



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Rol de los receptores muscarínicos en la tumorigénesis
mamaria**

Tesina de Maestría

Autor: Lic. Paola Martínez Pulido

Directora: Dra. María Elena Sales

Directora asociada: Dra. María Gabriela Lombardi

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

Facultad de Medicina - UBA

2015

Agradecimientos

A mi mamá, mi hermana y Juli, por el apoyo y todo el amor que me brindaron durante la realización de esta tesis.

A Gabi por todas sus enseñanzas durante este tiempo, su ayuda durante muchas noches y su amistad.

A Male por darme un espacio y oportunidad en su laboratorio, por los consejos y la revisión de la tesis.

A Mari por su valiosa ayuda con los ratones y a todos los compañeros del laboratorio: Ani, Ale y Agus por la buena onda.

Al Dr. Roberto Diez por brindarnos un espacio en la 2ª cátedra de Farmacología y por todas las noches que pasaba a saludar.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET.

Abreviaturas

Ac: acetilcolina

AC: adenilil ciclasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ATCC: Asociación Americana de Cultivo de Tejidos

CAM: calmodulina

CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

4-DAMP: 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina

DMEM: medio de cultivo mínimo esencial

D.O.: densidad óptica

E.S.: Error estándar

EDTA: ácido etilen diamino tetraacético

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

G_{αi}: subunidad α de la proteína G_i

G_{αq}: subunidad α de la proteína G_q

GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína verde fluorescente

IP₃: inositol trisfosfato

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasa

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

PBS: solución salina tamponada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PKC: proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RAPG: receptor asociado a proteína G

RE: receptor de estrógenos

N: nicotínico

M: muscarínico

SCnN: sistema colinérgico no neuronal

SDS: dodecil sulfato de sodio

SFB: suero fetal bovino

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

RVEGF: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

Abreviaturas	3
Índice	6
Introducción	9
1. El proceso de progresión tumoral.....	10
1.1. El crecimiento tumoral	11
1.2. Angiogénesis	11
1.3. Invasión.....	12
1.4. Proceso metastásico.....	13
1.4.1. Circulación.....	14
1.4.2. Arresto y extravasación	14
1.4.3. Colonización del órgano secundario.....	15
2. El cáncer de mama.....	15
3. Sistema colinérgico no neuronal	16
3.1. Receptores muscarínicos	17
3.1.1. Estructura.....	17
3.1.2. Vías de señalización	18
3.1.3. Receptores muscarínicos y cáncer.....	20
3.2. Antecedentes de nuestro laboratorio	21
Hipótesis y Objetivo General	23
Materiales y Métodos	25
1. Generación de líneas celulares mamarias transfectadas establemente con receptores muscarínicos ...	26
1.1. Cultivo celular	26
1.2. Generación de líneas celulares estables.....	27
2. Evaluación de la expresión de los receptores muscarínicos.	28

Índice

2.1.	Análisis de la expresión de ARN mensajero.....	28
2.1.1.	Extracción del ARN.....	28
2.1.2.	Síntesis del ADN complementario y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	29
2.2.	Análisis de la expresión proteica de los receptores muscarínicos	30
2.2.1.	Western blot.....	30
2.2.2.	Inmunocitoquímica.....	32
2.2.3.	Citometría de flujo.....	32
3.	Funcionalidad de los receptores muscarínicos en las líneas celulares	33
3.1.	Citometría de flujo para el análisis del ciclo celular	33
3.2.	Ensayo de migración en herida	34
3.3.	Expresión de la metaloproteinasa-9	34
3.3.1.	Preparación de la muestra	34
3.3.2.	Western blot.....	35
3.4.	Ensayo de angiogénesis en vivo	35
3.5.	Expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular A	36
3.5.1.	Preparación de la muestra	36
3.5.2.	Western blot.....	36
3.6.	Crecimiento tumoral	37
4.	Análisis estadístico	37
5.	Soluciones.....	37
	Resultados.....	39
1.	Generación de líneas celulares mamarias que expresan receptores muscarínicos	40
2.	Evaluación de la expresión de los receptores muscarínicos en las líneas celulares generadas	41
2.1.	Detección de los ARNm de los receptores muscarínicos	41
2.2.	Expresión proteica de los receptores muscarínicos.....	42
3.	Evaluación de la funcionalidad de los receptores muscarínicos en las líneas celulares generadas	45

Índice

3.1.	Efecto de la activación colinérgica sobre la proliferación celular	45
3.2.	Efecto de la activación colinérgica sobre la migración celular	47
3.3.	Expresión de metaloproteínasa-9	49
3.4.	Angiogénesis inducida por las células generadas y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A	51
3.5.	Crecimiento tumoral	52
Discusión		55
Conclusiones		63
Bibliografía		65

INTRODUCCIÓN

1. El proceso de progresión tumoral

La división de células normales está estrictamente regulada y responde a las necesidades específicas del organismo. Cuando surgen mutaciones genéticas en más de un gen involucrado en la regulación del ciclo celular, la célula comienza a crecer y a dividirse en forma descontrolada [1]. Durante el desarrollo tumoral se observa una tendencia en la población de células transformadas a aumentar la tasa de duplicación y a escapar de los mecanismos locales de control.

El cáncer es una enfermedad compleja que presenta múltiples tipos de interacciones biológicas lo que genera variaciones en su descripción biológica y conduce al estudio de esta enfermedad en el contexto molecular, celular y fisiopatológico.

Durante la tumorigénesis se pueden distinguir distintas etapas: crecimiento del tumor primario acompañado de angiogénesis, invasión local de las células del tumor, intravasación, circulación, extravasación y crecimiento del tumor secundario (Figura 1) [2].

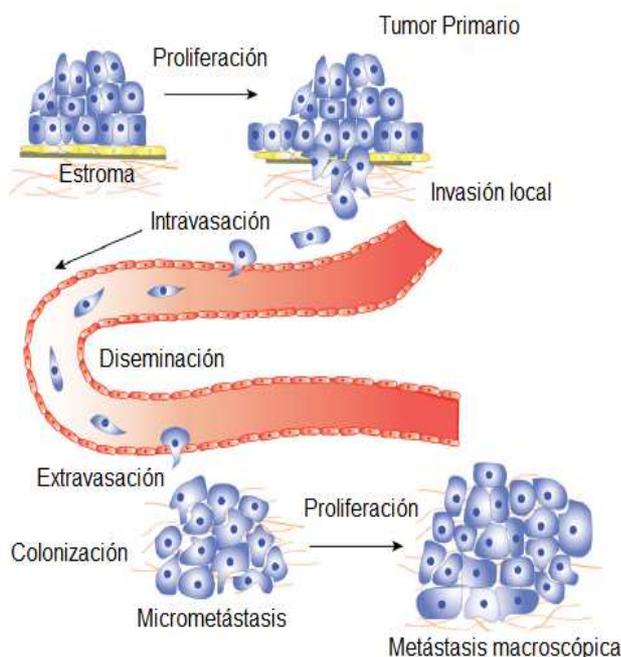


Figura 1. Durante la tumorigénesis se producen mutaciones que alteran la homeostasis del tejido en un contexto inflamatorio que promueve la transformación maligna acompañada de neovascularización. Adaptado de Saxena y Christofori., 2013.

1.1. *El crecimiento tumoral*

El ciclo de vida de una célula normal comprende dos etapas: la interfase y la división celular o fase. La primera consta de tres períodos: G1, S o síntesis y G2. Durante el período S se produce la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). El intervalo que precede a la síntesis se denomina G1 y el que sigue, G2. Luego del período G2, la célula se divide por mitosis y las células resultantes inician el ciclo en G1. De esta manera el ciclo celular comprende una sucesión de los períodos G1, S, G2 y mitosis. Algunas células pueden permanecer por lapsos prolongados en un período no proliferativo denominado G0. [3]

Existen dos mecanismos por los cuales las células evitan la proliferación descontrolada: el arresto del ciclo celular en G0 /G1 y la apoptosis. Las células tumorales se dividen sin control debido en parte, a que presentan insensibilidad a las señales antiproliferativas. La capacidad del tumor para aumentar su número de células depende tanto del incremento de la tasa de duplicación como de la disminución de la tasa de mortalidad. La resistencia a la apoptosis a través de la modulación de la expresión de los receptores de muerte, la disponibilidad de sus ligandos y el incremento de la expresión de proteínas antiapoptóticas es una característica común a todos los tumores.

1.2. *Angiogénesis*

El crecimiento del tumor a partir de unos pocos milímetros requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos para mejorar el aporte de nutrientes y oxígeno. Este proceso se denomina neovascularización o angiogénesis [4]. En condiciones fisiológicas, la angiogénesis está estrictamente regulada mediante el equilibrio de factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Durante la tumorigénesis, un cambio en el balance a favor de los factores proangiogénicos conduce

a un crecimiento inadecuado de los vasos sanguíneos. Estos son morfológicamente y funcionalmente diferentes a los vasos normales presentando un flujo intermitente. Debido a esto, el tejido tumoral tiene un aporte de oxígeno y nutrientes menor que un tejido normal, generándose regiones de hipoxia y estrés metabólico [5].

Existen alrededor de 30 factores proangiogénicos conocidos, pero la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que está compuesta por cuatro miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D juega un papel central. Cada una de estas proteínas contiene una secuencia señal que es clivada durante la biosíntesis, además mediante “splicing” alternativo de sus correspondientes pre-ARNm se generan productos del VEGF-A y VEGF-B [6]. Se ha encontrado que el VEGF-A está sobreexpresado en la mayoría de los carcinomas sólidos tanto en humanos como en animales. El incremento en la expresión de VEGF-A y la inducción de la angiogénesis es común en algunas lesiones premalignas y va aumentando en paralelo con la malignidad.

1.3. *Invasión*

La invasión es un proceso complejo por el cual un tumor se disemina localmente y a distancia. Las células tumorales migran a través de la membrana basal y dentro del estroma circundante. El microambiente del tumor está formado por una red de proteínas de la matriz extracelular (MEC) inmersas en fluido intersticial y una serie de células asociadas entre las que se incluyen fibroblastos, células derivadas de la médula ósea, células endoteliales y células inmunes infiltradas. Estas células estromales remodelan la MEC y proveen señales químicas y mecánicas a las células del tumor [7].

Los pasos iniciales de la invasión local incluyen: la activación de vías de señalización que controlan la dinámica del citoesqueleto y una pérdida de la función y/o de la expresión de moléculas de

adhesión en las células tumorales que, como consecuencia aumentan su movilidad y pueden desprenderse del tumor primario. La alteración en la expresión de genes supresores de tumor y oncogenes causa que células tumorales activen componentes del estroma adyacente e induzcan la liberación de citoquinas, factores de crecimiento y deposición de MEC dentro del estroma del tumor para crear un microambiente óptimo para el crecimiento y la diseminación. En la MEC se producen cambios en el contenido de proteínas tales como colágeno I y IV, fibronectina y laminina lo que lleva a la remodelación de la misma. Esto va acompañado de un reordenamiento de la MEC y de la membrana basal debido a la degradación por enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas (MMP), favoreciendo la migración de las células tumorales [8].

La actividad de las MMP se encuentra regulada a nivel transcripcional y postranscripcional [9]. Su expresión se correlaciona con un comportamiento invasivo y metastásico [10]. Se demostró que en la formación de metástasis, la MMP-2 y la -9 son responsables de la capacidad invasiva de los tumores y se relacionan con la malignidad y el mal pronóstico en humanos [11].

La MMP-9 digiere el colágeno desnaturalizado, gelatina y laminina, los principales componentes de la membrana basal. Esta enzima se secreta como una proenzima inactiva, que es clivada en el medio extracelular. La detección de la MMP-9 en suero o plasma se correlaciona con la invasividad y el estadio tumoral, por lo que su detección resulta útil para predecir la progresión de la enfermedad [11].

1.4. *Proceso metastásico*

La principal causa de muerte en los pacientes con cáncer es el desarrollo de metástasis. Este proceso implica una serie de pasos secuenciales e interrelacionados que se producen luego de la

transformación y el crecimiento inicial del tumor [12]. La metástasis se genera cuando las células tumorales cruzan la membrana basal y la pared endotelial, diseminándose a través de los vasos para colonizar órganos distantes [13]. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de alguno de los pasos antes descritos previene la formación de metástasis [14] [15].

1.4.1. Circulación

Una vez que las células tumorales penetran en los vasos sanguíneos y/o linfáticos circulan a través de ellos. En el torrente circulatorio deben sobrevivir al estrés provocado por daños físicos debido a las fuerzas hemodinámicas y al ataque por parte de células del sistema inmune sobre todo de los linfocitos T citotóxicos. Para evitar estos daños, las células tumorales en circulación pueden asociarse formando agregados homotípicos o interactuar con plaquetas formando agregados heterotípicos [16].

1.4.2. Arresto y extravasación

Las células tumorales se establecen en los lechos capilares de órganos distantes específicos para cada tipo tumoral denominado órgano blanco. La infiltración en los órganos blanco es influenciada, en parte, por patrones de circulación. Por ello los órganos secundarios más frecuentes para el desarrollo de metástasis son el hígado, el pulmón, el cerebro y el hueso [17].

El arresto de las células tumorales en los vasos de menor calibre puede deberse a causas mecánicas o a la adhesión específica a las células del endotelio facilitado por la estructura del complejo heterotípico. Luego de adherirse a las células endoteliales del capilar, las células tumorales pueden proliferar en el lumen de los vasos sanguíneos pero la mayoría extravasa al parénquima del órgano blanco por mecanismos similares a los que operan durante la invasión. Una estrategia común es la

expresión de genes que regulan la permeabilidad, como el VEGF. Una vez en el sitio secundario, las células tumorales pueden permanecer latentes por largos períodos de tiempo, a veces por años [12].

1.4.3. Colonización del órgano secundario

Una vez en el órgano blanco, las células tumorales que poseen receptores de superficie adecuados pueden responder a factores de crecimiento autócrinos, parácrinos o endócrinos y proliferar en el parénquima de dicho órgano formando colonias. Para esto necesitarán desarrollar nuevamente una red vascular que sustente el aporte de nutrientes y oxígeno necesarios para el crecimiento de la masa metastásica [18].

2. El cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres y ocupa uno de los primeros lugares entre las causas de defunción en pacientes oncológicos a nivel mundial. La República Argentina presenta la segunda tasa de mortalidad (21,8 por 100000) después de Uruguay, lo que se traduce en alrededor de 5400 muertes por año [19].

A pesar de los avances significativos logrados en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, aún hay aspectos parcialmente resueltos relacionados con: la prevención, el diagnóstico, la recurrencia, la progresión del tumor y la resistencia a las distintas terapias. Resolver estas cuestiones es complejo porque el cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea a nivel molecular y clínico. Esta extensa heterogeneidad intra e intertumoral puede estar dada por

diferencias en las células de origen o por los eventos genéticos y/o epigenéticos que le dieron lugar al subtipo tumoral [20]. Existen varios factores relacionados con un aumento del riesgo de presentar cáncer de mama, como causas hereditarias, nuliparidad, menarquia prematura, edad avanzada, obesidad y consumo de alcohol [21].

3. Sistema colinérgico no neuronal

Aun cuando se considera a la acetilcolina (Ac) como un neurotransmisor clásico del sistema nervioso, se sabe que es una molécula filogenéticamente conservada que se encuentra distribuida en células eucariotas y procariotas. Por esto, es probable que evolutivamente haya tenido un rol previo como citotransmisor. En la actualidad, se conoce que además de ser sintetizada en neuronas, la Ac se encuentra ampliamente expresada en células no neuronales reforzando su importancia en la regulación de funciones celulares básicas como la proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión, organización del citoesqueleto, contacto célula-célula, funciones inmunes, secreción y reabsorción de fluidos [22]. Se ha sugerido que la Ac tiene un rol como intermediario en la interacción de las células no neuronales con el ambiente externo, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas [23]. Por otra parte, un aumento de la producción de Ac ha sido implicado en la etiopatogenia de distintas enfermedades, como las inflamatorias y el cáncer [24].

A finales de los '90 se definió la existencia del sistema colinérgico no neuronal (SCnN) [25]. Está conformado por la Ac, la enzima colina acetiltransferasa, que la sintetiza a partir de colina y acetil

coenzima A, la enzima acetilcolinesterasa que la degrada en colina y ácido acético y los receptores muscarínicos (M) y nicotínicos (N) que son blanco de la Ac [26].

3.1. *Receptores muscarínicos*

3.1.1. Estructura

En los mamíferos se han identificado cinco subtipos diferentes de receptores M: M₁-M₅, cada receptor es el producto de un gen diferente [27][28]. Los receptores M pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana, los cuales activan vías de transducción de señales a través de su interacción con la proteína G, por esto también se denominan receptores asociados a proteína G (RAPG) [29]. Poseen una cadena glicoproteica con dominios transmembrana hidrofóbicos conectados por bucles hidrofílicos extra e intracelulares. El extremo amino terminal del receptor está localizado en el lado extracelular de la membrana plasmática y contiene potenciales sitios de glicosilación. El extremo carboxilo terminal está ubicado en la cara citoplasmática de la membrana y contiene un residuo de cisteína altamente conservado en toda la familia de RAPG (Figura 2).

Los cinco subtipos de receptores M exhiben una gran variabilidad en el extremo amino terminal y en la porción central del tercer bucle intracelular. La selectividad de los subtipos está determinada por los aminoácidos localizados dentro del segundo bucle intracelular y la porción próxima a la membrana del tercer bucle intracelular[30].

Introducción

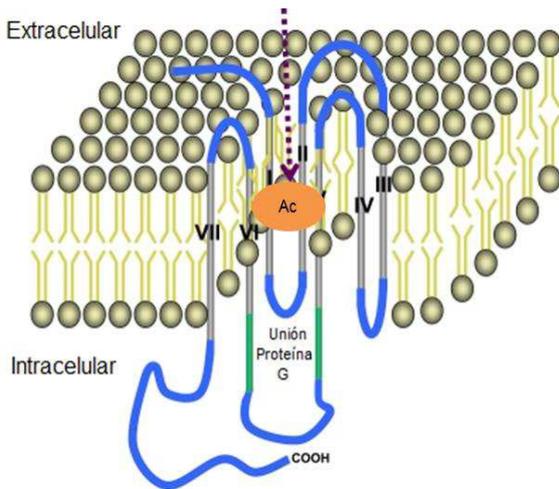


Figura 2. Esquema general de un receptor muscarínico. Está compuesto por siete dominios transmembrana (gris) conectados por tres bucles intracelulares y tres extracelulares (azul). El sitio de unión a la proteína G está localizado en la unión del tercer bucle intracelular y el sexto dominio transmembrana (verde). El sitio de unión de la acetilcolina (Ac) está localizado en una hendidura entre los dominios transmembrana (círculo naranja). Adaptado de Shah y col., 2009.

3.1.2. Vías de señalización

Los receptores M se activan por acción de la Ac o del agonista farmacológico sintético, no biodegradable carbacol y el efecto de estos agonistas se bloquea, en forma no selectiva, por la atropina.

Cuando un agonista se une a estos receptores se produce el acoplamiento de los mismos a una molécula transdutora que es la proteína G. Esta proteína está compuesta por tres subunidades: α , β y γ que forman un heterotrímero. Las proteínas G varían de acuerdo con el tipo de subunidad α que las componen y su activación regula la producción de segundos mensajeros y la apertura de canales iónicos. Las proteínas que contienen una subunidad α_s son activadoras de la enzima adenilil ciclasa (AC); si la subunidad es $\alpha_{i/o}$ son inhibidoras de la actividad de la AC y si es $\alpha_{q/11}$ son activadoras de la fosfolipasa C (PLC) [31].

Clásicamente la activación de los subtipos M_1 , M_3 y M_5 produce el acoplamiento del receptor a la proteína $G\alpha_{q/11}$ activando a la PLC y ésta induce la hidrólisis de 4,5-bifosfato de inositol, generando 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 difunde y al unirse a receptores específicos localizados en el retículo endoplasmático, promueve la liberación de Ca^{2+} al citosol. La

unión de éste a la calmodulina (CAM) activa enzimas tales como la óxido nítrico sintasa (NOS) calcio-dependiente de la cual existen dos isoformas NOS1 y NOS3. Por su parte, el DAG produce la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Figura 3)[31][32].

La activación de los subtipos M_2 y M_4 produce el acoplamiento de los mismos a la proteína $G_{i/o}$ y la inhibición de la actividad de la AC, lo que reduce la producción de 3',5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). También prolongan el tiempo de apertura de los canales de K^+ y de Na^+ e inhiben la apertura de los canales de Ca^{2+} (Figura 3) [31][32].

En células de mamíferos la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G, puede activar a la PLC β y desencadenar el metabolismo de fosfatidilinositoles; así como participar de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) a través de la activación de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) [33]. Además pueden activar canales de K^+ y a la AC[34].

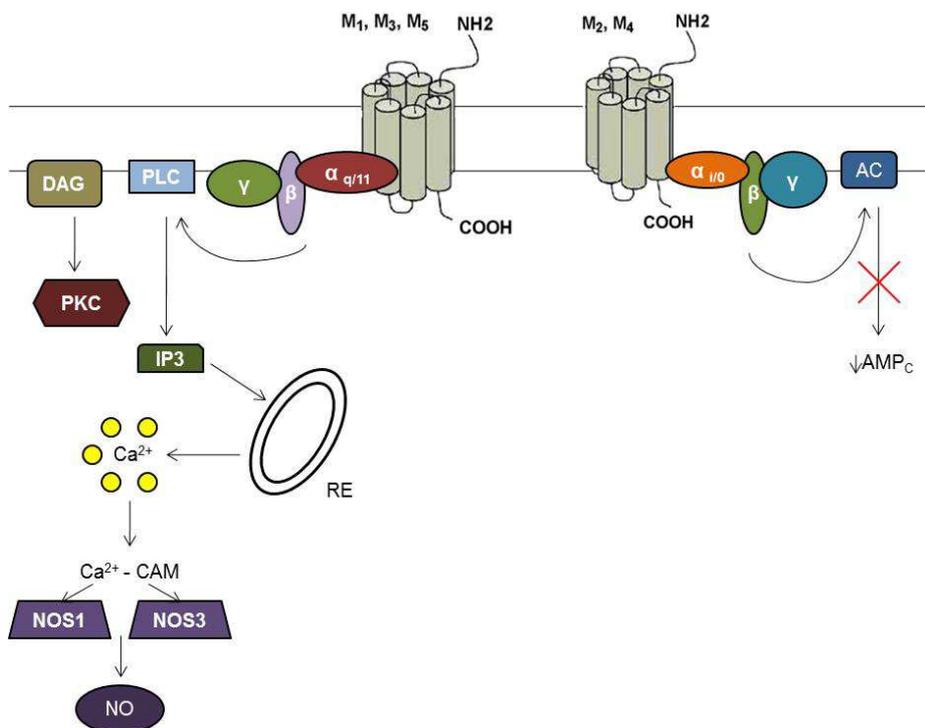


Figura 3. Vías de señalización de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos (M). PLC: fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol, IP₃: inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C, NOS: óxido nítrico sintasa. RE: retículo endoplasmático. AC: adenilil ciclasa, AMPc: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina. NO: óxido nítrico.

3.1.3. Receptores muscarínicos y cáncer

Se ha demostrado que los receptores M se encuentran presentes en tejidos malignos de distintos orígenes. En este sentido, se ha reportado que estos receptores se expresan tanto en células leucémicas como en tumores sólidos de páncreas, estómago, ovario, útero, próstata y cerebro [30]. Asimismo, se ha descrito su expresión en la mayoría de los tumores derivados de células epiteliales y endoteliales los cuales también secretan Ac que estimula la proliferación celular actuando como un factor de crecimiento autócrino. Para los tumores que no sintetizan Ac, la activación de los receptores M puede ser constitutiva o puede deberse a la presencia de Ac neuronal o glandular [35].

La activación de los subtipos 1 y 3 de los receptores M promueve la proliferación, la supervivencia, la migración y la angiogénesis en líneas celulares de cáncer de colon [36].

En cáncer de pulmón, la Ac y sus análogos estimulan la proliferación celular vía receptor M_3 , mientras que los antagonistas colinérgicos atenúan este efecto [30].

También se observó que los receptores M son expresados en células tumorales de próstata tanto humanas como murinas y se ha reportado que la estimulación de los mismos con el agonista colinérgico carbacol aumenta la proliferación celular mientras que el tratamiento con antagonistas colinérgicos la atenúa. Con este modelo se demostró que la proliferación celular esta mediada por el subtipo M_3 ya que el tratamiento con 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP) el antagonista específico para este subtipo disminuía la misma [37].

En la tabla 1 se resume la información disponible sobre la detección de receptores M en células tumorales humanas y los principales efectos biológicos mediados por su activación.

Línea celular tumoral	Expresión de receptores M	Efecto de la activación de los receptores M	Reducir la expresión del receptor M atenúa la acción (in vitro)
Cerebro	X	Proliferación	Si
Mama	X	Proliferación, angiogénesis	Si
Colon	X	Proliferación, sobrevida	Si
Pulmón	X	Proliferación	Si
Próstata	X	Proliferación	Si
Piel	X	Migración	Si

Tabla 1. Expresión de los receptores muscarínicos (M) y activación en cáncer. Tabla modificada de Shah, N. y col., 2009

3.2. Antecedentes de nuestro laboratorio

Demostramos que las líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos: LM2, LM3 y LMM3 expresan todos los subtipos de receptores M. La activación de dichos receptores estimula la proliferación celular *in vitro*, el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo* [38]. Asimismo, la línea celular LMM3, derivada de una metástasis pulmonar de LM3, expresa 50 veces más receptores M, lo que podría vincularse con la invasividad y la agresividad de este tumor. También se observó que la estimulación de los receptores M con carbacol en estas células aumenta la proliferación por la activación del subtipo M₃ ya que el tratamiento previo con el antagonista selectivo de este subtipo, pf-HHSiD revierte el efecto proliferativo [39].

Introducción

Por otro lado, describimos que la activación de los receptores M en estas células tumorales estimula la respuesta neovascular mediada por VEGF-A *in vivo* [39].

Además comprobamos que los receptores M se expresan en homogenatos tumorales de muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes con cáncer de mama, mientras que están ausentes en tejido mamario normal. También observamos un incremento en la expresión de receptores M que está vinculado al grado tumoral y a la capacidad invasiva de los tumores mamarios [40].

También demostramos que células de la línea tumoral de mama humana MCF-7, derivada de un adenocarcinoma estrógeno-dependiente, expresan los subtipos M_3 y M_4 y que la activación de estos receptores con el agonista carbacol aumenta la proliferación celular de manera concentración- dependiente. El tratamiento con el antagonista 4-DAMP, selectivo para los receptores M_3 , bloqueó totalmente la acción del carbacol [41].

Por otra parte demostramos que la activación muscarínica aumentó tanto la migración de las células MCF-7 como la actividad de la MMP-9 secretada por las mismas. El pretratamiento con atropina así como con los antagonistas selectivos de los receptores M_3 y M_4 , 4-DAMP y tropicamida respectivamente, revirtió los efectos de la activación muscarínica [42].

Por último, demostramos que el tratamiento de las células MCF-7 con carbacol aumentó la expresión de VEGF-A *in vitro* así como la respuesta angiogénica *in vivo* [43].

En los ensayos anteriores se utilizaron células no tumorigénicas mamarias humanas de la línea MCF-10A que no expresan los receptores M, como control [43].

Hipótesis y Objetivo General

Es sabido que en su transición hacia la malignidad una célula se ve sometida a cambios genéticos y epigenéticos. La malignización se caracteriza por la desregulación del ciclo celular, alteraciones a nivel genómico, un crecimiento de tipo invasivo, un incremento en la movilidad, quimiotaxis, cambios en la expresión de componentes de la superficie celular, la secreción de factores líticos, etc. Esta transformación es acompañada por una pérdida progresiva de la homeostasis del tejido y perturbaciones en la arquitectura tisular, culminando con la invasión de las células tumorales en el parénquima circundante y metástasis en órganos distantes. Dada la complejidad multifactorial de este proceso es de interés evaluar la contribución específica de los distintos componentes implicados en la desregulación que lleva a una célula normal a transformarse en una célula tumoral.

Teniendo en cuenta que el tejido tumoral mamario expresa receptores M que están ausentes en el tejido mamario normal y que la activación de estos receptores promueve la tumorigénesis es probable que la presencia de receptores M en células normales induzca la malignización.

Objetivos generales y específicos

- Evaluar si la transfección de los subtipos 3 y/o 4 de los receptores M en células de mama no tumorigénicas MCF-10A promueve la transformación celular hacia un fenotipo tumoral.
- Comparar la respuesta de las células transfectadas con la de las células tumorales mamarias humanas MCF-7.

Hipótesis y objetivos

- Generar clones estables que expresen los receptores M.
- Analizar el efecto de la expresión muscarínica sobre el ciclo celular.
- Cuantificar el efecto de la activación muscarínica sobre la invasión celular.
- Determinar el efecto de la activación muscarínica sobre la respuesta angiogénica y el crecimiento tumoral *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de líneas celulares mamarias transfectadas establemente con receptores muscarínicos

1.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea MCF-10A no tumorigénica, derivada del epitelio de glándula mamaria humana proveniente de la colección de la Asociación Americana de Cultivo de Tejidos (ATCC) y se obtuvieron clones transfectados establemente con los subtipos 3, 4 y 3-4 de los receptores M denominados MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄ que se cultivaron con medio Eagle modificado por Dulbecco DMEM:F-12 suplementado con hidrocortisona 0,5 mg/ml; factor epidérmico del crecimiento humano (EGFh) 10 µg/ml, insulina 5 mg/ml y 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco tres veces por semana. Las líneas celulares generadas se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con Genetecina (G418) con una concentración de 100 µg/ml y luego se mantuvieron en cultivo con una concentración de 50 µg/ml.

Además se utilizó la línea MCF-7 derivada de un adenocarcinoma de mama humano estrógeno-dependiente que expresa los receptores M₃ y M₄. Estas células se cultivaron en medio DMEM:F12 suplementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 80 µg/ml y 10% de SFB a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En todos los casos se utilizaron suspensiones celulares con una viabilidad mayor al 90%. La ausencia de micoplasma se determinó con el método de Hoechst [44].

1.2. Generación de líneas celulares estables

En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas de electroporación para lo cual se ajustaron: las condiciones de capacitancia y voltaje, el número de células y por último, la concentración de ADN.

Para la electroporación, se realizaron suspensiones de 1×10^6 y $2 \times 10^6/0,2$ ml de células MCF-10A en medio Opti-MEM. Las mismas fueron sometidas a un pulso de tipo exponencial, capacitancia de $1000 \mu\text{F}$ y en las dos suspensiones se realizó una curva de voltaje: 100, 150, 200, 250, 300 y 350V. Se encontró que en la condición de 100V la densidad celular sólo disminuyó un 40% en comparación con el control, células sin electroporar y que 1×10^6 células es la cantidad óptima para sobrevivir al proceso de electroporación.

Luego se evaluó la cantidad de ADN para lo cual utilizamos 2, 5 y $10 \mu\text{g}$ del plásmido CAG acoplado a proteína verde fluorescente (GFP)sp con las condiciones de electroporación descriptas anteriormente. La expresión de GFP permite visualizar fácilmente aquellas células que incorporaron el plásmido utilizando un microscopio de fluorescencia. Se determinó que con $5 \mu\text{g}$ de ADN plasmídico se obtuvo la mayor eficiencia de transfección. La figura 4 resume las condiciones que se utilizaron para la generación de las líneas celulares estables.

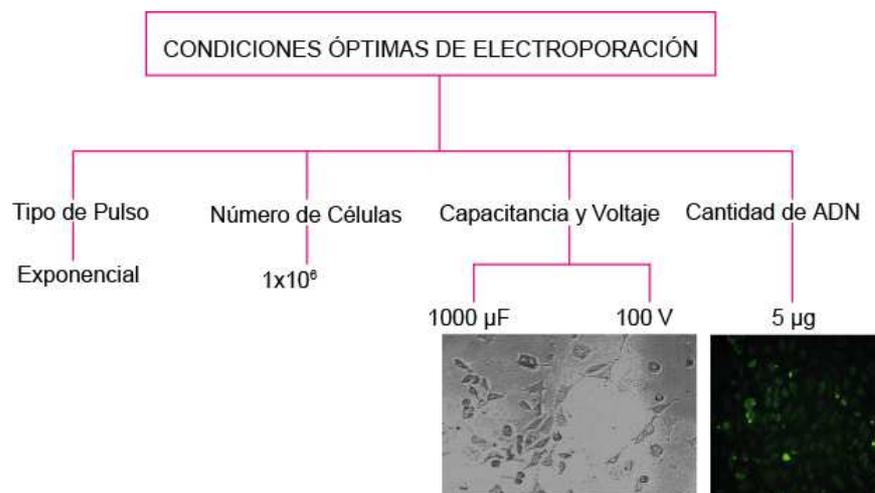


Figura 4: Esquema representativo de las condiciones de electroporación para las células MCF-10A. Se muestra el tipo de pulso, el número de células, los valores de capacitancia y voltaje y la cantidad de ADN plasmídico.

Para la selección de las células que incorporaron el plásmido del receptor M₃ y/o M₄ se utilizó la resistencia a G418. Previamente se determinó la dosis mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento de las células sin transfectar. Para ello, se sembraron 5x10⁵ células MCF-10A en placas de 6 pozos y se agregaron concentraciones crecientes de G418: 50, 100, 200, 400, 600 u 800 µg/ml y se evaluó la viabilidad celular durante 15 días para cada condición. Se estableció que 100 µg/ml es la concentración mínima de antibiótico necesaria para eliminar la totalidad de las células que no incorporaron el plásmido durante la electroporación.

2. Evaluación de la expresión de los receptores muscarínicos.

Una vez generadas las distintas líneas estables, se evaluó la presencia de los receptores M cuantificando la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de la proteína correspondiente.

2.1. Análisis de la expresión de ARN mensajero

2.1.1. Extracción del ARN

El aislamiento del ARN total de las líneas celulares se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor. Las células se amplificaron en botellas de 25 cm² a las que se les agregó 0,7 ml de TRIzol, y se lisaron directamente en la botella homogeneizando con una pipeta, e incubando 5 min a temperatura ambiente. El homogenato se traspasó a un tubo de 1,5 ml, se agregaron 0,14 ml de cloroformo y se mezcló vigorosamente durante 15 s. Después de incubar 2 ó 3 min a temperatura ambiente se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4°C y se transfirió la fase acuosa de la muestra donde se encuentra el ARN, a un tubo de 1,5 ml. El ARN fue precipitado incubando con 0,35 ml de isopropanol al 100% a temperatura ambiente durante 10 min y centrifugando 10 min a 12000 rpm a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y se reservó el precipitado que contenía el ARNm. El mismo se lavó con 0,7 ml de etanol al 75%, homogeneizando con vortex y se centrifugó durante 5 min a 7500 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 10 min. Éste se resuspendió en 50 ul de agua libre de RNAsas y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.1.2. Síntesis del ADN complementario y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) y el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se utilizó el kit SensiFAST SYBR Hi-ROX One-Step según las indicaciones del proveedor. La preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 20 µl en el cual agregamos: 10 µl de SensiFAST SYBR Hi-Rox One-Step mix 2X, 0,8 µl de cebadores “forward” y “reverse” (10 µM); 0,2 µl transcriptasa reversa; 0,4 µl del inhibidor de RNAsas y 4 µl templado (1 µg).

En la tabla 2 Se detallan las secuencias de los primers utilizados para cada gen:

Identificación		Secuencia
M ₃	Sentido	GGACAGAGGCAGAGACAGAA
	Anti-sentido	GAAGGACAGAGGTAGAGTGG
M ₄	Sentido	ATCGCTATGAGACGGTGGAA
	Anti-sentido	GTTGGACAGGAACTGGATGA
GAFDH	Sentido	CAATGACCCCTTCATTGACC
	Anti-sentido	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

Tabla 2: M₃: Receptor muscarínico 3, M₄: receptor muscarínico 4, GAFDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

La reacción de PCR se realizó utilizando el termociclador ABI-PRISM 7500 con las condiciones de amplificación indicadas en la tabla 3:

Numero de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Proceso
1	45	600	Transcripción reversa
1	95	120	Activación de la polimerasa
40	95	5	Desnaturalización del ADN
	60	20	Alineamiento/Extensión

Tabla 3. Número de ciclos, condiciones de temperatura y tiempo de los distintos procesos para la reacción de PCR.

Al finalizar, se realizó un análisis de la curva de “melting” para identificar si el producto de PCR obtenido era específico. Para lo cual realizamos un ciclo térmico de gradiente de temperatura entre 60°C y 95°C con lecturas del plato cada 0,1°C.

2.2. Análisis de la expresión proteica de los receptores muscarínicos

2.2.1. Western blot

2.2.1.1. Lisados celulares

Las células se suspendieron en buffer RIPA (ítem 5a) y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Luego se centrifugó durante 20 min a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se separó y se almacenó a -80°C. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford [45].

2.2.1.2. Electroforesis

Las muestras de proteínas obtenidas de cada línea celular se sometieron a electroforesis en minigeles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% sembrando 80 µg de proteína por calle, junto con las muestras se sembraron estándares de pesos moleculares conocidos. Las condiciones de corrida fueron 10 min a 80 V mientras las muestras pasaban el gel concentrador y después 2 h a 100 V en buffer de corrida (ítem 5b).

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, EE.UU.) por el método líquido durante 1h a 100 V en buffer de transferencia con refrigeración (ítem 5c). Para evaluar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau al 0,1% (P/V). Luego, el colorante se lavó con buffer fosfato salino (TBS) (ítem 5d) y luego tres veces durante 5 min con TBS-T (ítem 5e) y se incubaron en este buffer con 5% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación.

2.2.1.3. Inmunomarcación

Posteriormente las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos policlonales: anti-M₃ hecho en cabra y anti-M₄ hecho en conejo, diluidos 1:100 en TBS-T durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las membranas dos veces con TBS-T durante 10 min y se procedió a incubar con el segundo anticuerpo: IgG anti-cabra o anti-conejo, según correspondía conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:20000) durante 1 h con agitación continua. Después de lavar tres veces con TBS-T se revelaron las bandas por el método de quimioluminiscencia usando 1 ml de solución A (ítem 5f): solución B (ítem 5g) sobre las membranas durante 1 min. Luego estas se expusieron a una placa radiográfica de alta sensibilidad durante 20 min en oscuridad. Después de digitalizar la imagen

obtenida en la placa, la cuantificación de las bandas se realizó por densitometría usando el programa Image J. Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos se relativizaron con los valores obtenidos para las bandas de la proteína gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizada como control de carga en cada calle.

2.2.2. Inmunocitoquímica

Se sembraron 5×10^5 células de cada línea celular en placas de 6 pocillos. Después de que las células se adherieron se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS (ítem 5h).

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS-T (tween 0,05%) durante 5 min. Se realizó un bloqueó con suero de burro en una dilución 1:10 en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se incubó con anticuerpos anti-M₃ hecho en cabra y anti-M₄ hecho en conejo diluidos 1:100, durante toda la noche en cámara húmeda.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS-T durante 10 min y se agregó el anticuerpo anti-cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o anti-conejo conjugado con ficoeritrina (PE) ambos diluidos 1:10000 durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados con TBS-T durante 10 min. Por último, se incubó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 25 min a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó dos veces con PBS-T y después con agua para retirar las sales. La observación de los preparados se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon y se tomaron fotografías representativas de los preparados.

2.2.3. Citometría de flujo

Realizamos una suspensión celular de 5×10^5 células de las líneas MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A y MCF-7 las cuales fueron incubadas con anticuerpos policlonales anti-M₃ hecho en

cabra y anti-M₄ hecho en conejo durante 30 min. Luego se realizaron lavados con PBS suplementado con 2% de SFB y terminados los lavados se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-cabra FITC o anti-conejo PE durante 30 min. Finalizado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS suplementado con 2% de SFB. Por último se fijaron con paraformaldehído al 0,5%. Se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su adquisición.

3. Funcionalidad de los receptores muscarínicos en las líneas celulares

3.1. Citometría de flujo para el análisis del ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular se utilizó el agente intercalante yoduro de propidio dado que cuando interacciona con los ácidos nucleicos presenta un pico de emisión a 617 nm que se puede detectar con un FACScan. Se sembraron las células MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A y MCF-7 en placas de seis pozos y se dejaron adherir a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego fueron tratadas durante 1 h con el agonista colinérgico carbacol (10⁻⁸M) en ausencia o en presencia del antagonista no selectivo atropina (10⁻⁸M) y de los antagonistas selectivos 4-DAMP para los receptores M₃ o tropicamida para los receptores M₄ (10⁻⁸M) durante 30 min.

Finalizado el tratamiento se cambió el medio de cultivo por medio fresco con 2% de SFB y se cultivaron las células durante 6 h. Para la tinción con yoduro de propidio, las células se despegaron con tripsina y se resuspendieron en 200 µl de PBS, luego se fijaron con etanol al 70% en frío que fue agregado gota a gota.

Las células se almacenaron a 4°C hasta el momento de la adquisición en un citómetro de flujo FACScan. El día de la toma de los datos, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en una solución con yoduro de propidio (50 µg/ml) y se incubaron

durante 1 h a 4°C. Luego de la adquisición de los datos (10000 eventos) los resultados se analizaron con el software Cyflogic v 1.2.1.

3.2. Ensayo de migración en herida

Se sembraron 1.5×10^5 células MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A, y MCF-7 en placas de 24 pozos. Se dejaron adherir, se privaron de SFB para inducir la quiescencia y se trataron durante 1 h con carbacol (10^{-9} M) en ausencia o en presencia de los antagonistas muscarínicos: atropina, 4-DAMP o tropicamida (10^{-8} M) durante 30 min.

Finalizado el tratamiento se generó una herida en la monocapa con un tip estéril, se realizaron 3 lavados con PBS y luego se incubó con medio de cultivo suplementado con 2% de SFB.

Las células fueron fotografiadas a tiempo 0 h y a las 12 h de realizar la herida. El área cubierta se determinó por comparación del área a tiempo 0 h con respecto al tiempo 12 h utilizando el programa Image J. Los resultados se expresaron en porcentaje de migración con respecto al control (células sin tratamiento) considerado como el 100%.

3.3. Expresión de la metaloproteinasa-9

3.3.1. Preparación de la muestra

Las células de las líneas MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A, y MCF-7 se sembraron en placas de 24 pozos con medio de cultivo con 10% SFB. Una vez adheridas se privaron de SFB y se trataron con carbacol (10^{-9} M) durante 1 h en ausencia o en presencia de atropina, 4-DAMP o tropicamida (10^{-8} M) agregados 30 min antes.

Terminado el tratamiento se cambió el medio por medio fresco con 2% de SFB y se incubó durante 24 h en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se obtuvieron lisados celulares de la misma manera que se describe en 2.2.1.1.

3.3.2. Western blot

Para evaluar la expresión proteica de la MMP-9 se realizó una corrida electroforética como se indica en 2.2.1.2. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti MMP-9 hecho en conejo, diluido 1:100 en TBS-T. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron dos veces con TBS-T durante 10 min y se procedió a incubar con el segundo anticuerpo: IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:15000, durante 1 h con agitación continua. Después de lavar tres veces con TBS-T se revelaron las bandas por el método de quimioluminiscencia agregando 1ml de solución A: solución B sobre las membranas durante 1 min. Luego estas se expusieron sobre una placa radiográfica durante 20 min en oscuridad. La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría usando el programa Image J. Los valores de D.O. obtenidos para la proteína de interés fueron relativizados a los valores obtenidos para las bandas de GAFDH.

3.4. Ensayo de angiogénesis en vivo

Se utilizaron ratones atímicos NUDE, hembras de 3 meses de edad, provistos por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA, Buenos Aires, Argentina). Los animales endocriados se mantuvieron de acuerdo con los procedimientos indicados en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH, 1986). Se inyectaron por vía intradérmica (i.d.) 0,1 ml que contenían 2×10^5 células de las líneas MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A, y MCF-7 en ambos flancos del ratón.

Luego de 5 días, los animales se sacrificaron y se separó la piel de los tejidos adyacentes. La respuesta vascular se observó en la cara interna de la piel con un microscopio de disección y se fotografiaron los sitios de inoculación con una cámara digital. Las fotografías se proyectaron sobre una cuadrícula y se contó el número de vasos (N° de vasos). La densidad de vasos (δ) expresada como número de vasos por milímetro cuadrado de piel se calculó con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{\sum \text{N}^\circ \text{ de vasos en cada cuadrado}}{\text{N}^\circ \text{ total de cuadros}}$$

3.5. Expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular A

3.5.1. Preparación de la muestra

Se obtuvieron lisados celulares de las líneas MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A, y MCF-7 como se describe en 2.2.1.1.

3.5.2. Western blot

Para evaluar la expresión proteica del VEGF-A se realizó una corrida electroforética como se indicó en 2.2.1.2. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti VEGF-A hecho en cabra, diluido 1:100 en TBS-T. Transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron dos veces con TBS-T durante 10 min y se procedió a incubar con el segundo anticuerpo IgG anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:10000, durante 1 h con agitación continua. Después de lavar tres veces con TBS-T se revelaron las bandas por el método de quimioluminiscencia agregando 1 ml de solución A: solución B sobre las membranas durante 1 min. Luego estas se expusieron sobre una placa radiográfica durante 20 min en oscuridad. Como control de carga se utilizó la proteína GAFDH.

3.6. Crecimiento tumoral

Utilizamos ratones hembra NUDE de 2 meses de edad a los cuales se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) 0,2 ml que contenían 1×10^6 células de las líneas MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A, y MCF-7. Una vez que los tumores fueron palpables, se midieron con calibre dos diámetros perpendiculares, tres veces por semana durante 1 mes.

Los animales fueron sacrificados, los tumores se pesaron y se conservaron en formol. Se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula:

$$V = (D_1)^2 \times D_2 / 2$$

donde D_1 es el diámetro menor y D_2 es el diámetro mayor.

4. Análisis estadístico

Para determinar la significación de las diferencias entre los valores promedio de cada muestra se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de una comparación múltiple de Tukey para muestras apareadas (GraphPad Prism). Los resultados se expresaron como promedios \pm E.S. con un nivel de significación de 0,05.

5. Soluciones

- a. Buffer RIPA: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 1%, PMSF 100 μ g/ml, pepstatina 1 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, Na_3VO_4 1 mM, inhibidor de tripsina 10 μ g/ml, pH 7,4.
- b. Buffer de corrida: Tris 25 mM, glicina 190 mM, 0.1% SDS.
- c. Buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v).

Materiales y Métodos

- d. TBS: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM.
- e. TBS-T: TBS con Tween 20 al 0,05%.
- f. Solución A de revelado por quimioluminiscencia: luminol 250mM, ácido p-cumárico 90 mM, Tris-HCl 1M, pH 8,5 y agua destilada hasta completar un volumen final de 10 ml.
- g. Solución B de revelado por quimioluminiscencia: 0,1 ml Tris-HCl 1M pH 8,5, 0,9 ml agua destilada, 2 μ l H₂O₂ 100 vol (30%).
- h. PBS: NaH₂PO₄ 0,461 g, Na₂HPO₄ 0,946 g y NaCl 8,27 g, pH 7,2.

RESULTADOS

1. Generación de líneas celulares mamarias que expresan receptores muscarínicos

Previamente demostramos que las células de mama humana MCF-7, derivada de un adenocarcinoma mamario, estrógeno dependiente, expresan los receptores M₃ y M₄ y que su activación con el agonista carbacol promueve la progresión tumoral aumentando la proliferación y la migración celular además de la angiogénesis.

Por otra parte, no observamos expresión de los receptores M en tejido mamario normal ni en la línea celular de mama no tumorigénica, MCF-10A. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos evaluar la contribución específica de estos receptores en la oncogénesis mamaria. Para ello generamos líneas estables a partir de células MCF-10A que expresan los subtipos M₃, M₄ y M₃M₄.

Para generar las líneas estables utilizamos el plásmido pcADN3.1+ que contiene la secuencia del subtipo 3 o 4 de los receptores M (Figura 5).

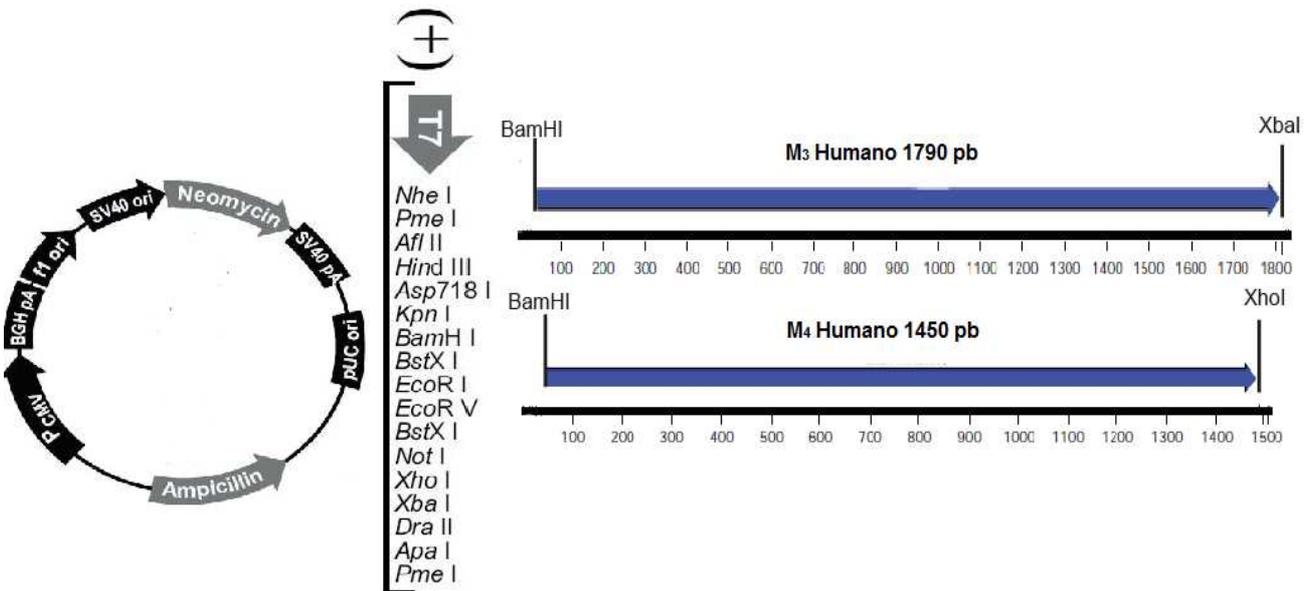


Figura 5: Esquema correspondiente al plásmido pcADN3.1+. Se muestra la ubicación de las resistencias, orígenes de replicación y el detalle del sitio múltiple de clonado. Se observa la secuencia correspondiente al receptor M₃ flanqueada por los sitios reconocidos por las enzimas de restricción BamHI y XbaI y al receptor M₄ flanqueada por lo sitios BamHI y XhoI respectivamente.

Resultados

Además los plásmidos contienen la resistencia al antibiótico neomicina. La selección con el análogo G418, que bloquea la síntesis de proteínas interfiriendo con la función ribosomal, permitió la selección de aquellas células que incorporaron el plásmido.

Para incorporar los plásmidos en la línea MCF-10A se estandarizaron las condiciones de transfección por electroporación como se detalló en Materiales y Métodos.

En la Figura 6 se muestra un foco celular representativo de la línea MCF-10A-M₃.

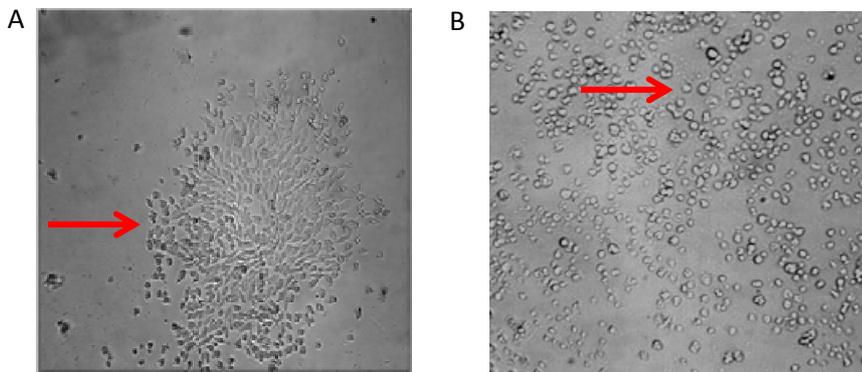


Figura 6. Selección de células MCF-10A transfectadas con los plásmidos. Las flechas muestran: A) Foco de células MCF-10A que incorporaron el plásmido pcADN3.1+ M₃. B) Control: restos celulares de la línea MCF-10A sin el plásmido con la resistencia al antibiótico G418 luego de 15 días de exposición.

A partir de los foci celulares que sobrevivieron a la selección se amplificaron y caracterizaron 10 clones de las tres líneas estables generadas: MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄ y MCF-10A-M₃M₄.

2. Evaluación de la expresión de los receptores muscarínicos en las líneas celulares generadas

2.1. Detección de los ARNm de los receptores muscarínicos

Para confirmar la expresión de ARNm de los receptores M en las líneas celulares generadas realizamos una RT-PCR con “primers” específicos para los subtipos 3 y 4 usando a la proteína GAFDH como control. Encontramos que las tres líneas generadas expresan el transcripto para los

subtipos de receptores M correspondientes. La magnitud de expresión de los mismos fue similar a la observada en la línea MCF-7 que se utilizó como control positivo, mientras que no detectamos los ARNm en la línea celular MCF-10A (Figura 7).

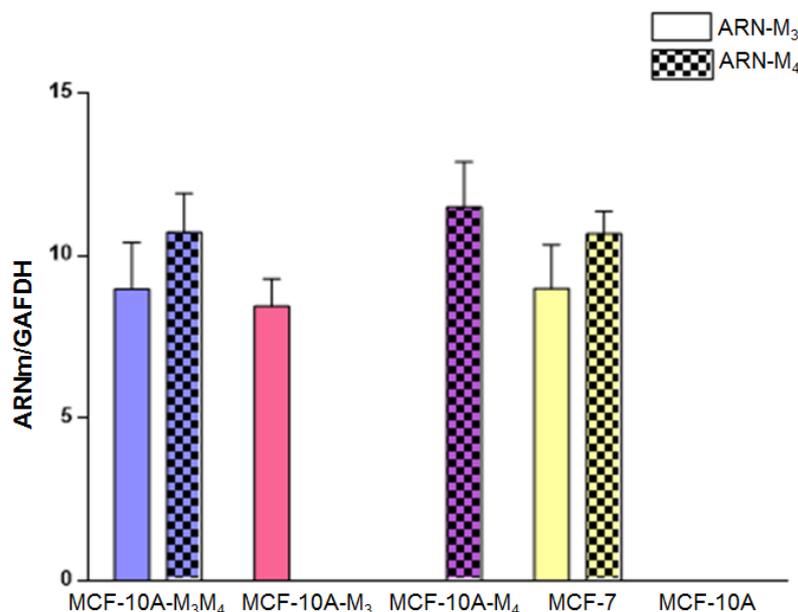


Figura 7: Expresión de los receptores M en las células transfectadas. Se muestra la magnitud de expresión de los ARNm de cada receptor en los clones estables en relación con la expresión del ARNm de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se utilizaron las células MCF-7 como control positivo y las MCF-10A como control negativo. Los valores son promedios±E.S. de 3 ensayos realizados.

2.2. Expresión proteica de los receptores muscarínicos

Por ensayos de Western blot detectamos la expresión de los subtipos de receptores M en lisados celulares de las líneas generadas usando como control positivo las células MCF-7 y como control negativo las células MCF-10A (Figura 8).

Se evidenció que la línea MCF-10A-M₃ presenta solo la banda correspondiente a la expresión del subtipo 3, mientras que en la línea MCF-10A-M₄ se observa únicamente la banda correspondiente al subtipo 4. La línea MCF-10A-M₃M₄ expresa los dos subtipos de receptores M.

Resultados

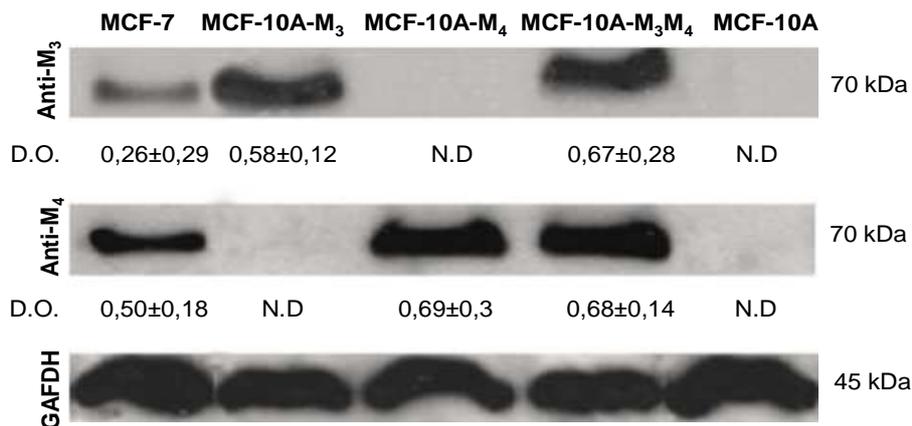


Figura 8: Expresión de receptores muscarínicos (M) en células mamarias humanas por Western blot. Se analizó la expresión en lisados de células: MCF-7, MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄ Y MCF-10A. El peso molecular de las proteínas está indicado a la derecha. La densidad óptica (D.O.) de las bandas fue relativizada con respecto a la correspondiente a la proteína gliceraldehido 3-fostato deshidrogenasa (GAFDH). N.D: no detectable. Se muestra un ensayo representativo de 3 semejantes. Los valores son promedios±E.S.

Además realizamos ensayos de inmunofluorescencia en las líneas estables generadas para detectar la expresión de los receptores M₃ y M₄. Como muestra la Figura 9 las líneas generadas expresan los subtipos de receptores M transfectados. Se observa además la expresión de los receptores M₃ y M₄ en células MCF-7 que están ausentes en MCF-10A.

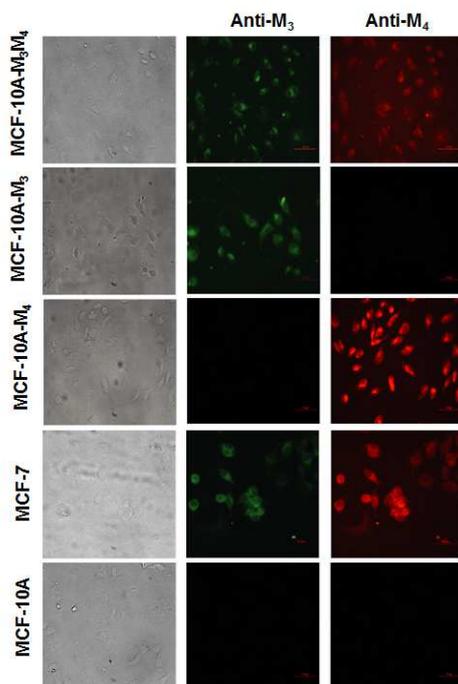


Figura 9: Expresión de receptores muscarínicos (M) en las líneas estables generadas por inmunocitoquímica. Se muestran fotografías de cada grupo experimental de un ensayo representativo de 3 semejantes. Aumento 400x. La marcación se realizó con un anticuerpo anti M3 hecho en cabra y un anti RM4 hecho en conejo. La marcación se evidencio empleando un anticuerpo anti-cabra acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y un anti-conejo conejo acoplado a ficoeritrina (PE). Se utilizaron células MCF-7 como control positivo y células MCF-10A como control negativo.

Resultados

Por ultimo confirmamos la expresión de los receptores M en las líneas celulares generadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos (Figura 10).

De manera similar a lo observado por Western blot e inmunocitoquímica la expresión de los subtipos de receptores M observada en células de las líneas generadas fue similar o superior a la detectada en las células MCF-7.

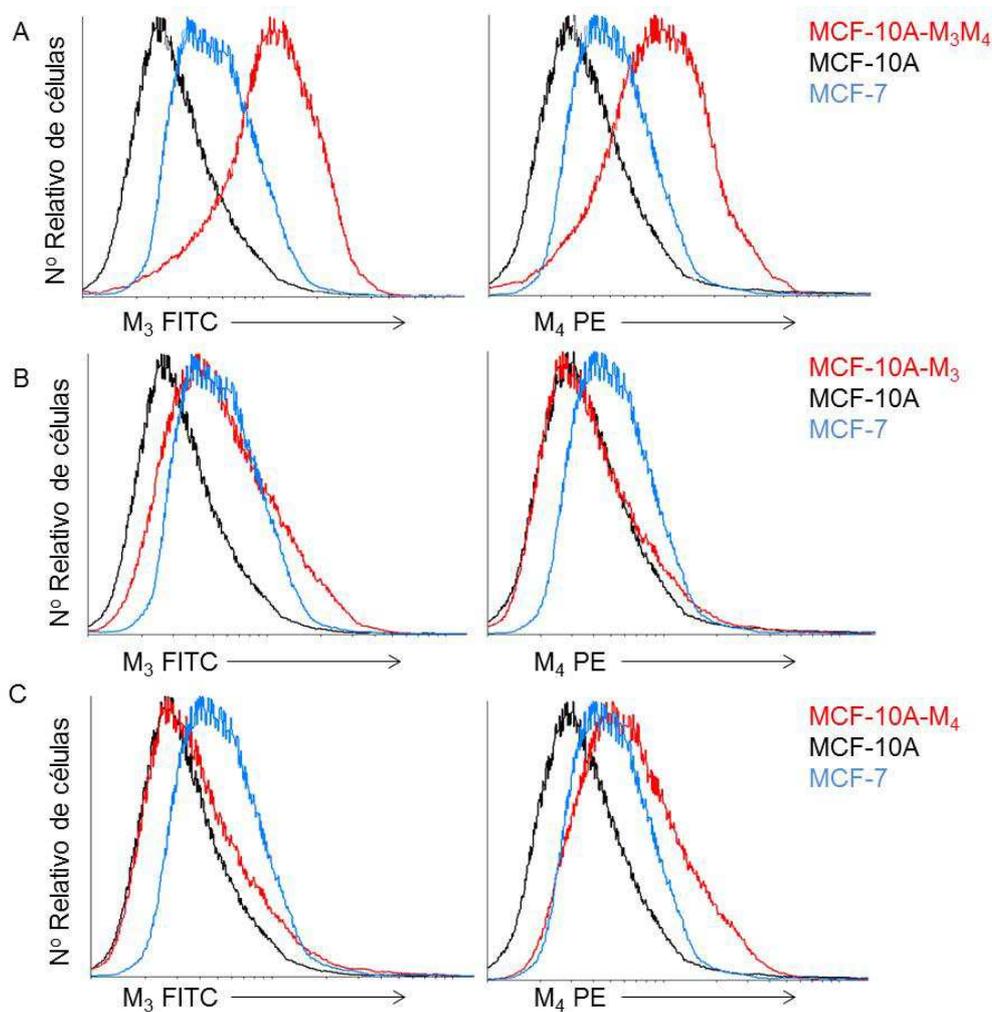


Figura 10. Expresión de receptores muscarínicos (M) en las líneas estables generadas por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de los perfiles de expresión de los subtipos de receptores M para las distintas líneas generadas, utilizando anticuerpos específicos: A) MCF-10A-M₃M₄, B) MCF-10A-M₃ y C) MCF-10A-M₄. La marcación se evidenció empleando un anticuerpo anti-cabra acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y un anti-conejo acoplado a ficoeritrina (PE) respectivamente. Se muestra un ensayo representativo de 3 semejantes.

3. Evaluación de la funcionalidad de los receptores muscarínicos en las líneas celulares generadas

Habiendo confirmado y caracterizado la expresión de los receptores M_3 y M_4 en las líneas MCF-10A- M_3 , MCF-10A- M_4 y MCF-10A- M_3M_4 , abordamos el análisis funcional de los mismos.

3.1. Efecto de la activación colinérgica sobre la proliferación celular

Previamente documentamos que la activación colinérgica con el agonista carbacol produce un efecto estimulante de la proliferación de forma concentración-dependiente en las células tumorales MCF-7 con respecto al control sin tratamiento. Dicho efecto se revierte en presencia del antagonista muscarínico atropina confirmando la participación de los receptores M en el mismo. Además, el tratamiento con carbacol no modificó la proliferación de las células no tumorales MCF-10A, resultado esperado dado que las mismas no expresan receptores M.

Con el objetivo de determinar si la activación colinérgica de las células transfectadas con los receptores M regula la proliferación, evaluamos este parámetro por citometría de flujo utilizando la técnica de incorporación de yoduro de propidio. Este compuesto se intercala entre las bases del ADN y permite diferenciar entre las células que están en proceso de división o las que han duplicado su contenido de ADN, de aquellas que no se están dividiendo.

Observamos que la estimulación con carbacol ($10^{-8}M$) incrementó el porcentaje de células en la fase S/G2/M en las células MCF-10A- M_3 , MCF-10A- M_4 y MCF-10A- M_3M_4 con respecto al control (células sin tratamiento) (Figura 12). El efecto estimulante del agonista se revierte en presencia de $10^{-8}M$ del antagonista muscarínico no selectivo atropina. Además observamos que el tratamiento previo con los antagonistas de los receptores M_3 y M_4 : 4-DAMP ($10^{-8}M$) o tropicamida ($10^{-8}M$) redujo el efecto del agonista, lo que indica que ambos subtipos de receptores M participan en el efecto proliferativo desencadenado por el carbacol (Tabla 4).

Resultados

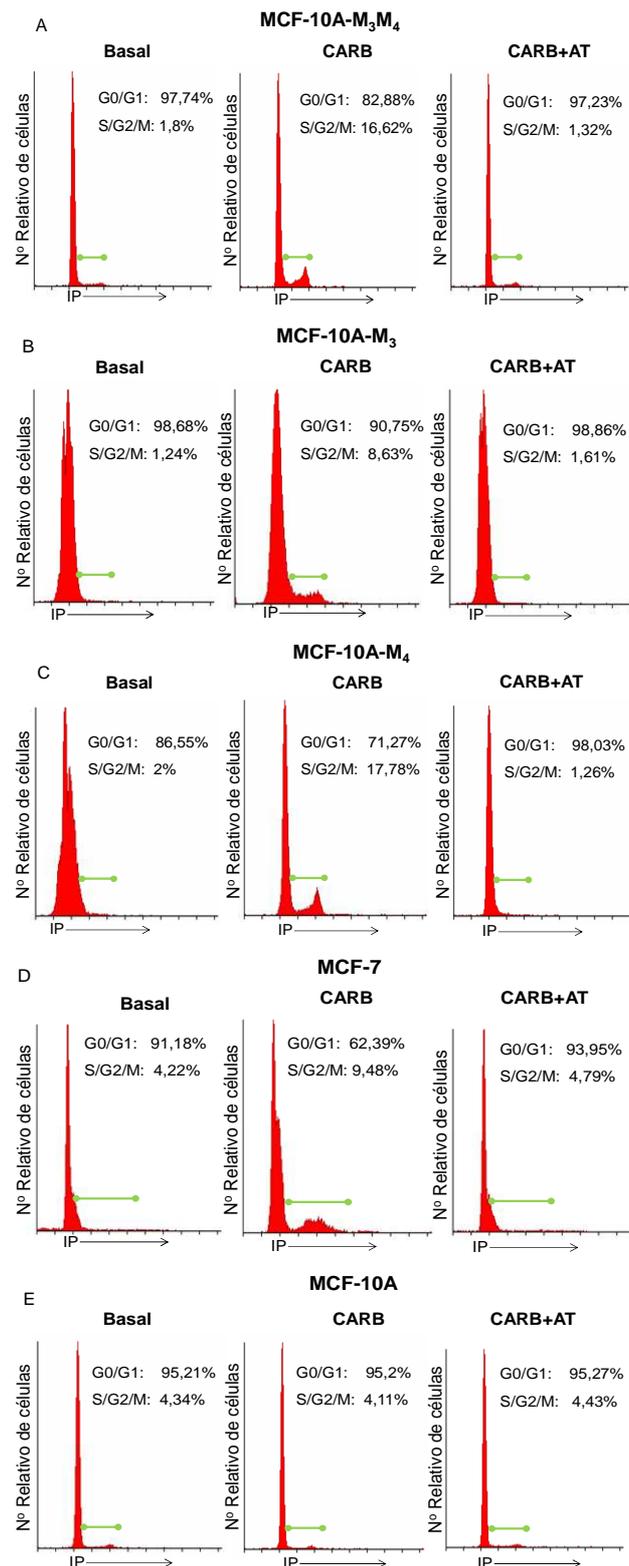


Figura 12: Efecto de la estimulación colinérgica sobre la proliferación de células: A) MCF-10A-M₃M₄, B) MCF-10A-M₃ C) MCF-10A-M₄, D) MCF-7 E) MCF-10A. Se muestran histogramas representativos del ciclo celular sin o con tratamiento con el agonista CARB (10^{-8} M) en ausencia o en presencia del antagonista atropina (AT) (10^{-8} M). Los datos se analizaron con el programa Cyflogic. Los resultados se expresaron como medias del porcentaje. Se muestra un ensayo representativo de n=3.

	MCF-10A-M ₃ M ₄	MCF-7	MCF-10A
	S/G2/M		
Control	2,13±1,90	5,66±0,48	4,16±0,78
CARB	10,81±3,70*	16,37±4,03 [#]	4,38±0,28
CARB+4-DAMP	5,49±0,46	8,25±2,31	3,16±2,02
CARB+TROP	2,08±0,42	9,76±2,92	4,35±0,41

Tabla 4. Efecto de la estimulación colinérgica sobre el porcentaje de células en S/G2/M. Las células se trataron como se indicó en Materiales y Métodos. Después se lavaron con PBS y se fijaron con etanol 70%. Receptor muscarínico (M), carbacol (CARB), 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP) y Tropicamida (TROP). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Cyflogic y los resultados se expresaron como promedios±E.S.(n=3). [#]p≤0,01 vs. Control. *p≤0,001 vs. Control.

3.2. Efecto de la activación colinérgica sobre la migración celular

La migración celular es un paso importante para la invasión tumoral. Por esto decidimos estudiar la capacidad migratoria de los clones generados, así como el efecto de la activación colinérgica sobre la misma. Con este fin utilizamos el ensayo de cierre de herida *in vitro*. Las células se cultivaron hasta llegar a confluencia y se estimularon con carbacol (10⁻⁹M) en ausencia o en presencia de los antagonistas atropina, 4-DAMP y tropicamida (10⁻⁸M) como se indicó en Materiales y Métodos.

Observamos que el tratamiento con carbacol aumentó la migración celular en las tres líneas generadas MCF-10A-M₃M₄ (196±10%), MCF-10A-M₃ (151±9,5%) y MCF-10A-M₄ (136±6,5%) con respecto al control considerado como 100% (células sin tratamiento) (Figura 13 A-C).

Resultados

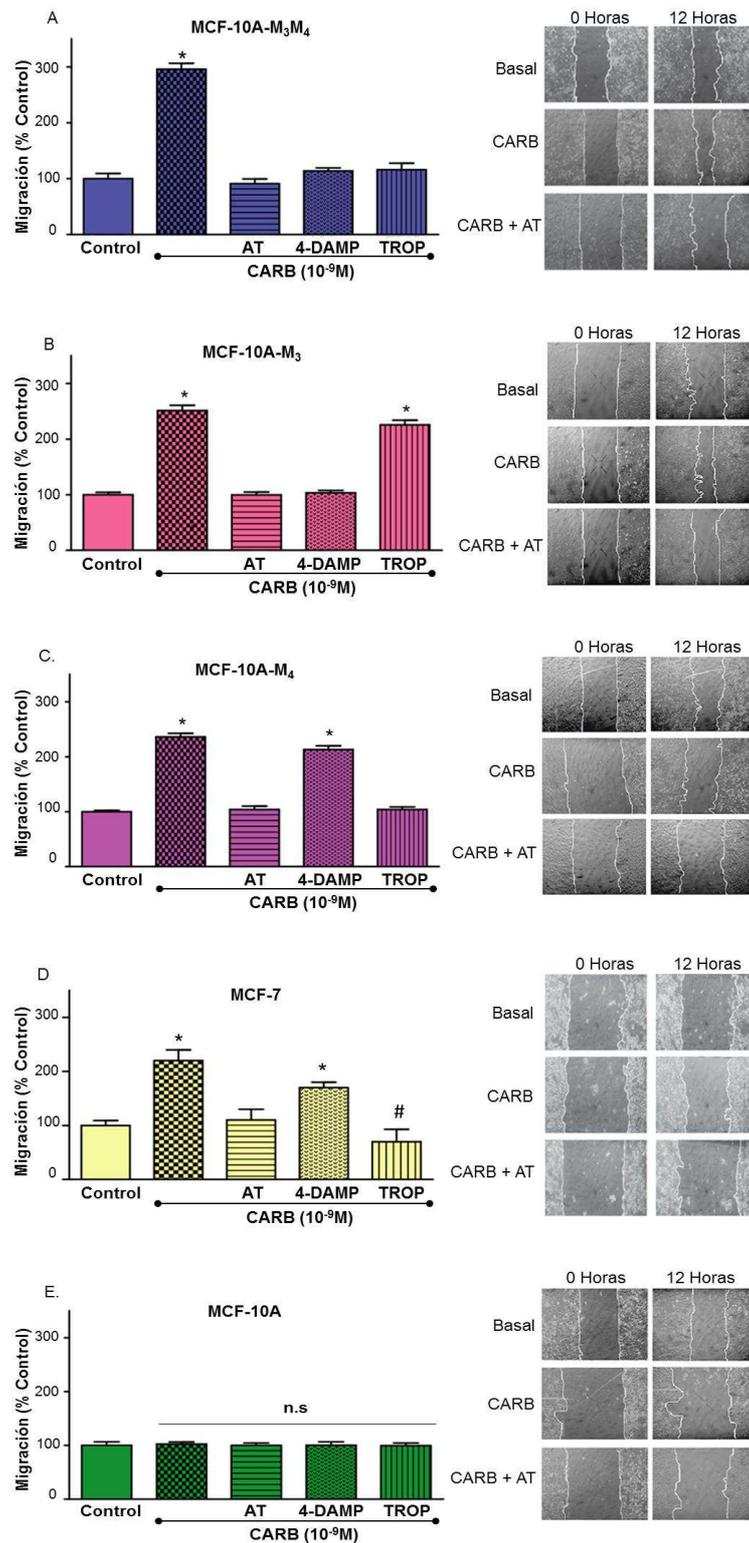


Figura 13. Efecto del carbacol (CARB) sobre la migración de células A) MCF-10A-M₃M₄, B) MCF-10A-M₃, C) MCF-10A-M₄, D) MCF-7 y E) MCF-10A. Las células se trataron con CARB (10⁻⁹M) en ausencia o en presencia de atropina (AT), 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP) o tropicamida (TROP) (10⁻⁸M). Los valores son promedios±E.S. de tres ensayos realizados por triplicado. #p<0.05 vs. control. *p<0,0001 vs. control considerado como 100% (Células sin tratamiento). n.s: no significativo. Se muestran fotos representativas de la herida a tiempo (t)=0 h y 12 h. Aumento a 40x.

La estimulación colinérgica no modificó la capacidad migratoria de las células MCF-10A (Figura 13 E), mientras que incremento en un $120\pm 9\%$ la migración de las células tumorales MCF-7 con respecto al control (Figura 13 D).

El agregado previo de atropina revirtió el efecto del carbacol a valores basales en las cuatro líneas que expresan los receptores M. El antagonista selectivo para M_3 , 4-DAMP, fue capaz de bloquear el efecto de la estimulación colinérgica tanto en las células de la línea MCF-10A- M_3 como en MCF-10A- M_3M_4 , mientras que solo redujo parcialmente el efecto del carbacol en las células MCF-7. Como se esperaba no tuvo efecto sobre la migración celular de la línea MCF-10A- M_4 ni MCF-10A.

Por otro lado, el antagonista selectivo para M_4 , tropicamida fue capaz de revertir el efecto del carbacol sobre la migración tanto en la línea MCF-10A- M_4 como en MCF-10A- M_3M_4 y MCF-7 y no tuvo efecto sobre las células MCF-10A- M_3 y MCF-10A.

3.3. Expresión de metaloproteinasa-9

Para que se produzca la migración y la invasión local de las células tumorales se requiere la remodelación de la MEC a través de la actividad de las MMP. Se ha descrito que la presencia de MMP-9 se correlaciona con la invasividad y el estadio tumoral por lo que es considerada un marcador pronóstico de la enfermedad.

En este contexto decidimos evaluar si la expresión de los receptores M induce la expresión de la MMP-9. Para ello utilizamos extractos proteicos de las líneas celulares generadas y analizamos por Western blot la expresión de esta proteína así como el efecto del tratamiento colinérgico.

Observamos que a diferencia de las células MCF-10A, las tres líneas generadas expresan MMP-9 de manera semejante a las células MCF-7 (Figura 14).

La estimulación con carbacol incrementó la expresión de MMP-9 en células MCF-10A- M_3 ($78,0\pm 5,2\%$), MCF-10A- M_4 ($76,7\pm 12,1\%$) y en mayor magnitud en las células MCF-10A- M_3M_4 ($123,0\pm 23,4\%$) con respecto al control (células sin tratamiento).

Resultados

El efecto de la estimulación colinérgica sobre la expresión de MMP-9 se redujo en todos los casos por el agregado previo del antagonista atropina. Por su parte el antagonista del receptor M₃, 4-DAMP, fue capaz de revertir el efecto en las células MCF-10A-M₃ así como en las células MCF-10A-M₃M₄ y MCF-7. Como se esperaba, el antagonista no tuvo efecto sobre las células MCF-10A-M₄.

Por otro lado, el antagonista tropicamida revirtió el efecto del agonista sobre la expresión de MMP-9 en las células MCF-10A-M₄, MCF-10A-M₃M₄ y MCF-7 y no tuvo efecto sobre las células MCF-10A-M₃.

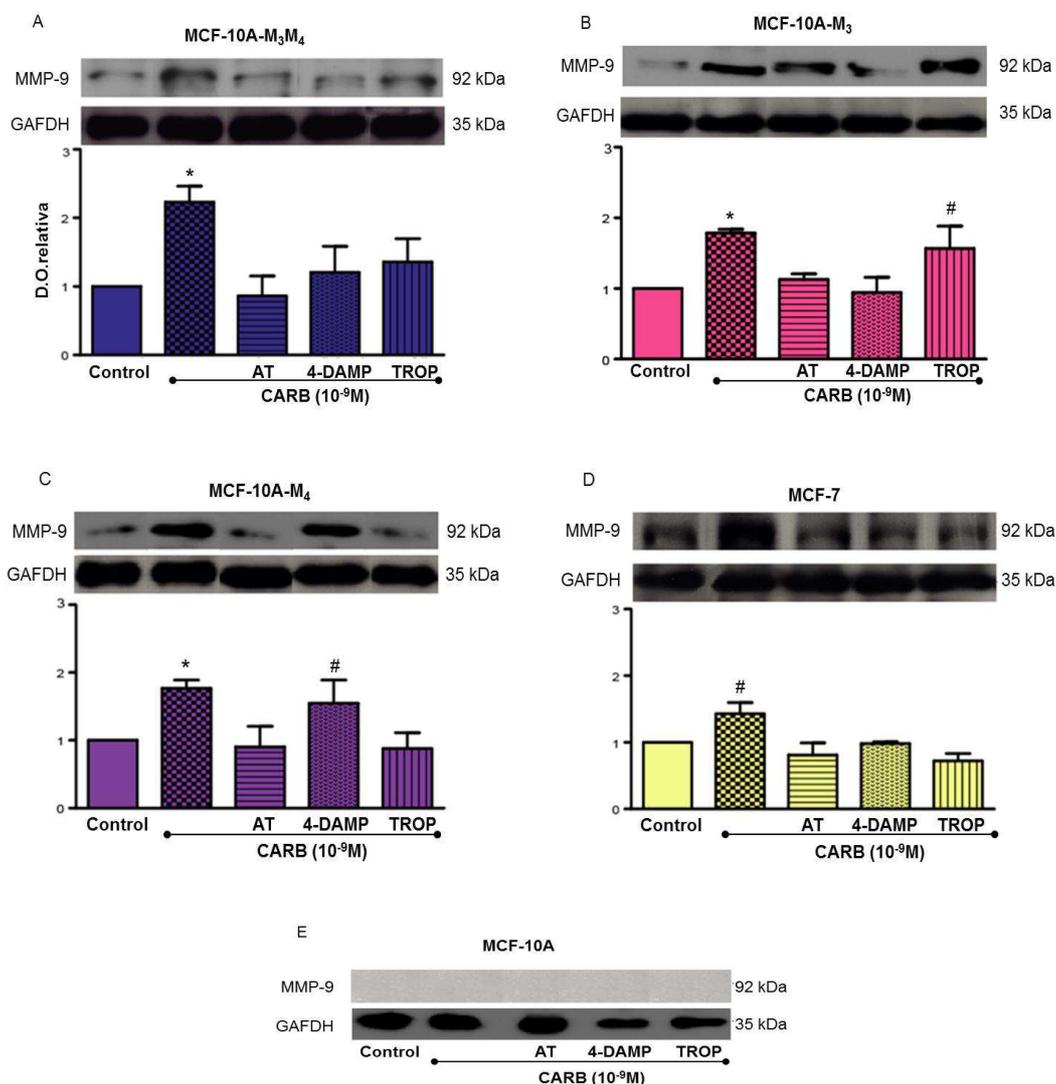


Figura 14. Efecto del carbacol (CARB) sobre la expresión de la metaloproteínasa- 9 (MMP-9). Se muestra la expresión de esta enzima en las células A) MCF-10A-M₃M₄, B) MCF-10A-M₃, C) MCF-10A-M₄, D) MCF-7 y E) MCF-10A. Las células se trataron con CARB (10⁻⁹M) en ausencia o en presencia de los antagonistas atropina (AT), 4-DAMP y tropicamida (TROP) (10⁻⁸M). Los valores son promedios±E.S. n=3. #p≤0,05 vs. control. *p≤0,01 vs. control. Los pesos moleculares se indican a la derecha.

3.4. Angiogenesis inducida por las células generadas y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A

Dada la importancia de la neovascularización en la progresión tumoral investigamos si la expresión y funcionalidad de los receptores M modifica la capacidad de las células MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄ y MCF-10A-M₃M₄ para generar nuevos vasos sanguíneos *in vivo*.

Para ello se inocularon en forma i.d. $2 \times 10^5 / 0,1$ ml de células en ambos flancos de ratones hembras NUDE y después de 5 días se cuantificó la respuesta neovascular en la cara interna de la piel.

Como se observa en la Figura 15, las células de las tres líneas generadas fueron capaces de incrementar la neovascularización ($\delta = N^\circ$ de vasos/mm²) en el sitio de inoculación de manera análoga a las células MCF-7 ($5,35 \pm 0,93$). La respuesta angiogénica producida por las células generadas fue semejante MCF-10A-M₃M₄ ($6,47 \pm 0,66$), MCF-10A-M₃ ($6,11 \pm 0,43$) y MCF-10A-M₄ ($5,01 \pm 0,83$). Todos los valores fueron significativamente distintos del de las células MCF-10A ($3,72 \pm 0,35$).

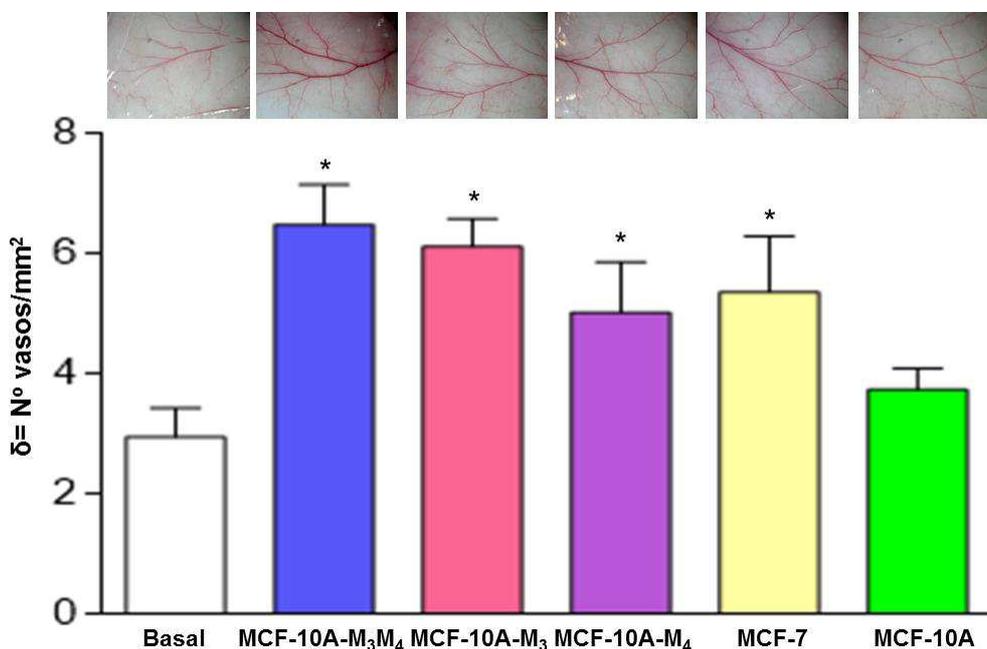


Figura 15. Respuesta angiogénica inducida por las células de las líneas generadas. Se inocularon $2 \times 10^5 / 0,1$ ml de células en ambos flancos de ratones NUDE. La angiogénesis se cuantificó como densidad vascular ($\delta = N^\circ$ de vasos /mm²). En el panel superior se muestran fotografías representativas del sitio de inoculación para cada grupo experimental. Aumento 6.4x. Los valores son promedios \pm E.S. de n=4. * $p \leq 0,001$ vs. Basal.

Resultados

Teniendo en cuenta que el VEGF-A es el principal factor proangiogénico decidimos investigar si el mismo se expresa en las células de las líneas generadas.

En la Figura 16 observamos que los tres clones de células generadas expresan VEGF-A de manera análoga a las células tumorales MCF-7, mientras que las células MCF-10A no lo expresan.

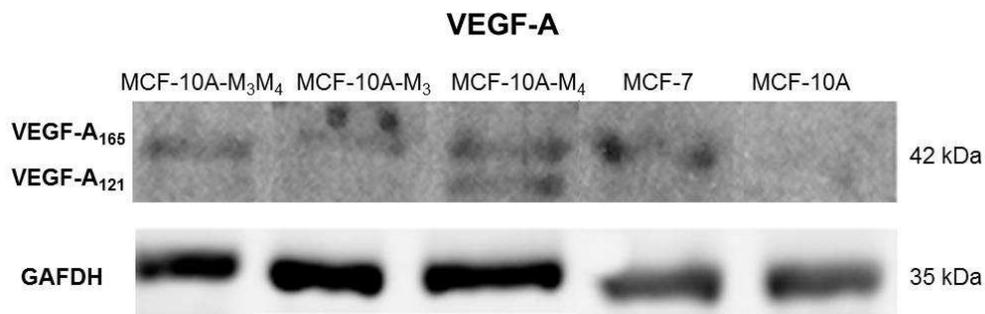


Figura 16. Expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A). Se analizó su expresión en lisados de las células: MCF-10A-M₃M₄, MCF-10A-M₃, MCF-10A-M₄, MCF-7 Y MCF-10A por Western blot. Como control de carga constante se utilizó la expresión de la proteína gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAFDH). Los pesos moleculares de las proteínas se indican a la derecha. Se muestra un ensayo representativo de 3 semejantes.

3.5. Crecimiento tumoral

Como hemos descrito, la expresión y activación de los receptores M en las células generadas resultó en un incremento de todos los parámetros relacionados con la progresión tumoral estudiados. Por lo tanto nos propusimos analizar la capacidad de estas células de formar tumores *in vivo*.

Para ello inyectamos en forma s.c. 1×10^6 células de cada una de las líneas generadas en el flanco de ratones hembra NUDE y evaluamos el crecimiento durante 30 días midiendo el volumen tumoral tres veces por semana como se indicó en Materiales y Métodos.

Resultados

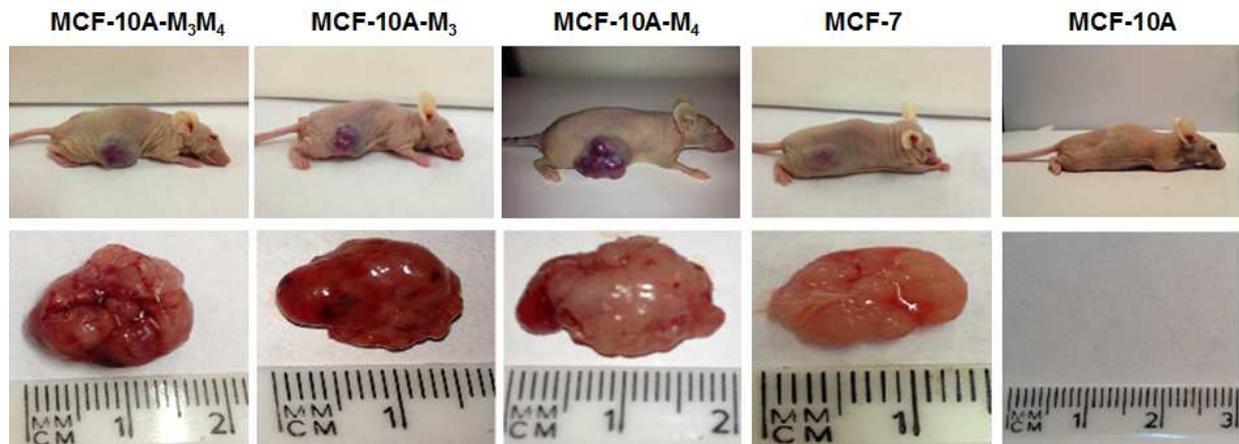


Figura 18. Tumores obtenidos a los 30 días a partir de las células: MCF-10A-M3M4, MCF-10A-M3, MCF-10A-M4, MCF-7 y MCF-10A. Se inyectaron 1×10^6 células en 0.2ml en el flanco de ratones hembras NUDE. Se muestran fotos representativas de los tumores generados. $n=4$ por cada grupo experimental.

Como se observa en la Figura 18, las células generadas tuvieron la capacidad de formar tumores *in vivo* de manera semejante a las células MCF-7. Las células MCF-10A no formaron tumores tal como ha sido previamente descrito [46].

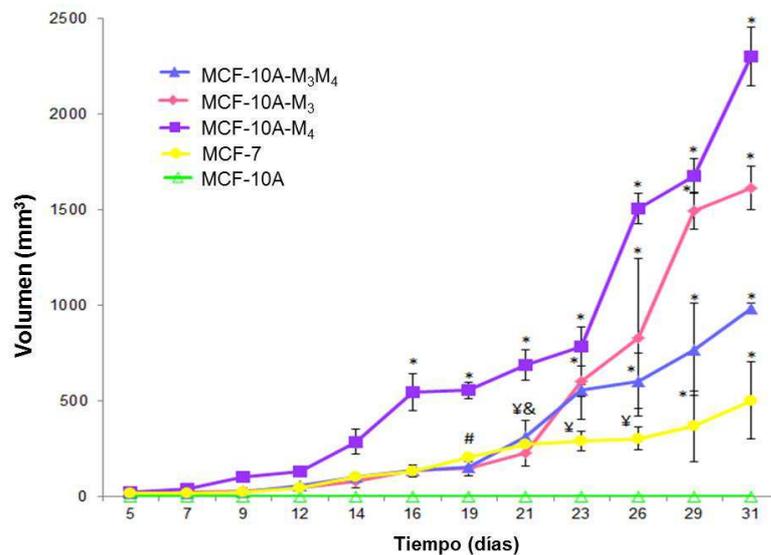


Figura 19. Curva de crecimiento tumoral. Se inyectaron 1×10^6 de células s.c. de las líneas MCF-10A-M3M4, MCF-10A-M3, MCF-10A-M4, MCF-7 y MCF-10A en el flanco de ratones hembra NUDE. El diámetro tumoral se midió tres veces por semana con calibre y se calcularon los volúmenes como se indica en Materiales y Métodos. # $p \leq 0,05$ vs. MCF-10A. & $p \leq 0,01$ vs. MCF-10A. ¥ $p \leq 0,001$ vs. MCF-10A. * $p \leq 0,0001$ vs. MCF-10A. $n=3$ por cada grupo experimental.

Resultados

Además, observamos que al finalizar el tiempo experimental, el volumen tumoral fue significativamente distinto entre las líneas generadas: MCF-10A-M₃M₄ ($985,15 \pm 27,76 \text{ mm}^3$), MCF-10A-M₃ ($1614,29 \pm 115,35 \text{ mm}^3$) y MCF-10A-M₄ ($2303,10 \pm 154,07 \text{ mm}^3$) (Figura 19).

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres y se encuentra entre las primeras causas de defunción por esta enfermedad. Es una enfermedad compleja y progresiva con numerosas interacciones biológicas a nivel genético y ambiental; que involucra la disfunción de múltiples sistemas, incluyendo la reparación del ADN, la apoptosis celular y la respuesta inmune, entre otros. A pesar de los progresos realizados en relación con la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad, aún quedan aspectos desconocidos y no resueltos relacionados con la etiopatogenia de la misma.

El SCnN participa en los siguientes procesos fisiológicos: crecimiento celular, adhesión, migración y diferenciación. La desregulación del mismo puede ser causa de la etiopatogenia de diferentes enfermedades [47]. En este sentido, existen numerosos trabajos que han analizado la relación entre la expresión y función de los distintos componentes del SCnN y el desarrollo de la fibrosis quística, la inflamación, el vitíligo y la dermatitis atópica [48].

En relación con el cáncer se ha descrito que el SCnN juega un rol de importancia en la progresión tumoral [49]. Los componentes del SCnN y los de la vía de señalización muscarínica han sido relacionados con cuatro de los tipos de tumores más frecuentes dentro de la población humana: mama, próstata, colon y pulmón [50].

Así por ejemplo se ha observado que los receptores M se encuentran sobreexpresados en el tejido tumoral con respecto al tejido normal. Song y col. han evidenciado que tanto el tejido tumoral como el normal expresan receptores M pero tienen una capacidad distinta de sintetizar y responder a la Ac [51]. Demostramos la expresión de receptores M en tumores mamarios murinos y humanos y ausencia de receptores en el tejido mamario normal [41]. Además describimos una correlación entre la magnitud de la expresión de estos receptores y la agresividad y capacidad invasiva de tumores mamarios [39]

Nuestro grupo ha documentado la expresión de los subtipos M₃ y M₄ en células de la línea MCF-7, derivadas de un adenocarcinoma mamario humano estrógeno-dependiente de tipo luminal, uno de los tumores más frecuente en mujeres. Mientras que no evidenciamos expresión de ningún subtipo de estos receptores en las células de la línea de mama humana no tumorigénica MCF-10A [52].

Con el objetivo de caracterizar el rol funcional de los receptores M se han empleado dos enfoques experimentales diferentes. El más utilizado involucra el uso de agonistas y antagonistas farmacológicos. Empleando este abordaje, hemos realizado importantes contribuciones demostrando la participación de los receptores M en la tumorigénesis mamaria tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular evidenciamos que la activación de estos receptores en células MCF-7 estimula la proliferación y la migración celular, tanto como la angiogénesis, que constituyen procesos fundamentales en la progresión tumoral[41] [42] [43].

El segundo enfoque implica modificar la expresión endógena de los receptores. Raufman y col. describieron que los ratones deficientes en el subtipo 3 (M₃^{-/-}) presentan una atenuación en el crecimiento y número de tumores de colon inducidos con azoximetano, un carcinógeno colorectal específico [53].

Por el contrario, es importante destacar que si bien se han sobreexpresado los receptores M humanos en células de mamíferos, en ninguno de estos trabajos se aborda el estudio del papel de estos receptores en la progresión tumoral [54] [55] [56].

Es sabido que en su transición hacia la malignidad, una célula se ve sometida a cambios genéticos y epigenéticos. Dada la complejidad multifactorial de este proceso es de interés evaluar la contribución específica de los distintos factores implicados en la desregulación que lleva a una célula normal a transformarse en tumoral. En este trabajo evaluamos la contribución de los

receptores M al proceso de malignización utilizando un modelo de mama humana. Para ello, transfectamos células mamarias no tumorigénicas MCF-10A, con los subtipos de receptores M₃ y M₄, que son los mismos subtipos expresados en las células tumorales mamarias humanas MCF-7 y evaluamos la adquisición de parámetros correspondientes a un fenotipo maligno.

Se ha evidenciado que la activación de receptores M promueve la proliferación de células tumorales de diferentes orígenes. Previamente demostramos que el agonista colinérgico carbacol activa a los receptores M expresados en las células MCF-7, estimulando su proliferación [42] [52]. En línea con nuestros resultados, Jimenez y Montiel, describieron que el carbacol aumenta la proliferación de células MCF-7 con activación de las proteínas MAPK/ quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) [57]. De manera semejante demostramos que el tratamiento con el agonista carbacol aumenta la cantidad de células en la fase S/G2/M del ciclo celular en las células transfectadas, similar a lo observado en las células MCF-7.

Diversos autores han demostrado que los distintos subtipos de receptores M están involucrados en la regulación de la capacidad migratoria de las células normales. En este sentido, Chernyavsky y col. [58] demostraron que la activación muscarínica estimula la migración de queratinocitos, principalmente por activación del subtipo M₄. En estas células, la muscarina estimuló la movilidad, mientras que el pretratamiento con el antagonista M₄ selectivo, tropicamida revirtió de manera efectiva la migración de los queratinocitos. Además, la participación de este subtipo de receptor en la migración celular también fue demostrada en ratones deficientes en el mismo [59].

En el cáncer, la migración celular es un evento necesario para la progresión tumoral dado que permite la invasión y la metastasis. Chiu y col [59] describen la participación del receptor M₄ en la migración de células tumorales en cáncer oral. Por su parte, Zhang y col. [60] demostraron que en

la línea celular SBC3, derivada de un tumor de pulmón de células pequeñas, el subtipo M_3 regula la adhesión y migración celular mediante la modulación de la expresión y funcionalidad de las integrinas. También se demostró que en el proceso de migración celular en tumores puede participar más de un subtipo de receptor M. Así, por medio de un ensayo semejante al usado por nosotros de cierre de herida, en células HeLa, derivadas de un tumor uterino humano, que expresan los subtipos 1, 3, 4 y 5 de receptores M, la migración se incrementó en presencia de muscarina y este efecto se inhibió con el pretratamiento con atropina. Un efecto semejante ejercieron los antagonistas selectivos para los receptores M_1 , M_3 y M_4 , pirenzepina, 4-DAMP y tropicamida respectivamente [61]. Nuestros resultados son similares, debido a que demostramos que los receptores M_3 y M_4 transfectados en las células MCF-10A, al ser activados por el agonista también promueven la migración y la magnitud del efecto es mayor a lo observado previamente en células MCF-7. Esto último se debe probablemente a que las líneas generadas presentan una mayor expresión de ambos subtipos de receptores M como se observó por citometría de flujo, inmunocitoquímica y Western blot.

La idea de que el microambiente local juega un rol esencial en la regulación del comportamiento celular, central en la embriología clásica, se ha incorporado progresivamente en el campo de la biología tumoral [62] [63]. Numerosos estudios se han focalizado en determinar cómo los componentes celulares locales inician y promueven la progresión del cáncer [64]. Sin embargo, en los últimos años se ha destacado la importancia de los componentes acelulares, especialmente de la MEC durante este proceso [65] [66] [67] [68]. La MEC está constituida por macromoléculas diferentes que varían en su composición entre tejidos de un mismo organismo. Las células tumorales y estromales se encargan de sintetizar sus componentes y de degradarlos con enzimas proteolíticas. La MEC está constituida por tres clases principales de macromoléculas: proteínas

estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (fibrilina, laminina y fibronectina) y glucosaminoglicanos. En cáncer de mama se ha demostrado que durante el crecimiento tumoral y la invasión es necesario tanto la deposición de colágeno como su degradación. Las MMP son producidas por las células tumorales y contribuyen a la iniciación, desarrollo y progresión del tumor mediante múltiples mecanismos [69]. Uno de ellos es la remodelación de la MEC permitiendo la invasión, intravasación y extravasación de las células tumorales lo que posibilita la diseminación metastásica [70]. Además, las MMP son capaces de clivar factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral, promover la formación de tumores sólidos, actuar como oncogenes y activar RAPG como los receptores M [71] [33]. La secreción de MMP-2, -3 y -9, es activada por el stress oxidativo y estas enzimas incrementan el recambio de la MEC [72] [73] [74].

La MMP-9 es una de las enzimas más importantes en el proceso de progresión tumoral. Se ha reportado que la actividad de la misma sobre diversos sustratos modula positivamente la proliferación celular, migración, invasión, metástasis y angiogénesis [75]. El aumento de la expresión de MMP-9 está asociado con un incremento en la agresividad y capacidad metastásica en cáncer de mama y se correlaciona con un mal pronóstico [76]. En nuestro laboratorio reportamos previamente que la activación de los receptores M_3 y M_4 con el agonista carbacol estimula la actividad de MMP-9 en células MCF-7 [42]. En concordancia con estos resultados describimos que las líneas celulares generadas expresan *de novo* MMP-9, a diferencia de las MCF-10A que carecen de esta enzima. Además observamos que la activación de los receptores M con carbacol aumenta tanto la expresión de MMP-9 como su secreción y actividad (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los observados por Lin y col. que demostraron que el receptor M_3 , sobreexpresado en células de la línea NSCLC, derivada de un tumor de pulmón de células no pequeñas, al ser activado con carbacol aumenta la expresión y actividad de la MMP-9 y el silenciamiento del

receptor M_3 usando ARNsi, disminuye notablemente la expresión de MMP-9. También genera menores niveles de p-Akt vía PI_3K , disminuyendo tanto la transcripción y expresión de MMP, como la invasión y migración de estas células [77].

La angiogénesis es un proceso complejo que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Es un proceso con múltiples etapas que involucra un fino balance entre factores pro y antiangiogénicos [4]. Los tumores primarios son pequeños e inactivos y el crecimiento de la masa tumoral genera condiciones de hipoxia en el centro del tumor que induce la expresión de factores proangiogénicos que promueven la neovascularización [78]. Se ha descrito que las células tumorales liberan factores de crecimiento asociados al estroma como el factor de crecimiento de fibroblastos, de plaquetas y/o VEGF, así como ligandos del receptor del EGF, interleuquinas y factor de crecimiento transformante β , entre otros [79]. Los mismos actúan de manera autócrina y parácrina alterando la homeostasis del tejido y generando una respuesta inflamatoria y angiogénica [80] [81].

El VEGF-A es una proteína homodimérica de 45 kDa. Existen diferentes isoformas producidas por el corte y empalme alternativo del mensajero, entre ellas se encuentran el $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ y el $VEGF_{206}$. Las mismas poseen distinta cantidad de aminoácidos, distinto peso molecular y tienen diferentes funciones biológicas. Las isoformas 121 y 165 pueden secretarse al medio extracelular, difundir libremente y se encuentran presentes en diferentes tejidos. El $VEGF_{165}$ es la isoforma predominante y comúnmente su expresión está regulada positivamente en una gran variedad de tumores sólidos [82]. Además se ha descrito que la expresión de VEGF-A puede estar regulada por oncogenes, genes supresores del tumor y numerosos factores de crecimiento, citoquinas,

hormonas y fracciones lipídicas. Estos son probablemente importantes en la regulación autocrina de la expresión de VEGF-A tanto en tejidos normales como en tumores [83].

En este trabajo observamos que las células generadas por transfección con los receptores M producen VEGF-A tanto en la isoforma mayoritaria 165 como en la isoforma 121, que no se detectan en las células MCF-10A no transfectadas. En trabajos anteriores hemos demostrado que las células MCF-7 expresan la isoforma 165 tanto en los lisados celulares como en el sobrenadante de cultivo [43]. En línea con estos resultados Hawinkels y col. proponen que la enzima MMP-9 produce el clivaje proteolítico del VEGF₁₆₅ de los restos de heparan sulfato de la MEC, lo que promueve la angiogénesis [84].

La angiogénesis de los tumores malignos, medida como la densidad de microvasos se correlaciona con factores clínico-patológicos o con un mal pronóstico en varios tipos de tumores [85]. Previamente demostramos en un modelo murino de tumor de mama que la activación de los receptores M con el agonista carbacol estimula la respuesta neovascular *in vivo* [86]. Posteriormente, observamos que las células MCF-7 inducen la angiogénesis aumentando la densidad vascular al ser inyectadas en ratones NUDE. Esta respuesta neovascular se incrementó cuando las células fueron tratadas con carbacol y el efecto se revirtió en presencia del antagonista no selectivo atropina [43]. En este trabajo de tesis demostramos que las células de las tres líneas estables generadas son capaces de inducir la respuesta neovascular cuando son inyectadas en el flanco de ratones NUDE, efecto que no se observó con células no tumorigénicas MCF-10A. La densidad de neovasos alcanzada por las tres líneas generadas fue similar al obtenido con las células tumorales MCF-7.

Vale la pena destacar que en este trabajo se demuestra por primera vez que la presencia de receptores M en células no tumorigénicas es condición suficiente para que al inyectar las mismas en el flanco de ratones hembra NUDE se produjera la formación de tumores *in vivo*, efecto que no se observó con las células MCF-10A. Además, detectamos que las células que expresan el subtipo M₄ alcanzaron el volumen tumoral mayor. Chan y col. [87] han demostrado que este subtipo de receptor puede activar la vía mTOR/p70S6K, modulando la traducción de ARNm esencial para la oncogénesis pues genera continuas señales de supervivencia celular. Restan realizar experimentos adicionales para demostrar la malignidad de los tumores obtenidos y las causas de las diferencias observadas en los distintos tipos de tumores.

Consideraciones finales:

El cáncer es una enfermedad multifactorial con cambios crono-espaciales múltiples que llevan a células normales a transformarse en tumorales. Uno de los mayores impedimentos para controlar el desarrollo y la progresión de esta enfermedad, lo constituye el conocimiento parcial del origen y las variables que controlan este proceso. La malignización implica el crecimiento celular descontrolado, como consecuencia de la activación de oncogenes y/o desactivación de genes supresores de tumores. Desde el descubrimiento de los oncogenes en la biología tumoral se han realizado numerosas investigaciones para dilucidar el rol causal que desempeñan estas moléculas en el cáncer [88] [89] [90]. En 1991, Gutkind y col. propusieron, por primera vez, que los receptores M acoplados a la hidrólisis de polifosfatos de inositol funcionarían como oncogenes condicionales cuando se expresan en células capaces de proliferar [91]. Los resultados obtenidos por nosotros en este trabajo de tesis avalan estos hallazgos.

Discusión

En este trabajo demostramos que la expresión de uno o más subtipos de receptores M en células no tumorales de mama humana es suficiente para incrementar la: proliferación, migración, e inducir la producción de MMP-9. Asimismo observamos la síntesis *de novo* de VEGF-A en las células generadas así como la inducción de angiogénesis y el desarrollo de tumores al ser inoculadas *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- [1] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th ed. 2000, p. 973.
- [2] M. Saxena and G. Christofori, "Rebuilding cancer metastasis in the mouse," *Molecular Oncology*, vol. 7. pp. 283–296, 2013.
- [3] D. Gomez and D. Alonso, *Introducción a la Oncología Molecular*. 1998, p. 208.
- [4] J. Folkman, "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 82. pp. 4–6, 1990.
- [5] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom, and E. A. De Bruijn, "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.," *Pharmacological Reviews*, vol. 56, pp. 549–580, 2004.
- [6] R. Roskoski and R. Roskoski Jr., "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 62, pp. 179–213, 2007.
- [7] W. J. Polacheck, I. K. Zervantonakis, and R. D. Kamm, "Tumor cell migration in complex microenvironments," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 70. pp. 1335–1356, 2013.
- [8] G. S. Wong and a K. Rustgi, "Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis.," *British Journal of Cancer*, vol. 108, pp. 755–61, 2013.
- [9] J. Trojanek, "Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors," *Postepy Biochem*, vol. 58, no. 3, pp. 353–62, 2012.
- [10] R. C. S. Figueira, L. R. Gomes, J. S. Neto, F. C. Silva, I. D. C. G. Silva, and M. C. Sogayar, "Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential.," *BMC Cancer*, vol. 9, p. 20, 2009.
- [11] L. Wang, D. Liu, Y. Chen, L. Hou, B. Wang, L. Mao, and S. Lu, "Relationship between lymph node metastasis and the expressions of E-cadherin, N-cadherin, and matrix metalloproteinase in breast carcinoma," *Ai zheng = Aizheng = Chinese Journal of Cancer*, vol. 21, pp. 965–969, 2002.
- [12] P. S. Steeg and D. Theodorescu, "Metastasis: a therapeutic target for cancer," *Nature Clinical Practice Oncology*, vol. 5, pp. 206–219, 2008.
- [13] P. Friedl and S. Alexander, "Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity," *Cell*, vol. 147. pp. 992–1009, 2011.
- [14] T. Valachovicova, V. Slivova, H. Bergman, J. Shuherk, and D. Sliva, "Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways.," *International Journal of Oncology*, vol. 25, pp. 1389–1395, 2004.
- [15] E. S. Hwang and H. J. Lee, "Phenylethyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress the metastasis of SK-Hep1 human hepatoma cells," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 17, pp. 837–846, 2006.
- [16] A. B. Al-Mehdi, K. Tozawa, A. B. Fisher, L. Shientag, A. Lee, and R. J. Muschel, "Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis.," *Nature Medicine*, vol. 6, pp. 100–102, 2000.
- [17] I. J. Fidler, "Critical determinants of metastasis.," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 12, pp. 89–96, 2002.

Bibliografía

- [18] M. Saez Bravo, D. Bosch, and P. Lara Jiménez, "Invasión y matástasis," *Biocancer*, vol. 1, 2004.
- [19] M. Viniegra, M. Paolino, and S. Arrossi, *Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control: diagnóstico de situación del Programa Nacional y programas Provinciales*. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud., 2010, p. 141.
- [20] K. Polyak, "Breast cancer: origins and evolution.," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, pp. 3155–3163, 2007.
- [21] A. Prado, P. Andrades, and F. Parada, "Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk," *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, vol. 63. pp. 1581–1587, 2010.
- [22] I. K. Wessler and C. J. Kirkpatrick, "The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways.," *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 14, pp. 423–434, 2001.
- [23] I. Wessler and C. J. Kirkpatrick, "Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans.," *British Journal of Pharmacology*, vol. 154, pp. 1558–1571, 2008.
- [24] I. Wessler, H. Kilbinger, F. Bittinger, R. Unger, and C. J. Kirkpatrick, "The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology," *Life Sciences*, vol. 72, pp. 2055–2061, 2003.
- [25] I. Wessler, C. J. Kirkpatrick, and K. Racké, "Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 77. pp. 59–79, 1998.
- [26] K. Kawashima and T. Fujii, "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance.," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 106, pp. 167–173, 2008.
- [27] T. I. Bonner, N. J. Buckley, A. C. Young, and M. R. Brann, "Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 237, pp. 527–532, 1987.
- [28] T. Kubo, K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, and K. Kangawa, "Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor.," *Nature*, vol. 323, pp. 411–6, 1986.
- [29] C. J. van Koppen and B. Kaiser, "Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling.," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 98, pp. 197–220, 2003.
- [30] N. Shah, S. Khurana, K. Cheng, and J.-P. Raufman, "Muscarinic receptors and ligands in cancer.," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 296, pp. C221–C232, 2009.
- [31] R. M. Eglén, "Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function," *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, vol. 26. pp. 219–233, 2006.
- [32] M. P. Caulfield and N. J. Birdsall, "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors.," *Pharmacological Reviews*, vol. 50, pp. 279–290, 1998.
- [33] M. J. Marinissen and J. S. Gutkind, "G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 22. pp. 368–376, 2001.

Bibliografía

- [34] L. Zieher, J. Tessler, H. Serra, F. Devoto, and R. Iannantuono, *Farmacología general. Farmacodinamia II*, 2nd ed. 2008, pp. 65–111.
- [35] E. R. Spindel, “Muscarinic receptor agonists and antagonists: Effects on cancer,” *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 208, pp. 451–468, 2012.
- [36] H. Frucht, R. T. Jensen, D. Dexter, W. L. Yang, and Y. Xiao, “Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor.,” *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 5, pp. 2532–2539, 1999.
- [37] W. Rayford, M. J. Noble, M. A. Austenfeld, J. Weigel, W. K. Mebust, and G. V. Shah, “Muscarinic cholinergic receptors promote growth of human prostate cancer cells,” *Prostate*, vol. 30, pp. 160–166, 1997.
- [38] A. Español, A. M. Eiján, E. Mazzoni, L. Davel, M. A. Jasnís, E. Sacerdote De Lustig, and M. E. Sales, “Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines.,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 9, pp. 651–657, 2002.
- [39] L. E. Rimmaudo, E. De La Torre, E. Sacerdote De Lustig, and M. E. Sales, “Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 334, pp. 1359–1364, 2005.
- [40] G. L. Fiszman and M. E. Sales, “Antibodies Against Muscarinic Receptors in Breast Cancer: Agonizing Tumor Growth,” *Current Immunology Reviews*, vol. 4, no. 3, pp. 176–182, 2008.
- [41] G. L. Fiszman, M. C. Middonno, E. de la Torre, M. Farina, A. J. Español, and M. E. Sales, “Activation of muscarinic cholinergic receptors induces MCF-7 cells proliferation and angiogenesis by stimulating nitric oxide synthase activity.,” *Cancer Biology & Therapy*, vol. 6, pp. 1106–1113, 2007.
- [42] L. T. Pelegrina, M. G. Lombardi, G. L. Fiszman, M. E. Azar, C. C. Morgado, and M. E. Sales, “Immunoglobulin G from breast cancer patients regulates MCF-7 cells migration and MMP-9 activity by stimulating muscarinic acetylcholine receptors,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 33, pp. 427–435, 2013.
- [43] M. G. Lombardi, M. P. Negroni, L. T. Pelegrina, M. E. Castro, G. L. Fiszman, M. E. Azar, C. C. Morgado, and M. E. Sales, “Autoantibodies against Muscarinic Receptors in Breast Cancer: Their Role in Tumor Angiogenesis,” *PLoS ONE*, vol. 8, 2013.
- [44] T. R. Chen, “In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain.,” *Experimental Cell Research*, vol. 104, pp. 255–262, 1977.
- [45] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.,” *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [46] H. D. Soule, T. M. Maloney, S. R. Wolman, W. D. Peterson, R. Brenz, C. M. McGrath, J. Russo, R. J. Pauley, R. F. Jones, and S. C. Brooks, “Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10.,” *Cancer Research*, vol. 50, pp. 6075–6086, 1990.
- [47] J. Beckmann and K. S. Lips, “The non-neuronal cholinergic system in health and disease,” *Pharmacology*, vol. 92, pp. 286–302, 2014.
- [48] M. E. Sales, “Muscarinic receptors as targets for anti-inflammatory therapy.,” *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, vol. 11, pp. 1239–1245, 2010.

Bibliografía

- [49] L. Paleari, A. Grozio, A. Cesario, and P. Russo, "The cholinergic system and cancer," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 18, pp. 211–217, 2008.
- [50] G. Xie, K. Cheng, J. Shant, and J.-P. Raufman, "Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 296, pp. G755–G763, 2009.
- [51] P. Song, H. S. Sekhon, A. Lu, J. Arredondo, D. Sauer, C. Gravett, G. P. Mark, S. A. Grando, and E. R. Spindel, "M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion," *Cancer Research*, vol. 67, pp. 3936–3944, 2007.
- [52] M. P. Negroni, G. L. Fisman, M. E. Azar, C. C. Morgado, A. J. Español, L. T. Pelegrina, E. de la Torre, and M. E. Sales, "Immunoglobulin G from breast cancer patients in stage I stimulates muscarinic acetylcholine receptors in MCF7 cells and induces proliferation. Participation of nitric oxide synthase-derived nitric oxide," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 30, pp. 474–484, 2010.
- [53] J. P. Raufman, R. Samimi, N. Shah, S. Khurana, J. Shant, C. Drachenberg, G. Xie, J. Wess, and K. Cheng, "Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia," *Cancer Research*, vol. 68, pp. 3573–3578, 2008.
- [54] H. Bräuner-Osborne, B. Ebert, M. R. Brann, E. Falch, and P. Krogsgaard-Larsen, "Functional partial agonism at cloned human muscarinic acetylcholine receptors," *European Journal of Pharmacology*, vol. 313, pp. 145–150, 1996.
- [55] B. Nicke, K. Detjen, and C. D. Logsdon, "Muscarinic cholinergic receptors activate both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 21701–21706, 1999.
- [56] S. K. Khattar, R. S. Bora, P. Priyadarsiny, A. Gautam, D. Gupta, A. Tiwari, K. Nanda, R. Singh, A. Chugh, V. Bansal, K. Mookhtiar, and K. S. Saini, "Molecular cloning, stable expression and cellular localization of human alpha1-adrenergic receptor subtypes: effect of charcoal/dextran treated serum on expression and localization of alpha1D-adrenergic receptor," *Biotechnology Letters*, vol. 28, pp. 1731–1739, 2006.
- [57] E. Jimenez and M. Montiel, "Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 204, pp. 678–686, 2005.
- [58] A. I. Chernyavsky, V. T. Nguyen, J. Arredondo, A. Ndoye, S. Zia, J. Wess, and S. A. Grando, "The M4 muscarinic receptor-selective effects on keratinocyte crawling locomotion," *Life Sciences*, vol. 72, pp. 2069–2073, 2003.
- [59] C. C. Chiu, B. H. Chen, T. C. Hour, W. F. Chiang, Y. J. Wu, C. Y. Chen, H. R. Chen, P. T. Chan, S. Y. Liu, and J. Y. F. Chen, "Betel quid extract promotes oral cancer cell migration by activating a muscarinic M4 receptor-mediated signaling cascade involving SFKs and ERK1/2," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 399, pp. 60–65, 2010.
- [60] S. Zhang, S. Togo, K. Minakata, T. Gu, R. Ohashi, K. Tajima, A. Murakami, S. Iwakami, J. Zhang, C. Xie, and K. Takahashi, "Distinct roles of cholinergic receptors in small cell lung cancer cells," *Anticancer Research*, vol. 30, pp. 97–106, 2010.
- [61] E. A. Parnell, I. E. Calleja-Macias, M. Kalantari, S. A. Grando, and H. U. Bernard, "Muscarinic cholinergic signaling in cervical cancer cells affects cell motility via ERK1/2 signaling," in *Life Sciences*, 2012, vol. 91, pp. 1093–1098.

Bibliografía

- [62] B. S. Wiseman and Z. Werb, "Stromal effects on mammary gland development and breast cancer.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, pp. 1046–1049, 2002.
- [63] M. J. Bissell and M. A. Labarge, "Context, tissue plasticity, and cancer: Are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?," *Cancer Cell*, vol. 7, pp. 17–23, 2005.
- [64] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.," *Nature*, vol. 432, pp. 332–337, 2004.
- [65] M. D. Sternlicht, A. Lochtest, C. J. Simpson, B. Huey, J. P. Rougier, J. W. Gray, D. Pinkel, M. J. Bissell, and Z. Werb, "The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis," *Cell*, vol. 98, pp. 137–146, 1999.
- [66] M. J. Paszek, N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver, "Tensional homeostasis and the malignant phenotype," *Cancer Cell*, vol. 8, pp. 241–254, 2005.
- [67] J. T. Erler and V. M. Weaver, "Three-dimensional context regulation of metastasis," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 26, pp. 35–49, 2009.
- [68] K. R. Levental, H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. T. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser, and V. M. Weaver, "Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling," *Cell*, vol. 139, pp. 891–906, 2009.
- [69] K. Kessenbrock, V. Plaks, and Z. Werb, "Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment," *Cell*, vol. 141, pp. 52–67, 2010.
- [70] A. John and G. Tuszynski, "The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis.," *Pathology Oncology Research: POR*, vol. 7, pp. 14–23, 2001.
- [71] L. E. Littlepage, M. D. Sternlicht, N. Rougier, J. Phillips, E. Gallo, Y. Yu, K. Williams, A. Brenot, J. I. Gordon, and Z. Werb, "Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression," *Cancer Research*, vol. 70, pp. 2224–2234, 2010.
- [72] S. Koch, C. M. Volkmar, V. Kolb-Bachofen, H. G. Korth, M. Kirsch, A. H. C. Horn, H. Sticht, N. Pallua, and C. V. Suschek, "A new redox-dependent mechanism of MMP-1 activity control comprising reduced low-molecular-weight thiols and oxidizing radicals," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, pp. 261–272, 2009.
- [73] P. P. Provenzano, D. R. Inman, K. W. Eliceiri, J. G. Knittel, L. Yan, C. T. Rueden, J. G. White, and P. J. Keely, "Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression.," *BMC Medicine*, vol. 6, p. 11, 2008.
- [74] D. C. Radisky and M. J. Bissell, "Matrix metalloproteinase-induced genomic instability," *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 16, pp. 45–50, 2006.
- [75] Q.-W. Wu, Q.-M. Yang, Y.-F. Huang, H.-Q. She, J. Liang, Q.-L. Yang, and Z.-M. Zhang, "Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer.," *PLoS ONE*, vol. 9, p. e97804, 2014.
- [76] C. Mehner, A. Hockla, E. Miller, S. Ran, D. C. Radisky, and E. S. Radisky, "Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer.," *Oncotarget*, vol. 5, pp. 2736–49, 2014.

Bibliografía

- [77] G. Lin, L. Sun, R. Wang, Y. Guo, and C. Xie, "Overexpression of Muscarinic Receptor 3 Promotes Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 9, pp. 170–178, 2014.
- [78] M. Egeblad, L. E. Littlepage, and Z. Werb, "The fibroblastic coconspirator in cancer progression," in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2005, vol. 70, pp. 383–388.
- [79] M. M. Mueller and N. E. Fusenig, "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 4, pp. 839–849, 2004.
- [80] B. V and C. G, "The angiogenic switch in carcinogenesis," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 19, no. 5, pp. 329–37, 2009.
- [81] H. Y. Chang, J. B. Sneddon, A. A. Alizadeh, R. Sood, R. B. West, K. Montgomery, J. T. Chi, M. Van De Rijn, D. Botstein, and P. O. Brown, "Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: Similarities between tumors and wounds," *PLoS Biology*, vol. 2, 2004.
- [82] D. J. Hicklin and L. M. Ellis, "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis.," *Journal of Clinical Oncology*: *Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 23, pp. 1011–1027, 2005.
- [83] J. A. Nagy, A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak, "VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis.," *Annual Review of Pathology*, vol. 2, pp. 251–275, 2007.
- [84] L. J. A. C. Hawinkels, K. Zuidwijk, H. W. Verspaget, E. S. M. de Jonge-Muller, W. van Duijn, V. Ferreira, R. D. Fontijn, G. David, D. W. Hommes, C. B. H. W. Lamers, and C. F. M. Sier, "VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis," *European Journal of Cancer*, vol. 44, pp. 1904–1913, 2008.
- [85] A.-P. Meert, M. Paesmans, B. Martin, P. Delmotte, T. Berghmans, J.-M. Verdebout, J.-J. Lafitte, C. Mascaux, and J.-P. Sculier, "The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis.," *British Journal of Cancer*, vol. 87, pp. 694–701, 2002.
- [86] G. Fizman, V. Cattaneo, E. de la Torre, A. Español, L. Colombo, E. Sacerdote de Lustig, and M. E. Sales, "Muscarinic receptors autoantibodies purified from mammary adenocarcinoma-bearing mice sera stimulate tumor progression," *International Immunopharmacology*, vol. 6, pp. 1323–1330, 2006.
- [87] G. P. W. Chan, E. H. T. Wu, and Y. H. Wong, "Regulation of mTOR and p70 S6 kinase by the muscarinic M4 receptor in PC12 cells," *Cell Biology International*, vol. 33, pp. 230–238, 2009.
- [88] L. F. Parada, C. J. Tabin, C. Shih, and R. A. Weinberg, "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene.," *Nature*, vol. 297, pp. 474–478, 1982.
- [89] S. Pulciani, E. Santos, A. V Lauer, L. K. Long, K. C. Robbins, and M. Barbacid, "Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, pp. 2845–2849, 1982.
- [90] E. Santos, S. R. Tronick, S. A. Aaronson, S. Pulciani, and M. Barbacid, "T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes.," *Nature*, vol. 298, pp. 343–347, 1982.

Bibliografía

- [91] J. S. Gutkind, E. A. Novotny, M. R. Brann, and K. C. Robbins, "Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, pp. 4703–4707, 1991.