

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EL YODO COMO AGENTE ANTIMETASTÁTICO DE CÉLULAS
DE CÁNCER MAMARIO HUMANO”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

DIRIGIDA POR

Dra. CARMEN ACEVES VELASCO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“EL YODO COMO AGENTE ANTIMETASTÁTICO DE
CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO HUMANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

DIRIGIDA POR

Dra. CARMEN ACEVES VELASCO

SINODALES

Dra. CARMEN ACEVES VELASCO
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

Dra. EDITH GARAY ROJAS
SINODAL

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Carmen Aceves Velasco en el laboratorio de Metabolismo energético del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Agradezco el apoyo técnico de QFB. Guadalupe Delgado, Biol. Felipe Ortiz y Dr. Martín García.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto: 78955) y por la UNAM (PAPIIT/UNAM 201210). El autor fue apoyado con la beca de titulación que otorga la Secretaría de Educación Pública (Folio: 20100052798).

Dedico este trabajo a mi familia

Alfonso Mendieta y Alicia Trejo, mis padres
Pily, Maribel, Raciél y Marco Antonio, mis hermanos
Johann y Arath, mis sobrinos
Mario Madrigal, mi pareja

AGRADECIMIENTOS

A Dios que quien como ser espiritual nos da la oportunidad de vivir y soñar, dando la luz necesaria a nuestro camino para seguir. Por poner a mi lado a las personas maravillosas con quien comparto cada momento del día.

A mis padres Alfonso y Alicia que son, han sido y serán el pilar que me mantiene en constante búsqueda de la superación, gracias por todo su esfuerzo y amor.

A mis hermanos: Pily, Raciél, Maribel y Toño, por todo el amor y la confianza que siempre han demostrado hacia mi.

A Mario por ser mi compañero, por creer en mí, por llenar mi mundo de ilusión y suspiros.

A mi tutora Carmen por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí, por todo el apoyo y aprendizaje.

A Brenda Anguiano por sus enseñanzas académicas y por su amistad, gracias por su jovialidad.

A Guadalupe Delgado por su incondicional apoyo, enseñanzas y sobre todo su amistad.

A Patricia Villalobos quien siempre ha tenido un momento y espacio disponible para platicar conmigo, gracias por su calidez y profesionalismo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de quienes también he aprendido infinitamente Aura, Elvira, Eva, Felipe, José Miguel, Laura, Mario, Memo, Paloma, Silvia,

A mis amigos y compañeros de vida con quien he aprendido de triunfos y fracasos: Brenda, Emereli, Diana, Gabriel, Gemma, Gustavo, Marta, Mario, Sonia y Treicy.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Glándula mamaria normal	3
II.1.1. Relaciones anatómicas	3
II.1.2. Histogénesis	4
II.1.3. Histología de la glándula mamaria	6
II.2. Cáncer mamario	10
II.2.1. Factores de riesgo	12
II.2.2. Carcinogénesis de la glándula mamaria	14
II.3. Metástasis	16
II.3.1. Invasión	18
II.3.1.1. Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)	19
II.3.1.1.1. Estructura y biología	19
II.3.1.1.2. Regulación	20
II.3.1.2. Receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR)	21
II.3.1.2.1. Estructura y biología	21
II.3.1.2.2. Regulación	24
II.3.1.3. Fisiopatología del sistema del plasminógeno	24
II.3.2. Angiogénesis	25
II.3.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	27
II.3.2.1.1. Estructura y biología	27
II.3.2.1.2. Regulación	29
II.3.2.2. Fisiopatología del VEGF	30

II.4. Yodo	32
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVOS	36
IV.1. General	36
IV.2. Específicos	36
V. METODOLOGÍA	37
V.1. Material Biológico	37
V.2. Métodos de análisis	37
V.2.1. Análisis de la expresión de uPA, uPAR y VEGF	37
V.2.1.1. Extracción de RNA	37
V.2.1.2. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	38
V.2.1.3. PCR en tiempo real	39
V.2.2. Determinación de la proliferación celular	39
V.3. Diseño experimental	40
V.4. Análisis estadístico	41
VI. RESULTADOS	42
VII. DISCUSIÓN	50
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Estructura histológica del componente glandular de la mama normal	9
2.	Secuencias de los oligonucleótidos usados en PCR tiempo real	39
3.	Efecto del tratamiento con yodo molecular en la implantación de células tumorales de cáncer mamario humano	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Relación anatómica de la glándula mamaria	4
2. Desarrollo embrionario de la glándula mamaria	5
3. Reborde mamario y líneas lácteas	6
4. Esquema de una glándula mamaria normal	7
5. Representación esquemática de un acino y una TDLU	8
6. Gráfico de incidencia y mortalidad por neoplasias en mujeres a nivel mundial	11
7. Gráfico de mortalidad por cáncer mamario en México	12
8. Representación esquemática de un tumor invasivo	15
9. Etapas de la progresión metastática	17
10. Esquema de uPA	21
11. Esquema de la cascada de señalización del sistema de uPA-uPAR	26
12. Esquema representativo de VEGF	31
13. Gráfico de incidencia tumoral en ratas, con tratamientos de yodo en sus diferentes formas químicas	33
14. Ratón inmunosuprimido con tumor formado a partir de la línea celular MCF-7	42
15. Histología de los tumores generados a partir de células MCF-7	43
16. Histología de los tumores generados a partir de células MDAMB-231	44
17. Efecto del tratamiento con yodo molecular en el volumen (progresión) de tumores de cáncer mamario humano	45
18. Gráfico de cuantificación de la proliferación celular en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano (MCF-7 y MDA-MB231)	46

19.	Productos de RT-PCR de: marcadores de metástasis (uPA, uPAR y VEGF) y gen constitutivo (actina)	47
20.	Gráfico de cuantificación de la expresión de uPA y uPAR en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano MDA-MB231	48
21.	Gráfico de cuantificación de la expresión de VEGF en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano MCF-7 y MDA-MB231	49

RESUMEN

El cáncer mamario representa un problema de salud con más de 1,000,000 de nuevos casos al año y 370,000 muertes a nivel mundial. El principal problema en pacientes con cáncer mamario no es el tumor primario *per se* sino su elevada capacidad de hacer metástasis a órganos vitales (cerebro, hueso y pulmón). Diversos estudios han demostrado que la suplementación de yodo reduce significativamente la proliferación de células tumorales de cáncer mamario tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Los análisis moleculares de este proceso mostraron que el yodo induce la activación de vías moleculares apoptóticas e inhibe la expresión de proteínas relacionadas con la vascularización e invasión tumoral como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) así como su receptor (uPAR). En este protocolo se analizó el efecto de la suplementación dietética de yodo en la implantación, progresión y potencial metastático utilizando células tumorales mamarias humanas con y sin capacidad invasiva en ratones inmunodeficientes (nu/nu). Los resultados mostraron que el yodo ejerce efectos antineoplásicos inhibiendo la implantación en ambas líneas, la proliferación en las no invasivas (MCF-7) y reprimiendo la expresión de factores de invasión en las invasivas (MDA-MB231). En este estudio se sustentan las bases para diseñar protocolos encaminados a conocer los mecanismos moleculares involucrados en los efectos diferenciales del yodo.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer mamario (CaMa) es la neoplasia maligna más común y la primera causa de muerte en mujeres en edad reproductiva a nivel mundial. La letalidad de este tipo de cáncer la confiere su elevada capacidad de invadir órganos vitales como cerebro, hueso, pulmón, etc. Está bien establecido que aproximadamente el 60% de las pacientes con CaMa desarrollará metástasis, por lo tanto es de suma importancia investigar este proceso para desarrollar tratamientos que disminuyan y/o impidan este evento. El CaMa está asociado a varios factores de riesgo entre los que destacan los genético-hereditarios, la historia reproductiva y la calidad de vida. Análisis epidemiológicos han mostrado que las poblaciones asiáticas presentan una menor incidencia en patologías mamarias con respecto al occidente (3 a 10 veces menos) y que dicha protección parece estar asociada a su dieta. Entre los factores sugeridos está el gran consumo de fitoestrógenos provenientes de la soya y las elevadas concentraciones de yodo obtenidas a partir del consumo de algas marinas.

En trabajos previos tanto de la literatura como de nuestro laboratorio se ha demostrado que la especie química del yodo que es ingerida, tiene gran importancia en los efectos antineoplásicos. Así se ha descrito que el yodo molecular (I_2) y no el yoduro (I^-) o las hormonas tiroideas, ejerce efectos antiproliferativos y apoptóticos tanto *in vivo* como *in vitro*. También se han caracterizado los procesos apoptóticos involucrados mostrando que el I_2 activa las vías de Bax/Bcl2, caspasas y AIF-PARP1. Recientemente nuestro laboratorio mostró que la suplementación de I_2 se acompaña, en los tejidos y/o células mamarias tumorales, de la formación de un lípido yodado conocido como 6-yodolactona (6-IL). Este lípido descrito anteriormente en la tiroides ejerce un poderoso efecto apoptótico y tiene una gran afinidad por los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ). Estos receptores están estrechamente relacionados a procesos de diferenciación y apoptosis en una gran variedad de cánceres humanos, disminuyendo entre otros, la expresión de

proteínas relacionadas con angiogénesis (factor de crecimiento del endotelio vascular; VEGF) e invasión tumoral (activador de plasminógeno tipo uroquinasa; uPA y su receptor; uPAR). Dado que previamente hemos encontrado que el I₂ detiene el crecimiento tumoral así como su vascularización, el presente protocolo se diseñó para conocer la participación del yodo en los mecanismos de angiogénesis e invasión tumoral utilizando como modelo el ratón transgénico inmunodeficiente (nu/nu), el cual tiene la ventaja de no rechazar los trasplantes de células tumorales de origen humano, permitiendo el análisis del tumor *in vivo*.

II. ANTECEDENTES

II.1. Glándula mamaria normal

La glándula mamaria (GM) es una glándula exócrina y constituye la característica fundamental de los mamíferos. Ésta se encuentra presente en ambos sexos aunque es funcional únicamente en las hembras ya que en los machos se presenta como un vestigio atrofiado. La principal función de la glándula mamaria es proveer a los recién nacidos de leche, un fluido nutritivo e inmunoprotector. Se encuentra localizada de manera subcutánea y se desarrolla en pares a lo largo de dos líneas que se llaman líneas mamarias. El número de glándulas que se diferencian funcionalmente dependerá de cada especie, en el humano se desarrollan dos en la región pectoral aunque en ocasiones suelen encontrarse pezones o masas glandulares rudimentarias. La diferenciación de la GM ocurre hasta el primer embarazo y su función se encuentra ligada a la madurez reproductiva, específicamente durante la lactancia (Peaker, 2002; García-Solís, 2006; Lanigan y col., 2007).

II.1.1. Relaciones Anatómicas.

En la especie humana la GM se encuentra en la estructura anatómica llamada mama. Las mamas se ubican en la cara anterior del tórax, una a cada lado del esternón sobre las líneas mamarias. La base de la glándula mamaria se extiende en la mayoría de los casos, desde la segunda hasta la sexta costilla. Desde el borde externo del esternón hasta la línea axilar media. El área supraexterna de cada glándula se extiende hacia la axila y se denomina “prolongación axilar”. La cara profunda de la mama es ligeramente cóncava y se encuentra en relación con el músculo pectoral mayor, el serrato anterior y la parte superior del oblicuo externo del abdomen. La mama está separada de estos músculos por la aponeurosis profunda. Entre ambas hay un tejido areolar laxo denominado espacio retromamario éste permite que la mama tenga cierta movilidad

sobre la aponeurosis profunda que cubre el plano muscular (Ross y Reith, 1985; Santisteban, 2001; García-Solís, 2006).

La cara superficial de la mama está cubierta por piel. Aproximadamente en el centro de esta cara se encuentra el pezón que está en relación al cuarto espacio intercostal. La base del pezón está rodeada por una zona de piel hiperpigmentada de aproximadamente 2.5 cm. de diámetro denominada areola (Figura 1) (Ross y Reith, 1985; Santisteban, 2001).

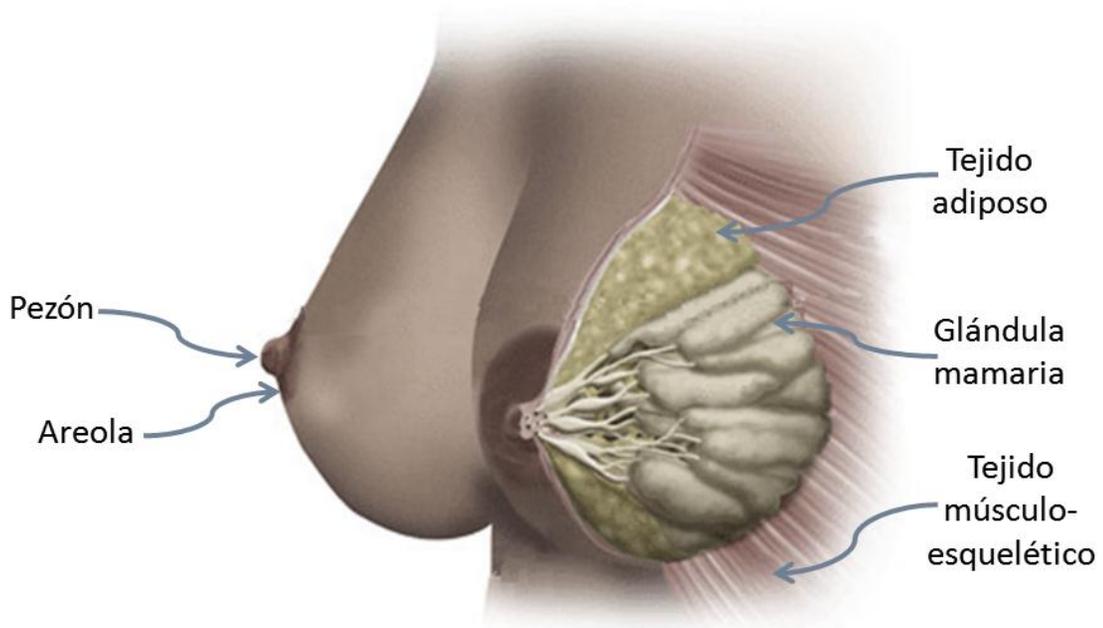


Figura 1. Relación anatómica de la glándula mamaria. Tomado de Visual Dictionary online, 2011.

II.1.2. Histogénesis

El desarrollo de la GM en el embrión comienza a partir del ectodermo cutáneo y el mesodermo que darán origen a lo que será el tejido glandular y el estroma mamario, respectivamente (Russo y Russo, 1997; Oftedal, 2002). El tejido mamario se inicia como un botón epitelial epidérmico que continuará su crecimiento

en profundidad, como cordones epiteliales que se canalizan y se transforman en conductos, y antes del nacimiento se ramifican un par de veces. Cada uno de los conductos representa el primordio de un lóbulo mamario. El mesénquima dérmico que rodea los conductos se diferencia en tejido conectivo y laxo, que rodea los conductos y sus ramificaciones, y en tejido conectivo denso, que forma los tabiques entre cada primordio de conducto y divide la glándula en lóbulos (el tejido conectivo denso corresponde a la capa reticular de la dermis). El desarrollo y ramificación ulterior permite que el estroma mesodérmico quede rodeando toda la estructura glandular (Figura 2) (Geneser, 2000; Howard y Gusterson, 2000; Arias, 2009).

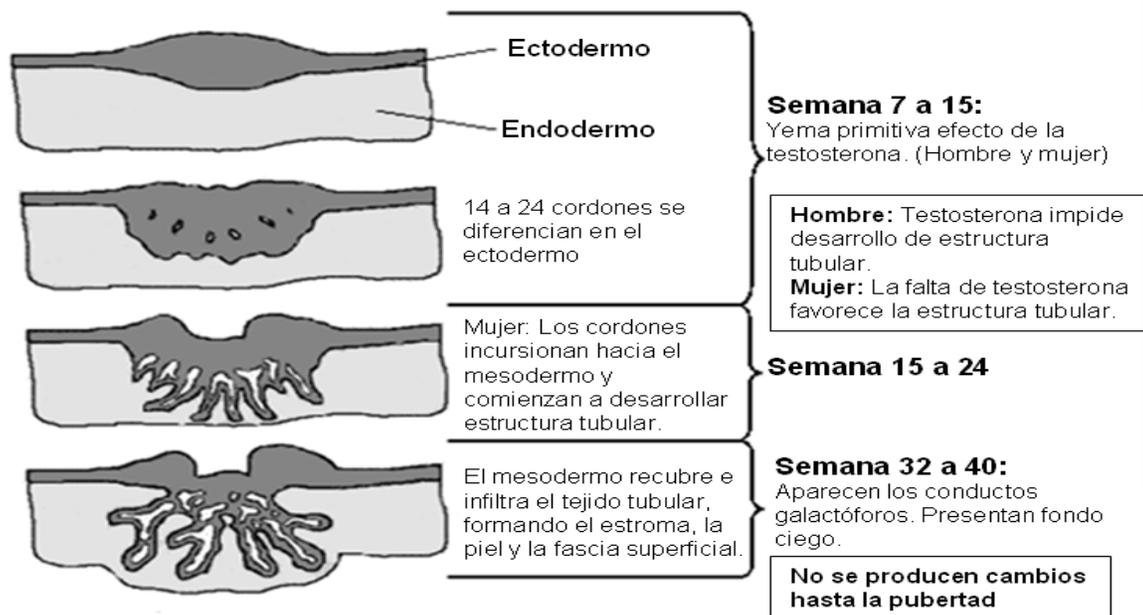


Figura 2. Desarrollo embrionario de la glándula mamaria. Modificado de Arias, 2009.

Durante las primeras semanas de desarrollo del embrión se forman dos engrosamientos lineales a manera de banda en el ectodermo cutáneo, las líneas mamarias o pliegues mamarios, y se extienden a ambos lados de la axila hasta la región inguinal. Posteriormente aparecen de 8 a 10 pares de pequeñas estructuras nodulares a lo largo de las líneas lácteas, la confluencia de estas estructuras

produce un reborde mamario. En el embrión humano este reborde y casi todos los nódulos involucionan a excepción de los correspondientes a la zona pectoral/torácica, donde se desarrolla el botón epitelial epidérmico, que se rodea por una condensación del mesénquima subyacente (Figura 3) (Ross y Reith, 1985; Geneser, 2000; Sternlicht, 2005; Arias, 2009).

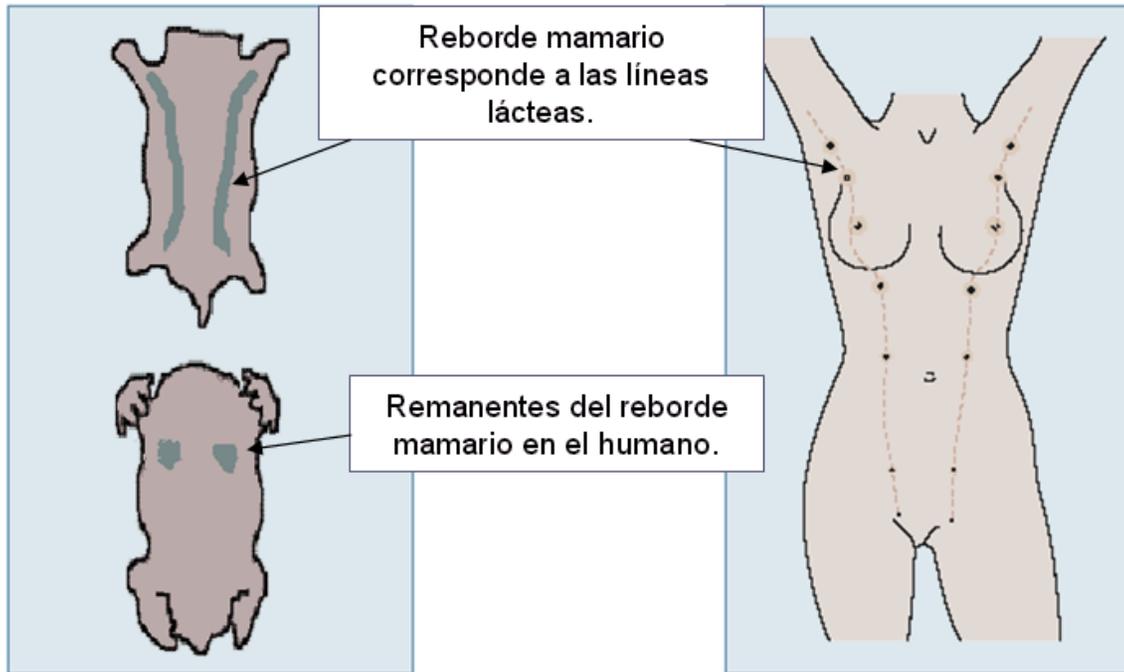


Figura 3. Reborde mamario y líneas lácteas. A lo largo de estas líneas se pueden presentar alteraciones pigmentarias, pezones o mamas supernumerarias. En otras especies de mamíferos, a lo largo del reborde mamario aparecen mayor cantidad de glándulas mamarias. Modificado de Dixon, 2006.

II.1.3. Histología de la glándula mamaria.

La GM es una glándula exócrina de estructura túbulo-alveolar, que se constituye por la unión de 15 a 20 sistemas independientes de conductos muy ramificados (lóbulos) (Figura 4), separados por tejido interlobular denso (tejido fibroso) y grasa. Cada lóbulo contiene una glándula independiente, cuyo conducto excretor, el conducto galactóforo desemboca sobre la papila o pezón y forma una abertura de aproximadamente 0.5 mm. de diámetro, que se distingue a simple vista (Ross y Reith, 1985; Geneser, 2000; Lanigan y col., 2007).

A nivel de la areola, el conducto galactóforo presenta una dilatación sacular formando lo que se denomina como seno lactífero (Figura 4), éste sirve como reservorio de leche y con ello facilita la salida de la leche materna durante la succión. El tejido conectivo denso que rodea todas las ramificaciones de un conducto galactóforo, se denomina interlobular, dado que separa los lóbulos individuales. Así mismo, las ramas de los conductos galactóforos forman conductos interlobulares que dan origen, cuando esta ramificación ingresa en el lóbulo, a conductos interlobulillares (se llama interlobulillar porque el lóbulo está compuesto a su vez por lobulillos y estos pasan entre ellos) que a su vez se dividen y forman el conducto terminal (Figura 5) (Geneser, 2000; Sternlicht, 2005; Lanigan y col., 2007).



Figura 4. Esquema de una glándula mamaria normal. 1. Caja torácica, 2. Músculo pectoral, 3. Lóbulos, 4. Pezón, 5. Areola y corpúsculos de Montgomery, 6. Ducto, 7. Tejido adiposo, 8. Piel. Modificado de Ali y Combes, 2002.

Cada lóbulo se compone de numerosos lobulillos, formados por las ramificaciones más pequeñas. Los lobulillos están separados por tejido conectivo interlobulillar denso. A cada lobulillo ingresa un único conducto terminal y se ramifica en forma irregular para formar conductillos intralobulillares que desembocan en los acinos (Geneser, 2000; Lanigan y col., 2007).

El conducto terminal con el lobulillo correspondiente representan la unidad funcional de la mama o la unidad ducto lobulillar terminal (TDLU), que mide menos de 1 mm. en la mama en reposo (Figura 5) (Howard y Gusterson, 2000; Geneser, 2000).

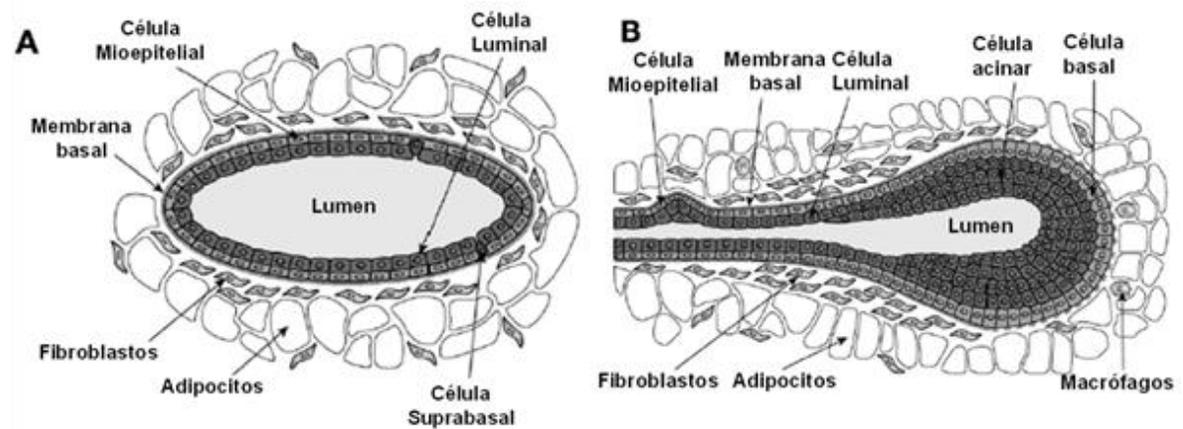


Figura 5. Representación esquemática de un acino y una TDLU. Acino (A), de forma esférica, luz y características celulares variables según el estado funcional de la mama. Está rodeado por células mioepiteliales y se continúa con el conductillo alveolar, hacia el conducto terminal intralobulillar, las células suprabasales descansan sobre la membrana basal pero no alcanzan el lumen. La TDLU (B) se compone del acino y su conductillo además de los conductos terminales intralobulillares. Modificado de Visvader, 2009.

Los lobulillos están compuestos por numerosas unidades secretoras llamadas acinos o adenómeros, que son pequeñas estructuras saculares de forma esférica que se encuentran revestidas por un epitelio cúbico simple. Las células acinares sufren importantes cambios según el estado funcional de la mama, de tal forma que en reposo se observan como fondos de sacos, revestidos por el epitelio cúbico simple con núcleo ovalado y citoplasma claro. Estas células utilizan mecanismos de excreción merócrina y apócrina, para liberar los nutrientes que constituyen la leche materna (Geneser, 2000; Arias, 2009).

Por debajo de la capa de células cúbicas o cilíndricas se encuentran numerosas células aplanadas que contienen miofilamentos y que reciben el nombre de células mioepiteliales. Estas células por efecto reflejo durante la lactancia son

estimuladas por la oxitocina y al contraerse favorecen la eyección del contenido hacia los conductos excretores (Geneser, 2000; Peaker, 2002; Arias, 2009).

Por debajo de la capa de células mioepiteliales se encuentra una membrana basal formada por un conglomerado de fibras colágenas y elásticas en proporciones variables. La membrana basal separa el epitelio glandular y la capa de células mioepiteliales del estroma circundante (Geneser, 2000; Arias, 2009).

Cuadro 1. Estructura histológica del componente glandular de la mama normal. Modificado de Arias, 2009.

Estructura histológica del componente glandular de la mama normal.				
Lóbulo	TDLU	Lobulillo	Acino con su conductillo	Epitelio cúbico simple en el conductillo y estratificado en el acino. CME alrededor del todo el acino
			C. Terminal intralobulillar	Epitelio cúbico simple. CME orientación longitudinal
		C. Terminal extralobulillar	Transición de epitelio cúbico a cilíndrico simple. CME orientación longitudinal	
	SE	C. Sub- segmentario	Epitelio cilíndrico simple	
		C. Segmentario	Epitelio cilíndrico simple	
		C. Galactóforo	Transición de epitelio cilíndrico simple a cilíndrico de dos capas (**) y desde el seno galactóforo plano estratificado sin queratina. Próximo al pezón puede transformarse en un epitelio escamoso.	
(**) Capa superficial cilíndrica, capa basal cúbica. TDLU= Unidad ducto lobulillar terminal. SE= Sistema excretor. C= Conducto. CME = Células mioepiteliales				

El conducto (conducto intralobulillar) por el que se continua cada acino es de estructura histológica similar, revestido por el mismo epitelio cúbico y células mioepiteliales separadas del estroma por una membrana basal. A partir de este conducto las células mioepiteliales son menos ramificadas y comienzan a presentar

una orientación longitudinal (Geneser, 2000; Howard y Gusterson, 2000; Arias, 2009).

La estructura descrita en el texto y resumida en el Cuadro 1, se refiere a la glándula mamaria de una mujer en edad fértil, no embarazada ni lactante. Este estadio se denomina mama en reposo. Un corte histológico de una mama en reposo muestra predominio del abundante tejido conectivo denso interlobular. El parénquima epitelial se localiza en pequeños islotes de tejido conectivo laxo (el tejido conectivo intralobulillar), bajo la forma de un pequeño grupo de conductillos y, en ocasiones con alveolos rudimentarios. Además, se observan ramificaciones mayores y menores del sistema de conductos excretores interlobulillares. Rara vez se distinguen alveolos con luz verdadera, dado que en este estadio la mayor parte de los alveolos son pequeños engrosamientos masivos, sin luces, en los extremos de los conductillos (Geneser, 2000; Howard y Gusterson, 2000; García-Solís, 2006).

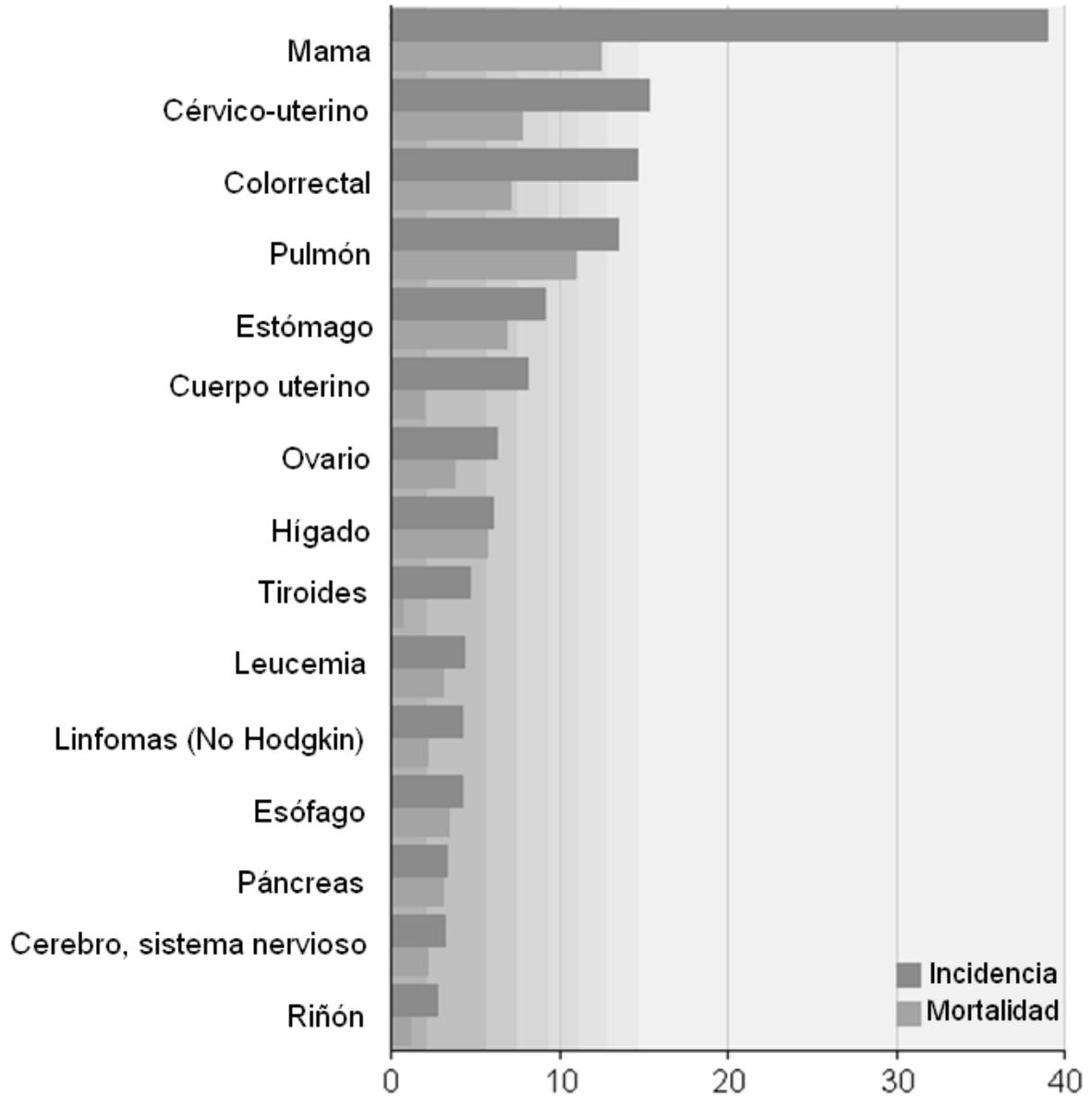
II.2. Cáncer mamario (CaMa)

Según estadísticas recientes el CaMa es, tanto a nivel mundial como en nuestro país (Figuras 6 y 7), la neoplasia más frecuente (representa el 22.9% a nivel mundial respecto a otros tipos de cáncer) y la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres en edad reproductiva (Knaul y col., 2008; Ferlay y col., 2008; Knaul y col., 2009).

En la última década y gracias al diagnóstico temprano, ha disminuido la mortalidad, sin embargo se ha evidenciado que el estilo de vida moderno ha aumentado su prevalencia (Rao y col., 1996; Guarneri y col., 2007).

El CaMa se caracteriza por una heterogeneidad morfológica, genética y molecular. De hecho, las lesiones premalignas e invasoras que pueden ocurrir en la glándula mamaria humana presentan diferentes características bioquímicas y moleculares, por lo que se considera al CaMa como un conjunto de enfermedades.

Como todas las neoplasias malignas el CaMa, es el resultado de la progresión acumulativa de daños en el material genético (Peto y col., 1999; Mallon y col., 2000; García-Solís, 2006).



Tasa de mortalidad ajustada por 100,000 personas
 Figura 6. Gráfico de Incidencia y mortalidad por neoplasias en mujeres a nivel mundial. Modificado de Ferlay y col., 2008.

Una de las características que más destacan del CaMa es que en algunos casos requieren la presencia de estrógenos para proliferar y a este tipo se le

denomina CaMa dependiente de hormonas. Se estima que al menos una tercera parte de los tumores mamarios que se presentan en la mujer son dependientes de hormonas mientras que las otras dos terceras partes no requieren para su proliferación de estos esteroides (Duffy, 2005; García-Solís, 2006; Lanigan y col., 2007).

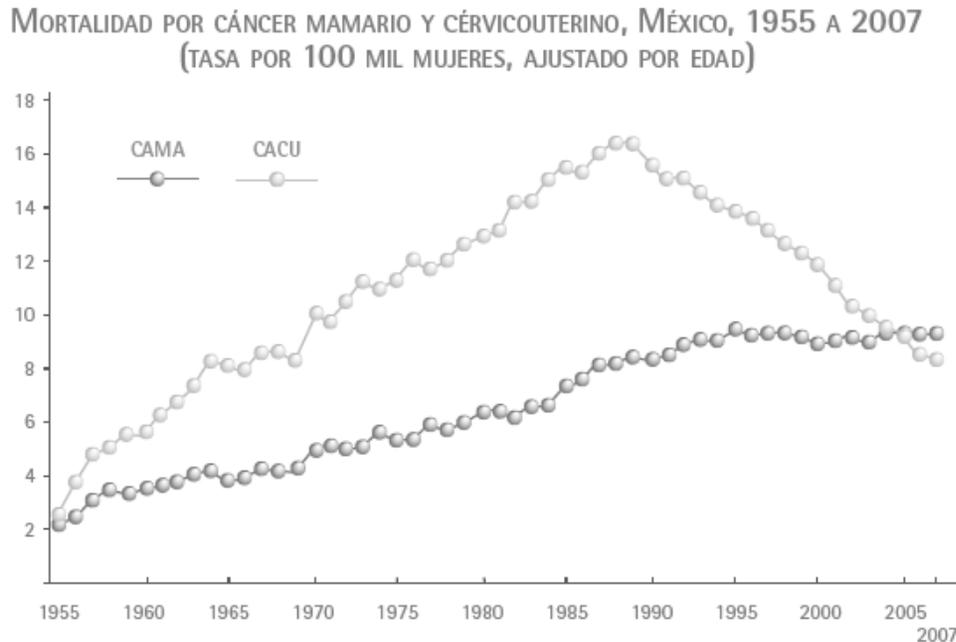


Figura 7. Gráfico de mortalidad por cáncer mamario en México. A partir del 2006 y por primera vez desde los años cincuenta, la mortalidad del cáncer de mama excede a la de cérvix. Tomado de Knaul y col., 2009.

II.2.1. Factores de riesgo

Se han señalado diversos factores de riesgo, aunque los más estudiados hasta el momento se agrupan en 3 vertientes que son: el factor genético, la historia reproductiva y la calidad de vida (Alfaro-Hernández, 2005; Dixon y col., 2006).

El factor genético explica sólo entre el 5 y el 10% de los casos de CaMa y se asocia principalmente a mutaciones que se heredan por la línea germinal de los genes BRCA1, BRCA2, p53 y PTEN. (Higginson, 1993; Wogan y col., 2004; Alfaro-Hernández, 2005; DeVita y col., 2008) Se ha descrito, que la promoción y

progresión tumoral son procesos que involucran la activación e inactivación coordinada de múltiples genes y participan mecanismos de tipo genético (mutaciones) y/o epigenéticos (metilación del DNA, acetilación de histonas, etc.) (Szif y col., 2004; García-Solís, 2006). Estudios realizados en CaMa humano muestran que una gran cantidad de mutaciones se adquieren durante el progreso de la enfermedad. Además se ha establecido una correlación entre el tipo de mutación de cada tumor y la morfología observada (Mallon y col., 2000; Neve y col., 2006).

Asimismo, la incidencia del CaMa incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia cuando el riesgo continúa aumentando pero con una pendiente menos pronunciada (Dixon y col., 2006; Ferlay y col., 2008). Esta correspondencia apunta a que la incidencia de cáncer mamario está profundamente relacionada con los cambios hormonales asociados con la menopausia ya que este tipo de cáncer es más frecuente entre los 40 y 60 años de edad (Parker y col., 1996; Duffy; 2005).

Debido a esto, se ha establecido que la historia reproductiva puede influir positiva o negativamente en el riesgo de desarrollar CaMa. Menarca temprana y menopausia tardía son factores de riesgo que incrementan la incidencia, ya que aumenta el tiempo de exposición a hormonas sexuales (MacMahon y col., 1970; Dixon y col., 2006). Mientras que la edad del primer embarazo (antes de los 20 años) y lactancia mayor a tres meses son potentes factores protectores en comparación con la nuliparidad (MacMahon y col., 1970; Kelsey y Gammon, 1991; Fiegelson y Henderson, 1996; Dixon y col., 2006). Se ha postulado que el riesgo de la nuliparidad está sustentado en la ausencia de diferenciación final de epitelio mamario, propiciando que las células primordiales permanezcan indiferenciadas. En esta condición la exposición a cancerígenos da como resultado una mayor incidencia de cáncer mamario (Russo y Russo, 1997; Dixon y col., 2006).

Con relación al factor dietético, diversos estudios han revelado que el alto consumo de alcohol y grasas, así como el fumar incrementan el riesgo de padecer

CaMa. En la actualidad las mujeres asiáticas (en Japón, principalmente) presentan la menor incidencia mundial de este tipo de cáncer (3 a 5 veces menos) y entre los alimentos asociados a dicha protección destacan los fitoestrógenos contenidos en la soya y el yodo consumido en las algas marinas (Adami y col., 1998; Dixon y col., 2006).

II.2.2. Carcinogénesis de la glándula mamaria

Se ha planteado que el paso inicial de la carcinogénesis mamaria puede ser la hiperplasia epitelial o la hiperplasia sin atipia, que es el aumento en la celularidad del TDLU y de los conductos intralobulares (Figura 8). Dicha lesión se clasifica en leve, moderada o severa dependiendo del número de capas involucradas siendo de 3 a 4 capas una lesión leve, más de 5 capas de células para la lesión moderada, y severa cuando las unidades epiteliales involucradas están distendidas y los espacios luminareos están obstruidos por las células que están proliferando. El núcleo de las células en la hiperplasia sin atipia varía de tamaño y suelen presentarse en forma ovoide o de huso, tienen un patrón de cromatina normal y el nucleolo es distinto. Se ha reportado que la hiperplasia sin atipia se asocia con un aumento de 1.5 a 2 veces de desarrollar cáncer mamario con respecto de la población en general (Mallon y col., 2000; García-Solís, 2006; DeVita y col., 2008).

Por otra parte la hiperplasia con atipia o atípica se considera que representa el segundo paso del desarrollo de los carcinomas mamaros. La hiperplasia atípica puede ser tanto de los conductos como de los lóbulos y se caracteriza por poseer francas características anormales y algunas veces es difícil distinguirlas de los carcinomas *in situ*. Existen tres criterios que se utilizan para distinguirla del carcinoma *in situ* que son: a) las características citológicas, b) el patrón histológico y la evaluación semi cuantitativa de la extensión de los cambios presentes. La hiperplasia atípica se asocia con un aumento en el riesgo de 4 a 5 veces de desarrollar cáncer mamario con respecto de la población general. El siguiente paso después de las hiperplasias atípicas son los carcinomas *in situ*. Dichas neoplasias se caracterizan por estar confinadas dentro de la membrana base y conservan la

arquitectura tisular ya que cuando la lesión se expande más allá de éste límite a la neoplasia se le considera carcinoma invasor (Mallon y col., 2000; García-Solís, 2006; DeVita y col., 2008; Visvader, 2009).

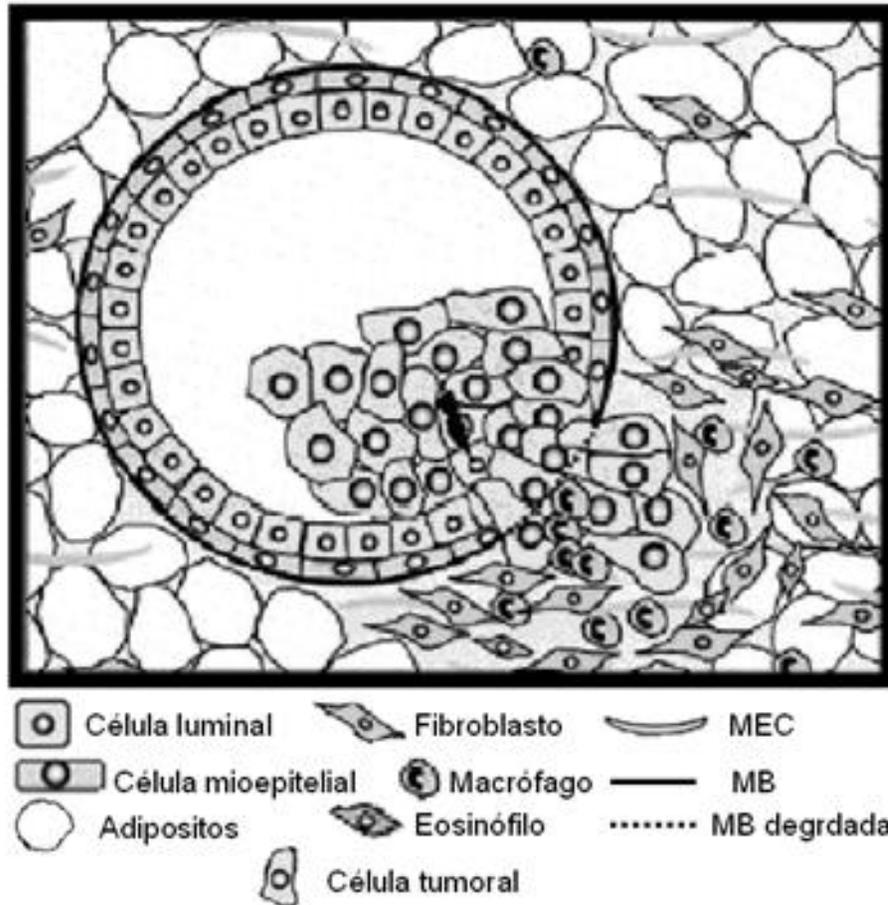


Figura 8. Representación esquemática de un tumor invasivo. Las células tumorales de los ductos secretan proteasas que degradan la membrana basal (MB) y crean una vía por donde el tumor puede invadir tejidos estromales. Las células del estroma favorecen la invasión ya que secretan factores de crecimiento, elementos que promueven la migración y proteasas de la matriz extracelular (MEC). Modificado de Lanigan y col., 2007.

La OMS clasifica el cáncer de mama según su lugar de origen (ductales o lobulillares) o su carácter (in situ o invasivo) y por su patrón estructural. Es importante señalar que los tumores malignos mamarios son primordialmente de origen epitelial y se originan en su mayoría en las TDLUs (Mallon, 2000; García-Solís, 2006).

II.3. Metástasis

La característica que confiere la letalidad al cáncer mamario es su alta capacidad de invadir tejidos vitales como pulmones, hígado, cerebro, glándula adrenal y médula osea. Se estima que el 95% del CaMa tiene la potencialidad de generar metástasis y que entre el 40 y 60% de las pacientes tratadas con quimioterapia desarrollaran recidivas y/o metástasis (Weigelt y col., 2005; Guarneri y col., 2007; DeVita y col., 2008).

La metástasis es un proceso dinámico a través del cual, la célula bajo estimulación parácrina y autócrina, sale de su ambiente primario y viaja, ya sea localmente o a distancia, dentro del cuerpo para formar un foco proliferativo. Por lo regular el cáncer mamario inicia la invasión hacia nódulos linfáticos regionales y al sistema vascular en el parénquima mamario (Figura 9) (Mallon y col., 2000; Rodríguez-Fragoso y col., 2000; García-Solís, 2006).

Según el medio de transporte de las células tumorales se reconocen dos tipos principales de metástasis en CaMa: linfógenas (vía linfática) y hematógenas (vía sanguínea).

En los últimos años un gran cuerpo de conocimiento ha permitido iniciar la comprensión de los procesos y moléculas involucradas en la patofisiología de la diseminación tumoral. Los resultados indican que la propagación metastática del tumor representa la culminación de cambios malignos adquiridos durante la tumorigénesis, resultando en la pérdida de control sobre el fenotipo no invasivo observado en células normales. Estudios experimentales han mostrado que las células que dan origen a metástasis pertenecen a subpoblaciones especiales del tumor que desarrollan un fenotipo invasivo que les permite perder sus propiedades adhesivas, inducir proteólisis local y migrar, tanto a través de la membrana basal (MB) adyacente, como también por la matriz extracelular (MEC) presente en diferentes partes del organismo (Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Chappuis y col., 2001; DeVita y col., 2008).

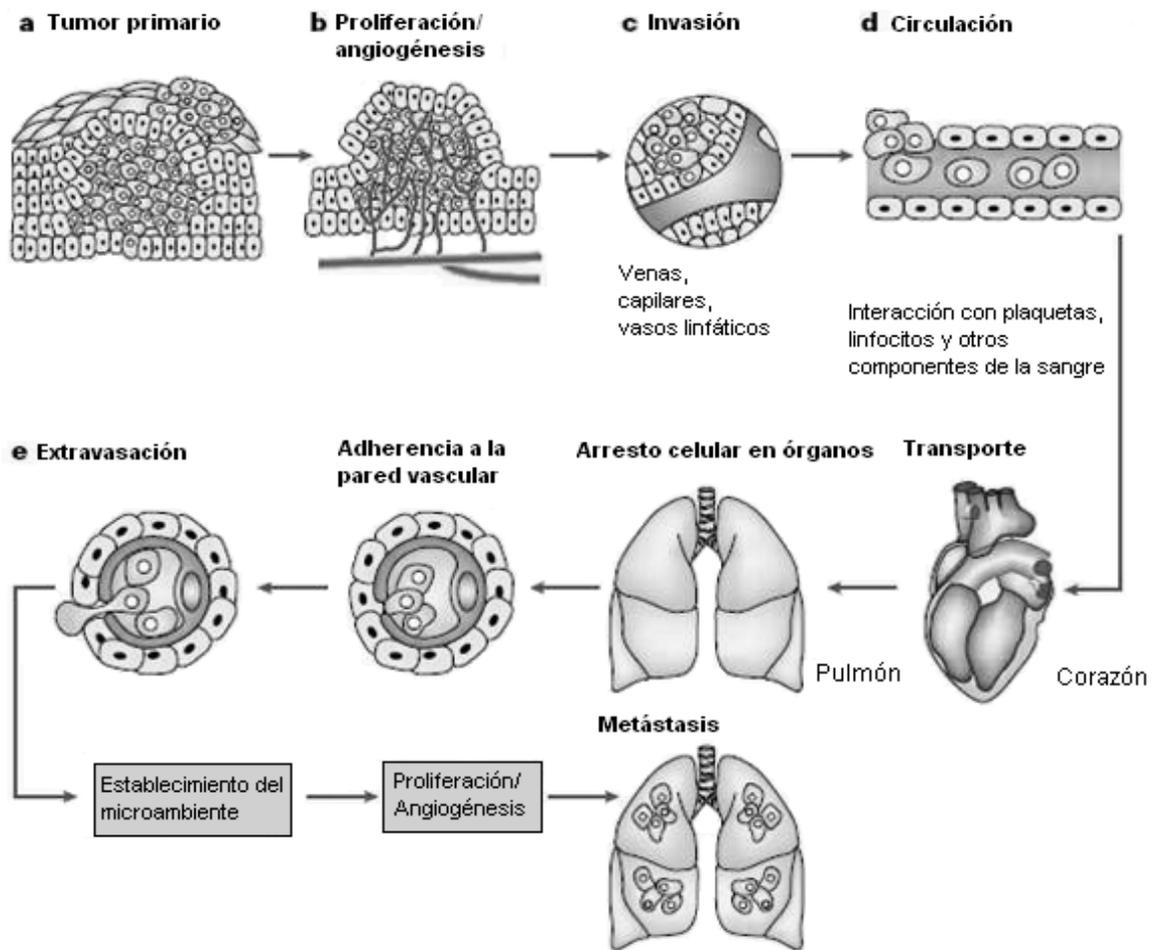


Figura 9. Etapas de la progresión metastásica. Este proceso involucra una secuencia de eventos relacionados entre sí que incluyen: migración y modulación de la adhesión de la célula tumoral, degradación de la matriz extracelular, angiogénesis, acceso y supervivencia en la circulación, extravasación (ingreso a nuevos tejidos) y proliferación metastásica en tejidos distantes. Modificado de Fidler, 2003.

La célula tumoral por efecto de estímulos apropiados inicia el proceso invasivo, la migración y la proteólisis local. Para lograr esto, la célula tumoral necesita adherirse al lado externo de la membrana vascular, degradar localmente la matriz y migrar a través de la membrana basal dañada, para posteriormente pasar entre células endoteliales y llegar a la luz del vaso sanguíneo. Una vez que las células tumorales penetran las vías linfáticas o vasculares, pueden crecer ahí o pueden separarse para ser transportadas a través de la circulación. El émbolo tumoral debe sobrevivir a la turbulencia de la circulación y a los mecanismos de

defensa y posteriormente arrestarse en los capilares de órganos distantes, extravasarse en el parénquima del nuevo órgano, y finalmente proliferar en el órgano receptor. El crecimiento de estas micrometástasis requiere el desarrollo de suplemento vascular y evasión de las defensas del huésped (Figura 9) (Shih y Herly, 1994; Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Fidler, 2002; Fidler, 2003; Gupta y Massagué, 2006; DeVita y col., 2008).

Así pues, tanto la degradación de la matriz extracelular como la formación de nuevos vasos sanguíneos son procesos clave en la formación y proliferación de un tumor secundario (Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Castelló-Cros, 2004; DeVita y col., 2008).

II.3.1. Invasión

La proteólisis local y la migración celular son eventos complejos en los que están involucrados tanto el tejido tumoral como el normal. Estos procesos requieren la producción, liberación y activación de una variedad de enzimas capaces de degradar la MB y la MEC. Existen tres clases de enzimas implicadas en la degradación: cisteín-proteasas, serin-proteasas y metaloproteasas, algunas de ellas se encuentran en circulación sanguínea mientras que otras son sintetizadas y secretadas por las mismas células tumorales (Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Castelló-Cros, 2004).

La degradación tisular observada en el cáncer es similar a la que ocurre en procesos normales u otras patologías. Bajo condiciones normales la proteólisis celular está regulada para prevenir la disgregación del tejido mientras que la actividad invasiva descontrolada está asociada a varias patologías humanas, especialmente al cáncer (Köhrmann y col., 2009). Además, los cambios en la concentración y actividad de las proteasas pueden exteriorizar los sitios críticos en las moléculas de la ECM que alteran el uso de las integrinas, y liberan factores de crecimiento de unión a la matriz extracelular, los cuales potencian la proliferación y

sobrevivencia de las células tumorales y a su vez, inducen angiogénesis (Streuli, 2002; Castelló-Cros, 2004).

La familia de serin-proteasas (activadores de plasminógeno y otros) forman parte del sistema fibrinolítico o sistema activador de plasminógeno y están involucradas en varios procesos biológicos como reproducción humana, regeneración tisular, angiogénesis, invasión tumoral y metástasis (Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Castelló-Cros, 2004). Como su nombre lo indica son proteasas que convierten específicamente el plasminógeno inactivo en plasmina activa, una enzima que contiene una amplia especificidad de sustratos. A través de la plasmina, los activadores del plasminógeno pueden indirectamente degradar una amplia variedad de proteínas que conforman la matriz extracelular (fibrina, fibronectina, colágena tipo IV, vitronectina y laminina). Los activadores de plasminógeno existen en dos formas: de tipo tisular y de tipo uroquinasa (Rijken, 1995; Rodríguez-Fragoso y col., 2000).

El de tipo tisular (tPA 70 kDa) es una enzima que está involucrada en la disolución de coágulos en los vasos sanguíneos (trombólisis) y en el mantenimiento de la hemostasia vascular. Se expresa durante el desarrollo cerebral. Además se sabe que está totalmente ausente en la metástasis de glioblastoma así como en tumores de colon, pulmón y mama (Binnema y col., 1986; Hajjar y Hamel, 1990; Rijken, 1995; Irigoyen y col., 1999).

II.3.1.1. Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)

II.3.1.1.1. Estructura y biología

La uPA es una serin-proteasa del tipo tripsina aislada inicialmente de la orina humana en forma de doble cadena de aminoácidos (tc-uPA o uPA). Esta enzima es sintetizada y secretada por una gran variedad de células (endoteliales, musculares lisas, monocitos/macrófagos, fibroblastos y células tumorales malignas) como zimógeno de una sola cadena y tras una digestión parcial la molécula se convierte

en la forma de doble cadena (tc-uPA) que es la forma enzimáticamente activa (uPA) y la responsable de la degradación del plasminógeno (Figura 10). El zimógeno de esta proteína está conformado por una cadena polipeptídica (sc-uPA o pro uPA) de 411 aminoácidos de peso molecular de 53 kDa (Figura 9) (Stump y col., 1987; Rijken, 1995; Irigoyen y col., 1999; Castelló-Cros, 2004; Crippa, 2006). La uPA está conformada por tres regiones (Figura 10): el dominio del fragmento amino-terminal (ATF, por sus siglas en inglés) que es homólogo al factor de crecimiento epitelial humano (EGF) y además es el responsable de la interacción con el receptor; el dominio kringle que interactúa con el inhibidor de la uPA y otras proteínas como heparina e integrinas de tipo $\alpha_v\beta_3$; y por último el dominio de la región carboxi-terminal en donde se localiza el centro catalítico o sitio activo de la enzima representado por una triada de aminoácidos específicos para las serin-proteasas (dominio de proteasa) (Irigoyen y col., 1999; Stepanova y Tkachuk, 2002; Castelló-Cros, 2004; Alfano y col., 2005; Danø y col., 2005; Crippa, 2006).

II.3.1.1.2. Regulación

El gen del uPA humano está localizado en el cromosoma 10. Contiene 11 exones y 10 intrones. La expresión del gen de uPA es inducible por muchas y diversas señales como son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) de fibroblastos (FGF), hormonas esteroides, calicreína, calcitonina, ésteres de forbol, luz ultravioleta, etc. (Irigoyen y col., 1999; Bajou y col., 2002; Castelló-Cros, 2004, Crippa, 2006).

Dentro de la gran variedad de proteínas que tienen la capacidad inducir la expresión de uPA, también se encuentran los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) que son factores de transcripción activados por ligando. El mecanismo molecular clásico de estos receptores consiste en la unión de PPAR a su ligando en citoplasma, la formación del heterodímero con el receptor de ácido retinóico (RXR) y su translocación al núcleo en donde se unen a sitios específicos en el DNA (elementos de respuesta para PPARs: PPRE). El gen que codifica para uPA contiene un sitio PPRE. Específicamente se ha mostrado

que la isoforma gamma de este receptor (PPAR γ) es un factor inhibidor ya que regula a la baja la expresión de uPA (Berger y Moller, 2002; Józkowicz y col., 2003; Saéz y col. 2004; Sawai y col., 2006; Zhang y col., 2006; Núñez-Anita, 2010).

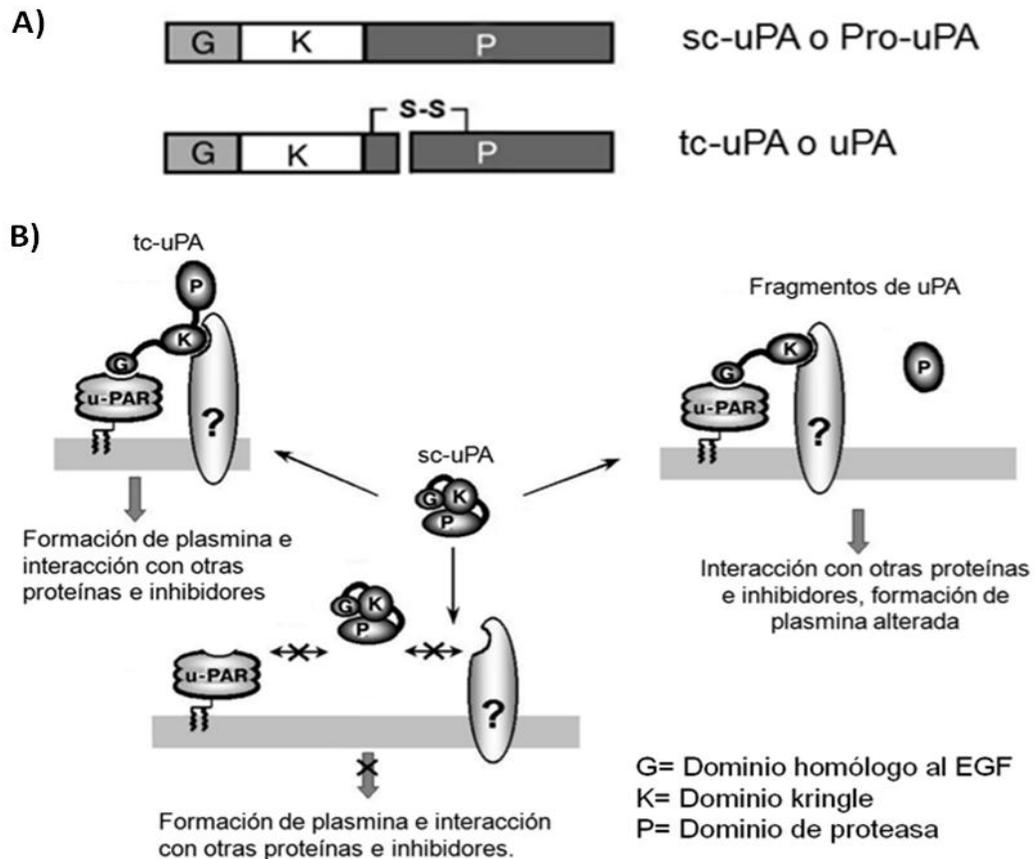


Figura 10. Esquema de uPA A) De la estructura de sus dominios; B) De la interacción de los dominios con su receptor y otras proteínas (?). Modificado de Stepanova y Tkachuk, 2002.

II.3.1.2. Receptor del Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR)

II.3.1.2.1. Estructura y biología

El uPAR, es una glicoproteína que actúa como receptor específico de superficie celular, sintetizado como una cadena polipeptídica de 313 aminoácidos que después de sufrir un procesamiento post-transduccional en el extremo

carboxiterminal, pasa a tener 283 aminoácidos y se vuelve el principal responsable de la activación del plasminógeno gracias a su elevada afinidad a uPA (Figura 11). Fue identificada por primera vez en 1985 en una línea celular humana de tipo monocítico (U937), este receptor de peso molecular de 55 kDa, pertenece a la familia de proteínas de superficie ricas en cisteína y se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las células cancerosas aunque también se ha descrito que está presente en muchos tipos celulares normales incluyendo células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos, monocitos y células endoteliales. En células no migratorias los uPAR se distribuyen uniformemente por toda la superficie membranal, mientras que en las células que pueden migrar se polarizan en la zona en la dirección en que migrará la célula (monocitos, células endoteliales o células musculares lisas vasculares) (Plow y Miles, 1990; Rodríguez-Fragoso y col., 2000; Peña-Sendra, 2001; Kjaergaard y col., 2008).

Poco después de secuenciar el cDNA aislado se encontró que uPAR estaba desprovisto de una parte intracelular y que la región extracelular estaba comprendida por tres repeticiones de una sola secuencia. Sin embargo, la naturaleza de las secuencias repetidas provocó la propuesta de que uPAR está conformado por tres dominios homólogos (D1, D2 y D3) y dos regiones que los conectan entre sí. Esta estructura se ancla a la membrana plasmática por una cola de glicolípido (glicosil fosfatidil inositol, GPI) aunque también se han descrito tanto *in vivo* como *in vitro* variantes solubles del uPAR (suPAR), las cuales resultan de la pérdida de la cola GPI. El dominio de unión al ligando (uPA) está comprendida en una superficie central que contiene residuos de los 3 dominios esta unión no se disocia fácilmente de la superficie celular pues la vida media del enlace es mayor a 5 horas. La unión de uPA a la superficie celular, a través del receptor uPAR, permite que uPA actúe como una ectoenzima asociada a la membrana, focalizando la proteólisis en el entorno pericelular inmediato. Por tanto limita la activación del plasminógeno a áreas focales como pueden ser las protrusiones celulares promovidas en la migración celular y la invasión (Blasi y col., 1987; Blasi y Carmeliet, 2002; Kjaergaard y col., 2008; Smith y Marshall, 2010).

Como se mencionó anteriormente, el uPAR también puede unirse a la vitronectina (Figura 11) (que se encuentra ligada a la MEC como ligando de la integrina $\alpha_v\beta_3$), esta interacción requiere de la unión de uPA al receptor pues favorece la expresión de epítopes para vitronectina, integrinas, receptores acoplados a proteínas G y caveolina (al menos se han identificado estas cuatro proteínas transmembranales implicadas en la señalización en respuesta a la unión uPA-uPAR), de esta forma uPA transforma a uPAR en un receptor pleiotrópico para ligandos de otras moléculas de superficie. La unión con la integrina $\alpha_v\beta_3$ compromete la asociación célula-célula, mientras que la alta afinidad de la interacción uPAR-vitronectina resulta en alteraciones de la morfología celular y la activación de cascadas de señalización que incrementan la adhesión y migración celular (Peña-Sendra, 2001; Blasi y Carmeliet, 2002; Alfano y col., 2005; Kjaergaard y col., 2008; Smith y Marshall, 2010).

La interacción de uPA con la célula a través del receptor (mediada por la unión a vitronectina) también induce una transducción de señales y una fosforilación específica de proteínas (Figura 11). En células musculares lisas vasculares, esta transducción de señales parece seguir tres vías: una directa a través de la cascada desencadenada por Jak/Stat que estaría implicada en la regulación de la migración celular, una segunda en donde favorece la translocación de las GTPasas rho e incrementa la motilidad celular y los cambios en el citoesqueleto y una tercera vía Src-“like” cuya función aún no se ha establecido del todo (Blasi y col., 1987; Peña-Sendra, 2001; Blasi y Carmeliet, 2002; Rao, 2003; Smith y Marshall, 2010).

Todos estos procesos pueden a su vez regularse por un inhibidor de uPA (PAI), que puede unirse a la uPA libre o a la uPA asociada a su receptor (Figura 10). La unión del inhibidor al complejo uPA-uPAR produce cambios en las propiedades de uPAR, ya que el complejo uPA-Inhibidor exhibe un dominio de unión para el receptor transmembrana afín a LDL (LRP). A través de la acción combinada de uPAR y LRP, se induce la internalización del complejo uPA-uPAR-

inhibidor, posteriormente, la degradación de uPA y el reciclado de uPAR que vuelve a la superficie celular (Peña-Sendra, 2001; Smith y Marshall, 2010).

II.3.1.2.2.Regulación

En células endoteliales se ha observado que los factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y de endotelio vascular (VEGF); así como la proteína cinasa C (PKC) y el aumento de AMP cíclico estimulan la expresión y funcionamiento de los uPAR (Peña-Sendra, 2001; Bajou y col., 2002; Zhang y col., 2006).

Diversos autores han descrito que tanto el VEGF como los PPAR γ modulan de manera inversa la expresión del uPAR siendo el VEGF un estimulador mientras que PPAR γ un poderoso inhibidor. Está bien establecido que la sobreexpresión de uPAR incrementa la migración, adhesión y proliferación tumoral (Chappuis y col., 2001; Bajou y col., 2002; Zhang y col., 2006; Veeravalli y col., 2010; Almasi y col., 2011).

II.3.1.3. Fisiopatología del sistema del plasminógeno

La activación del plasminógeno se da a través de una secuencia de tres reacciones (Figura 11). En la primera, el pro uPA actúa directamente sobre el plasminógeno generando pequeñas cantidades de plasmina. A continuación, la plasmina convierte la pro uPA en uPA permitiendo que esta se una a su receptor, y ésta dirige finalmente la activación del plasminógeno. (Irigoyen y col., 1999; Castelló-Cros, 2004; Alfano y col., 2005; Crippa, 2006).

La importancia del sistema del plasminógeno en la progresión de los tumores no es una aportación reciente y, de hecho, los datos que confirman el papel crucial de éste sistema en las patologías neoplásicas se han ido acumulando en la literatura por más de 30 años. En un principio se pensó que la uPA promovía la diseminación del cáncer únicamente a través de la degradación de la MEC, permitiendo así la invasión y la metástasis. Aunque una degradación controlada es

necesaria para la migración de las células malignas, actualmente está claro que la uPA tiene actividades adicionales que le permiten jugar un papel clave en la progresión del tumor. Estas otras funciones incluyen su habilidad para estimular la angiogénesis, la migración y la adhesión celular (Castelló-Cros, 2004; Alfano y col., 2005; Mazar, 2008). De hecho, ratones transgénicos deficientes en uPA presentan una mayor susceptibilidad a la trombosis, reducida vascularización, reducción de la activación de las plaquetas y reducción de la invasión tumoral (Irigoyen y col., 1999; Castelló-Cros, 2004).

La unión del uPA a su receptor no sólo activa al plasminógeno, sino que además desencadena una cascada de señales celulares que regulan los procesos de migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas, como es el caso de la angiogénesis, la implantación embrionaria, la reacción inflamatoria, la cicatrización cutánea y la implantación de metástasis tumorales. Además, la unión de uPAR a la vitronectina y a integrinas condiciona una selectividad de sustrato y una eficiente migración celular. Diversos estudios han mostrado que la sobreexpresión de uPAR en cáncer de mama incrementa de manera significativa la capacidad invasiva de estas células. Se ha descrito que tanto los niveles de uPA antigénico como la expresión puntual de uPA en los tumores están incrementados en las pacientes con cáncer de mama. También se ha descrito una relación directa entre la expresión uPAR con el tamaño del tumor y con la presencia de nódulos afectados. Por lo tanto, niveles elevados de uPA y/o uPAR en cáncer de mama primario indican un mal pronóstico (Grøndahl-Hansen y col., 1995; Castelló-Cros, 2004; De Bock y Wang, 2004).

II.3.2. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman y crecen nuevos vasos sanguíneos. De manera normal, estos procesos sólo se activan bajo condiciones estrictamente definidas durante el desarrollo o bien en la etapa adulta para

cicatrización o reproducción (Senger y col., 1983; Folkman y Shing, 1992; Karamisheva, 2008; Ferrara, 2009).

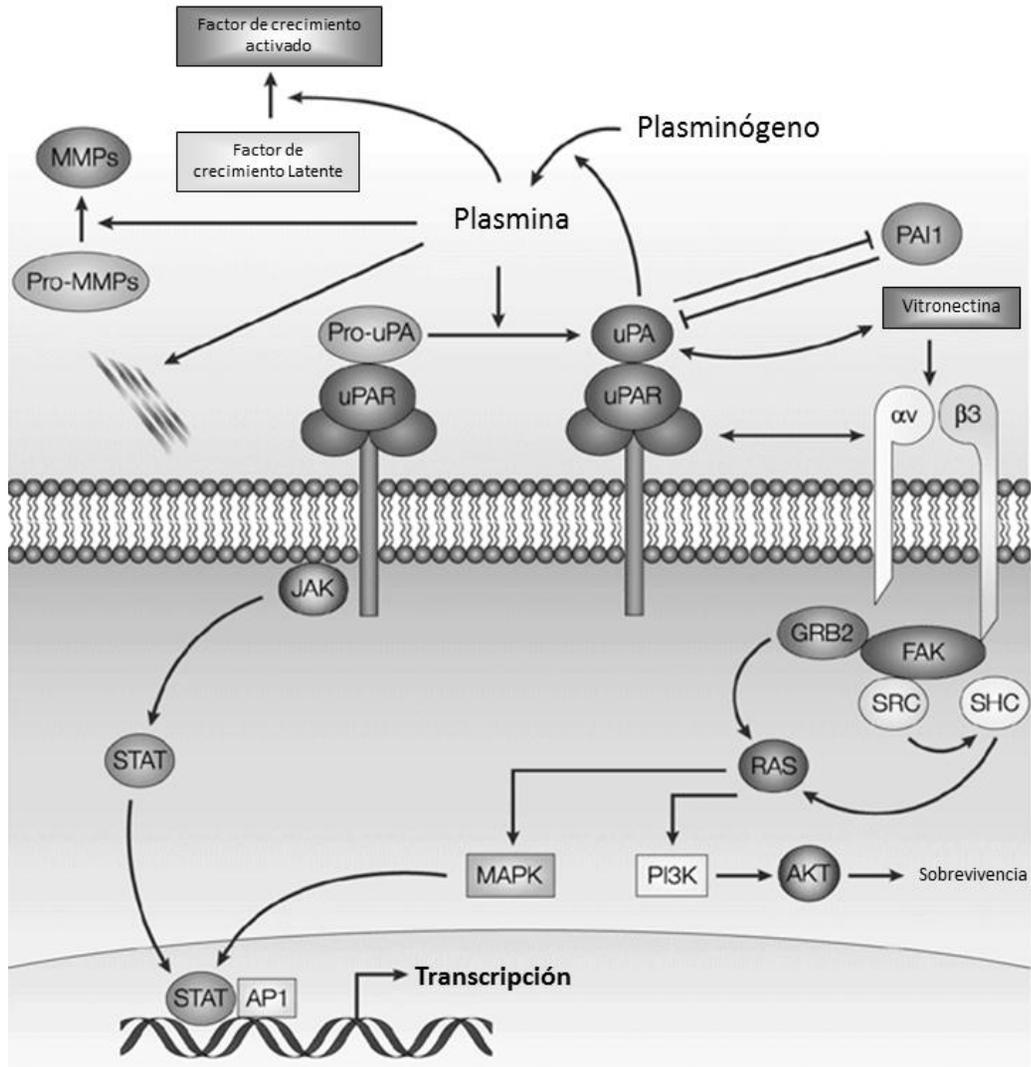


Figura 11. Esquema de la cascada de señalización de uPA-uPAR. La unión de pro-uPA a uPAR provee a la superficie celular de actividad proteolítica dependiente de plasmina, esta actividad determina la degradación de la matriz. También se muestra el papel de las integrinas en varias cascadas de señalización. MMPs= metaloproteasas de matriz; Pro-MMPs= zimógenos de las metaloproteasas de matriz; PAI1= inhibidor de los activadores del plasminógeno 1; FAK= quinasa de adhesión focal; GRB2= proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento;

SRC= proteína tirosina quinasa; SHC= proteína adaptadora SHC; RAS= proteína RAS; MAPK= proteínas quinasas activadas por mitógenos; PI3K= Fosfatidil inositol 3 quinasa; AKT= serina/treonina quinasa; JAK= Janus quinasas; STAT= Transductor de señal y activador de la transcripción; AP1= Proteína activadora 1. Modificado de Rao, 2003.

La hipoxia es el principal promotor de la angiogénesis y tiene un efecto dual ya que estimula la sobreexpresión de moléculas activadoras y disminuye la expresión de factores inhibidores. En relación con el cáncer, se ha encontrado una asociación clínica directa entre la vascularidad del tumor y la agresividad del mismo. La activación de las vías angiogénicas en los tumores (Figura 12) permiten suplir sus requerimientos de oxígeno y nutrientes para mantener su actividad vital y su progresión. Se ha corroborado ampliamente que sin el suministro de sangre, las dimensiones del tumor nodular no pueden exceder 1-2 mm³., causando la muerte de las células tumorales por hipoxia (Folkman y Shing, 1992; Weidner y col., 1992; Folkman, 2006; Zetter, 2008; Clapp y col., 2009).

Una serie de eventos secuenciales se pueden distinguir durante la formación de nuevos vasos sanguíneos: (a) la degradación de la membrana basal vascular y la fibrina o la matriz intersticial por las células endoteliales, (b) la migración de células endoteliales, (c) proliferación de células endoteliales y (d) la formación de nuevos capilares y nueva membrana basal (Figura 12) (Folkman y Shing 1992; Clapp y col., 2009; Nussenbaum y Herman, 2010).

II.3.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

II.3.2.1.1. Estructura y biología

En 1983, Senger y colaboradores describieron la purificación parcial de una proteína capaz de inducir proliferación vascular. Esta proteína fue llamada factor de permeabilidad vascular (VPF) y se pensó que era un regulador específico de la permeabilidad de vasos sanguíneos en tumores más que un factor de crecimiento.

En 1989, Ferrara y Henzel describieron la estructura primaria de un mitógeno específico para células endoteliales, que denominaron factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El clonaje y la expresión del VEGF y el VPF revelaron que estas dos moléculas eran en realidad la misma. A lo largo de los últimos años han sido identificados otros miembros de la familia de genes del VEGF, que incluye el factor de crecimiento placentario (PIGF), el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-E y el EG-VEGF8. La nomenclatura de estos miembros más recientes ha hecho que el primer factor descubierto se denomine VEGF-A, aunque la mayoría de investigaciones le denominan simplemente VEGF (Ochoa y col., 2000; Ferrara, 2009; García-Manero y col., 2009).

El VEGF nativo (VEGF 165) es una glicoproteína de 45 kDa, básica, homodimérica con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. Los monómeros consisten en 2 subunidades de 165 aá cada uno, se asocian de forman antiparalela, y su reducción implica la pérdida total de su actividad biológica. La mayoría de tipos celulares que expresan VEGF, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, expresan las isoformas VEGF 121 y VEGF 165 (Figura 12). La isoforma de VEGF 145 parece ser expresada únicamente en células derivadas de órganos reproductores. Es importante señalar que, tras la acción de diferentes enzimas como la heparinasa, la uroquinasa o la plasmina se puede liberar un fragmento de 110 aminoácidos con actividad biológica. Esto sugiere que las diferentes isoformas de VEGF podrían estar biodisponibles por al menos, 2 mecanismos: el “splicing alternativo” o por medio de la acción de enzimas proteolíticas sobre las isoformas de mayor tamaño (Ruhrberg, 2003, Ferrara, 2009; García-Manero y col., 2009).

Esta glicoproteína, es capaz de unirse a uno de los múltiples receptores de tirosina kinasa lo que provoca su autofosforilación, consiguiendo la activación de proteínas kinasas con acción mitogénica. Durante la embriogénesis la expresión del VEGF es más amplia, detectándose en pulmón, glándula adrenal, testículo, riñón y cerebro. En el adulto, en condiciones normales, la expresión de VEGF es baja o

inexistente en la mayoría de tejidos, y está limitada a órganos que presentan capilares con endotelio fenestrado como son el plexo coroidal y los glomérulos renales y en situaciones de angiogénesis fisiológica como la que tiene lugar en el endometrio en cada ciclo estral. Sin embargo, como se explica a continuación, la expresión de VEGF puede ser activada por diferentes factores (Ochoa y col., 2000; Ferrara y col., 2003; Ruhrberg, 2003; García-Manero y col., 2009).

II.3.2.1.2. Regulación

La localización cromosómica del gen VEGF humano es 6p21.3. Este gen está compuesto por ocho exones y siete intrones, con una región codificante de una longitud aproximada de 14kb. A partir de este gen se generan 5 isoformas por splicing alternativo, que tienen un tamaño de 121, 145, 165, 189, y 206 aminoácidos. Las propiedades bioquímicas de las diferentes isoformas dependen en gran parte de su capacidad o no de unión a la heparina, y esto está determinado por la presencia de exones 6 y 7 (Ferrara y col., 2003; Ferrara, 2009; García-Manero y col., 2009).

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo*. El significado fisiológico de la inducción de la expresión de VEGF en respuesta a hipoxia sería el mejorar el aporte de oxígeno a zonas en las que la perfusión tisular ha sido interrumpida por algún motivo. El principal mediador de respuesta a la hipoxia es el Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1). HIF-1 activa la transcripción de un grupo de genes responsables de la angiogénesis celular. HIF está compuesto de dos partes una subunidad inducible HIF-1 α y una subunidad HIF-1 β que se expresa de manera constitutiva. Bajo condiciones normales de oxígeno HIF-1 α es degradada rápidamente mientras que bajo una tensión de oxígeno baja HIF-1 α se estabiliza. Posteriormente se transloca al núcleo donde se heterodimeriza con HIF-1 β para formar al factor activador transcripcional HIF-1, que se une al sitio promotor de VEGF y entonces activa su transcripción (Ferrara y col., 2003; Li y Lu, 2010).

Aunado a lo anterior, VEGF puede ser regulado tanto a nivel mRNA como de proteína, por efecto de diferentes factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y otros agentes en diferentes tipos celulares. Entre los principales promotores de la expresión de VEGF están los estrógenos (Mueller y col., 2000; Buteau-Lozano y col., 2002; Aplanat y col., 2008; García-Manero y col., 2009).

Mientras que sus principales inhibidores son los agonistas de PPAR γ a través de su elemento de respuesta (PPARE) contenido dentro de la región promotora del gen de VEGF. (Peeters, 2006; Zhang, y col., 2006; Grau y col., 2008; García-Manero y col., 2009).

II.3.2.2. Fisiopatología del VEGF

El VEGF es una citocina multifuncional que ejerce la mayoría de sus funciones en el endotelio vascular. Entre estas funciones destaca la inducción de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, promover permeabilidad vascular y actuar como vasodilatador (Ferrara y col., 2003; Ruhrberg, 2003; García-Manero y col., 2009).

Las células endoteliales constituyen la diana preferencial del VEGF y este actúa como factor de supervivencia inhibiendo su apoptosis. También es un potente mitógeno, induce migración y cambia la expresión génica dando lugar al aumento de expresión de diferentes proteínas como las metaloproteasas, las proteínas implicadas en la actividad fibrinolítica, y en la sintasa endotelial del óxido nítrico (Ferrara y col., 2003; Ruhrberg, 2003; Ferrara, 2009).

La función de VEGF como promotor de la angiogénesis está asociada a varias patologías como preclampsia, retinopatía diabética, artritis reumatoide, cáncer, entre otras. El VEGF se encuentra sobreexpresado en el 60% de los cánceres humanos (Ferrara y col., 2003; Clapp y col., 2009).

Como se mencionó anteriormente, diversos análisis epidemiológicos han mostrado que las poblaciones asiáticas presentan una menor incidencia en

patologías mamarias con respecto al occidente y, que dicha protección parece estar asociada a su dieta y específicamente a las elevadas concentraciones de yodo obtenidas a partir del consumo de algas marinas.

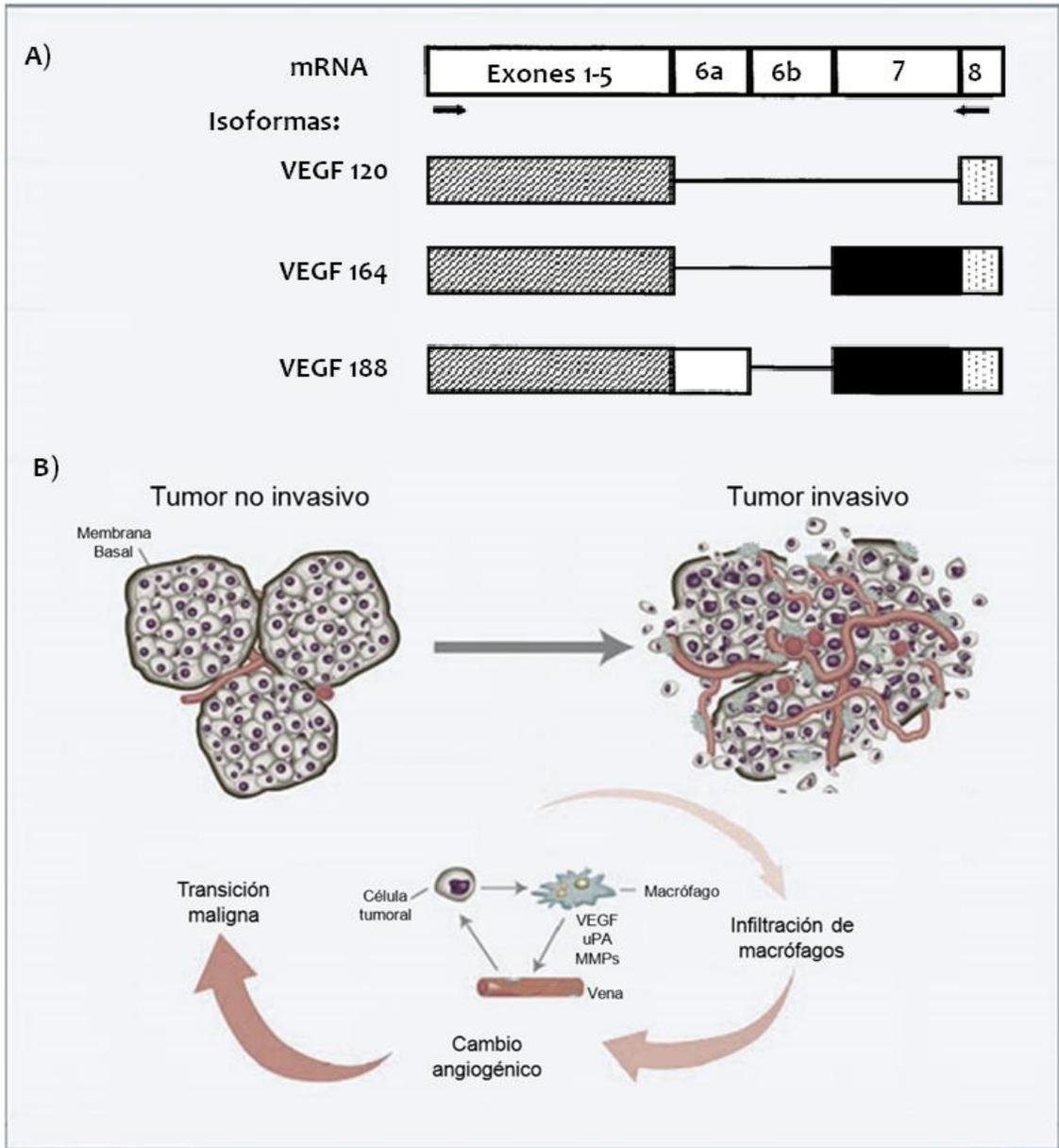


Figura 12. Esquema representativo de VEGF. A) RNA mensajero de VEGF y algunas isoformas: VEGF 120, VEGF 164 y VEGF 188 que provienen del “splicing alternativo” B) el papel de VEGF y la proteólisis (uPA y MMPs) en la angiogénesis tumoral. Modificado de Ochoa y col., 2000 y Clapp y col., 2009.

II.4. Yodo

En 1813 el yodo fue descrito como un ión abundante en las algas marinas y no fue sino hasta 1927 cuando Sir Charles Harrington lo reportó como un componente esencial de las hormonas tiroideas. La mayoría de las investigaciones en relación al metabolismo del yodo tanto en humanos como en animales se han enfocado al papel de éste como constituyente tiroideo, sin embargo estudios sólidos han demostrado su participación en la fisiología normal de otros órganos como glándula mamaria, estómago, próstata y ovario (Tseng y Latham, 1984; Venturi y Venturi, 1999; Cann y col., 2000; Smyth, 2003; Aceves y col., 2005; Aceves y Anguiano, 2009).

El yodo es importante para mantener la integridad estructural y funcional de la glándula mamaria (Eskin y col., 1995; Aceves y Anguiano, 2009). Estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado que la suplementación de I_2 disminuye los síntomas y patología histológica de la enfermedad mamaria fibroquística (Ghent y col., 1993; Kessler, 2004), y soportan la hipótesis de que el alto consumo de este elemento en poblaciones asiáticas está directamente asociado a su baja incidencia en cáncer mamario. Las algas marinas son un componente esencial en la dieta de estas poblaciones y es una rica fuente de yodo en todas sus formas químicas (Cann y col., 2000; Smyth, 2003).

Los primeros estudios que analizaron el efecto del yodo en el cáncer mamario mostraron que extractos de algas marinas o bien la co-administración de Lugol (combinación de yodo: yoduro; 1:3) junto con medroxiprogesterona disminuía significativamente el tamaño de tumores inducidos con el cancerígeno dimetilbensoantraseno (DMBA) (Funahashi y col., 1996; Kato y col. 1996). Posteriormente, nuestro laboratorio mostró que el I_2 y no el I^- o las hormonas tiroideas, es la forma química efectiva para prevenir hasta en un 70% la incidencia de cáncer en ratas tratadas con metilnitrosourea (MNU) (García-Solís y col., 2005). Un hallazgo importante fue el dato de que la suspensión del tratamiento de yodo a corto plazo (primeras 20 semanas), reactiva el crecimiento del tumor, sugiriendo

que el efecto del yodo está en la progresión tumoral más que en la iniciación (Figura 13). Sin embargo, si el tratamiento de yodo se mantiene por largo plazo (más de 60 semanas), la reincidencia desaparece indicando que las células tumorales que de inicio solo se arrestaban, después de un periodo crónico terminan por desaparecer (Aceves y col., datos no publicados).

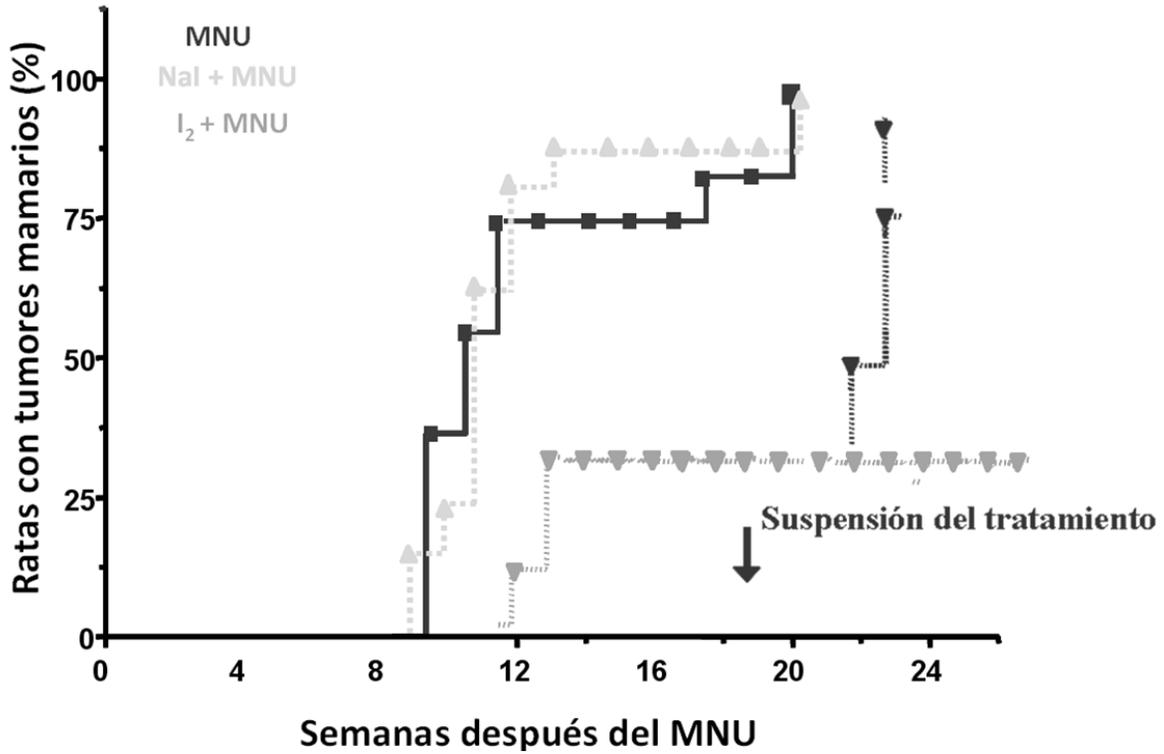


Figura 13. Gráfico de incidencia tumoral en ratas, con tratamientos de yodo en sus diferentes formas químicas. Modificado de García-Solís y col., 2005.

Efectos antiproliferativos y apoptóticos del yodo han sido corroborados en diversas células tumorales de origen humano tanto por otros autores (Shrivastava y col., 2006; Rösner y col., 2010) como por nosotros (Arroyo-Helguera y col., 2006; Arroyo-Helguera y col., 2008).

Desde el punto de vista celular, se ha descrito que el efecto apoptótico del I₂ parece estar mediado tanto por vías independientes de caspasas (AIF-PARP1)

como dependientes de ellas (Bax-caspasas) (Arroyo-Helguera y col., 2006; Shrivastava y col., 2006; Arroyo-Helguera y col., 2008). Nuestra hipótesis central propone que este tipo de yodo altamente reactivo puede ejercer su acción antiproliferativa a dos niveles: 1) ejerciendo un efecto antioxidante directo mediante su unión a especies reactivas de oxígeno (ROS), que se conoce están incrementadas en los procesos cancerosos (García-Solís y col., 2005) y 2) organizándose a lípidos de cadena larga como el ácido araquidónico (AA) y generando un yodolípido conocido como 6-yodolactona (6-IL), que ejerce un poderoso efecto apoptótico (Aceves y col., 2009).

La 6-IL ha sido aislada de la tiroides y ha mostrado tener efectos inhibidores en la proliferación y metabolismo celular de los tirocitos (Dugrillon, 1996; Pisarev y Gartner, 2000). En relación con el CaMa, nuestro grupo ha mostrado que la 6-IL está presente en concentraciones hasta 15 veces más altas en los tumores mamarios provenientes de animales suplementados con I_2 en comparación con glándulas mamarias normales (Aceves y col., 2009), y que este yodolípido es un ligando específico y promotor de los PPAR γ (Núñez-Anita y col., 2009; Núñez-Anita, 2010). Estos receptores están estrechamente relacionados a procesos de diferenciación y/o apoptosis en una gran variedad de cánceres humanos (Berger y Moller, 2002; Papadaky y col., 2005), y parecen disminuir el efecto proliferativo dependiente de estrógenos en el cáncer mamario (Suzuki y col., 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, algunos marcadores importantes de procesos invasivos como angiogénesis, quimiotáxis y proteólisis de MEC (VEGF, uPAR y uPA, respectivamente) contienen sitios responsivos a PPAR y la activación de los receptores tipo gamma se acompaña de su inhibición; es probable que el yodo por medio de la 6-IL disminuya la expresión de dichos marcadores (Zhang y col. 2006; Aceves y col., 2009).

III. HIPÓTESIS

El yodo molecular inhibe los procesos de invasión y metástasis de xenotransplantes de células tumorales mamarias humanas disminuyendo la expresión de uPA, uPAR y VEGF.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Evaluar si el yodo molecular (I_2) inhibe la implantación, crecimiento y potencial metastático de xenotransplantes de CaMa en ratones inmunodeficientes.

IV.2 Objetivos específicos

- Establecer un modelo *in vivo* de metástasis de cáncer mamario en ratones inmunosuprimidos.
- Analizar la instalación y progresión de dos tipos celulares de cáncer mamario con diferente potencial metastático.
- Analizar si el efecto antineoplásico del yodo involucra modificaciones en la expresión de las proteínas uPA, uPAR y VEGF.

V. METODOLOGÍA

V.1 Material biológico

Animales: se utilizaron ratones hembras atímicos Nude-Foxn1^{nu}, homocigotos (nu/nu). Los animales fueron mantenidos y reproducidos en condiciones óptimas de esterilidad, temperatura (18-22°C), ciclo luz–oscuridad (12:12), y dieta *ad libitum* a base de purina (Rat chow; Ralston Purina Co. St. Louis, MO) en el bioterio del INB. Los animales se manipularon y sacrificaron de acuerdo a las normas establecidas por el comité de bioética del INB.

Xenotransplantes: Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer mamario humano MCF-7 (ATCC HTB–22) y MDA-MB 231 (ATCC HTB–26), dependiente y no dependiente de estrógenos, respectivamente. Estas células presentan diferente potencial metastático siendo las MCF-7 no invasivas y las MDA-MB231 invasivas. Las células se crecieron en condiciones de cultivo, en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (medio basal). Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C, en alta humedad y una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. El medio se renovó según lo requirió el crecimiento de las células. Cuando el cultivo se encontró subconfluyente, las células se removieron por adición de tripsina para su propagación o bien, se contaron para posterior inoculación.

V.2 Métodos de análisis

V.2.1 Análisis de la expresión de uPA, uPAR y VEGF.

V.2.1.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA total se hizo con TRIzol® (Invitrogen), de acuerdo al protocolo comercial. Brevemente, 100 mg del del tumor se homogenizaron con 1 ml de TRIzol. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se hizo el mezclado por inversión e incubación durante 3 minutos a

temperatura ambiente (TA). Se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó 0.5 ml de isopropanol. Se incubó 10 minutos a TA, y centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el botón (RNA) con 1 ml de etanol 70% frío, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se dejó evaporar el etanol y se resuspendió en agua estéril. Finalmente la concentración de RNA se cuantificó en un espectrofotómetro UV (Nanodrop Technologies) mediante el cociente 260/280 nm.

V.2.1.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR)

A partir del RNA total, se sintetizó una cadena complementaria de DNA (cDNA) mediante transcripción reversa. La reacción de retrotranscripción se hizo con un volumen final de 20 µl. Partiendo de 2 µg de RNA total con 1 µl de un oligonucleótido iniciador dT, esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente se agregaron 4 µl de amortiguador 5X, 2 µl de DTT 50 mM, 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, y 1 µl de enzima Superscript transcriptasa reversa y se incubó durante 1 hora a 37°C, seguido de 5 minutos a 95°C. El DNA complementario (cDNA) obtenido se congeló a -20°C.

Para corroborar la expresión de una sola banda de los genes a analizar en el RNA mensajero, se usó la reacción de PCR normal. La reacción de PCR se llevó a cabo a una concentración final de 50 µL conteniendo: 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 µL de amortiguador 10x, 2.5 µl de 30 mM de MgCl₂, 2 µl de los oligonucleótidos iniciadores 10 pmolas y 5 U de Taq DNA polimerasa, más 1 µL de cDNA. Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar los fragmentos correspondientes de uPA, VEGF y actina, se muestran en la Cuadro 2. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV. El tamaño de las bandas se comparó con un marcador de peso molecular de DNA comercial (1 kb DNA ladder, In Vitro Gene). El gen de actina se usó como control interno ya que su síntesis es constitutiva a nivel estructural.

V.2.1.3 PCR en tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real se hizo en un termociclador Rotor Gene 3000, CORBET RESEARCH bajo las siguientes condiciones: 50 ciclos para los mRNAs de uPA, uPAR, VEGF y Actina. Cada ciclo a una temperatura de fusión de 94°C por 45 segundos, de alineación a 55-64°C (dependiendo del gen) y de extensión a 72°C por 1 minuto. Como control negativo en cada reacción, se colocó una muestra de RNA con los oligonucleótidos apropiados, pero sin cDNA.

El software del sistema ROTOR GENE reporta automáticamente los valores de Cp, los cuales se pueden utilizar para llevar a cabo cuantificaciones absolutas o relativas, construye una gráfica de la detección de fluorescencia en función de la temperatura y generando una tabla con los resultados del número de copias calculadas. La evaluación de la expresión de uPA, uPAR y VEGF se realizó mediante cuantificación relativa utilizando como control interno la amplificación de actina.

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en PCR tiempo real.

Gen	Sentido/ Antisentido	T.A.	Amplicon
uPA	5'-GTGGCCAAAAGACTCTGAGG-3' 5'- CAAGCGTGTCAGCGCTGTAG-3'	64°C	267 pb
uPAR	5'-CAGACTTGCTGTGTGACCTCA-3' 5'- AATAACAACAACACAACAGCGG-3'	64°C	183 pb
VEGF	5'-GGCCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCT-3' 5'-CCTCCTGCCCGGCTCACCCGC-3'	55°C	165 pb
β -Actina	5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTG-3' 5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA-3'	55°C	173 pb

V.2.2 Determinación de la proliferación celular.

Los tejidos fijados con formalina 10%, se incluyeron en parafina para posteriormente realizar cortes de tejidos en laminillas pretratadas con silano 1%.

Mediante las técnicas de inmunohistoquímica que se describirán a continuación de manera general, se hizo un análisis de proliferación celular mediante la cuantificación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

Inicialmente se desparafinó el tejido con xileno a 60°C, concluido este proceso se hidrataron las muestras con mezclas de xileno y alcohol, y alcohol y agua a diferentes concentraciones. La parafina hace que se inhiban los epítopes del antígeno por lo que se hizo una recuperación del antígeno con una solución de citratos. Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena concentrada en los glóbulos rojos, linfocitos y células endoteliales, para evitar falsos positivos ya que la esta enzima oxida a la diaminobencidina (DAB). A continuación se hizo un bloqueo enzimático de unión inespecífica con solución de albúmina sérica de bovino, seguido de una incubación con el anticuerpo primario, cuya función fue ser detectado en la incubación siguiente con el anticuerpo secundario. Y posteriormente, ser conjugado mediante una última incubación con una peroxidasa que reaccionará con el cromógeno (DAB). Por último, las células teñidas se contrastaron con solución de Hematoxilina de Harris.

V.3. Diseño experimental

Establecimiento del modelo de xenotrasplantes de CaMa en ratones desnudos.

Se utilizaron células cancerosas mamarias humanas no invasivas (MCF-7), o invasivas (MDA-MB231) y ratones inmunosuprimidos (Nude-Foxn1^{nu}) libres de patógenos de 8 semanas.

Después de pasar una semana de adaptación, las hembras se inocularon de forma subcutánea con jeringa estéril de 1 ml y aguja 21G, con células MCF-7 o MDA-MB231 (5×10^6) resuspendidas en 50 μ l de PBS y 50 μ l de Matrigel (BD BIORAD). Una vez inoculadas, se procedió a separar los animales en dos grupos (I₂ y Control). El grupo I₂ inició la suplementación de yodo (0.025% en el agua de beber) y el tratamiento se mantuvo hasta el sacrificio al cabo de 6 semanas, tiempo durante el cual se mantuvieron los ratones en observación.

Se cuantificó el crecimiento tumoral semanalmente y concluidas 6 semanas se extrajeron los tumores. De manera aleatoria se dividió en dos, una mitad se fijó en formalina al 10% para su análisis histológico y la otra mitad se congeló para el análisis de expresión de genes (RT-PCR).

V.4. Análisis estadístico.

Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar (DE). Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron de la siguiente manera:

- A) Para el análisis de incidencia se usaron tablas de contingencia con prueba post hoc de Fisher.
- B) Para las pruebas de proliferación y expresión de VEGF se usó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y Tukey como prueba post hoc.
- C) Para la expresión de uPA y uPAR se utilizó una prueba T de student.

En todos los casos, las diferencias con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

VI. RESULTADOS.

El primer objetivo de este trabajo consistió en establecer un modelo *in vivo* de metástasis de cáncer mamario en ratones inmunosuprimidos por lo que a partir del día de la inoculación y cada tres días se realizó la observación y palpación del sitio de inyección para detectar el incremento de volumen localizado. A partir de la semana 2 y durante las 4 semanas posteriores, fue posible observar el aumento de volumen de una masa compacta en el sitio de inoculación como se muestra en la figura 14.



Figura 14. Ratón inmunosuprimido con tumor de 6 semanas formado a partir de la línea celular MCF-7.

La figura 15 muestra el patrón histológico del tumor primario iniciado con la línea celular MCF-7. El análisis reveló la presencia de una masa compacta, con escaso estroma de tejido conectivo y células pleomórficas, predominantemente fusiformes, de núcleos hipercromáticos, redondos u ovalados, de tamaño variable y con presencia de núcleos conspicuos, con varios nucleolos prominentes. Se aprecian algunas imágenes de mitosis aberrantes (multipolares) además de zonas de infiltrado inflamatorio linfocítico dispersos en el tumor. Se observan residuos de tejido adiposo, así como extensas zonas de necrosis licuefactiva en la periferia. Cabe mencionar que los tumores están abundantemente vascularizados.

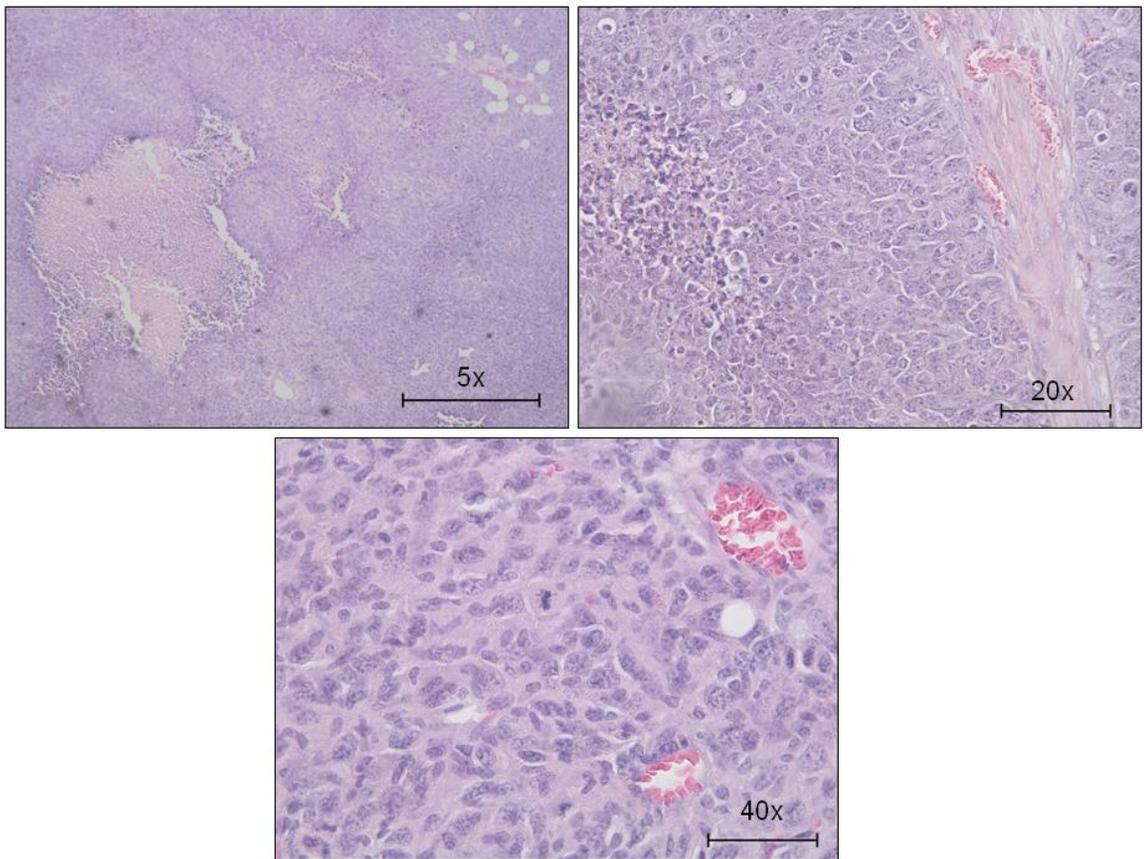


Figura 15. Histología de tumores generados a partir de células MCF-7. Tinción Hematoxilina-Eosina.

El estudio histológico del tumor primario iniciado con la línea celular MDA-MB231 reveló la presencia de una masa compacta, con escaso estroma de tejido conectivo. En estos tumores, que se ejemplifican con la figura 16, se ve una población celular heterogénea compuesta de células pleomórficas, fusiformes, y poligonales de aspecto epitelióide, de núcleos pálidos, las células de morfología poligonal presentan núcleos redondos y ovalados mientras que las fusiformes presentan un núcleo elongado, de tamaño variable y con presencia de núcleos conspicuos, con 1 o 2 nucleolos prominentes, se aprecian además, citoplasmas amplios con vesículas. Se pueden ver un gran número de mitosis tanto normales como aberrantes y escasos linfocitos dispersos en el tumor. Se observan residuos de tejido adiposo en la periferia, y algunas zonas de necrosis licuefactiva central.

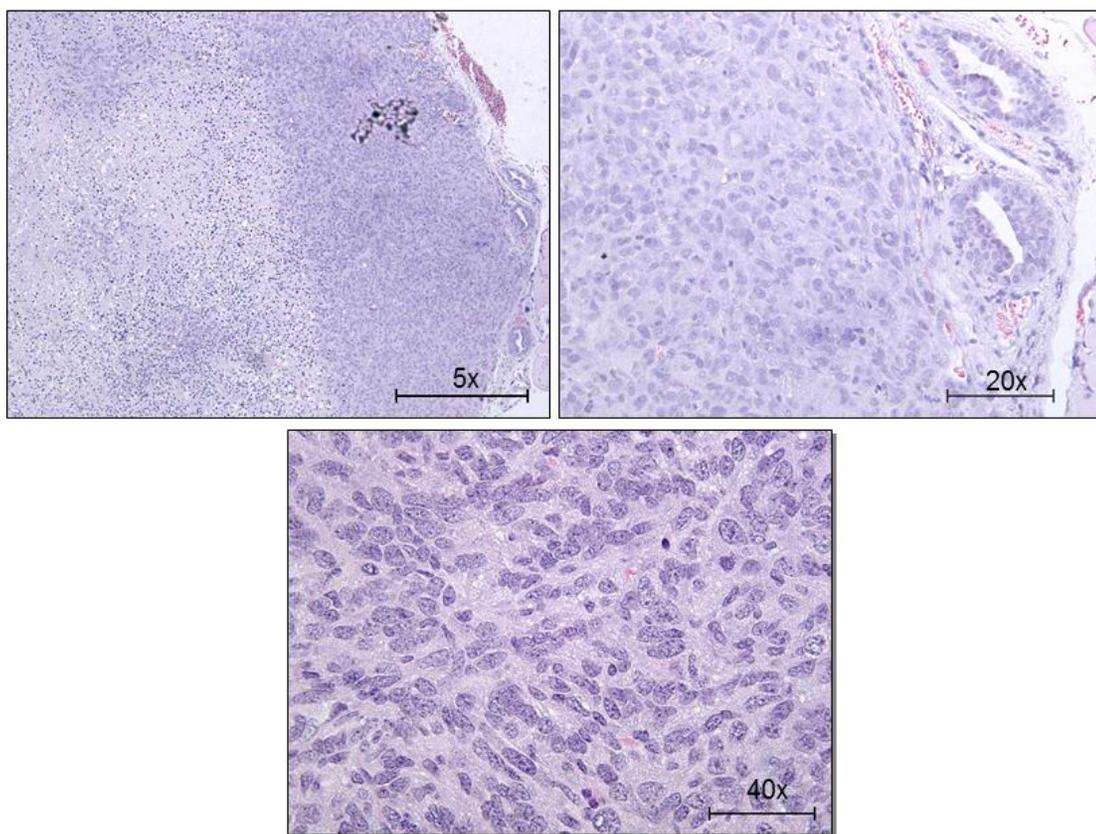


Figura 16. Histología de tumores generados a partir células MDA-MB231. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Para analizar el efecto del yodo en la implantación y progresión tumoral se determinó el porcentaje de incidencia, la tasa de crecimiento y la tasa de proliferación de los xenotrasplantes de cada una de las líneas celulares.

En el cuadro no. 3 se observa que ambas líneas celulares tiene la misma capacidad de implantación ya que a la semana 6 entre el 95 y 100% de los animales presentaron tumores. Los resultados obtenidos en los animales suplementados con yodo mostraron que este elemento disminuye significativamente la implantación de ambas líneas celulares, siendo más significativo en las células MDA-MB231.

Cuadro 3. Efecto del tratamiento con yodo molecular en la implantación de células tumorales de cáncer mamario humano.

	Control		I ₂	
	<i>Tumor/Total</i>	%	<i>Tumor/Total</i>	%
MCF-7	12/13	92.3%	6/12	50 % *
MDA-MB231	11/11	100 %	2/10	20 % *

* significativo con respecto al control P<0.05.

Respecto al volumen tumoral final (figura 17), se observa nuevamente que el yodo inhibe significativamente la progresión tumoral de ambas líneas celulares.

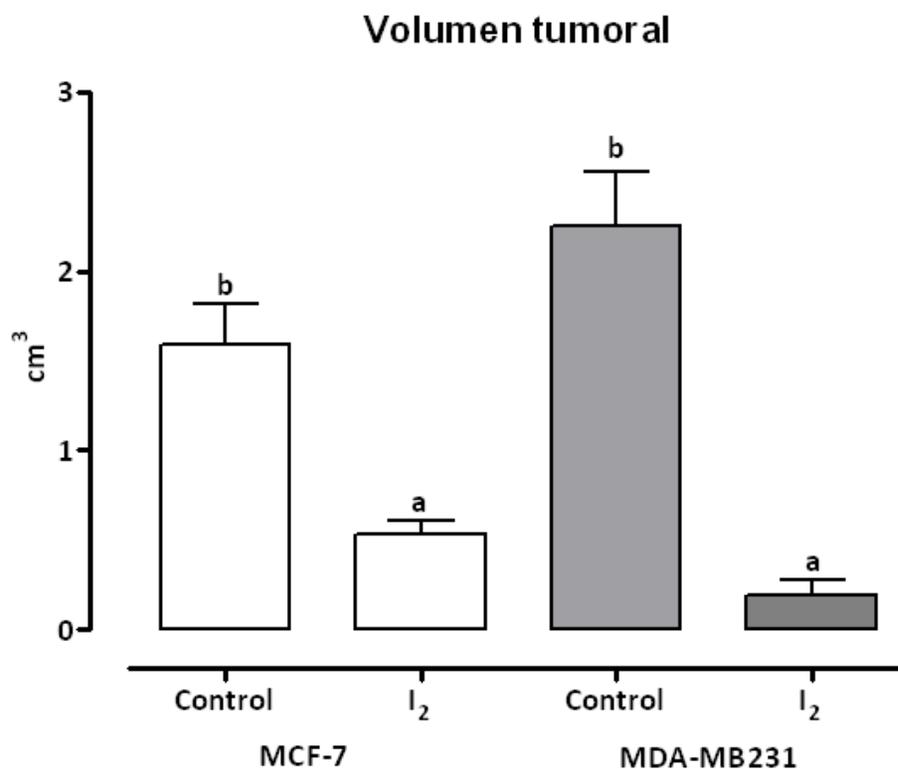


Figura 17. Efecto del tratamiento con yodo molecular en el volumen (progresión) de los tumores de cáncer mamario humano.

El análisis de proliferación celular de las células neoplásicas se llevó a cabo mediante la cuantificación inmunohistoquímica del PCNA (Antígeno nuclear de

proliferación celular, por sus siglas en inglés, Proliferation Cell Nuclear Antigen). La figura 18 muestra que el yodo disminuye parcialmente la proliferación celular (5 al 8%) alcanzando significancia estadística solo en las células MCF-7.

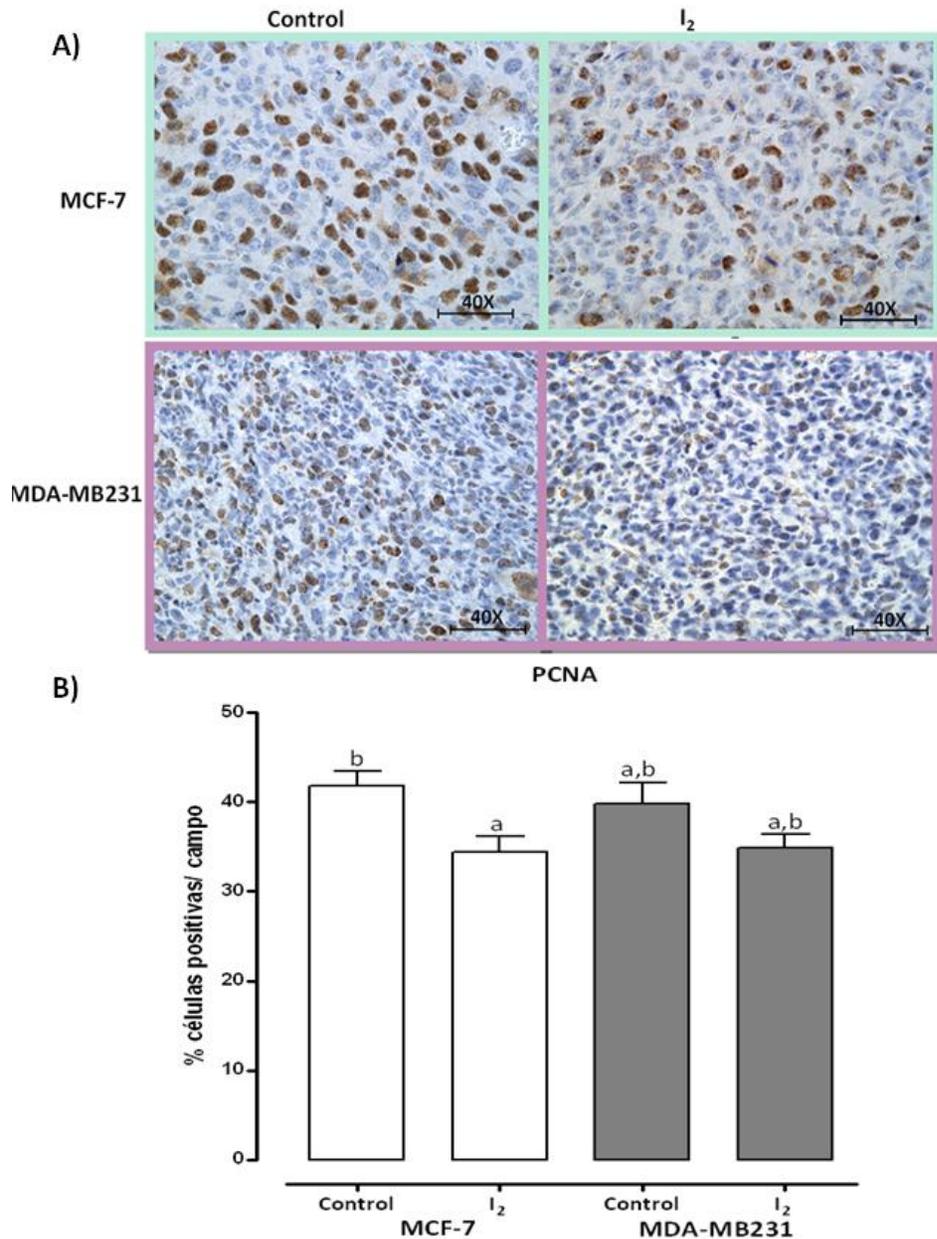


Figura 18. Gráfico de cuantificación de la proliferación celular en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano (MCF-7 y

MDA-231). A) Imágenes (inmunohistoquímica) representativas de PCNA. B) Cuantificación de células positivas a PCNA/campo. N=5.

El objetivo final de este trabajo fue analizar si la suplementación dietética de I₂ disminuye la expresión de algunos de los marcadores de metástasis como uPA, uPAR y VEGF.

El paso inicial fue buscar la expresión de éstas proteínas en los tumores de las dos líneas celulares de CaMa humano. Nuestros resultados mostraron que uPA y uPAR sólo se expresan en los tumores generados a partir de MDA-MB231 mientras que VEGF se expresa en los tumores de ambas líneas celulares (figura 19).

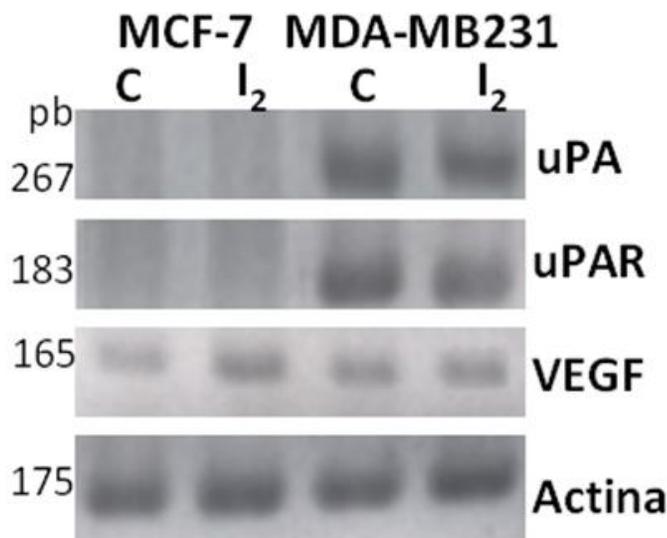


Figura. 19. Productos de RT-PCR de: marcadores de metástasis (uPA, uPAR y VEGF) y gen constitutivo (actina). A partir del mRNA de los tumores generados de MCF-7 y MDA-MB231, en gel de agarosa 2%.

El análisis de expresión de uPA y uPAR en las células MDA-MB231 mostró una disminución significativa de estas proteínas en el grupo tratado con I₂ (FIGURA 20).

En la figura 21 se observa una disminución de VEGF en los grupos tratados con I₂ respecto de los grupos control de ambas líneas, significativa sólo para el grupo de tumores generados a partir de células MCF-7.

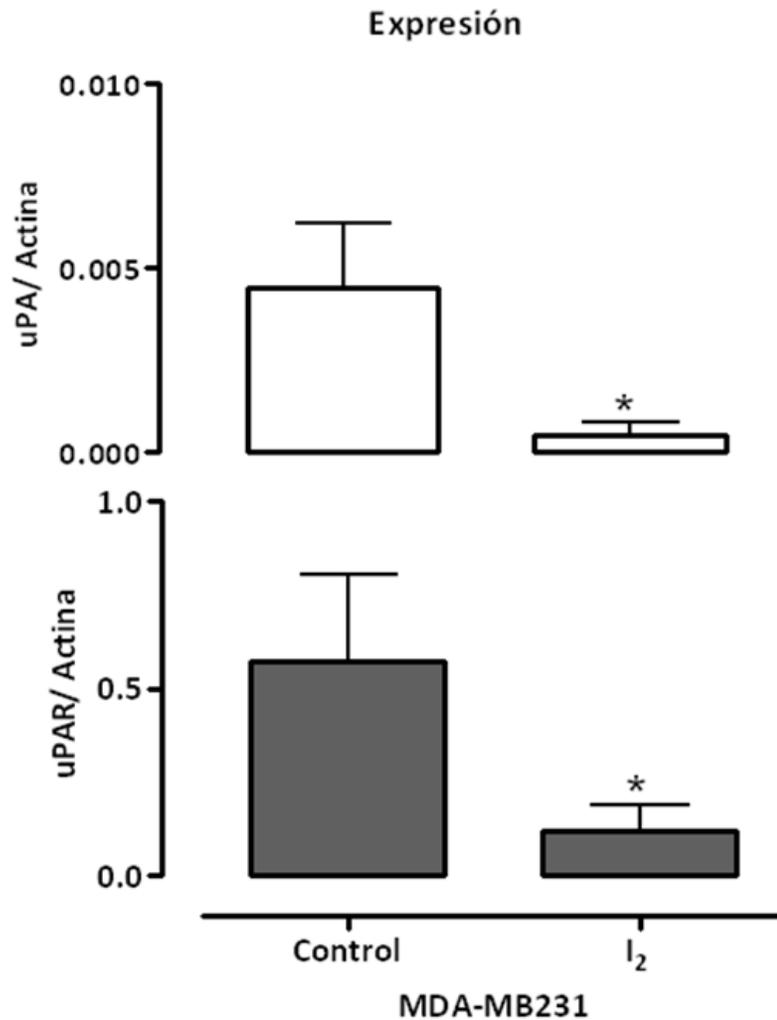


Figura 20. Gráfico de cuantificación de la expresión de uPA y uPAR en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano MDA-MB231.

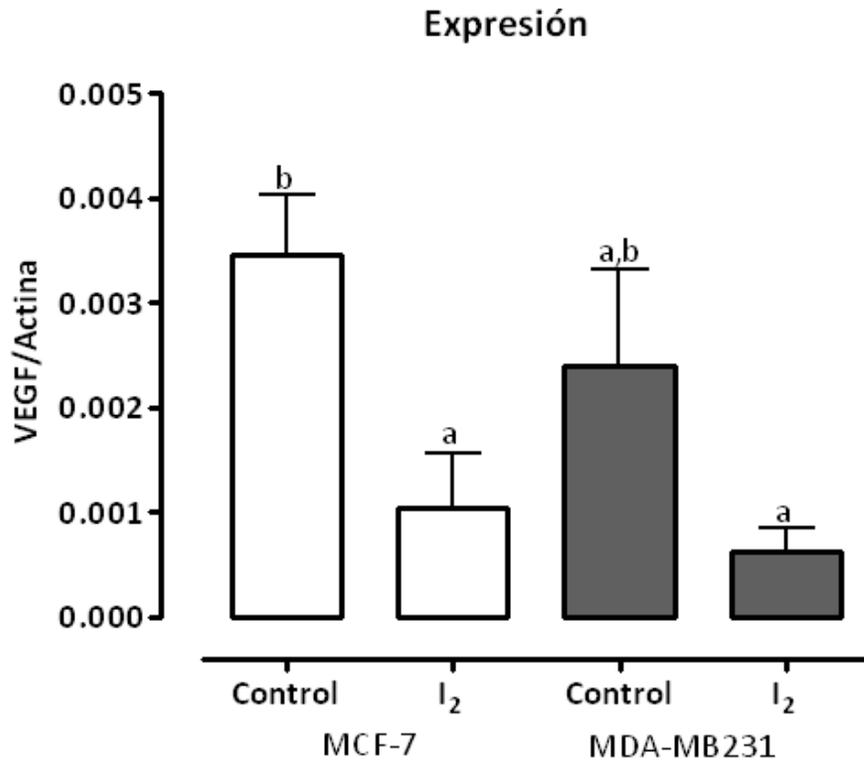


Figura 21. Gráfico de cuantificación de la expresión de VEGF en los tumores generados a partir de las líneas celulares de cáncer mamario humano MCF-7 y MDA-MB231.

VII. DISCUSIÓN.

En esta tesis se examinó la capacidad antineoplásica del I₂ en un modelo de xenotransplantes usando dos líneas tumorales mamarias humanas con diferente capacidad invasiva. Los resultados mostraron el desarrollo de un modelo eficiente y reproducible de cáncer mamario no-invasivo e invasivo. En ambos casos obtuvimos entre un 95 y 100% de implantación en los grupos control. La suplementación de yodo disminuyó la incidencia tumoral de ambas líneas siendo más efectivo en la línea invasiva MDA-MB231 donde solo el 20% de los ratones desarrollaron tumores (vs MCF-7 con el 50%). Esta diferencia en incidencia correlacionó también con una menor tasa de crecimiento tumoral ya que en la semana 6 los tumores generados con MDA-MB231 tendieron a ser más pequeños.

Estos datos concuerdan con reportes previos de otros investigadores y de nuestro laboratorio mostrando que la suplementación de yodo (por medio de la ingesta en algas, o suplementación con solución de lugol y solución de I₂, etc.) ejerce un efecto protector y antineoplásico en modelos *in vivo* de cáncer mamario inducido químicamente (DMBA y MNU). En esos modelos el efecto incide principalmente en el tiempo de aparición (se retrasan hasta 3 semanas), en la progresión (solamente un 30%-50% de los animales desarrollan tumores) y en la tasa de crecimiento (tumores ya desarrollados disminuyen su tamaño) (Funahashi y col., 1999; García-Solís y col., 2005; Aceves y col., 2009; Soriano y col., 2011).

En la búsqueda de los mecanismos involucrados en este efecto antineoplásico, en el presente trabajo analizamos la tasa de proliferación tumoral mediante la expresión de la proteína PCNA. Nuestros resultados mostraron que la suplementación de yodo detiene la proliferación celular solo en forma discreta (5 al 8%) siendo significativa únicamente en los tumores de células MCF-7. Estos datos aunque en principio parecen contradictorios, ya que los tumores más pequeños corresponden a los provenientes de células MDA-MB231, pueden explicarse en parte por datos encontrados previamente en tumores responsivos a estrógenos. Efectivamente el crecimiento de las células MCF-7 depende de la presencia de estrógenos mientras que las MDA-MB231 son independientes. En trabajos previos,

nuestro grupo ha mostrado que la suplementación de I_2 se acompaña de disminuciones significativas en la tasa de proliferación de tumores mamarios humanos de mujeres pre-menopáusicas, pero no en tumores de mujeres post-menopáusicas, y que ésta disminución en PCNA se acompaña de una disminución en la translocación del receptor de estrógenos tipo alfa hacia el núcleo (Vega-Riveroll y col., 2010). Está bien establecido que la activación de genes dependientes de estrógenos como PCNA, requieren de la translocación de la unidad estrógenos/receptor hacia el núcleo (Bai y Gust, 2009). Aunque el mecanismo celular/molecular involucrado en este efecto del yodo no se conoce, se han descrito varios efectos antagónicos entre los receptores PPAR γ y los de estrógenos alfa (Yin y col., 2009). Efectivamente se conoce que el receptor PPAR γ puede ejercer efectos antiestrogénicos a varios niveles: uno de ellos es tipo Cross-talk compitiendo por los sitios responsivos a estrógenos en diferentes genes generando inhibición en los efectos estrogénicos (Keller y col., 1995). Otra posibilidad es induciendo la expresión de la proteína exógena reguladora de la kinasa 8 (Erk8) involucrada en la translocación nuclear de varios receptores estrogénicos. La expresión de esta proteína depende en parte de la activación de PPAR γ y su incremento disminuye la traslocación nuclear de estos receptores (Rossi y col., 2010). Estos datos concuerdan con un resultado previo donde la suplementación de I_2 a células MCF-7 incrementa hasta en un 200% la expresión del receptor PPAR γ (Núñez-Anita y col., 2009). Estudios encaminados a conocer la participación de los PPAR γ en la respuesta estrogénica de estos tumores se hacen muy atractivos.

En el caso de las células MDA-MB231 se observó una mayor disminución del volumen tumoral en el grupo suplementado con I_2 con respecto de aquellos generados a partir de MCF-7. Dado que este efecto no se explica por modificaciones en la tasa de proliferación, otros mecanismos como apoptosis o necrosis podrían estar involucrados. Estudios previos han sugerido que la suplementación de yodo se acompaña de efectos apoptóticos que involucran tanto acciones directas del yodo *per se*, como indirectas mediante la formación de yodolípidos con acción apoptótica mediada por receptores (Arroyo-Helguera y col.,

2008). En el primer caso se ha descrito que la suplementación de I₂ a diversas células tumorales se acompaña de una disminución significativa en el potencial membranar mitocondrial, que se conoce como un potente inductor de apoptosis independiente de caspasas (PARP/AIF) (Shrivastava y col., 2006; Rösner y col., 2010). En el segundo caso, nuestro grupo ha demostrado que tanto en modelos *in vivo* (MNU) como en células MCF-7 el I₂ promueve muerte celular mediada por Bax/Bcl2- caspasas (Arroyo-Helguera, 2007; Aceves y col., 2009). Esta activación puede inducirse también al utilizar la 6-yodolactona (6-IL) que se ha demostrado se genera en tejidos y células tumorales mamarias suplementadas con I₂ (Aceves y col., 2009). Además se ha demostrado que la 6-IL es un ligando específico y activador de los receptores PPAR γ (Núñez-Anita y col., 2009). A este respecto, es necesario caracterizar en estos tumores, la tasa de apoptosis, la presencia de 6-IL, así como la posible activación de las vías de señalización antes mencionadas.

La capacidad invasiva de un tumor o célula tumoral está determinada por la expresión de proteínas específicas que se han designado previamente como marcadores de metástasis; estos marcadores “capacitan” a la célula para realizar diferentes acciones como la degradación de la matriz extracelular, la pérdida de adhesión célula-célula y la vascularización, entre otras funciones. Entre los marcadores más estudiados se encuentran el sistema del plasminógeno (uPA y uPAR), que permite activar procesos de migración y adhesión celular e implantación de metástasis tumorales, así como la expresión de VEGF involucrado en la creación de nuevos vasos sanguíneos (Irigoyen y col., 1999; Castelló-Cros, 2004; Crippa, 2006; Guise, 2010). Es por ello que el objetivo final de esta tesis fue analizar si la suplementación de I₂ disminuye la expresión de estas proteínas.

Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de expresión de uPA y uPAR en las células MCF-7 corroborando su fenotipo de no-invasivo. En contraste las células MDA-MB231 expresaron ambas proteínas y la suplementación de yodo se acompañó de su disminución. En el caso de VEGF encontramos que ambas líneas celulares expresan este factor angiogénico y que el yodo en ambos casos disminuye su expresión, pero sólo lo disminuye de manera significativa en la línea MCF-7. Es importante recordar que los genes de estas tres proteínas son inhibidos

de manera directa por PPAR γ . Previamente a este trabajo se había observado que en xenotransplantes de células tumorales mamarias MCF-7, la combinación de ligandos para PPAR γ y para RAR (receptor de ácido retinoico) se acompañó de la inhibición del crecimiento de tumores y de la inducción de apoptosis (Eltner y col., 1998; Mustafa y Kruger, 2008; Nuñez-Anita, 2010). Se sabe además que en modelos de cáncer espontáneo en ratones, se retrasa la aparición de tumores mamarios cuando se tratan con agonistas selectivos de PPAR γ . Este efecto es sinérgico cuando se administra en combinación con el fármaco Celecoxib el cual es un inhibidor selectivo de la enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) (Suh y col., 1999; Badawi y col., 2004). Datos de nuestro laboratorio también han reportado una disminución significativa de la expresión de uPA y VEGF en modelos de cáncer mamario inducido por fármacos, cuando se suplementa la dieta con I₂ (Aceves y col., 2009).

Nuestros datos no pueden demostrar que la inhibición observada de moléculas como UPA, uPAR o VEGF sean un factor suficiente para inducir los mecanismos apoptóticos descritos en otros modelos. Sin embargo datos en la literatura apuntan a que la disminución en la expresión de estos marcadores repercute de manera importante en la progresión de diversos tejidos tumorales. Así, se ha reportado que 1) en células mieloides (macrófagos) la deficiencia de uPAR inhibe la adhesión y degradación del fibrinógeno (Blasi y Carmeliet, 2002; Simon y col., 1996); 2) en células de la línea HEP3 que sobreexpresan uPAR y forman tumores en las membranas corioalantoínicas de embriones de pollo, una disminución en la expresión del uPAR forzó a las células malignas a entrar en un estado de quiescencia (Blasi y Carmeliet, 2002; Yu y col., 1997) y 3) la regulación a la baja de uPAR en células altamente invasivas disminuye la actividad de las integrinas a una concentración por debajo del límite requerido para el crecimiento y tumorigénesis (Blasi y Carmeliet, 2002; Veeravalli y col., 2010). En el caso del VEGF, diversos estudios han descrito que esta proteína además de ser un promotor angiogénico, es un factor crucial tanto en la proliferación del tumor principal como en la inducción de metástasis. Se conoce que el bloqueo de esta cascada de señalización es un potente inhibidor del crecimiento tumoral (Aplanat y

col., 2008; Bischoff e Ignatov, 2010), mientras que su transactivación mediada por el factor inducido por hipoxia 1- α (HIF1- α) induce la migración celular en modelos *in vitro* de cáncer mamario MDA-MB231 y 4T1. (Bischoff e Ignatov, 2010; Konokoglu y col., 2007; Li y Lu, 2010). Por todo lo anterior, es posible considerar que el efecto antineoplásico del yodo involucre la activación de varios mecanismos y que dependiendo del estado fisiopatológico del tejido, ejerza efectos antiestrogénicos, apoptóticos y de inhibición en invasión y metástasis.

VIII. CONCLUSIONES

En resumen, los datos presentados en este trabajo muestran que:

- I. Se estableció un modelo *in vivo* de invasión de cáncer mamario en ratones inmunosuprimidos con dos líneas celulares con diferente potencial invasivo.
- II. La suplementación de yodo disminuye la implantación y progresión tumoral de ambas líneas.
- III. El efecto antineoplásico del yodo incluye la disminución de la expresión de la proteína VEGF en MCF-7 así como de uPA y uPAR en la línea celular MDA-MB231.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aceves, C., Anguiano, B. 2009. Comprehensive handbook of iodine: nutritional, biochemical, pathological and therapeutic aspects. 1^{ra} edición. Academic Press. Tucson, USA: 249-257.

Aceves, C., García-Solís, P., Arroyo-Helguera, O., Vega-Riveroll, L., Delgado, G., Anguiano, B. 2009. Antieneoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Molecular Cancer*. Vol. 6: 8-33.

Aceves, C., Anguiano, B., Delgado, G. 2005. Iodine as a Gatekeeper of the integrity of mammary gland? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 10: 189-196.

Adami, OH., Signorello, LB., Trichopoulos, D. 1998. Towards an understanding of breast cancer etiology. *Seminars in Cancer Biology*. Vol. 8: 255-262.

Alfano, D., Franco, P., Vocca, I., Gambi, N., Pisa, V., Mancini, A., Caputi, M., Carriero, MV., Iaccarino, I., Stopelli, MP. 2005. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 6: 205-211.

Alfaro-Hernández, Y. 2005. Yodo, un potente antioxidante protector del cáncer mamario inducido por N-Metil-N-Nitrososaurea. Querétaro. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. 4-17.

Ali, S., Coombes, RC. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews cancer*. Vol. 11: 101-112.

Almasi, C., Christensen, I., Høyer-Hansen, G., Danø, K., Pappot, H., Dienemann, H., Muley, T. 2011. Urokinase receptor forms in serum from non-small cell lung cancer patients: relation to prognosis. *Lung cancer*. En prensa.

Aplanat, MP., Buteau-Lozano, H., Herve, MA., Corpet, A. 2008. Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 617: 437-444.

Arias, JA. 2009. Mastología. Centro Policlínico de Valencia. <http://www.mastologia.net/indexespecial.html>.

Arroyo-Helguera, O., Rojas, E., Delgado, G., Aceves, C. 2008. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocrine-Related Cancer*. Vol. 15:1003-1011.

Arroyo-Helguera, O. 2007. Análisis del mecanismo protector del yodo en el cáncer mamario. Querétaro. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. 4-14.

Arroyo-Helguera, O., Anguiano, B., Delgado, G., Aceves, C. 2006. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine-Related Cancer*. Vol. 13: 1147-1158.

Badawi, AF., Eldeen, MB., Liu, Y., Ross, EA., Badr, MZ. 2004. Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of ciclooxigenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cancer Research*. Vol. 64: 1181-1189.

Bai, Z., Gust, R. 2009. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Archiv der Pharmacie*. Vol. 3: 133-149.

Bajou, K., Lewalle, JM., Rodríguez-Martínez, C., Soria, C., Lu, H., Noël, A., Foidart, JM. 2002. Human breast adenocarcinoma cell lines promotes angiogenesis by providing cells with uPA-PAI1 and by enhancing their expression. *International Journal of Cancer*. Vol. 100: 501-506.

Berger, J., Moller, DE. 2002. The mechanisms of action of PPAR. *Annual Reviews of Medicine*. Vol. 53: 409-435.

Binnema, DJ., Van Iersel, JJJ., Dooijewaard, G. 1986. Quantitation of urokinase antigen in plasma and culture media by use of an Elisa. *Thrombosis Research*. Vol. 43: 569-577.

Bischoff, J., Ignatov, A. 2010. The Role of Targeted Agents in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Care*. Vol. 5: 134-141.

Blasi, F., Carmeliet, P. 2002. uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. Vol. 3: 932-943.

Blasi, F., Vassalli, JD., Dano, K. 1987. Urokinase-Type Plasminogen Activator: Proenzyme, Receptor and Inhibitors. *Journal of Cell Biology*. Vol. 104: 801-804.

Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B. 2002. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Estradiol and Tamoxifen in Breast Cancer Cells: A Complex Interplay between Estrogen Receptors α and β . *Journal of Cancer Research*. Vol. 62: 4977-4984.

Cann, SA., Van Netten, JP., Van Netten, C. 2000. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast Cancer. *Cancer Causes and Control*. Vol. 11:121-127.

Castelló-Cros, R. 2004. Estudio de la expresión del sistema fibrinolítico y del sistema de las metaloproteasas en el cáncer de mama. Valencia. Universitat de Valencia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis para obtener el título de Doctor en Bioquímica. 2-37.

Chappuis, P., Dieterich, B., Sciretta, V., Lohse, C., Bonnefoi, H., Remadi, S., Sappino, AP. 2001. Functional evaluation of Plasmin Formation in Primary Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 19: 2731-2738.

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, MC., Martínez de la Escalera, G. 2009. Peptide hormone regulation of the angiogenesis. *Physiological reviews*. Vol. 80: 1177-1215.

Crippa, M. 2006. Urokinase-Type Plasminogen Activator. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Vol. 39: 690-694.

Danø, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, LR., Ploug, M., Romer, J. 2005. Plasminogen activation and cancer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 93: 676-681.

De Bock, C., Wang, Y. 2004. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Medicinal research review*. Vol. 24: 13-39.

DeVita, VT., Lawrence, TS., Rosenberg, SA. 2008. Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8va edición. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA: 104-1655.

Dixon, JM. 2006. ABC of breast diseases. 3^{er} edición. Blackwell Publishing. Oxford, UK: 8-76.

- Duffy, MJ. 2005.** Predictive markers in breast and other cancers: A review. *Clinical Chemistry*. Vol. 51: 494-503.
- Dugrillon, A. 1996.** Iodolactones and iodine aldehydes-mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. Vol. 104: 37-40.
- Elstner, E., Müller, C., Koshizuka, K., Williamson, EA., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, JW., Heber, D., Koeffler, HP. 1998.** Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. Vol. 95: 8806-8811.
- Eskin, BA., Grotkowski, CE., Connolly, CP., Ghent, WR. 1995.** Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biological Trace Element Research*. Vol. 45: 9-19.
- Ferrara, N. 2009.** Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. Vol. 29: 789-791.
- Ferrara, N., Gerber, HP., LeCouter, J. 2003.** The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. Vol. 9: 669-676.
- Ferlay, J., Shin, HR., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, DM. 2008.** GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. <http://globocan.iarc.fr>.
- Fidler, IJ. 2003.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews*. Vol. 3: 453-458.
- Fidler, IJ. 2002.** The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*. Vol. 70: 498-505.
- Fiegelson, HS., Henderson, HE. 1996.** Estrogen and breast cancer. *Carcinogenesis*. Vol. 17: 2279-2284.
- Folkman, J. 2006.** Angiogenesis. *Annual Reviews of medicine*. Vol. 57: 1-18.
- Folkman, J., Shing, Y. 1992.** Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267: 10931-10934.
- Funahashi, H., Imai, T., Tanaka, Y., Hayakawa, Y., Kikumori, T., Mase, T., Itoh, T., Nishikawa, M., Hayashi, H., Shibata, A., Hibi, Y., Takahashi, M., Narita, T. 1999.**

Wakame seaweed supresses the proliferation of 7,12-dimetilbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. Japanese Journal of Cancer Research. Vol. 90: 922-927.

Funahashi, H., Imai, T., Tanaka, Y., Tobinaga, J., Wada, M., Morita, T., Yamada, F., Tsukamura, K., Oiwa, M., Kikumori, T., Narita, T., Takagi, H. **1996**. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. Journal of Surgical Oncology. Vol. 61:209-213.

García-Manero, M., Olartecoechea, B., Aubá, M., Alcázar, JL., López, G. **2009**. Angiogenesis y endometriosis. Revista de medicina de la Universidad de Navarra. Vol. 53-2: 8-13.

García-Solís, Pablo. **2006**. Análisis del efecto de las dietas ricas en yodo y ácido retinóico sobre la inducción del cáncer mamario en ratas tratadas con el cancerígeno N-metil-N- nitrosaura (MNU). Querétaro. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. 9-50.

García-Solís, P., Alfaro, Y., Anguiano, B., Delgado, G., Guzmán, RC., Nandi, S., Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aceves, C. **2005**. Inhibition of induced-MNU mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment. Evidence that I₂ prevent cancer promotion. Molecular and Cellular Endocrinology. Vol. 236: 49-57.

Geneser, Finn. **2000**. Histología. Tercera edición. Panamericana. Bogotá, Col: 679-684.

Ghent, WR., Eskin, BA., Low, DA., Hill, LP. **1993**. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. Canadian Journal of Surgery. Vol. 36: 453-460.

Grau, R., Díaz- Muñoz, M., Cacheiro- Llaguno, C., Fresno, M., Iñiguez, MA. **2008**. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in the control of Cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor: involvement in tumor growth. PPAR Research. Vol. 2008:1-10.

Grøndahl-Hansen, J., Peters, HA., van Putten, WL., Look, MP., Pappot, H., Røne, E., Danø, K., Klijn, JG., Brüner, N., Foekens, JA. **1995**. Prognostic significance of

the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol 1: 1079-1087.

Guarneri, V., Placentini, F., Conte, PF. 2007. Breast Cancer. *Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*. 1^a ed. Springerlink. Alemania: 240-256.

Guise, T. 2010. Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment. *Seminars in oncology*. Vol. 37: S2-S14.

Gupta, GP., Massagué, J. 2006. Cancer Metastasis: Building a framework. *Cell*. Vol. 127: 679-695.

Hajjar, KA., Hammel, NM. 1990. Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265: 2908-2916.

Higginson, J. 1993. Environmental carcinogenesis. *Cancer*. Vol. 72: 971-977.

Howard, BA., Gusterson, BA. 2000. Human breast development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. Vol. 5: 119-135.

Irigoyen, JP. Muñoz-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M., Nagamine, Y. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cellular and molecular life sciences*. Vol. 56: 104-132.

Józkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Cisowski, J., Weigel, G., Dulak, J. 2003. Prostaglandin-J(2) upregulates expression of matrix metalloproteinase-1 independently of activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 50: 677- 689.

Karamisheva, AF. 2008. Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 73: 751-762.

Kato, N., Funahashi, H., Ando, K., Takagi, H. 1996. Suppressive effect of iodine preparations on proliferation of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *Journal of Surgical Oncology*. Vol. 61: 209-213.

Keller, H., Givel, F., Perroud, M., Wahli, W. 1995. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid. *Molecular Endocrinology*. Vol. 9: 794-804.

Kelsey, JL., Gammon, MD. 1991. The epidemiology of breast cancer. *Journal of the American Cancer Society*. Vol. 41: 146-165.

Kessler, J. 2004. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast Journal*. Vol. 10:328-336.

Kjaergaard, M., Hansen, LV., Jacobsen, B., Gardsvoll, H., Ploug, M. 2008. Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR). *Frontiers in Bioscience*. Vol. 13: 5441- 5461.

Knaul, FM., Lozano, R., Arreola-Ornelas, R., Gómez-Dantes, H. 2009. México: Numeralia del cáncer de mama. Tómatelo a pecho. <http://www.tomateloapecho.org.mx/materiales%20difusion.html>.

Knaul, FM., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, R., Langer, A., Frenk, J., 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive health matters*. Vol. 16(32): 113-123.

Konokoglu, D., Turhan, MS., Celik, V., Turna, H. 2007. Relation of serum vascular endothelial growth factor as an angiogenesis biomarker with nitric oxide & urokinase-type plasminogen activator in breast cancer patients. *The Indian Journal of Medical Research*. Vol. 125: 747-751.

Köhrmann, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J., Anacker, J. 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer Journal*. Vol. 9: 188-208.

Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F., Gallagher, WM. 2007. Multi- autor Review Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 64: 3161- 3184.

Li, L., Lu, Y. 2010. Inhibition of Hypoxia-Induced Cell Motility by p16 in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Journal of Cancer*. Vol. 1: 126-135.

MacMahon, B., Cole, TM., Lin, M., Mirra, AP., Ravnihar, B., Salber, EJ., Valaoras, VG., Yuasa, S. 1970. Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol. 43: 209-221.

Mallon, E., Pinchas, O., Nasiri, N., Blain, I., Howard, B., Gusterson, B. 2000. The Basic pathology of human breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 5: 139-163.

Mazar, A. 2008. Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. Vol. 14: 5649-5655.

Mueller, MD., Vigne, JL., Minchenko, A., Lebovic, DI., Leitman, DC., Taylor, RN. 2000. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 97: 10972-10977.

Mustafa, A., Kruger, WD. 2008. Suppression of tumor formation by a cyclooxygenase-2 inhibitor and a Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in an in vivo mouse model of spontaneous breast cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol. 14: 4935-4942.

Neve, RM., Chin, K., Fridlyand, J., Baehner, FL., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, JP., Tong, F., Speed, T., Spellman, PT., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, NJ., Kuo, WL., Stilwell, JL., Pinkel, D., Albertson, DG., Waldman, FM., McCormick, F., Dickson, RB., Johnson, MD., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, JW. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*. Vol. 10: 515-527.

Núñez-Anita, RE. 2010. Participación de los receptores que activan la proliferación de peroxisomas en el efecto antineoplásico del yodo en la glándula mamaria. Querétaro. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. 8-25.

Núñez-Anita, RE., Arroyo-Helguera, O., Cajero-Juárez, M., López-Bojorquez, L., Aceves, C. 2009. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins, and other lipids Mediators*. Vol. 89:34-42.

Nussenbaum, F., Herman, I. 2010. Tumor angiogenesis: Insights and innovations. *Journal of oncology*. Vol. 2010: 1-24.

- Ochoa, AL., Mitchner, NA., Paynter, CD., Morris, RE., Ben-Jonathan, N. 2000.** Vascular endothelial growth factor in the rat pituitary: Differential distribution and regulation by estrogen. *The Journal of endocrinology*. Vol. 165: 483-492.
- Oftedal, OT. 2002.** The mammary gland and its origin during its synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 7: 225-252.
- Parker, SL., Tong, T., Bolden, S., Wingo, P. 1996.** Cancer statistics. *Cancer Journal*. Vol. 46: 5-27.
- Papadaky, I., Mylona, E., Giannopoulou, I., Markaky, S., Keramopoulos, A., Nacopoulou, L. 2005.** PPAR expression in breast cancer: Clinical value and correlation with ER. *Histopathology*. Vol 46: 37-42.
- Peaker, M. 2002.** The mammary gland in mammalian evolution: A brief commentary on some of the concepts. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol. 7: 347-353.
- Peeters, LL., Vigne, JL., Tee, MK., Zhao, D., Waite, LL., Taylor, RN. 2006.** PPAR gamma represses VEGF expression in human endometrial cells: implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis*. Vol. 4: 373-379.
- Peña-Sendra, E. 2001.** Sistema fibrinolítico, plasmina y metaloproteasas en la arteriosclerosis. Barcelona. Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Departamento de Fisiologia. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biologia. 58-63.
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton DF., Evans, C., Deacon, J., Stratton, MR. 1999.** Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 91: 943-949.
- Pisarev, MA., Gartner, R. 2000.** Werner & Ingbar's: The Thyroid. A fundamental and clinical text. 8th edition. LIPPINCOT WILLIAMS & WILKINS: 85-90.
- Plow, EF., Miles, LA. 1990.** Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell Differentiation and Development*. Vol 2: 293-298.
- Rao, J. 2003.** Molecular mechanisms of glioma metastasis: the role of proteases. *Nature Reviews. Cancer*. Vol. 3: 489-501.

Rao, DN., Desai, PB., Ganesh, B. 1996. Epidemiological observation on cancer of the esophagus – a review of Indian studies. *Indian Journal of cancer*. Vol. 33: 55-75.

Rijken, DC. 1995. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillière' s Clinical Haematology*. Vol. 8: 291-312.

Rodríguez-Fragoso, L., Jurado-Leon, FR., Reyes-Esparza, JA. 2000. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. Vol. 46: 33-46.

Ross, MH., Reith, EJ. 1985. *Histology. Text and Atlas*. 1^{ra} edición. Harper International Edition, NY, USA. 693-698.

Rossi, M., Colecchia, D., Iavarone, C., Strambi, A., Piccioni, F., Verroti di Pianella, A., Chiariello, M. 2010. Extracellular signal-regulated kinase 8 (Erk8) controls estrogen-related receptor α (ERR α) cellular localization and inhibits its transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 8: 8507-8522.

Rösner, H., Torremante, P., Möller, W., Gärtner, R. 2010. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Experimental and Clinical. Endocrinology & Diabetes*. Vol. 117: 1-10.

Ruhrberg, C. 2003. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. Vol. 25: 1052-1060.

Russo, J., Russo, IH. 1997. Role of differentiation in the pathogenesis and prevention of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. Vol. 4: 7-21.

Saéz, E., Rosenfeld, J., Livolsi, A., Olson, P., Lombardo, E., Nelson, M., Banayo, E., Cardiff, RD., Izpisua-Belmonte, JC., Evans, RM. 2004. PPAR gamma signaling exacerbates mammary gland tumor development. *Genes & development*. Vol. 18: 528-540.

Santisteban, J. 2001. Curso de lactancia materna. Enlace Hispano Americano de Salud-Perú.
<http://www.upch.edu.pe/ehas/pediatria/lactancia%20materna/Clase%20301%20-%2010.htm>.

Sawai, H., Liu, J., Reber, HA., Hines, OJ., Eilb, G. 2006. Activation of peroxisome proliferator receptor γ decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system. *Molecular Cancer Research*. Vol. 4: 160-167.

Senger, DR., Galli, SJ., Dvorak, AM., Peruzzi, CA., Harvey, VS., Dvorak, HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. Vol. 219: 983-985.

Shih, MI., Herly, M. 1994. Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *In Vivo*. Vol. 8: 113-123.

Shrivastava, A., Tiwari, M., Sinha, RA., Kumar, A., Balapure, AK., Bajpai, VK., Sharma, R., Mitra, K., Tandon, A., Godbole, MM. 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving mitochondria-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281: 19762-19771.

Smith, HW., Marshall, CJ. 2010. Regulation of cell signaling by uPAR. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Vol. 11: 23-36.

Simon, DI., Rao, NK., Xu, H., Wei, Y., Majdic, O., Ronne, O., Kobzik, L., Chapman, HA. 1996. Identification of an urokinase receptor-integrin interaction. Promiscuous regulation of integrin function. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275: 10228-10234.

Smyth, PP. 2003. Role of iodine in antioxidant defense in thyroid and breast disease. *Biofactors*. Vol. 19: 121-130.

Soriano, O., Delgado, G., Anguiano, B., Petrosyan, P., Molina-Servín, ED., Gonsebatt, ME., Aceves, C. 2011. Antineoplastic effect of iodine and iodide in DMBA-induced mammary tumors. Association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocrine Related Cancer*. En prensa.

Stepanova, VV., Tkachuk, VA. 2002. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 67: 127-138.

Sternlicht, MD. 2005. Key stages in mammary gland development. The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*. Vol. 8: 201-212.

Streuli, C. 2002. Maspin is a tumour suppressor that inhibits breast cancer tumour metastasis in vivo. *Breast Cancer Research*. Vol. 4: 137-140.

Stump, DC., Kieckens, L., De Cock, F., Collen, D. 1987. Pharmacokinetics of single chain forms of uPA. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 242: 245-250.

Suh, N., Wang, Y., Williamson, C., Risingsong, R., Gilmer, T., Willson, T., Sporn, M. 1999. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Research*. Vol. 59: 5671-5673.

Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H. 2006. Peroxisome proliferator activated receptor γ in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer* 13: 233-250.

Szif, M., Pakneshan, P., Rabbani, SA. 2004. DNA methylation and breast cancer. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 68: 1187-1197.

Tseng, YL., Latham, KR. 1984. Iodothyronines: oxidative deiodination by hemoglobin and inhibition of lipid peroxidation. *Lipids*. Vol. 19: 96-102.

Vega-Riveroll, L., Mondragon, P., Rojas-Aguirre, J., Delgado, G., Gonzalez-Cedillo, F., Romero-Romo, J., Hernández-Pando, R., Aceves, C. 2010. Impaired Nuclear Translocation of Estrogen Receptor Alfa Could Be Associated with the Antineoplastic Effect of Iodine in Premenopausal Breast Cancer. *San Antonio Breast Cancer symposium*. Texas, USA: 8-12.

Venturi, S., Venturi, M. 1999. Iodine, thyroid and stomach carcinogenesis: evolutionary story of a primitive antioxidant? Letter to the editor. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 140: 371-372.

Veeravalli, KK., Chetty, C., Ponnala, S., Gondi, CS., Lakka, SS., Fassett, D., Klopfenstein, JD., Dinh, DH., Gujrati, M., Rao, J. 2010. MMP-9, uPAR and cathepsin B silencing downregulate integrins in human glioma xenograft cells in vitro and in vivo in nude mice. Vol. 5: 1-15.

Visual dictionary online. 2011. <http://visual.merriam-webster.com/human-being/anatomy/breast.php>

Visvader, JE. 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development*. Vol. 23: 2563-2577.

Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, EN., Moore, DH., Meli, S., Gasparini, G. 1992. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 84: 1875-1887.

Weigelt, B., Peterse, JL., van't Veer, LJ. 2005. Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nature reviews Cancer*. Vol. 5: 591- 602.

Wogan, GN., Hecht, SS., Felton, JS., Conney, AH., Loeb, LA. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. Vol. 14: 473-486.

Yin, Y., Huang, H., Zeng, X., Kopelovich, L., Glazer, RI. 2009. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma increases estrogen receptor-dependent tumor specification. *Cancer Research*. Vol. 69: 687-694.

Yu, W., Kim, J., Ossowski, L., 1997. Reduction in surface Urokinase Receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *Journal of Biological Cells*. Vol. 137: 767-777.

Zetter, BR. 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman. To cancer research. *Journal Annals of Surgery*. Vol. 8: 647-654.

Zhang, L., Zhao, Z., Ru, G., Ma, J. 2006. Correlative studies on uPA mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer. Vol. 12: 3970-3976.