

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con
Orientación en Biotecnología Marina**

**Ingeniería de células cancerosas de mama para la
sobreproducción de la proteína Smad7, un inhibidor del
TGF-beta**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Elva Alejandra Gárate Carrillo

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Elva Alejandra Gárate Carrillo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Director de tesis

Miembros del comité
Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dr. Humberto Lobato Morales



Dr. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en ciencias de
la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Elva Alejandra Gárate Carrillo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Ingeniería de células cancerosas de mama para la sobreproducción de la proteína Smad7, un inhibidor del TGF-beta

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de los avances en el desarrollo de fármacos para tratar este padecimiento, las terapias utilizadas hasta el momento provocan diversos efectos secundarios en los pacientes. Además, después de la terapia antitumoral, existe la posibilidad de que el tumor reincida con mayor severidad e incluso en sitios distantes al origen primario; lo que aumenta las tasas de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que solos o combinados con las terapias actuales ofrezcan una alternativa para tratar esta enfermedad. Una de las estrategias es enfocar los esfuerzos en dilucidar vías de señalización celular que estén alteradas en el proceso de progresión tumoral. En el caso particular del cáncer de mama, la participación de la vía del Factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF β) en procesos clave para el establecimiento y progresión del cáncer ha sido ampliamente documentada. Este trabajo tuvo como objetivo modificar genéticamente células de cáncer de mama MDA-MB-231 mediante un sistema lentiviral que permitiera la sobreexpresión de la proteína Smad7, un inhibidor negativo de la vía de señalización del TGF β . Las células estables generadas sobreexpresaron el transcrito y la proteína Smad7. Al caracterizarlas, la expresión de PMEPA1, gen altamente regulado por TGF β se vio disminuida. La tasa de proliferación se mantuvo sin cambios, no así el grado de migración comparado con células parentales. Además, presentaron una morfología distinta a la convencional, lo que sugiere que la sobreexpresión de Smad7 inhibe la vía del TGF β posiblemente alterando y disminuyendo la agresividad y el potencial metastásico de las células de cáncer de mama.

Palabras clave: cáncer de mama, TGF β , sobreexpresión, Smad7, lentivirus.

Abstract of the thesis presented by **Elva Alejandra Gárate Carrillo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with a Marine Biotechnology orientation.

Engineering breast cancer cells for the overproduction of the TGF beta protein inhibitor Smad7

Abstract approved by:

Dr. Patricia Juárez Camacho
Thesis Advisor

Breast cancer is one of the main causes of death among women on a global scale. Despite the advances on the development of new therapies against this pathology, secondary effects generated by these agents still remain a great concern. Furthermore, anticancer therapies can increase tumor aggressiveness, and reappear at different sites from the primary tumor, increasing mortality and morbidity. Therefore, it is of great need to search for and characterize new therapeutic agents that provide a more effective treatment alternative, alone or combined with conventional anticancer agents. The transformation growth factor beta (TGF β) is a key regulator for cancer progression and colonization. In this work, we generated stable MDA-MB-231 cells overexpressing the Smad7 protein, a negative regulator of TGF β , using a lentiviral system as a gene transfer strategy. Overexpression of Smad7 mRNA was tested by RT-qPCR and at a protein level by Western blot. Smad7 overexpressed in the stable cells inhibited TGF β signaling demonstrated by inhibition of PMEPA1 negative TGF β regulated gene. The proliferation rate was not affected. However, the migration rate significantly decrease compared to the parental cancer cell line. Our results suggest that overexpression of the Smad7 protein inhibits the TGF β signaling pathway, impairing the migration rate and altering the fibroblast like phenotype of breast cancer cells *in-vitro*.

Keywords: breast cancer, TGF β , overexpression, Smad7, lentivirus.

Dedicatoria

A don Chato, el hombre que sin saberlo, me adentró en este mundo del cáncer...

A mi "Mexicali", que a pesar de la distancia siempre está cerca.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la maestría a través del número de registro 340508 dentro del programa de becas de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida, al Departamento de Innovación Biomédica; por darme la oportunidad de realizar una maestría, formar parte de un equipo de trabajo, y por su aporte científico y conocimientos transmitidos.

A mí tutora, la Dra. Patricia Juárez, por su verdadera asesoría, su entusiasmo, su experiencia y por creer en mi capacidad como estudiante.

A mi comité de tesis, los doctores: Carolina Álvarez, Alejandro Huerta y Humberto Lobato, así como al Dr. Pierrick Fournier por sus consejos y aportaciones para enriquecer este proyecto.

Al grupo de trabajo de cáncer y hueso (Florian, Akhil, Prakhar, Andrea, Danna, Mónica, Gerardo, Rolando, Adriana y Marylú), por la retroalimentación, la ayuda, el trabajo de equipo y el conocimiento compartido.

A Fernando Guerra por ser mi primer asesor en el trabajo de laboratorio. A Naye, por sus ganas, su actitud positiva y su ayuda invaluable en distintas partes de mi proyecto. A Valentín Mendoza y al Dr. López Casillas, por no tratarme como extraña en un laboratorio nuevo y ayudarme en cada experimento realizado durante mi estancia académica.

A mis raíces, esas dos mujeres, que enseñan más con la experiencia, los abrazos, las historias. Las que llevo en el corazón en cada paso que doy y a las que quiero con el cariño más sincero; mi nana Cruz y mi nana Chinda.

A los dos pilares que tengo. Los que me enseñan con sus actos cómo ser una persona de bien; a ellos que me dieron alas para volar todo lo que yo quiera, pero confiados siempre en mi regreso; los que han sabido guiarme, apoyarme, quererme. Mi admiración, mi orgullo y amor eterno para mis padres.

Moni y Caro, mis compañeras de vida, de viajes y aventuras. Carlos, mi hermano por elección, mi confidente y cómplice para siempre.

A los Gárate por su unidad, a los Carrillo por su alegría.

A Nadia, mi querida amiga. La que me ha enseñado a apreciar y maravillarme por la naturaleza. Gracias por estar ahí, por crecer conmigo. Ana, Pris, Mari, Pam y Fercho por hacer de mi carrera universitaria todo un pasatiempo lleno de anécdotas y buenos recuerdos.

A esa persona que me ayuda a creer, a intentar, a no tener miedo. Gracias Luis por tu seguridad, por compartir mis ideales, por soportar mis ausencias ¡ah!, y ayudarme a mejorar en las presentaciones.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Lista de acrónimos	xi
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	6
1.1.1 El TGF β y su vía de señalización.....	6
1.1.2 Inhibidores de la vía de señalización del TGF β con potencial terapéutico.....	9
1.1.3 Uso de lentivirus para modificar el material genético de células tumorales.....	12
1.2. Justificación.....	14
1.3. Hipótesis	15
1.4. Objetivos.....	15
1.4.1 General.....	15
1.4.2 Específicos.....	15
2. Metodología	16
2.1 Clonación de Smad7 en el vector de expresión lentiviral.....	16
2.2 Transfección transiente de Smad7 en células Cos-7.....	18
2.2.1 RT-qPCR.....	19
2.2.2 Western blot.....	19
2.3 Purificación de plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral.....	20
2.4 Cultivo celular.....	2
2.5 Generación de células estables por medio del sistema lentiviral.....	21

2.5.1 Selección de clonas estables con puromicina.....	21
2.5.2 Transducción genética por medio del sistema lentiviral.....	22
2.6 Caracterización molecular y análisis de actividad.....	23
2.7 Ensayos de actividad celular.....	23
2.8 Análisis estadístico.....	24
3. Resultados	25
3.1 Análisis de restricción de PCMV5-Smad7-HA.....	25
3.2 Transfección transiente a células Cos-7 para evaluar la expresión de Smad7.....	29
3.3 Purificación de los plásmidos de empaquetamiento.....	32
3.4 Transducción lentiviral.....	33
3.5 Las células MDA-MB-231 estables sobreexpresan Smad7.....	34
3.6 La sobreexpresión de Smad7 en MDA-MB-231 disminuye con el paso del tiempo....	35
3.7 Evaluación de la actividad de Smad7 en las células MDA-S7.....	36
3.8 La sobreexpresión de Smad7 en las células estables no altera la proliferación, pero sí la migración celular.....	37
3.9 Betaglicano soluble. Otro inhibidor del TGF β	40
4. Discusión	44
4.1 Eficiencia del Sistema lentiviral.....	44
4.2 Sobreexpresión de Smad7 y caracterización celular.....	46
4.3 Tasa de proliferación de las células MDA-S7 estables.....	46
4.4 Potencial de migración de MDA-S7 estables.....	47
4.5 Efectos de la sobreexpresión de sBG en MDA-MB-231.....	48
5. Conclusiones.....	50
6. Perspectivas.....	50
7. Literatura citada.....	51
8. Apéndices.....	55

Lista de figuras

Figura		Página
1	Círculo vicioso de metástasis ósea.....	4
2	La vía de Señalización del TGF β	8
3	Estructura y función de las regiones de Betaglicano.....	11
4	Generación de lentivirus de tercera generación.....	13
5	Esquema general del diseño experimental del proyecto.....	16
6	Representación esquemática del diseño de primers.....	17
7	Restricción enzimática de pCMV5-Smad7-HA.....	25
8	PCR de gradiente de los insertos Smad7 (A) y Smad7-HA (B).....	26
9	Amplificación de los insertos (A) Smad7 1278pb y (B) Smad7-HA, 1,314pb.....	27
10	Análisis de restricción de las construcciones generadas.....	27
11	Secuenciación de pLJM1-Smad7 y pLJM1-Smad7-HA.....	29
12	Extracción de RNA a partir de células Cos7.....	30
13	Células Cos-7 transfectadas transientemente con distintos vectores de Smad7 producen una sobreexpresión relativa de más de 40 veces del transcrito.....	31
14	Western blot para detección de la proteína Smad7	32
15	Purificación de los plásmidos del empaquetamiento viral.....	33
16	Análisis de la Expresión de GFP+ en MDA-MB-231 en distintas semanas post-transducción.....	34
17	Análisis de la Expresión de Smad7 en MDA-MB-231 estables.....	35
18	Expresión de Smad7 en células estables a través del tiempo.....	36
19	Análisis de actividad de las células estables MDA-MB-231.....	37
20	Ensayo de proliferación celular de MDA-S7.....	38
21	Evaluación de la migración celular de MDA-S7.....	39

22	Cambios en el fenotipo de MDA-S7.....	40
23	Purificación de sBG.....	41
24	Secuenciación de pLJM1-sBG.....	41
25	Expresión de sBG en células estables.....	42
26	Ensayo de proliferación celular de MDA-sBG.....	43
27	Cambios en el fenotipo de MDA-sBG.....	43

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Transfección con distintas variantes de Smad7.....	19
2	Diseño de primers para reacción de ligación entre el vector pLJM1 y el Inserto de interés.....	26
3	Purificación y análisis de las construcciones generadas por subclonación.....	28
4	Cuantificación y dilución de RNA de las células Cos-7.....	30

Lista de acrónimos

BG	Betaglicano o Receptor III del TGF β
BMPs	Proteínas morfogenéticas de hueso
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CXCR4	Receptor de quimiosinas
DCIS	Carcinoma ductal in-situ
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eGFP	Proteína verde fluorescente
EMT	Transición epitelio mesénquima
ER	Receptor de estrógeno
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAGs	Glucosaminoglicanos
Gag-pol	Poliproteínas
HA	Etiqueta de hematoaglutinina
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IDC	Carcinoma ductal infiltrante
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LCIS	Carcinoma lobulillar <i>in-situ</i>
LDC	Carcinoma lobulillar infiltrante

MDA-S7-HA	Células MDA-MB-231 estables; transducidas con Smad7-HA
MDA-S7	Células MDA-MB-231 estables; transducidas con Smad7
MDA-sBG	Células MDA-MB-231 estables; transducidas con Betaglicano soluble
MMPs	Proteínas metaloproteinasas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NEB	Laboratorios <i>New England</i>
Nt	Nucléotidos
OD	Densidad óptica
OPN	Osteopontina
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMEPA1	Proteína prostática transmembranal, andrógeno inducida 1
PR	Receptor de progesterona
pTHrP	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Rev	Reverso transcriptasa
RNA	Ácido ribonucleico
RLP32	Proteína tipo receptor 32
S7	Smad7
sBG	Betaglicano soluble
sTβRIII	Receptor III en forma soluble
TβRI	Receptor I del TGFβ
TβRII	Receptor II del TGFβ

- TβRIII** Receptor I del TGFβ o Betaglicano
- TGFβ** Factor de crecimiento y transformación beta
- VSVG** Virus de estomatitis vesicular

1. Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un desbalance entre la proliferación celular y apoptosis debido, en gran parte, a la pérdida de la homeostasis en el organismo. Cada tipo celular en el cuerpo puede dar lugar a un cáncer con origen y manifestaciones diversas (Lodish *et al.*, 2008).

Específicamente, el cáncer de mama se caracteriza por el crecimiento descontrolado de alguno de los tejidos que conforman este órgano, generando tumores con células malignas (NIH, 2014). Generalmente, el cáncer de mama comienza con un incremento celular acelerado y la evasión de la apoptosis de las células epiteliales que recubren los ductos y lóbulos. Así, se producen cánceres ductales, o lobulares dependiendo del origen de la célula neoplásica (ACS, 2009).

Tanto a nivel mundial como nacional, el cáncer de mama ocupa el segundo lugar en incidencia y es la causa número uno de muerte por cáncer entre las mujeres, con un estimado de 1.67 millones de casos nuevos diagnosticados en 2012 (25% del total de cánceres) (WHO, 2012). A nivel internacional una de cada ocho mujeres tiene o va a desarrollar cáncer de mama, es decir, que el 12% de la población femenina actual en el mundo presentará esta enfermedad (Sanfilipo y Moreno, 2015).

Entre los principales factores de riesgo se incluyen:

- Edad avanzada.
- Antecedentes familiares de tumores benignos o cáncer de mama.
- A edad adulta, nunca haber estado embarazada.
- Embarazos después de los 30 años.
- Uso excesivo de anticonceptivos orales.
- Historia clínica de tratamiento con radiación en el pecho.
- Alta densidad de tejido mamario.
- Consumo excesivo de alcohol y drogas.
- Obesidad.
- Mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2.

(NIH, 2014).

El cáncer de mama es clínicamente heterogéneo. Se han identificado varios subtipos histológicos o rasgos moleculares particulares que los hacen responder de forma distinta al tratamiento convencional, aunque sean morfológicamente similares (Rouzier *et al.*, 2005).

Histológicamente, puede ser dividido de acuerdo a su capacidad de invadir tejido circundante:

-Carcinoma ductal y lobular *in-situ* (DCIS, LCIS): se origina en las células epiteliales que forman los ductos y lóbulos productores de leche de la glándula, no es invasivo (Malhotra *et al.*, 2014). DCIS es el que se presenta en mayor porcentaje (Malhotra *et al.*, 2014).

-Carcinoma ductal y lobular infiltrante (IDC, ILC): Mismo origen que los DCIS y LCIS, pero tienen progresión y diseminación hacia el tejido adiposo circundante. El tumor es invasivo y puede tener la capacidad de hacer metástasis (Malhotra *et al.*, 2014).

Un solo tumor de mama puede tener una combinación de cualquiera de estos tipos de cáncer *in situ* y cáncer invasivo (ACS, 2009).

El cáncer de mama también puede clasificarse en diferentes subtipos moleculares dependiendo del tipo de receptores que se expresan en la membrana celular: receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y del factor de crecimiento epidérmico (Her2neu). A su vez, existe una variante en donde ninguno de estos tres receptores membranales antes mencionados se expresa, lo que se conoce como cáncer de mama triple negativo (CMTN). Cada variante, muestra grandes diferencias en la predicción de la supervivencia del paciente (Malhotra, *et al.*, 2014).

La proporción de CMTN es dos veces más alta en la población mexicana e hispana (23%) comparada con la caucásica (10-13%) (Lara-Medina *et al.*, 2012). Debido a la ausencia de los receptores ER, PR y HER2, el CMTN no responde a la terapia convencional con antiestrógenos (e.g. Tamoxifen). Como consecuencia, este tipo de cáncer es más agresivo lo que favorece el crecimiento del tumor y su diseminación hacia otros tejidos, especialmente el hueso.

La metástasis del cáncer de mama es un proceso recurrente en etapas avanzadas de la enfermedad. Los tumores secundarios se desarrollan normalmente en pulmón, cerebro, hígado y hueso. 80% de los pacientes que presentan estadios avanzados de esta enfermedad son diagnosticados con metástasis a hueso (Weinberg, 2007), asociada a dolor crónico, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la espina dorsal y parálisis. Esto conlleva a una sobrevida de menos de 5 años (Krzyszinski y Wan, 2015). Los tratamientos actuales únicamente retrasan las complicaciones de la enfermedad, pero no la previenen ni la curan.

En 1889, Stephen Paget propuso la hipótesis del “suelo y la semilla” para explicar la predilección que tiene el cáncer de mama para crecer en el hueso (Yin *et al.*, 1999). El establecimiento y crecimiento de metástasis en sitios distantes al tumor primario depende de las interacciones entre las células tumorales y el ambiente del tejido hospedero (Fidler y Kripke, 1977 y Poste y Fidler, 1980 en Kang *et al.*, 2003). El hueso es uno de los ambientes más favorables para la proliferación de células cancerígenas metastásicas ya que es el principal reservorio de factores de crecimiento como el factor de crecimiento y transformación beta (TGF β); el factor de crecimiento tipo insulina (IGF); el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros. Estas moléculas se encuentran almacenadas de forma inactiva en la matriz ósea. El hueso es el principal repositorio de TGF β y este es liberado localmente en el microambiente óseo como consecuencia de la resorción ósea mediada por osteoclastos. Las células tumorales se aprovechan de esta característica influenciando a las células formadoras o destructoras de hueso (osteoblastos y osteoclastos respectivamente) para que aumenten la tasa de resorción ósea liberando factores de crecimiento al microambiente, esenciales para el constante desarrollo de las células cancerígenas, que a su vez ocupan esos espacios libres de matriz ósea para establecerse y proliferar estableciendo lo que se conoce como el “ciclo vicioso de la metástasis ósea” (Fig. 1) (Krzyszinski y Wan, 2015).

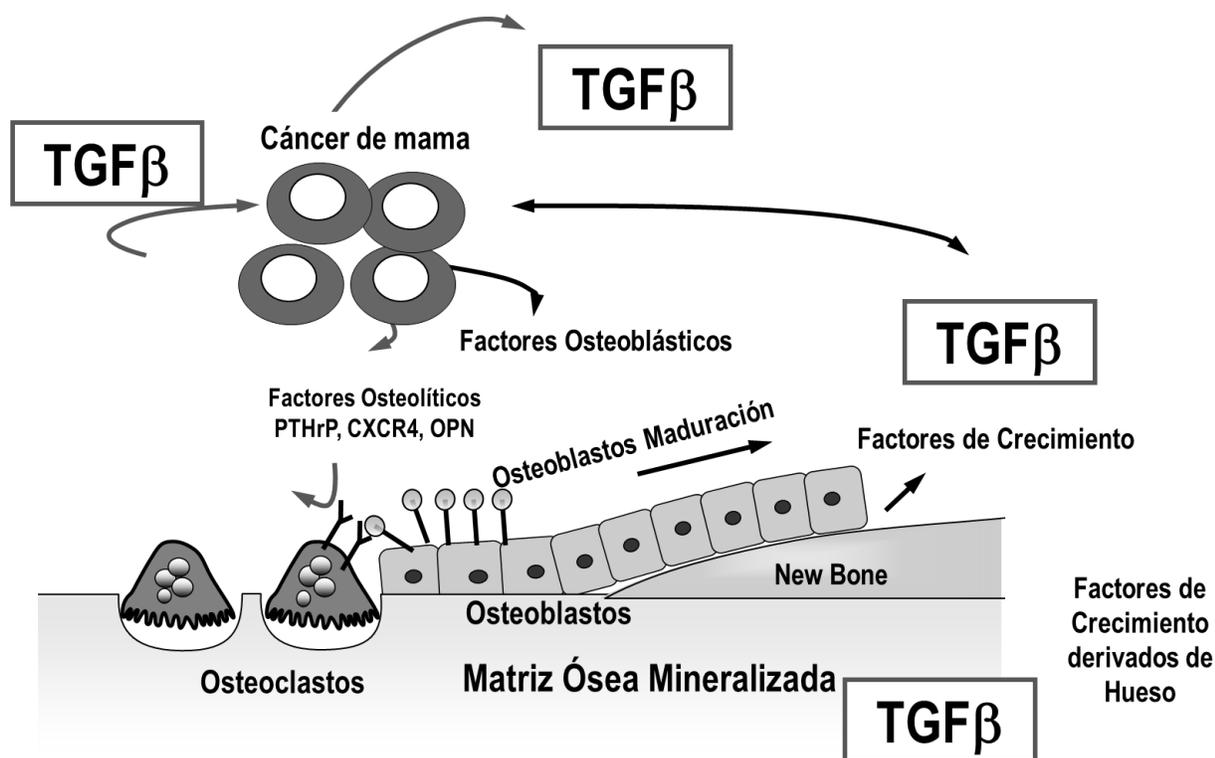


Figura 1. Círculo vicioso de la metástasis ósea. Las células de cáncer de mama secretan factores osteolíticos y osteoblásticos que estimulan a los osteoclastos y osteoblastos alterando y aumentando la tasa de resorción ósea. Así factores de crecimiento como el TGF β son liberados al medio y estimulan a las células cancerígenas para que sigan proliferando y estableciéndose en la matriz ósea. PTHrP: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. CXCR4: receptor de quimosinas. OPN: osteopontina.

La falta de especificidad, toxicidad y resistencia a medicamentos que desarrollan algunos tumores, sustentan la necesidad de buscar terapias más efectivas y específicas hacia las células cancerosas. En los últimos años se han enfocado los esfuerzos en el desarrollo de la terapia dirigida, que se define como el uso de fármacos u otras sustancias que bloqueen el crecimiento y diseminación del cáncer interfiriendo con moléculas específicas (blancos moleculares) involucradas en el crecimiento y progresión tumoral. La principal ventaja es que la terapia dirigida es específica y actúa directamente sobre blancos moleculares asociados al cáncer sin dañar otras células.

Una de las limitaciones de esta terapia dirigida antitumoral es que las células cancerosas se vuelven resistentes a los fármacos. La resistencia puede generarse por dos vías: 1) el blanco molecular sufre una mutación tal que el fármaco específico ya no puede interactuar con ella; 2) el tumor desarrolla resistencia

al fármaco y encuentra una vía nueva para seguir creciendo. Por ello, es importante aumentar la eficacia del tratamiento en combinación con la terapia actual para volver más efectivo el tratamiento de la enfermedad.

La FDA (Food *and* Drug Administration de Estados Unidos) ya ha aprobado varios fármacos anticancerígenos que basan su mecanismo de acción en los fundamentos de la terapia dirigida. Para el tratamiento contra cáncer de mama se han utilizado moléculas dirigidas hacia algún receptor membranal que esté sobreexpresado en la célula neoplásica, que logre evitar su activación y en consecuencia bloquear la vía de señalización que regulen. Ejemplos de estas terapias son: Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal recombinante que tiene afinidad por el dominio extracelular IV del receptor Her2 y lo inactiva. Es el principal agente terapéutico para tratar el cáncer de mama Her2 positivo. Lapatinib, es una molécula pequeña que inhibe el dominio tirosina cinasa del receptor Her2. Actualmente es utilizada en combinación para tratar el cáncer de mama Her2 positivo metastásico (NIH., 2014).

El desarrollo de una terapia dirigida requiere de la identificación de buenos blancos, es decir, proteínas que estén desreguladas y que tengan un papel esencial en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas y que estos blancos no se comporten de igual forma en las células sanas. Tal es el caso de la vía de señalización del Factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF β), un regulador importante del crecimiento y proliferación celular, que se encuentra aumentado y desregulado en cáncer, y por lo tanto se ha colocado como uno de los blancos más estudiados (NIH., 2014).

1.1 Antecedentes

1.1.1 El TGF β y su vía de señalización

La superfamilia de factores de crecimiento del TGF β es un grupo que comprende una gran cantidad de proteínas capaces de regular varios procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis. Estas proteínas ejercen sus efectos en todas las células y su patrón de expresión es temporal y tejido-específico. Entre los miembros de esta familia se encuentran principalmente las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y las del TGF β (Massagué, 1998).

La familia del TGF β se compone de una citocina con el mismo nombre, que presenta tres isoformas: TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3. Son estructuralmente similares y entre sus funciones destaca la inducción del arresto del ciclo celular en células hematopoyéticas y epiteliales, el control de la proliferación y la diferenciación de células mesenquimales, el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), cicatrización, producción de matriz extracelular e inmunosupresión (Massagué, 1998). La forma en que estas proteínas ejercen sus efectos es a través de la transducción de un mensaje desde el espacio extracelular hasta el núcleo de cada célula, en lo que se conoce como la vía de señalización del TGF β (Fig. 2).

La síntesis de las tres isoformas es intracelular y genera una molécula precursora inactiva compuesta por dos péptidos monoméricos unidos por enlaces disulfuro que se almacenan en la matriz extracelular (Losdich *et al.*, 2008). Para producir la molécula biológicamente activa del TGF β , se deben hidrolizar 112 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal del polipéptido precursor (Qian *et al.*, 1996).

Receptores de la vía

TGF β inicia su señalización a través de receptores tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII) (Fig. 2). Estos son glicoproteínas transmembranales de aproximadamente 55kDa y 70kDa respectivamente. Contienen una región extracelular donde se une el ligando y un dominio citoplasmático con regiones serin-treonina de proteínas cinasas (López-casillas *et al.*, 2008). La unión receptor-ligando promueve la activación del receptor tipo II que induce a la asociación entre los receptores tipo I y II en heterodímeros para formar el complejo receptor. T β RII fosforila a T β RI mientras el ligando siga unido al complejo (Massagué, 1998).

Posteriormente, la señal se propaga al interior de la célula a través de reacciones de fosforilación subsecuentes desde los receptores hacia otros mediadores intracelulares (Stolfi *et al.*, 2013).

SMADS como mediadores intracelulares de la vía del TGF β .

Las Smads (*mothers against decapentaplegic*) son los sustratos de T β RI y tienen un papel clave en la transducción de la señal desde los receptores a los genes blanco en el núcleo (Massagué, 1998). Basados en sus características estructurales y funcionales, SMADS se dividen en tres categorías: (a) R-Smads: que son reguladas y activadas por los receptores. Son las primeras en transducir el mensaje intracelularmente después de ser activadas por TR β I; en este grupo se encuentran Smad 2 y 3 (Fig.2, inciso 3). (b) Smads cooperadoras (e.g. Smad4); las que participan en la señalización asociándose con R-smads para formar el complejo SMAD, (Fig. 2 inciso 4), el cual translocará a núcleo para activar la transcripción de los genes blanco de la vía. (c) I-Smads: (Smads 6 y7), que son antagonistas de la vía (Stolfi *et al.*, 2013).

Las proteínas Smads están altamente conservadas entre especies y comparten dominios estructurales denominados MH1 (amino terminal) y MH2 (carboxilo terminal), unidos por un dominio de unión variable (linker) (Baker y Harland, 1996).

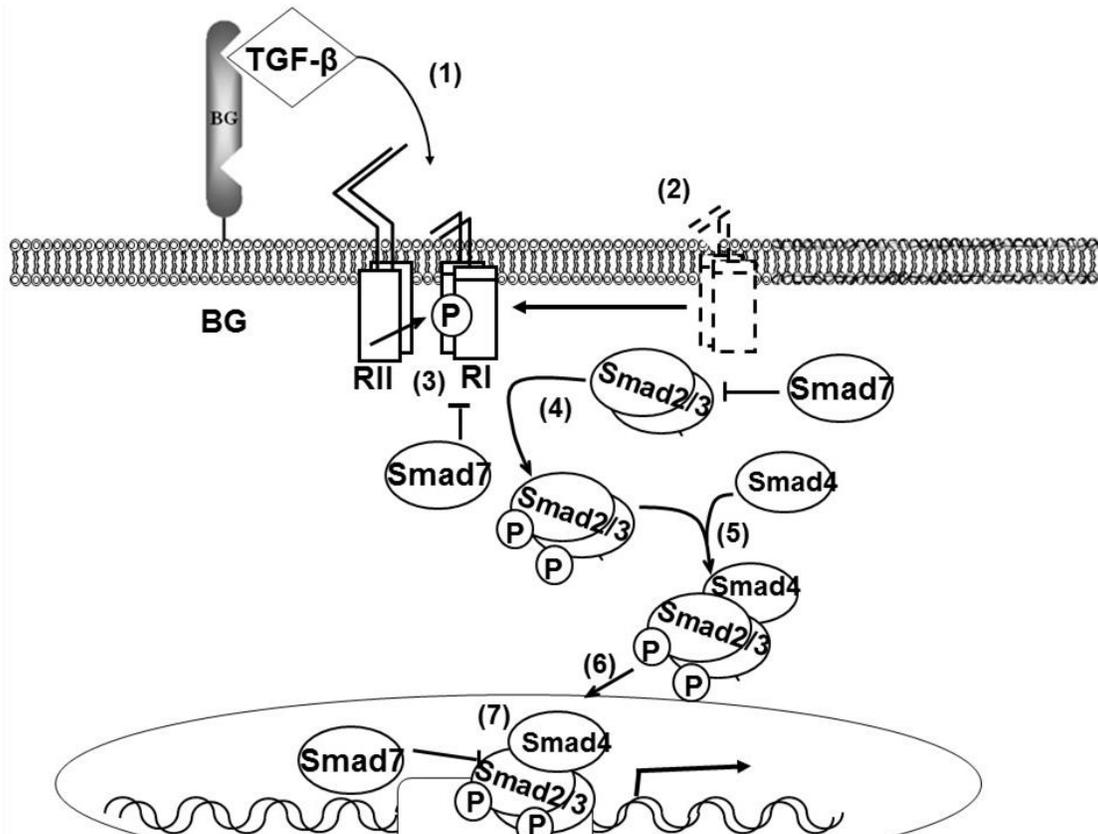


Figura 2. Vía de Señalización de TGFβ. La unión del ligando al receptor II propiciada por el corresponsor betaglicano (1) ocasiona el acercamiento del receptor tipo I hacia TβRII para formar el complejo receptor dependiente del ligando (2) en donde TβRII activa a TβRI (3). Una vez activado, TβRI fosforila a las proteínas Smads reguladas por el receptor (R-Smads) (4), permitiendo que estas proteínas se unan con Smad4 (5) y se transloquen al núcleo (6). Una vez en el núcleo, el complejo SMAD actúa como factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco (7) (Massagué, 1998).

El papel de TGFβ en cáncer

El papel de TGFβ en el cáncer es dual y antagónico. En etapas tempranas de la tumorigénesis actúa como un poderoso supresor de tumores restringiendo el crecimiento de células epiteliales y evitando la EMT, proceso en el que las células epiteliales pierden sus características de polaridad y adhesión adquiriendo el fenotipo de células mesenquimáticas que les confiere motilidad y capacidad de invasión. En contraparte, durante estadios avanzados del cáncer, el TGFβ se comporta como un potente promotor de la progresión tumoral y metástasis, incrementando la angiogénesis y la EMT (Stolfi *et al.*, 2013). Los pacientes en etapas avanzadas de cáncer, frecuentemente presentan concentraciones elevadas de TGFβ en la sangre (Gold LI, 1999). El TGFβ en cáncer, también es un regulador maestro de la metástasis ósea.

Se ha demostrado que la inhibición de TGF β en células de cáncer de mama triple negativo aumenta la susceptibilidad de estas a la quimioterapia y además disminuye la tasa de recurrencia retardando el desarrollo de metástasis ósea (Bhola, *et al.*, 2013).

En el año 2005, el grupo de trabajo de Kang, fue el primero en evidenciar la sobreexpresión de Smads activas en metástasis ósea de cáncer de mama en muestras de pacientes, mediante la técnica de inhumohistoquímica para la detección de Smad2 fosforilado (Kang, *et al.*, 2005). Experimentos posteriores, concluyeron que el *knockdown* de Smad4 en células de cáncer de mama reducen la metástasis ósea y aumentan la supervivencia de los ratones experimentales (Kang, *et al.*, 2005).

La importancia del TGF β en la progresión del cáncer se debe al tipo de genes que son regulados por esta vía de señalización, entre los cuales se encuentran inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, mediadores en el arresto del ciclo celular y genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular, entre otros (Massagué, 2008). Durante el desarrollo de la enfermedad, altera la expresión de genes implicados en la colonización de células cancerosas a hueso y progresión de metástasis; como por ejemplo: CXCR4, pThrP, CTGF, PMEPA1 entre otros. La metástasis ósea se caracteriza por presentar niveles altos de TGF β , lo que lleva a la desregulación de sus genes blanco. Por esto, el uso de inhibidores de TGF β es una estrategia terapéutica prometedora (Kang y Siegel, 2003).

1.1.2 Inhibidores de la vía de señalización del TGF β con potencial terapéutico.

Smad7

La proteína Smad7, pertenece a la familia de las proteínas smads y funciona como antagonista de las smads reguladoras y las co-smads. Es regulada a nivel transcripcional por la familia del TGF β y actúa como inhibidora de estas vías de señalización, estableciendo un asa de retroalimentación negativa importante (Yan, Liu, y Chen, 2009). Se conoce también como MADH7 (*mothers against decapentaplegic homolog 7*) y en humanos se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21.1). Se compone de 426 residuos de aminoácidos organizados en las siguientes regiones: (1) fragmento N-terminal con un dominio MH1; (2) región de unión entre dominios (linker) no conservada y (3) segmento C-terminal con un dominio MH2 (MAD-homology 2) altamente conservado.

Smad7 inhibe la vía del TGF β a través de múltiples mecanismos que actúan en el núcleo y el citoplasma (Massagué, 2008). Bloquea la fosforilación de R-Smads ocupando el dominio catalítico de T β RI. También induce la degradación en proteosoma de T β RI reclutando a enzimas tipo E3 ubiquitin ligasas, evita la formación de complejos funcionales entre R-Smads/Smad4 y bloquea la unión de este complejo con DNA (Stolfi *et al.*, 2013).

En cáncer de mama, existe evidencia experimental que sugiere que Smad7 puede regular el desarrollo de la enfermedad. Landström y colaboradores, concluyeron que en células de carcinoma prostático humano la sobreexpresión de Smad7 induce apoptosis de estas células malignas (Landström *et al.*, 2000).

Más adelante, se demostró que la sobreexpresión de Smad7, inhibe la vía de señalización del TGF β lo que conlleva a la reducción de la metástasis ósea (Javelaud *et al.*, 2007).

El potencial terapéutico anti-metastásico de Smad7, se demostró en 2012, cuando Juárez *et al.*, se enfocaron en estudiar un tratamiento preventivo con agentes para reducir la metástasis ósea. En su trabajo observaron que ratones inoculados con células de melanoma que sobreexpresan Smad7, muestran menos lesiones osteolíticas, menor área de lesión y un aumento significativo en la supervivencia al compararlo con los otros tratamientos (Juárez *et al.*, 2012).

Betaglicano

Se le conoce como receptor tipo III (T β RIII) o betaglicano (BG). Es una glicoproteína integral de membrana conformada por 853 aminoácidos, codificada en el gen *TGFBR3*, localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p32) (Ragnarsson, *et al.*, 1999; Borg, *et al.*, 1992; Bieche, *et al.*, 1999 en Dong *et al.*, 2007). Se expresa principalmente en células epiteliales y está ausente en endotelio, mioblastos y linajes hematopoyéticos. BG está presente en la superficie celular, modula la interacción del ligando con los receptores tipo I y II, ya que tiene la característica de formar complejos de unión con el T β RII inducidos por el ligando, que resulta en la amplificación de la señal (López-casillas *et al.*, 2008).

Estructuralmente se compone de un ectodominio largo (785 residuos), donde se presentan dos sitios de unión con TGF β . También presenta cadenas de condroitin sulfato glucosaminoglicanos (GAGs) que pueden unirse a factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Wang *et al.*, 1991). La región citoplasmática es corta, consta de 45 residuos y carece de un motivo de señalización (Fig.3) (López-casillas *et al.*, 2008).

Betaglicano se une con gran afinidad a las tres isoformas de TGF- β , especialmente a β 2. (Vilchis-Landeros *et al.*, 2001 en López-Casillas *et al.*, 2008).

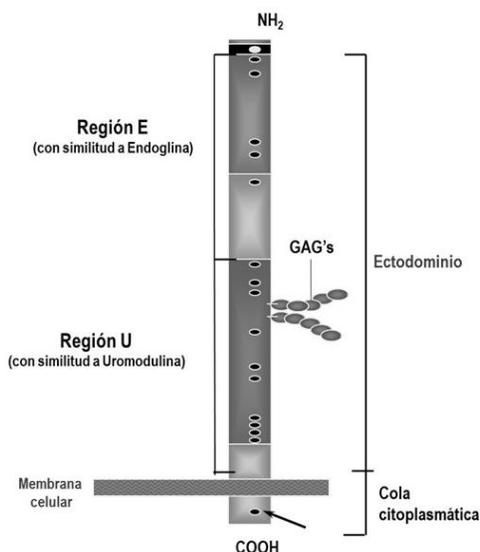


Figura 3. Estructura y función de las regiones de Betaglicano. De amino terminal a carboxilo terminal: Región E; sitio de unión con TGF β y presentación del ligando a T β RII. GAG's: Unión con FGF. Región U: sitio de unión con TGF β y presentación del ligando a T β RII. Región transmembranal: Anclaje del receptor a la membrana plasmática. Cola citoplasmática: Fosforilación por T β RII e internalización mediada por β -arrestina. (López-Casillas *et al.*, 2008).

El dominio extracelular de BG puede ser hidrolizado dando lugar a la forma soluble del receptor (sT β RIII/sBG). Este proceso ocurre naturalmente *in-vitro* e *in-vivo* (Andres *et al.*, 1989; Lopez-Casillas *et al.*, 1991 en Lopez-casillas, Wrana, y Massague, 1993). Las especies solubles de BG se encuentran en el suero y la matriz extracelular y conservan la capacidad de mantenerse unidas a TGF β (Wang *et al.*, 1991). En contraste a su precursor transmembranal, el sBG es un potente antagonista de TGF β ya que retiene la acción de la vía, al secuestrar a la citocina y disminuir la concentración extracelular disponible del ligando (Lopez-casillas, Wrana, y Massague, 1993).

La pérdida de la expresión de betaglicano ha sido reportada en múltiples cánceres donde establecen una relación directa entre la progresión de la enfermedad y una mala prognosis para los pacientes (Dong *et al.*, 2007).

En 2014 Elderbroom y su grupo de trabajo, investigaron los efectos de la producción de la forma soluble de betaglicano en la progresión, migración e invasión del cáncer mama. Para ello generaron mutantes estables de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231 las cuales sobreexpresaban una variante de betaglicano que producía altas concentraciones de la forma soluble del receptor III o BG con una inhibición permanente de la hidrólisis del ectodominio. Con sus estudios lograron demostrar que mutaciones en el BG que afectan la producción de la forma soluble, producen un incremento de la sensibilidad al TGF β ; la prolongación de la señal. Por otro lado, la disminución de BG y el aumento de sBG reducen la migración e invasión de las células de cáncer de mama. El estudio concluye que la cantidad de betaglicano soluble endógeno está inversamente relacionada con el potencial metastásico de las células *in vitro* e *in vivo* (Elderbroom *et al.*, 2014).

Dada la importancia que representan Smad7 y sBG como inhibidores de la vía del TGF β en la progresión de cáncer, su estudio y caracterización permitirán dilucidar su potencial como agentes terapéuticos. Estas moléculas pueden ser dirigidas hacia las células cancerígenas a través de vectores moleculares, valiéndose de los fundamentos de la terapia génica.

1.1.3 Uso de lentivirus para modificar el material genético de células tumorales

Una de las vertientes que tiene la terapia génica se basa en el uso de vectores virales para introducir material genético a la célula cancerígena que ocasione una desregulación del tumor eliminándolo por completo (Breckpot *et al.*, 2007).

Actualmente, los lentivirus son los vehículos más eficientes para la transducción y expresión estable de diversas moléculas efectoras o genes reporteros en casi todas las células de mamífero. Son capaces de transferir genes de 8-10 kb de tamaño a su célula hospedera, independientemente de si están en mitosis o no se dividan (Cann, 2000 en System Biosciences, 2010). La figura 3 describe el proceso de síntesis e infección de lentivirus de tercera generación.

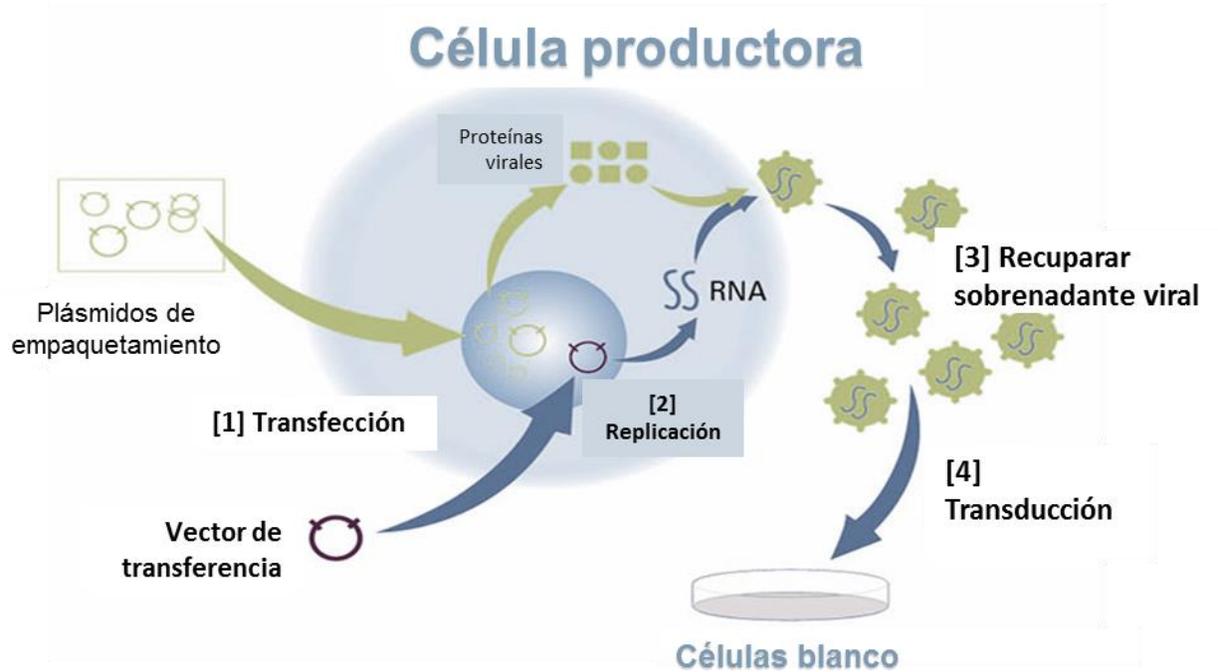


Figura 4. Generación de lentivirus de tercera generación. Se requieren tres plásmidos de empaquetamiento con los genes gag-pol para la expresión de poliproteínas, rev para la expresión de la transcriptasa reversa y VSVG para la cápside. Además un cuarto plásmido como vector de inserción para el gen de estudio. [1] Se hace la transfección simultánea de los cuatro vectores a la célula productora, [2] se realiza la replicación viral empaquetándose el RNA de la región codificante de interés dentro del virión, [3] las partículas virales son liberadas de la célula y recuperadas en el sobrenadante. [4] Se transducen los lentivirus a las células blanco (Sakuma, Barry, y Ikeda, 2012). *Modificado de dpharmacon RNAi, Gene expression y Gen delivery.*

Existen estudios que han demostrado la eficacia del uso de lentivirus como una terapia antitumoral. Uch y colaboradores en 2003, utilizaron lentivirus para transducir células humanas de hepatocarcinoma con un gen suicida bajo el control del promotor de la α -ferroproteína, lo que resultó en la destrucción de estas células neoplásicas (Uch, *et al.*, 2008 en Breckpot, Aerts, y Thielemans, 2007).

1.2. Justificación

Siendo el cáncer de mama uno de los tipos de cáncer más comunes y letales a nivel mundial, es urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que superen las limitaciones del tratamiento actual. La terapia dirigida se perfila como un fuerte candidato para dar solución a esta problemática y pone en la mira a las vías de señalización celular como blancos terapéuticos de gran interés. Una de las vías de señalización más importantes en la regulación del cáncer, es la del TGF β y varias estrategias están dirigidas para disminuir las altas concentraciones y efectos de esta citocina en pacientes con cáncer de mama y metástasis ósea (Conolly *et al.*, 2012 en Elderbroom *et al.*, 2014).

Smad7 es una proteína con un alto potencial anticancerígeno debido a su inherente participación en la regulación negativa de la vía del TGF β , como ha sido demostrado en estudios previos. En ellos, la sobreexpresión de Smad7 en células de melanoma inhibe completamente la vía de señalización del TGF β y reduce el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo *in vivo* de metástasis ósea (Juárez, *et al.*, 2012). Sin embargo, aún con el potencial que representa Smad7 como estrategia terapéutica, los mecanismos de acción que esta proteína ejerce en la regulación del cáncer y metástasis han sido poco estudiados. Por lo cual, este trabajo se enfoca en hacer ingeniería genética de células cancerosas de mama para que produzcan altas cantidades de Smad7. Estas células modificadas serán una herramienta molecular que nos permitirá: 1. Estudiar mecanismos de colonización y progresión de la metástasis ósea del cáncer de mama, y 2. Desarrollar una terapia antitumoral que pueda ser utilizada sola o en combinación con la terapia convencional para el tratamiento del cáncer de mama.

Las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 se consideran un buen modelo de estudio *in vitro* para evaluar el rol de inhibidores de TGF β , dado que producen altas concentraciones de las tres isoformas del TGF β que les confiere altas tasas tumorogénicas y metastásicas (Arteaga, *et al.*, 1993 en Bandyopadhyay, *et al.*, 1999).

Por su parte, los lentivirus son herramientas de ingeniería genética muy novedosas que permiten la integración eficiente de material genético en diversas células, permitiendo que este se conserve a lo largo de la progenie. De esta manera, los efectos de la primera generación modificada se conservan a lo largo del cultivo. Además el ser partículas biológicamente compatibles les confiere un coeficiente de toxicidad casi nulo, por ello serán utilizados como el vector de integración de genes a las células tumorales.

1.3 Hipótesis

La sobreexpresión de Smad7 en células de cáncer de mama, inhibirá la vía canónica del TGF β lo que producirá una disminución de la tasa de proliferación y migración celular *in vitro*, así como una alteración en los genes regulados por el TGF β .

1.4 Objetivos

1.4.1 General:

Generar células estables de cáncer de mama que sobreproduzcan la proteína Smad7, molécula inhibidora de la vía del TGF β .

1.4.2 Específicos:

1. Generar vectores lentivirales que produzcan Smad7.
2. Transfectar transientemente células de cáncer de mama con los vectores lentivirales.
3. Producir células estables de cáncer de mama que sobreexpresen Smad7.
4. Evaluar la sobreexpresión de Smad7 y determinar su estabilidad en las células generadas.
5. Demostrar que las células estables inhiben la vía de señalización del TGF β .
6. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de Smad7 en procesos celulares (proliferación y migración).

2. Metodología

El trabajo experimental para generar las células estables de acuerdo a los objetivos planteados, se llevó a cabo en siete fases (Fig. 5) según se describen a continuación:

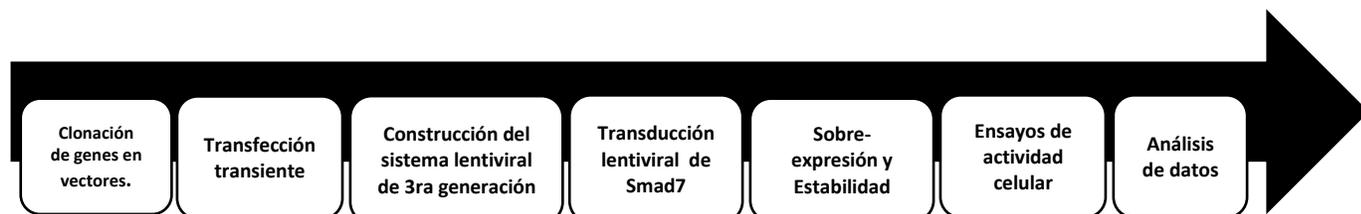


Figura 5. Esquema general del diseño experimental del proyecto.

2.1 Clonación de Smad7 en el vector de expresión lentiviral

El casete pCMV5 se obtuvo de la compañía Addgene. Este contiene la secuencia codificante de Smad7 y la secuencia que codifica para la etiqueta de hematoaglutinina (HA) acoplada al extremo 3' del gen (6,000pb). El plásmido se recuperó en 30 μ L de buffer TE y se transformó en células competentes DH5 α . Se seleccionaron tres colonias a partir de las cuales se establecieron cultivos en 5mL de medio LB con carbenicilina [100 μ g/mL] durante toda la noche y se realizó la extracción de DNA por medio del kit Miniprep GenElute™ (Sigma Aldrich). El plásmido fue digerido con las enzimas EcoRI y XbaI (Promega). El DNA se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la identidad del gen de interés.

Comercialmente también se obtuvo el vector de expresión lentiviral pLJM1-eGFP (9,000pb) que fue recuperado y purificado de la misma forma que pCMV5-Smad7-HA. La identidad del vector fue verificada por restricción enzimática y electroforesis en gel de agarosa al 1%. La secuencia codificante de eGFP, se removió del vector por restricción enzimática y el vector linearizado se utilizó para la subclonación de Smad7 utilizando el kit Gibson Assembly™ (New England Biolabs (NEB)). Este kit tiene la particularidad de reducir el proceso convencional de clonación a través del diseño de primers que combinen secuencias complementarias tanto del vector como del inserto en una misma secuencia (Fig 6).

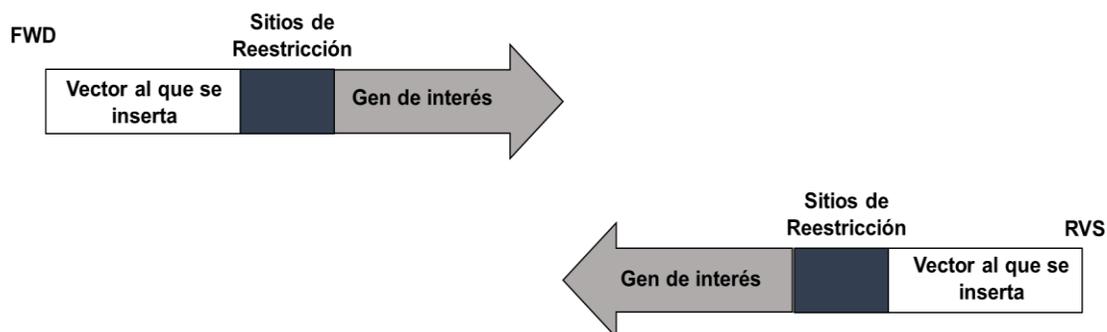


Figura 6. Representación esquemática del diseño de primers. Se muestran las zonas de traslape con el vector (en blanco), con el gen de interés (gris) y la inserción de los sitios de restricción (azul). La flecha indica la dirección del primer si es forward (FWD) y reverso (RVS).

Los primers fueron diseñados con la herramienta digital NEBuilder™ (NEB) y sintetizados por la empresa Oligo T4. Se generaron dos juegos de primers. Para el primer par, en dirección 5' se insertaron 20 bases complementarias del sitio de clonación del vector pLJM1 y la secuencia de restricción de AgeI además de 20 nucleótidos del gen Smad7 partiendo del codón de inicio de la región codificante. Para el oligo dirección 3' terminal se tomaron los nucleótidos complementarios a los últimos 20 nucleótidos de Smad7, que abarcaban la etiqueta HA, se insertó además el sitio de restricción EcoRI y las siguientes 20 bases del sitio de clonación de pLJM1. El segundo par de primers se sintetizó para tener una versión de Smad7 sin la etiqueta HA. Para ello, se utilizó el mismo oligonucleótido 5', y el cambio en el primer 3' fue que se tomó como secuencia base a las últimas 20 pb de la secuencia de Smad7 para evitar incluir la etiqueta HA. El sitio de restricción y la secuencia de empalme con pLJM1 fue la misma que en el primer par.

Para obtener la temperatura óptima de amplificación y verificar la complementariedad de los primers con el gen, se realizó un PCR de gradiente en cada caso. Se probaron 6 temperaturas: 3 más altas y 3 más bajas a la recomendada por el calculador de temperatura NEB (56° a 71° en intervalos de 3 grados). A partir de estos resultados, se seleccionó la temperatura de amplificación que generó los amplicones esperados de la manera más pura y con los extremos que fueron adicionados y complementarios para el vector pLJM1. Para el PCR se utilizó la polimerasa Q5 Hotstart (NEB), que es de alta fidelidad y permite ensamblar la reacción a temperatura ambiente. Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 µL. El producto de PCR se cuantificó por Nanodrop (Thermo Scientific).

La reacción de clonación se preparó en un volumen final de 5 μ L, donde se mezclaron el vector e inserto en una proporción molar de una parte de vector por 2 o 3 partes de inserto (1:2-3). A la mezcla se le agregó *buffer master mix 2X* (coctel de enzimas generado por la compañía). Posteriormente se incubaron 30 minutos a 50°C. El producto de las reacciones se utilizó para transformar células competentes *E.coli* de la cepa 5 α incluidas en el kit de NEB. El choque térmico y plaqueo de la muestra en placas con medio LB más carbenicilina se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Se obtuvo la eficiencia de transformación de las colonias transformantes para cada construcción. La purificación de DNA fue por medio de Miniprep GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Las muestras de Smad7 y Smad7-HA fueron resuspendidas en 100 μ L de buffer TE. El tamaño de los vectores esperados fue de 8,772 pb para pLJM1-Smad7-HA y 8,610 pb para pLJM1-Smad7.

Para verificar la identidad de las construcciones, se realizó una restricción enzimática con EcoRV y NdeI, para generar cortes aleatorios en diferentes sitios del vector. Los productos se separaron por electroforesis con gel de agarosa al 1% y los resultados se visualizaron en transiluminador.

Las construcciones generadas se secuenciaron en la compañía SeqXcel a una concentración de DNA de 500ng/ μ L y se mezclaron con 6.4 pmol/ μ L de los primers respectivos. Se diseñaron primers tomando como template la secuencia del vector pLJM1 cercana al inicio del gen de interés. Para el primer 5', se utilizó una secuencia universal ya estipulada en la página de la empresa; mientras que el primer reverso se diseñó tomando como base los primeros 25 nucleótidos del vector pLJM1 ligados al gen de interés complementario a su extremo 3' terminal. Las secuencias recibidas fueron analizadas y alineadas con el programa computacional APE1.

2.2 Transfección transiente de Smad7 en células Cos-7

Para evaluar si las construcciones realizadas producen una proteína Smad7 activa, se realizó una transfección transiente en células Cos-7, las cuales son altamente transfectables con vectores que requieren la expresión del antígeno SV40. Se partió de placas de 10cm, se sembraron en una placa de doce pozos 200,000 células en 2mL de medio DMEM por pozo. Los vectores utilizados para la transfección fueron pLJM1-smad7, pLJM1-smad7-HA, y el vector comercial pCMV5-smad7-HA. Para la transfección se

utilizó el reactivo FuGENE® HD (Promega). En la proporción 7:2 ($\mu\text{L de FuGENE}^{\text{®HD}}: \text{ng DNA}$) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Tabla 1. Mezcla para la transfección con distintas variantes de Smad7.

Nombre del vector	pLJM1-Smad7-HA	pLJM1-Smad7	pCMV5-Smad7-HA
Plásmido (1000ng)	20 μL	22.5 μL	7.4 μL
FuGENE® 7:2	3.5 μL	3.5 μL	3.5 μL
Medio DMEM	26.5 μL	24 μL	39.1 μL
Volumen final	50 μL	50 μL	50 μL

Después de incubar las mezclas durante 15 minutos a temperatura ambiente, cada tratamiento se agregó al pozo correspondiente y se incubaron las células durante 24 horas.

2.2.1 RT-qPCR

La expresión de los transcritos de Smad7 se evaluó por PCR en tiempo real (*RT-qPCR*). Primeramente se realizó la extracción de RNA con el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma Aldrich) y se cuantificó por Nanodrop (Thermo Scientific). Posteriormente, se obtuvo el cDNA a través de la reacción de transcripción reversa utilizando el kit SuperScrip II (Invitrogen). Se utilizó el gen constitutivo *rpl32* para normalizar las curvas de amplificación de Smad7. La reacción fue preparada en 10 μL de volumen utilizando SYBRgreen 2X (Qiagen) acoplada a fluorescencia. Cada grupo se evaluó por triplicado.

2.2.2 Western blot

La proteína de Smad7 con y sin etiqueta de HA fue identificada por Western blot. Las células se colectaron y lisaron en buffer RIPA (IGEPAL 1%, proteasas 1X, EDTA 5 μM , PBS1X), y se cuantificó por la técnica de Bradford (Sigma Aldrich). Se cargaron entre 30 y 50 μg de proteína en un gel de acrilamida al 8% y se separaron por electroforesis. Posteriormente se electro-transfirieron a membranas de PVDF en una cámara semi-húmeda. Las membranas se bloquearon con leche semidescremada al 5% y se incubaron por 2h a temperatura ambiente en agitación constante durante toda la noche. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-Smad7 (Sigma Aldrich. Polyclonal α -Smad7 SAB4200345), y anti-Tubulina (Sigma Aldrich. Monoclonal Anti- α -Tubulin T5168) como proteína de referencia. Después se aplicó el anticuerpo

secundario anti-ratón (Sigma Aldrich. Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase. A2304) o anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004) por dos horas. Las proteínas de interés se detectaron por un método quimioluminiscente utilizando el reactivo de Millipore *Sustrato immobilon quimioluminiscente de HRP para transferencias "Western"* (Immobilon western chemillum hrp substrate).

2.3 Purificación de plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral

Los plásmidos que forman el sistema lentiviral de 3^{ra} generación son (1) pLP1 que expresa los genes *gag-pol* que codifican las poliproteínas que forman la nucleocápside. (2) pLP2 expresa el gen *rev* de la enzima transcriptasa reversa, (3) pMD2.G contiene el gen que codifica para la cápside del virus de estomatitis vesicular (VSVG) y (4) pLJM1-gene de interés, vector de expresión que contiene el gen de interés. Estos plásmidos se obtuvieron de la compañía Addgene. Se recuperaron los plásmidos de papel Whatman y cada vector se resuspendió por separado en 45µL de buffer TE. Las muestras se calentaron por 1min en baño maría y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente.

Para la transformación bacteriana, se tomaron 60µL de células competentes *E.coli* de la cepa DH5α a la que se agregaron 3µL de cada plásmido por separado. Se transformó por choque térmico dejando las muestras 30 min en hielo seguido de 90 segundos en agua a 42°C y 2 minutos más en hielo. Se rescató a las células con 540µL de medio SOC y se incubaron por 1h 37°C en agitación constante. Se plaquearon 100µL de cada transformación en cajas de Petri con medio LB condicionado con carbenicilina [100µg/mL] y tras 15 horas de incubación a 37°C se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias.

Se seleccionaron 3 colonias para crecer cultivos líquidos de 5mL toda la noche. El DNA de las clonas fue purificado por el kit de elución "Miniprep GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Se eluyó el DNA de cada transformante en un volumen final de 50µL de buffer de elución. La concentración de DNA de cada muestra se cuantificó por triplicado en Nanodrop y se analizó por medio de restricción enzimática utilizando sitios únicos en el vector que generaran 2 fragmentos de tamaños distintos; pLP se digirió con EcoRV (NEB) y NdeI (Promega), pLP2 y pMD2.G con EcoRI (Promega). Los resultados de la restricción se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

2.4 Cultivo celular

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: células 293T, consideradas productoras de lentivirus por ser altamente transfectables. Estas células se aislaron por primera vez de riñón embrionario humano y fueron transformadas con el antígeno SV40. Células MDA-MB-231, células de cáncer de mama triple negativo de humano, aisladas de un derrame pleural y con regulación autócrina por factores de crecimiento. Ambas líneas celulares se obtuvieron del ATCC y se mantuvieron con medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico en una atmósfera humedecida con CO₂ al 5% y a 37°C Se realizaron pases celulares cada tercer día en diluciones de 1:5 o 1:10. La confluencia considerada óptima para experimentos fue del 80%.

2.5 Generación de células estables por medio del sistema lentiviral

2.5.1 Selección de clonas estables con puromicina

Para generar las células estables, es necesario seleccionarlas utilizando marcadores de selección, en el caso de las células MDA-MB-231 se utilizó el antibiótico Puromicina.

Previamente a la transducción se realizó una curva de muerte (“kill curve”) para las células MDA-MB-231, probando distintas concentraciones de puromicina para determinar la dosis óptima a la que las células que no fueron transfectadas con el plásmido de interés fueran eliminadas con la cantidad mínima de antibiótico. Las concentraciones probadas fueron 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 µg/mL. Las células se sembraron el día 0 del experimento en placas de 24 pozos utilizando 100,000 células MDA-MB-231/mL. El día 2 se hizo recambio del medio y el día 4 las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 6 pozos. El día 5 se realizó el primer cambio de medio adicionado con las distintas concentraciones de Puromicina. Este medio se cambió cada tercer día durante siete días. Ocho días después del primer contacto con antibiótico. Al tercer día se determinó la dosis alta que mostraba una toxicidad muy elevada. La dosis baja fue aquella en la que transcurrida una semana aún había células viables y dosis óptima donde a los siete días la viabilidad celular se pierde totalmente.

2.5.2 Transducción de genes por medio del sistema lentiviral

Para la transducción se realizaron dos experimentos independientes, uno para integrar Smad7-HA y el otro para integrar Smad7. Para cada experimento se adicionó un grupo en el que se transdujeron células con el vector pLJM1-eGFP como control, ya que la eGFP permitiría seguir la eficiencia de transfección mediante citometría y microscopía.

En el día 0 se sembraron 15,000 células 293T en 100µL de DMEM por pozo, en placas de 96 pozos; se incubaron 24h. El día 1 se transfectaron con FuGENE® HD (Promega) en proporción 7:2 los cuatro vectores lentivirales en una mezcla equimolar de 125ng. Para ello se generaron cuatro grupos de estudio divididos en dos experimentos de transducción independientes. En el primer experimento se trabajó con dos grupos: 1) control positivo (transfección con pLJM1-eGFP); 2) pLJM1-smad7-HA. En el segundo experimento, nuevamente se hizo un grupo para pLJM1-eGFP y un nuevo grupo para pLJM1-smad7. En cada experimento también se consideró un control negativo sin transfectar. En el día 2, transcurridas 24h de incubación se cambió el medio y las células transfectadas con GFP+ se observaron al microscopio de fluorescencia. 48h postransfección se observó la fluorescencia nuevamente. Posteriormente se realizó la primera colecta de sobrenadante viral de cada grupo de estudio y se mantuvo a 4° C (H1). Se sembraron el mismo día células MDA-MB-231 (100,000células/mL) en placas de 24 pozos. Al día 5, (tercer día post-transfección), tras evaluar la fluorescencia en el grupo control (+) se realizó la segunda colecta de sobrenadante viral (H2). Se realizó una mezcla 1:1 de las colectas dependiendo del grupo y este sobrenadante viral en combinación con polybrene a 8mg/mL se adicionó a las células cancerígenas. El día 6 y 7 se evaluó la fluorescencia de los grupos controles. En el día 8, las células transducidas con eGFP+ se analizaron por citometría de flujo para evaluar la eficiencia de infección. Posteriormente todos los grupos transducidos se tripsinizaron y sembraron por separado en placas de 6 pozos agregando el medio adicionado puromicina (0.5µg/mL) para realizar la selección positiva de las clonas. Las células se expandieron hasta congelar distintos viales y pasado el tiempo de recuperación y adaptación a la selección se evaluó sobreexpresión de las variantes de Smad7 y se caracterizaron funcionalmente.

2.6 Caracterización molecular y análisis de actividad

La sobreexpresión de Smad7 se evaluó por PCR en tiempo real en las células generadas y se utilizaron como control negativo células del mismo tipo pero sin transfectar. Posterior a la extracción de RNA y síntesis del cDNA, se realizó la RT-qPCR. Las curvas de amplificación se normalizaron con el gen constitutivo *rlp32*. La proteína se detectó por Western blot utilizando el anticuerpo anti-Smad7 y las muestras se normalizaron con tubulina. Las células se lisaron con buffer RIPA, la proteína total se cuantificó por el método de Bradford y 50 µg de las proteínas totales de cada grupo se separaron por geles de acrilamida al 8%.

Para evaluar si la Smad7 producida por las células estables era funcional, se evaluó la expresión del gen PMPEPA1, un gen blanco del TGFβ. Previo al tratamiento con TGFβ, se mantuvieron las células en ayuno durante 4h en medio con 0.2% de suero fetal bovino y posteriormente se agregó una concentración 5pM de TGFβ1 mezclado con medio DMEM sin suplementar. Tras 24h de incubación, las células se lisaron y se realizó la RT-qPCR para evaluar la expresión de PMEPA1.

2.7 Ensayos de actividad celular

La tasa de proliferación, se determinó por MTT (método colorimétrico del thiazolyl blue tetrazolium bromide). El experimento tuvo una duración de cuatro días. Las células estables y sus controles se sembraron en placas de 96 pozos utilizando 1000 células en 100µL de medio DMEM por pozo. Se incubaron por 24h y se adicionaron 20µL del compuesto MTT por pozo. Transcurridas 5h de incubación a 37°C se agregaron 100µL de solución de lisis. Las células se incubaron por 20hrs a 37° y se leyó la absorbancia a 570nm. Las células viables con metabolismo activo emiten un pico en el rango del púrpura a 570nm cuya intensidad es directamente proporcional al porcentaje de viabilidad celular (Riss, Niles y Minor, 2013).

La migración celular se evaluó a través del ensayo de la herida (*wound assay*). Se sembraron por duplicado cajas de 60mm de diámetro con células estables y sus controles. Una vez que las cajas alcanzaron una confluencia del 80%. Las células se pusieron en ayuno por 12h sin SFB. Utilizando una punta de 200µL se rasgó la monocapa celular a lo largo del diámetro. Se lavaron las células con PBS 1X para eliminar a las

células despegadas y se agregó medio con SFB al 0.5%. Se tomaron fotos a las 0, 12, 18 y 24h después de hacer el rasgado de la caja. La capacidad de la células para cerrar la herida a través del tiempo se analizó con el programa computacional imageJ.

2.8 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, fueron analizados con el paquete computacional PrismaGraph utilizando las pruebas paramétricas de análisis de varianzas (ANOVA) de una y dos vías, y *t* de Student. Los resultados significativos fueron aquellos con una $p < 0.05$.

3. Resultados.

3.1 Análisis de restricción de pCMV5-Smad7-HA.

Como primer paso para generar el vector que sobreexpresa Smad7 en un sistema lentiviral, se verificó la identidad del plásmido pCMV5-Smad7-HA obtenido de Addgene (Fig.7). El patrón generado de las bandas fue el esperado, con lo cual se corrobora la identidad del gen y se procedió a realizar la subclonación en el vector de expresión lentiviral.

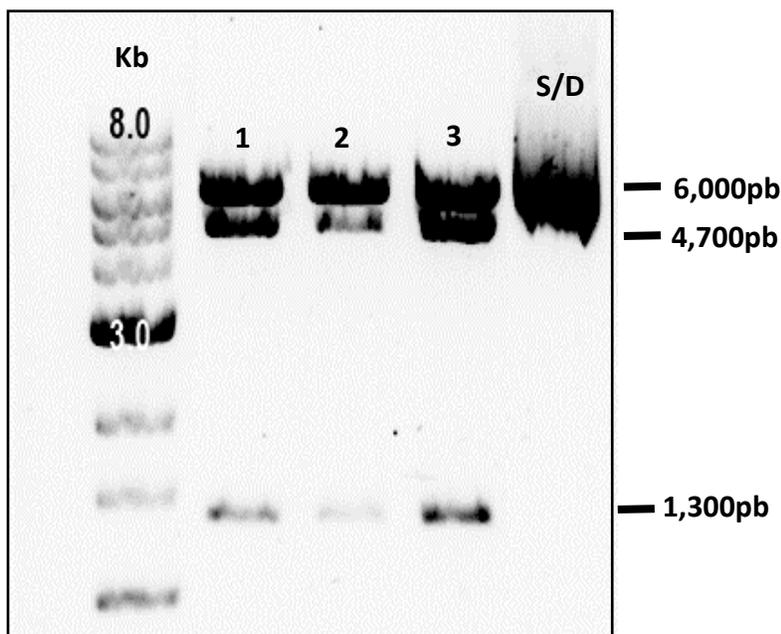


Figura 7. Restricción enzimática de pCMV5-Smad7-HA. Se purificaron tres colonias transformantes. El vector se digirió con las enzimas EcoRI (en el extremo 5' de Smad7-HA) y XbaI (hacia su extremo 3'). Bandas esperadas en 1, 2, 3: 1300pb del gen de Smad7 con la etiqueta de HA y 4700pb del vector pCMV5. S/D: plásmido sin digerir.

Los oligos diseñados para generar cada una de las versiones de Smad7 se muestran en la Tabla 1. Con ellos se realizaron los PCRs de gradiente en los cuales la temperatura óptima de alineación fue de 71°C en ambos casos (Fig.8).

Tabla 2. Diseño de primers para la reacción de ligación entre el vector pLJM1 y el Inserto de interés.

Vector	Oligo	Nt	Inserto	F/R	Tm°
pLJM1	gaaccgtcagatccgctagc ATGTT CAGGACCAAACGATCTGC	42	Smad7-cds	Fwd	71
pLJM1	tgtctcgaggtcgagaattc TTACCGGCTGTTGAAGATG	39	Smad7-cds	Rev	71
pLJM1	gaaccgtcagatccgctagc ATGTT CAGGACCAAACGATC	39	Smad7-HA	Fwd	71
pLJM1	tgtctcgaggtcgagaattc TTAGAGGCTAGCATAATCAG	38	Smad7-HA	Rev	71

La tabla 2 muestra el vector y el inserto utilizados para cada reacción así como la secuencia y número de nucleótidos (nt) diseñada para cada primer. En gris: traslape con el vector lentiviral. Negro: sitio de restricción. Naranja: Traslape con el inserto. Digestión del vector con NheI y EcoRI. Se especifica además el tipo de primer forward/reverso (F/R) y la temperatura óptima de alineación para cada caso.

El PCR de gradiente corrobora que los primers sintetizados son complementarios para el gen de Smad7 con y sin HA. Hay amplificación del inserto en todas las temperaturas de alineación probadas, por lo que el criterio de selección para producir el amplicón que sería subclonado a pLJM1, se basó en aquella temperatura que generó una banda más limpia y con menos barrido, siendo 71°C la que cumplió con este criterio (Fig.8).

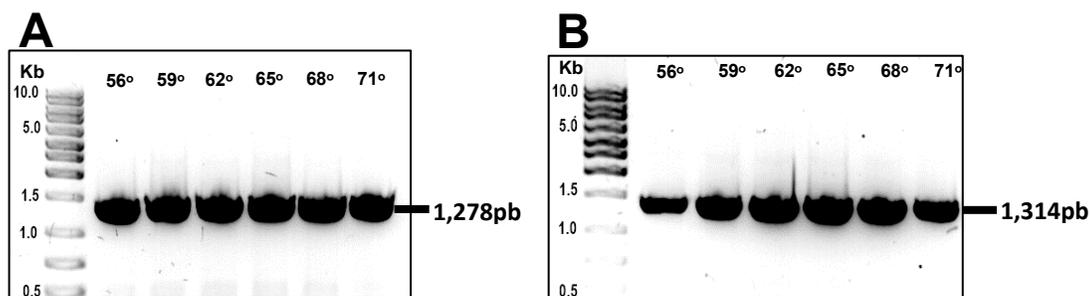


Figura 8. PCR de gradiente de los insertos Smad7 (A) y Smad7-HA (B). Se seleccionó como temperatura óptima de amplificación 71°C por ser la amplificación más limpia.

La amplificación para cada inserto se realizó correctamente (Fig.9) Para smad7 con y sin HA se obtuvieron los amplicones de 1278 y 1314pb respectivamente. Por lo que se continuó con la reacción de ligación

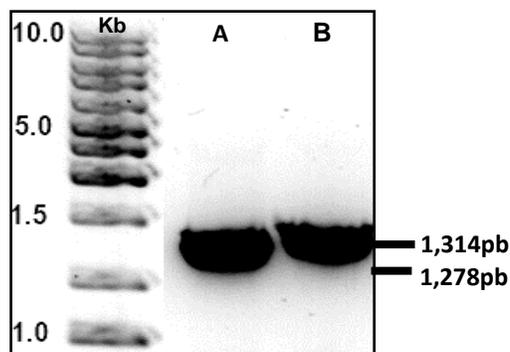


Figura 9. Amplificación de los insertos (A) Smad7 1278pb y (B) Smad7-HA, 1,314pb.

El análisis de restricción, muestra que se obtuvieron las construcciones de las dos versiones de Smad7 con y sin HA (Fig.10). En cada digestión se observa que hay una gran concentración de plásmido que no fue digerido (banda gruesa de mayor tamaño) debido a un exceso de DNA en la reacción o al bajo rendimiento de la enzima.

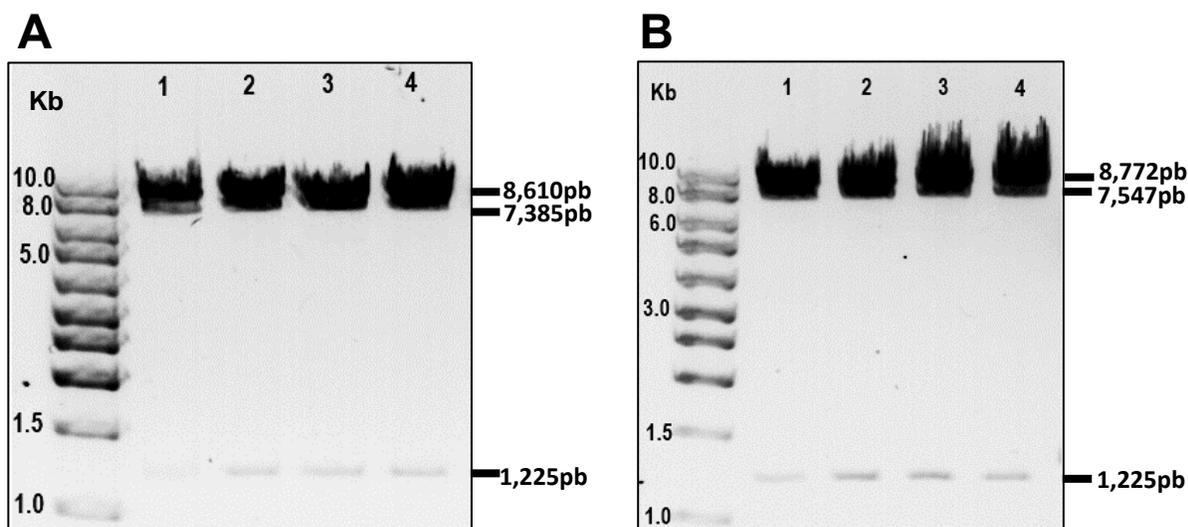


Figura 10. Análisis de restricción de las construcciones generadas. (A) Cuatro colonias transformadas con pLJM1-Smad7 y (B) cuatro colonias transformadas con pLJM1-Smad7-HA. Vectores digeridos con EcoRV y NdeI.

La tabla 3 muestra las construcciones generadas a través de la reacción de clonación. De cada muestra se obtuvieron clonas transformantes, pero se conservó la colonia tres por ser la que presentó la mayor concentración de DNA. Se muestran las enzimas utilizadas para la restricción enzimática así como el tamaño esperado de bandas en el gel de electroforesis. Los fragmentos esperados corresponden a un

corte que se realiza en el sitio de unión entre el vector e inserto y un segundo corte a la mitad de la secuencia codificante del gen de interés, para con ello corroborar el correcto ensamble entre las partes.

Tabla 3. Purificación y análisis de las construcciones generadas por subclonación

<i>Construcciones</i>	<i>Concentración [ng/μl]</i>	<i>Restricción</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Fragmentos esperados (pb)</i>
pLJM1-Smad7	44.4	EcoRV, NdeI	8,610	7,385 y 1,225
pLJM1-Smad7-HA	50.5	EcoRV, NdeI	8,772	7,547 y 1,225

Los resultados de la secuenciación de la clona 3 que fue la que se conservó, muestran que las secuencias de pLJM1-Smad7-HA están alineadas con la secuencia conocida conservando los marcos de lectura y la etiqueta HA (Fig.11).

En el caso de Smad7, la secuencia en dirección 5' coincide con la secuencia a pesar de que las primeras bases no pudieron ser identificadas. Tanto el marco de lectura como la ligación entre vector-inserto es correcta. En el reverso, la secuencia de consulta tiene un segmento de varios nucleótidos localizado en la zona de unión que no corresponde en absoluto con la secuencia conocida (Fig. 11 indicada con letra azul), pero su presencia no afecta o produce un corrimiento en el marco de lectura de la construcción. Al analizar este fragmento por medio de *Blast*, la secuencia corresponde a parte del genoma del organismo *Aequorea victoria*, medusa de la cual proviene la proteína verde fluorescente (eGFP), y cuyo gen formaba parte del plásmido pLJM1 antes de usarlo como vector para la ligación. Esto puede indicar que posiblemente la secuencia de eGFP no fue liberado en su totalidad del vector (Fig. 11).

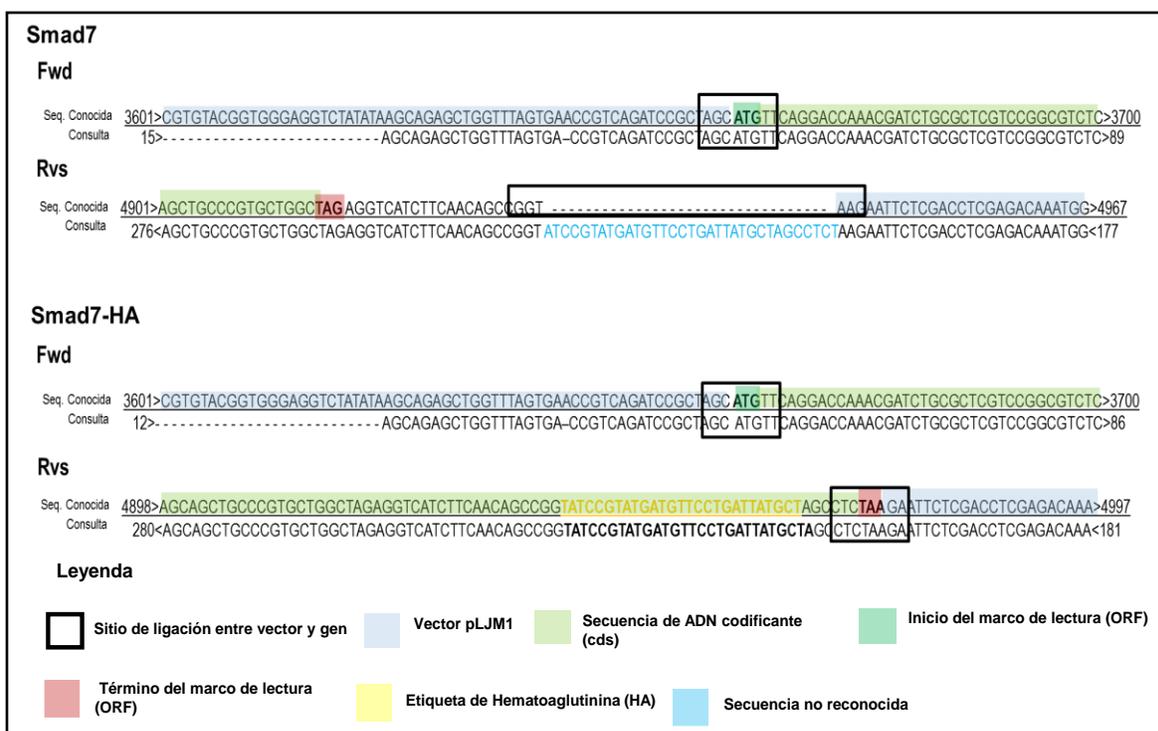


Figura 11. Secuenciación de las construcciones pLJM1-Smad7 y pLJM1-Smad7-HA. En cada muestra se identifican la secuencia conocida, con particularidades como los sitios de inicio o término del marco de lectura, la ligación entre el gen de interés y el vector lentiviral de transferencia, así como otras características especiales del inserto. Estas a su vez son contrastadas con la secuencia que fue obtenida por el análisis de la compañía.

3.2 Transfección transiente a células Cos-7 para evaluar la expresión de Smad7.

La expresión transiente se realizó transfecando las construcciones generadas en células Cos-7 utilizando el método de transfección transiente con FuGENE® HD. Se realizó la extracción de RNA de las células transfectadas Cos-7, y se obtuvieron concentraciones entre los 90 y los 200 ng/ μ L. En el gel de la figura 10, se observan claramente tres bandas que corresponden a las distintas subunidades ribosomales, lo que indica que la transcripción estaba activa en las células. El barrido de la parte superior del gel puede deberse a contaminación con otros ácidos nucleicos ya que la extracción no fue 100% pura. La tabla 4 muestra las concentraciones de cada uno de los grupos de estudio y los ajustes en volumen para igualar concentraciones (Fig. 12).

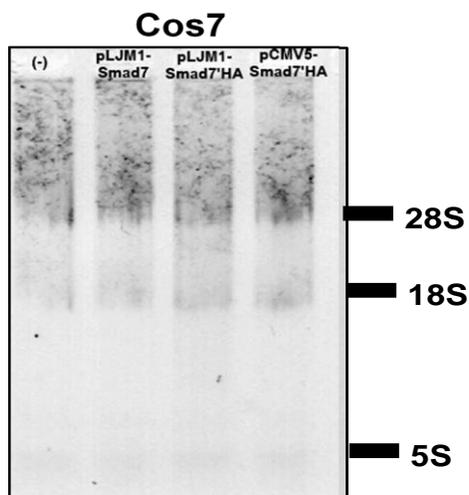


Figura 12. Extracción de RNA de células Cos7. Se cargaron 500ng de RNA mezclados con buffer de carga 5X en un gel de agarosa al 2%. Tiempo de corrida: 35' a 100 volts

Tabla 4. Cuantificación y dilución de RNA de las células Cos-7

<i>Muestra</i>	<i>Concentración [ng/μL]</i>	<i>Volumen para eluir la muestra a 90 ng/μL</i>
Sin transfectar	117.1	11.5μL
pLJM1-Smad7	108.5	8.3 μL
pLJM1-Smad7-HA	90.8	0.4 μL
pCMV5-Smad7-HA	102.6	6.1 μL

Con el análisis de PCR en tiempo real, se estimó la expresión relativa de Smad7 con respecto a *rp132*. La figura 13, muestra el cambio en la expresión de Smad7. En todos los grupos de estudio se observa que la transfección de Smad7 provoca la sobreexpresión del gen con respecto al control, lo que resulta en una alta tasa de transcripción. El vector pCMV5-Smad7-HA produce una mayor expresión de Smad7 en comparación con las construcciones generadas entre pLJM1 y Smad7. Lo anterior era de esperarse, y por lo tanto se consideró a pCMV5-Smad7-HA como control positivo de la transfección, ya que este es un vector comercial que presenta una alta tasa de transfección (Addgene). PLJM1, al ser parte de un sistema lentiviral, es un vector de transferencia dependiente del resto de los plásmidos para lograr una,

transducción del gen de interés a la célula blanco por medio de la infección viral y no una transfección transiente.

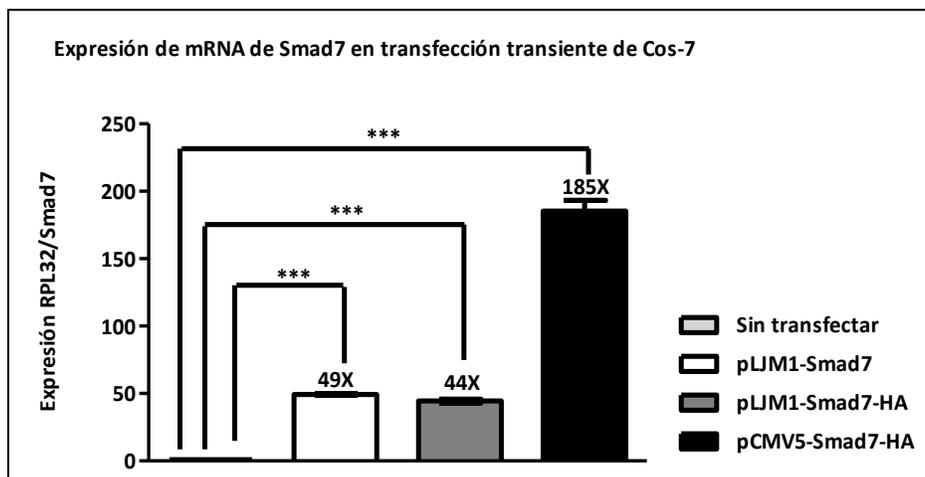


Figura 13. Células Cos-7 transfectadas transientemente con distintos vectores de Smad7 producen una sobreexpresión relativa de más de 40 veces del transcrito. Prueba estadística ANOVA de una vía, corrección de Bonferroni. (***) Datos significativos $p < 0.001$).

En cuanto a la caracterización proteica se observó una banda en el tamaño esperado para Smad7 (46kDa) no obstante, no se observó un incremento en la banda correspondiente a Smad7 comparado con células no transfectadas. Además se observaron varias bandas inespecíficas por lo que se considera que el anticuerpo no es muy bueno y de antemano se sabía que la proteína Smad7 es difícil detectar con los anticuerpos comerciales disponibles (Fig. 14).

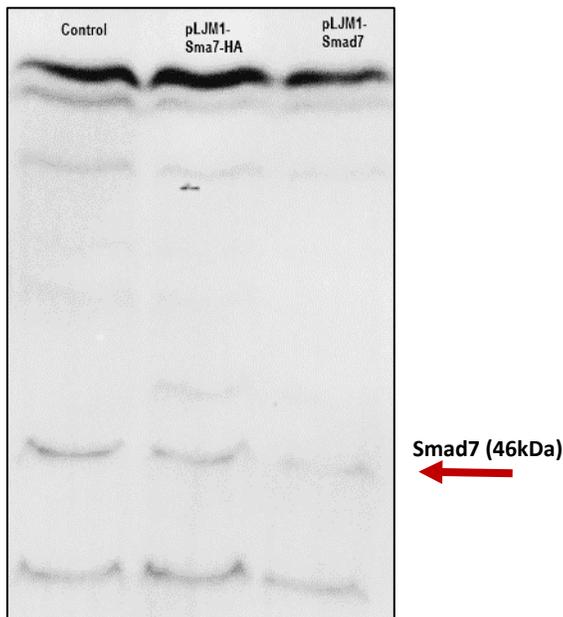


Figura 14. Western blot para detección de la proteína Smad7. Se cargaron 30µg de proteína por grupo de estudio. La membrana fue bloqueada con TBS-T con leche al 5% por dos horas. Se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-Smad7a una dilución de 1:300. El anticuerpo secundario fue anti-ratón a una dilución de trabajo 1:10,000. Reacción cruzada del anticuerpo con otras proteínas produce una señal inespecífica generando bandas en distintos tamaños, además de la detección de Smad7 a 46kDa.

3.3 Purificación de los plásmidos de empaquetamiento

Se transformaron células DH5α para producir y purificar los plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral. De la transformación con pLP1 resultaron en total dos colonias transformantes a las que se les extrajo el DNA plasmídico. Para el caso de pLP2 y pMD2.G, se escogieron tres colonias de cada transformación ya que para cada vector se obtuvieron más de cien clonas.

Una vez realizada la extracción de DNA, se hicieron las cuantificaciones de material genético y el análisis de restricción de las clonas (Fig. 15). La colonia resultante con mayor concentración de DNA fue en todos los casos la etiquetada con el número dos.

La digestión enzimática de pLP1 muestra el patrón de bandas esperado (Fig. 15A), lo que indica que la extracción de material genético se hizo correctamente y se obtuvo el vector esperado. Aun cuando la muestra del plásmido circularizado (S/D) tenga un ligero barrido y no coincida totalmente con el tamaño

esperado. Lo anterior suele pasar cuando se separan fragmentos muy grandes por electroforesis. Debido a su gran tamaño (8889pb), la muestra completa no logra migrar de manera uniforme por todo el gel, generando este patrón de corrimiento o barrido. Para pLP2 (Fig. 15B) se observó el mismo comportamiento con los fragmentos digeridos y con el plásmido sin digerir, aunque esta última muestra tiene un patrón de corrimiento mayor que con pLP1 (Fig. 6A); por lo tanto, con estos datos se consideró la extracción específica del vector. En el caso de pMD2.G (Fig. 15C), en la muestra digerida, se obtienen los fragmentos esperados, sin embargo también se observa una banda más gruesa de alrededor de 6.0 kb que coincide prácticamente con el tamaño total del plásmido (5,824pb).

Esto nos indica que la digestión enzimática no fue completa debido a que pudo faltar más enzima de restricción o la cantidad de DNA utilizada en la reacción superó la capacidad de la enzima para digerir toda la muestra. En cuanto a la banda del vector circularizado, solo se observa un ligero barrido de la misma, el tamaño coincide con lo esperado y la concentración es alta, por lo tanto se corrobora que la extracción del vector fue adecuada.

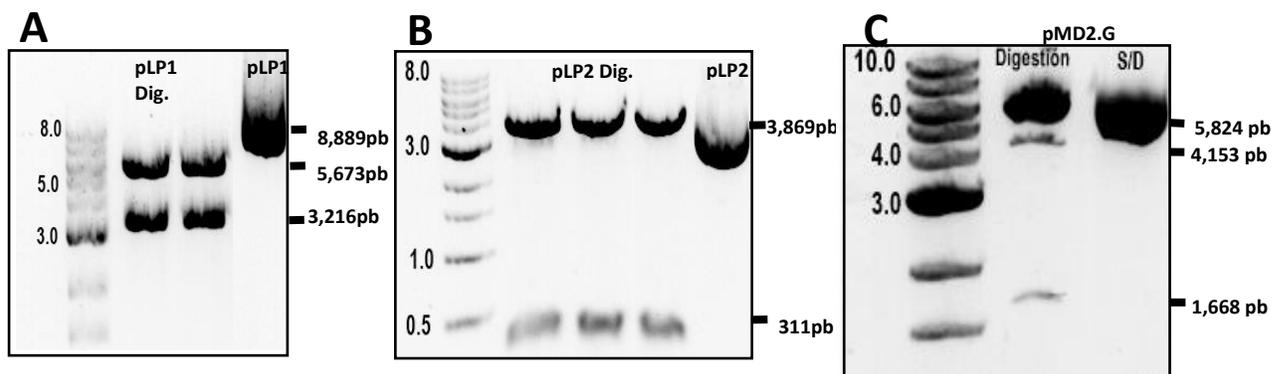


Figura 15. Purificación de los plásmidos de empaquetamiento del sistema lentiviral. (A) pLP1 vector circularizado con un tamaño de 8889pb. Restricción enzimática (pLP1 Dig.) con dos fragmentos de 5,673 y 3,216 pares de bases. (B) Purificación de pLP2. El plásmido circularizado tiene un tamaño de 4180pb. Digestión enzimática (pLP2 Dig.) con dos fragmentos de 3,869 y 311 pares de bases. (C) Purificación de pMD2.G. El plásmido circularizado tiene un tamaño de 5,824pb. Restricción (pMD2.G Dig.) con dos fragmentos de 4,153 y 1,668 pares de bases.

3.4 Transducción lentiviral

De la curva de muerte con puromicina, se obtuvo una dosis óptima de 0.5µg/mL, lo que concuerda con lo reportado por Reineke., *et al.*, 2008. (Ver imagen en apéndice). Esta concentración se adicionó al medio para selección de las clonas estables.

La eficiencia de transducción de las células expresando GFP+ como control de Smad7-HA alcanzaron un porcentaje de expresión de aproximadamente 20% y aquellas que se transdujeron como control de Smad7, alcanzaron un 23% de eficiencia en promedio (imágenes en apéndices). Transcurrido el proceso de selección, se volvió a medir la expresión de GFP+. En ambos controles aumentó significativamente y se mantuvo el porcentaje de expresión por un tiempo (Fig. 16).

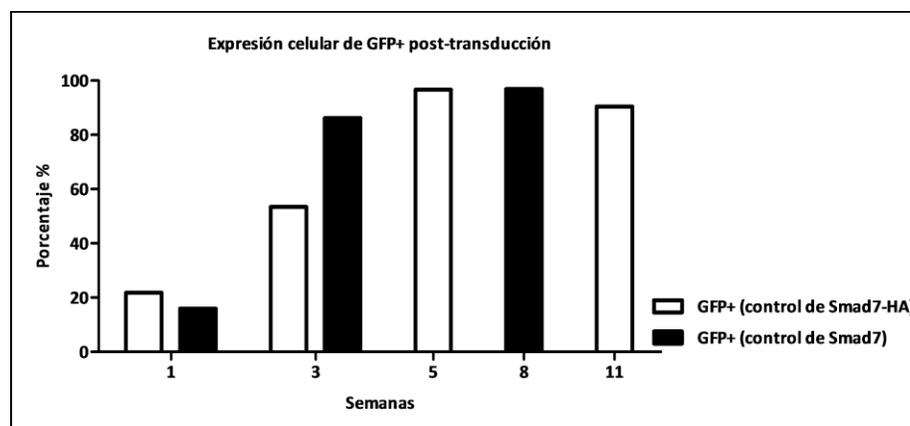


Figura 16. Análisis de la Expresión de GFP+ en MDA-MB-231 en distintas semanas post-transducción. ■ El porcentaje de células que expresan GFP+ Aumenta de 21.7 a 96% en once semanas. □ Se incrementa el porcentaje de células que expresan GFP+ de 17 a 96% en ocho semanas.

3.5 Las células MDA-MB-231 estables sobreexpresan Smad7

Una vez que se estableció que la técnica de transducción era funcional y una vez expandidas las células transducidas con Smad7 en sus dos versiones, se midió la expresión del transcrito en dichas células. La figura 17-A muestra que las células que sobreexpresan significativamente el mRNA con respecto al control son la versión de Smad7 sin la etiqueta de HA (MDA-S7), lo cual sugiere que el éxito de la técnica es dependiente del tipo de gen a integrar. En la versión con Smad7-HA, las células presentaron resistencia a la puromicina pero no queda claro si la etiqueta de HA influye para que la transcripción del gen no sea alta.

La detección a nivel proteína fue nuevamente deficiente. Se realizó el blot comparativo entre muestras de una transfección transiente y células estables de Smad7. Aun cuando se observan bandas en el tamaño esperado, la señal es inespecífica de la membrana lo que no permite identificar entre la expresión del gen endógeno o el transducido (Fig. 17-B). Sin embargo, analizando con más detalle, en el carril MDA-S7

estable, de acuerdo a la tubulina (control de carga), se observa una carga por lo menos de la mitad respecto a los otros dos carriles. De ser verdadera esta suposición, la señal de Smad7 tendría que subir al doble si se homogenizaran las cargas y entonces se vería una diferencia en la intensidad de bandas. Por lo cual no se descarta la posibilidad un ligero error metodológico en el experimento tomando en cuenta que a nivel transcrito sí hay una sobreexpresión significativa de Smad7 (Fig. 17-A).

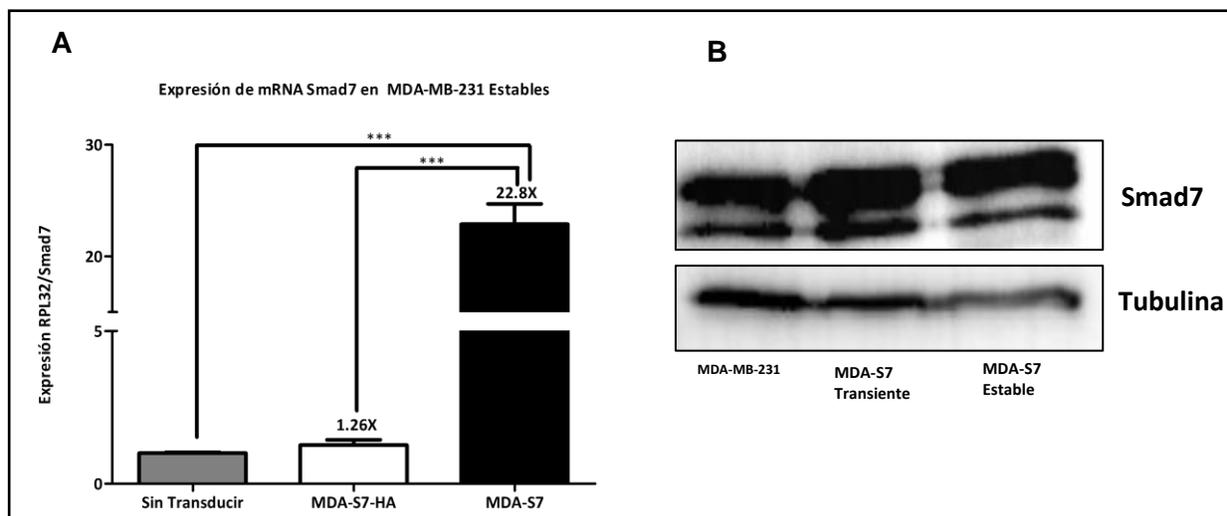


Figura 17. Análisis de la Expresión de Smad7 en MDA-MB-231 estables. (A) RT-qPCR para cuantificar la expresión relativa de Smad7 nivel transcrito. Las clonas estables MDA-S7 sobreexpresan significativamente más RNA mensajero de Smad7 en comparación del control sin transducción y de las células MDA-S7-HA cuya expresión no es significativa con respecto al control. ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni. * $p < 0.0001$ dato significativo. (B) Western blot para detección de la proteína Smad7. Se cargaron 30 μ g de proteína por grupo de estudio. La membrana fue bloqueada con TBS-T con leche al 5% por dos horas. Se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-Smad7a una dilución de 1:2000. El anticuerpo secundario fue anti-ratón a una dilución de trabajo 1:10,000. Anti-tubulina 1:4,000 detectado con anti-ratón 1:40,000 para normalización de la expresión. No se aprecia un cambio en la intensidad de las bandas de las células estables con respecto al control.**

3.6 La sobreexpresión de Smad7 en MDA-MB-231 disminuye con el paso del tiempo

Al medir la expresión de Smad7 en las células estables en distintas etapas de su desarrollo, se puede notar que la expresión relativa del inserto disminuye considerablemente con el paso del tiempo (Fig. 18). Al comparar este gráfico con el de la figura 16, es evidente que la eficiencia de transducción está relacionada con el tipo de gen a integrar; además dado que Smad7 es un gen que puede perturbar la homeostasis

celular, se puede pensar que la baja expresión sea motivo de un menor número de células viables aun cuando se sembró la misma cantidad celular al inicio del experimento.

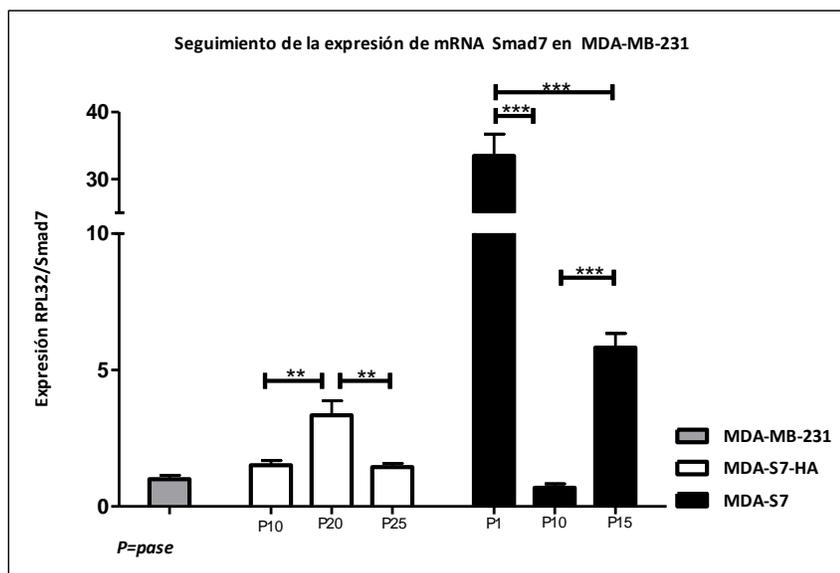


Figura 18. Expresión de Smad7 en células estables en distintos pases a través del tiempo. En ambas versiones de células estables se pierde la expresión de forma significativa con el paso del tiempo. Prueba estadística *t de student* para comparación entre subgrupos. * $p < 0.05$ para datos significativos.

3.7 Evaluación de la actividad de Smad7 en las células MDA-S7

No obstante la disminución de la expresión en las células estables, era importante probar la funcionalidad de las clonas evaluando la expresión de uno de los genes altamente regulados por TGF β .

La figura 19 muestra claramente, que la expresión de PMEPA1 disminuye significativamente en las células que sobreexpresan Smad7 (Fournier *et al.*, 2012). Lo anterior corrobora que la vía del TGF β se está inhibiendo significativamente en presencia del regulador negativo Smad7.

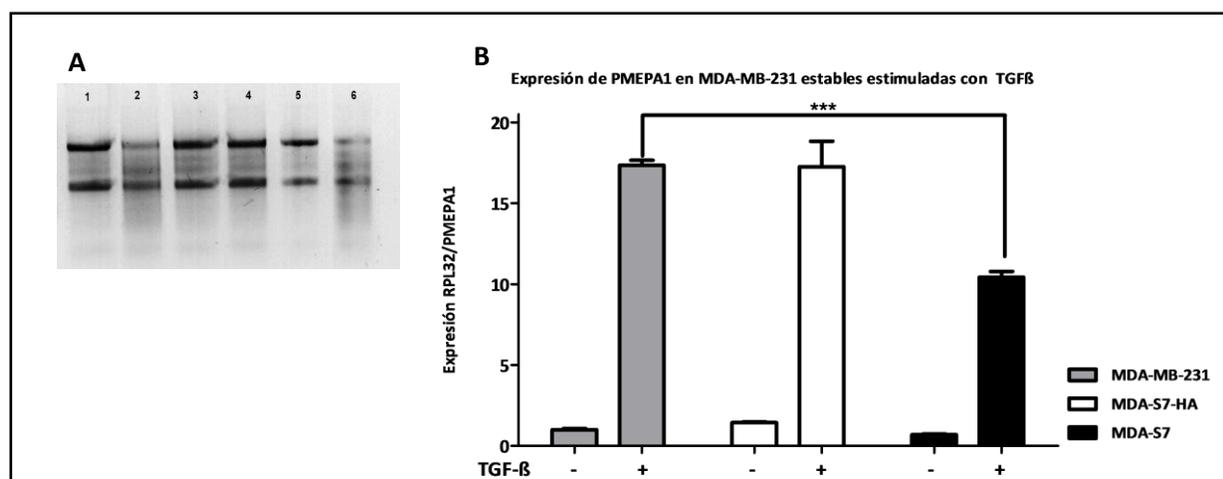


Figura 19. Análisis de funcionalidad de las células estables MDA-MB-231. (A) Extracción de RNA MDA-MB-231 estables. 1) MDA-MB-231, 2) MDA-MB-231 + TGF- β , 3) MDA-S7-HA, 4) MDA-S7-HA + TGF- β , 5) MDA-S7, 6) MDA-s7 + TGF- β . Se cargaron 500ng de RNA mezclados con buffer de carga 5X en un gel de agarosa al 2%. Tiempo de corrida: 35' a 100 volts. (B) Expresión de PMEPA1 en células estables estimuladas con TGF β . ANOVA de dos vías, corrección de Bonferroni. *** Datos significativos ($p < 0.001$).

3.8 La sobreexpresión de Smad7 en las células estables no altera la proliferación, pero sí la migración celular.

Los análisis de funcionalidad de las células estables, se realizaron únicamente a MDA-S7. Las células MDA-S7-HA fueron descartadas, debido a que no mostraron sobreexpresión de Smad7 en comparación con las células control.

La sobreexpresión estable de Smad7 en MDA-MB-231 no provocó ningún cambio significativo en la proliferación celular (Fig. 20). Lo anterior indica que aún con una inhibición de la vía del TGF β , las células transducidas se pueden dividir a la misma tasa que las células parentales. Estas observaciones son consistentes con otros estudios donde se producen clones estables de Smad7, que indican que el proceso de proliferación celular no se correlaciona únicamente con la vía del TGF β activada por Smads. Asimismo, estos resultados muestran que las células están logrando de cierta forma adaptarse a cambios abruptos en el medio y se vuelven resistentes al proceso (Javelaud *et al.*, 2005).

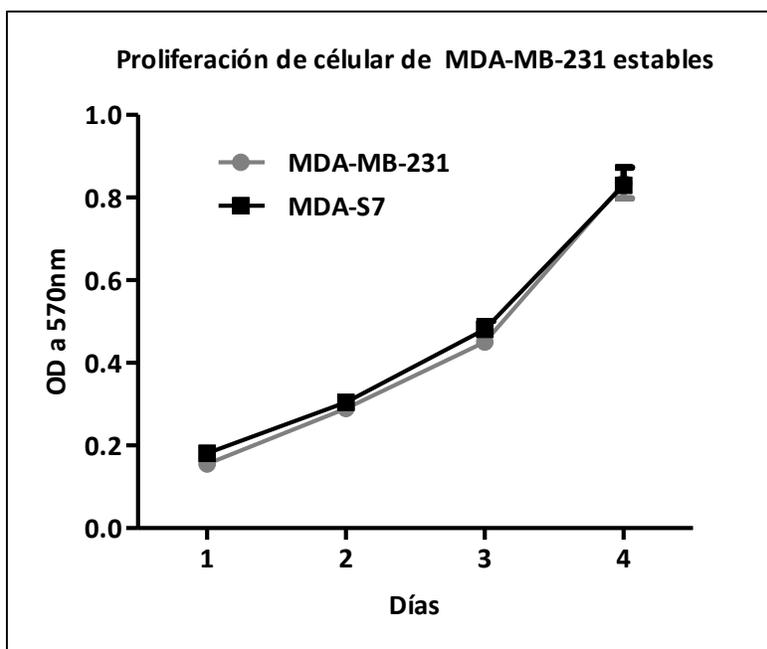


Figura 20. Ensayo de proliferación celular de MDA-S7. Se midió por cuatro días la absorbancia de las células en la presencia de MTT a 570nm. No se observan cambios significativos entre los grupos de estudio. El experimento se realizó con doce réplicas por grupo. Análisis estadístico ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni. *** $p < 0.001$ datos significativos.

Por otro lado, el ensayo de herida muestra diferencias significativas en el proceso de migración de las células MDA-S7 comparadas con las células control después de 12 y 18h (Fig. 21-A). Las células estables que sobreexpresan Smad7 avanzaron únicamente un 20% de la distancia mientras que el grupo control alcanzó un 80% en el porcentaje de cicatrización, mostrando diferencias significativas (Fig. 22-B). Es importante resaltar que aún después de 72h después la herida en MDA-S7 no había cerrado ni en un 50% (datos no mostrados). Es evidente que la sobreexpresión de Smad7, al inhibir la vía del TGF β altera procesos que tienen que ver con el potencial migratorio y metastásico de las células cancerígenas, tales como la EMT y la desregulación de la expresión de genes que producen matriz extracelular como MMP-9 o MMP-2.

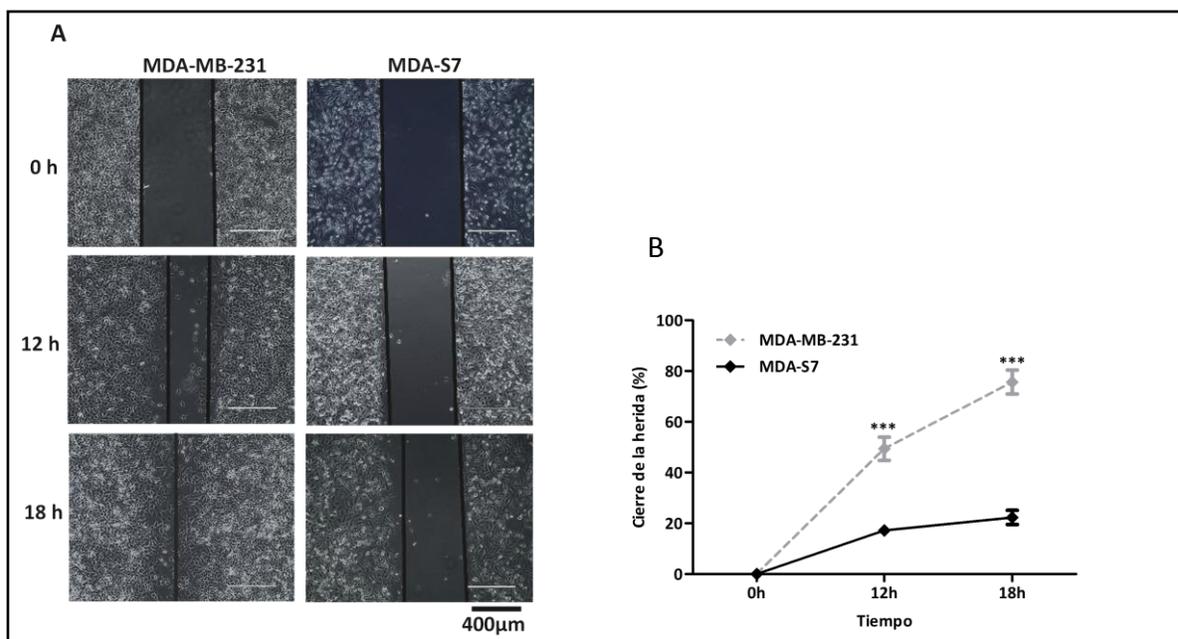


Figura 21. Evaluación de la migración celular de MDA-S7. (A) se realizó el ensayo de la herida. Las células se mantuvieron en ayuno por 12h, posteriormente se produce la herida con una punta de 200 μ l y por 18h se toman imágenes con microscopio invertido a 10X para observar la tasa de migración. (B) Gráfico que muestra la diferencia en el porcentaje de cierre de la herida. ANOVA de dos vías *** $p < 0.001$.

Una de las observaciones importantes fue el fenotipo celular. Se apreciaron cambios en la morfología de las células estables con respecto a las células parentales. Normalmente, MDA-MB-231, tiene un fenotipo tipo fibroblasto: son alargadas, con poco cuerpo celular, núcleo grande y múltiples nucléolos. A pesar de tener un origen epitelial, debido al nivel de mutación y agresividad de estas células, la mayoría de las características de unión y adhesión se pierden para ganar aquéllas que les permitan migrar e incrementar el potencial de invasión. En la figura 22 se muestra como las células MDA-S7 presentan un fenotipo que se asemeja más al tipo epitelial; son más redondeadas y con mucho menos prolongaciones citoplasmáticas. Lo anterior puede sugerir que la inhibición de la vía de señalización mediada por la sobreexpresión de Smad7 puede atenuar el proceso de EMT el cual está altamente regulado por TGF β y por medio del cual las células cancerígenas cambian su fenotipo a uno más invasivo.

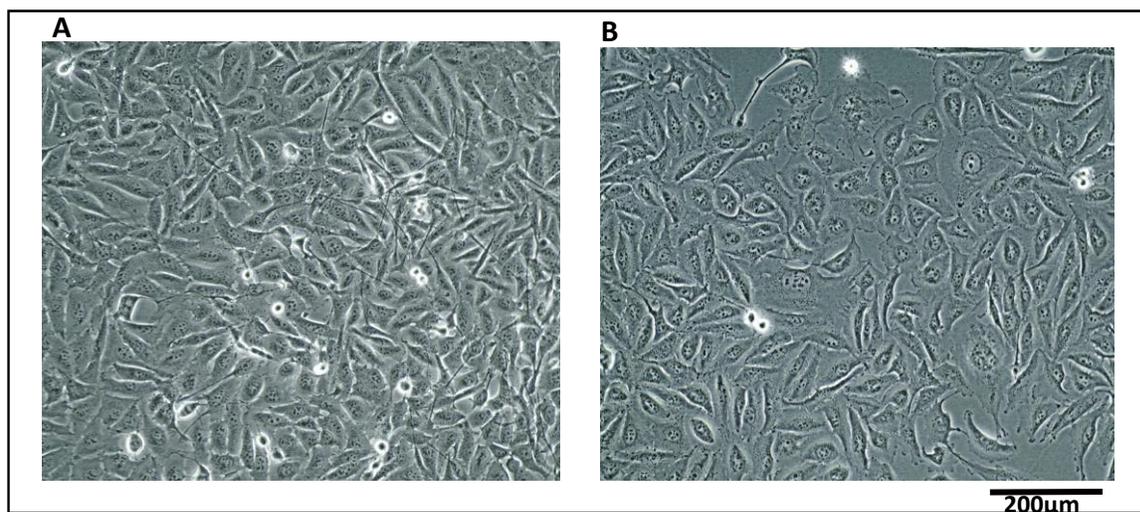


Figura 22. Cambios en el fenotipo de MDA-S7. (A) Células MDA-MB-231 confluentes semejan células mesenquimáticas con prolongaciones citoplasmáticas, poco cuerpo celular ocupado casi en su totalidad por el núcleo; han perdido la polaridad, y sus uniones célula-célula. (B) Células confluentes estables de MDA-MB-231 sobreexpresando Smad7. Son más redondeadas, sin largos lamelipodios, aparentan más un origen epitelial. Microscopio invertido aumento 20X.

3.9 Betaglicano soluble. Otro inhibidor del TGF β .

Como parte de los experimentos para probar la eficiencia de la herramienta lentiviral, y para evaluar los efectos de inhibir la vía de señalización del TGF β , se generaron células estables MDA-MB-231 que expresan la forma soluble de betaglicano, otra molécula inhibidora del TGF β . Se realizó desde la subclonación de los genes en el vector lentiviral, la secuenciación de vectores, transducción y caracterización tal como se describe en la sección de métodos.

Subclonación de sBG y verificación de la construcción pLJM1-sBG

La figura 23 muestra los resultados de la restricción enzimática con EcoRI y EcoRV para verificar la integridad del vector. El patrón de bandas obtenido coincide con los tamaños esperados. El barrido en el primer carril, donde se cargó el vector sin digerir, se debe a que la construcción no fue linearizada y por tanto es más complicada la migración del DNA dentro del gel de agarosa. Sin embargo aparece la banda en el tamaño total de la construcción.

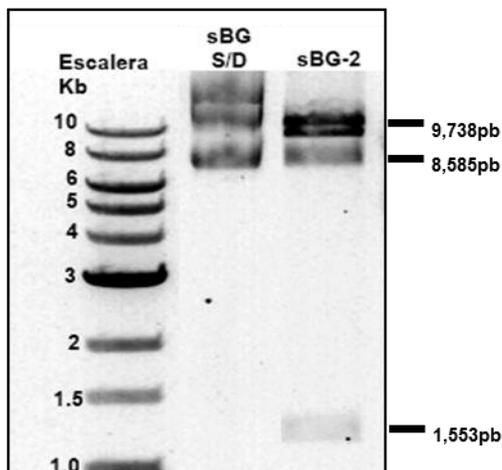


Figura 23 Purificación de sBG. El vector se digirió con las enzimas EcoRI y EcoRV. Bandas esperadas en el segundo carril: 1,553 y 8,585 pb. S/D: plásmido sin digerir.

La subclonación de sBG en el vector de expresión lentiviral también se comprobó por secuenciación (Fig.24), en donde no se detectaron corrimientos en el marco de lectura ni mutaciones dentro de la secuencia codificante. Por lo tanto se procedió a la transducción de sBG en MDA-MB-231 y a la generación de células estables.

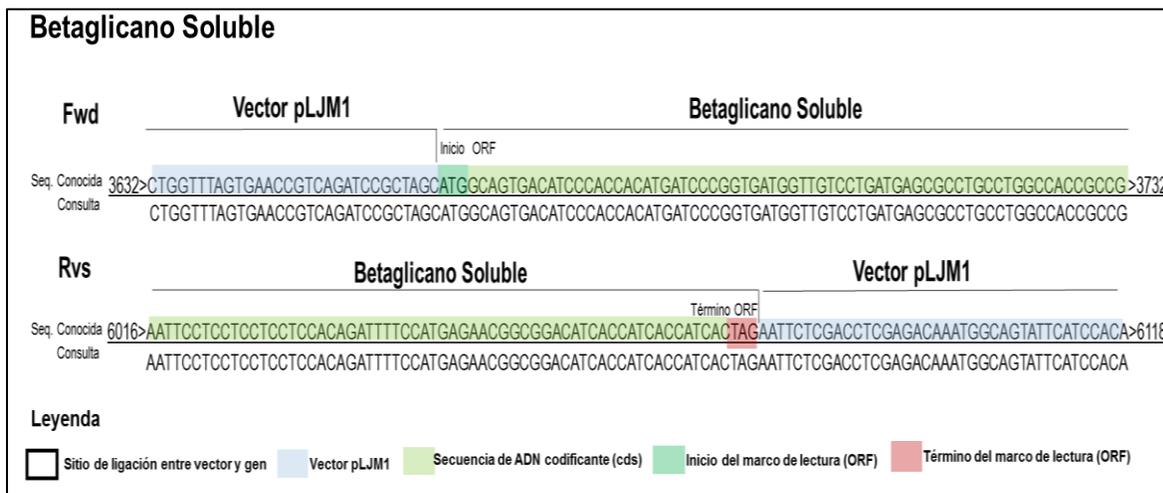


Figura 24. Secuenciación de pLJM1-sBG. En cada muestra se identifican la secuencia conocida, con particularidades como los sitios de inicio o término del marco de lectura, la ligación entre el gen de interés y el vector lentiviral de transferencia. Estas a su vez son contrastadas con la secuencia que fue obtenida por el análisis de la compañía.

Evaluación de la expresión de sBG en células estables

Después de la selección, se evaluó la expresión de sBG por medio de PCR en tiempo real y Western blot.

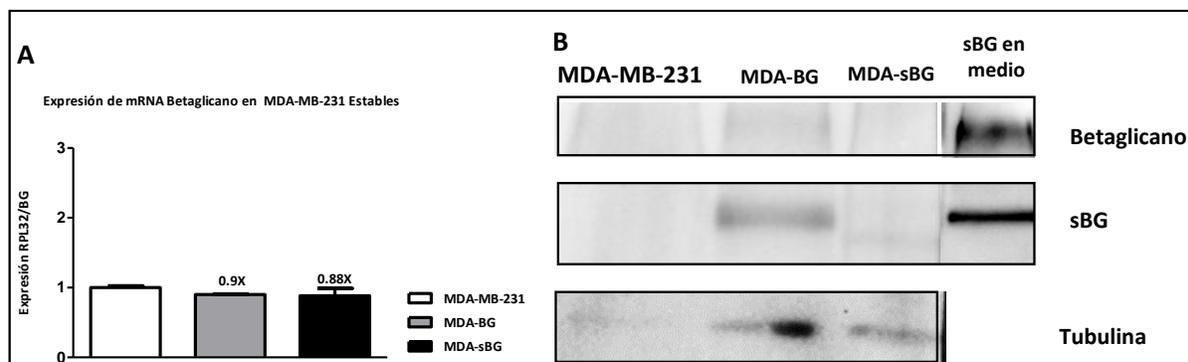


Figura 25. Expresión de sBG en células estables. (A) Expresión de mRNA de sBG en células estables. ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni. *** $p < 0.001$ datos significativos. (B) Western blot para detección de sBG en células estables y en el medio celular. El anticuerpo primario 822 (Policlonal Anti-sBG) fue donado amablemente por el Dr. Fernando López-Casillas. La dilución de trabajo: 1:2000. Ant. 2o: Anti conejo, 1:10,000. Bandas esperadas: BG: 250-300kDA y sBG: 120 kDA. Anti-tubulina 1:4,000 detectado con anti-ratón 1:40,000 para normalización de la expresión

La sobreexpresión de sBG no se observa a nivel de mensajero (Fig.25-A), pero se comprueba a nivel de proteína (Fig. 25-B). Aun cuando en el extracto celular no se observa una señal abundante, el hecho de que en el medio celular se identifique esta proteína sugiere que la molécula está siendo secretada al espacio extracelular una vez que ha sido traducida. No se descarta un error metodológico en la RT-qPCR.

Cambios en la proliferación y migración de las células estables con sBG

A diferencia de lo ocurrido en las células estables con Smad7, la proliferación de las células que sobreexpresan sBG disminuye de manera significativa (Fig. 26). A partir de 24h de haber sido sembradas, ya se puede notar una disminución celular. La figura 27, muestra cambios drásticos en la morfología celular de MDA-sBG; donde se pueden distinguir células con una morfología típica de estrés celular. Lo anterior se puede correlacionar con que una sobreexpresión de sBG induce cambios fenotípicos que someten a las células a condiciones de estrés, lo que se traduce en alteraciones en su tasa de proliferación y la disminución de su tiempo de vida.

Debido a que las células estables perdían su adherencia a la placa con relativa facilidad no fue posible realizar el ensayo de la herida, dato que corrobora que el estado de las células no es el ideal para que proliferen y migren a la misma tasa que las células parentales de esta línea.

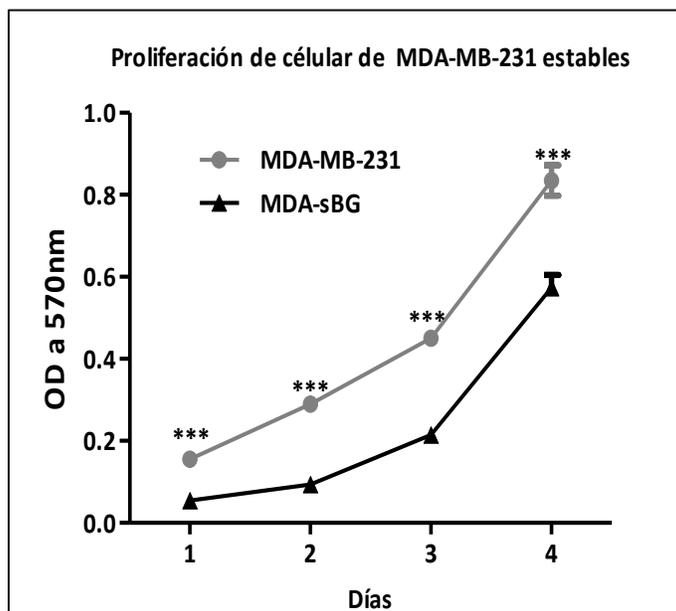


Figura 26. Ensayo de proliferación celular de MDA-sBG. Se midió por cuatro días la absorbancia de las células en la presencia de MTT a 570nm. Se observa menor proliferación en las células estables con sBG. El experimento se realizó con doce réplicas por grupo. Análisis estadístico ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni. *** $p < 0.001$ datos significativos.

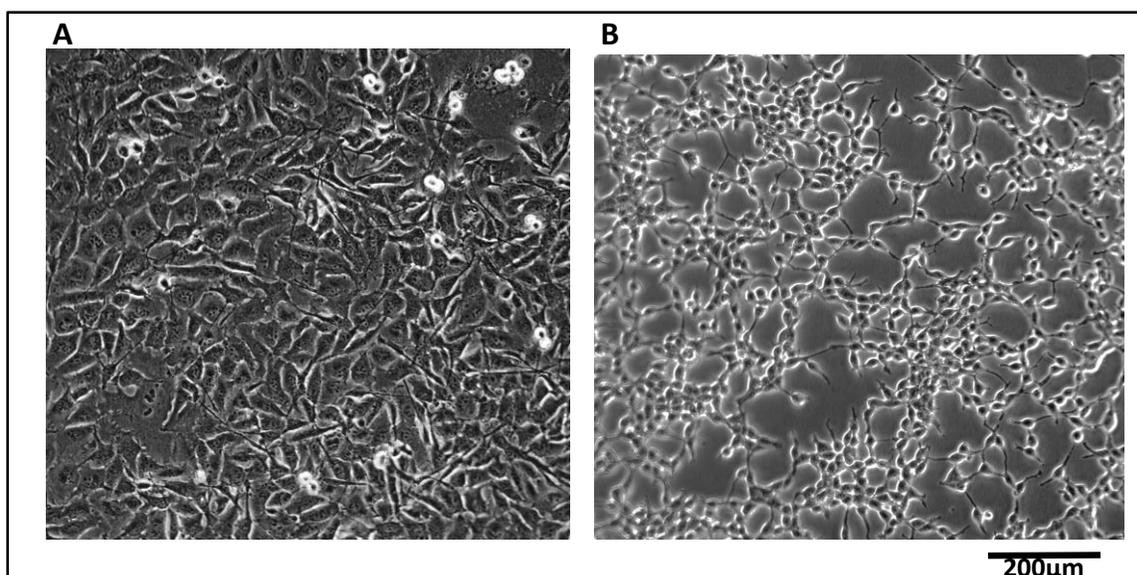


Figura 27. Cambios en el fenotipo de MDA-sBG. (A) Células MDA-MB-231 confluentes semejan células tipo fibroblasto han perdido la polaridad, y sus uniones célula-célula. (B) Células estables de MDA-MB-231 sobreexpresando sBG. Difícilmente alcanzan confluencia de 80%, ya que se despegan fácilmente. Son más alargadas, con largos lamelipodios, crecen en grupos y con mucho espacio entre células. Se observan estresadas. Microscopio invertido aumento 20X.

4. Discusión

4.1 Eficiencia del sistema lentiviral

El sistema lentiviral utilizado fue capaz de transducir genes a células cancerígenas. Sin embargo, los porcentajes de transducción de los genes estudiados (Smad7, Smad7-HA, sBG) presentan grandes variaciones con respecto al gen control GFP, sugiriendo que estas variaciones provienen del gen en particular y no del sistema de transducción. Entre los genes de estudio la eficiencia de transducción para GFP fue muy alta (>80%), seguido por Smad7 (por arriba del 50%).

Lo anterior contrasta con la eficiencia de transducción reportada, ya que en diversos estudios donde se prueba el potencial de los lentivirus como estrategias de terapia genética se obtiene una eficiencia de transducción mayor al 90% (Chen, *et al.*, 2013; Dishart *et al.*, 2003; Kallifatidis *et al.*, 2008). Sin embargo, en dichos estudios se trabaja con la secuencia de la proteína GFP, por ser un buen modelo de expresión genética. Los resultados que obtuvimos en la transducción de GFP en células MDA-MB-231 como control del experimento de transducción (Fig. 16), concuerdan con los datos reportados. Aunque al principio se obtiene una eficiencia de transducción baja, con el paso del tiempo la expresión incrementa bajo el agente de selección y se conserva por varias semanas expresándose alrededor del 90% con respecto al control (Apéndices Fig. suplementarias 2 y 3).

Es probable que la eficiencia de la herramienta lentiviral sea determinada por una combinación entre el tipo de célula a infectar, la cantidad de receptores de reconocimiento de la cápside lentiviral (VSV-G) y el tipo de gen a insertar en el genoma hospedero, más que de la concentración de partículas virales.

En 2001, Shichinohe y colaboradores utilizaron un sistema lentiviral para transducir células endoteliales y de cáncer de vejiga con un gen antiangiogénico, obteniendo eficiencias de transducción distintas de acuerdo a las líneas celulares utilizadas. Los autores atribuyeron estas diferencias a la cantidad y la distribución de fosfolípidos en la membrana. Se cree que la cápside viral VSV-G se une a fosfolípidos de membrana como la fosfatidilserina, la cual se expresa más en células epiteliales pero no en endoteliales, por lo que argumentan que la cantidad y la distribución de este fosfolípido difiere entre los distintos tipos celulares y esto limita la capacidad de infección del virus al no unirse a la membrana. En el caso de las células MDA-MB-231, aun cuando tienen un origen epitelial, se han transformado a tal grado que

presentan un fenotipo mesenquimático, por lo que es probable que la cantidad de fosfatidilserina sea menos que una célula epitelial sana y por lo tanto, la eficiencia de transducción se vea disminuida en primer instancia.

La vía de señalización del TGF β es clave para el mantenimiento de las funciones básicas de la célula, por lo que al inhibirla, las células se encuentran en condiciones de estrés. Posiblemente ésta sea una de las razones por las cuales los genes estudiados tengan problemas para integrarse y la eficiencia de transducción disminuya. Sin embargo, como reportaron Shichinohe *et al.*, aunque la eficiencia de transducción fue baja, la sobreexpresión de las proteínas Smad7 y sBG fue suficiente para regular negativamente al TGF β como lo muestran nuestros resultados en la migración y regulación de PMEPA1. En el caso de la construcción Smad7-HA, la producción de la proteína fue de menos del 5% y no se observó inhibición de la vía del TGF β . Es posible que la etiqueta HA esté alterando la producción y plegamiento de la proteína, impidiéndole realizar su función. En el futuro se piensa diseñar una nueva construcción en donde en el mismo vector de interés se integre GFP para poder seguir la infección e integración de Smad7 de manera directa en la célula.

Por otro lado, debido a que la inserción de las construcciones generadas en el genoma de la célula es aleatoria, es posible que las células que lograron integrar varias copias del gen de interés, sobreexpresen en mayor medida las proteínas inhibitoras del TGF β ; en consecuencia, su ciclo celular se altera y su viabilidad disminuye. Por el contrario, las células que integraron pocas copias del gen presentarán mayor viabilidad, favoreciendo la selección de éstas últimas, y por lo tanto, las células seleccionadas expresarán menos gen de interés.

El tiempo que se mantuvo la expresión es poco más de un mes pero bajo el agente de selección. Para poder utilizar estas células en modelos *in vivo*, es necesario mantener las células sin selección al menos cuatro semanas que es el tiempo en que se desarrolla el modelo *in vivo* de metástasis ósea. Experimentos posteriores a este trabajo contemplan la caracterización de las estables generadas en ausencia de la selección.

4.2 Sobreexpresión de Smad7 y caracterización celular

Las células MDA-S7 generadas, sobreexpresaron la proteína Smad7 como lo demostraron los ensayos de RT-qPCR en donde la expresión del mRNA de Smad7 se encontró aumentada. Sin embargo, la detección a nivel proteico no se pudo lograr debido a la calidad del anticuerpo. En el campo es conocido que no existen buenos anticuerpos para la detección de Smad7, por esta razón se pensó en generar una versión de Smad7 con HA. Sin embargo, con la construcción Smad7-HA no se obtuvo buena expresión del mensajero ni de la proteína. A pesar de no haber podido detectar la proteína por Western blot, sabemos que se está produciendo una proteína activa, como lo muestran los ensayos de RT-qPCR en donde células MDA-MB-231- Smad7 tratadas con TGF β presentan una disminución de los niveles de PMPEA1, gen regulado positivamente por esta vía de señalización. De esta manera queda comprobado que efectivamente la proteína Smad7 producida por las células estables inhibe la vía del TGF β . (Fig. 19). Al ser estas células funcionales, se espera la inhibición de la expresión de otros genes que son blancos de TGF β y que participan en el desarrollo de metástasis ósea como: CXCR4, pTHrP, IL-11, OPN (Javelaud *et al.*, 2007). Experimentos posteriores a este trabajo contemplan el estudio de estos genes.

Dados estos resultados en experimentos *in vitro*, se espera que la sobreexpresión de Smad7 *in vivo* disminuya la invasión y colonización de las células cancerosas al hueso, alterando la progresión tumoral y el potencial metastásico de las células.

4.3 Tasa de proliferación de las células MDA-S7 estables

Los ensayos de proliferación celular con células MDA-S7 comparadas con células MDA-MB-231 sin transfectar, demostraron que la expresión de Smad7 en células MDA-MB-231 no altera la tasa de proliferación en comparación con las células parentales (Fig. 21) Estos resultados son consistentes con datos reportados en donde no se registraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento en líneas celulares donde la transferencia de Smad7 o Smad6 mediada por adenovirus no influyó el crecimiento del tumor primario en células de cáncer de mama (Azuma *et al.*, 2005).

Se descarta la posibilidad de que una falla en la transferencia genética sea la causa de la ausencia de cambios significativos en la proliferación, ya que se observaron cambios en la expresión transcripcional

de Smad7, en genes regulados por TGF β y en el potencial migratorio de las clonas estables. En células de melanoma estables que sobreexpresan a partir de selección por colonia, a pesar de los cambios dramáticos en la expresión basal de Smad3 fosforilada, la sobreexpresión de Smad7 no provocó ninguna modificación en la tasa de proliferación (Javelaud *et al.*, 2007).

El proceso de proliferación celular está mediado no solo por la vía canónica del TGF β , sino por otras vías de señalización. Tal es el caso de las MAPK cinasas que participan en procesos de diferenciación y proliferación celular, y que pueden ser uno de los mayores mecanismos de acción del TGF β . Estas vías de las MAPK cinasas, no son inhibidas por Smad7 y al estar desreguladas en cáncer, pueden seguir ejerciendo sus funciones y propiciar que la proliferación celular no se vea afectada en su totalidad (Ranganathan *et al.*, 2007)

Con respecto al potencial terapéutico de Smad7, debido a que no se altera la tasa proliferativa, no es buena estrategia utilizarla para tratar tumores primarios en donde se espera reducir el tamaño del tumor, sin embargo por sus efectos en la migración celular tiene alto potencial como agente antimetastático.

4.4 Potencial de migración de MDA-S7 estables

Los ensayos de migración celular de las transfectantes estables evaluadas mediante el ensayo de la herida, mostraron que la migración celular se ve alterada en las células estables. La sobreexpresión de Smad7 Inhibe la capacidad de migración de las células aún después de 72hrs (imagen no mostrada). No se identificó el mecanismo celular por el cual se propicia este cambio, sin embargo, hay grupos que sugieren que es a través de MMPs, donde por acción de Smad7 se puede alterar la capacidad de remodelar la matriz extracelular (EMC) más que de modificaciones en las funciones de migración y adhesión celular (Javelaud *et al.*, 2005).

Otro grupo sugiere que es debido a un cambio en la expresión de cadherinas, puesto que la transferencia genética de Smad7 aumentó la expresión de los componentes más importantes de adhesión y unión celular, modificó los perfiles de expresión de Cadherinas incrementando N-cadherina y disminuyendo E-cadherina, también inhibió la habilidad migratoria e invasiva de células de carcinoma mamario de ratón JygMC (Azuma *et al.*, 2005).

TGF β se ha visto implicado en el cambio de N-cadherina a E-cadherina, que ocurre normalmente durante el proceso de EMT y que en células tumorales propicia en gran medida la metástasis. Por ello puede ser que más que una remodelación de la matriz extracelular, la inhibición del TGF β mediado por la sobreexpresión de Smad7 en estas células, propicie un cambio en la expresión de cadherinas mesenquimales pro-migratorias a cadherinas epiteliales pro-adhesivas y así se inhiba la invasión tumoral y metástasis (Azuma *et al.*, 2005). Será necesario realizar estudios más precisos para caracterizar los mecanismos que producen cambios en la migración celular pero sí es claro que la sobreproducción de Smad7 vuelve a las células cancerosas menos agresivas.

Es interesante lo que se muestra en la Fig. 23, donde claramente se observa un cambio en la morfología de las células estables, las cuales semejan a células del tipo epitelial. En otros estudios también se han identificado cambios en la morfología mostrando una regresión al fenotipo epitelial de células de cáncer de mama mediados por la expresión de Smad7, donde se observa un aumento de uniones tipo célula-célula en comparación a la línea parental que presenta fenotipo de fibroblasto (Azuma *et al.*, 2005). Son necesarios estudios posteriores para caracterizar este fenotipo y puntualizar si la sobreexpresión de Smad7 induce una regresión del proceso EMT y por ende las células de cáncer de mama pierden su potencial de migración.

4.5 Efectos de la sobreexpresión de sBG en MDA-MB-231

La sobreexpresión de sBG un tuvo un efecto significativo en la tasa de división celular. La proliferación disminuye en las células estables incluso 24h horas después de haber sido sembrada la misma cantidad de células transducidas y controles negativos, tal como se reporta en Elderbroom *et al.*, 2014. Por lo tanto, esta observación confirma que la sobreexpresión de sBG es capaz de alterar la tasa de proliferación a largo plazo. Es importante notar, que para que BG pueda ejercer esta inhibición, debe hidrolizarse su dominio membranal o, en su defecto, introducir la versión soluble de la proteína, ya que de lo contrario no se dará este efecto negativo en la proliferación celular como se vio en el estudio de Dong y colaboradores.

Al igual que MDA-S7, las células MDA-sBG mostraron cambios en su morfología. En este caso, la morfología celular asemeja un fenotipo de estrés en las células estables, en lugar de un fenotipo más

parecido al de origen epitelial (Azuma *et al.*, 2005). Al estar inhibido TGF β se suprimen también funciones celulares importantes que alteran a las células y les producen estrés, lo cual cumple con el objetivo de esta inserción: llevar a las células a un punto de estrés tal que comprometa su viabilidad. La migración de MDA-sBG no pudo ser analizada ya que el patrón de crecimiento celular no propició que se formara la monocapa correctamente, sino que el crecimiento se daba en forma de colonias, y las células difícilmente se mantenían adheridas a la placa. Con ello, se sugiere, que sBG tiene un efecto directo sobre el fenotipo celular que en consecuencia disminuye la proliferación y migración celular. Lo anterior es consistente con un estudio previo donde se confirman un efecto directo de sBG en inhibir el potencial de invasión de las células de cáncer de mama (Dong *et al.*, 2007).

5. Conclusiones

- Logramos generar células de cáncer de mama que sobreexpresan establemente la proteína Smad7.
- La proteína Smad7 sobreexpresada es activa y ejerce sus efectos de regulador negativo sobre la vía del TGF β como se demostró al inhibir genes regulados por esta vía.
- La sobreexpresión de Smad7 no tuvo efecto en la proliferación pero la migración celular se vio afectada en las células MDA-MB-231 estables.
- Pudimos validar nuestra metodología y producir adicionalmente células cancerosas de mama que sobreexpresan sBG. La sobreexpresión de sBG tuvo efecto negativo en la proliferación, alteró el fenotipo y la migración celular.
- Utilizar vectores virales para insertar Smad7 o sBG es un medio eficiente para atenuar la agresividad de células tumorales y; por consecuencia, es un medio terapéutico con un alto potencial para prevenir o disminuir el desarrollo de metástasis ósea.
- De llegar a utilizarse como estrategia terapéutica, su potencial de acción estaría enfocado a eliminar aquellas células capaces de metastatizar. Por lo tanto, es importante tomar en cuenta que puede considerarse como un tratamiento en combinación con otras terapias que eliminen el tumor primario, con el fin de tener un tratamiento completo que disminuya el riesgo de dejar células tumorales circulatorias que puedan metastatizar al hueso.

6. Perspectivas

- Probar las células estables en un modelo *in vivo* de metástasis ósea.
- Direccionar la proteína únicamente hacia células tumorales.
- Probar un vector de inserción genética más eficiente.

7. Literatura citada

- American Cancer Society [ACS], (2009). ¿Qué es el cáncer de seno? Recuperado el 1 de Noviembre del 2015 de: <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/cancerdeseno/Guiadetallada/cancer-de-seno>
- Azuma, H., Ehata, S., Miyazaki, H., Watabe, T., Maruyama, O., Imamura, T., ... Horie, S. (2005). Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JyMC(A) cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(23), 1734–46. <http://doi.org/10.1093/jnci/dji399>
- Baker, J. C., y Harland, R. M. (1996). A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes y Development*, 10(15), 1880–1889. <http://doi.org/10.1101/gad.10.15.1880>
- Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Malik, S. N., Kreisberg, J., Brattain, M. G., Sprague, E. A., Luo, J., López-Casillas, F., y Sun, L.Z. (2002). Extracellular domain of TGF b type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells, (February). <http://doi.org/10.1038/sj/onc/1205439>
- Bhola NE, Balko Jm, Dugger T. C., Kuba, M. G., Sánchez, V., Sanders, M., Standford, J., Cook, R. S., y Arteaga, C. TGF-β inhibition enhances chemotherapy action againts triple negative breast cáncer. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1348-1358.
- Breckpot, K., Aerts, J. L., y Thielemans, K. (2007). Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Therapy*, 14(11), 847–62. <http://doi.org/10.1038/sj.gt.3302947>
- Chen, C., Akerstrom, V., Baus, J., Lan, M. S., y Breslin, M. B. (2013). Comparative analysis of the transduction efficiency of five adeno associated virus serotypes and VSV-G pseudotype lentiviral vector in lung cancer cells. *Virology Journal*, 10, 86. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-10-86>
- Dishart K. L., Denby L., George S. L., Nicklin S. A., Yendluri, S., Tuerk M. J., Kelley M. P., Donahue B. A., Newby A. C., Harding T., B. A. H. (2003). Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(7), 739–748. [http://doi.org/10.1016/S0022-2828\(03\)00136-6](http://doi.org/10.1016/S0022-2828(03)00136-6)
- Dong, M., How, T., Kirkbride, K. C., Gordon, K. J., Lee, J. D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B. J., Marks, J. R., y Blobe, G. C. (2007). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 206–217. <http://doi.org/10.1172/JCI29293>
- Elderbroom, J. L., Huang, J. J., Gatza, C. E., Chen, J., How, T., Starr, M., ... Blobe, G. C. (2014). Ectodomain shedding of TβRIII is required for TβRIII-mediated suppression of TGF-β signaling and breast cancer migration and invasion. *Molecular Biology of the Cell*, 25(16), 2320–32. <http://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0524>
- Fournier, P. G. J., Juárez, P., Jiang, G., Clines, G. A., Kim, H. S., Walton, H. W., ... Guise, T. A. (2016). The TGFβ Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer c*, 27(6), 809–821. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.009>.The

- Gold LI (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10:303–60.
- Javelaud, D., Delmas, V., Möller, M., Sextius, P., André, J., Menashi, S., ... Mauviel, A. (2005). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo. *Oncogene*, 24(51), 7624–9. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208900>
- Javelaud, D., Mohammad, K. S., McKenna, C. R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., ... Mauviel, A. (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Research*, 67(5), 2317–2324. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3950>
- Juárez, P., Mohammad, K. S., Yin, J. J., Fournier, P. G. J., McKenna, R. C., Davis, H. W., ... Guise, T. a. (2012). Halofuginone inhibits the establishment and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Research*, 72(23), 6247–56. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1444>
- Kallifatidis, G., Beckermann, B. M., Groth, a, Schubert, M., Apel, a, Khamidjanov, a, ... Herr, I. (2008). Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Therapy*, 15(4), 231–40. <http://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701097>
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Guise, T. A., y Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6), 537–549. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610803001326>
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G. P., Serganova, I., Chen, C.-R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W. L., y Massagué, J. (2005). Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13909–14. <http://doi.org/10.1073/pnas.0506517102>
- Krzeszinski, J. Y., y Wan, Y. (2015). New therapeutic targets for cancer bone metastasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(6), 360–373. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.006>
- Landström, M., Heldin, N.-E., Bu, S., Hermansson, A., Itoh, S., ten Dijke, P., y Heldin, C.-H. (2000). Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor β in prostatic carcinoma cells. *Current Biology*, 10(9), 535–538. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00470-X](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00470-X)
- Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D, Blake-Cerda M, Arce, C., Motola-Kuba, D., Villareal-Garza, C., González-Ángulo, A. M., Bargalló, E., Aguilar, J. L., Mohar, A. y Arrieta O. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, y association with menopausal status, body mass index, y parity. *Cancer* 117, 3658–3669
- Lodish H., Berk A., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. (2007). *Molecular cell biology*. (6th ed.). New York. Freeman y Company. (pp. 668-670).
- López-casillas, F., Vilchis-Landeros, M. M., Esparza-López, J., Ponce-Castañeda, M. V., Velasco-loyden, N. G., Juárez, P., Montiel, J. L, y Mendoza, V. (2008). Regulation of the Transforming Growth Factor- β superfamily by Betaglycan. *Transforming Growth Factor-B in Cancer Therapy*, 1, 451–461.

- Lopez-casillas, F., Wrana, J. L., y Massague, J. (1993). Betaglycan Presents Ligand to the TGF-beta Signaling Receptor. *Cell*, 73, 1435–1444. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390368Z#>
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., y Band, V. (2014). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology y Therapy*, 10(10), 955–960. <http://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
- Massagué, J. (1998). TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 753–791. Recuperado de <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–30. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- National Institute of Health [NIH], 2014. Breast Cancer for Patients. Recuperado el 10 de julio del 2015 de: <http://www.cancer.gov/types/breast>
- National Cancer Institute [NIH], 2014. Targeted Cancer Therapies. Recuperado el 18 de agosto del 2016 de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>
- Qian, S. W., Burmester, J. K., Tsang, M. L.-S., Weatherbee, J. A., Hinck, A. P., Ohlsen, D. J., Sporn, M. B., y Roberts, A. B. (1996). Binding Affinity of Transforming Growth Factor- for Its Type II Receptor Is Determined by the C-terminal Region of the Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48), 30656–30662. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30656>
- Ranganathan, P., Agrawal, A., Bhushan, R., Chavalmane, A. K., Kalathur, R. K. R., Takahashi, T., y Kondaiah, P. (2007). Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics*, 8, 98. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-98>
- Reineke, E. L., Lam, Minh., Liu, Qing, L., Liu, Y., Stanya, K. J., Chang, K. S., Means, A. R., y Kao, H, Y. (2008). Degradation of the Tumor Suppressor PML by Pin1 Contributes to the Cancer Phenotype of Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Molecular and Cellular Biology* 997-1006. <http://doi.org/10.1128/MBC.010848-07>
- Riss, T. L., Niles, A. L., y Minor, L. (2013.). Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G., y Pusztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(16), 5678–85. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
- Sanfilipo, J.B., Moreno M,I. (2015). Cáncer de mama. Recuperado el 12 de noviembre del 2015 de: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/abr_01_ponencia.html

- Shichinohe, T., Bochner, B. H., Mizutani, K., Nishida, M., Hegerich-Gilliam, S., Naldini, L., y Kasahara, N. (2001). Development of lentiviral vectors for antiangiogenic gene delivery. *Cancer Gene Therapy*, 8(11), 879–89. <http://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700388>
- Stolfi, C., Marafini, I., De Simone, V., Pallone, F., y Monteleone, G. (2013). The dual role of Smad7 in the control of cancer growth and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 23774–23790. <http://doi.org/10.3390/ijms141223774>
- System Biosciences (SBI). (2010). Guide to Packaging and Transduction of Target Cells Lentivector Expression Systems : User Manual. Recuperado de https://www.systembio.com/downloads/web_manual_lentivector_exp_sys_071510.pdf
- Wang, X.-F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F., y Weinberg, R. a. (1991). Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell*, 67(4), 797–805. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90074-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90074-9)
- Weinberg R. (2014) *The biology of cancer*. (2nd ed.). New York. Garly Science. (pp. 32-40).
- World Health Organization [WHO]. (2012). Global Cancer Facts y Figures, 3rd Ed. Recuperado el 13 de junio del 2015 de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Yan, X., Liu, Z., y Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- b signaling by Smad7 Overview of TGF- b Signaling Pathways, 263–272. <http://doi.org/10.1093/abbs/gmp018>.Review
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R., y Guise, T. a. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 197–206. <http://doi.org/10.1172/JCI3523>

8. Apéndices

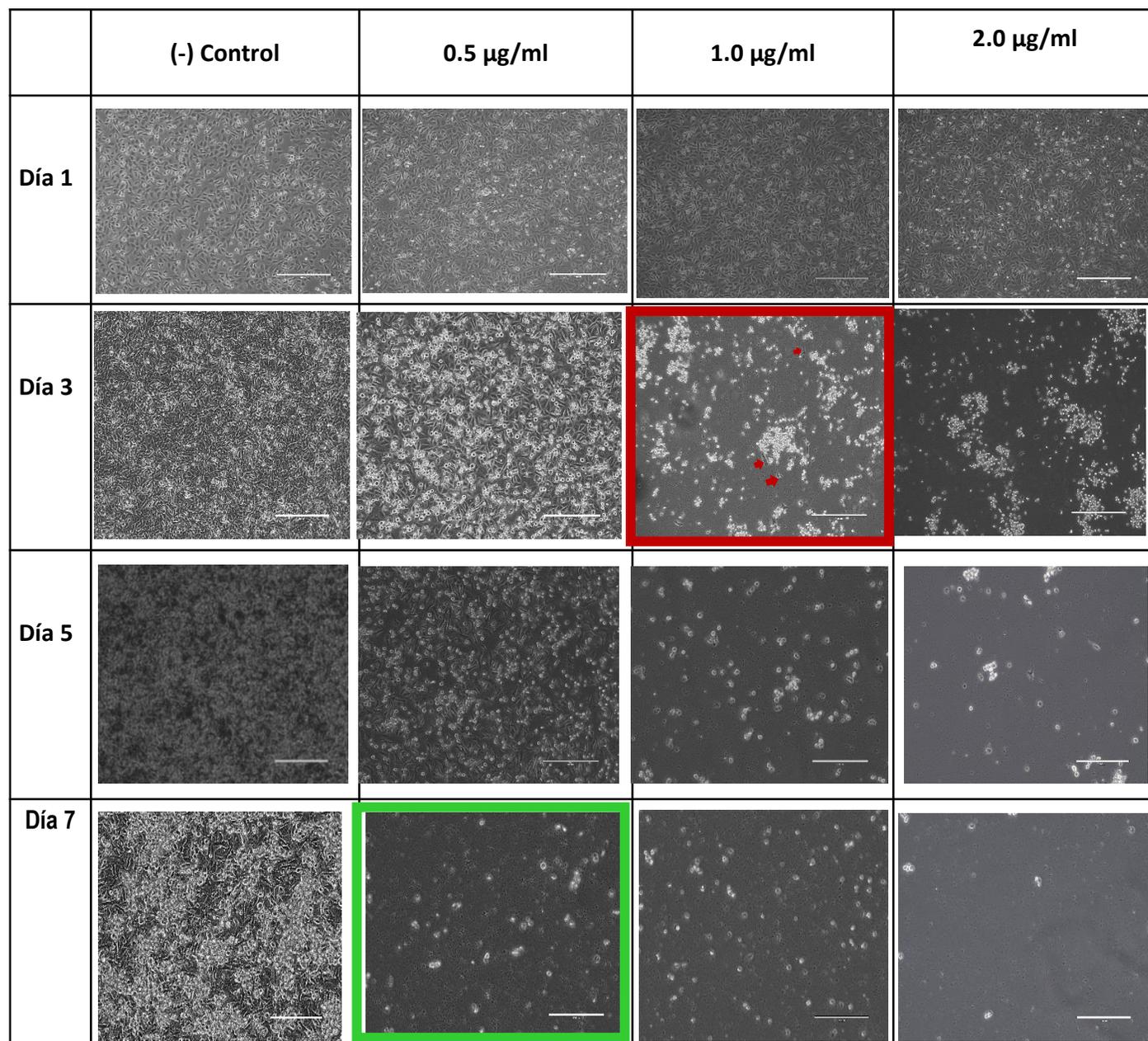


Figura suplementaria 1. Curva de muerte para selección con Puromicina de MDA-MB-231. Se expuso a las células a seis concentraciones diferentes de Puromicina 0.5-8.0 $\mu\text{g/ml}$ (solo se muestran las concentraciones más bajas) durante siete días. Se determinó la dosis alta al día 3 (imagen en recuadro rojo) y la dosis óptima al día siete: 0.5 $\mu\text{g/ml}$, con la cual se trabajó durante la transducción lentiviral.

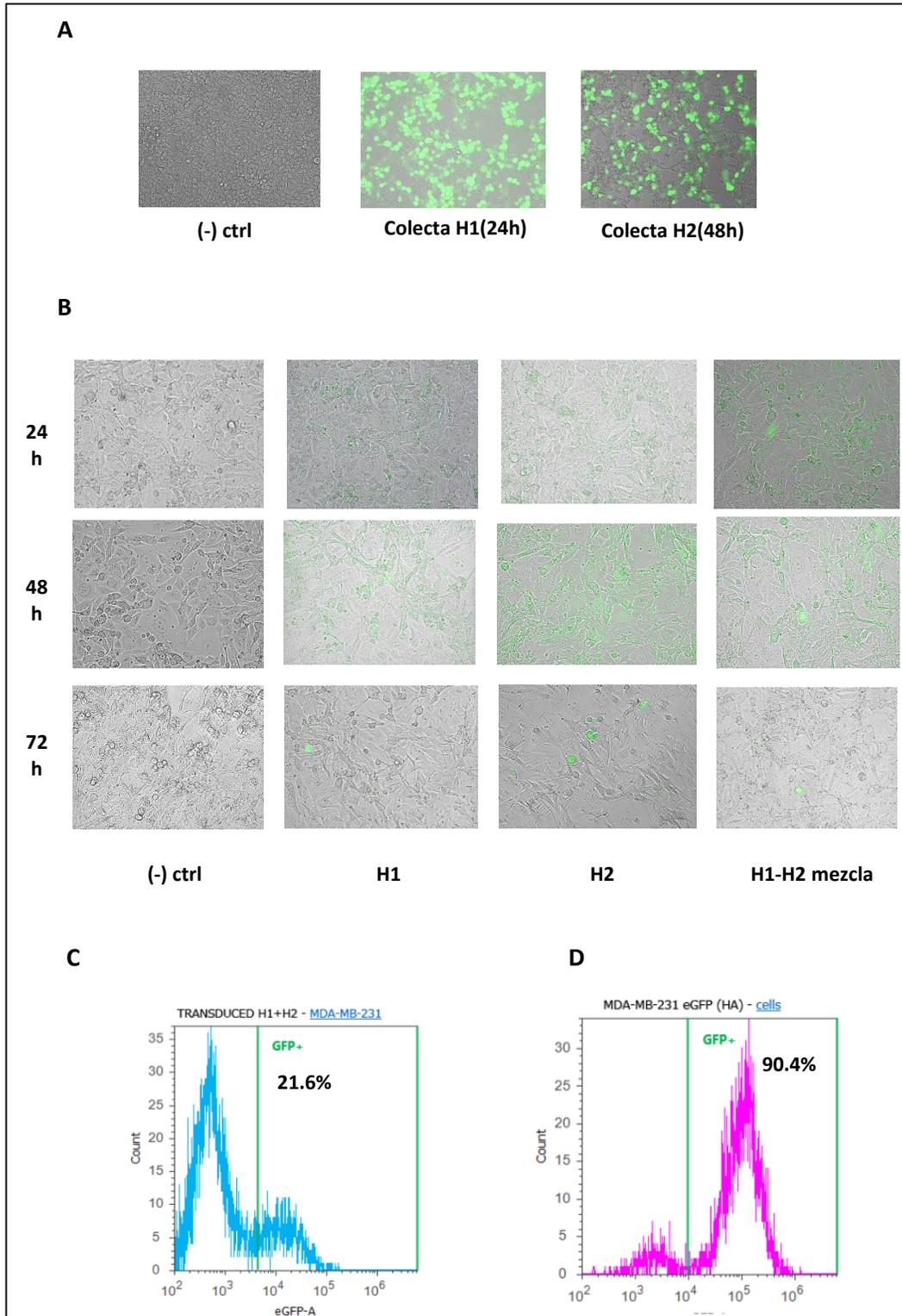


Figura Suplementaria 2. (A) Transfección del Sistema lentiviral con GFP+ como control de Smad7-HA a células 293T. Se observa fluorescencia en las células transfectadas a una intensidad relativamente igual. (B) Transducción de partículas lentivirales con GFP+ como control de transducción de Smad7-HA a MDA-MB-231. La fluorescencia disminuye a comparación de la transfección y entre las muestras de estudio no hay cambios en intensidad. (C) Primera medición de las células que expresan GFP+ para evaluar la eficiencia de transducción del sistema lentiviral. (D) Citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células MDA-MB-231 que expresan GFP+ después del proceso de selección celular.

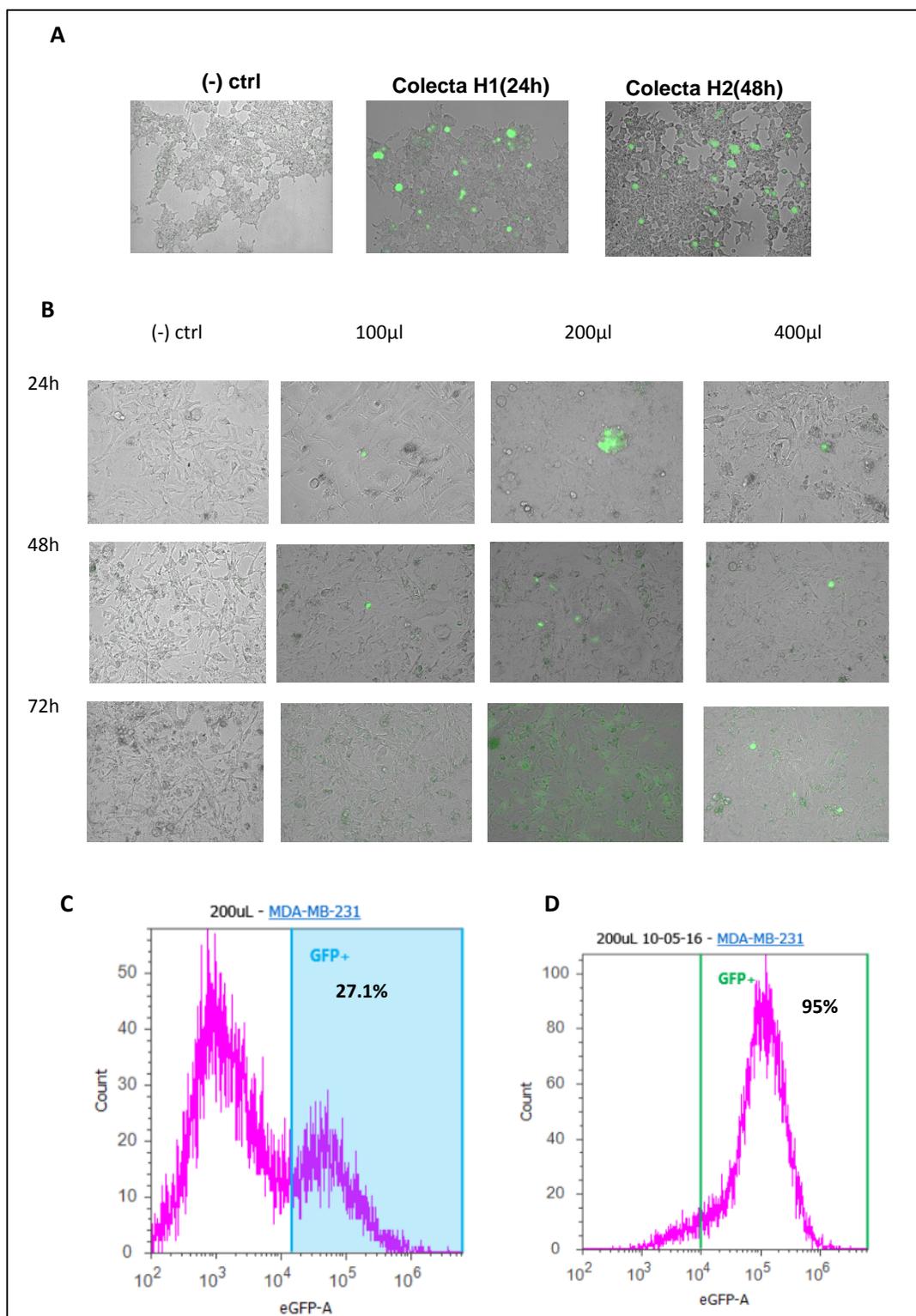


Figura Suplementaria 3. (A) Transfección del Sistema lentiviral con GFP+ como control de Smad7 a células 293T. Se observa fluorescencia en las células transfectadas a una intensidad relativamente igual. (B) Transducción de partículas lentivirales con GFP+ como control de transducción de Smad7 a MDA-MB-231. La fluorescencia disminuye a comparación de la transfección y entre las muestras de estudio la muestra de 200μl de partículas lentivirales presenta mayor intensidad. (C) Primera medición de las células que expresan GFP+ para evaluar la eficiencia de transducción del sistema lentiviral. (D) Citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células MDA-MB-231 que expresan GFP+ después del proceso de selección celular. .