



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología
Departamento de Biología

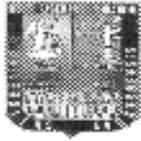


**EFFECTO DEL TAMOXIFEN E HIDROQUINOLINAS SOBRE LA
ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA EN CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA.**

Tutor: Prof. Pimali Felibertt.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Universidad de Carabobo por la bachiller **Oriana M. Sánchez H.** para optar al título de **Licenciado en Biología.**

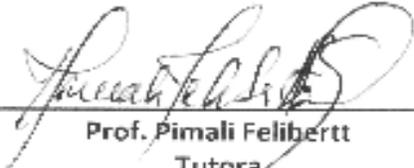
Octubre, 2014.



ACTA.

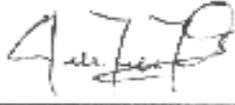
Mediante la presente se deja constancia que la **Br. Oriana Sánchez**, Cédula de Identidad N° 20.383.791, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **"Efecto del Tamoxifen e Hidroquinolinas sobre la actividad gelatinolítica en células de cáncer de mama"**, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo, el bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

En Valencia, a los veintinueve días del mes de Octubre del año dos mil catorce.


Prof. Pimali Felibertt
Tutora


Prof. Eucandis Fuentes
Jurado Principal




Prof. Francisco Arvelo
Jurado Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por esforzarse tanto para darnos todo y a mi padre, por responder todas mis preguntas curiosas ‘sin aburrirse’.

A Indira, mi hermana y amiga por ser tan discretamente protectora.

A mi familia, Abuela y Tíos, por su sabiduría, cariño y apoyo en cualquier situación.

A mi tutora Pimali Felibertt, por tener tanta confianza en mí y darme la oportunidad de ser su pupila.

A mis profesores, Carlos Moreno y Rafael Fernández por siempre estar en los momentos y lugares precisos de estos seis años.

Al Departamento de Biología y al personal de Laboratorio, en especial, al Sr. Luis Gaviria y a la profesora Emilia Barrios (BIOMOLP), por toda su ayuda.

A Karen Gavidia por su paciencia, sus conocimientos y hasta por sus burlas y a Joeli León por sus consejos y libros. ¡Muchas Gracias!

A mis amigos, TODOS, por ser lo mejor de cada casa, por la diversión y las tertulias.

Y finalmente a Álvaro Troitiño, simplemente por ser como es y apoyarme siempre. Por ser la persona más inteligente que conozco. ¡Gracias!.

EFFECTO DEL TAMOXIFEN E HIDROQUINOLINAS SOBRE LA ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

(Effect of Tamoxifen and Hydroquinolines on gelatinolytic activity of breast cancer cells.)

Sánchez, O¹., y P. Felibertt¹.

¹Universidad de Carabobo. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.
Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivo Celular y Virología.

e-mail: sanchezoriana19@gmail.com

El cáncer de mama se produce por la proliferación descontrolada de células alteradas genéticamente, producto de lesiones tisulares que generalmente ocurren en los ductos que conducen la leche materna y los lobulillos de las glándulas mamarias. Para esta enfermedad y dependiendo de la expresión de receptores estrogénicos, el tratamiento por excelencia es el tamoxifen. Sin embargo, existen otros compuestos como las hidroquinolinas sustituidas que han emergido como alternativas postuladas. No obstante, aún se desconocen algunos aspectos sobre los mecanismos implicados en el proceso de metástasis que pudiesen ser afectados por el tamoxifen. Por ello, el objetivo principal de esta investigación es determinar el efecto del tamoxifen e hidroquinolinas sobre la actividad gelatinolítica de los medios de excreción de líneas celulares de cáncer de mama con diferentes grados de malignidad. Para ello, se realizaron cultivos de las líneas celulares MCF-7, SKBR3 y Vero (células epiteliales) en DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina/streptomycin 1% y L-glutamina 1%. Mediante el uso del método del MTT se determinó la citotoxicidad del tamoxifen a 2.5, 5, 10, 15 y 20 μM , y las hidroquinolinas sustituidas DM5 y JS89 a 15 y 30 μM . A continuación, se obtuvieron perfiles proteicos y de actividad gelatinolítica mediante electroforesis 10% SDS-PAGE y zimografías copolimerizadas con 0,05% de gelatina, de los medios de excreción con cada uno de los tratamientos, con y sin medio condicionado. Por último, se realizó WB para determinar la presencia de MMP-2 y MMP-9 en los productos de excreción de los cultivos. Los resultados del MTT demostraron que los tres compuestos probados resultaron citotóxicos de forma dosis y tiempo-dependiente en ambas líneas celulares. En el caso de MCF-7 los valores de concentraciones medias inhibitorias fueron de 5 μM TMX, 15 μM DM5 y 15 μM JS89 para MCF-7 y 15 μM TMX, >30 μM DM5 y 30 μM JS89 para SKBR3. El perfil proteico de los medios de excreción comprendió proteínas entre 40 y 100 KDa en ambas líneas celulares, con presencia de proteínas de bajo peso molecular (20-26 KDa) únicamente en SKBR3. La actividad gelatinolítica obtenida demostró la existencia de una mayor actividad enzimática en MCF-7 en comparación con SKBR3. Los pesos moleculares obtenidos en el perfil gelatinolítico coinciden con algunas MMPs, específicamente MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 y las Catepsinas K, L, D y B. Los tratamientos con TMX disminuyen la actividad gelatinolítica de ambas líneas celulares, mientras que DM5 y JS89 la aumentan. Además, se demostró que dichas proteasas son inhibidas por EDTA y leupeptina, por lo tanto, posiblemente pueda tratarse de MMPs y en el caso de SKBR3 la inhibición completa de las proteasas en presencia de PMSF indica su naturaleza dependiente de serina. Por último, la presencia de medio condicionado obtenido de células epiteliales indujo el aumento de la actividad gelatinolítica en ambos casos, indicando la importancia e influencia del microambiente tumoral sobre el desarrollo del cáncer. **Palabras clave:** cáncer de mama, gelatinasas, tamoxifen, tetrahidroquinolinas.

EFFECT OF TAMOXIFEN AND HYDROQUINOLINES ON GELATINOLYTIC ACTIVITY OF BREAST CANCER CELLS.

(Efecto del Tamoxifen e Hidroquinolinas sobre la actividad gelatinolítica en células de cáncer de mama.)

Sánchez, O¹, and P. Felibertt¹.

¹University of Carabobo. Faculty of Sciences and Technology. Department of Biology. Laboratory of Cell Culture and Virology.

e-mail: sanchezoriana19@gmail.com

Breast cancer is caused by the uncontrolled proliferation of genetically altered cells as a result of tissue injury that usually occur in the ducts that carry milk and lobules of the mammary glands. For this disease and depending on estrogen receptors expression, tamoxifen is treatment per excellence. However, other compounds such as substituted hydroquinolines have emerged as alternative treatments. Nevertheless, some aspects of mechanisms involved in process of metastasis that could be affected by tamoxifen remain unknown. Therefore, the main objective of this study was to determine the effect of tamoxifen and hydroquinolines on gelatinolytic activity of excretion media of breast cancer cell lines with varying degrees of malignancy. Cell cultures of MCF-7, SKBR3 and Vero (epithelial cells) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin / streptomycin, 1% L-glutamine and 1%. MTT of treated cultures with 2.5, 5, 10, 15 and 20 μM tamoxifen, 15 and 30 μM DM5 and JS89 hydroxyquinolines was performed, in order to determine each compound cytotoxicity. The gelatinolytic activity and protein profiles were obtained by electrophoresis SDS-PAGE 10% and 0,05% gelatin zimography, of excretion media with all the treatments, in normal and conditioned medium. Finally, WB analysis was performed to determine the presence of MMP-2 and MMP-9 in the excretion products. MTT analysis showed that the three compounds were cytotoxic in a dose and time-dependent behavior on both cell lines. MCF-7 cell line showed mean inhibitory concentration value of 5 μM TMX, 15 μM DM5, 15 μM JS89 and SKBR3 cell line showed 15 μM TMX, >30 μM DM5 and 30 μM JS89. The protein profile of excretion media comprises proteins between 40 and 100 kDa in both cell lines, with the presence of low molecular weight proteins (20-26 kDa) only in SKBR3. Gelatinolytic activity obtained showed higher enzymatic activity of MCF-7 cell line compared to SKBR3. The molecular weights obtained in the gelatinolytic profile match some MMPs, particularly MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 and Cathepsins K, L, D and B. Treatment with TMX decrease gelatinolytic activity in both cell lines, while DM5 and JS89 increases it. Furthermore, it was shown that these proteases are inhibited by EDTA, leupeptin (possible MMPs) and proteases of SKBR3 medium were completely inhibited in the presence of PMSF, indicating serine-dependent proteins. Finally, the presence of conditioned medium obtained from epithelial cells increased gelatinolytic activity in both cases, indicating the influence and importance of the tumor microenvironment on cancer development.

Keywords: breast cancer, gelatinases, tamoxifen, tetrahydroquinolines.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. <i>Cáncer y metástasis.</i>	10
1.2. <i>Proteasas y cáncer.</i>	11
1.3. <i>Cáncer de mama. Definición.</i>	17
1.4. <i>Tamoxifen. Definición y uso como tratamiento.</i>	19
1.5. <i>Hidroquinolinas. Definición y uso como tratamiento.</i>	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. OBJETIVOS	23
4.1. <i>Objetivo general.</i>	23
4.2. <i>Objetivos específicos.</i>	23
V. ANTECEDENTES	24
5.1. <i>Metaloproteasas y cáncer.</i>	24
5.2. <i>Catepsinas y Serin-proteasas.</i>	25
5.3. <i>Efectos del Tamoxifen.</i>	27
5.4. <i>Efectos de las Hidroquinolinas.</i>	28
VI. MARCO METODOLÓGICO	29
6.1. <i>Cultivos celulares.</i>	29
6.2. <i>Tratamientos con Tamoxifen e Hidroquinolinas.</i>	30
6.3. <i>Determinación del efecto citotóxico de cada compuesto.</i>	31
6.4. <i>Determinación de la cantidad de proteínas.</i>	31
6.5. <i>Perfil de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.</i>	32
6.6. <i>Actividad gelatinolítica de medios de excreción de los cultivos celulares mediante zimografía.</i>	32
6.7. <i>Ensayos de inhibición de la actividad enzimática.</i>	33
6.8. <i>Determinación de la actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de cáncer de mama cultivados en medio condicionado.</i>	33
6.9. <i>Determinación de las Metaloproteasas 2 y 9 mediante Western blot.</i>	33
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1. <i>Determinación del efecto citotóxico.</i>	35

7.2.	<i>Determinación del perfil proteico de medios de excreción y contenido citoplasmático.</i>	47
7.3.	<i>Actividad gelatinolítica de medios de excreción y contenido citoplasmático. Ensayos de inhibición enzimática.</i>	49
7.4.	<i>Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de cáncer de mama cultivados en medio condicionado.</i>	56
7.5.	<i>Western blot para Metaloproteasas 2 y 9.</i>	59
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
IX.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	63

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: <i>Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de tamoxifen en diferentes tiempos de tratamiento</i>	36
Tabla 2: <i>Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de DM5 en diferentes tiempos de tratamiento</i>	39
Tabla 3: <i>Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de JS89 en diferentes tiempos de tratamiento</i>	41
Tabla 4. <i>Concentración media inhibitoria aproximada para cada tratamiento en ambas líneas celulares</i>	43
<i>Figura 1.</i> Estructura de las metaloproteasas. Tipos de metaloproteasas según la especificidad al sustrato.....	12
<i>Figura 2.</i> Estructura química del Tamoxifen.....	18
<i>Figura 3.</i> Estructura química del DM5 y JS89. Tipos de Hidroquinolinas.....	29
<i>Figura 4.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con Tamoxifen. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	34
<i>Figura 5.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con Tamoxifen. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	35
<i>Figura 6.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con DM5. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	38
<i>Figura 7.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con DM5. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	38, 39
<i>Figura 8.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con JS89. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	40
<i>Figura 9.</i> Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con JS89. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).....	41
<i>Figura 10.</i> Micrografías de los cultivos de MCF-7 luego de 48 horas de tratamientos con Tamoxifen (arriba/derecha), DM5 (abajo/izquierda) y JS89 (abajo/derecha) y su Control (arriba/izquierda). Aumento: 40X.....	44
<i>Figura 11.</i> Micrografías de los cultivos de SKBR3 luego de 48 horas de tratamientos con Tamoxifen (arriba/derecha), DM5 (abajo/izquierda) y JS89 (abajo/derecha) y su Control (arriba/izquierda). Aumento: 40X.....	45

<i>Figura 12.</i> Perfil proteico de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Patrón de pesos moleculares (1), Patrón de BSA (2), Control (3), TMX (4), DM5 (5) y JS89 (6). Densidad de las proteínas de excreción obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).....	46
<i>Figura 13.</i> Perfil proteico de contenido citoplasmático de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Patrón de pesos moleculares (1), Patrón de BSA (2), Control (3), TMX (4), DM5 (5) y JS89 (6).....	47
<i>Figura 14.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).....	49
<i>Figura 15.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con EDTA 5mM.....	50
<i>Figura 16.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con Leupeptina 1mM. Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).....	51
<i>Figura 17.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con PMSF 1µM. Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de MCF-7 (B1).....	52
<i>Figura 18.</i> Actividad gelatinolítica del contenido citoplasmático de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).....	54
<i>Figura 19.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de SKBR3 (A) y MCF-7 (B) tratados con medio condicionado. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).....	55, 56
<i>Figura 20.</i> Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de SKBR3 (A) y MCF-7 (B) tratados con medio condicionado. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con EDTA 5mM.....	57
<i>Figura 21.</i> Western blot de medios de excreción y contenido citoplasmático de MCF-7 para MMP-2 y MMP-9. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).....	58
<i>Figura 22.</i> Western blot de medios de excreción y contenido citoplasmático de SKBR3 para MMP-2 y MMP-9. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).....	59

I. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cáncer y metástasis.*

En el organismo, pueden producirse alteraciones en los tejidos, por la exposición a una serie de factores ambientales como, la radiación ionizante; entre estos la luz ultravioleta (UV) proveniente del sol y la radioactividad, los agentes químicos y otros mutágenos, o bien por causa de factores intrínsecos debidos a procesos metabólicos habituales como los errores en la replicación del ADN durante el ciclo celular o por hidrólisis, oxidación y alquilación de bases (7).

Existen múltiples mecanismos de reparación del material genético. Ente ellos destacan aquellos vinculados a la corrección de los emparejamientos incorrectos de los nucleótidos que pueden ocurrir durante la duplicación y son llevados a cabo por la ADN Polimerasa I, III y la ADN Ligasa. Por otro lado, se encuentran aquellos mecanismos que involucran la activación de proteasas para promover la escisión de grandes complejos celulares así como también la expresión de la proteína p53 la cual induce la apoptosis celular y es considerada como la proteína supresora de tumores (7).

Tras severas alteraciones genéticas en una célula, irreparables por los mecanismos existentes, dicha célula se convierte en la precursora de múltiples copias defectuosas las cuales son incluso susceptibles a sufrir mayores alteraciones. La acumulación de células de este tipo se ve reflejada en la aparición de lesiones tisulares que incluyen la expansión anormal de células y activación de la respuesta inflamatoria. Es en este momento, cuando puede generarse un foco que precede a la formación de un tumor (7, 66).

El cáncer es una condición que se caracteriza por la proliferación descontrolada de un grupo de células que llevan consigo alteraciones genéticas que no pudieron ser reparadas ni eliminadas. Las células cancerosas, generalmente, tienen dos propiedades principales: la primera es la alta capacidad proliferativa y la segunda es la capacidad de invasión. Por esta razón, la formación tumoral ha sido dividida en dos tipos, aquellos con presencia de tumores benignos, formados por células con capacidad proliferativa y presencia de tumores

malignos, formados por células con capacidad proliferativa e invasora. Son los tumores malignos los que pueden migrar hacia otros tejidos, lo cual es conocido como metástasis (7).

La metástasis es un proceso que ocurre cuando un grupo de células neoplásicas logran separarse del tumor primario, ingresar a un vaso sanguíneo o linfático (intravasación), migrar a través del sistema para finalmente salir del torrente sanguíneo o linfático (extravasación) y proliferar en otro tejido del cuerpo formando un tumor secundario. El complejo proceso de migración es el resultado de estrategias de invasión que incluyen la degradación de la matriz extracelular (ME) y la membrana basal (MB) de los tejidos adyacentes, la inducción de la Angiogénesis, y la aparición de procesos mecánicos de adhesión celular, movimientos celulares y procesos químicos que intervienen en la degradación de la ME mediante la activación de maquinarias enzimáticas (59). La célula tumoral interactúa con su microambiente mediante la producción en conjunto de factores de crecimiento, citoquinas, factores pro-angiogénicos, moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas, entre ellas las proteasas de la matriz o metaloproteasas (MMP), las catepsinas (Cat), las serin-proteasas, entre otras (7, 8, 47, 51, 66).

1.2. *Proteasas y cáncer.*

En el grupo de enzimas destacadas en la metástasis por su papel pro-angiogénico y otros procesos relacionados, se encuentran las metaloproteasas de la matriz (MMPs). Dichas enzimas son endopeptidasas sintetizadas como zimógenos que para su activación, dependen de iones divalentes como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} (19). Estas enzimas degradan una importante variedad de sustratos de la matriz extracelular como, proteoglicanos, fibronectina, laminina y colágeno (2). La mayoría de los genes que codifican para MMPs se expresan naturalmente en procesos reproductivos, como el ciclo menstrual, la ovulación, en la cicatrización de heridas, angiogénesis, formación del esqueleto, procesos inflamatorios, coagulación, entre otros (3, 34, 51).

Las MMPs son una amplia familia de enzimas que varían ligeramente en estructura y por ende, actúan sobre diferentes sustratos. Sin embargo, estas enzimas poseen una región

catalítica conservada que incorpora de dos a cuatro cadenas polipeptídicas con un sitio de unión al zinc (19).

Además de su papel en la degradación de la matriz extracelular, las MMPs tienen una variedad de sustratos entre los que se encuentran receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, citoquinas, ligandos apoptóticos como la endostatina y la angiostatina, factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros (52). El proceso de activación de estas enzimas viene dado de diferentes formas, entre ellas se encuentran los Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (por sus siglas en inglés TIMPs) e incluso la acción de otras MMPs. Con excepción de las MMPs de membrana, la activación o capacidad proteolítica de estas enzimas es adquirida en el espacio extracelular (3, 8).

Las MMPs están clasificadas en base al sitio de clivaje del sustrato, en dos subgrupos: las *metalo*carboxipeptidasas, que clivan el enlace peptídico en los extremos carboxilo terminal del sustrato, y las *metalo*endopeptidasas, que clivan el enlace peptídico en cualquier posición dentro de la cadena peptídica del sustrato. Además, han sido subdivididas en al menos cinco grupos de acuerdo a su estructura o su especificidad de sustrato, las cuales son descritas con mayor detalle en la *Figura 1* (19, 33).

- 1) Las *Matrilisinas*, son enzimas con una estructura simple que constituye la base del resto de las MMPs. Esto incluye un péptido de señal, una región propéptido y una región catalítica con un sitio de unión al zinc. Dentro de las matrilisinas están la MMP- 7 y la MMP-26. Degradan sustratos como la elastina, fibronectina, laminina, entre otros (3).
- 2) Las *Colagenasas*, son enzimas que constituyen un dominio similar a hemopexina conectado con una región catalítica dependiente de prolina, y tienen la capacidad de degradar la hélice nativa de los tipos I, II, III y otros colágenos fibrilares. El grupo de colagenasas está conformado por la MMP-1, MMP-8 y MMP-13 (3).
- 3) Las *Estromalisinas*, comprenden a las MMP-3, MMP-10 y MMP-11 y poseen una estructura similar a las colagenasas pero degradan una gran variedad de sustratos

incluyendo proteínas de la matriz extracelular, además de fibronectina y laminina así como proteoglicanos (3).

- 4) Las *Gelatinasas*, son enzimas que contienen una región adicional que consiste en tres repeticiones de fibronectina del tipo II en su dominio catalítico. Estas enzimas muestran especificidad por los compuestos colagenados desnaturalizados o gelatina, y otros compuestos como fibronectina, laminina y el colágeno tipo IV, V, VII y X. Se encuentran en este grupo las enzimas MMP-2 y la MMP-9 (3).

- 5) Las *Metaloproteasas de membrana*, son enzimas que se encuentran ancladas a la membrana plasmática mediante un dominio de glicosilfosfatidilinositol y tienen la capacidad de degradar gelatina, fibronectina y otros sustratos de la matriz extracelular. Están dentro de este grupo las MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25 (47).

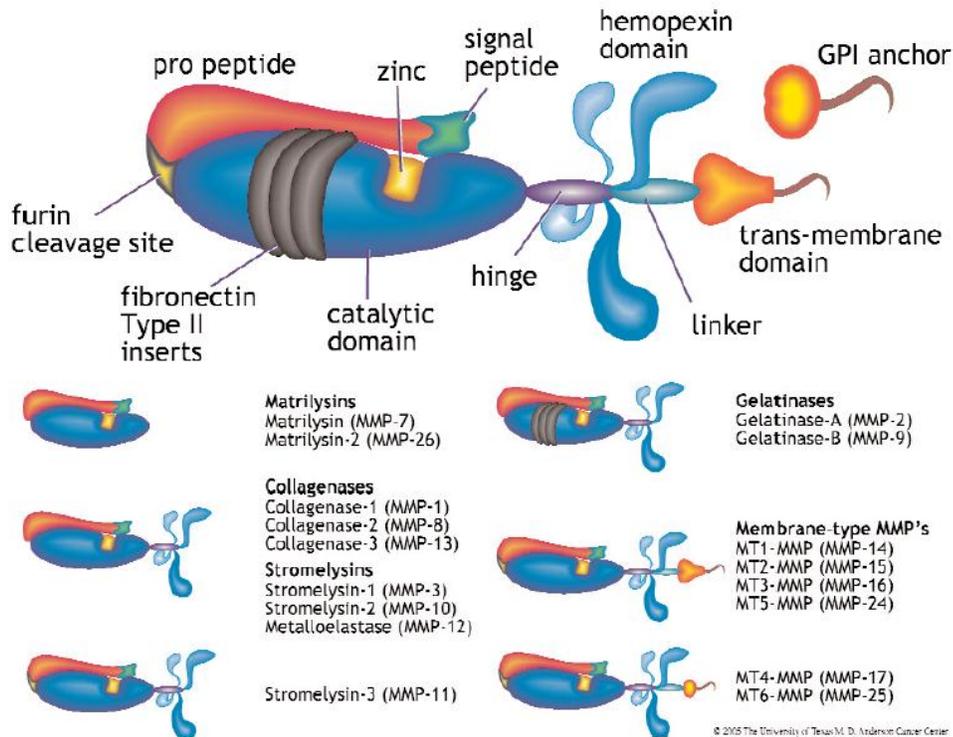


Figura 1. Estructura de las metaloproteasas. Tipos de metaloproteasas según la especificidad al sustrato (23).

La catepsinas (Cat), son un grupo numeroso de enzimas que participan en los procesos de invasión y metástasis al igual que las MMPs, degradando la ME y escindiendo prodominios activadores de factores de crecimiento y citoquinas. Son enzimas sintetizadas como zimógenos al igual que las MMPs y son activadas por el pH ácido del medio interno del lisosoma, donde son utilizadas para procesos de homeostasis, reciclado y degradación proteica. Además, tienen un rol importante en la organogénesis, la reabsorción ósea y en el cáncer, están presentes en la osteoporosis, la artritis y otras enfermedades. Su sitio activo está compuesto por residuos de cisteína, histidina y asparagina, estructura que se conserva en los trece tipos de Cat que se describen a continuación (28, 49, 56).

- 1) Las *Cat A*, dependientes de serina, es una carboxipeptidasa codificada por el gen CTSA. Está relacionada con la formación de complejos con otras proteínas, como la beta-galactosidasa y la neuraminadasa, y su deficiencia en el cuerpo generalmente indica la presencia de una enfermedad congénita conocida como galactosialidosis (28).
- 2) Las *Cat B*, dependientes de cisteína, son hidrolasas lisosomales de actividad endopeptidasa, codificada por el gen CTSB. Tienen la capacidad de degradar casi todos los compuestos de la ME. Pueden encontrarse en niveles elevados en un amplio rango de patologías. Han sido encontradas en algunos tipos de neoplasias y se conoce que tienen efecto sobre la apoptosis celular (28).
- 3) Las *Cat C*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSC, son proteínas lisosomales que tienen la función de coordinar la activación de algunas serin-proteasas en células del sistema inmune durante procesos inflamatorios. Son catalizadoras de la escisión de dipéptidos en el extremo N-terminal. Deficiencias en esta proteína son la causa de la enfermedad Papillon-Lefevre, un desorden que se caracteriza por presentar keratosis y periodontitis (28).
- 4) Las *Cat D*, dependientes de aspartato y codificadas por el gen CTSD, son hidrolasas lisosomales con acción mitogénica. Se conoce que mutaciones en el gen CTSD están involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades como el Alzheimer y

el cáncer de mama. Además, la transcripción de dicho gen puede darse en la cadena de transcripción regulada por estrógeno (28).

- 5) Las *Cat E*, dependientes de aspartato y codificadas por el gen CTSE, se encuentran en altas concentraciones en la superficie de las células epiteliales estomacales que producen moco. Además, se conoce que son expresadas por macrófagos. Sin embargo, no se conocen con claridad los sustratos que esta enzima utiliza por lo tanto su función aún es desconocida (28).
- 6) Las *Cat F*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSE, son proteínas expresadas de forma ubicua que tienen cinco sitios potenciales de *N*-glicosilación. Tiene muchas similitudes estructurales y funcionales con las *Cat L* y *B*, y se presentan en gran variedad de seres vivos como plantas y algunos parásitos (28).
- 7) Las *Cat G*, dependientes de serina y codificadas por el gen CTSG, se encuentran dentro de algunos leucocitos y se presume que participan en la digestión y eliminación de patógenos fagocitados. Intervienen además, en la remodelación del tejido conectivo en los lugares de inflamación (28).
- 8) Las *Cat H*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSH, son hidrolasas lisosomales que tienen actividad aminopeptidasa y endopeptidasa. Los altos niveles de expresión de estas proteínas han sido relacionados con la progresión del cáncer de próstata. Se ha evidenciado que en algunas neoplasias, la expresión de estas enzimas se ve favorecida por la acidez que se presenta en las áreas superficiales de las mismas (28).
- 9) Las *Cat K*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSK, son capaces de catabolizar péptidos como el colágeno, la gelatina, la elastina y, por lo tanto, intervienen en procesos como la ruptura del hueso y cartílago, y en la reabsorción durante la remodelación ósea. Son liberadas durante los procesos inflamatorios y en las lesiones tisulares (28).

- 10) Las *Cat L*, dependientes de cisteína incluyen dos tipos de proteínas denominadas *Cat L1* y *Cat L2*, codificadas por los genes CTSL1 y CTSL2 respectivamente. Las de tipo *L1* prefieren sustratos similares a las *Cat K*, como lo son el colágeno y la elastina y también degradan al inhibidor de la antitripsina alfa-1. Estas enzimas se vinculan a diversas patologías, incluyendo la necrosis miofibrilar en miopatías y en cardiopatías isquémicas. Por otro lado, las de tipo *L2* han sido encontradas en cáncer colorrectal y cáncer de mama, y se cree que forman parte de la progresión tumoral ya que en los tejidos sanos respectivos se encuentran ausentes. Se conoce que en la naturaleza juegan un papel importante en la fisiología de la córnea (28).

- 11) Las *Cat S*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSS, son enzimas lisosomales presentes en células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos y algunas células dendríticas, y están encargadas de degradar proteínas para producir péptidos en la presentación de antígenos al Complejo mayor de Histocompatibilidad. Además, se ha evidenciado que estas enzimas participan en el proceso de nocicepción y percepción del escozor. También participan en la degradación de la ME y se presume que es afín a sustratos como laminina, elastina, osteocalcina y algunos tipos de colágeno (28).

- 12) Las *Cat W*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSW, son enzimas asociadas a la membrana del retículo endoplasmático de los linfocitos. Se presume que tienen un rol de regulación sobre la actividad citolítica de las células T y que su transcripción es modulada por la interleucina-2 (28).

- 13) Las *Cat X*, dependientes de cisteína y codificadas por el gen CTSZ, tienen actividad carboxipeptidasa de mono y dipéptidos. Es una proteína expresada ampliamente en cáncer, tanto en líneas celulares como en tumores primarios y están involucradas en el proceso de tumorigénesis y progresión tumoral (28).

Las *Cat*, son reguladas mediante inhibidores que pertenecen a la familia de las cistinas como las estefinas, cistatinas y cinógenos que se encargan de bloquear el sitio activo de la proteína mediante una unión no covalente (49, 51).

Por último, las serin-proteasas son el tercer grupo más importante y más estudiado en el cáncer. Forman parte de un grupo de moléculas de señalización que intervienen en diversos procesos fisiológicos, motilidad leucocitaria, producción de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, entre otros. Además del cáncer, han sido relacionadas con enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, enteropatías y procesos alérgicos. Dentro de los tipos de serin-proteasas se encuentran los activadores de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y del tipo uroquinasa (uPA) (11, 51).

- 1) Las *tPA*, se encuentran generalmente en los procesos de coagulación de la sangre, desarrollo cerebral y migración neuronal.
- 2) Las *uPA*, son enzimas capaces de promover la angiogénesis y degradar componentes de la ME. Se han encontrado durante procesos de cicatrización, producción de coágulos e incluso durante procesos de respuesta a infecciones virales y bacterianas.

Existen otras familias de proteínas que se han encontrado durante la progresión tumoral y metástasis, y han sido poco estudiadas, como: las PAI1, PAI2, PAI3 o Inhibidores de activadores de plasminógeno, las ADAM o glicoproteínas transmembrana del tipo 1, entre otras (49).

1.3. *Cáncer de mama. Definición.*

El cáncer de mama es el aumento en la proliferación de células en el tejido epitelial mamario, que generalmente inicia en los ductos de la leche materna (carcinoma ductal) o en los lóbulos de las glándulas mamarias (carcinoma lobulillar). Los factores de riesgo para la aparición del cáncer de mama, van desde el estilo de vida, dietas, peso, consumo de drogas y alcohol, hasta la historia familiar, la edad y origen étnico (66). Existe una clasificación del cáncer de mama según subtipos tumorales, que difieren en función de la expresión de receptores estrogénicos, los cuales suelen ser determinantes en el momento de la aplicación de un tratamiento (65, 66):

- 1) *Subtipo Basal*: Las células en su morfología expresan de forma mínima o ausente los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y además no expresan el gen Her2/c-erb-2.
- 2) *Subtipo Her2*: En este subtipo las células de mama sobreexpresan el gen Her2/c-erb-2.
- 3) *Subtipo Luminal A*: en este caso las células sobreexpresan los RE.
- 4) *Subtipo Luminal B*: posee expresión moderada de los RE.

Los RE, comprenden una familia de receptores proteicos celulares activados por la hormona 17β -estradiol o estrógeno. Hasta ahora, se han descrito RE que forman parte de la familia de receptores nucleares (receptores clásicos) en dos isoformas, ER α y ER β , los cuales están regulados mediante la dimerización del complejo A1B1 (ER α -Er β) en presencia de la hormona. Además, existe un receptor de membrana denominado GPR30, que se encuentra acoplado a proteína G (50). La función principal de los receptores estrogénicos, está relacionada con la regulación de la transcripción y por ende la regulación de la expresión génica (1). Sin embargo, al GPR30 se le atribuyen otros efectos no genéticos vinculados con la señalización celular (50).

Dentro de las líneas celulares de cáncer de mama mayormente empleadas en estudios *in vitro* destacan las MCF-7 y SKBR3. La línea celular MCF-7, fue aislada de una mujer caucásica de 69 años por el Michigan Cancer Foundation, de la cual deriva su nombre y se caracteriza por expresar RE clásicos y RE de membrana GPR30. Además, posee RP y ausencia de expresión del gen Her2/c-erb-2. También, se conoce que la proliferación y viabilidad de estas células se ve afectada por la presencia de estrógeno, progesterona y compuestos como la endotelina, desmina y citoqueratina, y algunos factores antiestrogénicos y antiangiogénicos como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (55, 66).

La línea celular SKBR3 de cáncer de mama, fue aislada de un adenocarcinoma de una mujer caucásica de 43 años de edad en el Sloan- Kettering Cancer Center, del cual

deriva su nombre. Este tipo celular se caracteriza tener un número modal de 84 cromosomas y por poseer microvellosidades, desmosomas, gránulos de glucógeno y lisosomas grandes. Sobreexpresa el gen Her2/c-erb-2, un oncogén que codifica para receptores celulares de membrana ErbB con actividad tirosín quinasa importantes en la transcripción de productos que intervienen en la proliferación celular. La línea SKBR3 no posee RE del tipo nuclear pero presenta RE de membrana GPR30 (26, 52).

1.4. *Tamoxifen. Definición y uso como tratamiento.*

El tamoxifen es un compuesto químico no esteroideo que actúa como modulador selectivo de los RE, desempeñando una inhibición competitiva con el estrógeno (10). Es comúnmente utilizado para el tratamiento contra el cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas, ya que tiene afinidad por los RE que comúnmente se presentan en este tipo de tumores. Como resultado de la modulación estrogénica, el tamoxifen detiene la expresión de los genes regulados por esta hormona, entre los cuales se incluyen algunos factores de crecimiento y otros factores angiogénicos que son secretados por el tumor, como VEGF y FGF (1, 10, 27). En la siguiente figura, puede observarse su estructura química.

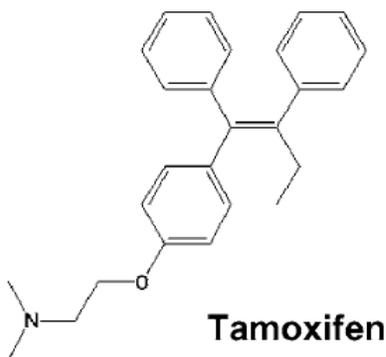


Figura 2. Estructura química del Tamoxifen (10).

Este compuesto posee efectos pro-apoptóticos, y en concentraciones farmacológicas tiene un efecto asociado con cambios en el pH y la permeabilidad celular, lo que promueve la muerte de las células. Otras investigaciones han dilucidado que el tamoxifen afecta los

flujos de calcio intracelular y provoca estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (30). Además, se reportó que este compuesto induce apoptosis en células aún con ausencia de RE, mediante la ruta dependiente de óxido nítrico (12, 10, 40). Pese a que el Tamoxifen, ha sido ampliamente utilizado en la prevención y tratamiento del cáncer de mama, aún se desconocen otras rutas posiblemente afectadas por este compuesto, pudiéndose continuar en la búsqueda por la elucidación de otros mecanismos de acción.

1.5. *Hidroquinolinas. Definición y uso como tratamiento.*

Las tetrahidroquinolinas, son compuestos orgánicos heterocíclicos que se forman de la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico. Estos compuestos son extraídos de diversas fuentes vegetales como *Galipea officinalis*, *Casimiroa edulis*, *Evodia rutaecarpa* y otras plantas de la familia de las Rutáceas, y a partir de fuentes microbianas, como *Pseudomona aeruginosa*, derivándose en otros múltiples compuestos que han sido utilizados para el diseño de otras moléculas, debido a sus propiedades medicinales en el tratamiento contra varias enfermedades como el cáncer, el asma, la gastritis, las úlceras gástricas y enfermedades infecciosas (18). La diversidad de efectos posiblemente mediados por estos compuestos es tal, que abarcan desde la acción antimicrobiana y antihistamínica hasta la acción antitumoral (22).

Como parte de la investigación en la búsqueda de nuevos compuestos que pudiesen afectar los procesos vinculados con la metástasis, las hidroquinolinas han resultado de gran interés. Estos compuestos de naturaleza lipofílica han sido aplicados como tratamientos en otros tipos de enfermedades, sobre todo aquellas que presentan cuadros infecciosos. Las hidroquinolinas son compuestos generalmente extraídos de plantas y de cultivos microbianos, pero que en los últimos años han sido sintetizadas en el laboratorio, y a partir de estos se han podido diseñar otros compuestos con fines de investigación biológica y médica (22, 35).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La complejidad de los procesos celulares que se desarrollan en un tejido tumoral, han incentivado la búsqueda de nuevas alternativas para tratamientos, nuevos blancos terapéuticos y nuevos compuestos farmacológicos. Existen tratamientos convencionales para el cáncer de mama, como es el caso del Tamoxifen que al ser un compuesto lipofílico y afín a receptores hormonales, como el RE, posee diversas maneras de afectar la estabilidad de una célula tumoral. A pesar de su efectividad relativa como tratamiento, no se ha logrado comprender por completo la complejidad de su efecto en las diferentes etapas de la enfermedad, incluyendo la angiogénesis y la metástasis.

Por otro lado, existen compuestos sintéticos que recientemente están siendo aplicados en la investigación como posibles tratamientos alternativos, como es el caso de las hidroquinolinas. Se ha demostrado que estos compuestos tienen un efecto importante en la progresión tumoral por su acción quelante de metales en el microambiente celular, entre otros. Sin embargo, de igual forma que el Tamoxifen, aún no han sido reportados los posibles mecanismos de acción y efectos sobre factores pro-metastásicos, como por ejemplo la actividad de proteasas, entre ellas las MMPs.

Por esta razón, se considera pertinente el estudio del efecto de dichos compuestos en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama, con el fin de determinar un poco más sobre su acción en la actividad gelatinolítica que desempeñan las proteasas durante la metástasis.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes alrededor del mundo y es considerado una de las primeras causas de muerte en las mujeres venezolanas. Según los datos estadísticos publicados en el Anuario Epidemiológico de 2005 y los datos de morbilidad del Registro Central de Cáncer, del programa de Oncología del Ministerio del Poder Popular para la Salud, el 19,6% de las muertes femeninas son causadas por cáncer, del cual 2% se deben al cáncer de mama. Este porcentaje de mortalidad aumentó luego de 6 años a un 3,44% según la última actualización de las estadísticas presentadas por el mismo ente en el año 2011.

Ya que la incidencia de la enfermedad es alta y existe un desconocimiento de algunos mecanismos de acción de los tratamientos disponibles y alternativos sobre las diversas etapas de la enfermedad, es necesario incrementar la investigación en torno a este tema, evaluar los parámetros metastásicos y de progresión tumoral bajo el efecto de estos compuestos. Entre estos parámetros, destaca el papel pro-metastásico de proteasas. Es por esto que se ha considerado pertinente realizar el estudio del efecto del tamoxifen e hidroquinolinas en líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y SKBR3 que poseen diferente morfología y grado de tumorigenicidad para evaluar su posible efecto sobre la actividad de dichas enzimas pro-metastásicas, las cuales son de activación extracelular con actividad gelatinolítica y colagenolítica. Este planteamiento se basa en la utilización amplia del tamoxifen en pacientes que padecen la enfermedad y el potencial farmacológico antitumoral, aún desconocido, que pudiesen tener las hidroquinolinas dado a su posible papel en la regulación de iones divalentes en el microambiente tumoral.

IV. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general.*

Determinar el efecto del Tamoxifen e Hidroquinolinas sobre la actividad gelatinolítica de medios de excreción de dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y SKBR3.

4.2. *Objetivos específicos.*

- Determinar el efecto citotóxico del Tamoxifen e Hidroquinolinas a diferentes concentraciones sobre cultivos celulares de cáncer de mama, mediante el método del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).
- Determinar el efecto citotóxico del Tamoxifen e Hidroquinolinas a diferentes tiempos de incubación sobre cultivos celulares de cáncer de mama.
- Determinar la actividad gelatinolítica de los medios de excreción y homogenatos obtenidos de los cultivos celulares de cáncer de mama tratados con Tamoxifen e Hidroquinolinas, mediante zimografía.
- Determinar la presencia de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en los medios de excreción de los cultivos de cáncer de mama, mediante Western blot.

V. ANTECEDENTES

5.1. *Metaloproteasas y cáncer.*

En el año 1996, Liabakk *et al.*, reportaron la existencia de una relación entre la propagación tumoral y la expresión de las colagenasas tipo IV o Metaloproteasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), analizando tejidos obtenidos mediante biopsias a pacientes con adenomas y carcinomas malignos en diferentes estadios de cáncer colorectal, realizando luego una comparación con tejido intestinal sano. En este mismo estudio, se demostró mediante zimografías con gelatina y RT-PCR, que los niveles de MMP-2 activa y MMP-9 incrementaron en tumores malignos con respecto a los tumores benignos y los tejidos sanos. Este estudio generó interés en particular para evaluar a las MMPs como posibles indicadores del grado de progresión tumoral y, más aún, como indicadores de malignidad en el cáncer.

Otín, en el año 2003, consideró a las MMPs como las enzimas de mayor vinculación a la actividad proteolítica en los escenarios de destrucción tisular de algunas enfermedades como las reumatológicas y, luego, en el 2004, Folgueras *et al.*, describieron el rol de los diferentes tipos de MMPs en todas las etapas del cáncer, como el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis tumoral y la invasión por parte de algunas células durante la metástasis.

Rundhaug en el 2005, destaca la importancia de las MMPs y su compleja relación con la angiogénesis, ya que dichas enzimas degradan la matriz extracelular facilitando la migración/invasión de las células, y su intervención en la liberación de compuestos pro-angiogénicos, como los factores de crecimiento y receptores como las integrinas vinculadas en la adhesión celular e interacciones célula-célula. Sin embargo, es de hacer notar que Rundhaug, destaca también el posible papel anti-angiogénico que pudiesen desempeñar las MMPs, como lo es la inhibición causada por la liberación de algunos componentes de la matriz extracelular generados como residuos de la actividad proteolítica, por ejemplo, la NC1 (Noncollagenous-1) dominio del colágeno tipo VII que contribuye en la organización de la membrana basal endotelial (6), la angiostatina y endostatina que pueden inducir

apoptosis o evitar la migración celular (42), la tumstatina que es un fragmento del colágeno tipo IV para el cual se reportan efectos antiangiogénicos y pro-apoptóticos (7, 27), entre otros fragmentos que bloquean algunos receptores de membrana e incluso pueden inhibir la actividad de las propias MMPs.

Más tarde en el año 2008, Bendrick *et al.*, 2008, reportaron que a pesar de que la actividad de las MMPs es crucial para la destrucción tisular que promueve la invasión y la angiogénesis. La sobreexpresión de la MMP-9 en modelos animales con cáncer de mama puede generar el efecto opuesto, ya que la actividad proteolítica realizada promueve la liberación de fragmentos como la endostatina.

En el año 2009, Quintana demostró mediante ensayos de zimografía, que la actividad gelatinolítica de medios de excreción de las líneas celulares LoVo y 273X17 de cáncer colorectal, varía con respecto al tiempo de exposición de dichos cultivos a compuestos de diferente naturaleza, específicamente los Kaurenos y Triterpenos, sugiriendo además la importancia de la concentración y el tiempo de exposición de cada uno sobre la viabilidad celular.

De igual manera, Rajoria *et al.*, 2011 reportaron la actividad antiestrogénica desempeñada por el compuesto 3,3'-Diindolilmetano (DIM) presente como componente de las dietas vegetales, en células de cáncer tiroideo. La acción antiestrogénica del compuesto DIM inhibió la secreción y actividad de las MMP-2 y MMP-9, demostrando una vez más el importante papel de dichas enzimas en la progresión tumoral.

5.2. *Catepsinas y Serin-proteasas.*

En la investigación de las Cat y el cáncer de mama, Shree *et al.*, 2011, mencionan la importancia de estas enzimas en el mantenimiento del microambiente tumoral y la recuperación del tumor durante los procesos de quimioterapia. Evidenciaron que el tratamiento con Taxol, un compuesto diterpeno cíclico que afecta la tubulina de las células, muy utilizado en quimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama, provoca el aumento en la actividad de las Cat B, C y L, producto de la entrada de macrófagos que proveen al tumor de factores de crecimiento y citoquinas.

Kleer *et al.*, en el 2009 evidenciaron que las células del estroma influyen directamente sobre la progresión tumoral. Encontraron que la expresión del gen CTSK que codifica para la Cat K en células del estroma promueve la invasión de las células tumorales de mama en cultivos *in vitro*. Además, encontraron que la sobreexpresión de este gen está asociada con carcinomas ductales invasivos y con etapas avanzadas del cáncer. Por último, concluyen que un microambiente tumoral (células del estroma, fibroblastos) que exprese Cat K favorece la progresión tumoral promoviendo la degradación de la ME y por ende aumentando la capacidad invasiva de las células tumorales.

Gocheva *et al.*, 2009, al igual que Kleer *et al.*, 2009, reportaron que los macrófagos asociados a tumores (TAMs) proveen al tumor de las Cat, lo que resulta en una mayor capacidad invasiva del tumor. Sin embargo, además de la importancia de dichas enzimas durante las etapas avanzadas del cáncer, ellos destacan que la aparición de las mismas ocurre desde una etapa hiperplásica y que, por lo tanto, también tienen un rol importante en la tumorigénesis.

Chen y Platt, 2011, registraron la actividad gelatinolítica mediante zimografía de las Cat K, L y S en muestras de tejido maligno de mama, pulmón y útero, y además registraron la presencia de la Cat K incluso en las etapas más tempranas de la enfermedad, destacando la importancia de esta enzima como biomarcador potencial para estos tres tipos de cáncer.

En el año 2012, Chan *et al.*, reportan que la expresión de algunas proteasas está asociadas a la expresión del ER α en cáncer de mama. Ensayos histopatológicos de algunas líneas celulares de cáncer confirmaron que la expresión de la serin-proteasa PRSS23 aumenta cuando se estudiaron subtipos con ER α positivo. También evidenciaron que la PRSS23 puede modular la replicación del ADN durante la proliferación del cáncer.

Welman *et al.*, 2012, describieron la importancia de una serin-proteasa de membrana denominada Matriptasa para la activación de otras proteínas que cumplen roles importantes durante la carcinogénesis como lo son la uPA y la MMP-3 (otras proteínas dependientes de serina). La expresión de Matriptasa es diferencial dependiendo de los fenotipos de las células cancerosas, por ejemplo, las líneas celulares de cáncer que poseen sobreexpresión del gen Her2/c-erb-2 poseen altos niveles de Matriptasa.

5.3. *Efectos del Tamoxifen.*

En el año 1997, Duh *et al.*, reportaron los efectos del Tamoxifen en la transducción de señales vinculadas a la activación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en células de cáncer de útero *HeLa*. En este reporte fue demostrado que el uso del tamoxifen disminuía la actividad de las quinasas evaluadas, debido a sus efectos tóxicos.

En el año 2001, Cardoso *et al.*, y en el año 2007 Nazarewicz *et al.*, describieron el efecto de este compuesto en mitocondrias aisladas de riñones de ratón y células de cáncer de mama MCF-7, respectivamente. Resaltaron que el tamoxifen puede inducir alteraciones sustanciales en la carga energética celular como consecuencia del desacoplamiento de la oxidación-fosforilación, inhabilitando a la mitocondria para satisfacer los requerimientos energéticos de la célula.

En el 2004, Sohu *et al.*, demostraron que el tamoxifen se comporta como un agonista del estrógeno en células de cáncer de mama que expresan altos niveles de coactivadores de receptores esteroideos (SRC), comúnmente denominados AIB1 y receptores 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), resultando en el desarrollo de una resistencia a este compuesto.

Zheng *et al.*, en el 2007, reportaron que el tamoxifen induce una muerte rápida en la línea celular MCF-7 que son RE positivas, afectando vías de señalización como las de la ruta proliferativa de MAPKs, lo que ayuda a la rápida muerte celular.

En otras investigaciones, Nilsson *et al.*, en el 2009, demostraron que la adición combinada de tamoxifen y estradiol, disminuye los niveles de proteínas extracelulares como el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) y la actividad extracelular de la MMP-9 en células de MCF-7 con RE y RP.

Criscitiello *et al.*, 2010, en una revisión exhaustiva sobre los tratamientos convencionales del cáncer de mama, destacan que el tamoxifen es el tratamiento hormonal para el cáncer de mama más ampliamente utilizado en mujeres pre y post-menopáusicas con tumores RE positivos, ya que en cinco años su uso ha significado una reducción anual de la tasa de mortalidad por el cáncer de mama en un 34%.

5.4. *Efectos de las Hidroquinolinas.*

Bohórquez *et al.*, 2007 consideran a las tetrahydroquinolinas como una clase de heterociclos productos del metabolismo secundario de plantas y microorganismos de los cuales han sido derivados algunos farmacóforos de profundo interés biológico y médico. Chen *et al.*, en el mismo año, utilizaron un derivado de tetrahydroquinolinas, denominado Clioquinol, que funciona como un potente quelante de cobre en cultivos de células tumorales prostáticas consiguiendo promover la apoptosis y la supresión de los receptores de andrógenos.

Du *et al.*, en el 2008, utilizaron Clioquinol en células de cáncer de útero *HeLa* para describir algunos mecanismos posiblemente anticancerígenos de este compuesto, reportando que puede promover la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y, por lo tanto, inducir apoptosis.

Muñoz *et al.*, 2010, demostraron que el uso combinado de compuestos tetrahydroquinólicos sustituidos como lo son DM8 y DM12 con compuestos usados comúnmente en quimioterapia, como el taxol y la gemcitabina incrementa la citotoxicidad sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 de cáncer de mama.

VI. MARCO METODOLÓGICO

6.1. *Cultivos celulares.*

Se realizaron cultivos de las líneas celulares SKBR3, MCF-7 (derivadas de carcinoma de mama) y Vero (fibroblastos de mono verde africano), empleando como medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina 1% y L-glutamina 1%. Los cultivos se conservaron en frascos T-25 y T-75 en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad a 37°C. Para los ensayos de determinación de proliferación celular, se cultivaron las células en placas de ELISA de 96 pozos, mientras que para la determinación del perfil proteico y actividad gelatinolítica se cultivaron en placas de Petri de 94x16 mm, disminuyendo la concentración de SFB del medio de cultivo a 1%., 24 horas antes de la adición de los compuestos a evaluar.

Previo a la aplicación de los tratamientos con Tamoxifen e Hidroquinolinas, se obtuvo la fracción celular de cada cultivo mediante la separación de las células en monocapa realizada bajo un lavado con solución buffer fosfato salino (PBS) 1% pH 7 y una solución de Tripsina-EDTA 0,25X por un período de dos minutos. La suspensión celular obtenida se diluyó en DMEM suplementado y luego se centrifugó a 724g por 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió nuevamente en un volumen conocido de DMEM suplementado. A partir de dicha fracción se realizó una cuantificación de la población celular mediante tinción con Azul de Tripano 0,2% en proporción 1:1 y posterior contaje con cámara de Neubauer. Se cargó la cámara con un volumen de 10 µL de la solución anterior y se procedió a realizar el contaje sobre un microscopio óptico invertido y posterior determinación de la población celular empleando la siguiente fórmula: (47)

$$N^{\circ} \text{ Células presentes en 4 cuadrantes de la cámara} \times 10.000 \\ / (4 \times 0,5) \times \text{Volumen de medio}$$

La determinación del número de células permitió realizar la siembra de manera equitativa sobre cada placa y así obtener cultivos con un grado de confluencia similar al momento de colocar los tratamientos y de esta manera asegurar réplicas exactas al momento de analizar los resultados.

6.2. *Tratamientos con Tamoxifen e Hidroquinolinas.*

En este ensayo se utilizaron tetrahydroquinolinas sustituidas, sintetizadas a partir de Isoeugenol y Eugenol extraído de plantas de Canela (*Cinamomum verus*) y Clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*), transformadas mediante reacciones imino Diels-Alder, de donde se purificaron isómeros estables por cromatografía. Esto fue realizado en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga – Colombia. A partir de allí se tomaron fracciones de isómeros que fueron denominadas genéricamente como DM5 y JS89, cuyas estructuras se pueden detallar en la *Figura 3* (29, 37). Para la determinación de la proliferación celular, los compuestos DM5 y JS89 fueron aplicados en las concentraciones 15 y 30 μM . Por último, el Tamoxifen se aplicó a 2.5, 5, 10, 15 y 20 μM . Cada compuesto fue diluido en dimetil sulfóxido (DMSO) al 100% y evaluado durante 24, 48 y 72 horas. Por otro lado, para determinar el perfil proteico y actividad gelatinolítica de cada línea celular, se aplicaron los tres compuestos en las concentraciones medias inhibitorias obtenidas de cada uno de los intervalos evaluados.

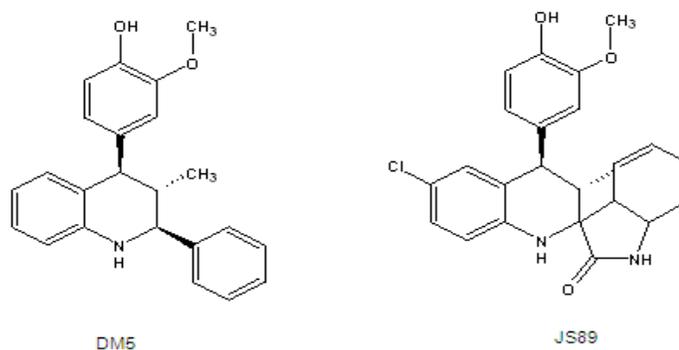


Figura 3. Estructura química del DM5 y JS89. Tipos de Hidroquinolinas (37).

6.3. *Determinación del efecto citotóxico de cada compuesto.*

Para evaluar el efecto citotóxico del Tamoxifen y las Hidroquinolinas, se utilizó el método MTT (Mosmann, 1983). Dicho método consiste en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas.

Luego de realizar los tratamientos con los compuestos mencionados, se retiró el medio de cultivo de cada pozo para después añadir 100 μ L de reactivo MTT, diluido en PBS 1%, a una concentración de 0.2 mg/mL. Se colocaron las placas dentro de la estufa a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% y 98% de humedad, durante 3 horas. Pasado este tiempo, se retiró el reactivo MTT y se sustituyó por 100 μ L de DMSO al 100% para luego realizar la lectura de la absorbancia a 570 nm, en un espectrofotómetro para placas de ELISA Multiskan™ GO. El proceso se repitió en todas las placas correspondientes a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

6.4. *Determinación de la cantidad de proteínas.*

Se determinó la cantidad de proteínas de los medios de excreción y los productos del lisado celular mediante el método de Lowry (47), utilizando una curva estándar de Albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras se obtuvieron a partir de cultivos realizados en placas de Petri tratados con Tamoxifen, DM5 y JS89, en sus concentraciones medias inhibitorias durante 48 horas. Pasado este tiempo se retiró el medio de excreción de cada placa y se disgregó la monocapa celular mediante fuerza mecánica y la adición de PBS 1%, cuidando colocar ambos productos en envases separados a temperatura baja para evitar la degradación por acción de proteasas. Tanto los medios de excreción como las células en PBS se llevaron a centrifugación a 724g por 10 minutos, conservándose el sobrenadante para medios de excreción y precipitados para la fracción celular. El precipitado celular fue sometido a un proceso de lisis realizado mediante la aplicación de 100 μ L de buffer RIPA preparado con Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Desoxicolato de Sodio 0,5% y SDS 1% a pH 8.8. Luego de agregado el buffer se agitó en un vórtex a su máxima velocidad y se colocó en hielo durante 5 minutos, proceso que se repitió durante 30

minutos. Pasado este tiempo se llevó a centrifugación a 5000g por 10 minutos y se conservó el sobrenadante. Los medios de excreción y los productos del lisado celular fueron conservados en alícuotas dentro de tubos eppendorff en refrigeración a -80°C hasta el momento de realizar la determinación de proteínas y ensayos posteriores.

6.5. *Perfil de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.*

Se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturizantes SDS-PAGE al 10% (gel resolutivo) de los medios de excreción y de los productos del lisado celular (con su correspondiente control), con el fin de caracterizar las proteínas que se liberan al medio extracelular y las que permanecen en el contenido citoplasmático, en función de su peso molecular para establecer comparaciones entre las muestras. La corrida se realizó a un voltaje de 120 mA y una temperatura de 4°C. Pasado el tiempo de corrida se tiñeron los geles con Azul de Coomassie R-250 1% por 30 minutos y luego se decoloraron (Etanol al 10% y Ácido acético al 10%) hasta observar las bandas deseadas. Se colocó una cantidad de 140 µg de proteínas por bolsillo para las electroforesis de los medios de excreción y 80 µg de proteínas para las electroforesis de los homogenatos celulares (47).

6.6. *Actividad gelatinolítica de medios de excreción de los cultivos celulares mediante zimografía.*

La actividad enzimática fue evaluada a través de un ensayo de zimogramas, donde se construyeron matrices sólidas de poliacrilamida al 10% (gel resolutivo) en condiciones no desnaturizantes SDS-PAGE, copolimerizado con gelatina a una concentración de 0,05%. La corrida se realizó bajo los mismos parámetros de las corridas electroforéticas. Al finalizar, los geles fueron incubados con Tritón X-100 2,5% durante 30 minutos bajo agitación suave. Luego se realizaron lavados con agua destilada para remover la solución de Tritón X-100 hasta observar la desaparición de burbujas (al menos 3 lavados). Para inducir la actividad enzimática, los geles se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas en buffer de replegamiento, constituido por Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 50 mM y a pH 7.6. Luego, fueron lavados con agua destilada y teñidos con Azul de Coomassie G-

250 1% por 30 minutos. Los geles se decoloraron hasta observar las bandas de actividad. Se colocó una cantidad de 140 µg de proteínas por bolsillo para todas las zimografías.

6.7. *Ensayos de inhibición de la actividad enzimática.*

Fueron aplicados los inhibidores Leupeptina 1 mM y PMSF 1 µM dentro del contenido del bolsillo de muestra antes de realizar la corrida. Además, se aplicó EDTA 5 mM colocado al momento de incubar el zimograma con buffer de replegamiento. Transcurridas las 24 horas se realizó un lavado con agua destilada de todos los geles y se tiñeron con Azul de Coomassie G-250 1% por 30 minutos.

6.8. *Determinación de la actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de cáncer de mama cultivados en medio condicionado.*

Se agregó una variante a la determinación de la actividad gelatinolítica, realizando cultivos de ambas líneas celulares, esta vez crecidos en medio condicionado compuesto por DMEM suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomina 1% y L-glutamina 1% y medio de excreción proveniente del cultivo de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano). Se empleó un factor de dilución a razón de 1:1 de medio fresco y medio de excreción de Vero. Luego de tratados con los compuestos correspondientes se realizaron zimogramas y ensayos de inhibición, de igual forma que los cultivos realizados en primer lugar.

6.9. *Determinación de las Metaloproteasas 2 y 9 mediante Western blot.*

Se realizó un Western blot de las muestras analizadas anteriormente para determinar la presencia de las MMP-2 y MMP-9, realizando una electrotransferencia de las proteínas separadas por electroforesis hacia una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó un buffer de transferencia constituido por: glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, SDS 0,0375% y metanol 20% a pH 8.3. Este proceso se completó en una hora de corrida a 100 mA cuidando mantener el buffer de Transferencia a una temperatura baja. Pasado este tiempo, se retiró la

membrana de nitrocelulosa y se tiñó con Rojo Ponceau 0,01% en Ácido acético al 0,1% y Agua destilada, para verificar la transferencia completa de las proteínas. La solución de Rojo Ponceau se retiró con agua destilada a presión con ayuda de una pizeta. Luego, se realizó el bloqueo de las membranas de nitrocelulosa con una solución con leche descremada en polvo al 5% en TBS constituido por Trizma base 200 mM y NaCl 500 mM, durante media hora en agitación suave. Para retirar la solución de saturación se realizaron tres lavados con TBS-T (Solución TBS más Tween 20 al 0,05%) de cinco minutos cada uno. Finalmente, las membranas bloqueadas fueron incubadas toda la noche en agitación suave y temperatura de 4°C con los anticuerpos primarios monoclonales MMP-2 y MMP-9 a una concentración de 2 µg/mL y 4 µg/mL respectivamente, cada uno disuelto en una solución de TBS-T. Se utilizó Peroxidasa conjugada como anticuerpo secundario en una dilución de 1:5000 con TBS-T y Luminol como solución reveladora.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. *Determinación del efecto citotóxico.*

Los resultados obtenidos por el método del MTT se muestran a continuación:

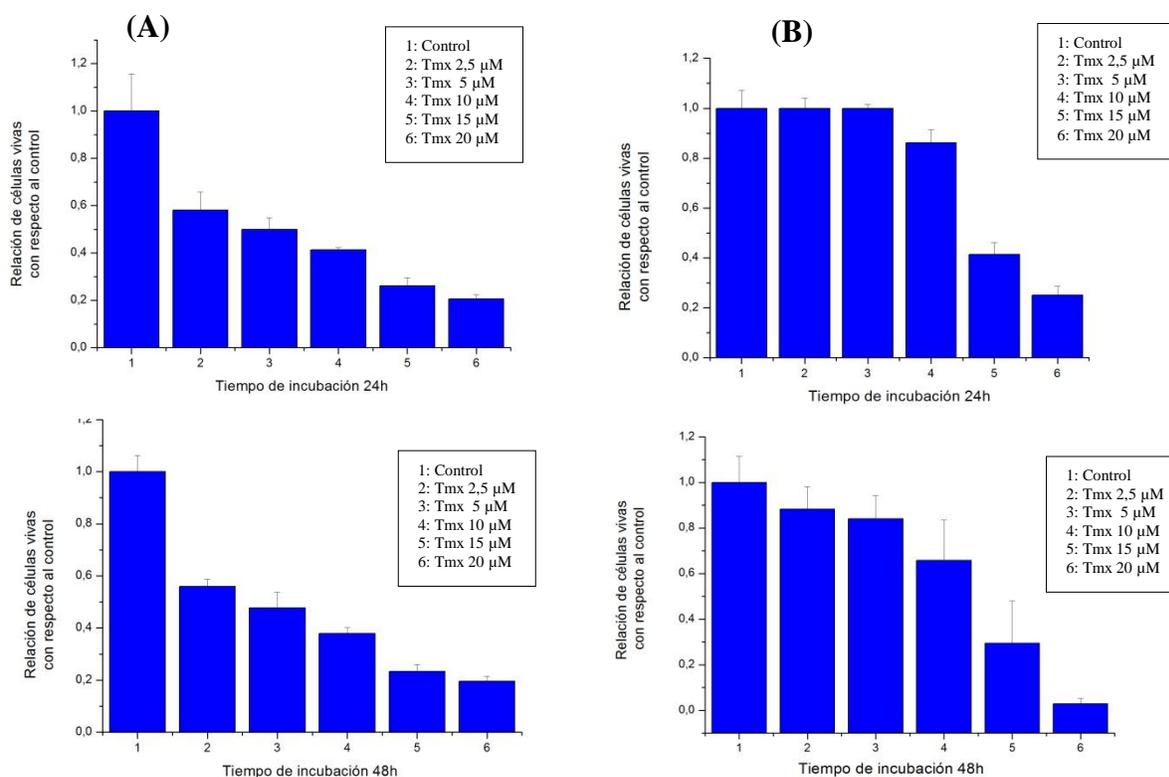


Figura 4. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con Tamoxifen. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).

El análisis de MTT demuestra que los compuestos TMX, DM5 y JS89 tuvieron un efecto citotóxico sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, el cual depende principalmente de la concentración aplicada y el tiempo de exposición. En las Figuras 4 y 5, se observa que a medida que aumenta la concentración de TMX disminuye la proporción de células vivas con respecto al control. Sin embargo, el efecto citotóxico provocado por este compuesto es diferente sobre cada línea celular. En MCF-7, todas las concentraciones

evaluadas produjeron una reducción en la población celular de más del 30% mientras que en SKBR3 sólo las concentraciones mayores a 10µM produjeron un efecto apreciable.

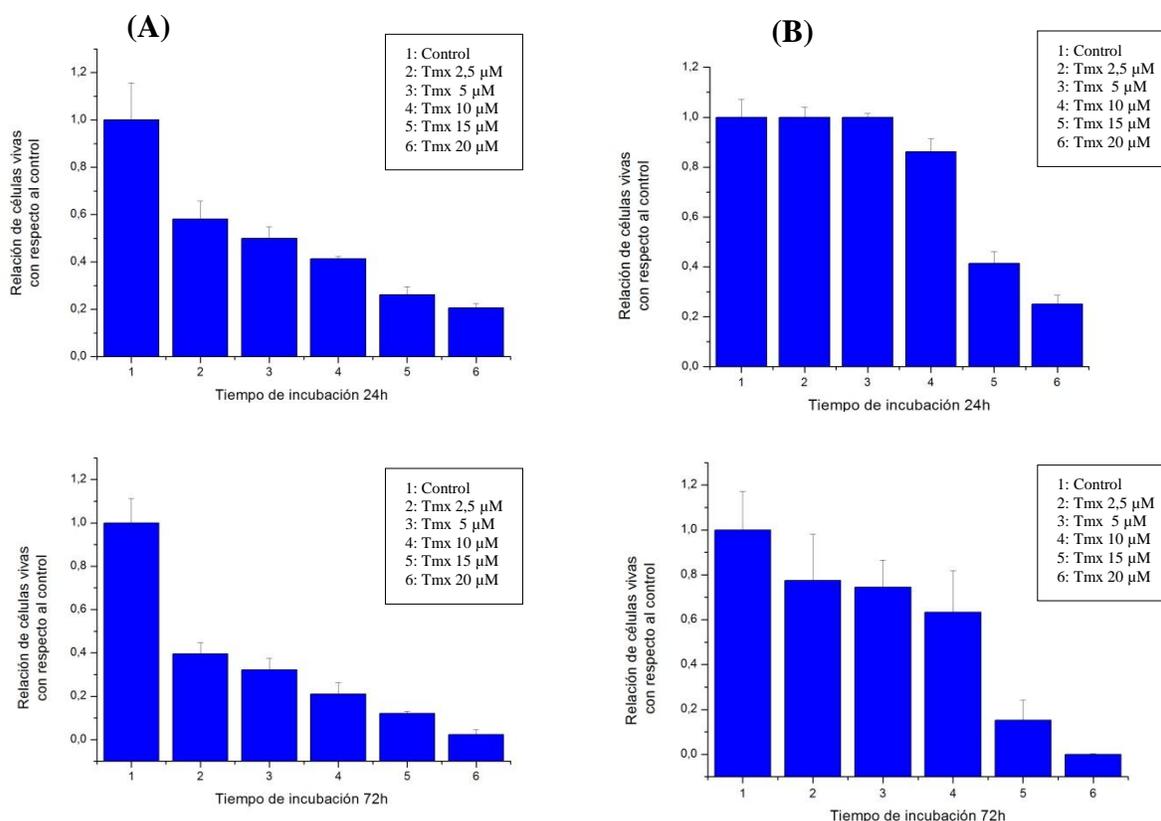


Figura 5. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con Tamoxifen. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).

En cuanto al tiempo de exposición, se observa en la Figura 5, que a medida que transcurren las horas, el efecto citotóxico del TMX para una misma concentración va incrementando. A las 24 horas de tratamiento, 10 µM de compuesto provoca la disminución de aproximadamente un 60% \pm 0,008 de la población celular en MCF-7 y luego de pasadas 72 horas de incubación este valor aumenta a un 80% \pm 0,05. De igual forma, la proporción de células vivas en SKBR3 a las 24 horas de incubación, disminuye en un 10% \pm 0,18 mientras que a las 72 horas lo hace en un 30% \pm 0,05 para una concentración de 10 µM.

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: *Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de tamoxifen en diferentes tiempos de tratamiento.*

Línea Celular	TMX 24 horas	TMX 48 horas	TMX 72 horas	Concentración
MCF-7	60% ± 0,008	60% ± 0,0227	80% ± 0,05	10 µM
SKBR3	10% ± 0,18	30% ± 0,17	30% ± 0,05	10 µM

El TMX es utilizado como terapia hormonal del cáncer de mama sobre los subgrupos tumorales que presentan RE en su morfología. La línea celular MCF-7 es conocida por poseer los 3 tipos de RE que permiten a dicho compuesto desempeñar su papel antagonista. Cuando el estrógeno en forma de estradiol se une con el RE, ocurren cambios conformacionales que resultan en la dimerización del complejo ER α y Er β . La formación de dicho complejo esta mediada por proteínas que modulan la actividad transcripcional de elementos del ADN conocidos como “elementos de respuesta al estrógeno” los cuales, resultan en la supervivencia y la proliferación celular. Los RE también tienen como producto de activación a los genes Fos/Jun y modulación de la ciclina D1 del ciclo celular. Por otro lado, el RE de membrana GPR30, tiene influencia sobre la actividad de otros receptores de superficie como el EGFR, HER2, IGF-1R y otros receptores acoplados a proteína G, los cuales comienzan vías de señalización para la transducción y activación de quinasas, fosfatasas y para la generación de segundos mensajeros y flujos de calcio (57). El TMX inhibe a los genes responsables de los factores de crecimiento tumoral, produce el bloqueo de la fase G1 del ciclo celular e induce apoptosis. Según Criscitiello *et al.*, 2011, las terapias con TMX han disminuido la tasa de mortalidad anual en un 34% en pacientes RE-positivas pre y postmenopáusicas (15).

Pese a lo anterior, existen otros subgrupos de cáncer de mama con otras características moleculares y que presentan RE ausente, variante o alterado, lo que se traduce en resistencia al tratamiento con TMX o la posibilidad de llegar a desarrollarla con el tiempo. Además, se ha demostrado que los subgrupos de cáncer con sobreexpresión de HER2 sin importar la presencia o ausencia de RE y RP tienen poca respuesta al TMX según estudios realizados en líneas celulares modificadas como MCF-7/HER2-18 (55). En algunos casos, bajo el tratamiento con TMX en subgrupos con la combinación RE positivo y HER2 positivo induce estimulación del crecimiento. La línea celular SKBR3 presenta sobreexpresión del HER2 y expresión de GPR30, lo que puede explicar el efecto observado en los análisis de MTT (16, 27).

Por otro lado, se ha demostrado que el TMX desacopla los procesos de fosforilación oxidativa mitocondrial, proceso de generación de ATP crucial para surtir de energía al metabolismo. Se conoce que este compuesto afecta el flujo de calcio intracelular, un segundo mensajero responsable de la señalización de múltiples procesos y también afecta de manera general la estabilidad celular por inducir estrés oxidativo y cambios en el pH (10, 30, 31, 40).

De forma similar al TMX, el DM5 muestra un efecto citotóxico marcado sobre los cultivos de la línea celular MCF-7 mientras que la línea SKBR3 el efecto es menor. Las *Figuras 6 y 7*, nos indica que a medida que aumenta la concentración de DM5 disminuye la proporción de células vivas en MCF-7. A las 24 horas de tratamiento la reducción de la población es de un $65\% \pm 0,05$ para $30 \mu\text{M}$ de concentración y dicha proporción se mantiene sin cambios importantes en todos los tiempos de incubación. Por otro lado, para la línea SKBR3, la disminución de población celular solamente se aprecia a partir de las 48 horas de tratamiento bajo una concentración de $30 \mu\text{M}$, la cual comienza en un $20\% \pm 0,06$ y luego de 72 horas aumenta a $40\% \pm 0,08$. Además de estos valores, DM5 no muestra efectos citotóxicos importantes en los demás casos de SKBR3.

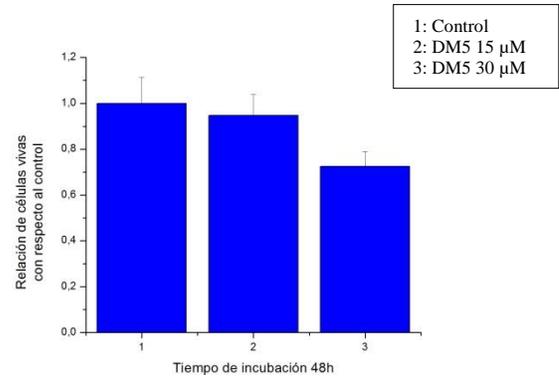
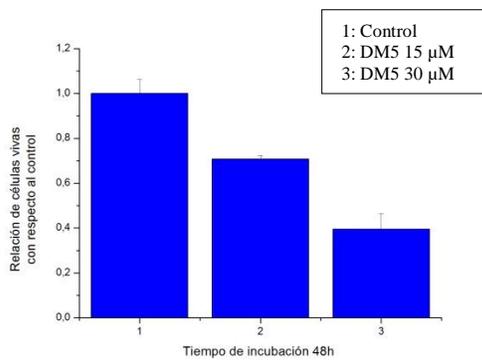
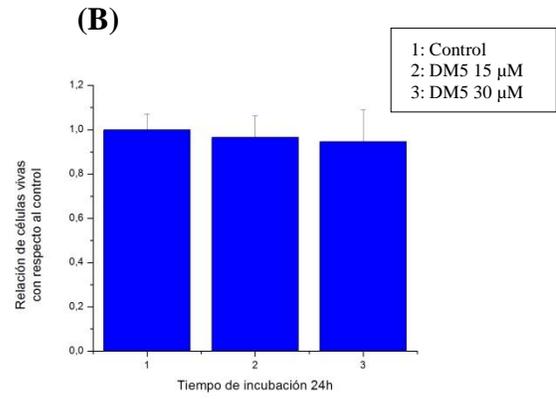
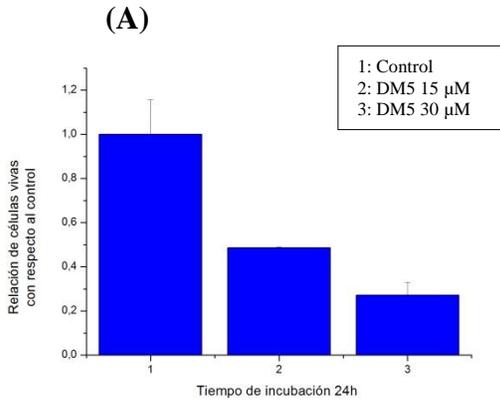
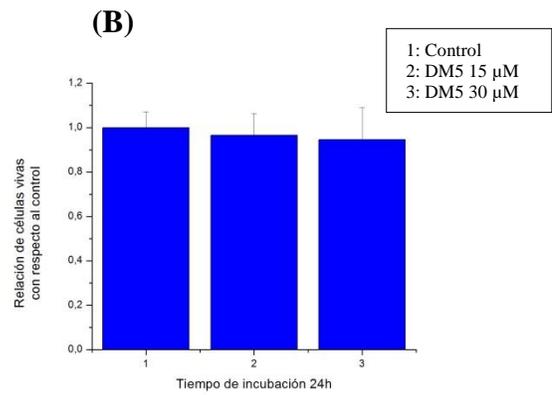
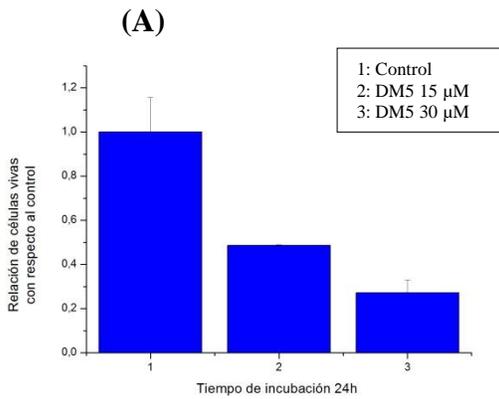


Figura 6. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con DM5. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).



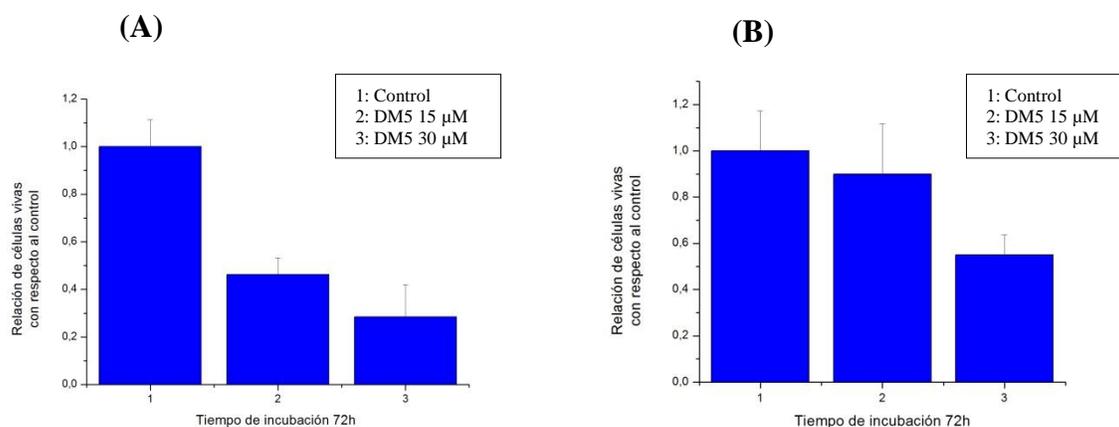


Figura 7. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con DM5. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).

Como puede observarse, el compuesto DM5 inhibe la proliferación celular en ambas líneas. No obstante, se observa que en el caso de la línea SKBR3 la inhibición resulta menor, teniéndose los siguientes valores:

Tabla 2: Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de DM5 en diferentes tiempos de tratamiento.

Línea Celular	DM5 24 horas	DM5 48 horas	DM5 72 horas	Concentración
MCF-7	65% ± 0,05	60% ± 0,07	65% ± 0,13	30 μM
SKBR3	Sin efecto	20% ± 0,06	40% ± 0,08	30 μM

En las Figuras 8 y 9, se observa que el compuesto JS89 provoca un efecto citotóxico en ambas líneas celulares, siendo este mayor en MCF-7. En dicha línea celular se presenta un comportamiento similar al observado con el compuesto DM5, donde a las 24 horas se obtiene una disminución de la proporción de células vivas del 75% ± 0,007 bajo una concentración de 30 μM, que en los demás tiempos evaluados no varía de manera

importante. A diferencia de MCF-7, la línea SKBR3 a las 24 horas de exposición no muestra una gran disminución en la población celular. Sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición este compuesto logra una disminución del $60\% \pm 0,21$ de la proporción de células vivas bajo $30\ \mu\text{M}$ de concentración.

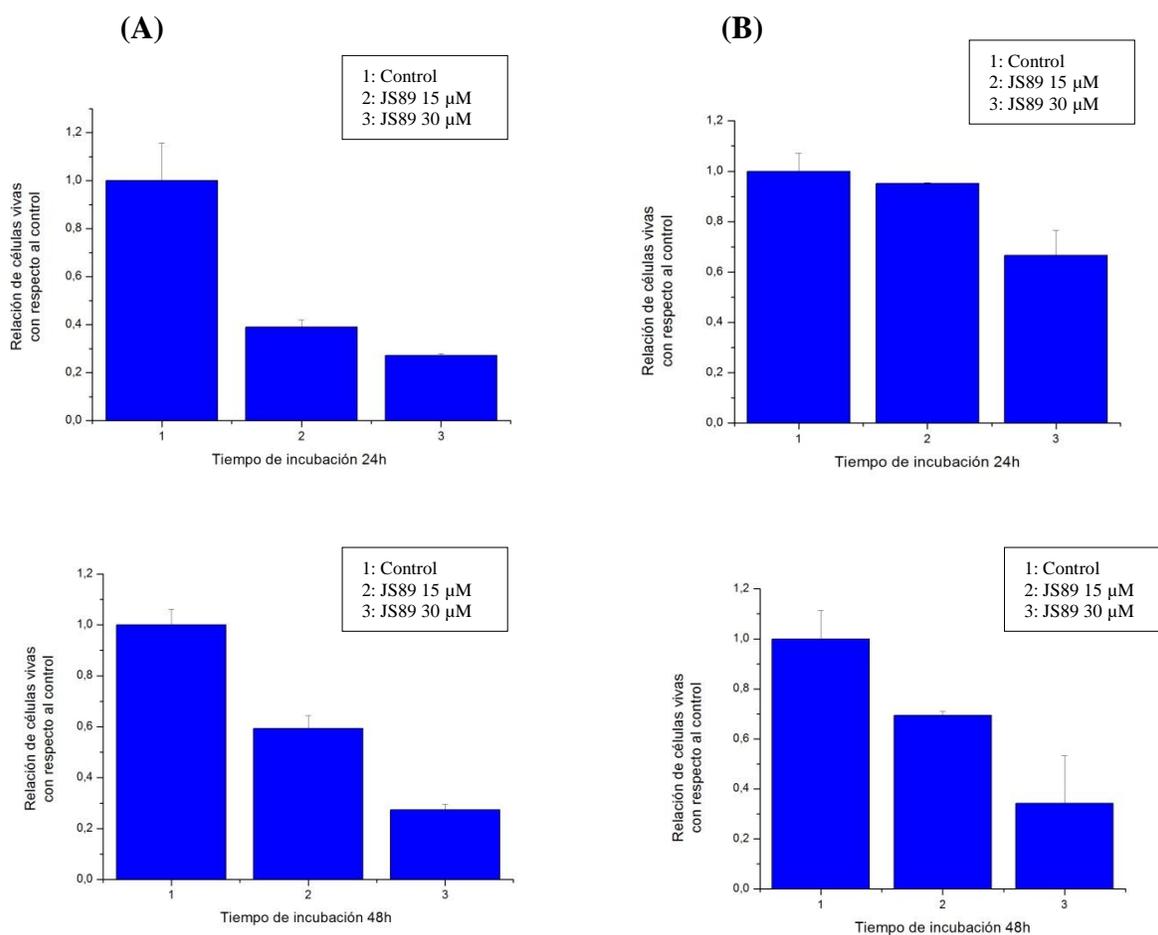


Figura 8. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento con JS89. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).

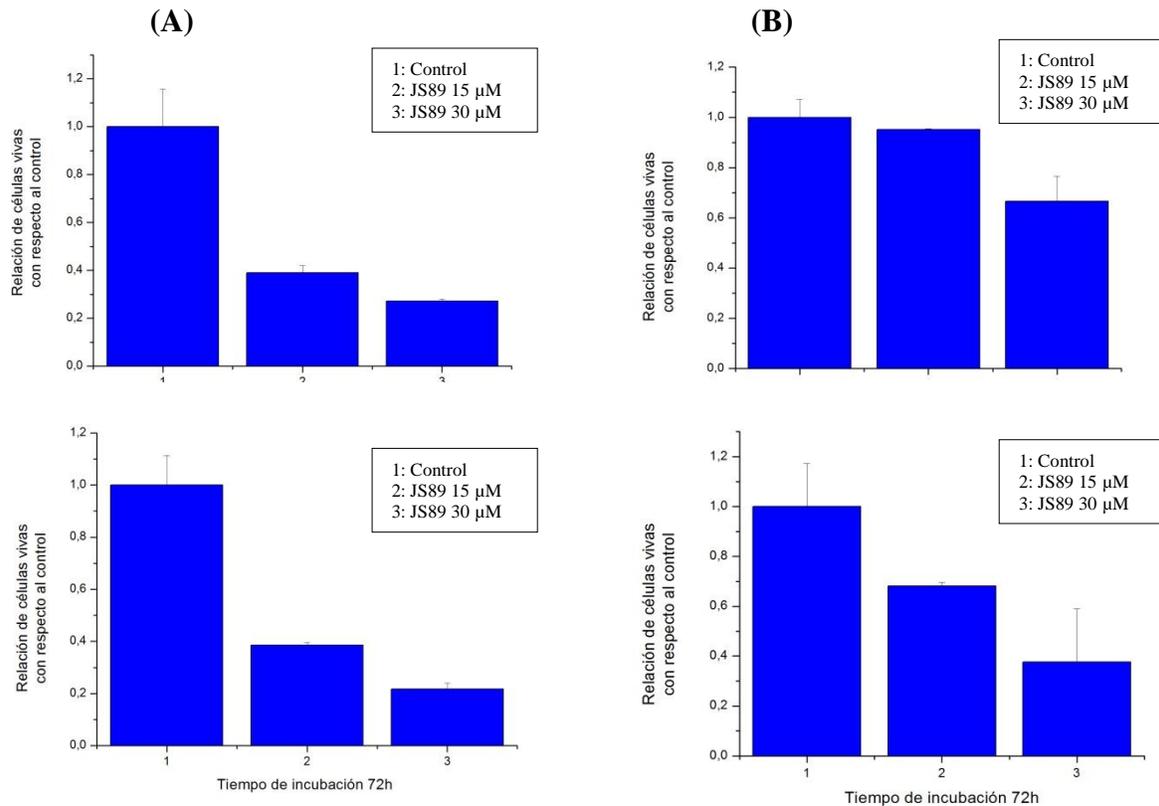


Figura 9. Relación de células vivas con respecto al control a las 24 y 72 horas de tratamiento con JS89. MCF-7 (A) y SKBR3 (B).

En el caso del compuesto JS89 los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 3: Porcentajes de citotoxicidad para una misma concentración de JS89 en diferentes tiempos de tratamiento.

Línea Celular	JS89 24 horas	JS89 48 horas	JS89 72 horas	Concentración
MCF-7	75% ± 0,007	75% ± 0,02	80% ± 0,022	30 μM
SKBR3	40% ± 0,1	60% ± 0,19	60% ± 0,21	30 μM

Algunas tetrahydroquinolinas sustituidas han sido utilizadas como compuestos anti-neoplásicos ya que además de provocar estrés oxidativo y en algunos casos la inhibición de la actividad de Telomerasas, poseen efectos anti-angiogénicos y pro-apoptóticos (18). Se han realizado algunos reportes empleando compuestos análogos del DM5 como el DM8 y DM12, donde la aplicación de los mismos inhibe el crecimiento celular en líneas de cáncer de mama MCF-7 y SKBR3 y de forma similar a lo observado en esta investigación, la línea MCF-7 se mostró más sensible a los tratamientos que la línea SKBR3 (39).

De igual forma que DM5, en el caso del compuesto JS89, se evidencia la inhibición de la proliferación celular en ambas líneas celulares, siendo menor el efecto bajo la misma concentración sobre la línea SKBR3. Se ha reportado que compuestos análogos al JS89 tienen efectos sobre la viabilidad celular e inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer. Mayora *et al.*, 2014, realizaron estudios sobre la línea PC-3 de cáncer de próstata, empleando cinco tetrahydroquinolinas sustituidas, denominados como JS87, JS79, JS92, JS56, y JS43. En sus resultados obtuvieron efectos citotóxicos tiempo y dosis dependiente con cada uno de los compuestos sobre las células de próstata. Estos autores reportan que los compuestos señalados inducen apoptosis dada la pérdida de la permeabilidad celular y fragmentación del ADN observada en células de PC-3, mediante citometría de flujo.

Como se mencionó anteriormente, las tetrahydroquinolinas son inhibidores de la actividad tirosín quinasa así como de algunos factores como el factor de crecimiento similar a insulina (59). En este sentido, el Linomide, un tipo de quinolina conocida por actuar como inmunoestimulante, activando a células del sistema inmune, como macrófagos y natural killer, tiene un efecto anti-androgénico según estudios realizados en cáncer de próstata *in vivo* (61).

Kouztnesov *et al.*, 2014, registraron los efectos citotóxicos de una variedad de tetrahydroquinolinas sustituidas mediante MTT sobre cultivos de MCF-7 y SKBR3, donde la mayoría de los compuestos probados tuvieron un valor de IC₅₀ menor en los cultivos de la línea MCF-7. Según Wallace *et al.*, 2003, algunos de estos compuestos tienen afinidad por RE y por lo tanto pueden actuar como moduladores selectivos de los mismos, esto podría explicar la sensibilidad de este tipo de línea celular a compuestos como DM5 y JS89 y la moderada resistencia que muestra la línea SKBR3.

En la *Tabla 4*, se pueden observar los valores de las concentraciones medias inhibitorias en cada línea celular:

Tabla 4. *Concentración media inhibitoria aproximada para cada tratamiento en ambas líneas celulares.*

Concentración media inhibitoria (μM)		
	Línea celular	
Compuesto	MCF-7	SKBR3
TMX	5	15
DM5	15	> 30
JS89	15	30

La línea SKBR3, requirió mayores concentraciones de compuesto en todos los casos, siendo DM5 el compuesto donde no se encontró concentración media inhibitoria, bajo las condiciones establecidas.

Los valores obtenidos con TMX coinciden con los IC_{50} reportados, su grado de citotoxicidad es conocido y por esta razón se utiliza como control positivo en los experimentos. Darakhshan y Ghanbari, en el 2013 utilizaron al TMX sobre la línea MCF-7 y obtuvieron un valor de concentración media inhibitoria de $5 \mu\text{M}$. La línea SKBR3 al no presentar RE clásicos, se muestra un poco más resistente al tratamiento requiriendo $15 \mu\text{M}$ para disminuir la proporción de células vivas a la mitad.

Para DM5 y JS89, los valores coinciden con los registros de Mayora *et al.*, 2014, donde los IC_{50} de los compuestos del tipo JS sobre la línea celular PC-3, siendo de $25 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$ para los cinco tipos de tetrahydroquinolinas utilizadas. Dentro del grupo de compuestos a los que pertenece el DM5, se ha registrado que las diferencias en los grupos químicos que se encuentran agregados a la estructura básica, determinan el grado de

citotoxicidad de cada isómero. Muñoz *et al.*, 2010 demostraron que el DM12 el cual posee dos grupos de óxido nitroso (NO₂) añadidos en posición *orto*, tiene un mayor efecto citotóxico sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 en comparación con DM8 que posee un grupo amino (NH₂). El DM5 en su estructura carece de dichos grupos químicos añadidos, lo que puede resultar en una menor citotoxicidad sobre líneas de cáncer de mama (29, 39).

Kouznetsov *et al.*, 2014, determinaron valores de IC₅₀ mediante MTT de los compuestos DM5 y JS89, sobre las líneas MCF-7 y SKBR3, obteniendo para DM5 un IC₅₀ de 13,95 ± 1,06 μM en MCF-7 y de 38,10 ± 0,08 μM y para JS89 22,52 ± 1,21 μM en MCF-7 y 33,10 ± 1,85 μM en SKBR3. Valores que se asemejan a los obtenidos en esta investigación.

A continuación, observamos en las *Figuras 10 y 11*, las micrografías de los cultivos celulares tomadas luego de 48 horas de tratamiento con los diferentes compuestos.

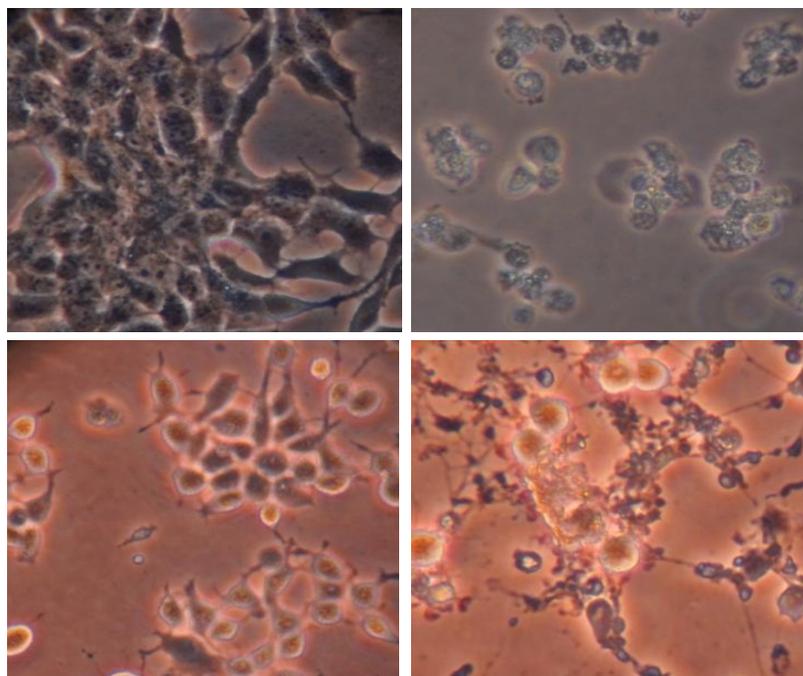


Figura 10. Micrografías de los cultivos de MCF-7 luego de 48 horas de tratamientos con Tamoxifen (arriba/derecha), DM5 (abajo/izquierda) y JS89 (abajo/derecha) y su Control (arriba/izquierda). Aumento: 40X.

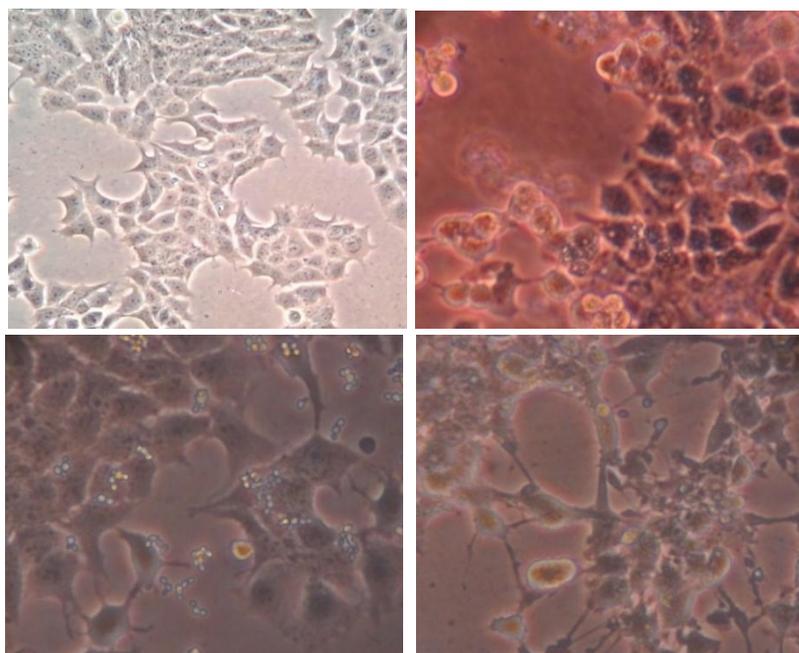


Figura 11. Micrografías de los cultivos de SKBR3 luego de 48 horas de tratamientos con Tamoxifen (arriba/derecha), DM5 (abajo/izquierda) y JS89 (abajo/derecha) y su Control (arriba/izquierda). Aumento: 40X.

Se observa un cambio morfológico de las células incluso con disrupción de la monocapa en ambas líneas celulares. En todos los tratamientos, en mayor o menor grado se observa la aparición de células lisadas, presencia de células refringentes con prolongaciones delgadas y alargadas, lo que puede significar el desarrollo de un proceso de apoptosis.

Durante la apoptosis se desencadenan procesos que comienzan con la activación de receptores de muerte celular como el TNF y Fas, la inhibición del gen p53 y expresión de algunas proteínas como las Caspasas, Bcl-2, Apaf-1, entre otras, que en conjunto afectan la permeabilidad de la membrana celular, comienzan la formación del apoptosoma, degradación del ADN nuclear y empaquetamiento de material citoplasmático en vesículas pequeñas. Las células en apoptosis sufren una etapa de retracción que provoca un aspecto delgado y alargado de las células. Además, la adhesión celular mediada por las proteínas como integrinas y cadherinas, se ve interrumpida resultando en la separación de las células con su sustrato (aparición del color amarillo) y la disgregación de la monocapa (4, 14, 37).

Por estas razones, el aspecto observado en las *Figuras 10 y 11*, bien pudiese reflejar el proceso de apoptosis inducida por efecto de los compuestos evaluados.

7.2. *Determinación del perfil proteico de medios de excreción y contenido citoplasmático.*

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

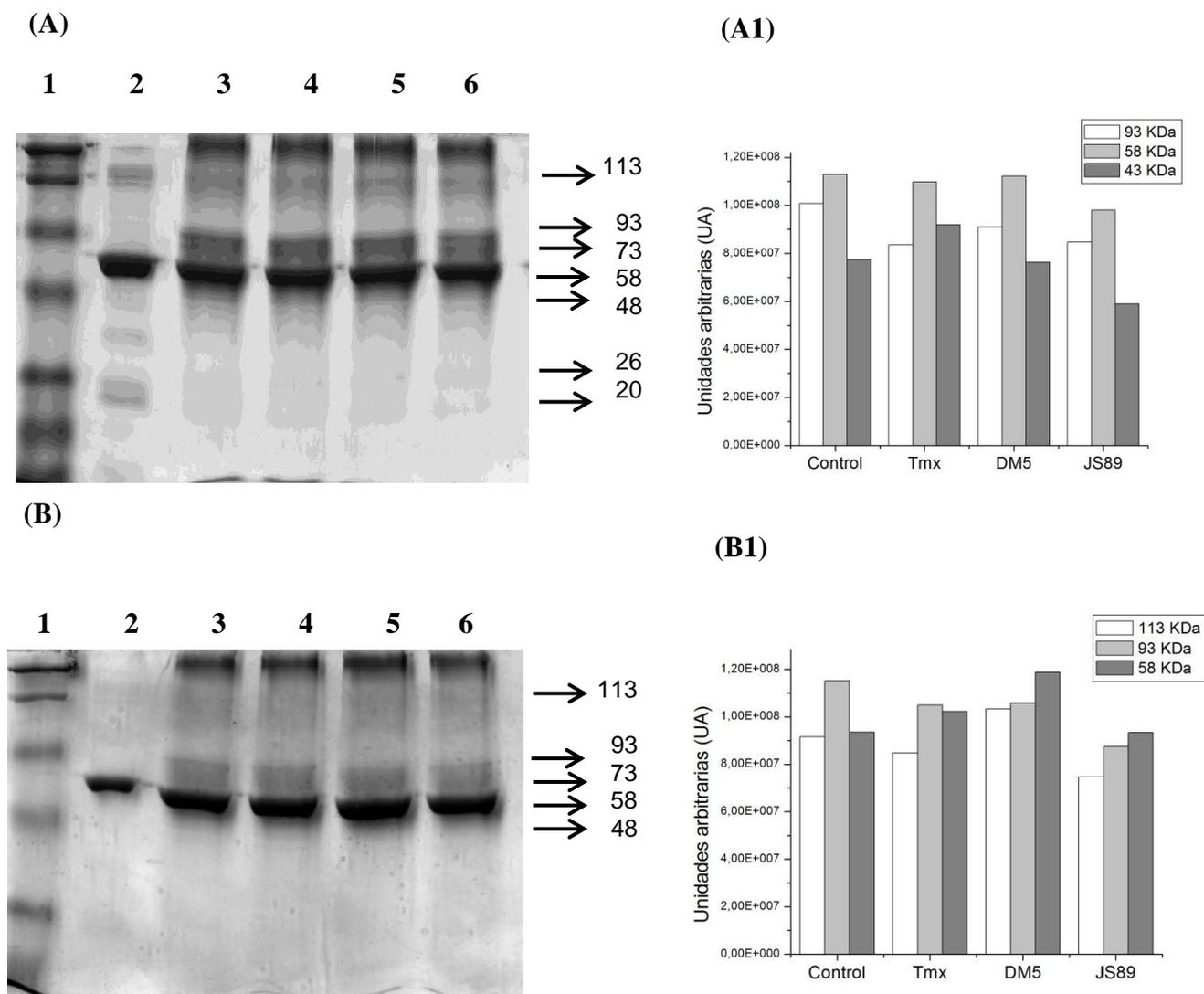


Figura 12. Perfil proteico de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Patrón de pesos moleculares (1), Patrón de BSA (2), Control (3), TMX (4), DM5 (5) y JS89 (6). Densidad de las proteínas de excreción obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).

En la *Figura 12*, se observan los resultados correspondientes al perfil proteico de los medios de excreción obtenidos de ambas líneas celulares, luego de 48 horas de tratamiento con cada uno de los compuestos y su respectivo control. Dicho perfil es similar en ambos casos y se conserva entre tratamientos. Existe una predominancia de proteínas de pesos moleculares entre 40 y 120 kDa, y la proteína de 58 kDa es la de mayor expresión en ambos casos. Las proteínas de menores pesos moleculares entre 20 y 26 kDa no se encuentran presentes en MCF-7. Además se observa que la línea SKBR3 muestra mayor excreción de proteínas al medio extracelular en comparación con la línea MCF-7. Al analizar los gráficos de densidad de bandas, se tiene que en SKBR3 los tratamientos no afectaron en gran medida la excreción de proteínas al medio. Sin embargo, JS89 provoca una disminución de aproximadamente 0,2 UA en comparación con el control. En el caso de la línea MCF-7 la expresión de las proteínas de 113 y 58 kDa parece aumentar bajo el tratamiento con DM5. Mientras que con JS89 las bandas de 113 y 93 kDa disminuyen su intensidad.

Resultados correspondientes al perfil proteico de homogenatos celulares se muestran a continuación:

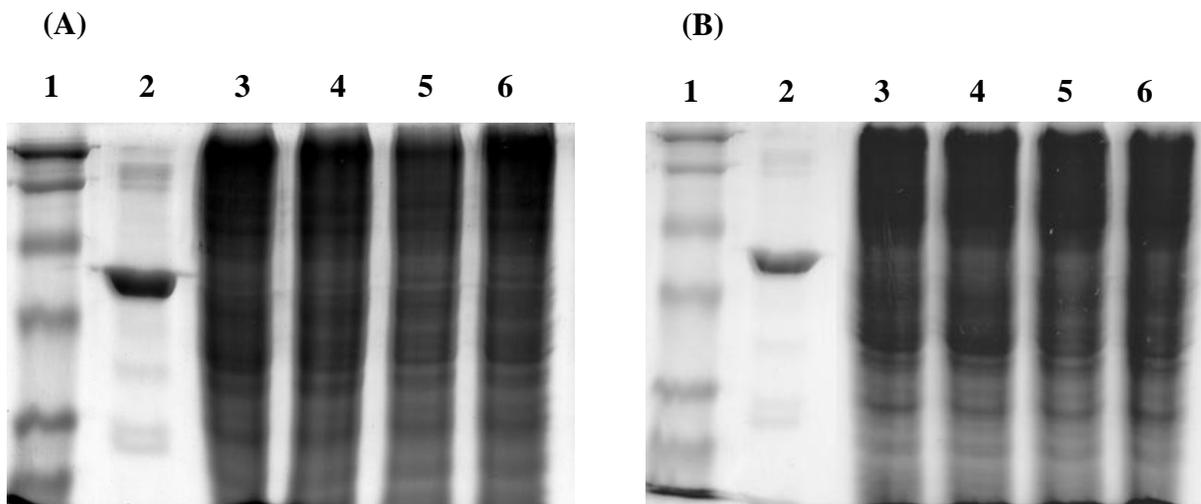


Figura 13. Perfil proteico de contenido citoplasmático de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Patrón de pesos moleculares (1), Patrón de BSA (2), Control (3), TMX (4), DM5 (5) y JS89 (6).

En la *Figura 13*, se evidencia que las proteínas de menores pesos moleculares de la línea celular MCF-7 se encuentran en menor proporción que las mostradas en el perfil de SKBR3. Se evidencia que a nivel citoplasmático, los tratamientos aplicados no ejercen efecto notable sobre la expresión de ciertos tipos de proteínas, en ninguno de los casos evaluados.

La línea SKBR3 al sobreexpresar genes como Her2/c-erb-2, aumenta la activación de cascadas de señalización de MAPKs que resultan en el incremento de la proliferación celular y por consiguiente probablemente esto se traduzca en una mayor expresión de productos de excreción. Por esta razón, el perfil proteico de SKBR3 posee mayor número de bandas de diversos pesos moleculares (4, 52).

Como ya se ha mencionado, el TMX inhibe la transcripción de fragmentos del genoma ya que impide la unión del estrógeno con su receptor y por ende las cascadas de señalización responsables de que esto ocurra se inactivan. Por lo tanto, en el caso de la línea MCF-7 existen mayor cantidad de blancos de acción por parte del TMX, lo cual puede argumentar el hecho de reportar mayores valores de citotoxicidad en esta línea celular en comparación con la línea SKBR3 (10).

7.3. *Actividad gelatinolítica de medios de excreción y contenido citoplasmático. Ensayos de inhibición enzimática.*

Los ensayos de zimografías demuestran la existencia de actividad gelatinolítica en las proteínas contenidas en el medio de excreción de las células de cáncer de mama de diferentes subtipos. La *Figura 14*, muestra que el perfil gelatinolítico de ambas líneas celulares es diferente. En la línea celular SKBR3, se tiene la actividad de al menos cuatro proteínas de pesos moleculares que van de 40 a 100 kDa, siendo la proteína de 65 kDa la de mayor intensidad. Por otro lado, en los medios de excreción de la línea celular MCF-7 se evidencian cinco bandas con actividad gelatinolítica, siendo la proteína de 80 kDa la de mayor actividad. Comparando los patrones, la línea MCF-7 muestra mayor presencia de enzimas proteolíticas que la línea SKBR3, a pesar de que el perfil proteico por

electroforesis (*Figura 12*) muestra que se excretan en menor concentración. Se observa además que existe una pequeña diferencia entre los tratamientos colocados. El TMX, DM5 y JS89 tienden a disminuir la actividad gelatinolítica de las proteínas de 65 y 56 kDa con referencia al control en SKBR3, mientras que en MCF- 7, si bien el TMX disminuye la actividad de todas las proteínas evaluadas, DM5 y JS89 aumentan la actividad de la proteína de 71 kDa.

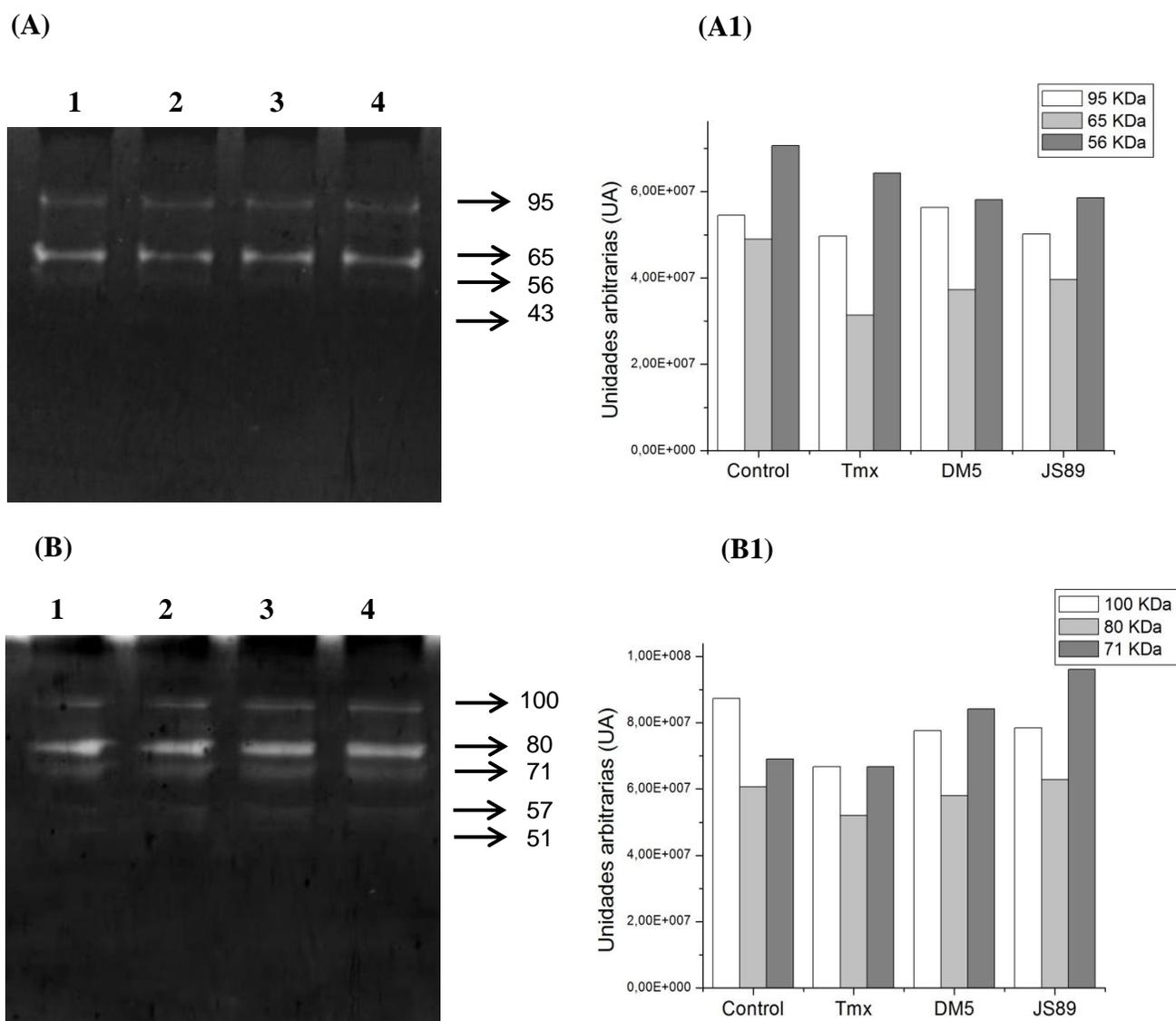


Figura 14. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Densidad de las bandas

de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).

A continuación se observan los geles de zimografía en presencia de EDTA (*Figura 15*) empleado como inhibidor de metaloproteasas dada su acción quelante.

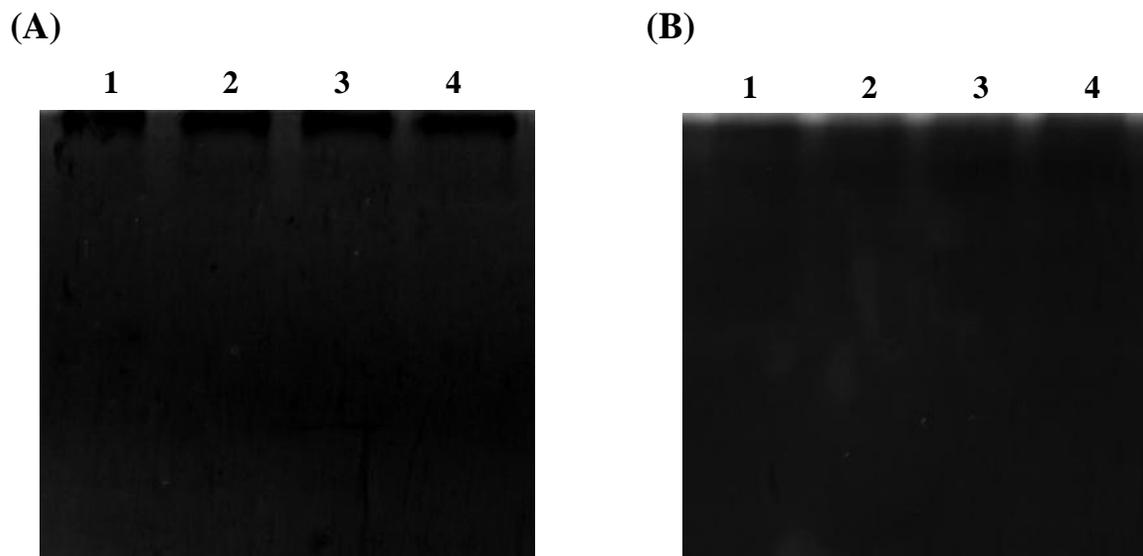


Figura 15. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con EDTA 5mM.

Como puede observarse, se obtuvo la inhibición de todas las bandas que poseían actividad en ambas líneas celulares, lo que evidencia la dependencia de dichas proteínas a la presencia de cationes divalentes en el medio como el Ca^{2+} y el Zn^{2+} .

El EDTA es una molécula que se utiliza como agente quelante de iones divalentes entre ellos algunos metales como el Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y otros iones como el Ca^{2+} . Las proteasas generalmente necesitan de un componente no proteico para su activación denominado cofactor. Las MMPs utilizan como cofactores algunos iones metálicos, especialmente el Zn^{2+} pero este papel también puede ser desempeñado por el ión Ca^{2+} (8).

En las *Figuras 16* y *17*, se evidencia el efecto de la leupeptina y el PMSF en la actividad gelatinolítica y se observa que en todos los casos dicha actividad es inhibida por

ambas moléculas. Sin embargo, sólo en el caso del PMSF, se obtuvo la desaparición total de alguna de las bandas de actividad.

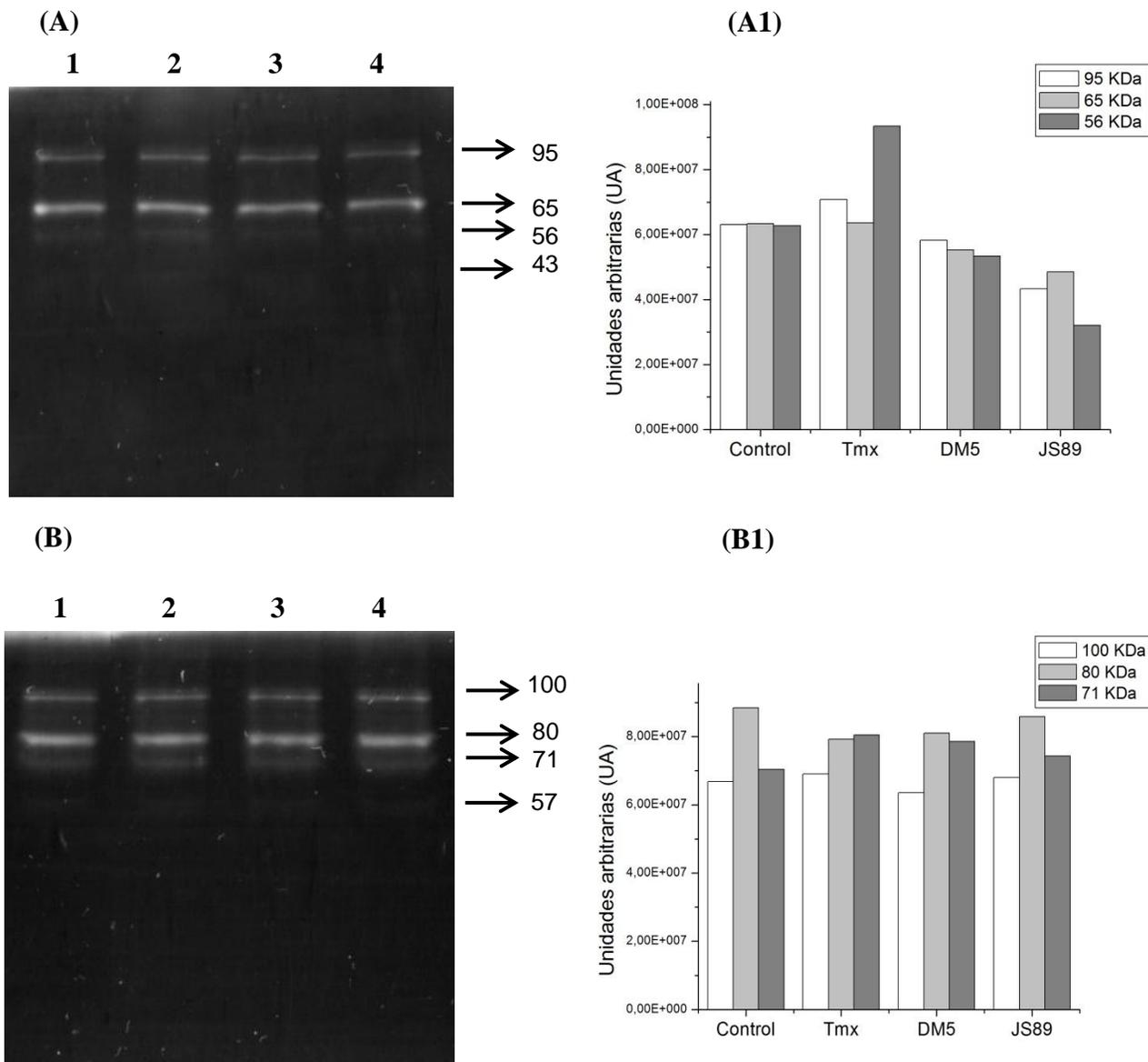


Figura 16. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con Leupeptina 1mM. Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).

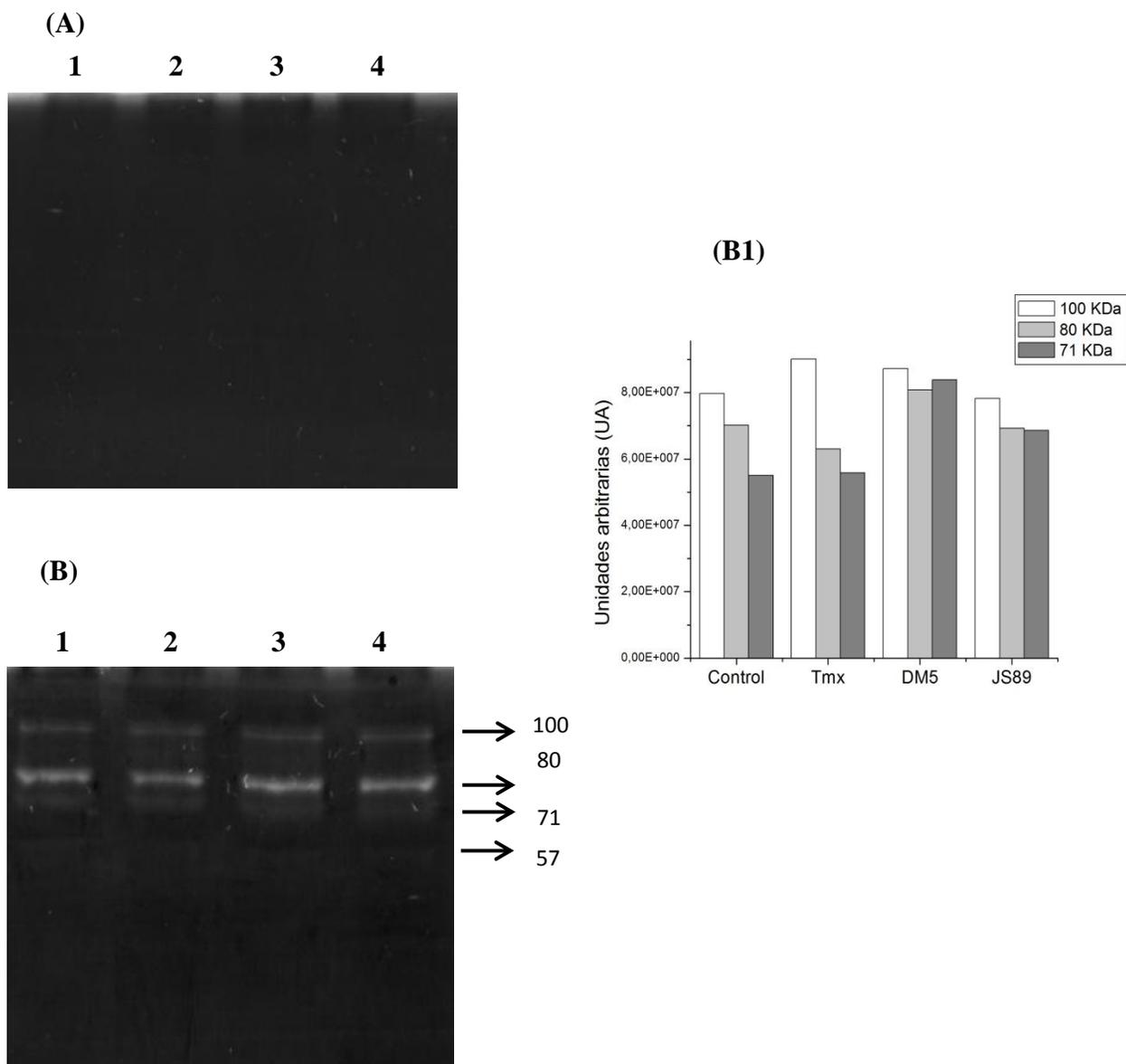


Figura 17. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con PMSF 1 μ M. Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de MCF-7 (B1).

La Leupeptina y el PMSF son inhibidores de proteasas. El PMSF es específico reconocer e inhibir serin-proteasas y generalmente es utilizado en el laboratorio para impedir la digestión de algunas muestras biológicas. La leupeptina por otro lado, inhibe la acción de cisteín, serin y treonin proteasas. Esto puede explicar que en los zimogramas tratados con leupeptina, se haya disminuido la actividad de todas las bandas en cuestión, dado el amplio espectro de inhibición de este compuesto. Por otra parte, las proteasas que se excretan al medio por la línea SKBR3 son todas del tipo serin-proteasas al ser inhibidas por PMSF.

Como es conocido, las proteasas son de gran importancia en la progresión tumoral específicamente la metástasis. La degradación de la ME para la movilización y la invasión de las células tumorales a los vasos sanguíneos y otros tejidos, es mediada por un grupo heterogéneo de proteasas, que generalmente se excretan al medio extracelular donde son activadas por la presencia de cofactores, niveles de anoxia y de acidez (23, 51).

Estudios de biopsias realizadas en pacientes con cáncer colorectal han revelado la presencia de las MMP-2 y MMP-9, de menor a mayor grado dependiendo del avance de la enfermedad. Dichas enzimas no se encontraron en biopsias de tejido sano (13). La excreción de diversas MMPs en ensayos *in vitro* ha sido reportada en 15 líneas celulares de diversos tipos de cáncer, como cáncer de colon, mama y próstata. Las MMP-2 y MMP-9 suelen estar relacionadas con la tumorigenicidad (47). Los pesos moleculares de estas gelatinasas son de 72 y 92 kDa, respectivamente, pesos observados en el perfil de bandas proteolíticas de la *Figura 14*. Existen otros tipos de MMPs que por sus pesos moleculares y su actividad colagenolítica pudiesen estar relacionadas con el perfil de actividad gelatinolítica como lo son la MMP-8 (75 kDa), MMP-13 (60 kDa), MMP-3 (45 kDa) (47).

Las Cat K, L, D y B son proteasas que tienen un papel importante en cáncer. Algunos estudios han reportado que la expresión de los genes que codifican para las Cats por parte de las células del estroma del microambiente tumoral, promueve la migración de las células malignas. Algunas Cats se consideran como marcadores tumorales, ya que las mismas se expresan desde las etapas más tempranas de la enfermedad. También se ha reportado que degradan componentes de la MEC como el colágeno tipo IV. Las Cat D con 34 kDa y Cat B con 24 kDa coinciden con los pesos moleculares más bajos reportados en las zimografías (13, 21, 28, 49, 56).

Se ha demostrado que el TMX inhibe la actividad de algunas MMPs. Bendrick *et al.*, 2009, describen como el TMX inhibe la progresión de la angiogénesis mediante la regulación de la expresión de la MMP-9, en estudios realizados sobre cáncer ovárico. En otros reportes, se ha demostrado que líneas celulares que han creado resistencia al TMX presentan una mayor expresión de MMP-2 y MMP-9 en comparación con la línea MCF-7. El tratamiento prolongado con TMX y estradiol sobre células de cáncer de mama provoca un aumento de la expresión ambas enzimas, según Nilsson y Dabrosin, 2006. De igual forma, la aplicación de otros compuestos como el 3,39-Diindolylmethane (DIM), común en los vegetales verdes, sobre líneas celulares de cáncer provoca la disminución de la actividad de estas enzimas ya que dicho compuesto posee efectos anti carcinógenos que consisten en la inhibición de la Akt kinasa y por ende posee efectos sobre la proliferación celular (49).

En la *Figura 18*, se observan las zimografías realizadas con el homogenato de ambas líneas celulares. Como se evidenció, no existe actividad gelatinolítica en ninguno de los casos.

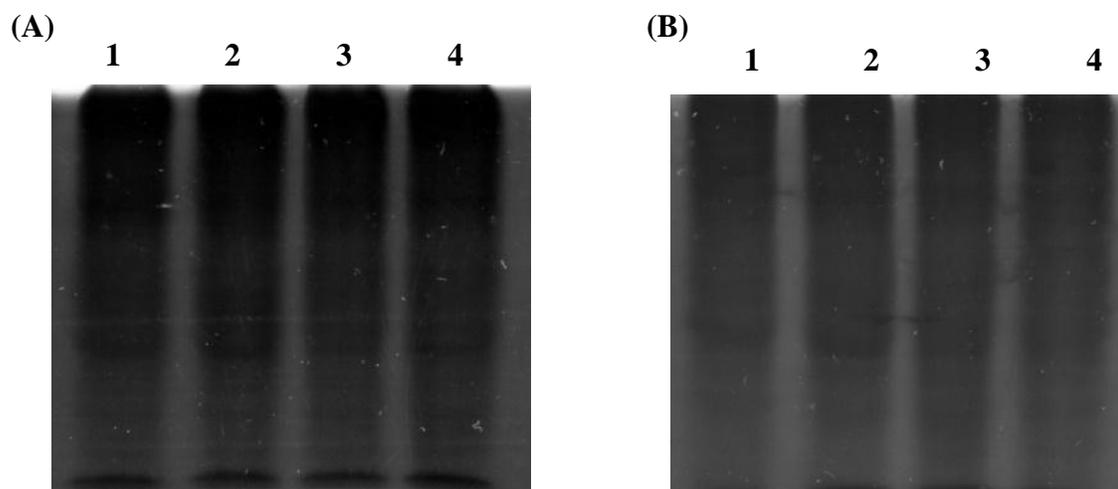


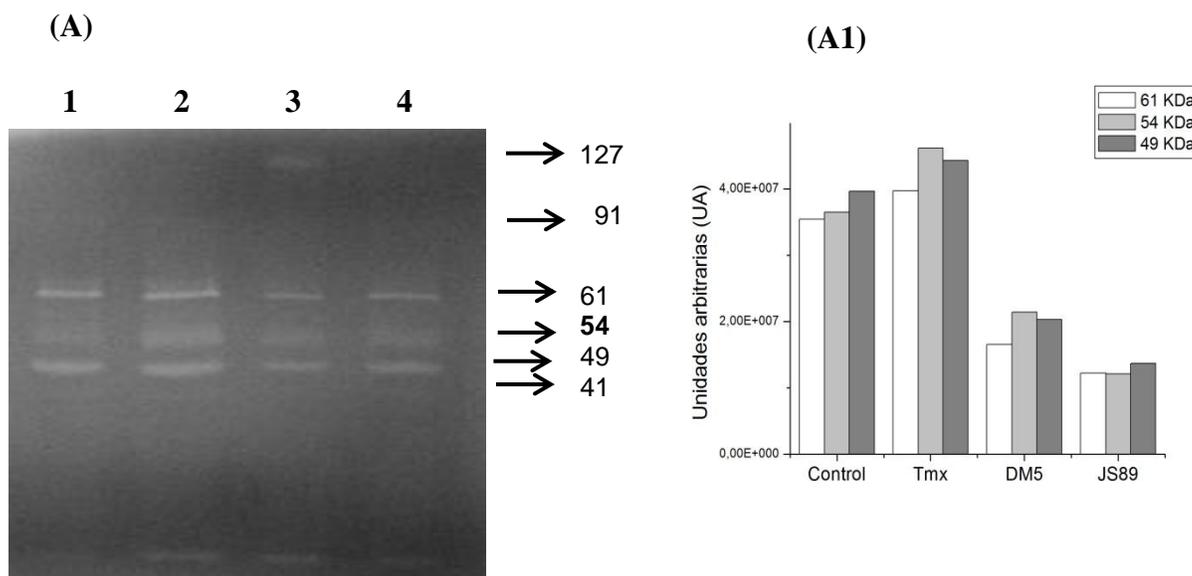
Figura 18. Actividad gelatinolítica del contenido citoplasmático de SKBR3 (A) y MCF-7 (B). De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).

La ausencia de actividad puede deberse a que en su mayoría, las proteasas son sintetizadas y almacenadas como zimógenos o precursores enzimáticos inactivos, que

necesitan de algún componente bioquímico que exponga o conforme el sitio activo de la proteína. Dichos cambios estructurales son llevados a cabo en el caso de las MMPs, en el medio extracelular debido a la presencia de iones como Zn^{2+} y Ca^{2+} , mientras que otras proteínas como las Cat, son activadas gracias a los cambios del pH del medio que ocurren dentro del lisosoma (2, 13, 51).

7.4. *Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de cáncer de mama cultivados en medio condicionado.*

Los resultados obtenidos sobre la actividad gelatinolítica de los medios de excreción se muestran a continuación:



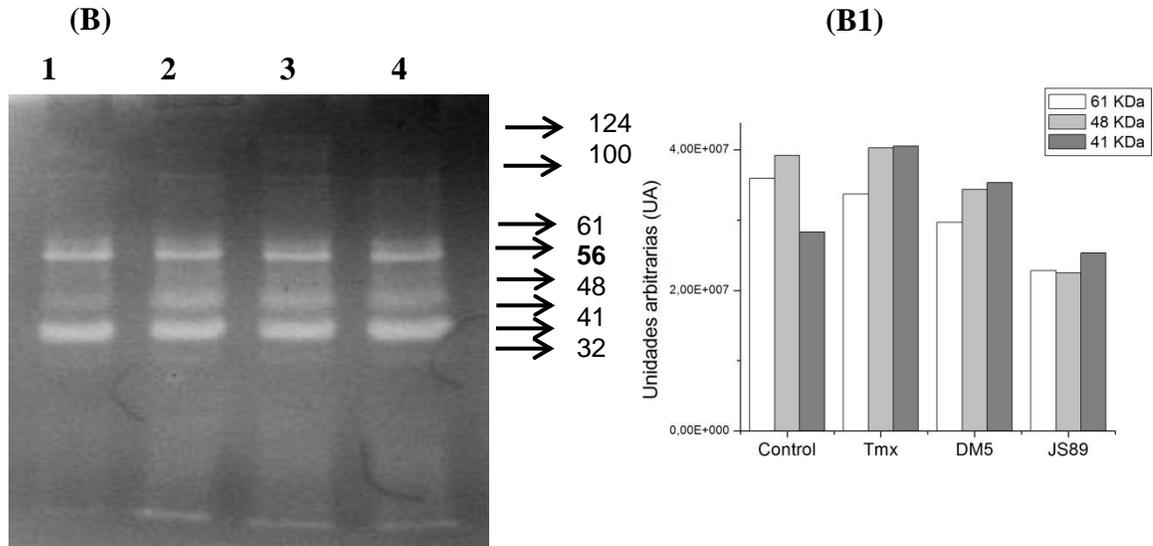


Figura 19. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de SKBR3 (A) y MCF-7 (B) tratados con medio condicionado. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Densidad de las bandas de actividad gelatinolítica obtenidas bajo los diferentes tratamientos de SKBR3 (A1) y MCF-7 (B1).

En este ensayo, se observa que en comparación con la actividad los medios de excreción sin medio condicionado, los zimogramas presentan una mayor intensidad en la actividad proteolítica en ambos casos (*Figura 19*). El patrón de bandas obtenido se mantiene por lo que en el caso de la línea celular MCF-7 se observa una mayor cantidad de bandas con actividad en comparación con la línea SKBR3. Algunas proteínas de alto peso molecular mayores a 100 kDa, aparecen bajo estas condiciones.

Estos resultados evidencian que la presencia de factores provenientes del medio de excreción de fibroblastos incrementa la excreción y activación de proteasas. Por otra parte, el tratamiento con DM5 estimula la producción de proteínas de 124-127 kDa en ambas líneas celulares, lo cual no se evidencia en el resto de los tratamientos. Tomando en cuenta los gráficos de densidad de bandas, en la línea SKBR3 el TMX produce el incremento en la actividad gelatinolítica con respecto al control, mientras que las tetrahydroquinolinas DM5 y JS89 la disminuyen en gran proporción, siendo JS89 de mayor efecto que DM5. En MCF-7, el TMX y DM5 aumentan la expresión de las proteínas de 40 kDa con respecto al control, mientras que JS89 disminuye un poco la expresión de la misma.

En la *Figura 20*, se evidencia que en presencia de EDTA, con excepción de las bandas entre 48 y 54 kDa en ambas líneas celulares, el resto de las bandas desaparece.

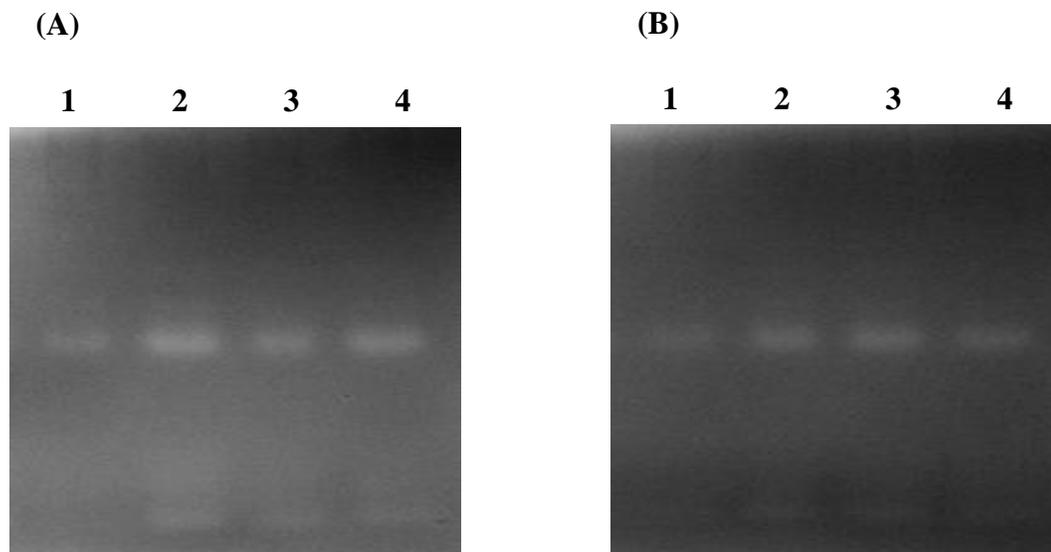


Figura 20. Actividad gelatinolítica de medios de excreción de cultivos de SKBR3 (A) y MCF-7 (B) tratados con medio condicionado. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4). Ensayo de inhibición enzimática con EDTA 5mM.

El microambiente tumoral ejerce una influencia importante sobre el desarrollo del mismo. Dentro de los componentes de este microambiente se encuentran fibroblastos, células endoteliales y otras células normales como linfocitos, macrófagos y algunas moléculas de la ME como factores de crecimiento, anticuerpos, proteasas y otros tipos de metabolitos. La interacción de las células tumorales con su microambiente es bidireccional, los productos de las células tumorales son capaces de regular la expresión de genes en las células normales provocando el cambio gradual de su fenotipo. En dirección opuesta, el microambiente tumoral regula procesos durante la progresión del cáncer como la angiogénesis, invasión, motilidad y metástasis (58, 64, 66).

En el año 1889, Stephen Paget publicó la teoría del *suelo y la semilla*, donde se planteó la hipótesis de que la migración de las células tumorales durante la metástasis no ocurría de forma aleatoria. Realizando la autopsia de más de 900 cadáveres, encontró

patrones de migración que dependían del origen tumoral. En el caso del cáncer de mama la mayoría de las células metastásicas migraban hacia los tejidos óseos o hacia tejidos blandos, específicamente los pulmones. Estos descubrimientos llevaron a Paget a concluir que sin las condiciones óptimas o apropiadas para que se produzca un tumor secundario (Suelo) las células metastásicas (Semilla) no prosperarían (7, 20, 25, 44).

7.5. Western blot para Metaloproteasas 2 y 9.

Los análisis de WB que se muestran en las Figuras 21 y 22, determinaron la ausencia de MMP-2 y MMP-9 tanto en medios de excreción como en homogenatos de las líneas celulares MCF.7 y SKBR3. No hubo expresión de estas dos gelatinasas en respuesta a los tratamientos aplicados.

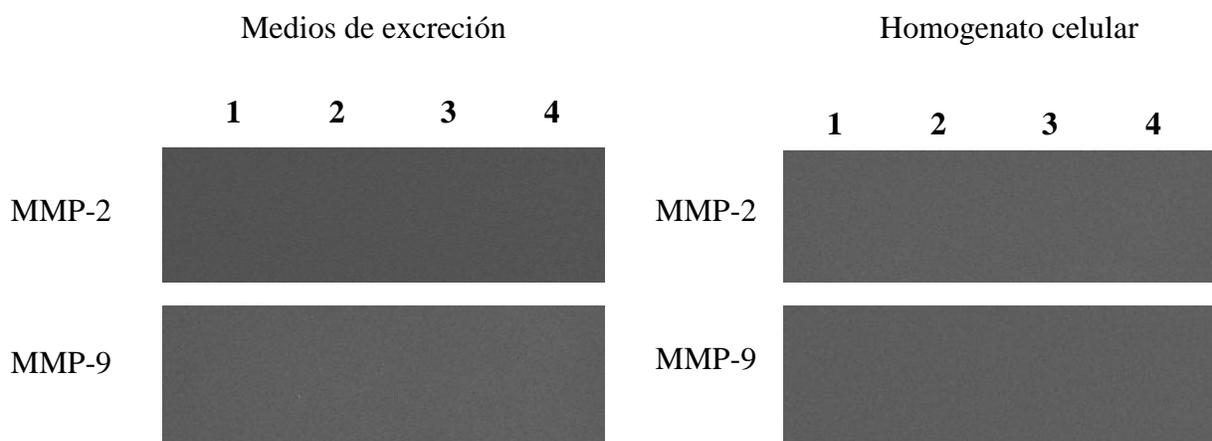


Figura 21. Western blot de medios de excreción y contenido citoplasmático de MCF-7 para MMP-2 y MMP-9. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).

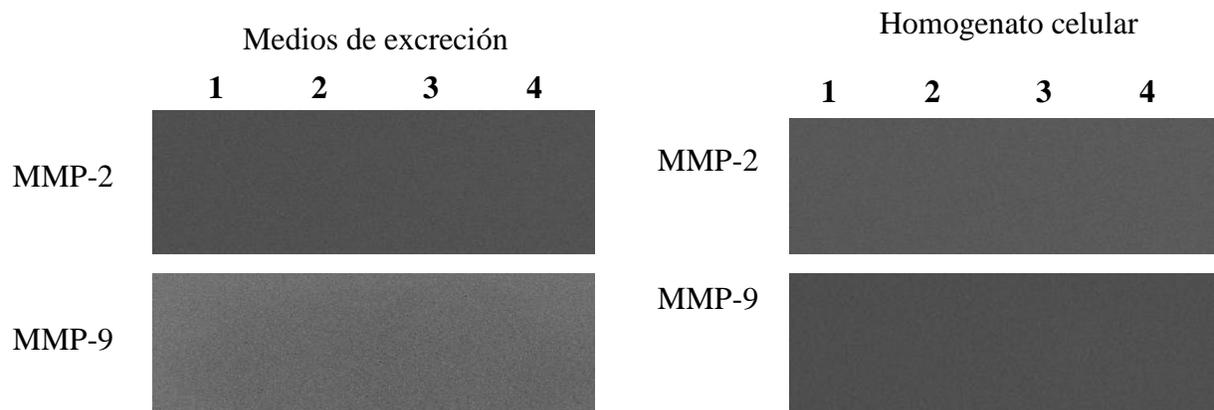


Figura 22. Western blot de medios de excreción y contenido citoplasmático de SKBR3 para MMP-2 y MMP-9. De izquierda a derecha: Control (1), TMX (2), DM5 (3) y JS89 (4).

A pesar de que las MMP-2 y MMP-9 son dos de las enzimas principalmente reportadas como moléculas de degradación de la MEC y blancos para la determinación de la agresividad tumoral en cáncer de mama, el análisis de WB determinó que estas enzimas no se excretan, al menos no en las condiciones experimentales de este trabajo.

Otras proteínas pudiesen corresponder con las bandas obtenidas, tales como las MMP-10, MMP-3, MMP-13 y las Cats K, L, B y D, de pesos moleculares similares a los reportados en este trabajo. No obstante, es importante destacar que los pesos moleculares obtenidos sí corresponden a la MMP-2 y MMP-9 por lo que se hace necesario continuar con la identificación de las bandas obtenidas.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El TMX, DM5 y JS89, poseen efectos citotóxicos sobre líneas de cáncer de mama con diferente grado de tumorigenicidad.
- El efecto citotóxico de TMX e hidroquinolinas es mayor en el caso de las células de la línea MCF-7, de menor tasa proliferativa, en comparación con la línea SKBR3.
- Los valores de concentraciones medias inhibitorias para DM5 y JS89 son mayores en el caso de la línea celular SKBR3 en comparación con la línea MCF-7, indicando que la línea SKBR3 es más resistente a dichos compuestos.
- La morfología celular observada en las micrografías bajo los diferentes tratamientos, indica que los tres compuestos inducen cambios morfológicos similares a los reportados en el caso de apoptosis, tales como: disminución de la refringencia, vacuolización, entre otros.
- Los perfiles proteicos de los medios de excreción y homogenatos de ambas líneas celulares son similares. Sin embargo, en la línea celular SKBR3, probablemente al sobreexpresar receptores de membrana HER2, se induzca la mayor expresión de proteínas y en un rango más amplio de pesos moleculares.
- Los tratamientos con TMX, DM5 y JS89 no producen cambios significativos sobre la excreción de proteínas con respecto al control.
- Los cultivos de las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 excretan proteasas al medio extracelular en condiciones de laboratorio.
- De acuerdo con los pesos moleculares obtenidos en la zimografías y los ensayos de inhibición con EDTA, leupeptina y PMSF, las proteasas excretadas por ambas líneas, pueden corresponder a la familia de las metaloproteasas y catepsinas.
- El TMX disminuye la actividad gelatinolítica en ambas líneas celulares, mientras que el DM5 y el JS89 la aumentan.

- No existe actividad gelatinolítica de los homogenatos de ninguna de las líneas, lo cual demuestra que la activación de estas enzimas ocurre en el medio extracelular, como lo indica la literatura.
- El microambiente tumoral compuesto por células epiteliales normales, entre ellas los fibroblastos, influye sobre la actividad gelatinolítica de las células tumorales. Los cultivos de MCF-7 y SKBR3 en medio condicionado, resultaron en el aumento de la cantidad y de la intensidad de bandas proteolíticas, incluso provocando la expresión de proteínas de alto peso molecular que no se encuentran en cultivos sin medio condicionado.
- Pese a la correspondencia con MMPs dados los pesos moleculares, no se identificaron las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en los medios de excreción según lo obtenido mediante la técnica del WB.

IX. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- 1) Abdulkareem, I.H. e I. B. Zurmi. (2012). *Review of hormonal treatment of breast cancer*. Nigerian Journal of Clinical Practice. Vol. 15. Issue 1.
- 2) Angosto, M. C. y J. A. Álvarez. (2010). *Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer*. An. R. Acad. Nac. Farm., 76 (1): 59-84.
- 3) Arvelo, F. y C. Cotte. (2006). *Metaloproteasas en la progresión tumoral*. Investigación clínica ISSN 0535-5133.
- 4) Basu, S., I. Rui, J. Patrick, L. Boyle, B. Mikulla, M. Bradley, B. Smith, M. Basu y S. Banerjee. (2004). *Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cisplatin, Tamoxifen, Melphalan, Betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 ganglioside*. Glycoconjugate Journal 20, 563–577, 2004.
- 5) Bendrik, C., L. Karlsson y C. Dabrosin. (2010). *Increased endostatin generation and decreased angiogenesis via MMP-9 by tamoxifen in hormone dependent ovarian cancer*. Cancer Letters 292 32–40.
- 6) Bendrik, C., J. Robertson, J. Gauldie y C. Dabrosin. (2008). *Gene Transfer of Matrix Metalloproteinase-9 Induces Tumor Regression of Breast Cancer In vivo*. Cancer Res 2008; 68: (9).
- 7) Bidard, F.C., J. Pierga, A. Vincent-Salomon y M. France Poupon. (2008). *A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metástasis?*. Cancer Metastasis Rev. March; 27(1): 5-10.
- 8) Bloomston, M., E. Zervos y A. Rosemurgy II. (2002). *Matrix metalloproteinases and Their role in pancreatic cancer: A Review of preclinical studies and clinical trials*. Annals of Surgical Oncology, 9(7):668-674.
- 9) Bohórquez, A. D. y V. Kouznetsov. (2007). *Reacción de imino Diels-alder de tres componentes con precursores de origen natural. Generación de nuevas tetrahidroquinolinas 2,4-diaril disustituidas*. Scientia et technica año xiii, No 33.
- 10) Cardoso, C., J. Custodio, L. M. Almeida y A. Moreno. (2001). *Mechanisms of the Deleterious Effects of Tamoxifen on Mitochondrial Respiration Rate and Phosphorylation Efficiency*. Toxicology and Applied Pharmacology 176, 145–152.
- 11) Chan, H., S. Chang, T. Wang, H. Ko, Y. Lin, K. Lin, K. Chang y Y. Chuang. (2012). *Serine Protease PRSS23 Is Upregulated by Estrogen Receptor α and Associated with Proliferation of Breast Cancer Cells*. PLoS ONE. Vol. 7. Issue 1 e30397.

- 12) Chang, H., J. Huang, J. Wang, J. Cheng, K. Lee, Y. Lo, C. Liu, K. Chou, W. Chen, W. Su, Y. Law y C. Jan. (2002). *Tamoxifen-induced increases in cytoplasmic free Ca²⁺ levels in human breast cancer cells*. Breast Cancer Research and Treatment 71: 125-131.
- 13) Chen, B. y M. O. Platt. (2011). *Multiplex Zymography Captures Stage-specific Activity Profiles of Cathepsins K, L, and S in Human Breast, Lung, and Cervical Cancer*. Journal of Translational Medicine, 9:109.
- 14) Chen, D., Q. C. Cui, H. Yang, R. A. Barrea, F. H. Sarkar, S. Sheng, B. Yan, G. Prem Veer Reddy y Q. P. Dou. (2007). *Clioquinol, a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease, Has Proteasome Inhibitory, Androgen Receptor-Suppressing, Apoptosis-Inducing, and Antitumor Activities in Human Prostate Cancer Cells and Xenografts*. Cancer Res; 67: (4).
- 15) Criscitiello, C., D. Fumagalli, K. S Saini y S. Loi. (2011). *Tamoxifen in early-stage estrogen receptor positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection*. OncoTargets and Therapy.
- 16) Darakhshan, S. y A. Ghanbari. (2013). *Tranilast enhances the anti-tumor effects of tamoxifen on human breast cancer cells in vitro*. Journal of Biomedical Science, 20:76.
- 17) Duh, J., R. Yu, J Jiao, G. Matwyshyn, W. Li, T. Tan y A. Kong. (1997). *Activation of signal transduction Kinases by tamoxifen*. Pharmaceutical Research, Vol. 14, No. 2.
- 18) Du, T., G. Filiz, A. Caragounis, P. J. Crouch, y A. R. White. (2008). *Clioquinol Promotes Cancer Cell Toxicity through Tumor Necrosis Factor α Release from Macrophages*. The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol. 324, No. 1. JPET 324:360–367.
- 19) Felibertt P., J. Quintana, F. Arvelo. (2009). *Metaloproteasas. Propiedades, funciones y sus usos como blancos terapéuticos en el tratamiento antineoplásico*. Acta Científica Venezolana, 60 (1-2).
- 20) Fidler, I. (2003). *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nature Reviews. Cancer. Vol. 3.
- 21) Gocheva, V., H. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman y J. A. Joyce. (2009). *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. Received October 13.

- 22) Heeb, S., M. P. Fletcher, S. Ram Chhabra, S. P. Diggle, P. Williams y M. Cámara. (2011). *Quinolones: from antibiotics to autoinducers*. FEMS Microbiol Rev 35 247–274.
- 23) Folgueras, A., A. Pendás, L. Sánchez y C. López-Otín. (2004). *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int. J. Dev. Biol. 48: 411-424.
- 24) Horwitz, K.B., M.E. Costlow y W.L. McGuire. (1975). *MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors*. STEROIDS. Vol. 26, No. 6 6.
- 25) Hu, M. y K. Polyak. (2007). *Microenvironmental regulation of cancer development*. Current opinions in genetics and development. 18:1-8.
- 26) Ignatov, A., T. Ignatov, A. Roessner, S. Da Costa y T. Kalinski. (2010). *Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells*. Breast Cancer Res Treat. 123:87–96.
- 27) Issandou, M., C. Faucher, F. Bayard y J. Darvon. (1990). *Opposite effects of tamoxifen on in vitro protein kinase C activity and endogenous protein phosphorylation in intact MCF-7 cells*. Cancer Research 50, 5845-5850.
- 28) Kleer, C., N. Bloushtain-Qimron, Y. Chen, D. Carrasco, M. Hu, Y. Jun, S. Kraeft, L. C. Collins, M. S. Sabel, P. Argani, R. Gelman, S. J. Schnitt, I. E. Krop, y K. Polyak. (2008). *Epithelial and Stromal Cathepsin K and CXCL14 Expression in Breast Tumor Progression*. Clin Cancer Res. 2008 September 1; 14(17): 5357–5367.
- 29) Kouznetsov, V., D. R. Merchan Arenas, F. Arvelo, J. S. Bello Forero, F. Sojo y A. Muñoz. (2010). *4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline Derivatives Obtained Through Imino Diels-Alder Reactions as Potential Antitumoral Agents*. Letters in Drug Design & Discovery, 7, 632-639.
- 30) Larosche, I., P. Letteron, B. Fromenty, N. Vadrot, A. Abbey-Toby, G. Feldmann, D. Pessayre y A. Mansouri. (2007). *Tamoxifen Inhibits Topoisomerases, Depletes Mitochondrial DNA, and Triggers Steatosis in Mouse Liver*. The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol. 321, No. 2 JPET 321:526–535.
- 31) Lee, W. J., G. Monteith y S. Roberts-Thompson. (2005). *Calcium transport and signaling in the mammary gland: Targets for breast cancer*. Biochimica et Biophysica Acta 1765 235-255.
- 32) Lemaitre, V. y J. D'Armiento. (2006). *Matrix Metalloproteinases in Development and Disease*. Birth Defects Research (Part C) 78:1–10.

- 33) Liabakk, N., I. Talbot, R. Smith, K. Wilkinson y F. Balkwill. (1996). *Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) and Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) Type IV Collagenases in Colorectal Cancer*. *Cancer research* 56, 190-196.
- 34) López-Otín, C. (2003). *Las metaloproteasas como dianas terapéuticas en enfermedades reumatológicas*. *Rev Esp Reumatol*;30(3):95-8.
- 35) Marella, A., O. Prakash Tanwar, R. Saha, M. Rahmat Ali, S. Srivastava, M. Akhter, M. Shaquiquzzaman y M. Mumtaz Alam. (2013). *Quinoline: A versatile heterocyclic*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 1–12.
- 36) Mauriz, J., P. Linares, P. González y J. Culebras. (2005). *Tratamiento antiangiogénico del cáncer*. *Cir Esp*.;78(1):3-11.
- 37) Mayora, A., H. Rojas, P. Chirino, F. Sojo, V. Kouznetsov, J. De Sanctis, F. Arvelo y G. Benaim. (2014). *Apoptosis por tetrahydroquinolinas sustituidas en la línea de cáncer de próstata independiente de andrógenos PC-3*. *OC*. Vol. 2. No. 4.
- 38) Mitsiades, N., W. Yu, V. Poulaki, M. Tsokos e I. Stamenkovic. (2001). *Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity*. *Cancer Research* 61, 577-581.
- 39) Muñoz, A., F. Sojo, D. R. Merchan Arenas, V. Kouznetsov y F. Arvelo. (2011). *Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer*. *Chemico-Biological Interactions* 189 215–221.
- 40) Nazarewicz, R., W. J. Zenebe, A. Parihar, S. K. Larson, E. Alidema, J. Choi y P. Ghafourifar. (2007). *Tamoxifen Induces Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis via Stimulating Mitochondrial Nitric Oxide Synthase*. *Cancer Res*; 67: (3).
- 41) Nilsson, U., A. Abrahamsson y C. Dabrosin. (2010). *Angiogenin Regulation by Estradiol in Breast Tissue: Tamoxifen Inhibits Angiogenin Nuclear Translocation and Antiangiogenin Therapy Reduces Breast Cancer Growth In vivo*. *Clin Cancer Res*;16:3659-3669.
- 42) Nilsson, U. y C. Dabrosin. (2006). *Estradiol and Tamoxifen Regulate Endostatin Generation via Matrix Metalloproteinase Activity in Breast Cancer In vivo*. *Cancer Res*; 66:4789-4794.
- 43) Nilsson, U., S. Garvin y C. Dabrosin. (2007). *MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat* 102:253–261.

- 44) Orimo, A. y R. Weinberg. (2006). *Stromal fibroblasts in cancer. A novel tumor-promoting cell type*. Cell Cycle 5:15,1597-1601.
- 45) Overall, C. y O. Kleinfeld. (2006). *Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy*. Nature Reviews. Cancer. Vol. 6.
- 46) Pattarozzi, A., M. Gatti, F. Barbieri, R. Wurth, C. Porcile, G. Lunardi, A. Ratto, R. Favoni, A. Bajetto, A. Ferrari y T. Florio. (2008). *17 β Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Proliferation-Inducing Stromal Cell-Derived Factor-1-Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Reversal by Gefitinib Pretreatment*. Mol Pharmacol 73:191–202.
- 47) Quintana, J. (2009). *Actividad gelatinolítica en dos líneas celulares de cáncer de colon y su posible vinculación con el grado de metástasis*. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo, Venezuela.
- 48) Rajoria, S., R. Suriano, A. George, A. Shanmugam, S. P. Schantz, J. Geliebter, R. K. Tiwari.(2011). *Estrogen Induced Metastatic Modulators MMP-2 and MMP-9 Are Targets of 3,3,9 Diindolylmethane in Thyroid Cancer*. PLoS ONE Vol. 6. Issue 1 e15879.
- 49) Reiser, J., B. Adair y T. Reinheckel. (2010). *Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease*. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 120 No. 10.
- 50) Revankar, C., D. Cimino, L. Sklar, J. Arterburn y E. Prossnitz. (2005). *A Transmembrane Intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science Vol. 307 pp 1625-1630.
- 51) Rodríguez-Fragoso, L., F. R. Jurado-León, J. A. Reyes-Esparza. (2000). *La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral*. Revista del instituto nacional de cancerología. Vol. 46, Núm. 1 pp 33 – 46.
- 52) Ruan, S., Z. Wanga, S. Wangb, Z. Fu, K. Xu, D. Li, S. Zhang. (2012). *Heregulin-b1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3–MAPK/ERK pathway*. Biochemical and Biophysical Research Communications 420 385–390.
- 53) Rundhaug, J. (2005). *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. J. Cel. Mol. Med. Vol. 9. No. 2, pp 267-285.
- 54) Sato, H. T. Takino y H. Miyamori. (2005). *Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis*. Cancer Sci Vol. 96. No 4, 212-217.

- 55) Shou, J., S. Massarweh, C. Osborne, A. Wakeling, S. Ali, H. Weiss y R. Schiff. (2004). *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute. Vol. 96. No 12.
- 56) Shree, T., O. C. Olson, B. T. Elie, J. C. Kester, A. L. Garfall, K. Simpson, K. M. Bell-McGuinn, E. C. Zabor, E. Brogi y J. A. Joyce. (2011). *Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer*. Genes & development 25:2465–2479.
- 57) Sukocheva, O. A., L. Wang, N. Albanese, S. M. Pitson, M. A. Vadas y P. Xia. (2003). *Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells*. Mol. Endocrinol. 17: 2002-2012.
- 58) Tabruyn, S. y A. Griffioen. (2007). *Molecular pathway of angiogenesis inhibition*. Biochemical and Biophysical Research Communications 335 1-5.
- 59) Ungefroren, H., S. Sebens, D. Seidl, H. Lehnert y R. Hass. (2011). *Interaction of tumor cells with the microenvironment*. Cell Communication and Signaling,9:18.
- 60) Vargas-Méndez, L y V. Kouznetsov. (2011). *4-aminopiperidinas y espiro-4-piperidinas: Importancia farmacológica y esfuerzos sintéticos*. Universitas scientiarum Revista de la Facultad de Ciencias Vol. 12 N° 2, 23-45.
- 61) Vukanovic, J., A. Passaniti, T. Hirata, R. J. Traystman, B. Hartley-Asp y J. T. Isaacs. (1993). *Antiangiogenic Effects of the Quinoline-3-Carboxamide Linomide*. Cancer research 53. 1833-1837.
- 62) Wallace, O., K. S. Lauwers, S. A. Jones y J. A. Dodge. (2003). *Tetrahydroquinoline-Based Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13 1907–1910.
- 63) Welman, A., D. Sproul, P. Mullen, M. Muir, A. R. Kinnaird, D. J. Harrison, D. Faratian, V. G. Brunton, M. C. Frame. (2012). *Diversity of Matriptase Expression Level and Function in Breast Cancer*. PLoS ONE Vol. 7 Issue 4 e34182.
- 64) Witz, I. (2008). *Tumor-microenvironment interactions: Dangerous Liaisons*. Advances in Cancer Research.
- 65) Yersal, O. y S. Barutca. *Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications*. World J Clin Oncol 2014 August 10; 5(3): 412-424.
- 66) Yokota, J. (2000). *Tumor progression and metastasis*. Carcinogenesis Vol. 21. No. 3 pp 497-503.

- 67) Zheng, A., A. Kallio y P. Harkonen. (2007). *Tamoxifen-Induced Rapid Death of MCF-7 Breast Cancer Cells Is Mediated via Extracellularly Signal-Regulated Kinase Signaling and Can Be Abrogated by Estrogen*. *Endocrinology*, 148(6):2764–2777.