación sanguínea.

Si bien en TSCs la sobreexpresión de ADAR1p110 induce neoangiogénesis con un consecuente aumento de CD-31, la evaluación *in vitro* de VEGF-A, un potente activador de la angiogénesis en cáncer (138), mostró que la regulación de los niveles de ADAR1p110 no generan cambios en el contenido proteico de VEGF-A, así como el exceso de ADAR1p110 resulta en la reducción del transcrito de VEGF-A en células MDA-MB-231.

Es sabido que en el tumor se produce disminución de oxígeno (hipoxia) y que un medio para evadir la muerte celular por hipoxia es inducir la expresión de HIF1- α (“*Hypoxia-inducible factor-1 α* ”) (166), un factor de transcripción que induce la expresión de VEGF-A (167). De este modo, en condiciones de hipoxia se induce la formación de vasos sanguíneos en tumores sólidos (167). Estos antecedentes podrían explicar porque en nuestro estudio *in vitro* no se encontró un cambio en el nivel de VEGF-A. Por otro lado, se ha reportado que la disminución en el nivel de oxígeno induce el aumento del transcrito de VEGF-A (167), condición que no fue evaluada en nuestro estudio.

Una investigación realizada en líneas celulares de ESCC que sobreexpresan ADAR1p110 ha sugerido que ADAR1 funciona como oncogén en su progresión y cambios en su expresión estarían envueltos en la transformación celular (73). Al igual que en nuestra investigación, una de sus aproximaciones fue estudiar el comportamiento del volumen tumoral en animales inoculados subcutáneamente con células que sobreexpresan ADAR1p110, encontrando que ADAR1p110 induce la velocidad de crecimiento tumoral y que es marcadamente más alta comparada con la condición control (73). No obstante, en nuestra investigación debido a que se presentaron lesiones en el epitelio en tumores de algunos

animales, debimos realizar cirugía para extraer los tumores que presentaban evidencia de alta agresividad. Luego, no fue posible observar el crecimiento de todos los tumores primarios desarrollados en el tiempo que comprendió el estudio. Por esta razón, no se puede descartar que la sobreexpresión de ADAR1p110 esté involucrada en tumorigénesis.

Usando perfiles de expresión génica se han identificado diferentes subtipos de TNBC. La línea celular MDA-MB-231 corresponde al TNBC subtipo “*mesenchymal stem-like*” (168), por lo tanto, se considera que sería necesario extender el estudio de la sobreexpresión de ADAR1p110 en otros modelos celulares de cáncer de mama. En nuestros experimentos, no se obtuvieron clones individuales después de la transducción lentiviral desde células MDA-MB-231 ADAR1p110 (SE) o Mock, a fin de evitar los fenotipos derivados de la selección clonal. En general, los resultados de este trabajo y varios otros (70) muestran cada vez más que la expresión elevada de ADAR1 promueve el crecimiento del cáncer y la metástasis en, por ejemplo, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata y múltiples modelos de xenoinjertos de tumor en ratones.

En nuestro estudio se condujeron experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar el impacto de ADAR1p110 sobre la vía Wnt canónica y los blancos que esta enzima regula. Dado que muchos mRNAs son editados y más del 85% de los pre-mRNAs son editados en sus secuencias intrónicas (57), no se puede descartar el papel de otros componentes de la vía Wnt canónica. Futuros estudios podrán contribuir a definir si otras vías de señalización son moduladas por ADAR1p110 en TNBC.

8. CONCLUSIONES

- ADAR1p110 participa en la regulación de la vía Wnt canónica, alterando la expresión de algunos componentes claves de la vía en células MDA-MB-231 (**Figura 42**).
- Sobreexpresión de ADAR1p110 se asocia con el aumento de migración e invasión de células MDA-MB-231.
- Sobreexpresión de ADAR1p110 se asocia a una agresiva capacidad invasiva de células MDA-MB-231 en tumores subcutáneos *in vivo*.
- Sobreexpresión de ADAR1p110 se asocia *in vivo* a la formación de nuevos vasos sanguíneos de tumores TNBC generados a partir de células MDA-MB-231.

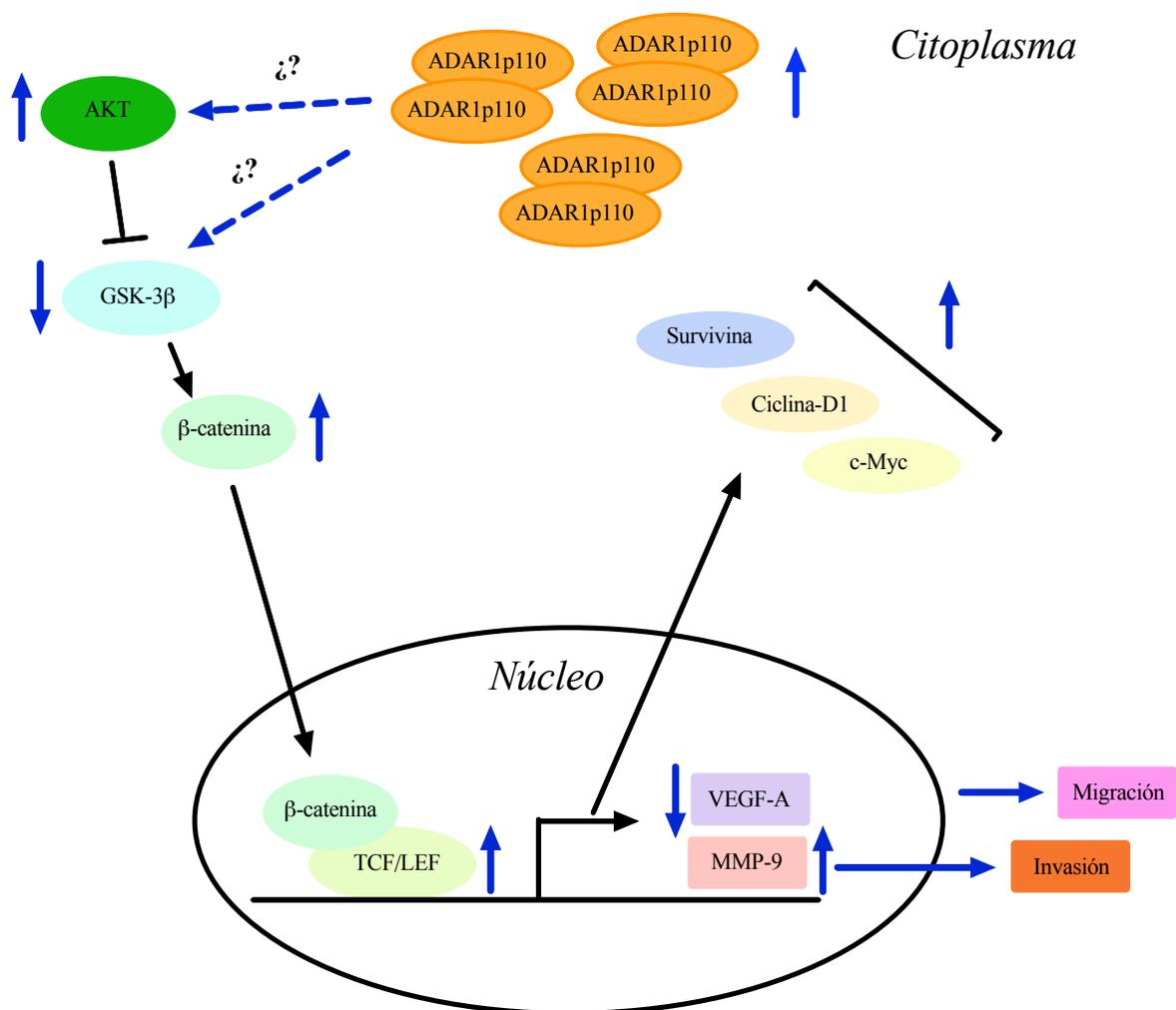


Figura 42: ADAR1p110 activa la vía de señalización Wnt canónica que promueve la migración e invasión celular en células MDA-MB-231. La sobreexpresión de ADAR1p110 (Figura 12) induce la disminución de GSK-3 β (Figura 14A), incremento de AKT (Figura-14B), aumento de β -catenina total y de β -catenina no fosforilada (Figura 15B y 15C, respectivamente). La activación de la vía de la vía Wnt canónica (Figura 20B) promueve el aumento de Survivina, Ciclina D1 y c-Myc (Figura 22); disminución de Cadherina-11 (Figura 25B) y reducción del transcrito de VEGF-A, sin afectar su nivel proteico (Figura 31A y 31B, respectivamente). Además, induce la capacidad de migración (Figura 28) y la transcripción de MMP-9 (Figura 30), esta última, asociada al aumento de la invasión de las células MDA-MB-231 tanto *in vitro* (Figura 29) como *in vivo* (Figura 33). Flechas en color morado indican sobreexpresión de ADAR1p110; flechas en color azul resultados encontrados en nuestro estudio; flechas en negro antecedentes reportados por otros investigadores; signos de interrogación, aproximaciones a abordar en futuros estudios.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. If You Have Breast Cancer | What To Do When You Get Breast Cancer: @cancer.org; 2021 [Disponible desde: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/if-you-have-breast-cancer.html>].
2. Kumar AF. Patología estructural y funcional. Séptima ed. Elsevier, editor. Madrid2005. 1368-90 p.
3. Breast Cancer 2021 [Disponible desde: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>].
4. Definition of malignancy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute 2011. Disponible desde: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/malignancy>.
5. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Tumor Cells and the Onset of Cancer: W. H. Freeman; 2000 2000.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-49.
7. Itriago L, Silva N, Cortes G. Cáncer en Chile y en el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. REV MED CLIN CONDES. 2013;24(4): 531-52.
8. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA. 2019;321(3):288-300.
9. Rivenbark AG, Coleman WB. Field cancerization in mammary carcinogenesis - Implications for prevention and treatment of breast cancer. Exp Mol Pathol. 2012;93(3):391-8.

10. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
11. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013;183(4):1113-24.
12. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
13. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1938-48.
14. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123-33.
15. Walker JM. Breast Cancer Methods And Protocols. In: Protocols S, editor. NY, USA 2016. p. 39-50.
16. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15):4429-34.
17. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2008;113(10):2638-45.
18. Irvin WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008;44(18):2799-805.

19. Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
20. Sun B, Zhao X, Ding L, Meng X, Song S, Wu S. Sunitinib as salvage treatment including potent anti-tumor activity in carcinomatous ulcers for patients with multidrug-resistant metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(36):57894-902.
21. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2016;8:93-107.
22. del Castillo C, Cabrera M, Derio L, Gaete F, Cavada G. Resultados del tratamiento del cáncer de mama, Programa Nacional de Cáncer del Adulto. *Rev Med Chil*. 2017;145(12):1507–13.
23. Maiz C, Silva F, Domínguez F, Galindo H, Camus M, León A, et al. Mammography correlates to better survival rates in breast cancer patients: a 20-year experience in a University health institution. *ecancermedicalscience*. 2020;14.
24. Luque G, Walbaum B, Camus M, Domínguez F, Merino T, Acevedo F, et al. Cáncer de mama triple negativo: terapias sistémicas actuales y experiencia local. *Rev Cir*. 2021;73(2):188-96.
25. Shen M, Pan H, Chen Y, Xu YH, Yang W, Wu Z. A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy. *Open Medicine*. 2020;15(1):1143-9.
26. Boussios S, Abson C, Moschetta M, Rassy E, Karathanasi A, Bhat T, et al. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Talazoparib in Ovarian Cancer and Beyond. *Drugs R D*. 2020;20(2):55-73.

27. Search of: Talazoparib | TNBC - Triple-Negative Breast Cancer - List Results - ClinicalTrials.gov 2021 [Disponibile desde <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=TNBC+-+Triple-Negative+Breast+Cancer&term=Talazoparib&cntry=&state=&city=&dist=>.
28. Nishikura K. Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases. *Annual Review of Biochemistry*. 2010;79(1):321-49.
29. Bass BL. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:817-46.
30. Zinshteyn B, Nishikura K. Adenosine-to-inosine RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(2):202-9.
31. Jin Y, Zhang W, Li Q. Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB Life*. 2009;61(6):572-8.
32. Grice LF, Degnan BM. The origin of the ADAR gene family and animal RNA editing. *BMC Evol Biol*. 2015;15:4.
33. Hogg M, Paro S, Keegan LP, O'Connell MA. RNA editing by mammalian ADARs. *Adv Genet*. 2011;73:87-120.
34. Keegan LP, Gallo A, O'Connell MA. The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet*. 2001;2(11):869-78.
35. Lykke-Andersen S, Pinol-Roma S, Kjems J. Alternative splicing of the ADAR1 transcript in a region that functions either as a 5'-UTR or an ORF. *RNA*. 2007;13(10):1732-44.
36. Patterson JB, Samuel CE. Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(10):5376-88.

37. Licht K, Jantsch MF. The Other Face of an Editor: ADAR1 Functions in Editing-Independent Ways. *BioEssays*. 2017;39(11):1700129.
38. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, et al. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*. 1997;387(6630):303-8.
39. Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K. A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA*. 2000;6(5):755-67.
40. Cho DS, Yang W, Lee JT, Shiekhattar R, Murray JM, Nishikura K. Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J Biol Chem*. 2003;278(19):17093-102.
41. Strehblow A, Hallegger M, Jantsch MF. Nucleocytoplasmic distribution of human RNA-editing enzyme ADAR1 is modulated by double-stranded RNA-binding domains, a leucine-rich export signal, and a putative dimerization domain. *Mol Biol Cell*. 2002;13(11):3822-35.
42. Fritz J, Strehblow A, Taschner A, Schopoff S, Pasierbek P, Jantsch MF. RNA-Regulated Interaction of Transportin-1 and Exportin-5 with the Double-Stranded RNA-Binding Domain Regulates Nucleocytoplasmic Shuttling of ADAR1. *Molecular and Cellular Biology*. 2009;29(6):1487-97.
43. Maas S, Gommans WM. Identification of a selective nuclear import signal in adenosine deaminases acting on RNA. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(17):5822-9.
44. Barraud P, Banerjee S, Mohamed WI, Jantsch MF, Allain FH-T. A bimodular nuclear localization signal assembled via an extended double-stranded RNA-binding domain

- acts as an RNA-sensing signal for transportin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(18):E1852-E61.
45. Poulsen H, Nilsson J, Damgaard CK, Egebjerg J, Kjems J. CRM1 Mediates the Export of ADAR1 through a Nuclear Export Signal within the Z-DNA Binding Domain. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(22):7862-71.
 46. Desterro JMP, Keegan LP, Lafarga M, Berciano MT, O'Connell M, Carmo-Fonseca M. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *Journal of Cell Science*. 2003;116(9):1805-18.
 47. Wang Q, Khillan J, Gadue P, Nishikura K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science*. 2000;290(5497):1765-8.
 48. Ota H, Sakurai M, Gupta R, Valente L, Wulff B-E, Ariyoshi K, et al. ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing. *Cell*. 2013;153(3):575-89.
 49. Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science*. 2015;349(6252):1115-20.
 50. Wang Q, Miyakoda M, Yang W, Khillan J, Stachura DL, Weiss MJ, et al. Stress-induced Apoptosis Associated with Null Mutation of ADAR1 RNA Editing Deaminase Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(6):4952-61.
 51. Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, et al. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*. 2000;406(6791):78-81.

52. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Higuchi M, Seeburg PH. RED2, a Brain-specific Member of the RNA-specific Adenosine Deaminase Family. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(50):31795-8.
53. BASILIO C, WAHBA AJ, LENGYEL P, SPEYER JF, OCHOA S. Synthetic polynucleotides and the amino acid code. V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962;48:613-6.
54. Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*. 1999;399(6731):75-80.
55. Elbarbary RA, Lucas BA, Maquat LE. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science*. 2016;351(6274):aac7247.
56. Morse DP, Aruscavage PJ, Bass BL. RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):7906-11.
57. Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS Biol*. 2004;2(12):e391.
58. Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matisse TC, Buyske S, et al. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome Res*. 2004;14(9):1719-25.
59. Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol*. 2004;22(8):1001-5.
60. Hsiao YE, Bahn JH, Yang Y, Lin X, Tran S, Yang EW, et al. RNA editing in nascent RNA affects pre-mRNA splicing. *Genome Res*. 2018;28(6):812-23.

61. Lev-Maor G, Sorek R, Levanon EY, Paz N, Eisenberg E, Ast G. RNA-editing-mediated exon evolution. *Genome Biology*. 2007;8(2):R29.
62. Solomon O, Oren S, Safran M, Deshet-Unger N, Akiva P, Jacob-Hirsch J, et al. Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). *RNA*. 2013;19(5):591-604.
63. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610.
64. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(1):13-21.
65. Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhattar R, Nishikura K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep*. 2007;8(8):763-9.
66. Shimokawa T, Rahman MF, Tostar U, Sonkoly E, Stähle M, Pivarecsi A, et al. RNA editing of the GLI1 transcription factor modulates the output of Hedgehog signaling. *RNA Biol*. 2013;10(2):321-33.
67. Yu Z, Chen T, Cao X. RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". *Cell Res*. 2015;25(12):1283-4.
68. Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song C, Kossenkov AV, Wickramasinghe J, et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(6):534-43.
69. Avesson L, Barry G. The emerging role of RNA and DNA editing in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(2):308-16.

70. Xu L-D, Öhman M. ADAR1 Editing and its Role in Cancer. *Genes*. 2018;10(1):12.
71. Paz-Yaacov N, Bazak L, Buchumenski I, Porath HT, Danan-Gotthold M, Knisbacher BA, et al. Elevated RNA Editing Activity Is a Major Contributor to Transcriptomic Diversity in Tumors. *Cell Rep*. 2015;13(2):267-76.
72. Han L, Diao L, Yu S, Xu X, Li J, Zhang R, et al. The Genomic Landscape and Clinical Relevance of A-to-I RNA Editing in Human Cancers. *Cancer Cell*. 2015;28(4):515-28.
73. Qin Y-R, Qiao J-J, Chan THM, Zhu Y-H, Li F-F, Liu H, et al. Adenosine-to-Inosine RNA Editing Mediated by ADARs in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2014;74(3):840-51.
74. Chen L, Li Y, Lin CH, Chan THM, Chow RKK, Song Y, et al. Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma. *Nature Medicine*. 2013;19(2):209-16.
75. Chan TH, Lin CH, Qi L, Fei J, Li Y, Yong KJ, et al. A disrupted RNA editing balance mediated by ADARs (Adenosine DeAminases that act on RNA) in human hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2014;63(5):832-43.
76. Chan TH, Qamra A, Tan KT, Guo J, Yang H, Qi L, et al. ADAR-Mediated RNA Editing Predicts Progression and Prognosis of Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 2016;151(4):637-50.e10.
77. Anadón C, Guil S, Simó-Riudalbas L, Moutinho C, Setien F, Martínez-Cardús A, et al. Gene amplification-associated overexpression of the RNA editing enzyme ADAR1 enhances human lung tumorigenesis. *Oncogene*. 2016;35(33):4407-13.

78. Paz N, Levanon EY, Amariglio N, Heimberger AB, Ram Z, Constantini S, et al. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res.* 2007;17(11):1586-95.
79. Shoshan E, Mobley AK, Braeuer RR, Kamiya T, Huang L, Vasquez ME, et al. Reduced adenosine-to-inosine miR-455-5p editing promotes melanoma growth and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(3):311-21.
80. Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* 2009;461(7265):809-13.
81. Fumagalli D, Gacquer D, Rothé F, Lefort A, Libert F, Brown D, et al. Principles Governing A-to-I RNA Editing in the Breast Cancer Transcriptome. *Cell Reports.* 2015;13(2):277-89.
82. Sagredo EA, Blanco A, Sagredo AI, Pérez P, Sepúlveda-Hermosilla G, Morales F, et al. ADAR1-mediated RNA-editing of 3' UTRs in breast cancer. *Biological Research.* 2018;51(1).
83. Song IH, Kim Y-A, Heo S-H, Park IA, Lee M, Bang WS, et al. ADAR1 expression is associated with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology.* 2017;39(10):101042831773481.
84. Kung CP, Cottrell KA, Ryu S, Bramel ER, Kladney RD, Bao EA, et al. Evaluating the therapeutic potential of ADAR1 inhibition for triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2021;40(1):189-202.

85. Jiang Q, Crews LA, Barrett CL, Chun H-J, Court AC, Isquith JM, et al. ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(3):1041-6.
86. Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R, Cowin P. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin. *Breast Cancer Research*. 2010;12(6):213.
87. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-Mccaw A, et al. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors*. 2013;31(1):1-31.
88. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4262-6.
89. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281(5382):1509-12.
90. Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity*. 2007;26(2):227-39.
91. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*. 2003;362(9379):205-9.
92. Shimizu H, Julius MA, Giarré M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ*. 1997;8(12):1349-58.
93. Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9(1):15-21.

94. Hayes MJ, Thomas D, Emmons A, Giordano TJ, Kleer CG. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4038-44.
95. Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: Clinical and prognostic significance. *Cancer Science.* 2012;103(2):210-20.
96. Wang Z, Li B, Zhou L, Yu S, Su Z, Song J, et al. Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016;113(46):13150-5.
97. Garg H, Suri P, Gupta JC, Talwar GP, Dubey S. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int.* 2016;16:49.
98. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 2002;62(9):2462-7.
99. Li D, Hu C, Li H. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomed Rep.* 2018;8(5):399-406.
100. Jha K, Shukla M, Pandey M. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surg Oncol.* 2012;21(2):125-31.
101. Prasad CP, Gupta SD, Rath G, Ralhan R. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology.* 2007;73(1-2):112-7.
102. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):151-66.

103. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5(9):2736-49.
104. Abrahamsson AE, Geron I, Gotlib J, Dao K-HT, Barroga CF, Newton IG, et al. Glycogen synthase kinase 3 missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(10):3925-9.
105. Kiran A, Baranov PV. DARNED: a DAtabase of RNa EDiting in humans. *Bioinformatics*. 2010;26(14):1772-6.
106. Bahn JH, Lee J-H, Li G, Greer C, Peng G, Xiao X. Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing. *Genome Research*. 2012;22(1):142-50.
107. Galipon J, Ishii R, Suzuki Y, Tomita M, Ui-Tei K. Differential Binding of Three Major Human ADAR Isoforms to Coding and Long Non-Coding Transcripts. *Genes*. 2017;8(2):68.
108. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
109. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):117-34.
110. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9.

111. Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999;59(4):947-52.
112. Pohlodek K, Tan YY, Singer CF, Gschwantler-Kaulich D. Cadherin-11 expression is upregulated in invasive human breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4393-8.
113. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
114. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997;151(3):671-7.
115. Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18:3005-14.
116. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, et al. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol.* 2001;194(2):254-61.
117. Rakocevic J, Orlic D, Mitrovic-Ajtic O, Tomasevic M, Dobric M, Zlatic N, et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp Mol Pathol.* 2017;102(2):303-13.
118. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(12).

119. Jadhav U, Chigurupati S, Lakka SS, Mohanam S. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Int J Oncol.* 2004;25(5):1407-14.
120. Masckauchán TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis.* 2005;8(1):43-51.
121. Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, et al. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3299-304.
122. Chen Y, Wang H, Lin W, Shuai P. ADAR1 overexpression is associated with cervical cancer progression and angiogenesis. *Diagn Pathol.* 2017;12(1):12.
123. Sagredo AI, Sagredo EA, Cappelli C, Báez P, Andaur RE, Blanco C, et al. TRPM4 regulates Akt/GSK3- β activity and enhances β -catenin signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. *Mol Oncol.* 2018;12(2):151-65.
124. Fernández JG, Rodríguez DA, Valenzuela M, Calderon C, Urzúa U, Munroe D, et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol Cancer.* 2014;13:209.
125. Mendoza P, Ortiz R, Díaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D, et al. Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 17):3835-47.
126. Lobos-Gonzalez L, Aguilar-Guzmán L, Fernandez JG, Muñoz N, Hossain M, Bieneck S, et al. Caveolin-1 is a risk factor for postsurgery metastasis in preclinical melanoma models. *Melanoma Research.* 2014;24(2):108-19.

127. Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J.* 2000;41(2):80-6.
128. Schuh JCL. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicologic Pathology.* 2004;32(1_suppl):53-66.
129. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *British Journal of Cancer.* 1998;77(1):1-10.
130. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease.* 2011;32(1-2):35-48.
131. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378(6559):785-9.
132. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a007898.
133. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3756-88.
134. Blaschuk OW, Devemy E. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2009;625(1-3):195-8.
135. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2006;94(5):661-71.

136. Farina AK, Bong YS, Feltes CM, Byers SW. Post-transcriptional regulation of cadherin-11 expression by GSK-3 and beta-catenin in prostate and breast cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(3):e4797.
137. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79-80:3-18.
138. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.
139. Sanhueza C, Wehinger S, Castillo Bennett J, Valenzuela M, Owen GI, Quest AFG. The twisted survivin connection to angiogenesis. *Molecular Cancer*. 2015;14(1).
140. Newman PJ. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(1):5-9.
141. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol*. 1996;156(4):1515-24.
142. Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol*. 1997;158(7):3408-16.
143. Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
144. Jhan J-R, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*. 2017;18(17):1595-609.

145. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016;13(11):674-90.
146. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11(1):280.
147. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal*. 1993;296(1):15-9.
148. Bavelloni A, Focaccia E, Piazzini M, Raffini M, Cesarini V, Tomaselli S, et al. AKT-dependent phosphorylation of the adenosine deaminases ADAR-1 and -2 inhibits deaminase activity. *FASEB J*. 2019;33(8):9044-61.
149. Qiu W, Wang X, Buchanan M, He K, Sharma R, Zhang L, et al. ADAR1 is essential for intestinal homeostasis and stem cell maintenance. *Cell Death & Disease*. 2013;4(4):e599-e.
150. Wang Y, Xu X, Yu S, Jeong KJ, Zhou Z, Han L, et al. Systematic characterization of A-to-I RNA editing hotspots in microRNAs across human cancers. *Genome Research*. 2017;27(7):1112-25.
151. Ramírez-Moya J, Baker AR, Slack FJ, Santisteban P. ADAR1-mediated RNA editing is a novel oncogenic process in thyroid cancer and regulates miR-200 activity. *Oncogene*. 2020;39(18):3738-53.

152. Nemlich Y, Besser MJ, Schachter J, Markel G. ADAR1 regulates melanoma cell invasiveness by controlling beta3-integrin via microRNA-30 family members. *Am J Cancer Res.* 2020;10(8):2677-86.
153. Liu X, Fu Y, Huang J, Wu M, Zhang Z, Xu R, et al. ADAR1 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition and stem-like cell phenotype of oral cancer by facilitating oncogenic microRNA maturation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):315.
154. Roberts J, Patterson D, King V, Amin S, Polska C, Houserova D, et al. ADAR Mediated RNA Editing Modulates MicroRNA Targeting in Human Breast Cancer. *Processes.* 2018;6(5):42.
155. Dey N, Barwick BG, Moreno CS, Ordanic-Kodani M, Chen Z, Oprea-Ilies G, et al. Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis. *BMC Cancer.* 2013;13(1):537.
156. Amin EM, Liu Y, Deng S, Tan KS, Chudgar N, Mayo MW, et al. The RNA-editing enzyme ADAR promotes lung adenocarcinoma migration and invasion by stabilizingFAK. *Science Signaling.* 2017;10(497):eaah3941.
157. Güth U, Singer G, Schötzu A, Langer I, Dieterich H, Rochlitz C, et al. Scope and significance of non-uniform classification practices in breast cancer with non-inflammatory skin involvement: a clinicopathologic study and an international survey. *Ann Oncol.* 2005;16(10):1618-23.
158. Cheon SS, Cheah AYL, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, et al. -Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(10):6973-8.

159. Cheon SS, Wei Q, Gurung A, Youn A, Bright T, Poon R, et al. Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J.* 2006;20(6):692-701.
160. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* 2008;27(55):6920-9.
161. Satriyo PB, Bamodu OA, Chen JH, Aryandono T, Haryana SM, Yeh CT, et al. Cadherin 11 Inhibition Downregulates β -catenin, Deactivates the Canonical WNT Signalling Pathway and Suppresses the Cancer Stem Cell-Like Phenotype of Triple Negative Breast Cancer. *J Clin Med.* 2019;8(2).
162. Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino JD. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia.* 2010;24(11):1920-6.
163. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research.* 2008;14(16):5000-5.
164. Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Ohmura T, Hirata K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):11018-25.
165. Sagredo EA, Sagredo AI, Blanco A, Rojas De Santiago P, Rivas S, Assar R, et al. ADAR1 Transcriptome editing promotes breast cancer progression through the regulation of cell cycle and DNA damage response. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(8):118716.

166. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-89.
167. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):507-21.
168. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-67.