



**Lic. Enrique P. García**

**Rol de la mucina MUC5B en la  
tumorigenicidad del cáncer de mama  
como posible blanco en su tratamiento.**

**Maestría en Ciencias Biológicas – PEDECIBA  
Opción: Biología Celular & Molecular**

**Tutor: Dra. Teresa Freire  
Co-tutor: Dr. Eduardo Osinaga**



**12 de diciembre, 2013.**

**Laboratorio de Oncología Básica & Biología Molecular  
Departamento de Inmunobiología  
Facultad de Medicina – Universidad de la República**

## Agradecimientos

A la Prof. Adj. Dra. Teresa Freire, por su incansable trabajo, conocimiento, constancia, dedicación a mi trabajo de tesis; y por su esfuerzo e interés por mi formación como estudiante y persona.

Al Prof. Dr. Eduardo Osinaga por haberme abierto las puertas en el Uruguay, haberme motivado a iniciar y guiarme en este proceso.

A la MSc. Verónica Noya, compañera de trabajo, referente, cómplice y desde hace tiempo amiga de la vida.

A mis compañeros de laboratorio del Depto de Inmunobiología: Carolina Chiale, Ernesto Rodríguez, Natalie Brossard, Ma Florencia Festari, Luis Ubillos, Manuel Dávila, Ana Laura Cabrera, Leticia Monin, Claudia Schwartzman, Carlos Jacoel, Mariana Silveira y Mónica Silvera quienes me acompañaron durante estos años.

Al LOBBM: a los estudiantes y profesores del Depto de Bioquímica, Genética, Histología y funcionarios del laboratorio por el apoyo, el buen ambiente y el día a día.

A la MSc. Gabriela Libisch, MSc. Gerard Hernández y el Dr. Carlos Robello por su valiosísima ayuda en las qRT-PCRs, pieza fundamental para desarrollar esta tesis.

Al Lic. Ernesto Rodríguez, por su trabajo en los inmunoensayos con lectinas.

A la MSc. Ines Tiscornia y Dra Mariela Bollati por su trabajo en la modulación de DCs.

A la Dra Rossana Sapiro, Dr. Gonzalo Peluffo, Dra. Lucia Piacenza y MSc Maria Laura Chiribao por su asistencia con la microscopía fluorescente.

A mi novia Magdalena Sprechmann por su paciencia, ayuda, consejos, cariño y amistad; por ser andamio de mis emprendimientos.

A mis hermanos Gonzalo y Mateo y mis padres por haber estado, por sus enseñanzas, valores y sostén.

A mis amigos y a mis compañeros de Fac. de Medicina, alimento de mi motivación.

Al Dr Rosen de Berea College y al Dr Joseph Amann, Dr David Carbone y Dr Hal Moses de Vanderbilt University por su ayuda, por haber confiado y por haberme iniciado en mi carrera científica.

A la ANII, la Comisión Académica de Posgrado y la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer por el apoyo económico.

A la Universidad de la República por mi formación como científico y médico.

A todo este equipo, muchas gracias!!!

# Indice

<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>7</b>
I.    Cáncer.....	7
I.1. Generalidades y Estadística.....	7
I.2. Características biológicas generales del cáncer.....	7
I.3. Tratamientos contra el Cáncer.....	10
I.4. Cáncer de mama.....	11
II.   Glicosilación .....	12
II.1. Generalidades.....	12
II.2. O-glicosilación de tipo mucina.....	14
III.  Mucinas.....	15
III.1. Estructura y funciones fisiológicas de las mucinas.....	15
III.2. Mucinas y su rol en la transformación maligna.....	19
III.3. MUC1 y MUC4 en cáncer.....	20
III.4. Funciones de mucinas en cáncer.....	22
III.5. Antígenos carbohidratos asociados a tumor presentes en mucinas.....	22
III.6. Resistencia a tratamientos quimioterapéuticos debido a la expresión de mucinas en cáncer.....	24
IV.   MUC5B.....	25
IV.1. Estructura, expresión y función de MUC5B.....	25
IV.2. Expresión de MUC5B en cáncer de mama.....	26
IV.3. Regulación génica de MUC5B.....	27
V.    Mucinas como posibles blancos de tratamiento contra el cáncer.....	28
V.1. Modulación del sistema inmune por células tumorales.....	28
V.2. Capacidad de mucinas para modular el sistema inmune.....	29
V.3. Vacunas basadas en mucinas.....	30
V.4. Terapia génica.....	30
<b>Hipótesis.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos:.....</b>	<b>34</b>
Objetivos generales.....	34
Objetivos específicos.....	34
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>35</b>
I.    Cultivo celular.....	35
II.   Inhibición de la expresión del gen MUC5B.....	35
II.1. Características de plásmidos utilizados.....	35
II.2. Transformación bacteriana con plásmidos codificantes.....	37
II.3. Purificación del ADN plasmídico.....	37

II.4. Transfección de plásmidos en células MCF7 <i>wt</i> .....	38
II.5. Selección de transfectantes.....	38
III. Detección de la inhibición de MUC5B por PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	38
III.1. Purificación de ARN.....	38
III.2. Síntesis de ADN copia.....	39
III.3. Amplificación por qRT-PCR.....	39
IV. Determinación de la expresión proteica de MUC5B por inmunocitoquímica.....	40
V. Evaluación del crecimiento celular por viabilidad.....	40
VI. Determinación de apoptosis y necrosis por citometría de flujo.....	40
VII. Determinación de la capacidad de formación de colonias.....	41
VIII. Determinación de la adhesión celular.....	41
IX. Evaluación de la muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos.....	42
X. Identificación de estructuras glucídicas.....	42
X.1. Producción y cuantificación de extractos proteicos a partir de células MOCK y MUC5Bsi.....	42
X.2. Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas con lectinas.....	42
XI. Estudio de efectos inmunomodulatorios con células dendríticas.....	43
XI.1. Preparación de medio condicionado.....	43
XI.2. Evaluación de la modulación de células dendríticas.....	43
XI.3. Estudio de la expresión de moléculas de co-estimulación.....	44
XI.4. Cuantificación de citoquinas producidas.....	44
<b>Resultados.....</b>	<b>45</b>
I. Evaluación de la expresión endógena de MUC5B en MCF7 <sub>wt</sub> .....	45
II. Selección de células transfectadas con geneticina.....	46
III. Expresión de MUC5B en MUC5Bsi y MOCK por qRT-PCR.....	46
IV. Expresión de MUC5B en MUC5Bsi y MOCK por inmunocitoquímica.....	47
V. Características morfológicas distintivas.....	48
VI. Evaluación del crecimiento celular a través de la determinación de la viabilidad celular.....	49
VII. Identificación del tipo de muerte de las células MOCK y MUC5Bsi.....	50
VIII. Capacidad de formación de colonias.....	51
IX. Capacidad de adhesión celular.....	52

X. Susceptibilidad a la muerte celular inducida por drogas quimioterapéuticas.....	53
XI. Identificación del perfil glucídico de células MOCK y MUC5Bsi.....	55
XII. Immunomodulación de células dendríticas por células MOCK y MUC5Bsi.....	56
<b>Discusión.....</b>	<b>63</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>71</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>72</b>

## Resumen

El cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres, y es la segunda causa de muertes en países con adecuado nivel socio-económico. La inmunoterapia y la terapia génica son alternativas prometedoras para el tratamiento contra el cáncer. Las mucinas son proteínas extracelulares grandes, altamente glicosiladas con complejos oligosacáridos que actúan como una barrera molecular selectiva en la superficie epitelial y participan en la transducción de señales morfogenéticas. La elongación incompleta de las cadenas sacáridas O-glicanas llevan a la expresión de antígenos carbohidratos, siendo el antígeno Tn el más comúnmente expresado (90 % de carcinomas humanos). La expresión aberrante de MUC5B en cáncer de mama, al igual que la posible relación con el antígeno Tn, hacen de esta proteína un blanco interesante de estudio.

Para evaluar el rol que esta apomucina pueda llegar a tener en la capacidad tumoral de células de cáncer mamario, silenciámos -usando shARN- la expresión de MUC5B en una línea celular estable de cáncer de mama humano (MCF7). Evaluamos la viabilidad celular, la capacidad de adhesión y de formación de colonias, y aspectos morfológicos de la línea silenciada (MUC5Bsi) comparada con el control (MOCK). Luego, por medio de lectinas biotiniladas, se caracterizó el perfil de estructuras glucídicas presentes en la línea celular inhibida. Además se evaluó la viabilidad celular de las células silenciadas luego de expuestas a los agentes quimioterapéuticos: 5-Fluoracilo y Cisplatino. Por último, se estudió una posible capacidad inmunomodulatoria de MUC5B sobre células dendríticas, evaluando la expresión de moléculas co-estimuladoras y producción de citoquinas en las mismas.

Los resultados que presentamos en esta tesis de maestría sugieren que la apomucina MUC5B juega un rol en la tumorigenicidad de las células de cáncer mamario. Las células MUC5Bsi mostraron una menor viabilidad, capacidad de formación de colonias y adhesión que las células MOCK. Al mismo tiempo vimos que las MUC5Bsi mostraban una menor viabilidad al incubarse con 5-Fluoracilo y Cisplatino comprado con las MOCK. Por último se vio que la apomucina podría alterar el patrón de expresión de moléculas de co-estimulación de células dendríticas y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Actualmente se está llevando a cabo experimentos *in vivo*, para evaluar a MUC5B como posible blanco terapéutico.

# **Introducción**

## **I. Cáncer:**

### **I.1. Generalidades y estadística:**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por un deterioro patológico del proceso que controla la proliferación, diferenciación y muerte celular, llevando a un crecimiento celular descontrolado y anormal (1). El sello distintivo del cáncer se basa en seis capacidades biológicas adquiridas durante la transformación maligna: señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores tumorales, resistencia a la muerte celular, capacidad replicativa inmortal, inducción de angiogénesis, y por último invasión celular y metástasis (2). Hay evidencia significativa que sugiere que dos capacidades biológicas adicionales pueden estar involucradas en la patogénesis de muchos cánceres: la capacidad para reprogramar el metabolismo celular y la capacidad para evadir el sistema inmune (2).

En el ámbito de la salud mundial, el cáncer se encuentra entre las enfermedades de mayor impacto. Los problemas en torno al cáncer se han duplicado en los últimos 30 años. Se estima que en el año 2008 hubo 12,7 millones de casos nuevos (6,6 en hombres y 6,0 en mujeres), 7 millones de muertes, y se calcula que 25 millones de personas confrontan hoy esta enfermedad (3).

### **I.2. Características biológicas generales del cáncer:**

A continuación se describen los rasgos distintivos del cáncer mencionados anteriormente:

#### **A) Señalización proliferativa sostenida:**

Las células de tejidos normales mantienen un cuidadoso control en la producción y secreción de señales promotoras de crecimiento que se encargan de mantener homeostáticamente el crecimiento y la división celular. Las células cancerosas adquieren una capacidad sostenida de señalización proliferativa. Esto lo pueden lograr por acción proliferativa autócrina, o alternativamente estimulando células normales dentro de su ambiente tumoral para que les provean factores de crecimiento (4, 5). Las células cancerosas también pueden aumentar el número de receptores expresados en la superficie celular generando así una hiper-reactividad a estímulos normales (2).

### B) Evasión de supresores tumorales:

Las células cancerosas adquieren la capacidad de evadir los programas que las células normales poseen para regular negativamente la proliferación celular, la cual depende mayoritariamente de las acciones de los genes supresores de tumores. Dentro de los varios supresores de tumores, los de mayor relevancia son el gen TP53 y el RB (retinoblastoma), los cuales gobiernan las decisiones celulares de proliferar o activar la senescencia y apoptosis según la circunstancia en que se encuentre la célula. La proteína RB, en respuestas a diversas señales intra- y extra-celulares, decide si una célula debe o no proseguir a través del ciclo celular (6). En el cáncer, este punto de restricción está ausente, permitiendo a la célula transitar su ciclo celular de manera permanentemente proliferativa (2). La proteína TP53 recibe estímulos anormales de procesos intra-celulares que han sido alterados, y es la encargada en detener el ciclo celular hasta que se repare el daño que está sensando. En el caso que sea un daño irreparable, la TP53 puede inducir apoptosis, evitando así que células con daños genéticos se repliquen. En las células cancerosas este “guardián del genoma” se encuentra alterado permitiendo así que las células se mantengan replicando sin haber reparado sus daños celulares (2).

### C) Resistencia a la muerte celular:

El concepto de apoptosis, muerte celular programada, ha sido considerado como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer (7, 8). Durante el proceso de apoptosis, la célula recibe estímulos de muerte tanto extra- como intra-celulares, que culminan con la activación de proteasas latentes (caspasas). Estas inician los procesos proteolíticos, los que llevarán a un progresivo y controlado desensamblado celular para luego ser fagocitada por células vecinas y fagocitos profesionales. Durante la transformación maligna las células cancerosas desarrollan una variedad de tácticas para evadir la apoptosis. La estrategia más común es la pérdida de la función del supresor de tumores más importante del genoma, el p53 (2). Otra estrategia para evadir la apoptosis es sobre-expresar reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x) y señales de sobrevida (Igf 1/2), o regular en menos factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) (2).

### D) Capacidad replicativa inmortal:

Para que las células cancerosas logren generar tumores macroscópicos, deben adquirir un potencial replicativo ilimitado (9). En las células normales esto no ocurre, ya que

atraviesan el ciclo celular un número limitado de veces. Ello se debe concretamente a dos procesos: primero senescencia, y posteriormente, muerte celular. Los telómeros, compuestos por repeticiones de hexanucleótidos, se encuentran en los extremos de los cromosomas y están destinados a proteger el material genético. En las células no inmortalizadas, los telómeros se irán reduciendo con cada pasaje del ciclo celular, llevando a la eventual pérdida de su función protectora de ADN, causándole la muerte (9). Por ende, la longitud de los telómeros va a determinar cuantos ciclos de replicación consecutivos una célula va a soportar antes de generarle daño genético irreversible. La telomerasa, una polimerasa de ADN que adhiere segmentos de repeticiones a los extremos de los telómeros en el ADN, está mayoritariamente ausente en células no inmortales, pero se ha visto presente en el 90 % de las células inmortales, incluyendo cáncer (2, 9). Esto explicaría porque las células cancerosas no erosionan sus telómeros, permitiéndoles así evadir la muerte.

#### E) Angiogénesis:

De igual manera que en los tejidos normales, los tumores requieren suministro de nutrientes, oxígeno y descarte de desechos de manera sostenida. La neovasculatura tumoral brinda la solución a esta necesidad imprescindible para la sobrevivencia del tumor. Durante la embriogénesis, se dan los procesos de vasculogénesis (nacimiento de células endoteliales y su ensamblado en tubos) y angiogénesis (brotes de nuevos vasos a partir de vasos pre-existentes) que luego de formados, se mantienen quiescentes. En el adulto, de manera transitoria, la angiogénesis se activa durante ciertos procesos fisiológicos tales como el ciclo reproductivo de la mujer o en el curado de heridas. Por el contrario, en los tumores, la activación angiogénica es mantenida, generando de manera constante brotes de nuevos vasos (10). El factor más importante de inducción angiogénica es el VEGF-A (vascular endotelial growth factor – A), que puede ser sobre-expresado por medio de señalización oncogénica (2).

#### F) Invasión y metástasis:

El grado patológico de malignidad de una célula cancerosa se ve reflejado en la invasión local y metástasis a distancia que la misma exhibe. La alteración mejor caracterizada consiste en la pérdida de la E-caderina, que es una de las moléculas clave en la adhesión celular (11). Durante la transformación maligna, existe una regulación en menos de la E-caderina, facilitando así el desprendimiento de células cancerosas de un tumor primario (11, 12). También hay moléculas vinculadas a la migración celular, tales como la N-caderina, las

cuales se han visto sobre-expresadas en varios carcinomas invasivos (12). El proceso de invasión y metástasis consiste en una secuencia de cambios patológicos que comienza con invasión local, intravasación de células cancerosas a vasos sanguíneos y sistema linfático, tránsito de estas células por los sistemas circulatorios, seguido por extravasación a través de los vasos en un parénquima distante, formación de pequeños nódulos (micrometástasis), finalizando con el crecimiento de las micrometástasis en tumores macroscópicos (13).

### G) Evasión del Sistema Inmune:

Uno de los sellos distintivos del cáncer es su capacidad de evadir el sistema inmune del huésped (2). Fisiológicamente, el sistema inmune tiene la función de monitorizar, reconocer y eliminar a la gran mayoría de los cánceres incipientes. Los tumores, por mecanismos aún no completamente elucidados, logran evadir el sistema inmune y mediar su sobrevida. Una de las estrategias consiste en la secreción por parte de tumores de factores inmunosupresores, como TGF- $\beta$ , que disminuyen la infiltración de células Natural Killer (NK) y linfocitos T citotóxicos (14, 15). También existe el reclutamiento de células con funciones inmunosupresoras al microambiente tumoral, tales como las células T reguladoras y las células mieloides supresoras (MDSC) (16, 17). Estos mecanismos propios de los tumores, les permiten modular su microambiente y suprimir la inmunovigilancia del huésped.

## **I.3. Tratamientos contra el cáncer:**

El cáncer es una enfermedad multifactorial derivada tanto de factores externos (tabaquismo, radiación, infecciones) e internos (mutaciones, condiciones inmunes y hormonales, entre otros). Estos factores pueden actuar simultánea o secuencialmente para iniciar y promover la carcinogénesis. Esta patología en alguno de los casos es prevenible si se identifican y se reduce la exposición a los factores de riesgo. Dentro de los tratamientos del cáncer se encuentran: cirugía, radiación, quimioterapia, hormono e inmunoterapia (3, 18).

La quimioterapia consiste en la administración de drogas citotóxicas (existen 20-30 tipos) para inducir la muerte celular (3). Si bien esta terapia mejora significativamente la sobrevida de diferentes tipos de cáncer, provoca una serie de efectos colaterales tales como neutropenia, anemia, trombocitopenia, alopecia y la inducción de apoptosis de células gastrointestinales (que degeneran en ulceración oral y diarrea), entre otras (3). La intervención quirúrgica como tratamiento oncológico es una medida que depende de la naturaleza y estadio de la enfermedad. La optimización de este tratamiento requiere de la coordinación con otras

modalidades, y muchas veces los riesgos no justifican los beneficios de la misma. La radioterapia consiste en el uso de radiación de alta energía para matar células cancerosas como consecuencia del daño a nivel de ADN que les provoca. Este tipo de tratamiento es requerido por más del 50% de los pacientes con cáncer, y si bien ha habido grandes avances en el tema de calidad y seguridad en los pacientes, se sigue trabajando para reducir la morbilidad inducida por la radiación (3). La hormono e inmunoterapia, en algunos casos, podrían constituir alternativas más eficientes que los tratamientos convencionales con el beneficio adicional de no generar efectos secundarios graves (3).

#### **I.4. Cáncer de mama:**

El cáncer de mama fue el segundo cáncer más prevalente en 2008 con 1.4 millones de casos nuevos. En mujeres, el cáncer mamario fue el más común representando un 22,9% del total de los cánceres (3). Si bien el número de casos diagnosticados estuvo igualmente distribuido entre países desarrollados y en vías de desarrollo (50 % en cada caso), fue y aún sigue siendo la segunda causa más importante de muertes totales en países en desarrollo (269,000 muertes en países en desarrollo, 189,000 muertes en países desarrollados (3). En 2008 el Uruguay se ubicó 8° a nivel mundial en incidencia de cáncer de mama, con una prevalencia de 90.7 casos cada 100,000 habitantes y una mortalidad de 24.3 cada 100,000 habitantes (1). En el período de 2003-2005 hubo un promedio de cáncer de mama de 1800 casos por año, ocasionando 643 muertes por año (19).

Con respecto a su tratamiento, existen alternativas quirúrgicas, hormonales e inmunológicas. En el caso de un cáncer mamario hereditario se puede realizar una mastectomía bilateral de forma profiláctica, reduciendo significativamente la probabilidad de contraerlo (20). El tratamiento en el cáncer de mama infraclínico (lesiones malignas detectadas en ausencia de síntomas) consiste en la cirugía conservadora (tumorectomía o cuadrantectomía y linfadenectomía) (21). Existen también ciertos cánceres dependientes de hormonas esteroideas: estrógenos y progesterona, siendo el cáncer de mama uno de ellos. El tamoxifeno es un anti-estrógeno no esteroideo usado para antagonizar los efectos del estrógeno y se usa tanto para la prevención como para el tratamiento de cánceres mamarios positivos para receptores de estrógenos (22). Otra posibilidad es que un cáncer mamario sea positivo para Her-2/neu (proteína de factor de crecimiento sobre-expresada en distintos cánceres), lo cual sería de mal pronóstico. Hoy en día contamos con un anticuerpo

monoclonal, trastuzumab, que bloquea la acción del Her-2/neu, neutralizando su función proliferativa (23).

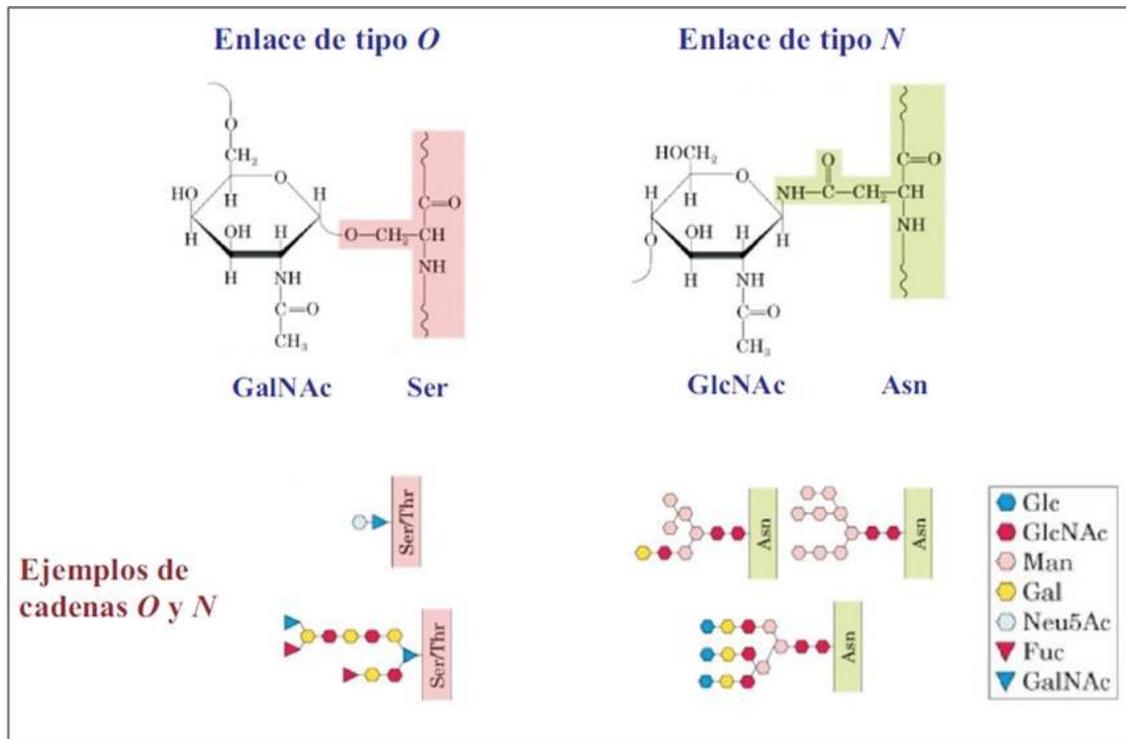
## **II. Glicosilación:**

### **II.1. Generalidades:**

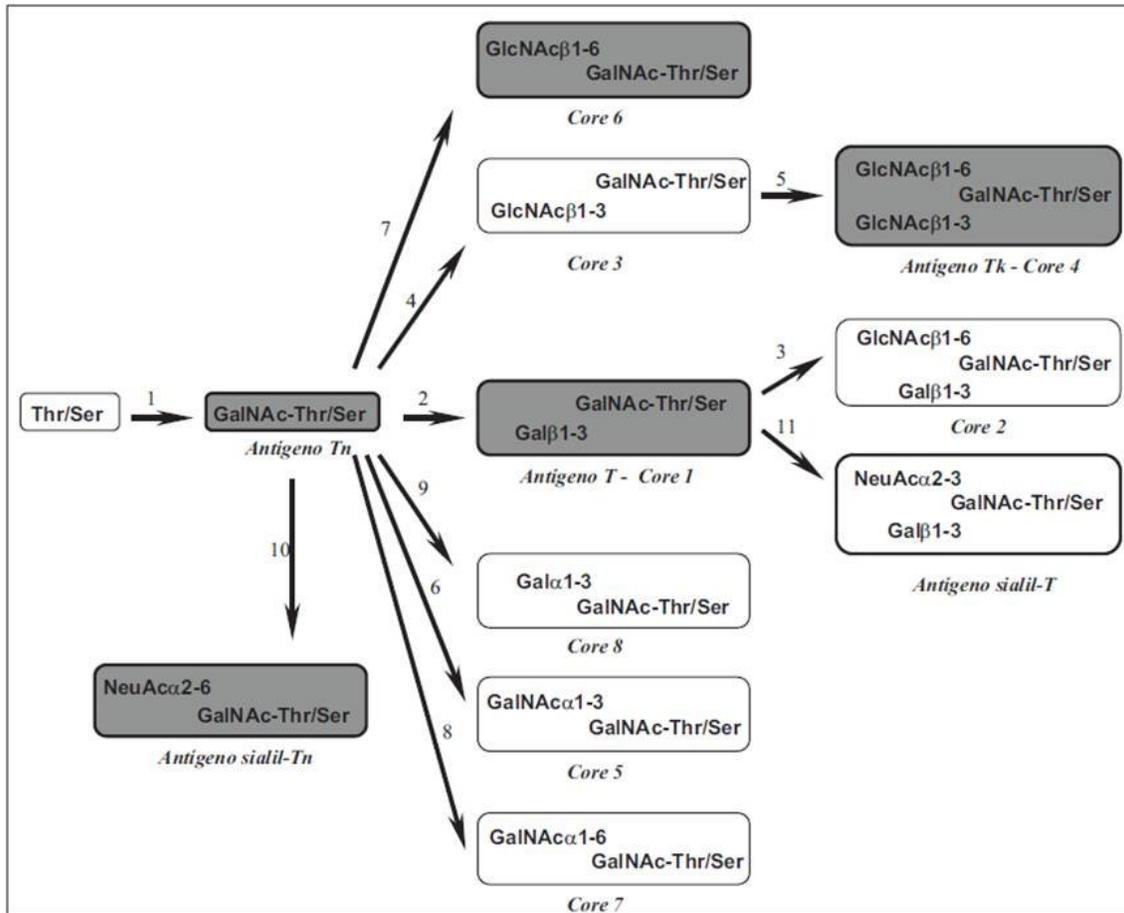
La inmensa mayoría de las proteínas se ven involucradas en algún tipo de cambio postraduccional. La gama de modificaciones postraduccionales (MPT) es amplia, impactando en todas las áreas de la biología celular. Las MPT mejor caracterizadas son: glicosilación, fosforilación, ubiquitinación, metilación y palmitilación (24). Una característica que todas comparten es que ninguna de estas MPT están codificadas en el ADN celular, ya que son el producto de reacciones enzimáticas. En el proceso de glicosilación, hay alrededor de 250 enzimas involucradas, lo cual a su vez utiliza cerca del 2% del genoma humano para codificarlas (25). Ocurre por lo general en la mayoría de proteínas eucariotas (26) y consta de la adición y/o eliminación de carbohidratos en residuos aminoácidos (27). La glicosilación cumple funciones importantes tales como: control sobre el plegado proteico, interacción celular, protección ante proteínas de degradación enzimática, y traducción de señales (28).

En mamíferos, la glicosilación puede dividirse en dos grandes tipos: N-glicosilación y O-glicosilación. En la N-glicosilación una molécula de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) se adiciona al grupo amida de un residuo de asparagina en una secuencia aminoácida Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (28). Todos los oligosacáridos ensamblados a partir de una N-glicosilación contienen manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc), y por lo general están compuestos por varias ramas de oligosacáridos cada uno pudiendo terminar en ácido siálico negativamente cargado (Figura 1) (28). Por otro lado, el proceso de la O-glicosilación comienza con la adición de un monosacárido, N-acetil-galactosamina (GalNAc), transferido desde la UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina (formando un enlace O-glucosídico), en reacción catalizada por las UDP-GalNAc-polipeptidil transferasas (Figura 1) (29). La ubicación subcelular en donde se lleva a cabo esta reacción es la región proximal del aparato de Golgi (30). Luego que la proteína pasa a la región distal del Golgi, se da el proceso de elongación que consiste en la adición de galactosa (Gal), GlcNAc o GalNAc a la GalNAc, lo cual lleva a generar distintas estructuras denominadas “cores” o núcleos (Figura 2) (28). La biosíntesis de los típicos oligosacáridos O-glicanos es completada por la adición de dos ácidos siálicos (N-

acetil-neuramínico) provenientes de un precursor CMP-acido siálico; reacción que también se lleva a cabo en la red trans del Golgi.



**Figura 1 – Glicosilación General:** La glicosilación puede dividirse en dos grandes tipos: O-glicosilación y N-glicosilación. La O-glicosilación comienza con la adición de un monosacárido, N-acetil-galactosamina (GalNAc), transferido desde la UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina (formando un enlace O-glucosídico), en reacción catalizada por las UDP-GalNAc-polipeptidil transferasas (29). En la N-glicosilación una molécula de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) se adiciona al grupo amida de un residuo de asparagina en una secuencia aminoacídica Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (28). (Imágen obtenida de: Freire, T; Robello, C; *et al* (2002). Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología* 8, p. 89-107).



**Figura 2 – Cores tipo mucina:** Estructura y biosíntesis del “core” de los O-glicanos. En color oscuro se indican los antígenos asociados a tumor identificados hasta el presente. La primera etapa de la O-glicosilación ocurre por la adición de GalNAc a un residuo de Thr o de Ser de la cadena polipeptídica. Esta reacción es catalizada por una ppGalNAc-T (paso 1). Ocho tipos diferentes de “core” de O-glicanos pueden luego formarse por la actividad de distintas glicosiltransferasas: “core” 1  $\beta$ 3Gal-T (paso 2), “core” 2  $\beta$ 6GlcNAc-T (paso 3), “core” 3  $\beta$ 3GlcNAc-T (paso 4), “core” 4  $\beta$ 6GlcNAc-T (paso 5), “core” 5  $\alpha$ 3GalNAc-T (paso 6), “core” 6  $\beta$ 6GlcNAc-T (paso 7), “core” 7  $\alpha$ 6GalNAc-T (paso 8) y “core” 8  $\alpha$ 3Gal-T (paso 9). Las estructuras sialil-Tn y sialil-TF se forman mediante sialilación de los antígenos Tn y TF, en reacciones catalizadas por la  $\alpha$ 6-sialil-T (paso 10) o la  $\alpha$ 3sialil-T (paso 11), respectivamente. (Imágen obtenida de: Freire, T; Robello, C; *et al* (2002). Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología* 8, p. 89-107).

## **II.2. O-glicosilación de tipo mucina:**

Las mucinas son proteínas altamente O-glicosiladas encontradas tanto en secreciones mucosas como en glicoproteínas de transmembrana con el glicano expuesto al ambiente externo. La particularidad de las mucinas es que poseen regiones de repeticiones proteicas (“variable number tandem repeats,” VNTR) ricas en serinas, treoninas y prolina, siendo las serinas y treoninas sitios aceptores de O-glicanos. Estos glicanos pueden llegar a conformar el 80% del peso de la mucina, ya que cientos de glicanos O-GalNAc se pueden adherir a las VNTR (29). Fisiológicamente, las mucinas O-glicosiladas cumplen con importantes

funciones celulares. Las mucinas forman una capa protectora sobre el epitelio, y sus glicosilaciones controlan la antigenicidad, las interacciones con el ambiente y con el sistema inmune. Dependiendo de las estructuras de las cadenas de O-glicanos, las mucinas pueden estar involucradas en la adhesión celular o pueden tener propiedades anti-adhesivas (31).

La estructura O-glicana más simple se conforma por una GalNAc enlazado por la actividad de una pp-GalNAc-transferasa a una serina o treonina (Figura 2) (30). El O-glicano GalNAc más común es el Gal $\beta$ 1-3GalNAc y es encontrado en muchas glicoproteínas y mucinas. Se denomina glicano core 1 O-GalNAc porque forma la base de estructuras más largas y complejas. El O-glicano core 2 se genera por la adición de una GlcNAc a una GalNAc por actividad de la Core 2 GlcNAc-T formando un enlace  $\beta$ 1-6. El core 2, por ende, requiere del core 1 como sustrato. El O-glicano core 3 es controlado por la actividad de la core 3 GlcNAc-T, que también usa el sustrato GalNAc $\alpha$ -serina/treonina. El core 4 forma un enlace  $\beta$ 1-6 entre una GlcNAc y la GalNAc unida a serina o treonina. Estos 4 cores, conforman la mayoría de las estructuras O-glicanas producidas *in vivo* (Figura 2) (31).

### **III. Mucinas:**

#### **III.1. Estructura y funciones fisiológicas de las mucinas:**

Las mucinas son proteínas expresadas por células epiteliales que existen en ambientes hostiles: la interfase aire-agua del epitelio respiratorio, el ambiente ácido del estómago, el ambiente del tracto digestivo, y en superficies de epitelios secretores de órganos especializados como hígado, páncreas, vesícula, riñón, glándulas salivares, glándulas lacrimales y el ojo (32). Las células epiteliales de estos órganos tienen funciones secretoras y absorbivas, y están sujetas a fluctuaciones en su composición molecular, incluyendo pH, concentraciones iónicas, hidratación y oxigenación; también están expuestas a proteasas, glicosidasas, lipasas y toxinas. Dado las condiciones a las cuales las células epiteliales son sometidas, las mucinas cumplen un papel trascendental al conferirles un ambiente homeostático y de este modo promover la supervivencia celular. La composición estructural y bioquímica de las mucinas provee protección y regulación para la superficie celular (32). Otra función que cumplen es la de comunicar a la célula epitelial sobre las condiciones del ambiente externo por medio de transducción de señales asociadas a mucinas de membranas. Dada esta función, las mucinas podrían actuar como sensores y receptores celulares, conducir señales en respuesta a estímulos externos que lleven a respuestas celulares coordinadas tales

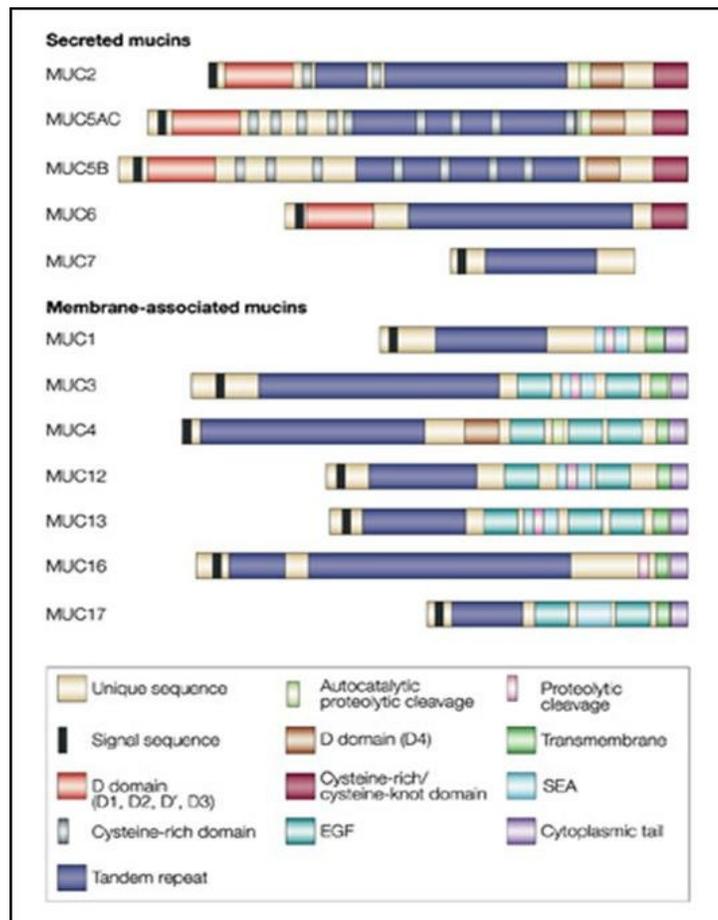
como proliferación, diferenciación, apoptosis y secreción de productos celulares especializados (32).

Las mucinas tienen un peso molecular que varía entre 0.5 y 20 MDa y si bien se dividen en dos categorías (mucinas asociadas a membrana y mucinas secretadas), ambos tipos comparten rasgos y características similares (33). Todas las mucinas se encuentran altamente glicosiladas, siendo compuestas por cerca de un 80% de carbohidratos: GalNAc, GlcNAc, fucosa, galactosa y ácido siálico. Las cadenas oligosacáridas están compuestas por 5 a 15 monómeros, exhiben moderada ramificación, y están adheridas a un core proteico denominado apomucina. Las apomucinas componen el restante 20% del peso molecular (200-500 kDa) y están compuestas mayoritariamente por dos regiones claramente identificables: 1) una región central glicosilada, compuesta por un gran número de repeticiones en tandem (VNTR) ricas en serinas, treoninas y prolinas que componen casi el 60% del total de los aminoácidos; y 2) ubicado en el extremo amino y carboxilo, y a veces intercalado entre las repeticiones en tandem, se encuentran repeticiones ricas en cisteínas, con relativamente pocos sitios de N- y O-glicosilación (Figura 3) (34).

El rasgo estructural característico de todas las mucinas es el dominio VNTR, que consiste de secuencias idénticas o altamente similares (32). Las secuencias específicas y el número de repeticiones en tandem es altamente variable entre las distintas mucinas y entre mucinas de distintas especies. Estos VNTRs le proporcionan a las células sitios en donde ensamblar sus cadenas oligosacáridos. La O-glicosilación con complejos oligosacáridos es crucial para la estructura y función de las mucinas. Los VNTRs le confieren a las mucinas un alto poder estoiométrico, ya que cada repetición contiene típicamente de 5 a 100 potenciales sitios de O-glicosilación, y las apomucinas contienen entre 5 y 500 VNTRs (32).

Todas las apomucinas se dividen en: 11 asociadas a membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 y MUC21) y 7 secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC19) (32, 35-38). Las mucinas asociadas a membrana están unidas a las células por un dominio transmembrana y tienen una cola citoplasmática corta que está asociada a elementos del citoesqueleto, a proteínas adaptadores del citosol, participando de ese modo en la traducción de señales (Figura 3) (39). Otro rasgo que comparten las mucinas asociadas a membrana, es el clivado proteolítico específico que ocurre intracelularmente durante el procesamiento postraduccional en la región que será expresada extracelularmente. De este modo se forman dos subunidades que permanecerán asociadas durante el transporte desde el retículo endoplasmático hasta la superficie celular. Esta porción extracelular, en muchas mucinas, es clivada en el dominio

SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) por proteasas intracelulares aún no identificadas, o bien por alteraciones en el pH, en la concentración iónica, o en la hidratación (Figura 3). Bajo situaciones celulares adversas, o en condiciones de movilidad celular, esto facilitaría una pronta disociación de materiales asociados a la superficie celular. Muchas de estas mucinas también tienen un dominio homólogo a la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Figura 3) (40). Esto le permitiría a las mucinas interactuar con receptores de la familia EGF, lo cual estaría regulando señales relacionadas al crecimiento, movilidad, diferenciación, e inflamación, entre otras (41, 42).



**Figura 3** – Estructura de algunas mucinas secretadas y asociadas a membrana: ilustración de la composición de algunas mucinas. (Imagen obtenida de: Hollingsworth, MA; Swanson, BJ. (2004). Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface. *Nature Reviews* 4, p. 45-60).

Existen dos sub-clases de mucinas secretadas: las que tienen capacidad de formar oligómeros (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) y las que no (MUC7). Los genes que codifican para las mucinas polimerizantes conservan una homología en su secuencia y están agrupados en el cromosoma 11p15.5 (43, 44). La apomucina de estas mucinas es de gran

tamaño, por lo general mayor a 5000 aminoácidos, y su estructura es compleja. Las mucinas secretadas, además de poseer el VNTR glicosilado, poseen dominios homólogos a dominios del factor de vonWillebrand: VWF, VWC, VWD, y un dominio rico en cisteínas (Figura 3), los cuales están implicados los procesos de oligomerización (45-47).

Las mucinas cumplen primordialmente una función protectora en las superficies de células epiteliales aerodigestiva, donde gran superficie celular se encuentra en contacto con aire, alimentos, enzimas, pH ácido, sales, bacterias y virus. Una matriz gelatinosa se forma en esta superficie, cuyo volumen y composición están determinados por: los tipos de mucinas expresadas, la naturaleza de las modificaciones postraduccionales, el grado de entrecruzamiento inter- e intra-molecular, y los tipos de moléculas capturados en la matriz. Esta capa provee a la superficie una barrera física contra microorganismos y material insoluble. Esta matriz extracelular posee la capacidad de regular el flujo de moléculas específicas a través de la misma, gracias a su poder estequiométrico. La mucosa gástrica, por ejemplo, actúa como una barrera selectiva difusa para el HCl. En esta estructura, los iones de bicarbonato que son secretados por el epitelio gástrico son preservados en la capa mucosa, creando así un gradiente de va de pH 2 en el lumen del estómago a pH 6-7 en la superficie epitelial (48).

Hay ciertas moléculas que pueden permanecer en la capa mucosa producida por mucinas, que cuando son liberadas de la misma, pueden desencadenar procesos inflamatorios y de reparación. El ejemplo mejor caracterizado es el factor trefoil (TFF) que es expresado por la mayoría de los epitelios productores de mucosa. Es componente de la mucosa, a la cual le confieren su viscosidad, y promueven la reparación de heridas y la restitución de mucosas en los epitelios dañados (49-51). También se ha visto que la inmunoprotección que proporcionan las mucosas a través de IgA se debe a que la porción carbohidrata del componente secretor de las IgA es responsable de la localización a compartimentos específicos de la mucosa y de la estabilidad que le proporciona. De este modo, a través de la IgA, la mucosa adquiere actividad antimicrobiana (52). Otra función que se les atribuye a las mucinas y la mucosa es que pueden secuestrar citoquinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación y mediadores inflamatorios. Algunas interleuquinas, como IL-1, IL-4, IL-6, IL-7 tienen actividad específica de tipo lectina que les permite unirse a los oligosacáridos expresados en los VNTRs. Esto explica porque varias citoquinas que se detectan en mucosa (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL6, IL-9 e IL-13) han demostrado mediar respuestas inflamatorias en los pulmones y en el tracto digestivo, lo que en ciertas ocasiones genera una hipersecreción mucosa (53-57). Por último, las mucinas asociadas a membrana están involucradas en

traducción de señales, confiriéndole de este modo la capacidad de transmitirle a la célula señales en respuesta a alteraciones en la capa mucosa o el ambiente molecular local. Las mucinas por ende, sirven como mecanismo de señalización pudiendo modificar la proliferación, diferenciación o adhesión celular de células epiteliales (32).

### **III.2. Mucinas y su rol en la transformación maligna:**

Principalmente en adenocarcinomas, las células cancerosas poseen una expresión aberrante de mucinas, la que se debe a una desregulación en la expresión de las apomucinas y/o en las enzimas que las modifican. La expresión de distintas estructuras oligosacáridas, en conjunto con un proceso de glicosilación diferencial de apomucinas, le confiere a células tumorales un amplio rango de ligandos de interacción con otros receptores a nivel de la superficie celular (32, 34). Las mucinas pueden contribuir con el tumor de distintas maneras: 1) controlando el microambiente local, 2) regulando la diferenciación y la proliferación celular, 3) actuando como supresores tumorales (como MUC2), 4) generando invasión y metástasis, y 5) afectando la inflamación y la respuesta inmune.

Al igual que en células y tejidos normales, las células tumorales usan las propiedades protectoras que le confieren las mucinas para controlar el microambiente durante la invasión y el crecimiento metastásico, permitiéndoles de ese modo sobrevivir y proliferar en condiciones que de otro modo serían inhóspitas. El poder estoiquiométrico que le proporciona los VNTRs y la habilidad para formar capas de mucosa sobre el epitelio, le provee a células tumorales una barrera contra compuestos tóxicos (ácidos, compuestos citotóxicos y agentes quimioterapéuticos), razón que podría explicar, al menos en parte, la resistencia de algunos tumores a la quimioterapia (32). La mucosa también puede favorecer el crecimiento tumoral al secuestrar citoquinas y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral, o alternativamente, estos factores podrían regular la respuesta inmune e inflamatoria en su interacción con el tumor.

Hay evidencia que demuestra que mucinas en la superficie celular contribuyen a la regulación de la diferenciación y proliferación de células tumorales por interacciones entre ligando y receptor y por traducción de señales morfogenéticas. Dos ejemplos de mucinas con clara intervención en funciones de este tipo son la MUC1 y la MUC4 (32). Otra función, atribuida a la MUC2 en particular, es la de actuar como supresor tumoral. En ratones knock-out para el gen MUC2, se desarrollaron tumores en el intestino delgado, colon y recto, sitios donde MUC2 es predominantemente expresado bajo condiciones normales (58). Debido a la

falta de MUC2, se genera una alteración en la protección y lubricación en la superficie mucosa intestinal lo que lleva a un aumento de la flora bacteriana con efectos procarcinogénicos o puede destruir la barrera física que le proporciona la MUC2 exponiendo el epitelio a carcinógenos presentes en la dieta (58).

Las mucinas alteran la inflamación y la respuesta inmune al interactuar directamente con las células que median esta acción. Las mucinas que son producidas tanto por células normales como por células cancerosas (estas últimas a una mayor densidad y poder estoquiométrico), exponen estructuras oligosacáridas y proteicas que se pueden unir a leucocitos. Por ejemplo, se ha visto que algunas selectinas y siglecs interactúan con estructuras oligosacáridas en glicoproteínas de tipo mucina (59). Los tumores que producen altos niveles de mucina soluble y la depositan alrededor del tumor median una barrera contra los leucocitos previniendo de ese modo que interactúen con el tumor. Además, una alta concentración de mucinas solubles en sangre, sistema linfático y espacio intersticial puede afectar la motilidad y activación de los leucocitos (60, 61). Este mecanismo podría prevenir el acercamiento de células presentadoras de antígeno o de células efectoras (células natural killer o linfocitos T citotóxicos), imprescindibles en la inmunidad contra los tumores.

Los procesos de invasión y metástasis son complejos, los cuales requieren que la célula tumoral se desprenda del tumor primario, invada a través de elementos estromales y uniones de células normales, se intravase y extravase del sistema circulatorio y linfático, y se establezca como nueva colonia de células tumorales en un sitio distante. Estos procesos requieren de interacciones moleculares a nivel de la superficie celular entre la célula tumoral invasora y las células que la rodean. Las uniones se rompen repetidamente (anti-adhesión) y nuevos contactos se establecen (adhesión) a medida que el tumor crece (32, 34). Esto se atribuye a una coordinada expresión de proteasas y moléculas que median procesos de adhesión y anti-adhesión. Las mucinas tienen una actividad trascendental en estos procesos ya que contienen dominios tanto de adhesión como de anti-adhesión y al mismo tiempo pueden bloquear la actividad proteolítica o generar actividad autoproteolítica. Es por esto que a las mucinas se les atribuye parte de las causas por las cuales las células configuran sus capacidades adhesivas o anti-adhesivas.

### **III.3. MUC1 y MUC4 en cáncer:**

A continuación presentaremos ejemplos de las mucinas más estudiadas en materia de su rol en el cáncer:

### A) MUC1:

Está establecido que la MUC1, la mucina más estudiada, se sobreexpresa y está aberrantemente glicosilada en diferentes adenocarcinomas (32). Está compuesta por dos subunidades asociadas no covalentemente: subunidad N-terminal, conteniendo un VNTR de 20 aminoácidos altamente glicosilados, y la subunidad C-terminal, compuesta de un corto dominio extracelular, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática de 72 aminoácidos (Figura 3) (32). La porción glicosilada extracelular media las propiedades anti-adhesivas de las células que la expresen. La cola citoplasmática tiene sitios de unión para Grb2/Sos y  $\beta$ -catenina pudiendo ser fosforilada por quinasas incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), c-Src, y GSK-3 $\beta$  (62). Al fosforilarse, secuestra  $\beta$ -catenina disminuyendo su disponibilidad para unirse a E-caderina, y por lo tanto inhibe la adhesión celular mediada por esta. En cáncer de mama, se ha visto que MUC1 puede estimular la vía de señalización del ErbB1 al inhibir su ubiquitinización y degradación, y al favorecer su internalización y reciclaje (62). Indirectamente al estimular la interacción MUC1-ErbB, se activan las quinasas reguladas por señalización extracelular (Erk 1 y 2), aumentando la proliferación celular (52). MUC1 también puede regular la señalización de la ERK al modular la transcripción de genes para MEK1, Raf1, y c-jun (63). La fosforilación de la cola citoplasmática también se asocia a la señalización por vía de la protein-quinasa activada por mitógeno (MAPK). Recientemente se ha revelado que la cola citoplasmática se puede unir directamente a diversos efectores relacionados a la transformación maligna tales como el p53, receptores de estrógeno  $\alpha$ , inhibidor de las kinasas  $\kappa$ B, y proteínas de choque térmico.

### B) MUC 4:

La MUC4 es una mucina de gran tamaño (930 kDa) compuesta por un dominio terminal  $\alpha$  con una larga y glicosilada cola extracelular que contiene VNTRs de 16 aminoácidos (32, 64), y un dominio C-terminal  $\beta$  que consiste de 3 dominios similares a los EGF y una cola citoplasmática de 22 aminoácidos (Figura 3) (65). Se expresa normalmente en tejidos que revisten bronquios e intestino grueso. Sin embargo, en cáncer se encuentra sobreexpresada, lo cual se ve asociado a una proliferación invasiva de tumores (40, 41, 66-68). Esto se debe en gran parte a que el dominio EGF de la MUC4 se une al dominio extracelular del receptor ErbB generando una fosforilación cruzada con residuos específicos de la cola citoplasmática, modificando de este modo señales de proliferación celular, diferenciación, apoptosis, y sobrevivencia (69). ErbB2 puede regular la proliferación celular y

metástasis al activar las cascadas de señalización mediadas por las kinasas MAPK, PI3K/Akt, FAK, y c-src. MUC4 también media, por mecanismos aún no elucidados, resistencia a la apoptosis en células tumorales (69).

### **III.4. Funciones de mucinas en cáncer:**

En vista de las consecuencias que genera la expresión aberrante de mucinas sobre tejidos epiteliales normales, muchos estudios apuntan a la inhibición de la expresión de estas mucinas como medio para inhibir la transformación maligna que la expresión de estas genera. La inhibición específica de la expresión de MUC4 a nivel de ARN en células de adenocarcinoma pancreático, por ejemplo, disminuyó la velocidad de crecimiento celular y la capacidad de formar colonias (65). Además, demostró una menor capacidad de crecimiento tumoral y propiedades metastásicas *in vivo*. Estas células tumorales carentes de MUC4 mostraron una menor movilidad, adhesión y agregación con respecto a las que expresan dicha mucina. Por último, una menor expresión de MUC4 se relacionó con una menor expresión de ErbB2 (65).

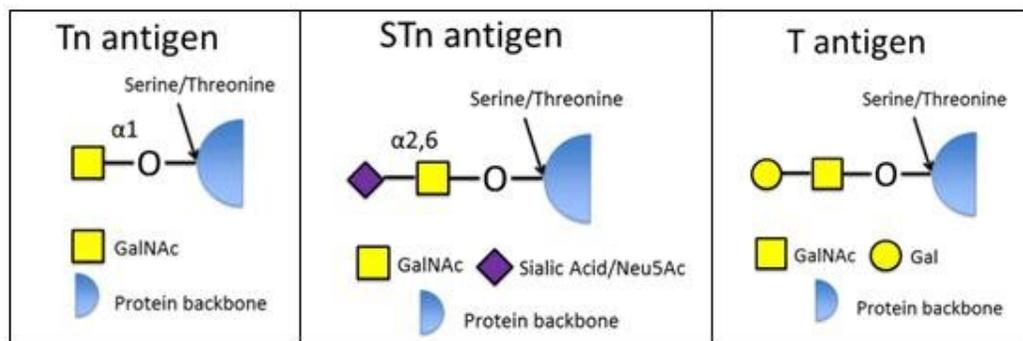
También en el páncreas, y por medio de ARN interferencia, se vio que células con MUC1 inhibidas transplantadas al páncreas redujeron significativamente la metástasis a nodos linfáticos, pulmón y sitios peritoneales comparado con células control. Esto dejó en claro que la MUC1 contribuye al crecimiento y poder metastásico en cáncer de páncreas, y que la inhibición proteica de la misma revierte esta situación (70).

La subunidad C terminal del MUC1 (MUC1-C) contiene un dominio citoplasmático (CD) necesario para su dimerización y función oncogénica. Un inhibidor del MUC1-CD impide la localización del MUC1-C al núcleo estando este asociado a una detención del crecimiento celular y a la inducción de la apoptosis tardía y necrosis celular (70). La administración de este supresor, GO-201, interrumpe la activación de las vías Wnt/ $\beta$ -catenina, STAT3 y NF- $\kappa$ B en cáncer de mama, indicando que MUC1-C es un blanco terapéutico de interés en la clínica (70).

### **III.5. Antígenos carbohidratos asociados a tumor presentes en mucinas:**

Las mucinas constituyen los mayores aceptores de O-glicanos, y en cáncer, producto de una desregulación del proceso de O-glicosilación, expresan diversos antígenos carbohidratos asociados a tumor. Cada vez existe más evidencia involucrando cambios

postraduccionales con procesos malignos. Se ha visto que en células cancerosas existe una glicosilación aberrante, donde las glicoproteínas son anormales tanto en estructura como en cantidad (31). El antígeno Tn, definido como una unidad GalNAc ligada por enlaces  $\alpha$  a residuos de serina y treonina (Figura 4), es la estructura O-glicana más simple y a su vez una de las más específicas del cáncer, expresándose en 90 % de los carcinomas humanos (71). Se considera un marcador de cáncer (71), y se ha relacionado la agresividad del carcinoma a la densidad de la expresión de este antígeno en el tumor (72). La estructura del core 1 se denomina también antígeno T (Figura 4). Tanto el antígeno Tn como el T pueden ser modificados por ácido siálico para formar antígenos Tn o T – sialilados, respectivamente (31).



**Figura 4** – Estructura de los antígenos Tn, Tn sialilado, y T: Ilustración de la composición de los antígenos Tn (izquierda), Tn-sialilado (medio), y T (derecha). (Imágen obtenida de: SBH Sciences <[http://www.sbhsciences.com/Carbohydrate\\_Cancer\\_Antigens.asp](http://www.sbhsciences.com/Carbohydrate_Cancer_Antigens.asp)>)

La expresión de O-glicanos asociada a tumores se correlaciona con una anormal expresión de las enzimas encargadas de la biosíntesis y catabolismo de estos glicanos, tales como glicosiltransferasas y glicosidasas (73). Las sialiltransferasas son otra familia de glicosiltransferasas que tienen una expresión anormal en cánceres. Se han visto implicadas en progresión tumoral, carcinogénesis y metástasis (31).

La expresión de estructuras O-glicanas core-2 ha sido detectada en tumores malignos, mientras que los O-glicanos core 3 y core 4, que se expresan en células normales, están regulados en menos en células cancerosas. El O-glicano core 2 fue hallado originalmente en linfocitos T activados, y su expresión aberrante fue asociada a inmunodeficiencias (74). Por último, se ha visto que cumple un rol importante en la metástasis tumoral al contribuir con la sobrevivencia de células tumorales circulantes (74).

Las alteraciones en los antígenos carbohidratos pueden tener importantes consecuencias en la patología del cáncer ya que ligandos potencialmente responsables de interacciones entre las células cancerosas y el microambiente se encuentran alterados. Esto puede influir en la sobrevivencia y crecimiento celular, en su habilidad para invadir y generar

metástasis a distancia, y en las interacciones con lectinas y receptores celulares del sistema inmune. Se ha visto que pueden interactuar con moléculas de adhesión celular, como integrinas y caderinas.

Existen observaciones que sugieren que la O-glicosilación juega roles importantes en metástasis. Dos estudios en células de cáncer de colon implican metástasis asociada a O-glicanos sialilados. La eliminación del ácido siálico de la integrina O-glicana  $\beta 4$  por la sialidasa NEU1 disminuye la fosforilación de la misma resultando en la supresión de migración y metástasis (75). Se sabe que el factor de necrosis tumoral asociado al ligando inductor de apoptosis (TRAIL) estimula la muerte celular a través de los receptores proapoptóticos DR4 y DR5. La O-glicosilación de estos receptores es fundamental en el control de la señalización apoptótica (76). Finalmente, el aumento de la O-glicosilación de la fibronectina oncofetal es requerida para el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), paso clave en la progresión tumoral y metástasis (77).

### **III.6. Resistencia a tratamientos quimioterapéuticos debido a la expresión de mucinas en tumores:**

Existe evidencia que demuestra que la sobre-expresión de mucinas en ciertos cánceres, le confieren resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos comúnmente utilizados. Las funciones fisiológicas que las mucinas les proporcionan a los tejidos que revisten son, protección y un ambiente homeostático para su supervivencia. Por otra parte se ha visto que durante la transformación maligna, las células cancerosas pueden usar a la expresión aberrante de mucinas para modificar las señales intracelulares y también como barrera física de aislamiento contra el sistema inmune generando un microambiente tumoral propicio para su sobrevida. Las mucinas también pueden actuar como barrera tumoral contra los agentes quimioterapéuticos usados en la práctica clínica.

En el cáncer de páncreas, por ejemplo, a excepción de la gemcitabina, no existe otro agente quimioterapéutico que actúe en la sobrevida de pacientes de la manera que lo hacen las fluoropirimidinas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la timidina sintasa, enzima encargada en la biosíntesis del deoxinucleótido pirimidina (78). Si bien el 5-Fluoracilo (5-Flu) ha demostrado tener actividad antitumoral, el éxito terapéutico ha sido limitado. La sobreproducción de mucina, principalmente MUC1, en la superficie epitelial del páncreas genera una densa capa que impide la actividad citotóxica del 5-Flu. Cuando se bloqueó la

síntesis de mucinas O-glicosiladas por un inhibidor específico, se observó una relación invertida entre la sobreabundancia de MUC1 y la susceptibilidad de las células al 5-Flu (79).

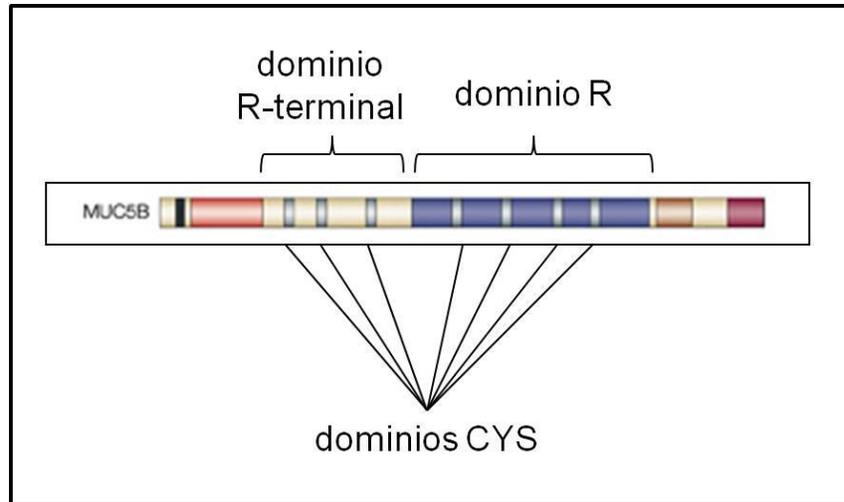
La subunidad C-terminal de MUC1 se colocaliza en la mitocondria bloqueando la activación de señalización intrínseca de apoptosis. Atenúa los efectos que el cisplatino induce normalmente: libera factores apoptóticos de la mitocondria, activa la caspasa 3 e induce apoptosis. La inhibición específica de la MUC1 en cáncer de pulmón se asoció con un aumento de la susceptibilidad a drogas genotóxicas (80). MUC1 también se ha visto involucrado en una amplia red de señalización intracelular que deriva en procesos malignos en cáncer de tiroides. Es un blanco interesante si se desea sensibilizar las células cancerosas a las terapias convencionales (81). A pesar de estas evidencias no se conocen reportes en la literatura asociadas a la resistencia inducida por drogas y otras mucinas.

## **IV. MUC5B:**

### **IV.1. Estructura, expresión y función de MUC5B:**

La mucina MUC5B, objeto de estudio de esta tesis, se encuentra dentro del grupo de mucinas secretadas y formadoras de oligómeros junto con la MUC2, MUC5AC, MUC6 y MUC19 (82). Los genes para MUC6, MUC2, MUC5AC y MUC5B han sido identificados en el mismo cluster de 400 kilobases en el cromosoma 11p15.5 entre los genes HRAS e IGF2 (44). Las mucinas secretadas poseen dominios amino- y carboxi- terminal que comparten dominios similares con el factor pro-von Willebrand (82).

La región central de la mucina MUC5B contiene regiones (VNTRs) ricas en serina, treonina y prolina. El gen de MUC5B consta de una secuencia de 40 kb, con un exón central de 10,713 pb que codifica para un péptido de 3570 aminoácidos (83). La región central de MUC5B esta compuesta por 3 sub-dominios: 1) dominio R, encontrado 5 veces y compuesto por repeticiones irregulares de 29 aminoácidos ricos en serina, treonina y prolina; 2) dominio R-terminal, segmento conservado de 111 aminoácidos encontrado 4 veces; y 3) dominio CYS, altamente conservado compuesto de 110 aminoácidos y encontrado 7 veces en la proteína (82). La secuencia alternada del dominio CYS/dominio R/dominio R-terminal compone una unidad repetida de 528 aminoácidos (Figura 5).



**Figura 5** – Ilustración de región central de MUC5B: La estructura génica de la apomucina MUC5B está compuesta por: dominio R-terminal, dominio R, y dominios CYS. (Imagen obtenida de: Hollingsworth, MA; Swanson, BJ. (2004). Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface. *Nature Reviews* 4, p. 45-60).

La MUC5B, junto con la MUC5AC, son las principales mucinas presentes en las secreciones de vías aéreas (84). En estado fisiológico la MUC5B se encuentra preferentemente en células mucosas de glándulas submucosas y a menor nivel en algunas células de goblet dentro de la superficie del epitelio y ductos de la glándula submucosa (85-89). Esta mucina también se ha encontrado en el esófago, sistema hepatobiliar, páncreas y en el tracto reproductor femenino (90).

#### **IV.2. Expresión de MUC5B en cáncer de mama:**

Se ha descrito expresión aberrante de 4 mucinas formadoras de oligómeros en cáncer de mama: MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6. Existen pocos estudios realizados sobre MUC5B, y su rol ha sido pobremente descrito hasta el momento (82). Berois, *et al*, (91), analizaron, por medio de RT-PCR, la expresión génica de 5 mucinas en pacientes con cáncer de mama diseminado, siendo MUC5B la que mostró mayor frecuencia de detección (47%). Por el contrario, el análisis de células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos, mostró resultados negativos para MUC5B. Se determinó, al comparar distintas líneas celulares de cáncer mamario, que el ARNm de MUC5B se expresaba solo en una determinada población de células de cáncer de mama. Usando el mismo método, en pacientes que habían sido sometidos a cirugía curativa de cáncer mamario, se detectó ARNm de MUC5B en aspirados de médula ósea previo a la cirugía. Esto indicaría que MUC5B podría servir como marcador tumoral para la diseminación de cáncer mamario (91).

Con este antecedente de detección a nivel de ARNm de la apomucina “no mamaria” MUC5B, Sonora, *et al*, (92), evaluaron la presencia a nivel proteico de MUC5B por medio de inmunohistoquímica en carcinomas de mama. En este estudio se detectó la expresión proteica de MUC5B en 81% de tumores primarios mamarios y en el 42,1% de tejidos adyacentes a estos tumores, mientras que no se detectó en tejido de mama normal. La expresión de la apomucina MUC5B en cáncer de mama fue confirmada mediante inmunocitoquímica, hibridización *in situ* y western blot en células MCF-7 (92). Estos estudios sirvieron para documentar por primera vez que existe una sobre-expresión de una apomucina “no mamaria” en células de cáncer de mama.

### **IV.3. Regulación Génica de MUC5B:**

Los genes para las 4 mucinas secretadas y con capacidad de oligomerizar se encuentran en el cromosoma 11p15.5 y están ordenados de telómeros a centrómeros de la siguiente manera: MUC6, MUC2, MUC5AC y MUC5B, componiendo una región de 400 kb (93). La expresión de los 4 genes es específica para cada tipo de célula y tejido. La activación de los promotores de los distintos genes está regulada por varios mecanismos. Estos incluyen mediadores inflamatorios como citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13 y TNF $\alpha$ ), factores de crecimiento (EGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), y LPS bacteriano (94). A su vez, las cuatro regiones promotoras contienen sitios de unión funcionales para muchos factores de transcripción incluyendo Sp1, Sp3, CREB, AP-1, NF- $\kappa$ B, y c-Myc. El reclutamiento de distintos factores de transcripción a estos genes de mucinas resulta en modificaciones epigenéticas incluyendo metilación de ADN, metilación de histonas, y acetilación y desacetilación de histonas (95, 96).

La activación mediada por “enhancers” es un mecanismo fundamental para la regulación génica en eucariotas. La organización tridimensional del genoma permite la interacción de regiones que se encuentran a larga distancia. Es por esto que los “enhancers” pueden activar la transcripción génica, independientemente de su orientación y posición relativa del promotor (97). Existen secuencias génicas que actúan como aislantes, lo cual llevan a impedir activación génica si se ubican entre un “enhancer” y un promotor, por ejemplo. La proteína CTCF, de 82 kDa, se une a ciertos aislantes génicos con variaciones de motivos CCCTC, (97, 98). Los sitios de unión del CTCF se encuentran preferentemente en regiones intergénicas e intrónicas en lugar de regiones proximales al promotor. Se encontró CTCF en muchos sitios génicos a lo largo del cluster 11p15.5 y su unión se correlaciona con

la expresión génica de mucinas (44). La depleción de CTCF por ARNsi mostró un aumento de: MUC2 en células de carcinoma pulmonar y de MUC6 y MUC5AC en células de carcinoma de colon (44). Se encontró que la unión de CTCF en las mucinas polimerizantes es específica para ciertos tipos de células y tejidos y que su inhibición por medio de siRNA altera la expresión individual de genes de mucina (44). La unión de CTCF y las interacciones a larga distancia tejido-específicas dentro del cluster 11p15.5 son mecanismos críticos para la expresión génica coordinada de mucinas formadoras de oligómeros (44).

## **V. MUCINAS como posibles blancos de tratamiento contra el cáncer:**

### **V.1. Modulación del sistema inmune por células tumorales:**

El sistema inmune es responsable de reconocer antígenos, (en este contexto tumorales), y montar una respuesta inmune protectora. La mayoría de los tumores desarrollan la habilidad de inmunosuprimir el microambiente donde se alojan. En el cáncer de mama particularmente existe una clara “manipulación” para evadir el sistema inmune del huésped. Se ha visto una disminución en el número absoluto de linfocitos T (99) y natural killer T (100) en sangre periférica con una señalización de STAT1 y producción de IFN $\gamma$  disminuida, tanto en linfocitos como en NK (101). Los linfocitos citotóxicos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> derivados de pacientes con cáncer de mama mostraron una regulación en menos de receptores de células T y de co-receptores CD28, mientras que se apreció una regulación en más de CD59 (FAS) (102). Al mismo tiempo, en estos pacientes se detectó un aumento tanto células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> como de MDSC (103).

Para que un linfocito sea activado, el antígeno debe ser presentado en el contexto de una molécula de MHC de clase I o II. Por lo general los antígenos endógenos se presentan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el contexto del MHC I. En cambio, los antígenos exógenos se presentan en los T CD4<sup>+</sup> en el MHC II (104). Además existen procesos alternativos que permiten presentar antígenos exógenos en MHC I (presentación cruzada) y antígenos endógenos en MHC II (autofagia). Las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales incluyen: células dendríticas (DC), macrófagos y linfocitos B. Las células dendríticas son las APC por excelencia y se especializan en activar linfocitos T vírgenes (105). Este proceso involucra la captura del antígeno por la DC, activación y maduración de la misma, migración a un órgano secundario, y presentación del antígeno a un linfocito T virgen.

Las DCs al madurar y presentar el antígeno a los linfocitos T, aumentan su expresión de MHC (esencial para la activación del linfocito), aumentan las moléculas de co-estimulación (involucrada en la sobrevivencia del linfocito) y la producción de citoquinas (influyendo en la diferenciación del linfocito) (104, 105).

Las células tumorales emplean varias estrategias para eludir las respuestas inmunes y adaptativas. Pueden reducir la expresión de MHC-I, generar variantes con defectos en el procesamiento del MHC, o regular en menos la expresión de antígenos tumorales, todo lo cual lleva a una inmunogenicidad reducida (105). Las células tumorales también pueden afectar las APC, y en particular las DCs (105). En pacientes con cáncer, las células dendríticas se encuentran disminuidas en número o son disfuncionantes (106). Las células malignas secretan una variedad de citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- $\beta$ ) que pueden afectar negativamente la maduración y función de DCs. Además, los tumores pueden secretar moléculas que regulen en menos la presentación antigénica e induzcan la apoptosis de DCs (106).

## **V.2. Capacidad de mucinas para modular el sistema inmune:**

Uno de los mecanismos por los cuales las mucinas modulan la actividad de las DC, es promoviendo un cambio en el repertorio de citoquinas que ellas producen. En particular se ha reportado que las DCs derivadas de monocitos expuestas a mucinas, producen IL-10<sup>high</sup>-IL-12<sup>low</sup>. Las mucinas derivadas de tumores afectan la capacidad (Th1 dependiente) inmunoestimuladora de las DCs y reprimen su diferenciación funcional y maduración (107). La regulación dependiente de mucinas de las funciones de las DCs resultan en una inadecuada presentación de antígenos tumorales a células T, generando tolerancia a antígenos asociados a tumores (TAA) convirtiéndolos en células T-reguladoras. El aumento de la producción de IL-10 genera tolerancia y anergia de células T (107).

La MUC1 es la mucina cuya capacidad de inmunomodular las DCs ha sido más estudiada. Tiene la capacidad de alterar el fenotipo de células dendríticas (108), generando una menor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD40), moléculas presentadoras de antígenos (DR, CD1d) y marcadores de diferenciación (CD83), y una mayor expresión de marcadores asociados a un fenotipo de DC inmaduro tales como CD1a y CD206 (108). Al mismo tiempo también se ha visto que alteran la producción de citoquinas (108). Por otro lado, se ha reportado que la metástasis de cáncer mamario a ganglios centinelas está asociada a la detención de la maduración y apoptosis de DCs y a una pobre colocalización de DCs con

linfocitos CD8<sup>+</sup>, en parte debido a la producción de TGF- $\beta$  secretadas por el tumor (109). De hecho, se ha reportado que mucinas derivadas de células tumorales inducen apoptosis sobre DC (110). Existen estudios que demuestran que luego de la estimulación con MUC1 se regula en menos la expresión de  $\alpha\beta$ TCR y CD28 en células T CD8<sup>+</sup>, resultando en la ausencia de actividad citotóxica de linfocitos T y en la inducción de tolerancia periférica. MUC1 también puede suprimir la proliferación de células T (107).

### **V.3. Vacunas basadas en mucinas:**

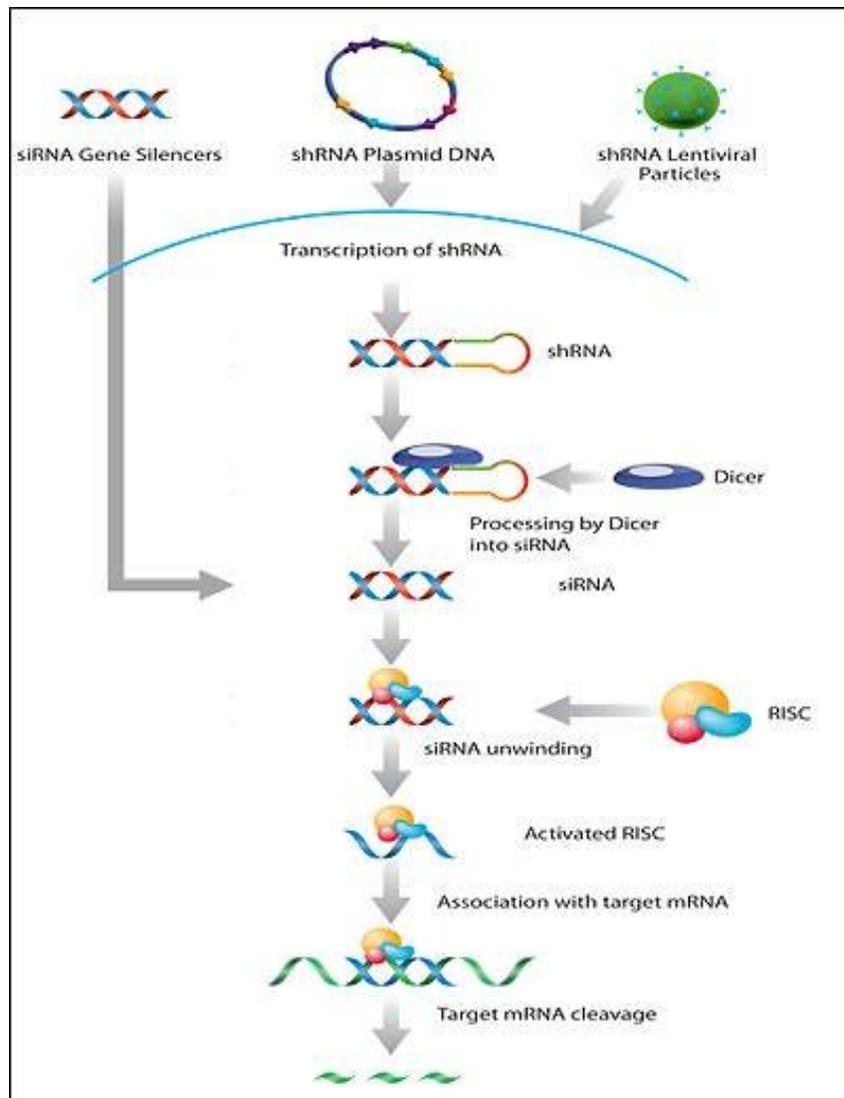
Desde hace más de un siglo las estrategias de inmunoterapia buscan mejorar la capacidad del sistema inmune para eliminar células tumorales. En la última década se han llevado a cabo varios ensayos clínicos con vacunas profilácticas y curativas que intentan adiestrar el sistema inmune a reconocer células cancerosas por medio de presentación de moléculas o fragmentos celulares altamente antigénicos. La mucina más estudiada, MUC1, es un blanco terapéutico de gran interés y ha sido sometida a estudios para el desarrollo de vacunas anti-tumorales. Concretamente, se ha transfectado el gen de la MUC1 a células dendríticas y testado como posible vacuna (109). También se ha probado inocular MUC1 conjugada a la metaloproteína KLH a pacientes con alto riesgo de cáncer de mama pero sin evidencia actual de padecerlo (111). Muy recientemente se ha probado una vacuna con MUC1 para cáncer de colon en pacientes asintomáticos pero con historia de lesiones malignas (112) y actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico con una vacuna de MUC1 para pacientes con adenocarcinoma de mama y que sean triple negativas: ER (-), PR (-), Her2/neu (-) (113). Los estudios basados en antígenos tumorales asociados a humanos, en este caso MUC1, muestran resultados favorables de inmunogenicidad, seguridad y memoria inmunitaria, fundamental para la prevención contra el cáncer (112).

### **V.4. Terapia Génica:**

La terapia génica usa el ADN como agente para tratar enfermedades. La forma más común de terapia génica involucra el reemplazo terapéutico de un gen mutado por un gen funcional. También se emplea la posibilidad de inactivar o silenciar algún gen disfuncionante, o introducir un nuevo gen que colabore en el tratamiento de alguna enfermedad (113).

El término de ARN interferencia (ARNi) se refiere al proceso celular por el cual un ARN de doble hebra inhibe secuencialmente la expresión específica de un gen. El proceso general de ARN interferencia consiste en el procesamiento de una cadena larga de ARN doble

hebra (shRNA) a pequeños ARNs interferentes (ARNsi) de 21 nucleótidos de largo. El verdadero efecto inhibidor lo lleva a cabo el complejo ribonucleoproteína (RISC) que es guiado por una cadena simple de ARNsi a la región complementaria del ARN blanco (114). Una de las desventajas de los ARNsi es su actividad transitoria ya que se degradan en pocos días o se van diluyendo a medida que se replican las células. En el 2002 se desarrollaron sistemas de expresión en que los ARNsi fueran continuamente generados por las células. Consiste en que el ARNsi es convertido a ADN para que codifique una secuencia en sentido, un bucle, y una secuencia antisentido. Este molde de ADN se transcribe bajo el control de promotores de la polimerasa III que están optimizados para generar grandes cantidades de ARNs precisamente definidos. Durante la transcripción un ARN autocomplementario es sintetizado, y es referido como shARN. Este shARN es procesado intracelularmente por la enzima DICER para formar ARNsi mediando así el silenciamiento (Figura 6) (114). El uso de micro-ARN ha sido de gran utilidad para la inhibición específica a nivel de ARNm *in vivo*. Por ejemplo, el micro-ARN-145 suprime la invasión celular y metástasis al inhibir específicamente la expresión de MUC1 (115). El micro-ARN-1226 también controla la expresión de la MUC1 e induce la muerte celular (116).



**Figura 6** – Procesamiento de shRNA para la inhibición de expresión génica: El plásmido de ADN conteniendo el shRNA es internalizado y transcrito a shRNA que luego es procesado por la enzima DICER a ARNsi. El complejo RISC desensambla el ARNsi doble hebra en hebra simple para asociarse luego con la secuencia blanco a nivel de ARNm inhibiendo de ese modo la traducción proteica. (Imágen obtenida de: Santa Cruz Biotechnology, Inc <[http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html)>).

## HIPOTESIS:

La tecnología de silenciamiento génico nos permitiría estudiar o verificar el rol de un gen al estudiar las consecuencias que llevaría al suprimir la expresión proteica del mismo. En este proyecto, nos interesa estudiar la mucina MUC5B la cual se encuentra, en condiciones fisiológicas, en el tracto respiratorio, glándulas salivares y esófago. La expresión aberrante de una mucina “no mamaria” en células de cáncer de mama, nos lleva a cuestionarnos el rol que pueda llegar a tener la MUC5B en la transformación maligna. En este contexto, y teniendo en cuenta el papel preponderante que juegan tanto las mucinas como los antígenos carbohidratos tumorales, es que nos propusimos estudiar posibles funciones de MUC5B en células de cáncer de mama. Después de inhibir la expresión de MUC5B en un modelo celular de cáncer de mama humano que expresa normalmente esta mucina (células MCF7), estudiamos posibles diferencias en el comportamiento tumoral, como por ejemplo, en la proliferación celular, la capacidad de adhesión a células endoteliales y la susceptibilidad a la muerte inducida por fármacos quimioterapéuticos. Asimismo, teniendo en cuenta que MUC5B se encuentra altamente glicosilada y contiene antígenos carbohidratos tumorales, analizamos si existe un posible patrón de expresión de antígenos tumorales alterado. Por último, investigamos si las propiedades inmunomoduladoras son alteradas en presencia de MUC5B (expresión de moléculas co-estimuladoras y producción de citoquinas) con un impacto directo en células dendríticas.

## **Objetivos Generales:**

El objetivo principal de esta tesis de maestría es evaluar el papel de MUC5B en células de cáncer de mama utilizando células de adenocarcinoma humano (MCF7) transfectadas con plásmidos que silencien la expresión de esta proteína. Es de nuestro interés también estudiar los glicanos (que por medio de estas mucinas) podrían estar participando en procesos de proliferación, adhesión, y metástasis. Por último, queremos analizar la capacidad de modular ciertos aspectos del sistema inmune para evadirlo, en particular las células dendríticas.

## **Objetivos Específicos:**

A continuación se detallan de forma más específica los objetivos de este proyecto:

- 1) Generación de células transfectadas de cáncer de mama humano (línea celular MCF7) que no expresen la mucina MUC5B.
- 2) Estudio de las características tumorales de las líneas transfectadas y su comparación con el control (MOCK). Este objetivo incluye:
  - i. Estudio y caracterización de la proliferación.
  - ii. Análisis de la capacidad de formación de colonias.
  - iii. Análisis de la capacidad de adhesión celular.
- 3) Determinación del perfil de antígenos tumorales O-glicosilados expresados por las líneas con MUC5B inhibidas (MUC5Bsi), por la línea de origen (MCF7) y por el control (MOCK).
- 4) Evaluación de la susceptibilidad a la muerte celular inducida por fármacos quimioterapéuticos (5-Fluoracilo y Cisplatino).
- 5) Evaluación de la capacidad de modular células dendríticas (moléculas co-estimuladoras y producción de citoquinas).

## **Materiales & Métodos:**

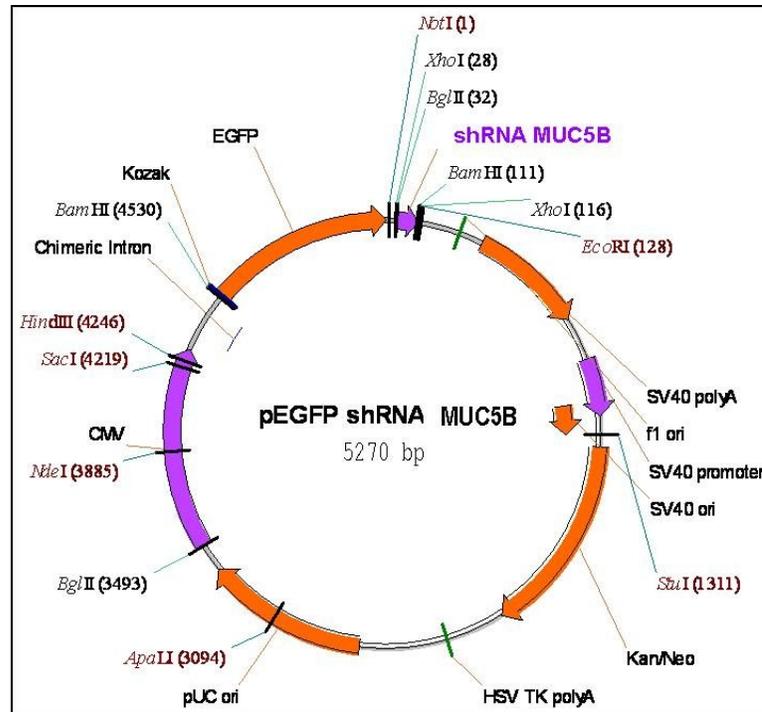
### **I. Cultivo celular:**

La línea celular de cáncer mamario humano, MCF7 (ATCC HTB-22), disponible en nuestro laboratorio, se cultivó a 37° C y 5 % CO<sub>2</sub> en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 complementado con: suero bovino fetal (FBS) (PAA Laboratories GmbH) al 10%, L-glutamina (2.05 mM) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 0.1 mg/ml) (medio completo). Las líneas celulares transfectadas con los plásmidos inhibitorios y mock, fueron incubadas además con 0.75 mg/ml de geneticina (Sigma G418), para mantener la selección de células transfectadas. Tanto las células *wild type* como las transfectadas fueron despegadas al ser incubadas con tripsina-EDTA (0.05 % y 0.02 %) por 10 minutos a 37° C.

### **II. Inhibición de la expresión del gen MUC5B:**

#### **II.1. Características de plásmidos utilizados:**

Se crearon tres plásmidos (Figura 7) conteniendo diferentes secuencias codificantes (Figura 8) para shRNA (short hairpin RNA) para inhibir de forma selectiva la expresión de MUC5B: MUC5B 1, MUC5B 2.4, MUC5B 3.3. Se incluyó un control (MOCK), que consta del mismo plásmido pero sin las secuencias inhibitorias específicas para MUC5B. Cada plásmido utilizado contiene una secuencia shRNA, un promotor CMV, la secuencia para la producción de eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) y de resistencia al antibiótico geneticina. El mismo plásmido contiene secuencias de resistencia Kanamicina/Neomicina para la selección de bacterias transformadas.



**Figura 7** – Mapa del vector usado para transfecciones: Vector usado para las transfección en MCF7 conteniendo una secuencia eGFP, una secuencia de resistencia a Geneticina, un promotor CMV y la secuencia inhibitoria especifica descrita en figura 8.

shRNA	Posición en gen MUC5B	Horquilla
MUC5B-1	Posición 8374	<p>CUCGAGAUCUAGCGAaCGAUGGGUUucUCCUA  AAUUUgcgGUGAAGCCACAGAUGggcAAUUUU  AGGAAACCCAUCGgcUGCCGGAUCCUCGAG</p>
MUC5B-2.4	Posición 5245	<p>CUCGAGAUCUAGCGAaCGACCUGGAUCucCUC  ACAAAgcgGUGAAGCCACAGAUGggcUUUGUG  AGGAUCCAGGUCGucUGCCGGAUCCUCGAG</p>
MUC5B-3.3	Posición 11060	<p>CUCGAGAUCUAGCGAaCTGATCCTGTTucTGA  CuAAAatcgGUGAAGCCACAGAUGggaUUUGGU  CAAACAGGAUCAGgcUGCCGGAUCCUCGAG</p>

Secuencias sentido en verde  
Secuencias antisentido en violeta

**Figura 8** – Secuencias interferentes de MUC5B: shRNA mostrando en verde la secuencia sentido y en violeta la secuencia antisentido para los tres plásmidos MUC5B utilizados.

## II.2. Transformación bacteriana con plásmidos codificantes:

Para la producción de los plásmidos de interés, se realizaron transformaciones en bacterias competentes con los mismos. Las bacterias competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se obtuvieron inoculando una muestra de la misma cepa almacenada a -80 °C en un cultivo de 2 ml de medio Luria Broth (LB) (Invitrogen) con cloranfenicol por 18 horas a 37 °C. Luego se extrajo 1.5 ml del medio cultivado y se diluyó en 100 ml de LB con cloranfenicol, incubándolo nuevamente a 37 °C por dos horas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. Después se trasvasó a dos tubos de 50 ml y se enfrió en hielo por 15 minutos. Se centrifugó (10 min, 4000 RPM, 4 °C), se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet, delicadamente, en 10 ml de 0.1 M de CaCl<sub>2</sub> previamente enfriado y se trasvasó a un tubo con un total de 20 ml. Posteriormente se enfrió en hielo por 20 min, se centrifugó (10 min, 4000 RPM, 4 °C), se retiró el sobrenadante y se resuspendió una última vez en 1 ml de 0.1 M de CaCl<sub>2</sub>.

Las bacterias competentes se transformaron con 5 ng (1  $\mu$ l) de cada uno de los plásmidos descritos en la tabla I. Las mismas se incubaron en hielo por 15 minutos previo al choque térmico (45 segundos a 42° C) para nuevamente incubarlas en hielo por 10 minutos más. Se le agregó 950  $\mu$ l de LB, se incubó en agitador por 1 hr a 37° C y se plaqueó en placas de petri con LB y kanamicina (1  $\mu$ l/ml). Al día siguiente se seleccionaron clones individuales de la placa de petri y se inocularon en 2 ml de LB con kanamicina (1  $\mu$ l/ml) para ser incubados por 18 hrs a 37° C.

## II.3. Purificación del ADN plasmídico:

La extracción del ADN plasmídico se realizó por uso del kit de purificación de plásmidos de QIAGEN (mini-prep). Primero se centrifugó el cultivo bacteriano a 6800g por 3 min a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 250  $\mu$ l de buffer de resuspensión (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml ARNasa A) y se trasvasó a un tubo de microcentrifuga. Se le agregó 250  $\mu$ l de buffer de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS) y se invirtió la mezcla vigorosamente 5 veces, para ser incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Por último, se le agregó 350  $\mu$ l de buffer de neutralización (3.0 M acetato de potasio, pH 5.5), se invirtió la mezcla 5 veces. Pasada la incubación, esta suspensión se centrifugó a 17900g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se dispensó en columnas de centrifugación, las cuales fueron centrifugadas por 60 segundos a 13200 rpm. La columna fue lavada con 750  $\mu$ l de buffer de lavado (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % isopropanol) y centrifugada a 13200 rpm por 60 segundos. Para eluir el ADN restante se le

agregó 50 µl de buffer de elusión (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 15 % isopropanol). La concentración del plásmido fue cuantificada usando espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (donde 1 UA de 260 nm de ADN doble hebra = 50 µg/ml).

#### II.4. Transfección de plásmidos en células MCF7 *wt*:

Para comenzar se incubó a temperatura ambiente 2 µg del plásmido con 4 µl del agente transfectante Fugene HD (Roche) por 10 minutos que luego se llevó a un volumen total de 20 µl con RPMI. Esta mezcla se co-cultivó con células MCF7<sub>wt</sub> que fueran previamente cultivadas en una placa P-24 a una concentración de 40,000 células/pocillo y se almacenó a 37° C en estufa a 5 % CO<sub>2</sub>. La eficiencia de la transfección fue medida por cantidad de células fluorescentes, consecuencia de la expresión de la eGFP, sobre total de células.

#### II.5. Selección de transfectantes:

A las 24 hrs de la transfección se comenzó la selección de células transfectadas con geneticina (G418, Sigma) a una concentración final de 0.75 mg/ml para aumentar el porcentaje de células transfectadas. El seguimiento de estas células se hizo mediante el uso de un microscopio de inmunofluorescencia con un filtro de excitación de 488 nm. Para seleccionar la concentración óptima de la geneticina, se realizó una curva de concentración para determinar cuál es la concentración mínima necesaria para matar el 100 % de las células al cabo de 48 hrs. Se cultivaron 40,000 cél./pocillo en medio RPMI con distintas concentraciones de geneticina. Se controlaron las células a las 24 y 48 hrs, determinando 0.75 mg/ml como la concentración óptima para MCF7.

### **III. Detección de la inhibición de MUC5B por PCR cuantitativa**

#### **(qRT-PCR):**

##### III.1. Purificación de ARN:

Se realizaron qRT-PCRs a modo de cuantificar el grado de inhibición - a nivel de ARN mensajero - de las células silenciadas y del MOCK en relación a la expresión endógena de las *wild type*. Un pellet de 5-10 x 10<sup>6</sup> células se resuspendió en 1 ml de TRIzol (Invitrogen) y se almacenó a - 80 °C. Para la purificación de ARN, se agregó 200 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4° C. Se recuperó la capa acuosa de la superficie (400-500 µl), y se le agregó 500 µl de isopropanol. Se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4° C y el pellet se lavó con 1 ml de 75 % etanol que fue centrifugado una vez

más a 7500 g por 5 minutos a 4° C. El pellet se resuspendió en 20 µl de agua libre de DNA/RNAsas y fue cuantificado usando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) con el software NanoDrop 1000 3.7.

### III.2. Síntesis de ADN copia:

El ARN obtenido se usó como molde para sintetizar cDNA. La reacción llevó 5 µg de ARN, 4 µl de buffer 5x (Tris-HCl [pH 8.3] 250 nM, KCl 375 nM, MgCl<sub>2</sub> 15 nM), 0.1 M (2 µl) ditioneitol (DTT), 10 mM (2 µl) dNTPs, 10 µM (1 µl) primers randomizados, 15 U/µl (1 µl) enzima transcriptasa reversa, llevado a un volumen final con H<sub>2</sub>O destilada de 20 µl (Gibco). Se sintetizó con un programa de 37 °C por 55 min, seguido por 5 min a 85 °C.

### III.3. Amplificación por qRT-PCR:

Sybr Green (QIAGEN) fue el sistema de detección usado en las RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). Este sistema se basa en la detección de todo ADN doble hebra amplificado a partir de los ADN copia de hebra simple previamente sintetizados y con primers diseñados específicamente (Tabla I). Se utilizó el termociclador Rotor Gene (QIAGEN) usando 35 ciclos: 95° C 10 seg, 52° C 30 seg, 72° C 30 seg. Se obtuvieron los valores del “ciclo umbral” y se analizaron con el Chromas software del termociclador, versión 2.4 (QIAGEN). Los resultados obtenidos se procesaron con el software REST 2009 V2.0.13.

**Tabla I** – Secuencia de primers usados para las reacciones qRT-PCR

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'→ 3')</b>
MUC5B F'	TGGGCCTCGAGTGCCGTG
MUC5B R'	CACACGGATTTCATAGTTGAA
GAPDH F'	TGGGAGTCAACGGATTTG
GAPDH R'	CCTGGAAGATGGTGATGG

---

#### **IV. Determinación de la expresión proteica de MUC5B por inmunocitoquímica:**

Las células (MCF7<sub>wt</sub>, MOCK, MUC5Bsi) fueron incubadas en cubreobjetos por 18 hrs a 37° C para permitir su adhesión al portaobjetos. Luego fueron fijadas con 3.7 % de formaldehído por 30 minutos a temperatura ambiente, incubadas con 50 mM de cloruro de amonio por 10 min a temp. amb., permeabilizadas con Triton-X100 0.2 % por 1 hora a temp. amb. e incubadas con el anticuerpo policlonal hecho en cabra contra un péptido específico de MUC5B humano (Santa Cruz Biotechnology) a 4° C por 18 hrs. Se incubó posteriormente con el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a rodamina por 1 hora a temp. amb., luego con DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) por 15 min a temp. amb. y se montó con 25 µl de glicerol 80%. Entre cada paso siempre se lavaron las células con PBS-Tween 0.1 %. La tinción conferida por los fluorocromos usados fueron detectados con un microscopio de epifluorescencia a una excitación de onda de 544 nm.

#### **V. Evaluación del crecimiento celular por viabilidad:**

A modo de medir la proliferación celular se cultivaron en una placa de 96 pocillos de fondo chato células MOCK y MUC5Bsi en concentraciones de  $3.2 \times 10^5$ ,  $1.6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  y 0 células/pocillo, en triplicados en medio completo sin rojo fenol. A las 72 hrs se reveló incubando con 10 µl (50 mg/ml) de solución MTT (3-(4,5-dimetiltiazol) 2,5 bromuro difenil tetrazolio) por pocillo a 37° C por 3 hrs. Luego se adicionó 100 µl de 0.1 N HCl isopropanol y seguidamente se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Labsystems Multiskans MS).

#### **VI. Determinación de apoptosis y necrosis por citometría de flujo:**

En una placa de 96 pocillos se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo de células MOCK y MUC5Bsi por duplicado. A las 48 hrs de iniciado el experimento, se despegaron las células con 20 µl de una dilución  $\frac{1}{4}$  de tripsina-EDTA. Luego de centrifugar las células en una placa aparte por 3 min a 1500 rpm, se resuspendieron las células en 200 µl de buffer anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Para marcar las células, las mismas fueron incubadas con 1,5 µl de anexina V en 50 µl de buffer anexina por pocillo a temperatura ambiente, en oscuridad, por 15 minutos. Media hora más tarde las muestras

fueron teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo (CyAn Beckman Coulter). Los datos obtenidos fueron procesados con el software SUMMIT 4.3.

Para este experimento se incluyeron controles de necrosis y apoptosis. Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo de células MOCK y MUC5Bsi por duplicado. Treinta horas más tarde se agregó 15 % de  $H_2O_2$  (control necrosis) o se incubó con PBS en ausencia de FBS (control de apoptosis) y se incubó a 37° C por 18 horas. A estos controles se les realizó el mismo tratamiento con anexina V y tinción con yoduro de propidio para incluirlos junto con el resto de las células para determinar por citometría de flujo la muerte de las mismas por necrosis o apoptosis.

## **VII. Determinación de la capacidad de formación de colonias:**

Se cultivaron en medio RPMI completo 500 células y 1000 células (MOCK y MUC5Bsi) por placa de petri de 10 cm de diámetro por 14-17 días a 37° C. Luego de este tiempo, se fijaron y se tiñeron todas las células en simultáneo con 0.1 % de violeta de cristal en 20 nM de MOPS (ácido 4 morfolin-propano-sulfónico) lo que permitió posteriormente contar el número de colonias visibles al ojo humano.

## **VIII. Determinación de la adhesión celular:**

La adhesión celular se midió utilizando matrigel, que es el nombre comercial para la mezcla proteica gelatinosa secretada por células de sarcoma murino, usado para representar el complejo ambiente extracelular encontrado en muchos tejidos (117). Una placa de cultivo de 96 pocillos fue preincubada con una capa de 50  $\mu$ l/pocillo de matrigel diluido a 1/3 por 8-10 hrs a 4° C. Luego se bloqueó con seroalbumina bovina (BSA) por 30 min a temp. amb. Las células MOCK y MUC5Bsi (200.000, 100.000, y 50.000 células/pocillo) fueron dispensadas en 100  $\mu$ l de RPMI 2 % FBS e incubadas por 2 hrs a 37° C. Después de la incubación se fijaron con 50  $\mu$ l 1 % de glutaraldehído por 10 min a temp. amb., teñidas con 50  $\mu$ l de violeta de cristal 0.1 % por 30 min a temp. amb. y lisadas con 50  $\mu$ l de ácido acético 10 %. Las placas fueron medidas en el espectrofotómetro a 570 nm.

## **VIII. Evaluación de la viabilidad celular inducida por agentes**

### **quimioterapéuticos:**

Para evaluar la susceptibilidad a drogas quimioterapéuticas se cultivaron en dos placas de 96 pocillos de fondo chato células MOCK y MUC5Bsi en concentraciones de  $3.2 \times 10^5$ ,  $1.6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  y 0 células/pocillo en medio completo sin rojo fenol, en triplicados. A las 24 hrs a una placa se le administraron en 200  $\mu$ l de RPMI completo sin rojo fenol 10  $\mu$ g/pocillo de Cis-Diammine-Platinum ( $\pm$ ) Dichloride (Cisplatino) por pocillo o 20  $\mu$ g/pocillo de 5-Fluoracilo, incubándolas por 72 hrs a 37° C. Luego se reveló incubando por 3 hrs a 37° C con (50 mg/ml) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide), adhiriendo 100  $\mu$ l de 0.1 N HCl isopropanol y cuantificando la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Labsystems Multiskans MS).

## **IX. Identificación de estructuras glucídicas:**

### **IX.1. Producción y cuantificación de extractos proteicos a partir de células MOCK y MUC5Bsi:**

Tanto células MOCK como MUC5Bsi fueron tripsinizadas y centrifugadas en PBS (10 min a 1500 rpm) para luego ser resuspendidas en buffer de lisis (25 % glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 20 mM HEPES, 1 % Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) y congeladas a -80° C por 24 hrs. Luego las mismas se centrifugaron a 15000g por 10 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas. El extracto proteico se cuantificó por ensayo de ácido bicinonínico. El mismo combina la reducción del Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> por proteínas en medio alcalino con la detección calorimétrica del cation Cu<sup>1+</sup> por el ácido bicinonínico (118).

### **IX.2. Ensayos de inmunoabsorción con lectinas:**

Para elucidar las posibles modificaciones de los antígenos carbohidratos tumorales en las MUC5Bsi comparadas con las MOCK se realizaron ensayos de inmunoabsorción con diferentes lectinas biotiniladas que reconocen diferentes estructuras carbohidratos (Tabla II):

**Tabla II** – Nombre y abreviación de cada lectina y la estructura glucídica que reconocen.

Lectina	Abreviación	Estructura que reconoce
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	$\alpha$ -Man, $\alpha$ -Glc
<i>Euonymus Europaeus</i>	EEA	$\alpha$ -Gal(1→3)Gal
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	(GlcNAc) <sub>2</sub> (ácido siálico)
<i>Vicia Villosa</i>	VV	Thr/Ser $\alpha$ -GalNAc (antígeno Tn)
<i>Helix pomatia</i>	HPM	GalNAc terminal
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	$\alpha$ NeuNAC(2→6)Gal
<i>Ulex europaeus</i>	UEA	$\alpha$ -L-Fuc
<i>Arachis Hypogaea</i>	PNA	$\beta$ -Gal(1→3)GalNAc (antígeno T)
<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA	$\beta$ -Gal(1→4)GlcNAc

Se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 5  $\mu$ g/ml de extracto proteico MOCK y MUC5Bsi por 18 hrs a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-T (PBS-Tween 1%) se bloqueó la placa con 1% BSA-PBS por 1 hr a 37° C. Luego se lavó 3 veces la placa con PBS-T y se incubó por triplicados por 1 hr a 37° C con 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml y 0.1  $\mu$ g/ml de lectinas conjugadas a biotina (Sigma). Se lavó 3 veces con PBS-T y se incubó con 0.2  $\mu$ g/ml de Streptavidina-DyLight 800 (Pierce) por 30 minutos a 37° C. La concentración de lectinas fue cuantificada por el sistema Odyssey Licor y analizada con el software Image Studio Ver 2.0 (Licor).

## **X. Estudio de efectos inmunomodulatorios de la maduración de células dendríticas:**

### **X.1. Preparación de medio condicionado:**

En frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> se cultivaron por 1 semana células MOCK y MUC5Bsi a una concentración celular inicial de 200,000 células en 5 cm<sup>3</sup> de RPMI complementado con FBS al 10 %. Al cabo de los 7 días, se recolectó el medio y se filtró con un filtro de 0.20  $\mu$ m (Ministart Sartorius Stedim biotech); a este medio llamaremos Medio Condicionado (MC).

### **X.2. Cultivo con células dendríticas:**

En placas de P6 se cultivaron 1.25 x 10<sup>5</sup> células dendríticas (extraída de diferentes donantes) que fueron diferenciadas a partir de monocitos luego de 48 hrs de cultivo en presencia de GM-CSF (800U/ml) e IL-4 (1%) (119). Pasadas estas 48 hrs, se sustituyó el

medio de cultivo de las células dendríticas (DC) por: I) una mezcla de medio condicionado de MOCK o MUC5Bsi en una proporción 1:1 con medio de cultivo completo, y II) un co-cultivo en medio completo de  $1.25 \times 10^5$  células MOCK o MUC5Bsi con las células dendríticas. Ambas condiciones fueron llevadas a cabo en duplicados. Por un lado se estimuló con lipopolisacárido (LPS) (concentración final 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 18 hrs, 37° C) 24 hrs después del co-cultivo y por otro lado fueron cultivadas en ausencia de LPS. En ambos casos las células se cultivaron por 24 hrs más a 37° C.

### X.3. Cuantificación de citoquinas producidas:

Las concentraciones de las citoquinas: IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12, TNF $\alpha$  fueron cuantificadas por FlowCytomix (Bender MedSystems, Austria) y analizadas por citometría de flujo. Para calcular los resultados se usó el BMS FlowCytomix Software versión 2.2.1.

### X.4. Estudio de la expresión de moléculas de co-estimulación:

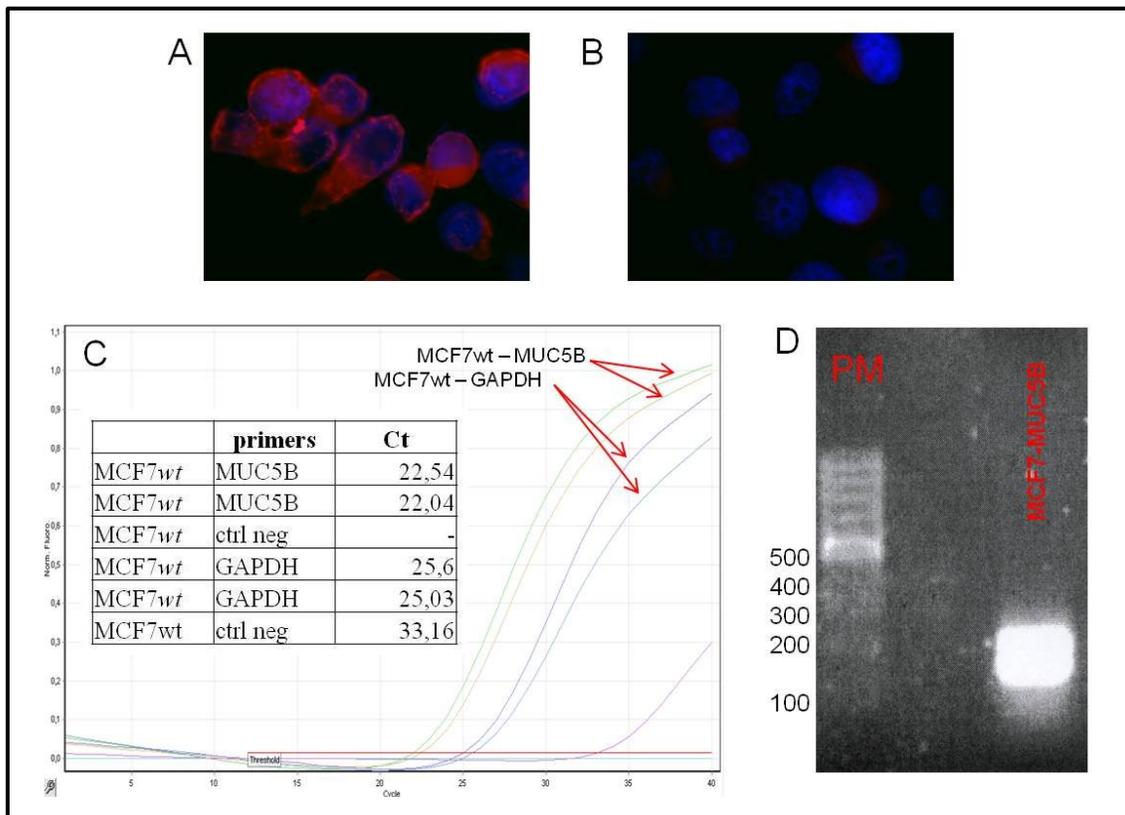
El nivel de expresión de moléculas de co-estimulación de las células dendríticas tratadas fue estudiado mediante el uso de los siguientes anticuerpos (BD PharMingen): B-ly6 (anti-humano CD11c, conjugado a alofococianina), 2331 (anti-humano CD86, conjugado a ficoeritrina), TU36 (anti-humano HLA-DR conjugado a isotiocianato de fluoresceína), BB1 (anti-humano CD80 conjugado a isotiocianato de fluoresceína), y PE-Cys5 (anti-humano CD83). El nivel de expresión fue analizado como la media de intensidad de fluorescencia (MFI). Las células dendríticas fueron teñidas y luego analizadas por el clitómetro CyAn ADP (Dako) usando el software Summit 4.3.

## Resultados:

### I. Evaluación de la expresión endógena de MUC5B en

#### MCF7wt:

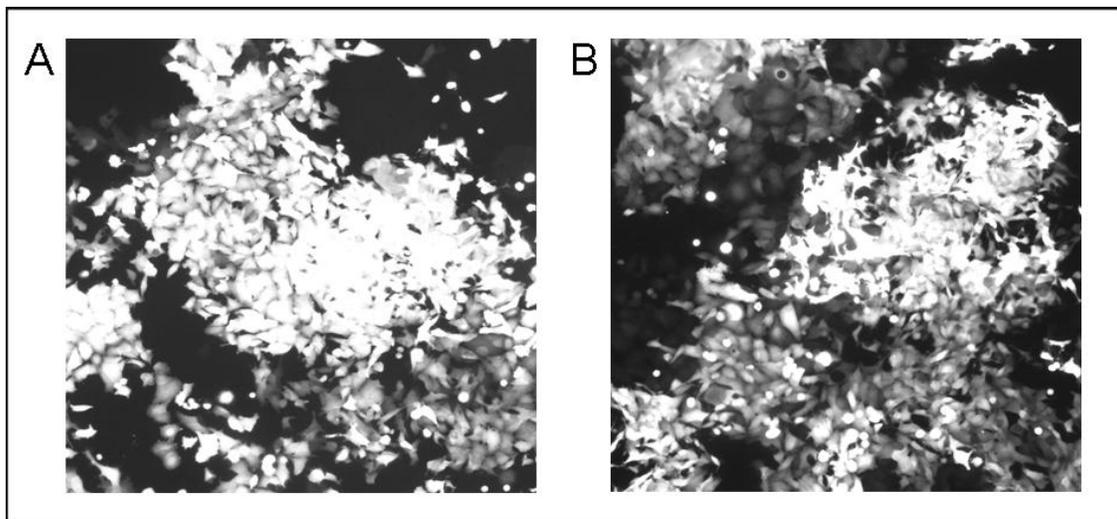
Primeramente evaluamos la expresión de MUC5B en las células MCF7wt. Tanto la inmunocitoquímica (Figura 9A y 9B) como la amplificación por qRT-PCR (Figura 9C) confirmaron los hallazgos previos sobre la expresión proteica endógena de MUC5B en esta línea celular. Para tener certeza de estar amplificando el gen de MUC5B, se corrió en un gel de agarosa donde se obtuvo una banda de peso esperado (152 pb) (Figura 9D). Luego se secuenció el producto de PCR confirmando la identidad del segmento amplificado.



**Figura 9** - Expresión de MUC5B en células MCF7wt: **A)** Detección de la expresión proteica de MUC5B verificada por inmunocitoquímica en células MCF7 *wild type* por medio de un anticuerpo policlonal anti-MUC5B y un anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a Rodamina. **B)** Como control se realizó el mismo procedimiento obviando la incubación con el anticuerpo primario. **C)** Se cuantificó la expresión de MUC5B por qRT-PCR calculando el valor umbral para la amplificación de MUC5B comparado con la amplificación del gen de expresión constitutiva, GAPDH. Datos reales obtenidos por medio del software Rest 2009. **D)** A partir del ARN celular se sintetizó cDNA para amplificar el gen MUC5B con primers específicos, amplificación que fue verificada en un gel de agarosa; peso molecular esperado de 152 pb.

## **II. Selección de células transfectadas con genética:**

Luego de haber corroborado la expresión de MUC5B en células MCF7<sub>wt</sub>, procedimos a transfectar células MCF7<sub>wt</sub> con plásmidos conteniendo secuencias shRNA inhibitorias específicas del gen MUC5B (MUC5Bsi) (Figura 8). Como control se utilizó el mismo plásmido vacío (sin secuencia shRNA) (MOCK). Las células que efectivamente fueron transfectadas exhibieron el verde fluorescente producto de la expresión de la proteína eGFP (Figura 7). La eficiencia de transfección a las 24 hrs fue del 70 % (aprox.) tanto para las células MOCK como para las células MUC5Bsi. El plásmido utilizado para este estudio fue el MUC5B 1 ya que obtuvimos una mayor confluencia de células transfectadas comparada con los plásmidos MUC5B 2.4 y MUC5B 3.3. Posteriormente se seleccionaron las células transfectadas con 0.75 mg/ml de geneticina en medio completo, aumentando de este modo el porcentaje de células transfectadas por encima del 90 % del total en ambas líneas celulares (Figura 10).

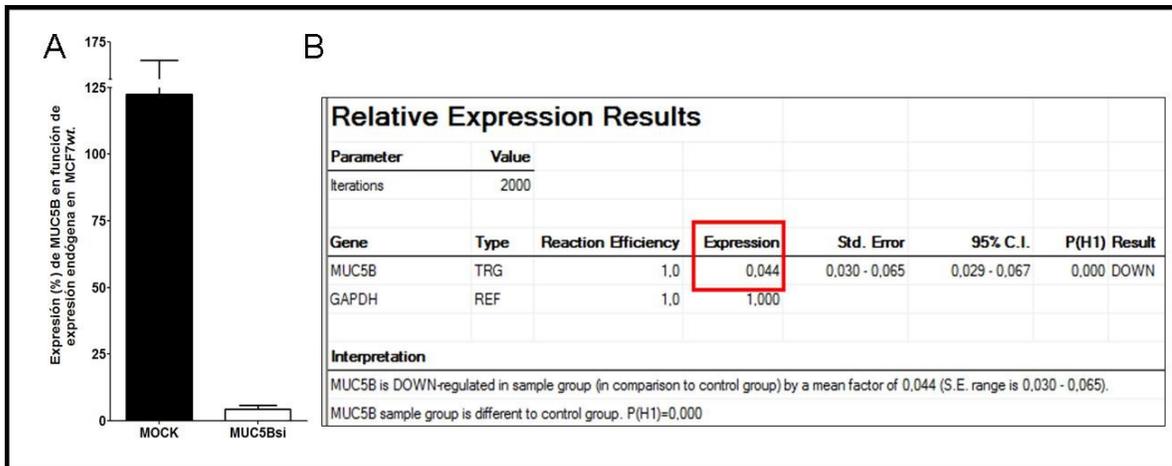


**Figura 10 - Selección de células transfectadas:** Se cultivaron las células transfectadas: **A)** MUC5Bsi y **B)** MOCK en medio completo con 0.75 mg/ml de geneticina para seleccionar de ese modo aquellas que poseyeran el plásmido. La confluencia final de células transfectadas fue del 90 %.

## **III. Expresión de MUC5B en células MUC5Bsi y MOCK por qRT-PCR:**

Se realizaron qRT-PCR para cuantificar el grado de inhibición de la apomucina MUC5B en las células MUC5Bsi, y confirmar la expresión de la apomucina MUC5B en las células MOCK. Se demostró que, en relación a la expresión endógena de MUC5B en células MCF7<sub>wt</sub>, no existe inhibición de la secuencia MUC5B a nivel de mRNA en las células

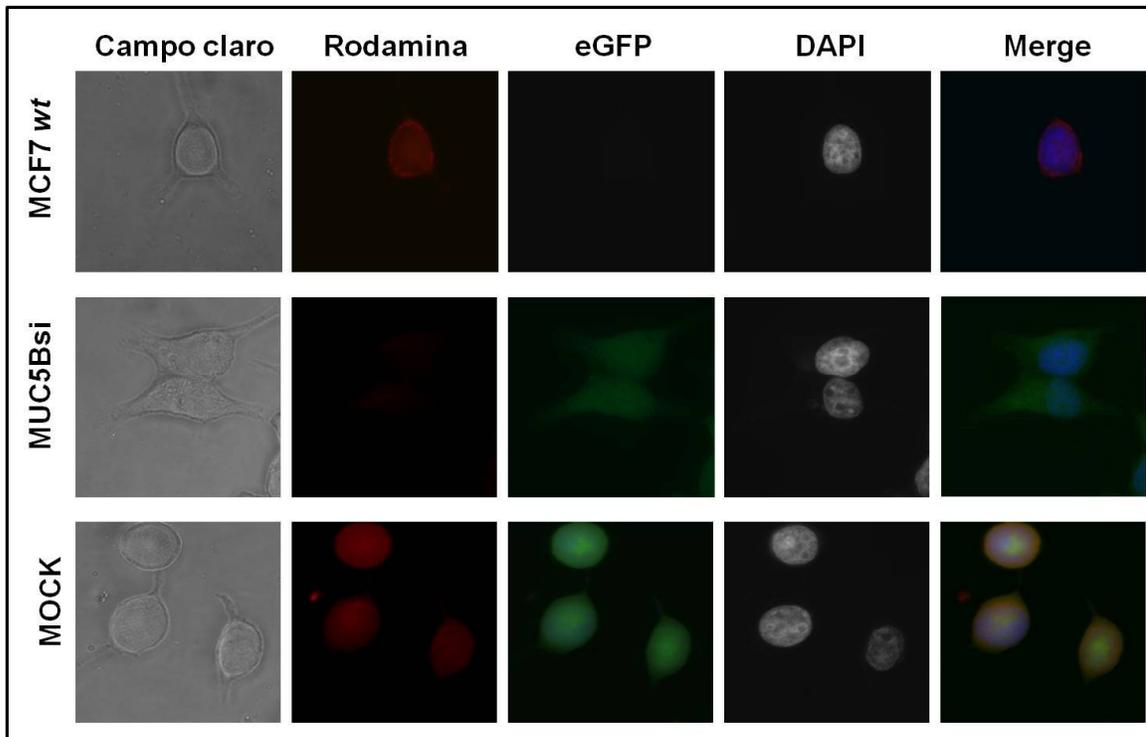
MOCK (Figura 11A), mientras que se comprobó la inhibición de un 95.6 % (expresión de un 4.4%) en las células MUC5Bsi (Figura 11B).



**Figura 11** – Expresión de MUC5B en MOCK y MUC5Bsi por qRT-PCR: **A)** Se realizó qRT-PCR para cuantificar y comparar el grado de expresión relativo a nivel de mRNA entre células MOCK y MUC5Bsi en comparación con el nivel de expresión endógeno de MUC5B de la línea *wild type* (100 %). **B)** Grado de inhibición de MUC5B (95.6%) en células MUC5Bsi comparado con el grupo control (expresión de MUC5B en células MCF7wt) obtenido por el software REST 2009 V2.0.13 .

#### **IV. Expresión de MUC5B en MUC5Bsi y MOCK por inmunocitoquímica:**

Una vez comprobada, a nivel de mRNA, la inhibición y expresión de MUC5B en células MUC5Bsi y MOCK respectivamente, se estudió la expresión a nivel proteico de MUC5B por inmunocitoquímica en las distintas sublíneas celulares. En concordancia con los resultados obtenidos en la qRT-PCR, MUC5B se expresó en las células MOCK de manera similar a las MCF7wt, mientras que se observó una ausencia de MUC5B en las células MUC5Bsi (Figura 12).



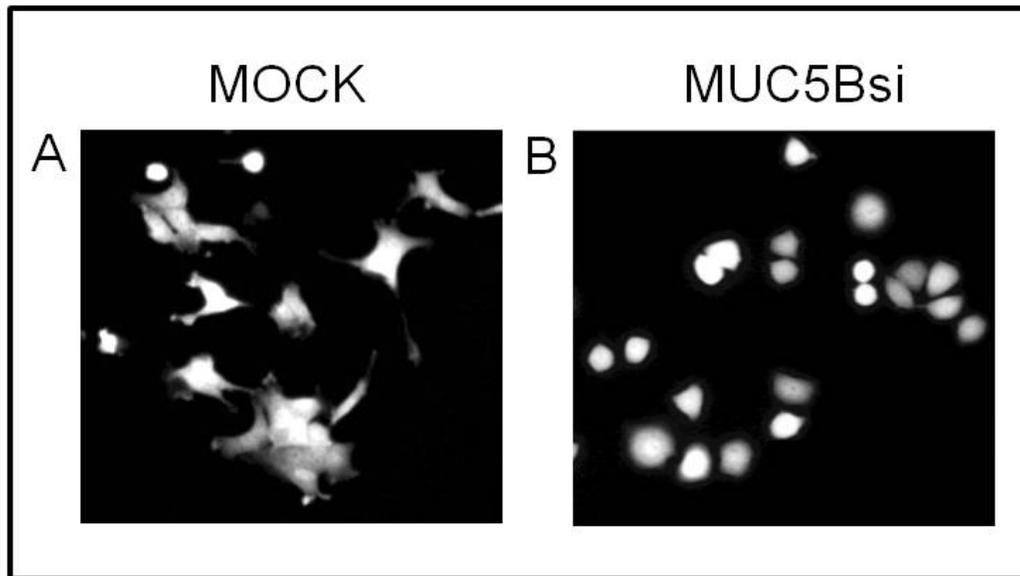
**Figura 12** – Expresión de MUC5B en MOCK y MUC5Bsi por inmunocitoquímica: Detección de MUC5B en células MCF7 $wt$  y MOCK, y ausencia de MUC5B en células MUC5Bsi, por medio de un anticuerpo policlonal anti-MUC5B y un secundario anti-cabra conjugado a Rodamina. Expresión de eGFP en las células transfectadas con el plásmido MOCK y MUC5Bsi. Observación celular en campo claro y tinción nuclear con DAPI en las tres líneas celulares (aumento 40X).

## **V. Características morfológicas distintivas:**

Morfológicamente evidenciamos distintas características entre las células MOCK y MUC5Bsi (Figura 13). Las células MOCK poseen forma y tamaño irregular; además se encuentran explayadas y bien adheridas a la superficie del frasco de cultivo, adoptando formas heterogéneas estrelladas. En muchas células se observa un núcleo de mayor tamaño comparado con las células MUC5Bsi. Al inhibir la MUC5B, las células adoptan una forma redondeada, exponen una uniformidad de tamaño y forma, y mantienen una proporción núcleo:célula menor. Se podría asociar la malignidad ya conocida de las células MCF7 con su morfología típica, e inferir que al inhibir la MUC5B, tal como es el caso de las células MUC5Bsi, se inducen cambios morfológicos que sugieren un patrón menos agresivo. Los cambios en la estructura celular están involucrados en la pérdida de adhesión y la migración celular polarizada requerida para los procesos metastáticos (120).

Para descartar que los cambios morfológicos que sufren las células MUC5Bsi no fuera debido a un proceso de muerte celular, se contaron las células MOCK y MUC5Bsi luego de incubadas con medio completo y trypan blue. Todas las células observadas fueron viables

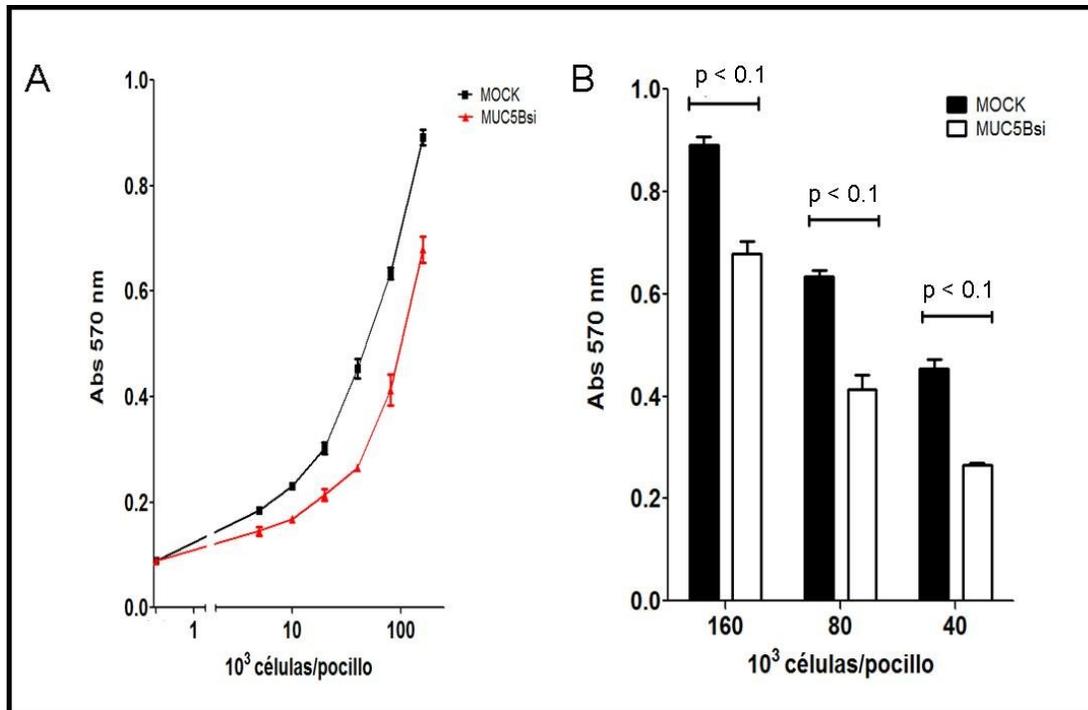
confirmando que la inhibición de MUC5B no induce la muerte celular (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que los cambios celulares se deben a propiedades atribuidas a la presencia o ausencia de la MUC5B.



**Figura 13** – Características morfológicas propias de las células MOCK y MUC5Bsi: se evidencian diferencias en las formas que presentan las células A) MOCK y las que adoptan las B) MUC5Bsi.

## **VI. Evaluación del crecimiento celular a través de la determinación de la viabilidad celular:**

Dentro de las posibles características funcionales, una mayor capacidad de crecimiento proliferativo se puede asociar a un alto grado de malignidad de las células (2). Dado esto, evaluamos el crecimiento de células incubadas durante 72 hrs a través de la medición de la viabilidad celular con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol) 2,5 bromuro difenil tetrazolio). Esta molécula se reduce por medio de la enzima oxidoreductasa dependiente de NADPH que se encuentra en el citoplasma. La actividad reductora de MTT aumenta con células metabólicamente activas, en particular células con alto nivel replicativo. Este ensayo mide por colorimetría la actividad enzimática que reduce MTT a su composición insoluble de formazan, midiendo indirectamente viabilidad celular (121). Luego de 72 hrs de cultivo, las células MOCK presentaron un aumento significativo de la viabilidad celular en comparación con las células MUC5Bsi (Figura 14).

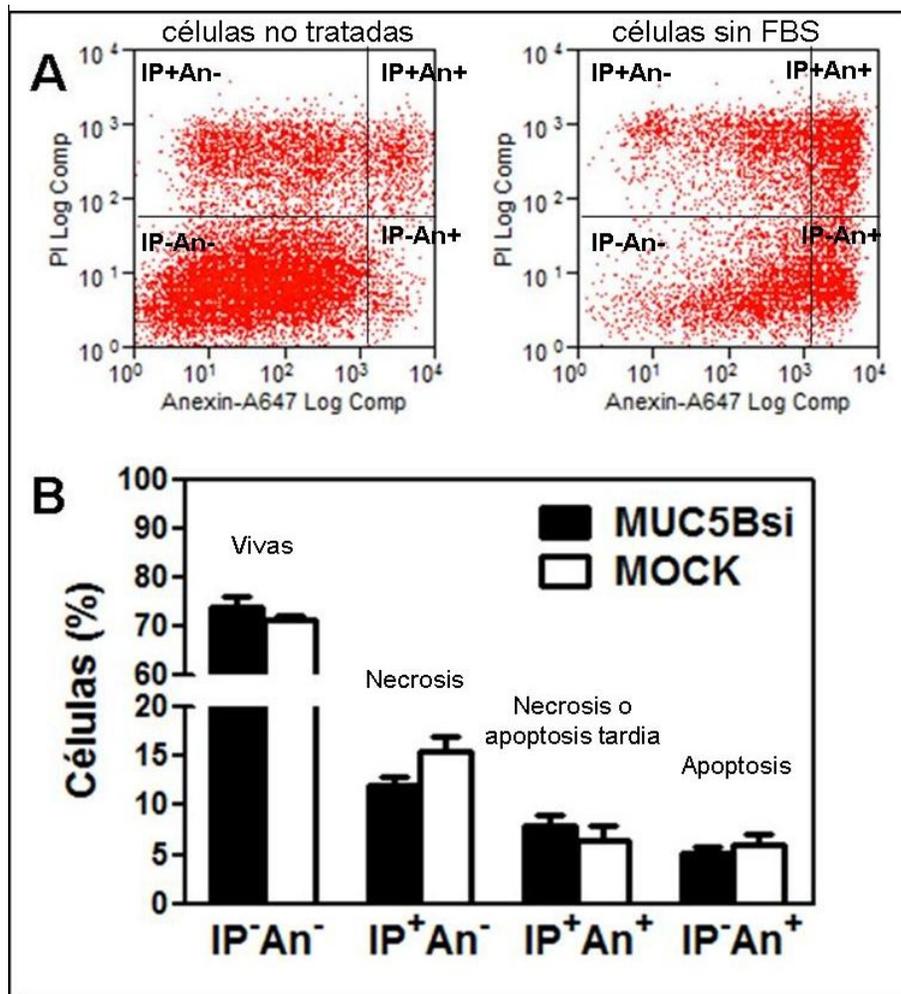


**Figura 14** – Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de MTT: **A)** Curva de viabilidad celular para las células MOCK vs las células MUC5Bsi a distintas concentraciones celulares. **B)** Comparación individual a ciertas concentraciones celulares mostrando una diferencia significativa entre la viabilidad de las células MOCK vs MUC5Bsi.

## **VII. Identificación del tipo de muerte de la células MOCK y**

### **MUC5Bsi:**

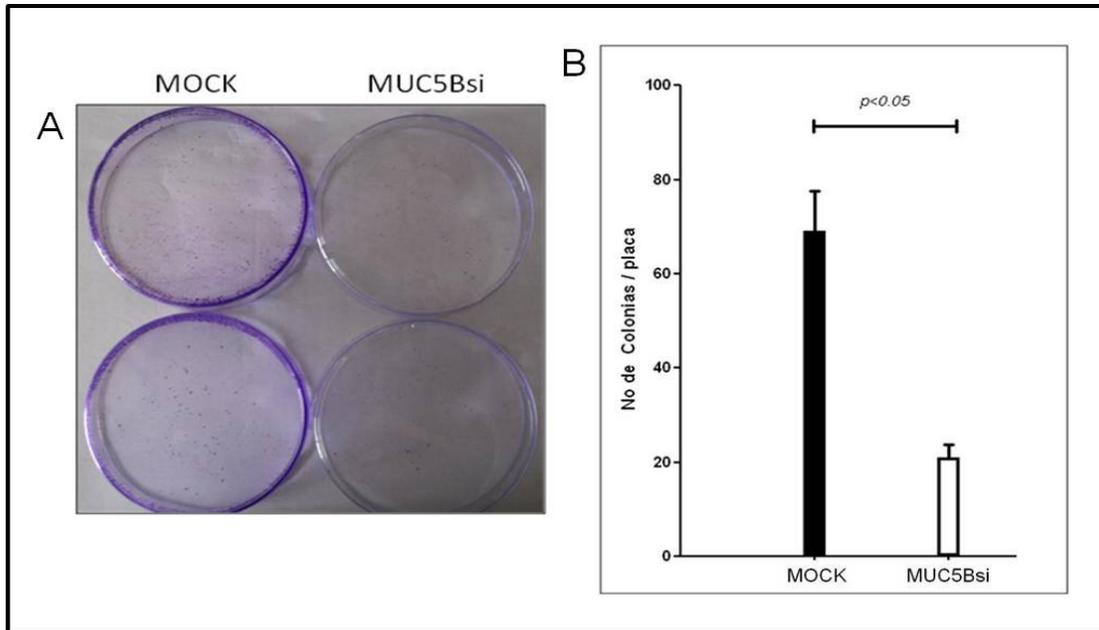
La apoptosis es el proceso fisiológico de muerte celular programada orquestado por un conjunto de enzimas llamadas caspasas. La característica a destacar de este proceso, es que a diferencia de la necrosis, la apoptosis no genera una respuesta inflamatoria (122). En vista de esto es que decidimos investigar si existe alguna diferencia en el proceso de muerte entre las células MOCK y MUC5Bsi. Por otro lado, la evaluación de la muerte celular sugeriría que los resultados de crecimiento evaluados por viabilidad celular se deben, o bien a un crecimiento retrasado, o a un aumento en la muerte celular. Para ello, las células MUC5Bsi y MOCK fueron dispensadas ( $1.5 \times 10^5$ /pocillo) y cultivadas por 48 hrs. Posteriormente fueron resuspendidas y marcadas con Anexina V y yoduro de propidio, de manera de poder identificar el tipo de muerte celular según la tinción obtenida:  $IP^-An^+$  = células vivas,  $IP^+An^-$  = necrosis,  $IP^+An^-$  = necrosis o apoptosis tardía,  $IP^-An^+$  = apoptosis (123). Luego de haberle inducido la muerte a las células, incluyendo sus respectivos controles, y habiéndolas analizado por citometría de flujo, observamos que la inhibición de MUC5B no genera cambios en el patrón de muerte celular con respecto a las células control (Figura 15).



**Figura 15** – Estudio del proceso de muerte de las células MOCK y MUC5Bsi: A) Dot plot de FACS mostrando los diferentes gates seleccionados. B) Gráfico comparando el tipo de muerte celular entre MOCK y MUC5Bsi luego de 18 hrs de cultivo; Apoptosis = An<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>; Necrosis = An<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>.

## VIII. Capacidad de formación de colonias:

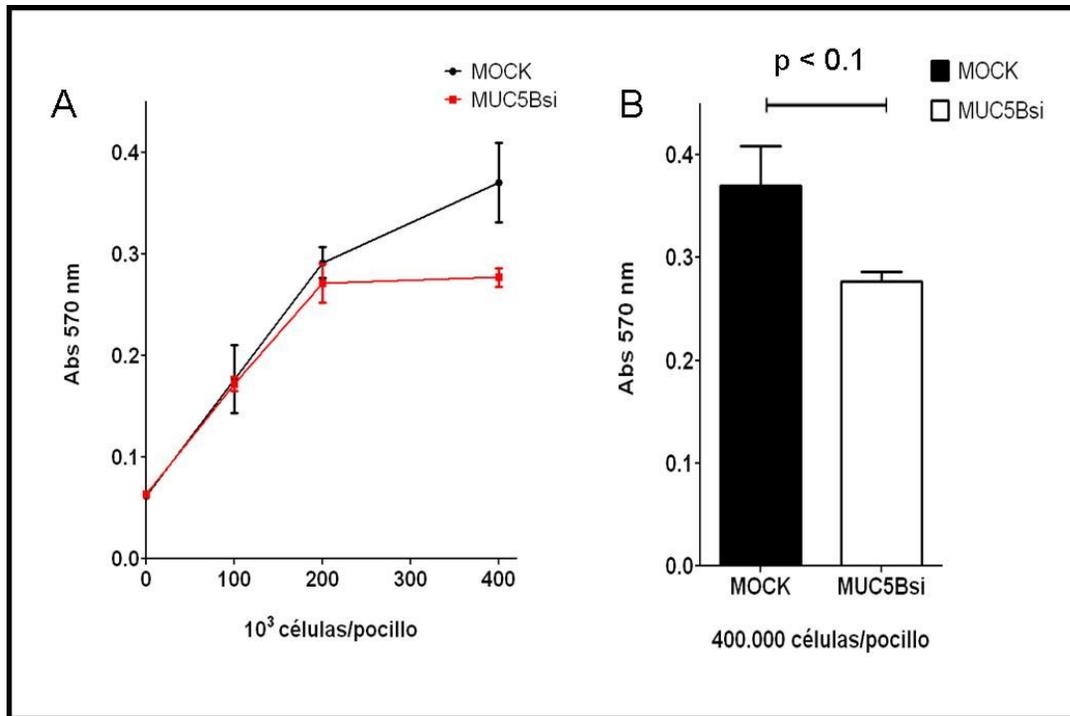
Una característica celular de malignidad es la capacidad aumentada de formar colonias (124). En base a esto, pusimos a punto un ensayo de formación de colonias para comparar dicha capacidad entre las células MOCK y MUC5Bsi. Luego de 15-17 días de cultivo, las células fueron fijadas y tenidas con violeta de cristal (Figura 16A). Observamos que las células MOCK fueron capaces de formar mayor número de colonias celulares que las MUC5Bsi (Figura 16B). Ambas líneas celulares produjeron colonias de similar tamaño.



**Figura 16** – Capacidad celular de formación de colonias: A) Foto de las placas de petri evidenciando una mayor capacidad de formación de colonias en las células MOCK comparados con las MUC5Bsi. B) Cuantificación del número total de colonias producidas por células MOCK y MUC5Bsi.

## **IX. Capacidad de adhesión celular:**

La capacidad de una célula tumoral de desprenderse del tumor primario más fácilmente aumenta la posibilidad de generar una metástasis a distancia, lo que se correlaciona a una peor supervivencia de los pacientes (125). Visto esto, decidimos evaluar la capacidad de adhesión celular de las células obtenidas MUC5Bsi y MOCK. Luego de realizar los ensayos con matrigel (previamente descritos en la sección de Materiales y Métodos), a concentraciones celulares más elevadas, se evidenció una disminución significativa en la capacidad de adhesión celular de las MUC5Bsi con respecto a MOCK (Figura 17A). Si bien a concentraciones celulares de 100,000 células/pocillo y 200,000 células/pocillo hay una tendencia a una menor adhesión celular en las MUC5Bsi comparado con las MOCK, estas no llegan a ser diferencias significativas. A una concentración celular de 400,000 células/pocillo se aprecia una disminución significativa en la capacidad de adhesión en las células MUC5Bsi ( $p < 0.1$ ) (Figura 17B).

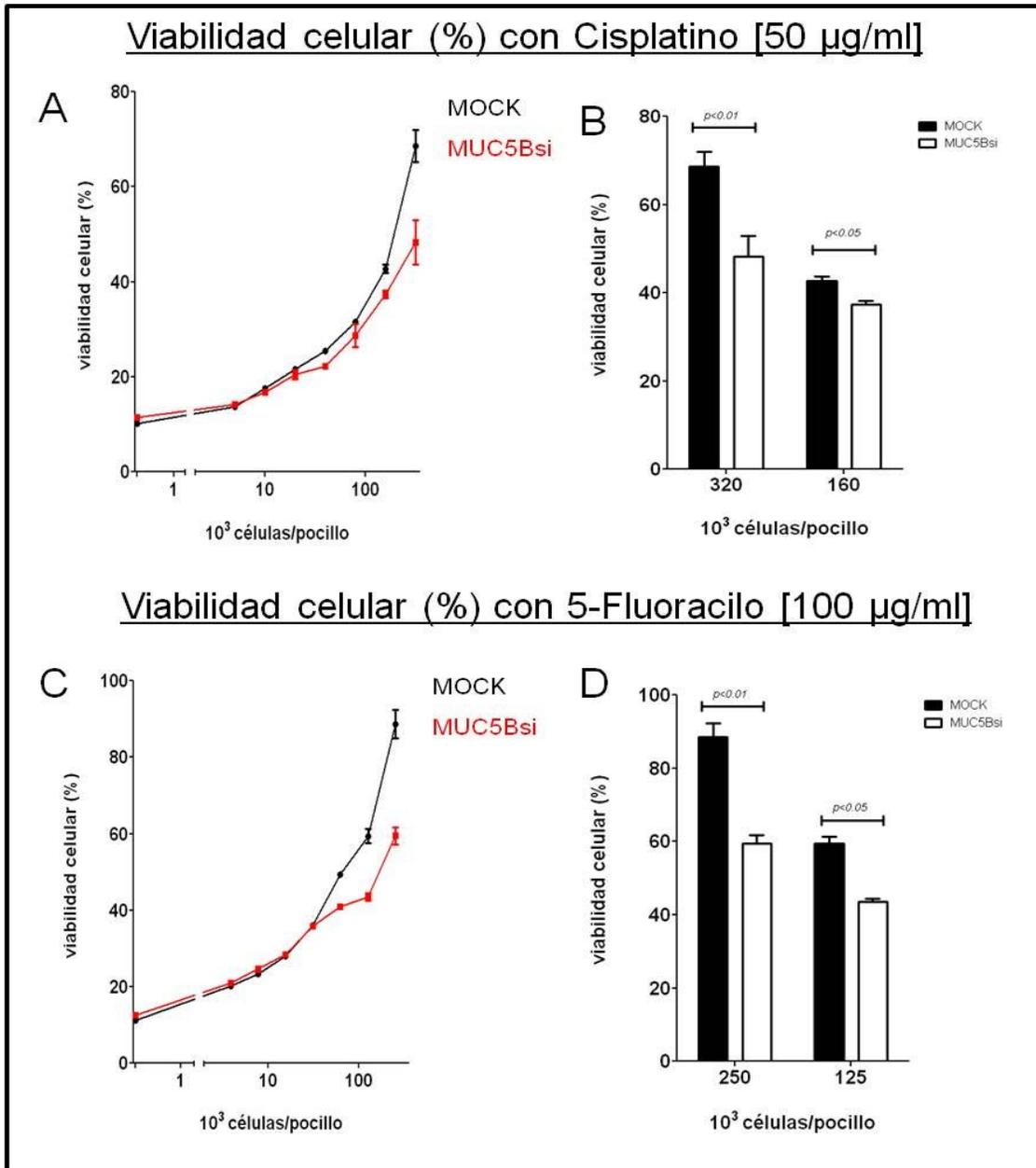


**Figura 18** - Adhesión celular por ensayo con Matrigel: **A)** Curva de nivel de adhesión celular comparando células MOCK y MUC5Bsi a distintas concentraciones celulares sobre una monocapa de matrigel que luego fueron teñidas con violeta de cristal. **B)** Gráfico mostrando disminución estadísticamente significativa entre la capacidad de adhesión de las células MOCK y MUC5Bsi.

## X. Susceptibilidad a la muerte celular inducida por drogas

### quimioterapéuticas:

Dos drogas usadas hoy en día en tratamientos de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama son Cisplatino y 5-Fluoracilo (126). El cisplatino se adhiere al ADN celular e induce apoptosis (127). El 5-Fluoracilo es un antimetabolito análogo de la timidina impidiendo su síntesis y por ende la replicación de ADN (128). Pudimos observar que al inhibir MUC5B aumenta la susceptibilidad a la muerte inducida por ambas drogas (Figura 19). Al incubar ambas células con Cisplatino (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), observamos menor viabilidad celular en las MUC5Bsi con respecto a las MOCK (Figura 19A y 19B). El mismo comportamiento ocurrió en presencia de 5-Fluoracilo (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Figura 19C y 19D). Esto sugeriría que al bloquear la expresión de MUC5B aumenta la susceptibilidad a la muerte celular inducida por las drogas quimioterapéuticas Cisplatino y 5-Fluoracilo, lo que indicaría que MUC5B estaría confiriendo resistencia a la muerte inducida por las dos drogas utilizadas.

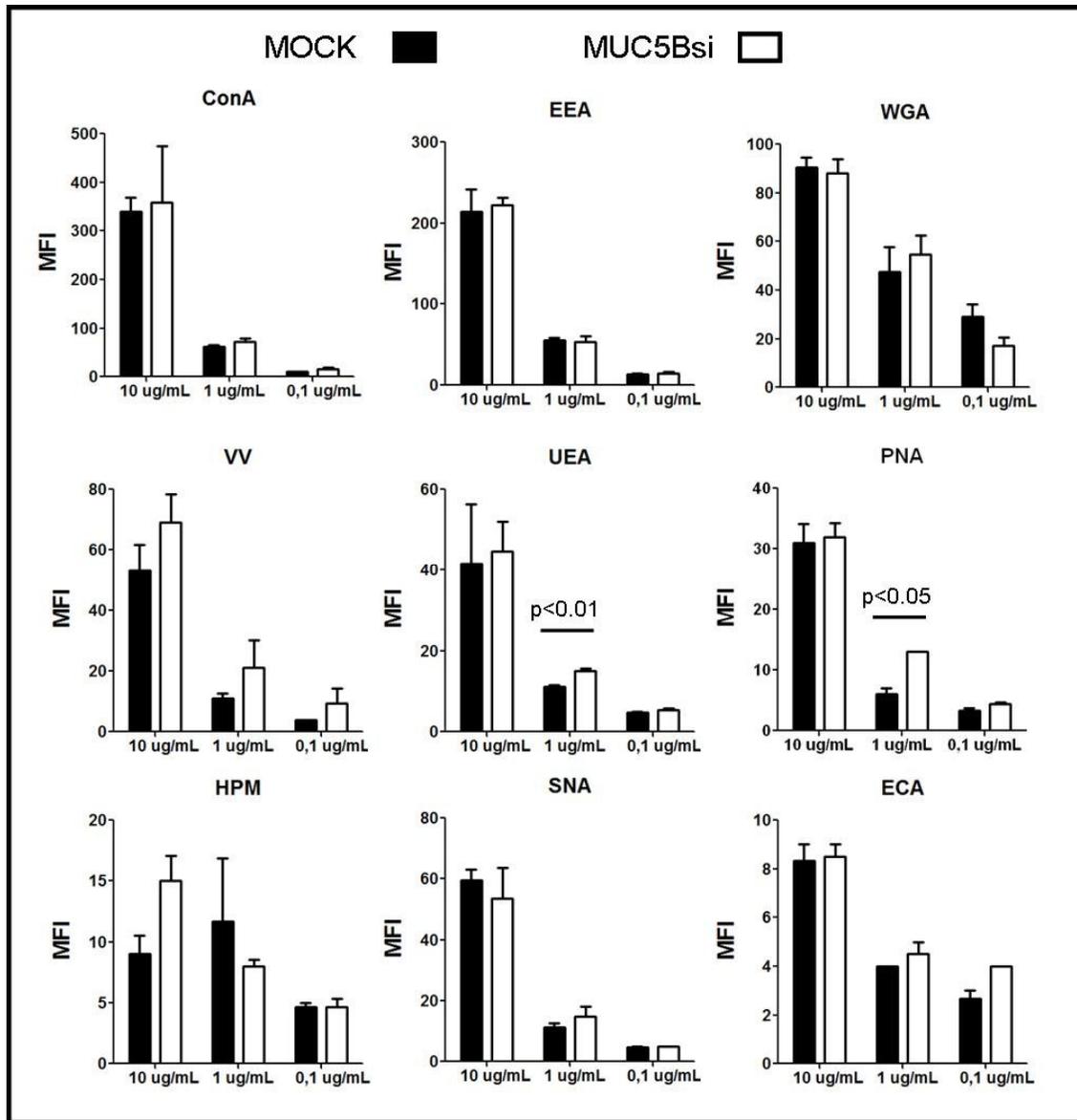


**Figura 19** – Viabilidad celular después de exposuras a Cisplatino y 5-Fluoracilo: **A)** Viabilidad celular medido por ensayo de MTT comparando células MOCK y MUC5Bsi luego de incubadas con Cisplatino [50 µg/ml]. Para el ensayo de viabilidad se incubaron las células a distintas concentraciones en RPMI sin rojo fenol para luego de incubado revelar con MTT. **B)** Viabilidad celular en presencia de Cisplatino a dos concentraciones celulares. **C)** Viabilidad celular medido por ensayo de MTT comparando células MOCK y MUC5Bsi luego de incubadas con 5-Fluoracilo [100 µg/ml]. **D)** Viabilidad celular en presencia de 5-Fluoracilo a dos concentraciones celulares. La viabilidad se expresa en porcentaje siendo 100% la viabilidad obtenida para cada una de las concentraciones celulares en ausencia de droga.

## **XI. Identificación del perfil glucídico de células MOCK y**

### **MUC5Bsi:**

Para evaluar si la ausencia de MUC5Bsi modifica el perfil glucídico de las células MCF7, se realizaron inmunoensayos con lectinas biotiniladas que reconocen diferentes estructuras carbohidratos (Tabla II de Materiales & Métodos). Hubo un aumento significativo en la detección de las lectinas *Ulex europaeus* (UEA) y *Arachis Hypogaea* (PNA) en células MUC5Bsi comparadas con células MOCK a concentraciones de extracto proteico de 1 µg/ml (Figura 20). Al mismo tiempo se pudo detectar estructuras glucídicas presentes en las células MOCK y MUC5Bsi. Se presenciaron distintos grados de expresión glucídica indicado por los distintos valores de las lectinas. Hubo una mayor reactividad de las lectinas ConA, EEA y WGA, correspondientes a las estructuras glucídicas  $\alpha$ -Man o  $\alpha$ -Glc,  $\alpha$ -Gal(1→3)gal, y (GlcNAc)<sub>2</sub> (ácido siálico) respectivamente. En menor medida las lectinas VV, UEA y PNA, revelaron la expresión de las estructuras Thr/Ser  $\alpha$ -GalNAc (antígeno Tn),  $\alpha$ -L-Fuc, y  $\beta$ -Gal(1→3)GalNAc (antígeno T) respectivamente. Por último con una menor expresión las lectinas HPM, SNA y ECA mostraron una mínima expresión de GalNAc terminal,  $\alpha$ NeuNac(2→6)al, y  $\beta$ -Gal(1→4)GlcNAc respectivamente.

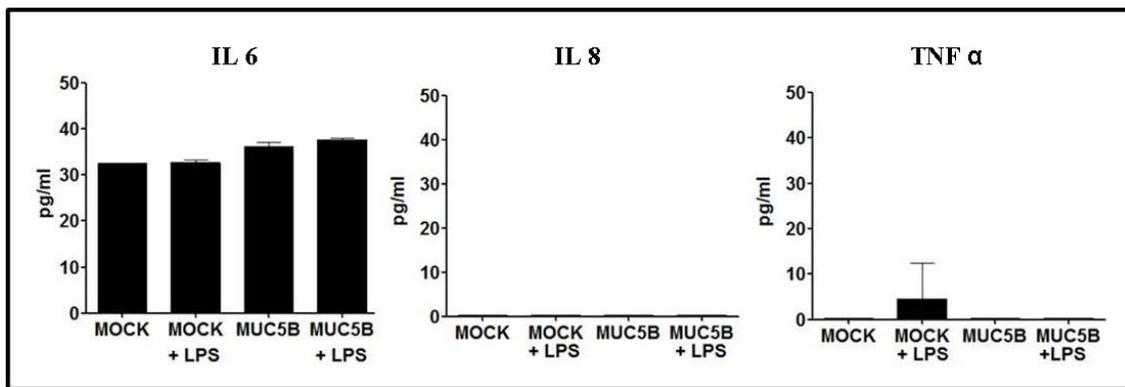


**Figura 20** – Identificación del perfil glucídico de células MOCK y MUC5Bsi: Valoración de estructuras glucídicas de células MOCK y MUC5Bsi por inmunoensayos con lectinas biotiniladas que reconocen estructuras glucídicas específicas. Para este ensayo se sensibilizó placas con extracto proteico MOCK y MUC5Bsi, se incubó con lectinas biotiniladas y Streptavidina-DyLight para luego cuantificar sus concentraciones por medio del sistema Odyssey Licor.

## **XII. Inmunomodulación de la maduración de células dendríticas por células MOCK y MUC5Bsi:**

Con el fin de evaluar si en cáncer de mama la proteína MUC5B puede llegar a tener un rol inmunomodulador sobre la maduración de DC, se evaluó la expresión de moléculas de co-estimulación (HLA-DR, CD40, CD80, CD83 y CD86) y producción de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF  $\alpha$ ) por parte de células dendríticas en presencia de células MOCK y

MUC5Bsi y sus respectivos medios condicionados (MC) por 48 hrs, en presencia y ausencia de LPS (tal como se refiere en sección de Materiales & Métodos). En primera instancia se evaluó la producción de citoquinas por parte de las células MOCK y MUC5Bsi por si solas. Como se puede apreciar en la Figura 21, confirmamos que no hay producción de IL-8 y TNF $\alpha$  (Figura 21), ni de IL-10 e IL-12 (resultados no mostrados). Observamos una mínima producción de IL-6 tanto para células MOCK como para MUC5Bsi, en presencia y ausencia de LPS.

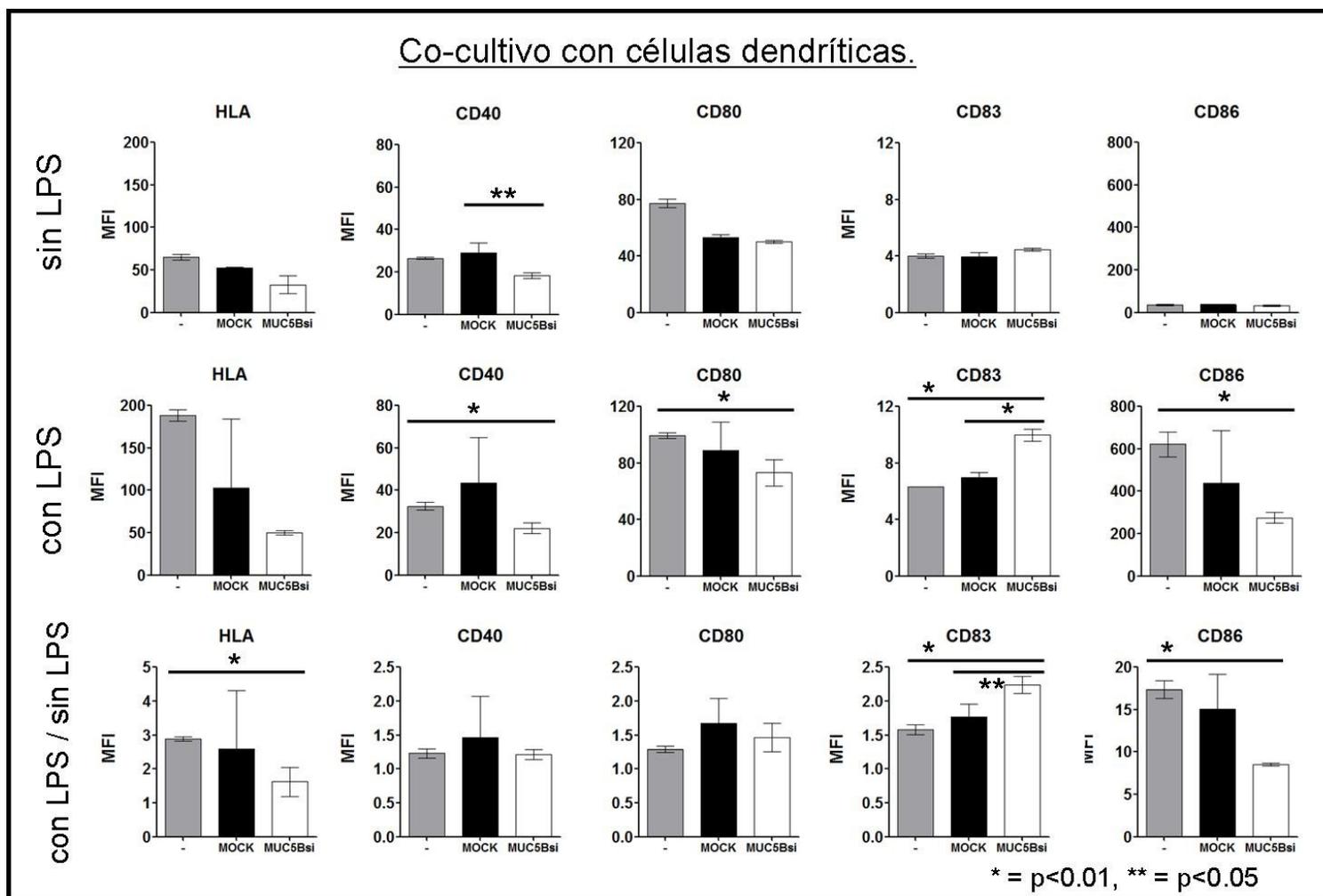


**Figura 21** – Evaluación de la producción de citoquinas por células MOCK y MUC5Bsi: La presencia de de citoquinas producidas por células MOCK y MUC5Bsi cultivadas en presencia o ausencia de LPS por 3 días fue evaluada por FlowCytomix (Bender MedSystems, Austria). Se observa una baja producción de IL-6 (aprox.: 30 pg/ml), y ausencia de IL-8 y TNF- $\alpha$ .

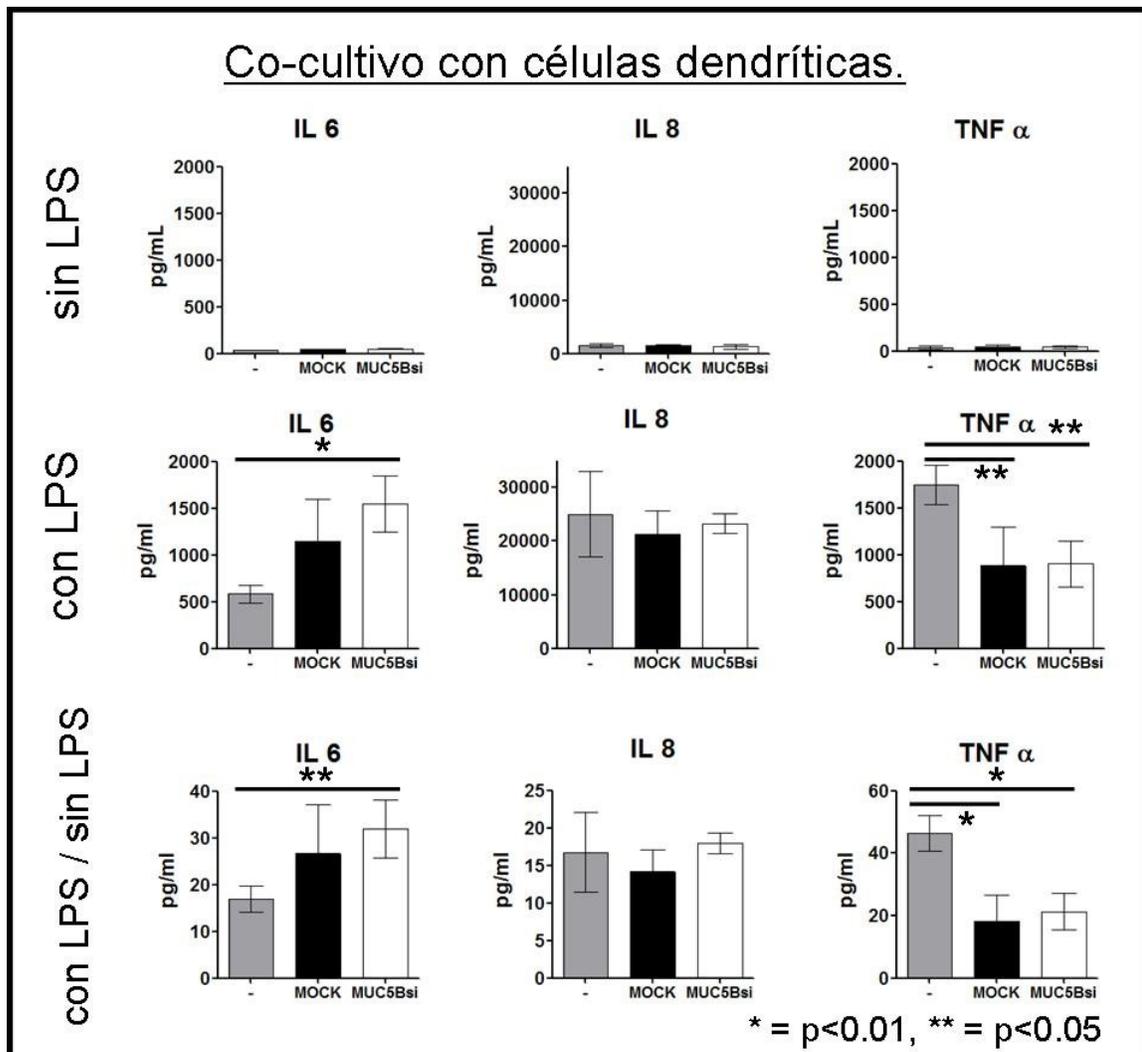
Luego estudiamos la expresión de moléculas co-estimuladoras de DCs en co-cultivo con las células MOCK y MUC5Bsi y evidenciamos un aumento significativo de la expresión de CD83 en presencia de LPS por parte de las DCs que fueron incubadas con las células MUC5Bsi comparadas con el control y las DCs incubadas con células MOCK (Figura 22). Al mismo tiempo se evidenció una disminución significativa en la expresión de HLA, CD80 y CD86 de las DCs incubadas con células MUC5Bsi, comparadas con las DCs incubadas con células MOCK (Figura 22). Con respecto a la producción de citoquinas, no se encontraron diferencias significativas entre la producción por parte DCs incubadas con células MOCK y MUC5Bsi (Figura 23). De todas maneras se vio un aumento significativo en la producción de IL-6, y una disminución de TNF  $\alpha$  por parte de las DCs incubadas con células MOCK y MUC5Bsi en comparación con el control (Figura 23). En este caso también se buscó la producción de IL-10 e IL-12 (resultados no mostrados), pero las mismas no fueron detectadas.

Al mismo tiempo, se cultivaron células dendríticas maduras en medio condicionado por células MOCK y MUC5Bsi y se evaluó la expresión de moléculas de co-estimulación y

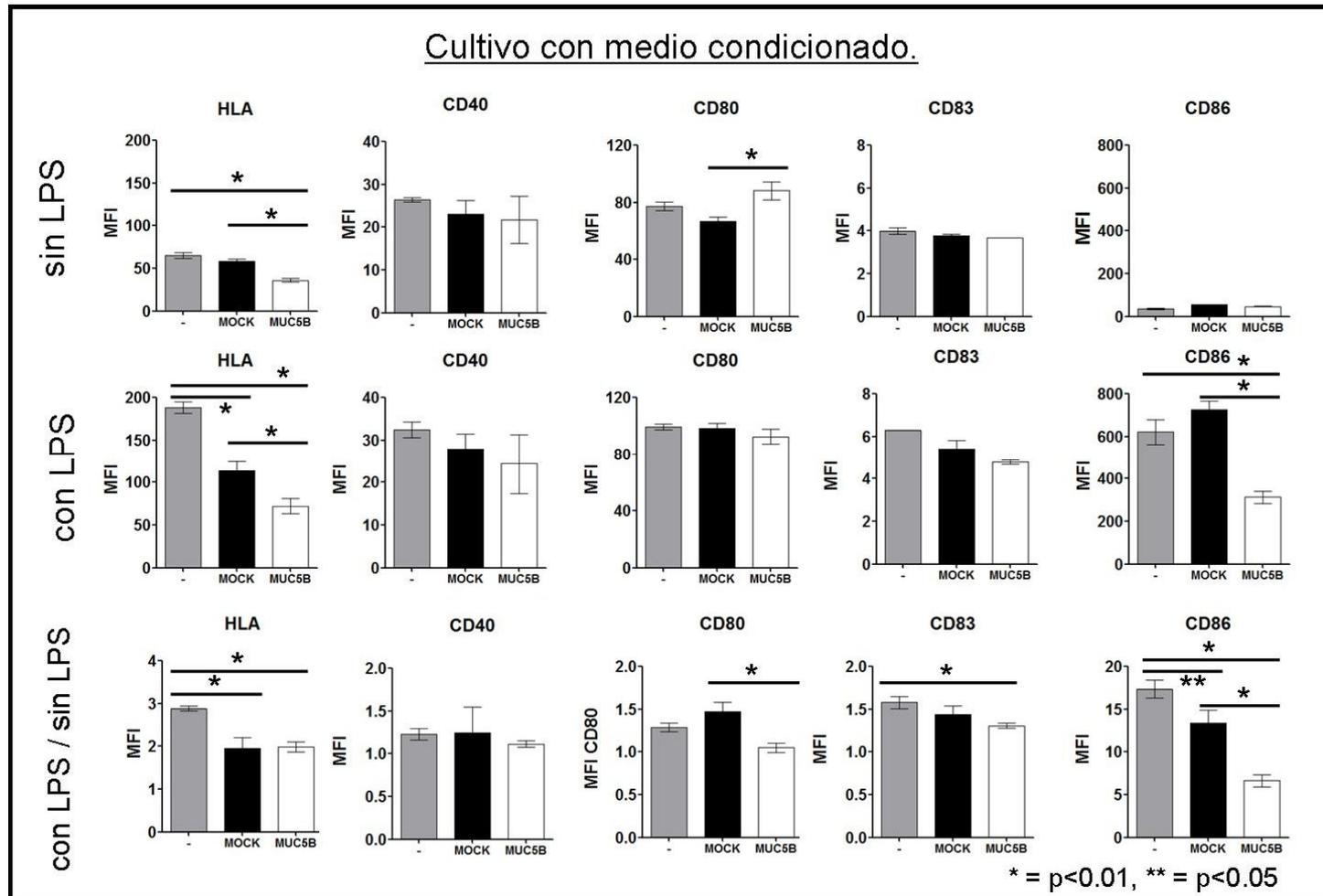
producción de citoquinas. Los resultados mostraron que en presencia de LPS hubo una disminución significativa en la expresión de HLA y CD86 por parte de las DCs cultivadas en MC de células MUC5Bsi comparadas con MC de células MOCK y su control (Figura 24). Al calcular la razón entre cultivo en presencia de LPS sobre cultivo en ausencia de LPS se apreció una disminución en la expresión de CD80 y CD86 de DCs cultivadas en MC de células MUC5Bsi comparado con MC de células MOCK (Figura 24). También se vio una disminución en la expresión de CD83 y HLA por las DCs en MC de MUC5Bsi comparado con el control (Figura 24). En el caso de las citoquinas, hubo una disminución de la producción de IL-6 y TNF  $\alpha$  por parte de las DCs en MC de células MUC5Bsi comparado con MC de células MOCK (Figura 25). Cabe resaltar que al incubar DCs con MC de células MOCK se obtiene un aumento de IL-6, que luego no es evidenciado con DCs en MC de células MUC5Bsi (Figura 25). Estos resultados sugieren que la inhibición de MUC5B en células de cáncer de mama podría mostrar una actividad anti-inflamatoria al modular la activación de células dendríticas inducida por LPS y la producción de citoquinas proinflamatorias.



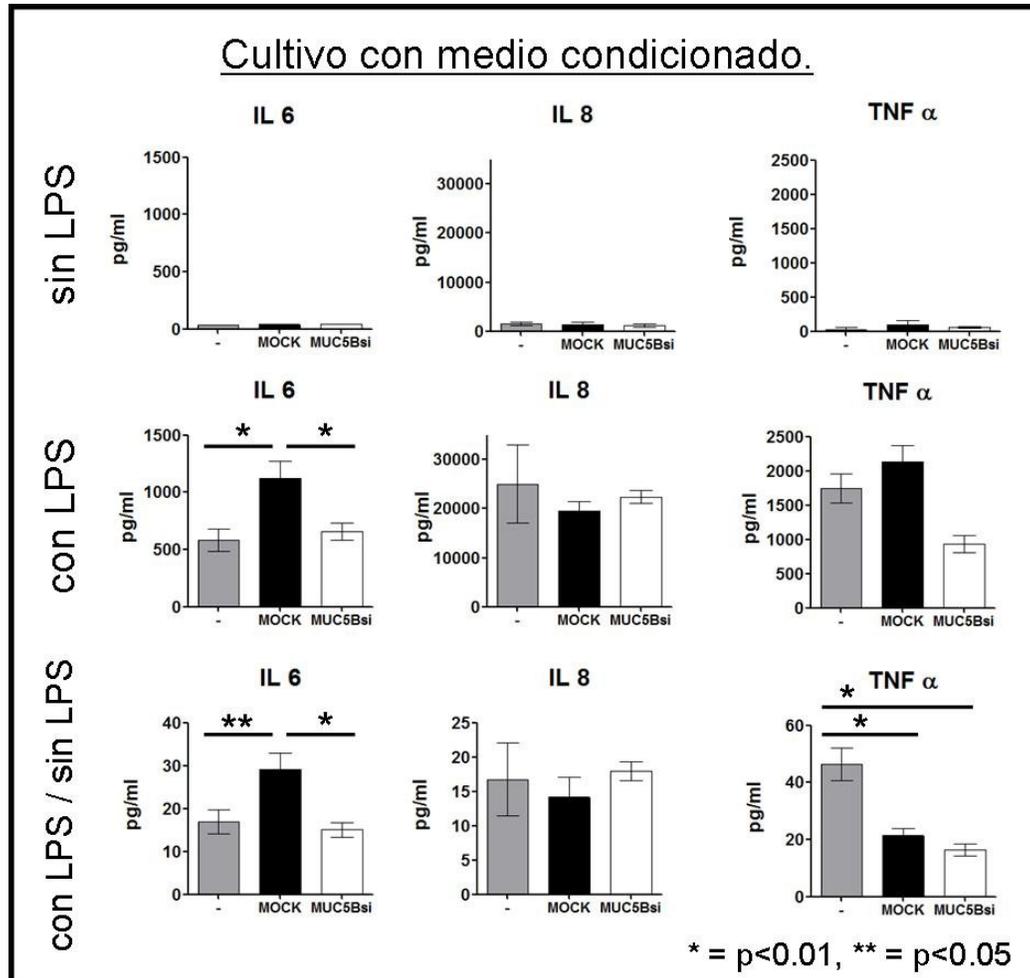
**Figura 22** – Expresión de moléculas coestimuladoras por células dendríticas cocultivadas con células MOCK y MUC5Bsi; Células dendríticas humanas se cocultivaron por 48 hrs con células MOCK y MUC5Bsi, en ausencia y presencia de LPS. La expresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 fue detectada por medio de anticuerpos específicos y medido por citometría de flujo. Se calculó la relación de la expresión de células en presencia y ausencia de LPS.



**Figura 23** – Producción de citoquinas por células dendríticas cocultivadas con células MOCK y MUC5Bsi: Células dendríticas humanas maduras se co-cultivaron por 48 hrs con células MOCK y MUC5Bsi, en ausencia y presencia de LPS. La producción de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  fue detectada por medio de anticuerpos específicos y cuantificado por citometría de flujo. No se detectó presencia de IL-10 e IL-12. La relación de la expresión de células en presencia y ausencia de LPS fue calculada para cada citoquina.



**Figura 24** – Expresión de moléculas coestimuladoras por células dendríticas cultivadas con medio condicionado de MOCK y MUC5Bsi. Células dendríticas humanas maduras se cultivaron por 48 hrs con medio condicionado de células MOCK y MUC5Bsi, en ausencia y presencia de LPS. La expresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 fue detectada por medio de anticuerpos específicos y medido por citometría de flujo. Se calculó la relación de la expresión de células en presencia y ausencia de LPS.



**Figura 25** – Producción de citoquinas por células dendríticas cultivadas con medio condicionado de células MOCK y MUC5Bsi. Células dendríticas humanas maduras se cultivaron por 48 hrs con medio condicionado por células MOCK y MUC5Bsi, en ausencia y presencia de LPS. La producción de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  fue detectada por medio de anticuerpos específicos y cuantificado por citometría de flujo. No se detectó presencia de IL-10 e IL-12. La relación de la expresión de células en presencia y ausencia de LPS fue calculada para cada citoquina.

## **Discusión:**

El cáncer ha sido, y aún es, uno de los mayores problemas biomédicos a nivel mundial, cobrándose millones de muertes y generándole altísimos gastos a los sistemas de salud en todo el mundo (3). Si bien ha habido grandes avances en materia de diagnóstico y tratamiento, lo cual le ha ido permitiendo a los pacientes gozar de una mayor sobrevida con mejor calidad de vida, aun existen tratamientos ineficientes. Por otro lado, el pronóstico para muchos tipos de cánceres debe ser mejorado considerablemente (3). De hecho, los mejores pronósticos de pacientes ocurren en aquellos que obtuvieron un diagnóstico en estadios precoces de la enfermedad, permitiéndoles iniciar tratamiento oportuno con mejores resultados (3).

La prevención primaria y los métodos de tamizaje han sido las mejores herramientas para la lucha contra muchos cánceres (3). Se hace hincapié en la prevención y el tamizaje del cáncer de mama no solo porque, en materia de calidad de vida para el paciente y costos para el sistema de salud, es siempre mejor prevenir una enfermedad que curarla, sino en parte también por la falta de alternativas en materia de tratamientos eficaces para el cáncer de mama en general (129). La quimioterapia, radioterapia e intervenciones quirúrgicas forman parte de los tratamientos convencionales contra el cáncer. Existen alternativas terapéuticas para el cáncer de mama, tales como hormonoterapia (en caso de ser positivos para receptores hormonales) y terapias inmunológicas como por ejemplo con el anticuerpo monoclonal trastuzumab (en caso de ser Her2/neu positivo) (19). En vista de los efectos adversos de los tratamientos convencionales y las limitantes de los tratamientos alternativos, es que se invierte esfuerzos en desarrollar tratamientos más eficaces, con menos efectos adversos y con un alcance para que cubra la mayoría de los subtipos de cáncer de mama. En este sentido la identificación de moléculas que participan o contribuyen a los procesos de transformación maligna, así como la comprensión de los mecanismos que ellos median, es fundamental para diseñar mejores tratamientos. La inmunoterapia y la terapia génica son alternativas prometedoras para el tratamiento del cáncer mamario.

Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas que cumplen la función fundamental de mantener la homeostasis en ambientes hostiles del cuerpo humano (32). Las mucinas también pueden actuar como sensores y receptores celulares que conducen señales en respuesta a estímulos externos que lleven a repuestas celulares coordinadas como proliferación, diferenciación y apoptosis. En muchos cánceres, principalmente en

adenocarcinomas, se ha visto que la función y la expresión de las mucinas se encuentran desregulada (32). Esto despertó gran interés derivando en estudios exhaustivos de los roles de mucinas en procesos malignos. Se vio que las mucinas pueden influir en las propiedades tumorales de distintas maneras: modificando el microambiente local, regulando la diferenciación y proliferación celular, generando invasión y metástasis, y afectando la inflamación y respuesta inmune (32). Las mucinas MUC1 y la MUC4 han sido identificadas con procesos malignos, mientras que la MUC2 actúa como supresor tumoral (la cual se encuentra subexpresada en cáncer de colon) (130).

Nuestro grupo de investigación detectó por primera vez la mucina “no mamaria” MUC5B expresarse a nivel de ARNm y proteico en tejidos y células de cáncer de mama (91, 92). La ausencia de MUC5B en tejido mamario normal, y la presencia de la misma en células de cáncer de mama despertaron nuestro interés como posible blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama. En base a esta hipótesis es que decidimos inhibir la expresión de la mucina MUC5B en células de adenocarcinoma humano MCF7 (que normalmente la expresan) y estudiar como dicha inhibición afecta sus capacidades malignas.

En primera instancia, con respecto a la morfología de las células con MUC5B inhibido, observamos que adoptaban, en su gran mayoría, formas estructurales distintas al patrón morfológico de las células control, las cuales expresan MUC5B. Existe evidencia que indicaría que un cambio en la estructura celular, estaría asociado a alteraciones en funciones básicas celulares (120). El cambio morfológico podría deberse indirectamente a un proceso de muerte celular inducido por la inhibición de MUC5B. Es decir, un planteamiento podría basarse del hecho que la inhibición de MUC5B induzca la muerte celular (apoptosis o necrosis), generándole los cambios morfológicos típicos de muerte celular, y no atribuirle estos cambios a la mera supresión de la MUC5B. Para descartar esta hipótesis, se hicieron dos cosas: 1) determinar el tipo de muerte (necrosis o apoptosis) por FACS luego de 48 hrs de incubación, lo cual arrojó resultados que descartan diferencias en la muerte celular entre células MOCK y MUC5Bsi; y 2) corroboramos al microscopio y con tinción de trypan blue, que las células MUC5Bsi en cultivo celular se mantenían vivas aun cuando exhibían un patrón morfológico distintivo.

En el primer caso, se buscó identificar si existía o no algún cambio en el tipo de muerte celular al inhibir la expresión de la MUC5B. La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada dirigido por una familia de enzimas

denominadas caspasas (122). Estas determinan, a nivel del núcleo, la activación de endonucleasas lo que provoca la fragmentación del ADN y en el citoplasma la fragmentación de las proteínas del citoesqueleto. Luego se generan cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células epiteliales adyacentes y macrófagos, impidiendo la liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular, evitando de ese modo un proceso inflamatorio (122). Por el contrario, la necrosis consta siempre de un proceso patológico, donde implica la afectación y muerte de un grupo celular. Los restos de las células necróticas son vertidos al medio extracelular, desencadenando un proceso inflamatorio, si bien los restos celulares son eventualmente fagocitados por monocitos y macrófagos. Si la inhibición de la apomucina MUC5B hubiera logrado inducir la muerte celular a través de la necrosis, hubiera desencadenado una respuesta inflamatoria, lo cual podría dirigir la activación de una respuesta inmune hacia el sitio donde se alojan las células mamarias. Una respuesta inmune localizada como consecuencia del proceso necrótico ocasionado por la inhibición de MUC5B en el tumor mamario hubiera sido de mayor ventaja que un proceso apoptótico. Sin embargo, nuestros estudios muestran que no hay diferencias en el tipo de muerte celular entre las células MOCK y MUC5Bsi.

En segunda instancia, se observó que las células MUC5Bsi mostraban una alteración en su morfología y con trypan blue se vio que todas estaban vivas. Esto podría indicarnos que la inhibición de MUC5B altera la morfología celular no por consecuencia de la muerte de la misma, sino que podría ser consecuencia de modificaciones en el citoesqueleto celular, por ejemplo (131). Una perspectiva para este resultado sería estudiar la compleja red de filamentos proteicos que se extiende por el citoplasma celular en busca de cambios entre células MOCK y MUC5Bsi. Existe la posibilidad de que la apomucina MUC5B esté interactuando con alguna proteína del citoesqueleto, tales como filamentos de actina, microtúbulos, y filamentos intermedios. Además de controlar la morfología celular y sus movimientos, el citoesqueleto controla directamente o a través de proteínas regulatorias, varias funciones celulares, incluidas las de señalización celular que promueven la continuación por el ciclo celular o apoptosis (131). Además se vio por medio del ensayo de viabilidad celular que las células MOCK se mostraban metabólicamente más activas, (característico de células con alto nivel replicativo), midiendo indirectamente la viabilidad de las células MUC5Bsi. De encontrar alguna relación entre la inhibición de la MUC5B y la interacción con alguna proteína del citoesqueleto (que además actúe sobre funciones celulares), se estaría elucidando por lo menos un mecanismo por el cual la MUC5B

podría influir en los procesos malignos en cáncer de mama. La expresión de MUC5B puede estar afectando la expresión de otras proteínas. Por eso es que estamos llevando a cabo estudios de secuenciación masiva y evaluando si existe alguna modificación del perfil proteico entre las células MOCK y las MUC5Bsi.

La capacidad de una célula de desprenderse de su tumor primario, tiene implicancias significativas con respecto a su potencial metastásico. Es por ésto que se realizaron ensayos de adhesión a proteínas de la matriz extracelular, indicando que la mucina MUC5B podría facilitarle a las células de cáncer mamario a desprenderse del tumor primario. Por último, una vez que una célula se desprende de un tumor primario, estas se alojan en sitios distantes formando micro y posteriormente macrometástasis. La mayor capacidad de formación de colonias a partir de un número limitado de células las exhibieron las células MOCK. En conclusión, podríamos sugerir que la expresión de la apomucina MUC5B: se relaciona con las células de mayor nivel replicativo; tienen una menor adhesión celular; y poseen una mayor capacidad de formación de colonias. Indirectamente, la MUC5B podría relacionarse con el proceso metastásico que exhiben las células de cáncer de mama al conferirle una mayor capacidad replicativa, una mayor facilidad para desprenderse del tumor primario y formar colonias a distancia. Al igual que la MUC5B, se ha visto que otras mucinas, MUC1 y MUC4, están involucradas en procesos malignos similares. La inhibición específica de la expresión de MUC4 en células de adenocarcinoma pancreático, por ejemplo, disminuyó también la velocidad de crecimiento celular y la capacidad de formar colonias (65). Además demostró una menor capacidad de crecimiento tumoral y de propiedades metastásicas *in vivo*. Las células con MUC4 inhibidas mostraron una menor movilidad, adhesión y agregación (65). De manera similar, la inhibición específica de MUC1 en células de cáncer pancreático redujeron significativamente la metástasis *in vivo* a nodos linfáticos, pulmón y sitios peritoneales comparado con células control (70).

En el 2012, un estudio publicado sobre MUC5B en MCF7, expone resultados que concuerdan con nuestros resultados del rol tumoral que puede llegar tener esta apomucina (82). Este grupo de investigación liderado por Desseyn, demostró que la expresión de MUC5B se relaciona a una mayor proliferación celular, una mayor capacidad de invasión y una mayor tumorigenicidad (82). Nuestros resultados y los de Valque, *et al*, (82) nos orientan hacia un perfil tumorigénico de la MUC5B. Todo resultado cobra mayor relevancia cuando los mismos son obtenidos usando distintos abordajes. El grupo de Desseyn trabajó también con células MCF7 pero

sobreexpresando solamente una pequeña porción altamente glicosilada de la MUC5B, y comparando su función con células con esta mini-MUC5B inhibida. Nosotros también trabajamos con células MCF7, pero a diferencia de las anteriores, éstas tienen inhibida la expresión endógena de la apomucina MUC5B para poder compararla con aquellas células que mantienen su expresión normal. En ambos casos, los resultados sugieren que la presencia de la apomucina MUC5B, tanto en su totalidad como en pequeñas porciones, podría estar involucrada en procesos malignos en cáncer de mama.

Dentro de las perspectivas más inmediatas para este trabajo, se encuentra la posibilidad de realizar los mismos ensayos pero en diferentes células de cáncer de mama que (después de confirmar la expresión de la apomucina MUC5B), tales como SUM185 y las distintas clases de MDA-MB (132). De corroborar los mismos resultados que se obtuvieron con MCF7, el rol de la apomucina MUC5B pasaría a cobrar mayor importancia como posible blanco terapéutico en cáncer de mama. Posteriormente podríamos plantear la inhibición de MUC5B en células de cáncer de mama de cultivos primarios obtenidos de tumores mamarios MUC5B+ de diferentes pacientes. Además, actualmente estamos realizando experimentos *in vivo* para valorar el posible rol tumorigénico de la MUC5B a nivel sistémico. Para ello estamos administrando células MOCK y MUC5Bsi en ratones *nude* y evaluando el número y tamaño de los tumores, el número de metástasis generadas, y la sobrevivencia de los ratones. Sería interesante confirmar los resultados obtenidos *in vitro* a nivel *in vivo*.

Las mucinas forman una capa protectora sobre el epitelio, y sus glicosilaciones controlan la antigenicidad, las interacciones con el ambiente y con el sistema inmune. Estas estructuras de carbohidratos llegan a componer el 80% del peso total de la mucina. Dependiendo de las estructuras de las cadenas de O-glicanos, las mucinas pueden estar involucradas en la adhesión celular o pueden tener propiedades anti-adhesivas (31). Ante la sospecha de que la inhibición de la MUC5B podría cambiar el perfil glucídico de las células, y así alterar los antígenos de carbohidratos, vimos por medio de los experimentos con lectinas biotiniladas que, a grandes rasgos, no hay cambios en la composición glucídica. Sin embargo evidenciamos, a una concentración de 1 µg/ml de extracto proteico, un aumento de la reactividad con las lectinas UEA y PNA que reconocen  $\alpha$ -L-Fuc y  $\beta$ -Gal(1→3)GalNAc (antígeno T) respectivamente. Estas diferencias son sutiles por lo que habría que confirmar dichos resultados. Otra estrategia que queda pendiente para verificar estos resultados es por medio también de lectinas

biotiniladas usando la técnica de Western Blot con extracto de células o con sobrenadante de cultivo celular.

Uno de los problemas de la terapia con fármacos quimioterapéuticos es la resistencia que muchos tipos de cánceres han mostrado contra estos. Existe evidencia que muestra que la sobreproducción de mucinas en ciertos cánceres, confiere resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos utilizados. Las mucinas actúan como barrera física ofreciendo protección a epitelios de revestimiento contra pH ácidos, enzimas proteolíticas y bacterias (32). Esta misma barrera física puede impedir que los fármacos quimioterapéuticos lleguen al sitio de acción, enmascarando los tumores. En el cáncer de páncreas, por ejemplo, si bien el 5-Fluoracilo ha demostrado tener actividad antitumoral, el éxito terapéutico ha sido limitado (79). Un planteo de dicha consecuencia es que la sobreproducción de mucina, principalmente MUC1, en la superficie epitelial del páncreas genera una densa capa que impide la actividad citotóxica del 5-Fluoracilo (79). La inhibición específica de MUC1 en cáncer de páncreas y de pulmón genera una mayor sensibilidad a las drogas quimioterapéuticas usadas en sus correspondientes tratamientos (78, 79, 80). En vista de estas observaciones, es que medimos por ensayos de viabilidad, posibles cambios en la susceptibilidad a la muerte celular inducida por 5-Fluoracilo y Cisplatino. En ambos casos demostramos que las células MUC5Bsi son menos viables en presencia de estos fármacos comparados con las células MOCK. Estas diferencias se pueden atribuir a la inhibición de la apomucina MUC5B y no a los posibles cambios en el patrón glucídico que estas células podrían llegar a exhibir, ya que como vimos anteriormente, el perfil de antígenos carbohidratos no varía, a grandes rasgos, en ausencia de MUC5B. Un estudio que queda pendiente es el de identificar por FACS el tipo de muerte celular (necrosis o apoptosis) como consecuencia de la inhibición de MUC5B en presencia de agentes quimioterapéuticos como Cisplatino y 5-Fluoracilo. Vimos que las células MOCK y MUC5Bsi por si solas no demuestran diferencia en el tipo de muerte celular, pero podría ser relevante para futuros tratamientos en caso de que existiera una diferencia en presencia de agentes quimioterapéuticos. Es de nuestro interés experimentar con ratones *nude* y corroborar que la mayor susceptibilidad a estos agentes quimioterapéuticos *in vitro*, también se observara *in vivo*.

Estos resultados podrían tener implicancias directas en materia de terapéutica a nivel clínico. En primera instancia, es importante detectar el cáncer de mama en estadios precoces, siendo la prevención primaria la mejor opción para un tratamiento terapéutico

posterior mas eficiente. Una vez que se detectan rastros de malignidad en cáncer de mama, se estudia anatómo-patológicamente para tipificar el cáncer mamario. En el caso de que sea positivo para receptores de estrógeno y progesterona la terapéutica mas apropiada es con tamoxifeno, y si es positivo para Her2/neu, se utiliza el anticuerpo monoclonal trastuzumab (23). Siguiendo estos ejemplos, se podría estudiar el nivel de expresión de la apomucina MUC5B y dirigir una terapia específica contra MUC5B en combinación con quimioterapia, tamoxifeno, y/o trastuzumab, según el tipo de cáncer que se presente. Como una perspectiva más lejana, se podría plantear la posibilidad de inhibir la expresión de la apomucina MUC5B. El uso de micro-ARN ha sido de gran utilidad para la inhibición específica a nivel de ARNm *in vivo*. Por ejemplo, el micro-ARN-145 suprime la invasión celular y metástasis al inhibir específicamente la expresión de MUC1 (115). El micro-ARN-1226 también apunta contra la MUC1 e induce la muerte celular (116). De forma similar, se podría dirigir una terapia con miARN que suprimiera la expresión de MUC5B permitiéndole al paciente un posible mejor pronóstico.

Para que un linfocito sea activado el antígeno debe ser presentado en el contexto de una célula presentadora de antígeno (APC), siendo las células dendríticas (DC), las células presentadoras de antígeno por excelencia (105). Cuando las células dendríticas maduran aumentan su expresión de MHC, al igual que de sus moléculas de co-estimulación y producción de determinado perfil de citoquinas. Las células tumorales emplean varias estrategias para eludir las respuestas inmunes. Pueden reducir la expresión de MHC-I, generar variantes con defectos en el procesamiento del MHC, o regular en menos la expresión de antígenos tumorales, todo lo cual lleva a una inmunogenicidad reducida (106). Las células tumorales pueden afectar específicamente las APC, en particular las DCs (105). Se evidenció que la MUC1 tiene la capacidad de alterar el fenotipo de células dendríticas (108), a través de la inhibición de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD40), moléculas presentadoras de antígenos (DR, CD1d) y marcadores de diferenciación (CD83) (108). Al mismo tiempo también se ha visto que alteran la producción de citoquinas (108). Nuestros resultados, muestran una disminución significativa en moléculas de co-estimulación (CD80) y de producción de citoquinas (IL-6 y TNF $\alpha$ ) por parte de las células dendríticas incubadas con medio condicionado de células MUC5Bsi en presencia de LPS.

Estos resultados podrían sugerir que la apomucina MUC5B, a diferencia de la MUC1 por ejemplo, podría de algún modo participar en la maduración de las DC

inducida por agonistas de TLR, a través del aumento de IL6 y TNF $\alpha$ . Dichos resultados contrastan a los ya obtenidos para MUC1, sin embargo, es importante resaltar que nuestras observaciones son producto de un experimento en el que indirectamente se está evaluando la actividad de MUC5B sobre DC. Para confirmar dichos resultados deberíamos purificar del MC la MUC5B (de las células MOCK), analizando la misma etapa de separación en MC de células MUC5Bsi (en principio no conteniendo MUC5B) y exponer dicho purificado a las DC. La brecha que estos resultados podrían abrir es la de orientar una posible vacuna con péptidos de MUC5B ya que su presencia esta asociada a una mayor respuesta inmune inflamatoria. Por otro lado, también se ha reportado una elevada concentración de IL6 en el suero de pacientes con cáncer de colon (133). Este estudio demostró que monocitos de sangre periférica secretan IL6 como consecuencia del efecto de las mucinas secretadas por células de cáncer de colon. El aumento de la concentración sérica de IL6, a su vez causaría un aumento en la producción de IL10 por parte de las células tumorales generando un ambiente inmunosupresor local. Del mismo modo, en nuestro trabajo, el aumento de la producción de IL6 de las células dendríticas incubadas con MC y co-cultivo con células MOCK podría deberse a un mecanismo similar por parte de las mucinas secretadas por células de cáncer de mama. Sería interesante evaluar como la producción de IL6, o en nuestro caso también de TNF $\alpha$ , afectan la producción de citoquinas antiinflamatorias por parte de las células de cáncer de mama.

## Conclusión

En general, de esta tesis de maestría podemos sugerir que la apomucina MUC5B está implicada en la tumorigenicidad de una línea celular de cáncer de mama humano de tres maneras posibles: 1) le confiere características de malignidad vinculadas a procesos metastásicos, 2) le confiere un grado de resistencia mayor a las drogas quimioterapéuticas 5-Fluoracilo y Cisplatino, y 3) podría llegar a afectar el microambiente tumoral a nivel inmunológico favoreciendo la maduración de DC inducida por agonistas TLR. A pesar de que sobre esta última afirmación se tienen datos preliminares, habría que investigar si dicha influencia también modifica la función estimuladora de las DC tratadas en presencia de MUC5B. Actualmente estamos realizando pruebas con ratones *nude*, para ver si podemos llevar este trabajo a un modelo *in vivo*. Sería interesante también explorar la posibilidad de extender estos resultados a otras líneas celulares de cáncer de mama que también expresen endógenamente la MUC5B. Estos resultados abren nuevas brechas con respecto a la apomucina MUC5B como un posible blanco terapéutico para una futura terapia contra el cáncer mamario. En un futuro se podría desarrollar una terapia contra el cáncer de mama (MUC5B+) en el que primero se monte, por medio de una vacuna, una respuesta inmune específica contra la apomucina MUC5B aprovechando las propiedades proinflamatorias que la MUC5B podría llegar a tener, y combinarla con un posterior silenciamiento génico para atenuar las propiedades metastásicas, proliferación, formación de colonias y de resistencia a la quimioterapia que la misma también podría llegar a conferirle a las células de cáncer de mama.

---

## Referencias:

1. Stewart, B; Kleihues, P. (2003). World Cancer Report 2003. **International Agency for Research on Cancer**. WHO, Lyon France.
2. Hanahan, D; Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, 144, p. 646-674.
3. Boyle, P; Levin B. (2008). World Cancer Report 2008. **International Agency for Research on Cancer**. WHO, Lyon, France.
4. Cheng, N; Chytil, A; *et al.* (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**, 6, p. 1521–1533.
5. Bhowmick, N.A; Neilson, E.G., *et al.* (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, 432, p. 332–337.
6. Burkhart, D.L; Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, 8, p. 671–682.
7. Adams, J.M; Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, 26, p. 1324–1337.
8. Lowe, S.W; Cepero, E; Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. **Nature**, 432, p. 307–315.
9. Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nature Reviews Genetics**. 6, p. 611–622.
10. Hanahan, D; Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell** 86, p. 353–364.
11. Berx, G; van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 1, a003129.
12. Cavallaro, U; Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Reviews Cancer** 4, p. 118–132.
13. Talmadge, J.E; Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research** 70, p. 5649–5669.
14. Yang, L; Pang, Y; *et al.* (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends Immunology** 31, p. 220–227.

15. Shields, J.D; Kourtis, I.C; et al. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. **Science** 328, p. 749–752.
16. Mougiakakos, D; Choudhur, A; *et al.* (2010). Regulatory T cells in cancer. **Advances in Cancer Research** 107, p. 57–117.
17. Ostrand-Rosenberg, S; Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. **Journal of Immunology** 182, p. 4499–4506.
18. **American Cancer Society.** (2011). Global Cancer Facts & Figures, 2<sup>nd</sup> edition, Atlanta, USA.  
<<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>> [Nov 2013].
19. Barrios, E. (2009). Cáncer en Uruguay 2002-2005. Principales sitios. **Revista de Oncología Médica**, 1, p. 11-13.
20. Cancer de mama Heredo-Familiar (2005). **proSEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.**
21. Perez-Lopez, F.R. (1999). Cáncer infraclínico de la mama: detección, diagnóstico y aspectos terapéuticos. **Encyclopedie Médico-Chirurgicale (Elsevier, Paris-France), Gynécologie** 865, p. 12-20.
22. Abdulkareem, IH; Zurmi, IB. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. **Nigerian Journal of Clinical Practice** 15, p. 9-14.
23. Tsang, RY; Finn, RS. (2012). Beyond Trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. **British Journal of Cancer** 106, p. 6-13.
24. Markiv, A; Rambaruth, NDS; *et al.* (2012). Beyond the genome and proteome: targeting protein modifications in cancer. **Current Opinion in Pharmacology** 12, p. 408-413.
25. Schachter, H; Freeze HH. (2009). Glycosylation diseases: quo vadis? **Biochimica et Biophysica Acta** 1792, p. 925-930.
26. Apweiler, R; Hermjakob, H; *et al.* (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of SWISS-PROT database. **Biochimica et Biophysica Acta** 1473, p. 4-8.
27. Lis, H; Sharon N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **European Journal of Biochemistry** 218, p. 1-27.
28. Lodish H, *et al.* (2000) **Molecular Cell Biology. Section 17.7, Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex.** 4th edition. New York: W. H. Freeman; <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/>> [Sept 2013].

- 
29. Brockhausen, I; *et al.* (2009). Chapter 9: Essentials of Glycobiology. **O-GalNAc Glycans**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/>> [Sept 2013].
  30. Varki, A; *et al.* (1999). Chapter 8: O-Glycans. **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20721/>> [Sept 2013].
  31. Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. **EMBO Reports** 7, p. 599-604.
  32. Hollingsworth, MA; Swanson, BJ. (2004). Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface. **Nature Reviews** 4, p. 45-60.
  33. Dekker, J; Rossen, J; *et al.* (2002). The MUC family: an obituary. **Trends in Biochemical Science** 27, p. 126– 131.
  34. Bansil, T; Turner, Bradley. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science** 11, p. 164-170.
  35. Kufe, DW. (2009). Mucins in cancer: Function , prognosis and therapy. **Nature Reviews in Cancer** 9, p. 874-885.
  36. Chen, Y; Zhao, YH; *et al.* (2004). Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 30, p. 155-165.
  37. Higuchi, T; Takuya, O; *et al.* (2004). Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regultaded in injured kidney. **Journal of Biological Chemistry** 279, p. 1968-1979.
  38. Itoh, Y; Kamata-Sakurai, M; *et al.* (2008). Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: A novel transmembrane mucin. **Glycobiology** 18, p. 74-83.
  39. Prochet, N; Nguyen, VC; *et al.* (1991). Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 175, p. 414-422.
  40. Tsutsumida, H; Goto, M; *et al.* (2007). MUC4 expression correlates with poor prognosis in small-sized lung adenocarcinoma. **Lung Cancer** 55, p. 195-203.
  41. Hamada, T; Wakamatsu, T; *et al.* (2011). MUC4 is a novel prognostic factor of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer** doi: 10.1002/ijc.26187.

- 
42. Moniaux, N; Varshney, GC; *et al.* (2004). Generation and characterization of anti-MUC4 monoclonal antibodies reactive with normal and cancer cells in humans. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 52, p. 253-261.
  43. Moehle, C; Ackerman, N; *et al.* (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. **Journal of Molecular Medicine** 84, p. 1055-1066.
  44. Gosalia, N; Leir, SH; Harris, A. (2012). Coordinate Regulation of the Gel-forming Mucin Genes at Chromosome 11p15.5. **The Journal of Biological Chemistry** 288, p. 6717-6725.
  45. Perez-Vilar, J; Hill, R. (1999). The structure and assembly of secreted mucins. **The Journal of Biological Chemistry** 274 p. 31751–31754.
  46. Turner, B; Bhaskar, KR; *et al.* (1999). Cysteine-rich regions of pig gastric mucin contain von Willebrand factor and cystine knot domains at the carboxyl terminal. **Biochimica et Biophysica Acta** 1447, p. 77–92.
  47. Bell, S; Xu, G; Forstner, J. (2001). Role of the cystine-knot motif at the C-terminus of rat mucin protein Muc2 in dimer formation and secretion. **Biochemical Journal** 357, p.203– 209.
  48. Bhaskar, KR; Garik, P; *et al.* (1992). Viscous fingering of HCl through gastric mucin. **Nature** 360, p. 458-461.
  49. Tran, CP; Cook, G; *et al.* (1999). Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. **Gut** 44, p. 636-642.
  50. Taupin, D; Wu, DC; *et al.* (1999). The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor – and MAP kinase-dependent interregulation. **Journal of Clinical Investigation** 103, p. R31-R38.
  51. Longman, RJ; Douthwaite, J; *et al.* (2000). Coordinated localization of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. **Gut** 47, p. 792-800.
  52. Phalipon, A; Cardona, AT; *et al.* (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. **Immunity** 17, p. 107-115.
  53. Reader, JR; Hyde, DM; *et al.* (2003). Interleukin-9 induces mucus cell metaplasia independent of inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 28, p. 664-672.
  54. Dabbagh, K; Takeyama, K; *et al.* (1999). IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Immunology** 162, p. 6233-6237.

- 
55. Song, KS; Lee, WJ; *et al.* (2003). Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinase-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry** 278, p. 23243-23450.
56. Kibe, A; Inoue, H; *et al.* (2003). Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 167, p. 50-56.
57. Enss, ML; Cornberg, M; *et al.* (2000). Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. **Inflammation Research** 49, p. 162-169.
58. Velcich, A; Yang, W; *et al.* (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. **Science** 295, p. 1726-1729.
59. Brinkman-Van der Linden, EC; Varki, A. (2000). New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. **Journal of Biological Chemistry** 275, p. 8626-8632.
60. Cohen, PA; Penga, L; *et al.* (2001). T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. **Critical Reviews in Immunology** 21, p. 215-248.
61. Chan, AK; Lockhart, DC; *et al.* (1999). Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. **International Journal of Cancer** 82, p. 721-726.
62. Pochampalli, MR; Bejjani, RM; *et al.* (2007). MUC1 is a novel regulator or ErbB1 receptor trafficking. **Oncogene** 26, p. 1693-1701.
63. Hattrup, CL; Gendler, SJ. (2006). MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research** 8, p. R37.
64. Moniaux, N; Escande, F; *et al.* (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. **Frontiers in Bioscience** 6, p. D1192-D1196.
65. Chaturvedi, P; Sing, AP; *et al.* (2008). MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. **Cancer Research** 68, p. 2065-2070.
66. Shibahara, H; Tamada, S; *et al.* (2004). MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. **Hepatology** 39, p. 220-229.
67. Saitou, M; Goto, M; *et al.* (2005). MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. **Journal of Clinical Pathology** 58, p. 845-852.

- 
68. Tamada, S; Shibahara, H; *et al.* (2006). MUC4 is a novel prognostic factor of extrahepatic bile duct carcinoma. **Clinical Cancer Research** 12, p. 4257-4264.
69. Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 103, p. 211-225.
70. Tsutsumida, H; Swanson, BJ; *et al.* (2006). RNA Interference Suppression of MUC1 Reduces the Growth Rate and Metastatic Phenotype of Human Pancreatic Cancer Cells. **Human Cancer Biology** 12, p. 2976-2987.
71. Springer, GF; Desai, PR; *et al.* (1995). T/Tn pancarcinoma autoantigens: fundamental, diagnostic, and prognostic aspects. **Cancer Detection and Prevention** 19 p. 173-182.
72. Vogelstein, B; Lane, D; *et al.* (2000). Surfing the p53 network. **Nature** 408, p. 307–310.
73. Meany, DL; Chan DW. (2011). Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical Proteomics** 8, doi: 10.1186/1559-0275-8-7.
74. Tsuboi, S; Fukuda, M. (2001). Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. **Bioessays** 23, p. 46-53.
75. Uemura, T; Shiozaki, K; *et al.* (2009). Contribution of sialidases NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. **Oncogene** 28, p. 1218-1229.
76. Wagner, KW; Punnoose, EA; *et al.* (2007). Death receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. **Nature Medicine** 13, p. 1070-1077.
77. Freire-de-Lima, L; Gelfenbeyn, K; *et al.* (2011). Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108, p. 17690-17695.
78. van Triest, B; Peters, GJ. (1999). Thymidylate Synthase: a target for combination therapy and determinant of chemotherapeutic response in colorectal cancer. **Oncology** 57, p. 179–194.
79. Kalra, AV; Campbell, RB. (2007). Mucin impedes cytotoxic effect of 5-FU against growth of human pancreatic cancer cells: overcoming cellular barriers for therapeutic gain. **British Journal of Cancer** 97, p. 910 – 918.
80. Ren, J; Agata, N; *et al.* (2004). Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. **Cancer Cell** 5, p. 163-75.
81. Siragusa, M; Zerilli, M; *et al.* (2007). MUC1 oncoprotein promotes refractoriness to chemotherapy in thyroid cancer cells. **Cancer Research** 1, p. 5522-30

- 
82. Valque, H; Gouyer, V; *et al.* (2012). MUC5B Leads to Aggressive Behavior of Breast Cancer MCF7 Cells. **Plos One** 7, p. e46699.
83. Desseyn, JL; Guyonnet-Duperat, V; *et al.* (1997). Human Mucin Gene *MUC5B*, the 10.7-kb Large Central Exon Encodes Various Alternate Subdomains Resulting in a Super-repeat. **The Journal of Biological Chemistry** 272, p. 3168-3178.
84. Copin, MC; Buisine, MP; *et al.* (2001). Normal respiratory mucosa, precursor lesions and lung carcinomas: differential expression of human mucin genes. **Frontiers in Bioscience** 6, p. D1264-D1275.
85. Buisine, MP; Devisme, L; *et al.* (1999). Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 20, p. 209-218.
86. Copin, MC; Devisme, L; *et al.* (2000). From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. **International Journal of Cancer** 86, p. 162-168.
87. Reid, CJ; Gould, S; *et al.* (1997). Developmental expression of mucin genes in the human respiratory tract. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 17, p. 592-598.
88. Sharma, P. (1998). MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 19, p. 30-37.
89. Voynow, JA. (2002). What does mucin have to do with lung disease? **Paediatric Respiratory Reviews** 3, p. 98-103.
90. Andrianifahanana, M; Moniaux, N; *et al.* (2006). Regulation of mucin expresión: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1765, p. 189-222.
91. Berois, N; Varangot, M; *et al.* (2003). Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. **International Journal of Cancer** 103, p. 550-555.
92. Sónora, C; Mazal, M; *et al.* (2006). Immunohistochemical analysis of MUC5B apomucin expression in breast cancer and non-malignant breast tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 54, p. 289-299.
93. Pigny, P; Guyonnet-Duperat, V; *et al.* (1996). Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. **Genomics** 38, p. 340-352.
94. Van Seuning, I; Pigny, P; *et al.* (2001). Transcriptional regulation of the 11p15.5 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer? **Frontiers in Bioscience** 6, p. D1216-D1234.

- 
95. Vincent, A; Perrasi, M; *et al.* (2007). Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. **Oncogene** 26, p. 6566-6576.
96. Yamada, N; Kitamoto, S; *et al.* (2011). Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers. **Clinical Epigenetics** 2, p. 85-96.
97. Bell, AC; West, AG; *et al.* (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. **Cell** 98, p. 387-396.
98. Boyle, AP; Song, L; *et al.* (2011). High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. **Genome Research** 21, p. 456-464.
99. Caras, I; Grigorescu, A; *et al.* (2004). Evidence of immune defects in breast and lung cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 53, p. 1146-1152.
100. Molling, JW; Kolgen, W; *et al.* (2005). Peripheral blood IFN  $\gamma$ -secreting V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. **International Journal of Cancer** 116, p. 87-93.
101. Konjevic, G; Radenkovic, S; *et al.* (2011). Association of decreased NK cell activity and IFN expression with pSTAT dysregulation in breast cancer patients. **Journal of BUON**. 16, p. 219-226.
102. Gruber, IV; Yousfi, SE; *et al.* (2008). Down-regulation of CD28, TCRzeta ( $\zeta$ ) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients. **Anticancer Research** 28, p. 779-784.
103. Diaz-Montero, CM; Salem, ML; *et al.* (2009). Increased circulating myeloide-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 58, p. 49-59.
104. Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, S. (2008). **Inmunologia celular y molecular**. 6<sup>a</sup> edición, Barcelona, Elsevier.
105. Steinman, R.M; Banchereau, J. (2007). Taking Dendritic Cells into Medicine. **Nature** 449, p. 419-426.
106. Kiertcher, SM; Luo, J; *et al.* (2002). Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology** 164, p. 1269-1276.
107. Anandkumar, A; Devaraj, H (2013). Tumour Immunomodulation: Mucins in Resistance to Initiation and Maturation of Immune Response Against Tumours. **Scandinavian Journal of Immunology** 78, doi: 10.1111/sji.12019.
107. Rughetti, A; Pellicciotta, I; *et al.* (2005). Recombinant Tumor-Associated MUC1 Glycoprotein Impairs the Differentiation and Function of Dendritic Cells. **The journal of Immunology** 174, p. 7764-7772.

109. Kontani, K; Taguchi, O; *et al.* (2003). Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. **International Journal of Molecular Medicine** 12, p. 493-502.
110. Ishida, A; Ohta, M; *et al* (2008). Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. **Proteomics** 8, p. 3342-3349.
111. Miles, D; Roche, H; *et al.* (2011). Theratope Study Group. Phase III multicenter clinical trial of the sialyl-TN (STn)-keyhole limpet hemocyanin (KLH) vaccine for metastatic breast cancer. **Oncologist** 16, p. 1092-1100.
112. Kimura, T; McKolanis, JR; *et al.* (2013). MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study. **Cancer Prevention Research** 6, p. 18-26.
113. Baar, J. (2013). MUC1 vaccine for triple negative breast cancer (ongoing study). **US National Institute of Health – Clinical Trials**. <<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00986609>> [Nov 2013]
114. Kurreck, J. (2009). RNA interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. **Angewandte Chemie International Edition** 48, p. 1378-1398.
115. Sachdeva, M; Mo, YY (2010). MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. **Cancer Research** 70, p. 378-387.
116. Jin, C; Rajabi, H; Kufe, D (2010). miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. **International Journal of Oncology** 37, p. 61-69.
117. Hughes, CS; Postovit, LM; *et al.* (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics** 10, p. 1886-1890.
118. Smith, PK; Krohn, RI; *et al* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry** 150, p. 76-85.
119. Tiscornia, I; Sanchez-Martins, V; *et al* (2012). Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an *in vitro* co-culture assay with intestinal epithelial cells. **Journal of Immunological Methods** 384, p. 164-170.
120. Brandhagen, BN; Tieszen, CR; *et al* (2013). Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. **BMC Cancer** 13, doi:10.1186/1471-2407-13-35

121. van Meerlon, J; Kaspers, *et al.* (2011). Cell Sensitivity assays: The MTT Assay. **Cancer Cell Culture** 731, p. 237-245.
122. Fink, SL; Cookson, BT (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunology** 73, p. 1907-1916.
123. Sawai, H; Domae, N. (2011). Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 411, p. 569-573.
124. Singh, AP; Moniaux, N; *et al* (2004). Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. **Cancer Research** 15, p. 622-630.
125. Brooks, SA; Lomax-Browne, HJ; *et al* (2010). Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochemica** 112, p. 3-25.
126. Lekakis, L; Tryfonopoulos, D; *et al.* (2012). Salvage chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in metastatic breast cancer. Particular activity against liver metastases. **Anticancer Research** 32, p. 1833-1837.
127. Siddik, ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene** 20, p. 7265-7279.
128. Longley, DB; Harkin, DP; *et al* (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews in Cancer** 3, p. 330-338.
129. Onitilo, AA; Engel, JM; *et al* (2009). Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. **Clinical Med. Research** 7, p. 4-13.
130. Bafna, S; Kaur, S; *et al* (2010). Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. **Oncogene** 29, p. 2893-2904.
131. Meredith, J.E; Schwartz, M.A. (1997). Integrins, adhesion and apoptosis. **Trends in Cell Biology** 7, p.146-150.
132. Holliday, DL; Speirs, V (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research** 13, p. 215-227.
133. Yokoigawa, N; Takeuchi, N; *et al* (2005). Enhanced Production of Interleukin 6 in Peripheral Blood Monocytes Stimulated with Mucins Secreted into the Bloodstream. **Human Cancer Biology** 11, p. 6127-6132.