

TRABAJO FIN DE MÁSTER

EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS EN CÉLULAS MADRE TUMORALES MAMARIAS TRAS IRRADIACIÓN

Máster en Avances en Radiología Diagnóstica y Terapéutica
y Medicina Física

M^a Auxiliadora Olivares Urbano

TUTORES

María Isabel Núñez Torres

Juan Antonio Marchal Corrales

Departamento de Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

Granada, 2014

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	7
1. Cáncer en la actualidad	8
2. Cáncer de mama.....	8
3. Células madre tumorales (CSCs)	9
4. Radiación ionizante (RI).....	10
5. Efectos de la RI en las CSCs	12
6. Resistencia de las CSCs a la RI.....	13
- Reparación del ADN	13
- Puntos de control del ciclo celular	14
- Vías de supervivencia.....	15
• Vía de Hedgehog	15
• Vía de Notch	16
• Vía Wnt/ β -catenina	16
- Nicho y microambiente tumoral	16
7. Metaloproteasas (MMPs).....	18
8. Papel de las MMPs en la carcinogénesis.....	20
- Invasión y metástasis	20
- Transición epitelio mesenquimal (TEM).....	20
- Crecimiento del tumor	21
- Evasión de la apoptosis.....	21
- Formación de vasos sanguíneos	22
- Respuesta a la inflamación	22
- Formación de nichos pre-metastásicos	23

9. Alteración de las MMPs tras irradiación	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
1. Hipótesis de trabajo	26
2. Objetivos a desarrollar	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Líneas celulares	28
2. Condiciones de cultivo de las líneas celulares	28
3. Congelación/Descongelación de cultivos celulares	29
4. Separación de la subpoblación de CSCs.....	29
5. Irradiación celular	31
6. Determinación de marcadores de células madre tras irradiación	31
7. Medidas de expresión génica tras irradiación	32
7.1. Extracción y cuantificación de ARN.....	32
7.2. Síntesis de cDNA mediante RT-PCR.....	33
7.3. Determinación de la expresión génica mediante qPCR.....	34
8. Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
1. Expresión de marcadores de CSCs tras irradiación	37
2. Expresión de genes tras irradiación.....	38
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	54
ABREVIATURAS.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las CSCs constituyen una pequeña subpoblación de células dentro del tumor. Estas células se caracterizan por la capacidad de auto-renovación, diferenciación, metástasis, quiescencia, tumorigénesis, supervivencia al torrente sanguíneo, expresión de marcadores de superficie y resistencia a la quimioterapia y radioterapia. El tratamiento con radiación ionizante provoca en las CSCs senescencia, inestabilidad genómica y epigenética, alteración del metabolismo y del ciclo celular, daño en el ADN y modificación de su reparación, y muerte celular. Las CSCs que sobreviven al tratamiento con radiación generan mecanismos de supervivencia que les permite favorecer los procesos de invasión y metástasis, en los que también intervienen distintos tipos de metaloproteasas (MMPs). Las MMPs son una familia de endopeptidasas, secretadas como zimógenos tanto por las células tumorales como por las células del microambiente. Están además implicadas en otros procesos de la carcinogénesis como la TEM, el crecimiento tumoral, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis, la inflamación, y la formación de nichos pre-metastásicos. Estas enzimas están reguladas por los TIMPs y, epigenéticamente, por las HDACs.

OBJETIVO: Establecer la proporción de CSCs en dos líneas celulares tumorales de cáncer de mama humano para distintas dosis de radiación y, determinar, en caso de que exista, la expresión de distintas enzimas asociadas al microambiente tumoral (MMPs, TIMPs y HDACs) en las poblaciones CSCs positiva y negativa.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han utilizado dos líneas celulares tumorales mamarias (MCF-7 y MDA-MB-231), mantenidas en cultivo monocapa y posteriormente cultivadas en medio de esferas. A las 24h de la siembra en monocapa, las células han sido irradiadas a distintas dosis (2, 4 y 6 Gy), manteniendo un control sin irradiar. Tras ello, se han dejado en cultivo una semana para formar colonias y, por último, se han determinado los marcadores de células madre (ALDH1, CD24 y CD44) mediante citometría de flujo. De la población general del cultivo en medio de esferas, se han separado las CSCs positivas y las negativas mediante citometría de flujo. Las dos subpoblaciones de células han sido irradiadas a distintas dosis (0, 2, 4 y 6 Gy). A las 24h, se ha llevado a cabo la extracción y cuantificación de ARN, la síntesis de ADNc mediante RT-PCR y la medición de la expresión génica mediante qPCR. Los genes medidos (subpoblaciones positiva y negativa) han sido: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2.

RESULTADOS: Tras el tratamiento con radiación ionizante, el porcentaje de marcadores de CSCs varía en función de la dosis y del tipo celular. En MCF-7 se

observa un incremento de ALDH1 a los 4 Gy, mientras que en MDA-MB-231, aumentan los marcadores ALDH1 y CD44 a los 6 Gy. Se han expresado mayor número de genes en la línea MDA-MB-231 que en la MCF-7. Los genes expresados en ambas líneas han sido: MMP-1, MMP-2, HDAC-4 y TIMP-1. En MDA-MB-231, además, se han expresado la MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-2 y TIMP-2. De forma general, los genes han sido más expresados en la población negativa que en la positiva, destacando la expresión en las CSCs positivas de la MMP-2 y la MMP-9, las cuales están relacionadas con la formación de tumores secundarios.

CONCLUSIONES: La radiación favorece la selección de CSCs de distinta manera dependiendo de la dosis y de la línea celular irradiada. Además, después de este tratamiento, mayor número de genes y en mayor proporción han sido expresados en la línea celular MDA-MB-231, la cual es más radio-resistente que la MCF-7. La expresión aumentada de MMP-2 y MMP-9 tras el tratamiento con radiación estaría contribuyendo, por tanto, a que las células MDA-MB-231 modifiquen su capacidad de supervivencia celular, su estado de diferenciación y a que reflejen un fenotipo asociado al proceso de carcinogénesis. El hecho de que esta expresión aumente con la dosis de radiación en la población CSC+, podría justificar el desarrollo de tumores secundarios, dado que aquellas células que no han sido eliminadas con radiación degradarían la MEC con mayor facilidad. En este sentido, sería interesante utilizar, junto a la radioterapia, inhibidores de estas MMPs para evitar que, tras el empleo de radiación, las células desarrollaran un fenotipo más agresivo que favorezca la progresión tumoral. De esta manera, tanto MMP-2 como MMP-9 podrían ser consideradas como nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER EN LA ACTUALIDAD

El cáncer representa una de las principales enfermedades a nivel mundial y una de las principales causas de muerte. Se conocen más de 200 tipos de cáncer, entre los que destacan el cáncer colorrectal, pulmonar, de mama y de estómago. En relación al sexo, en hombres se da con mayor frecuencia el cáncer pulmonar y en mujeres, el cáncer de mama. Respecto a la mortalidad, los más letales son el cáncer de pulmón, de estómago, de hígado, de mama y el colo-rectal. [Ferlay y cols., 2010]

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de cáncer se ha duplicado durante los últimos 30 años. En 2008, había más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticado y hubo 7 millones de muertes por esta enfermedad. Estas cifras se esperan aumentadas en un futuro, ya que para el 2030 podría haber unos 27 millones de nuevos casos de cáncer y sobre 17 millones de muertes. Por ello, se debe investigar sobre la identificación de factores de riesgo para conseguir una adecuada prevención de esta enfermedad. [Boyle P y Levin B, 2008]

2. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres, tanto en las regiones más desarrolladas como en las menos (con un ligero aumento en estas últimas). Respecto a la mortalidad, es la primera causa de muerte en los países menos desarrollados y la segunda en los países más desarrollados, tras el cáncer pulmonar. [GLOBOCAN, 2012]

Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), en 2012 se diagnosticaron más de 1.5 millones de nuevos casos, representando el 25% de todos los cánceres. [GLOBOCAN, 2012]

Desde un punto de vista clínico, se sabe que en el 25-30% de los pacientes con cáncer de mama hay una sobre-expresión de HER2 [Haffty BG, y cols., 1996; Valabrega G, y cols., 2007]. HER2 es un proto-oncogén ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 humano que codifica para una glicoproteína en los tejidos epiteliales, mesenquimales y origen neural. [Olayioye MA, 2001; Soomro S, y cols., 1991]

Tal sobre-expresión se asocia con un crecimiento agresivo del tumor, resistencia al tratamiento, desarrollo de metástasis, alto riesgo de recaída local y recurrencia; dando lugar a un mal pronóstico. [Haffty BG, y cols., 1996; Holbro T, y cols., 2003; Slamon DJ, y cols., 1987]

Además, HER2 está vinculado con las células madre tumorales (CSCs) del cáncer de mama (BCSCs) [Diehn M, y cols., 2009], y está siendo utilizado como un marcador predictivo para el diagnóstico de cáncer de mama metastásico, siendo un factor importante para el diseño de un plan de tratamiento [Haffty BG, y cols., 1996; Hicks DG, y cols., 2005], como por ejemplo la utilización del anticuerpo monoclonal anti-HER2 (suprime la actividad de HER2) [Uno M, y cols., 2001].

3. CÉLULAS MADRE TUMORALES (Cancer Stem Cells, CSCs)

La primera evidencia sobre el papel de las CSCs fue en 1994 con un estudio de la leucemia mieloide aguda en humanos. [Lapidot T, y cols., 1994] En 2003, se identificaron nuevas CSCs humanas en cáncer de mama [Al-Hajj M, y cols., 2003] y de cerebro [Singh SK, y cols., 2003]. Posteriormente, se han identificado CSCs en gran variedad de tumores como el cáncer de colon, páncreas, pulmón, próstata, melanoma y glioblastoma. [Al-Hajj M, y cols., 2003]

Las CSCs son una pequeña subpoblación de células dentro de los tumores, que se distinguen del resto de células por la asimetría de su división celular y por alteraciones en su expresión genética. [Rosen JM y Jordan CT, 2009]

Hasta la fecha ha sido muy difícil definir el origen de las CSCs y su proporción en un determinado tumor. [Kelly PN, y cols., 2007] Respecto al origen, hay distintas teorías [Mani SA, y cols., 2008]:

- Las CSCs surgen a partir de células madre normales o progenitoras, y son capaces de generar tumores cuando se enfrentan a una mutación genética especial o alteración ambiental.
- Las CSCs surgen de células somáticas normales, que adquieren características de células madre y un comportamiento maligno debido a alteraciones genéticas y/o heterotípicas.

Las CSCs presentan las siguientes propiedades: capacidad de auto-renovación, de diferenciación, mayor tumorigenicidad (capacidad de regenerar un tumor cuando se trasplanta en un animal huésped), supervivencia en el torrente sanguíneo, resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, formación de metástasis a distancia y quiescencia. [Celia-Terrassa T, y cols., 2012; Floor S, y cols., 2011; Korpál M, y cols., 2011; Lawson JC, y otros., 2009; Nigam A, 2013; Ogawa K, y cols., 2013; Tsuji T, y cols., 2008] Además, estas células expresan marcadores de superficie celular, lo que permite aislarlas de los diferentes

tumores al ser específicos del tejido e incluso del subtipo de tumor; dichos marcadores son: CD44, CD24, CD29, CD133, antígeno específico epitelial (ESA) y aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1). [Al-Hajj M, y cols., 2003; Ginestier C, y cols., 2007; Nigam A, 2013; Ogawa K, y cols., 2013; Singh SK, y cols., 2003; Yu Z y Pestell RG, 2011]

En la adquisición de las propiedades antes citadas están involucrados los miRNAs [Martinez NJ y Gregory RI, 2010; Yu Z, y cols., 2010^a; Yu Z, y cols., 2010^b], varias vías de señalización (Wnt/ β -catenina, Notch, Hedgehog) [DeSanto JT y Xu L, 2009; Nigam A, 2013; Ogawa K, y cols., 2013; Reva T y Clevers H, 2005] y los nichos de las células madre (son microambientes ubicados dentro de cada tejido) [Khaled WT, y cols., 2007; Ogawa K, y cols., 2013; Zhang Y, y cols., 2010]. Además, la actividad de las CSCs está asociada a las características de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), ya que la heterogeneidad intratumoral de dichas células se refleja por el grado de activación de EMT [Alkatout I, y cols., 2013; Mani SA, y cols., 2008].

Hay evidencia de que las CSCs presentan resistencias a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia [Li X, y cols., 2008; Meirelles K, y cols., 2012; Ogawa K, y cols., 2013]; sin embargo, existe cierta controversia en los estudios publicados, lo que implica una gran variabilidad de las CSCs en pacientes individuales [Zielske SP, y cols., 2011].

Debido a dichas resistencias, las CSCs juegan un papel importante en los procesos de recidiva tumoral y de metástasis [Li X, y cols., 2008; Meirelles K, y cols., 2012; Ogawa K, y cols., 2013]. La metástasis (proceso complejo por el cual las células de tumores sólidos primarios invaden tejidos adyacentes y distantes, produciendo el crecimiento de tumores secundarios) puede iniciarse a partir de la formación de nichos pre-metastásicos (formación de nichos, por CSCs, en los órganos diana) [Kaplan RN, y cols., 2005].

Debido a esto, cada vez es más probable que se necesiten terapias dirigidas específicamente a las CSCs para la erradicación completa del tumor [Ogawa K, y cols., 2013], ya que son las responsables de la morbilidad y mortalidad asociadas al mismo [Nigam A, 2013].

4. RADIACIÓN IONIZANTE (RI)

La radioterapia es ampliamente utilizada en el tratamiento de la mayoría de tumores, aprovechando que la energía asociada a la radiación ionizante es suficiente como para dañar el ADN de las células [Henry JH, 2012]. Al trabajar con radiación es muy importante conocer el concepto de dosis umbral, que para

un efecto dado, se puede definir como una dosis por debajo de la cual no se produce el efecto. Considerando este término, podemos distinguir dos tipos de efectos biológicos producidos por la radiación: efectos deterministas, que son los que se observan una vez superada la dosis umbral y en los que la gravedad depende de la dosis y efectos estocásticos (efectos hereditarios), que no necesitan una dosis umbral para manifestarse y en ellos la gravedad del efecto no se asocia a la dosis absorbida [Henry JH, 2012]

Se tiene evidencia de que cuando se irradia a altas dosis, sobrepasando el umbral, puede haber tal cantidad de muerte celular que se ponen de manifiesto una serie de reacciones tisulares detectables; las cuales pueden ser, dependiendo del tejido [Dörr W y Henry JH, 2001]:

- Agudas: aparecen días/semanas después de la radiación. Son el resultado de cambios en la permeabilidad celular y en la liberación de mediadores inflamatorios.
- Tardías: aparecen meses/años después de la radiación. Se clasifican en:
 - o Genéricas: son el resultado de una lesión directa en el tejido diana (ejemplo: oclusión vascular que originan necrosis tras irradiación del tejido).
 - o Consecuentes: son el resultado de reacciones tempranas graves.Estos dos subtipos, pueden coexistir al mismo tiempo.

Tanto las reacciones agudas como las tardías pueden presentar un tiempo de latencia hasta su aparición, el cual está relacionado con la tasa de renovación y la capacidad proliferativa de las células y con la organización estructural de los tejidos. Además, la aparición de dichas reacciones puede alterarse con el uso de modificadores de respuesta biológica [Henry JH, 2012].

La respuesta obtenida a la radiación y, por tanto, la muerte celular producida, está muy relacionada con la estructura de los tejidos y órganos. Por ello, hay órganos que toleran mejor la irradiación, hecho que se corresponde con aquellos que presentan subunidades funcionales (FSU) con capacidad de reserva funcional. Esto nos hace comprender la importancia de la dosis umbral en cuanto al daño funcional; ya que, por encima de dicho umbral, a medida que aumenta la dosis, también aumenta el riesgo de alteración funcional. [Henry JH, 2012]

Otro concepto importante es el fraccionamiento de la dosis: se puede irradiar con una dosis única o, bien, la dosis de radiación puede ser dividida en distintas fracciones. Sin embargo, con dicho fraccionamiento se aumenta la supervivencia celular, lo que conlleva a una reducción de la eficacia biológica de

la terapia debido a dos factores [Henry JH, 2012]:

- Reparación del daño subletal.
- Sustitución de las células con daños mortales por otras (fenómeno de repoblación que ocurre cuando la duración del tratamiento es larga). El reemplazo también puede ser por células no irradiadas procedentes de regiones no afectadas.

En la radioterapia, puede haber radio-adaptación con exposiciones crónicas a la radiación. La radio-adaptación es la modificación de la respuesta a la exposición, por un aumento de la radorresistencia; lo que permite utilizar dosis mayores sin obtener efectos perjudiciales. [Flidner TM, y cols., 2002]

En el desarrollo de la adaptación se han distinguido dos etapas [Henry JH, 2012]:

- Adaptación inicial (rápida pero incompleta): tiene lugar inmediatamente después de la exposición a la radiación e implica mecanismos fisiológicos preexistentes (ej. aumento en el nivel natural de antioxidantes).
- Adaptación persistente: se desarrolla gradualmente e implica mecanismos como la estimulación de la reparación del ADN, inducción de la síntesis de proteínas, activación de sistemas radio-protectores (ej. proteínas de estrés endógeno o antioxidante).

5. EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LAS CSCs

Los efectos que produce la radiación ionizante en las CSCs, son prácticamente los mismos que se observan en las células madre en general: senescencia, quiescencia, inestabilidad genómica y epigenómica, daño en el ADN y alteración en su reparación, modificación del metabolismo y del ciclo celular y muerte celular. Dichos efectos se ven afectados por una serie de factores, como la tasa de dosis y la dosis total de radiación administrada, el microambiente tisular y la transferencia lineal de energía de la radiación (LET) entre otros. [Sokolov MV y Neumann RD, 2012]

La radiación ionizante también puede producir un efecto conocido como “mecanismo bystander”: es el daño producido en las células no irradiadas como resultado de una comunicación intercelular entre las células irradiadas y las adyacentes. [Dickey JS, y cols., 2009; Mothersill C y Seymour C, 1997;

Nagasawa H y Little JB, 1992; Sokolov MV, y cols., 2007; Sokolov MV, y cols., 2005]

Las CSCs son capaces de superar los efectos causados por la radiación ionizante, debido al desarrollo de distintos mecanismos que les permiten recuperarse y les confieren, incluso, mayor agresividad. Dichos mecanismos son los responsables de que las CSCs adquieran resistencia a la radiación.

6. RESISTENCIA DE LAS CSCs A LA RADIACIÓN IONIZANTE

El grado de radio-sensibilidad en las células está relacionado con sus propiedades intrínsecas y extrínsecas, las cuales permiten distintos mecanismos que conllevan a una recuperación parcial de las células y, por tanto, les confiere radio-resistencia. En las propiedades intrínsecas se incluyen la reparación del ADN, la fase del ciclo celular en la que se lleva a cabo la irradiación y el estado de los puntos de control y las vías de supervivencia. Las propiedades extrínsecas incluyen las señales del entorno extracelular (nicho y microambiente). [Sun L, y cols., 2011]

Las CSCs, además, presentan una mayor expresión de genes radio-resistentes respecto a las células madre no tumorales. Este hecho no sólo favorece la supervivencia de las mismas, sino que interviene en el desarrollo del proceso de carcinogénesis, de metástasis y de recaída del paciente. [Sun L, y cols., 2011]

A continuación se detallan cada uno de los mecanismos relacionados con la radio-resistencia.

- REPARACIÓN DEL ADN

Es un mecanismo esencial para la supervivencia de las células, y puede tener lugar de distintas formas:

- Reparación de bases mal apareadas (“mismatch repair”) [Jiricny J, 2006; Kinsella TJ, 2009; Vaish M, 2007]
- Reparación por escisión de bases (BER) [Dalhus B, y cols., 2009; Sengupta S y Harris CC, 2005; Svilar D, y cols., 2011; Wilson III DM, y cols., 2011]: está involucrado en la corrección de pequeñas alteraciones del ADN, como bases oxidadas o daños producidos por agentes alquilantes. [Moynahan ME y Jasin M, 2010]

- Reparación por escisión de nucleótidos (NER) [Liu L, y cols., 2010; Sengupta S y Harris CC, 2005; Vermeulen W, 2011]: principalmente repara lesiones voluminosas, como dímeros de pirimidin-ciclobutano. [Moynahan ME y Jasin M, 2010]
- Reparación por recombinación homóloga (RH) [Holthausen JT, y cols., 2010; Kass EM y Jasin M, 2010]: es una de las vías para la reparación de roturas de doble cadena (RDCs) del ADN. [Moynahan ME y Jasin M, 2010; Ralhan R, y cols., 2007; Tichy ED y Stambrook PJ, 2008]
- Reparación por unión de extremos no homólogos (“NHEJ”) [Lieber MR, 2010; Mladenov E y Iliakis G, 2011]: es una de las vías para la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) del ADN. [Moynahan ME y Jasin M, 2010; Ralhan R, y cols., 2007; Tichy ED y Stambrook PJ, 2008]

En la reparación del ADN están involucradas una serie de proteínas, entre otras destacan la ataxia telangiectasia mutada (ATM), DNA-PKc, BRCA1/2, Chk2, p53 y otras de la familia RAD. [Mathews LA, y cols., 2011; Ralhan R, y cols., 2007]

- PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR

Este mecanismo está relacionado con paradas en diferentes momentos del ciclo, permitiendo de esta manera que la célula disponga de más tiempo y pueda llevar a cabo la reparación del ADN. Este retraso en la progresión del ciclo está regulado principalmente por los complejos constituidos por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas así como por los inhibidores de éstos [Ropolo M, y cols., 2009].

En la regulación del ciclo celular, además, intervienen las quinasas de los puntos de control (Chk1/2) así como ATM. Estas proteínas se activan por estrés genotóxico, para finalmente producir la detención del ciclo, la reparación del ADN y la activación de muerte celular en caso de no poder reparar el daño [Eyler CE y Rich JN, 2008].

De esta manera, la administración junto con la radioterapia de agentes inhibidores de los mecanismos de resistencia, podría mejorar la eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer [Eyler CE y Rich JN, 2008].

En este caso, junto a la radiación, serían útiles los inhibidores de las quinasas de los puntos de control (Chk1/2). Así, se puede evitar las paradas del ciclo celular e impedir la reparación del ADN. Esto impediría la recuperación de las células, provocándoles mayor sensibilidad ([Figura 1](#)) [Eyler CE y Rich JN, 2008; Sun L, y cols., 2011].

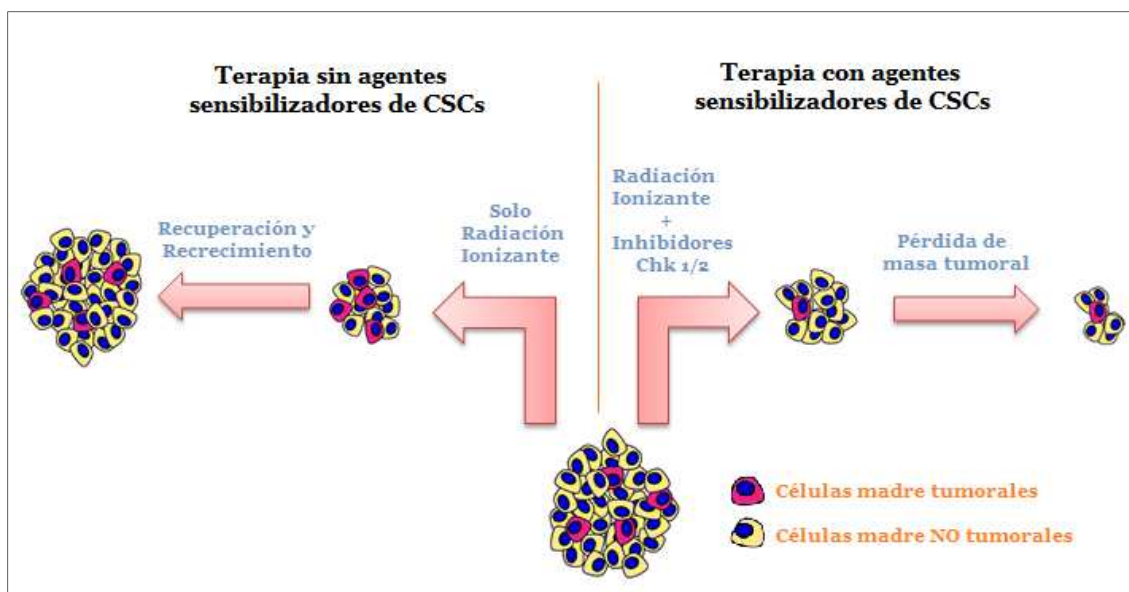


Figura 1: Comparación de la radioterapia con/sin inhibidores de Chk 1/2. Adaptada de Eyler y Rich, 2008. [Eyler CE y Rich JN, J Clin Oncol, 2008]

- VÍAS DE SUPERVIVENCIA

En las CSCs, tienen lugar tres vías de supervivencia para aumentar su radio-resistencia: vía de Hedgehog, vía de Notch y vía Wnt/ β -catenina.

• Vía de Hedgehog

Esta vía presenta un papel importante en la regulación de la proliferación de las CSCs, en su supervivencia y en su mantenimiento. [Berman DM, y cols., 2003; Evangelista M, y cols., 2006; Karhadkar SS, y cols., 2004; Lai K, y cols., 2003] Su activación, puede favorecer la repoblación de CSCs después de la radioterapia, lo que contribuye a la radio-resistencia y al fracaso del tratamiento [Sims-Mourtada J, y cols., 2006].

Hay estudios importantes de la vía de Hedgehog en CSCs de glioblastoma, dónde se ha demostrado que esta vía está implicada en la auto-renovación y la tumorigenicidad de las células; por lo que puede estar involucrada en las recaídas observadas tras la radioterapia [Clement V, y cols., 2007]. En este tipo de tumor, parece ser dependiente de un factor similar al factor de crecimiento de la insulina (IGF) [Hsieh A, y cols., 2011], el cual induce la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Esta activación promueve la supervivencia celular, mediante la supresión de los mecanismos de apoptosis y la activación de la transcripción de genes de supervivencia. Todo esto conduce a una proliferación celular incontrolada y a una alta capacidad tumorigénica. [Bonni A, y cols., 1999; Dhillon AS, y cols., 2007]

- **Vía de Notch**

Esta vía está asociada con la inhibición de la diferenciación de las CSCs y es crucial para su auto-renovación en los distintos nichos. [Hittelman WN, y cols., 2010; Weng AP y Aster JC, 2004] La activación de la vía, aumenta la repoblación acelerada de las CSCs y, por tanto, su resistencia a la radiación [Gupta R, y cols., 2009].

Parece ser que induce la expresión de la proteína Jagged-1 en la superficie de las CSCs después del fraccionamiento de la radiación, lo que aumenta los niveles de su receptor activado Notch-1. Esto provoca una alteración de la vía de Notch, que se relaciona con la radio-resistencia presente en las CSCs tras la radiación [Phillips TM, y cols., 2006].

Hay evidencias de la implicación de la vía de Notch en los tumores de glioblastoma. También se ha documentado su asociación con la activación de otras vías, como la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo que podría promover la capacidad de reparación del ADN, la cinética de regeneración y, en definitiva, la supervivencia de las CSCs. [Ischenko I, y cols., 2008; Rassi H, 2009]

- **Vía Wnt/ β -catenina**

Esta vía interviene en la auto-renovación de las CSCs, mediada por un aumento de los niveles de β -catenina activados tras irradiación. El resultado es una mayor proliferación en las CSCs y el control de su estabilidad en los nichos, dando lugar a un aumento de la radio-resistencia. Además, en este mecanismo se encuentra implicada la survivin, una proteína anti-apoptótica que regula positivamente a las células después de la irradiación [Eyler CE y Rich JN, 2008; Hurt EM, y cols., 2008; Takebe N y Ivy SP, 2010; Woodward WA, y cols., 2007].

La vía Wnt/ β -catenina está relacionada con la reparación del ADN y los puntos de control del ciclo celular (dos mecanismos descritos anteriormente). Esta vía de supervivencia permite la tolerancia de pequeños daños en el ADN de las CSCs, mientras las quinasas de los puntos de Chk1 y Chk2 detienen el ciclo hasta la reparación del daño letal presente en el ADN [Bao S, y cols., 2006].

- **NICHO Y MICROAMBIENTE TUMORAL – Hipoxia y angiogénesis**

El microambiente tumoral es particularmente importante para las CSCs, ya que sus interacciones con los elementos estromales constituyen el nicho de las células madre. Las células localizadas dentro de los nichos pueden regular dichas interacciones de diversas maneras, por contacto directo célula-célula o mediante la secreción de moléculas reguladoras. Esta última modalidad tiene

como función, promover la proliferación de las células madre o la inhibición de la diferenciación. [Barcellos-Hoff MH, y cols., 2005; Schofield R, 1978; Whetton AD y Graham GJ, 1999]

La supervivencia de las CSCs puede verse afectada por los nichos, ya que éstos se alteran tras la exposición a la radiación. [Barcellos-Hoff MH, y cols., 2005; Ghotra VP, y cols., 2009; Lomonaco SL, y cols., 2009; Woodward WA, y cols., 2007] Por ello, los propios nichos también producen citoquinas de supervivencia, como son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las cuales generan radio-resistencia y radio-protección en las CSCs. [Barcellos-Hoff MH, y cols., 2005]

Los estudios publicados en la literatura científica demuestran que la radio-resistencia de las CSCs viene además determinada por la concentración de oxígeno que hay en las células del tumor en el momento de la radiación. Este hecho es muy importante en lo que respecta a la radio-sensibilidad de las CSCs, ya que el estado de hipoxia en los nichos es fundamental para que las células se mantengan indiferenciadas [Blazek ER, y cols., 2007; Borovski T, y cols., 2011; Soeda A, y cols., 2009]. El oxígeno es un potente radio-sensibilizador, y puede aumentar la eficacia de la radiación mediante la formación de radicales libres que dañan el AD. [Harrison LB, y cols., 2002]. En estados de hipoxia, se encuentra aumentada la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) en las CSCs. El HIF-1 α es una proteína que puede proteger del daño oxidativo, contribuyendo a la resistencia frente a los mecanismos de muerte inducidos por la radiación [Bao S, y cols., 2006; Keith B y Simon MC, 2007; Rich JN, 2007].

Otro factor fundamental en los nichos es la angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes [Folkman J, 1971] y está meticulosamente regulada por un equilibrio entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Su desregulación en los tumores, produce malformación de los nuevos vasos sanguíneos; los cuales son funcional y estructuralmente anormales, y generan condiciones de hipoxia en el seno del tumor. Esta situación de hipoxia estimula la angiogénesis a través de HIF-1 α porque activa factores pro-angiogénicos, como el VEGF [Mazeron R, y cols., 2011]. El VEGF es secretado por las CSCs y, para ello, las propias CSCs dependen de factores secretados por la vasculatura de los nichos. Todo lo anterior pone de manifiesto la relación que existe entre la angiogénesis, las CSCs y la vasculatura tumoral que, finalmente, permite un aumento de la radio-resistencia [Calabrese C, y cols., 2007].

En este mecanismo de resistencia de las CSCs, al igual que en los puntos de control del ciclo celular, encontramos otra posible diana terapéutica. En este caso, si se administran agentes anti-angiogénicos junto a la radioterapia, se

evitaría la formación de nuevos vasos y se dificultaría el mantenimiento del nicho tumoral, provocando de este modo una mayor sensibilidad en las CSCs (Figura 2) [Eyler CE y Rich JN, 2008].

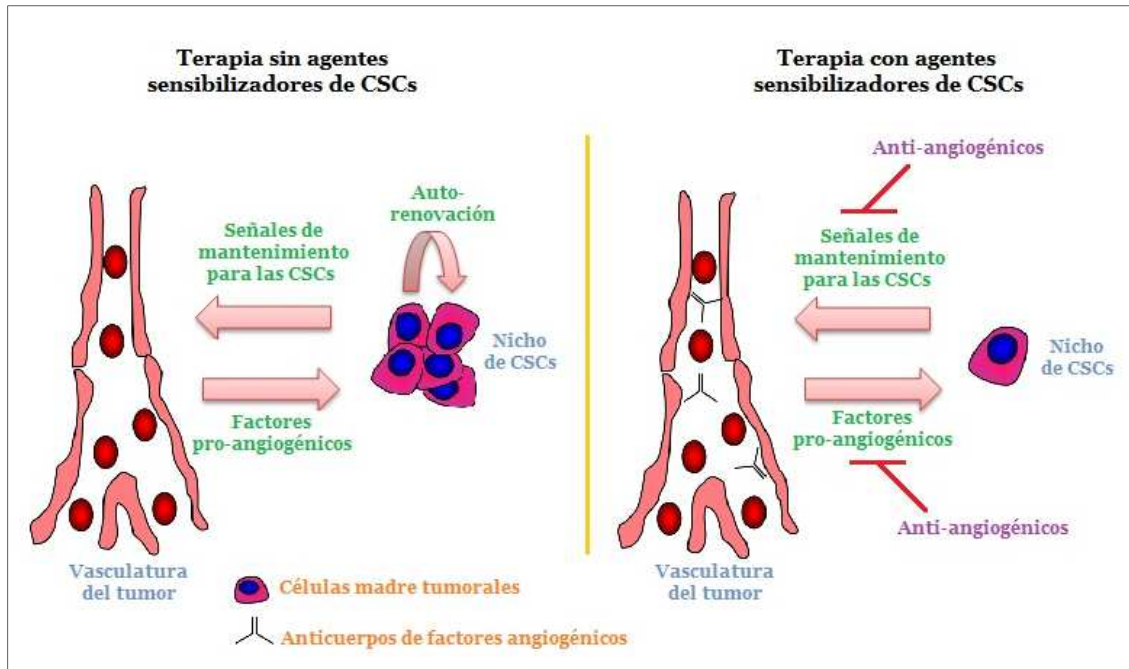


Figura 2: Comparación de la radioterapia con/sin inhibidores de la angiogénesis. Adaptada de Eyler y Rich, 2008.
[Eyler CE y Rich JN, J Clin Oncol, 2008]

7. METALOPROTEASAS (MMPs)

Las MMPs son una amplia familia de endopeptidasas (proteasas), dependientes de cinc y secretadas como zimógenos por las células tumorales y las células del microambiente. Son enzimas directamente vinculadas con los procesos de invasión tumoral y de metástasis a través de la rotura de la matriz extracelular (MEC); y también se han asociado con el crecimiento tumoral y la angiogénesis [Chabottaux V y Noel A, 2007].

En diversos estudios se ha visto que estos procesos se ven favorecidos tras la radiación, debido a un aumento de la actividad de MMP. Por ello, una terapia orientada a las MMPs puede mejorar la eficacia de la radioterapia y disminuir el riesgo de metástasis [Artacho-Cordón F, y cols., 2012].

Las MMPs se pueden dividir en distintas subfamilias, dependiendo de la especificidad de sustrato y de su localización celular (Tabla 1) [Artacho-Cordón F, y cols., 2012].

Tabla 1: Clasificación de MMPs, según especificidad de sustrato y localización celular. [Artacho-Cordón F, y cols., Surg Oncol, 2012]

SUBFAMILIAS	MIEMBROS	SUSTRATO
Colagenasas	MMP-1, MMP-8, MMP-13	Colágeno fibrilar de triple hélice
Gelatinasas	MMP-2, MMP-9	Gelatina
Matrilisinas	MMP-7, MMP-26	Familia de TNF; Componentes de MEC
Estromelisinas	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Componentes de MEC, excepto para el colágeno fibrilar de triple hélice
MMPs de tipo membrana	MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP), MMP-25 (MT6-MMP)	Zimógenos
Otras MMPs	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23A, MMP-23B, MMP-27, MMP-28	

Como se ha dicho anteriormente, los niveles aumentados de MMPs se relacionan con la progresión tumoral y, por ello, se precisa de los inhibidores tisulares endógenos de MMPs (TIMP) para una correcta regulación de su actividad. Por tanto, el equilibrio entre MMPs y TIMPs es esencial en la progresión del cáncer y en el desarrollo de metástasis. [Fan SQ, y cols., 2003]

La actividad de las MMPs también está regulada mediante mecanismos epigenéticos por las histonas desacetilasas (HDACs). Éstas últimas son enzimas que participan en el silenciamiento génico, mediante la eliminación de grupos acetilo de la cromatina, generando una estructura compacta inaccesible a las polimerasas. Sin embargo, la desacetilación de histonas producida por las HDACs se relaciona de forma negativa con los genes que inducen la apoptosis (favoreciendo la evasión de este tipo de muerte) y con los genes que regulan el ciclo celular (induciendo la no respuesta a señales anti-proliferativas). [Hoshino I y Matsubara H, 2010] Debido a esto, son necesarios los inhibidores de HDACs (HDACIs) para producir un aumento de la acetilación de histonas de dichos genes, y compensar la situación. [Young DA, y cols., 2005].

Es importante considerar que, a pesar de la meticulosa regulación a nivel fisiológico de la actividad de las MMPs, su actividad se encuentra mal regulada en ciertas enfermedades como es el caso del cáncer y por tanto estas proteínas se asocian al desarrollo y la progresión de esta enfermedad [Köhrmann A, y cols., 2009].

8. PAPEL DE LAS MMPs EN LA CARCINOGENÉISIS

Las MMPs están involucradas en distintos aspectos del proceso de carcinogénesis.

- INVASIÓN Y METÁSTASIS

Las MMPs involucradas son: MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP.

La invasión y la metástasis tienen lugar debido a la degradación de la MEC que rodea al tumor, llevada a cabo mediante dos tipos de MMPs [Johansson N, y cols., 2000]:

- Colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13): Degradan el colágeno en fragmentos pequeños, permitiendo la división de la triple hélice del colágeno en dos fragmentos, que se desnaturalizan espontáneamente en gelatina.
- Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9): Degradan la gelatina formada.

La MMP-1 es la única capaz de degradar todos los tipos de colágeno mamario, y tiene un papel muy importante en la degradación de fibras en otras enfermedades distintas al cánce. [Eck SM, y cols., 2009].

Las MMP-2 y MMP-9 mejoran la degradación de la membrana basal debido a su actividad, lo cual es esencial en la invasión tumoral. [Köhrmann A, y cols., 2009] Por ello, se consideran, cada vez más, como biomarcadores fiables del desarrollo de metástasis [Jezierska A y Motyl T, 2009; van't Veer LJ, y cols., 2002].

- TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL (TEM)

Las MMPs involucradas son: MMP-3 y MMP-28.

La TEM describe los cambios estructurales y funcionales que tienen lugar en las células epiteliales, cuando migran a través de la membrana basal y adoptan

las características de células mesenquimales [Nisticò P, y cols., 2012; Radisky ES y Radisky DC, 2010].

La MMP-3 interviene en la rotura de uniones intercelulares mediadas por E-cadherina, permitiendo que las células tumorales pierdan el contacto con las células vecinas [Chabottaux V y Noel A, 2007] y promoviendo su capacidad invasiva [Noë V, y cols., 2001]. Los niveles de esta MMP están controlados por la hipoxia [Steinbrech DS, y cols., 1999] y su presencia genera especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan daño oxidativo e inestabilidad genómica [Radisky DC, y cols., 2005].

- CRECIMIENTO DEL TUMOR

Las MMPs involucradas son: MMP-9 y MMP-13.

Las MMPs intervienen en el crecimiento del tumor porque generan un balance de señales proliferativas y anti-proliferativas en el microambiente tumoral [Yu Q y Stamenkovic I, 2000].

La MMP-9 activa proteolíticamente al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual permite inhibir la proliferación celular debido a su implicación en rutas de señalización supresoras de tumores [Kessenbrock K, y cols., 2010; Yu Q y Stamenkovic I, 2000].

La MMP-13 es secretada por los fibroblastos y miofibroblastos en el microambiente tumoral [Nielsen BS, y cols., 2001]. Esta MMP interviene en los primeros estadios del desarrollo del tumor porque regula la actividad y biodisponibilidad de factores de crecimiento inactivos en la MEC [Pendás AM, y cols., 2000]. Además, se ha relacionado con un fenotipo tumoral agresivo y, por tanto, de mal pronóstico en cáncer de mama [Chang HJ, y cols., 2009; Zhang B, y cols., 2008].

- EVASIÓN DE LA APOPTOSIS

Las MMPs involucradas son: MMP-7.

La apoptosis (un tipo de muerte celular programada) es capaz de activarse por dos vías distintas: una vía intrínseca o mitocondrial, mediada por el p53; y una vía extrínseca, mediada por receptores de muerte localizados en la superficie de la membrana, como el fas ligando (FasL). Ambas vías coinciden en la activación de caspasas, provocando la muerte celular [Artacho-Cordón F, y cols., 2012].

La MMP-7 activa proteolíticamente a TNF- α y FasL, que actúan como sustratos para promover la apoptosis [Haro H, y cols., 2000; Powell WC, y cols., 1999]. Pero una presencia crónica (niveles muy altos) de esta MMP induce

resistencia a apoptosis [Vargo-Gogola T, y cols., 2002] y, por tanto, provoca un efecto pro-tumoral [Fingleton B, y cols., 2001].

- FORMACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS

Las MMPs involucradas son: MMP-2, MMP-9 y MMP-12.

La formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, se puede llevar a cabo mediante angiogénesis (a partir de vasos pre-existentes) y vasculogénesis (a partir de angioblastos) [Artacho-Cordón F, y cols., 2012].

La angiogénesis es de gran importancia en el desarrollo del cáncer, ya que permite un suministro de nutrientes al tumor y proporciona una vía de difusión para la metástasis [Hanahan D y Folkman J, 1996] Además, ha sido relacionada con la matriz extracelular (MEC), componente que puede ejercer efectos anti-angiogénicos [Nelson AR, y cols., 2000].

La MMP-9 está relacionada tanto con la angiogénesis como con la vasculogénesis [Ahn GO y Brown JM, 2008]. Es capaz de estimular la angiogénesis porque controla la disponibilidad de VEGF, el cual es esencial para la neovascularización tumoral. [Sparmann A y Bar-Sagi D, 2004; Zong WX y Thompson CB, 2006] Tanto la MMP-9 como la MMP-2, en determinadas situaciones, también pueden producir ejercer un papel anti-angiogénico [Tabruyn SP y Griffioen AW, 2007]

- RESPUESTA A LA INFLAMACIÓN

La MMP involucrada es: MMP-7.

La inflamación es una respuesta fisiológica a citoquinas y quimioquinas. Las principales citoquinas/quimioquinas, moduladas por MMP son:

- Factor de necrosis tumoral (TNF- α): Es una citoquina moduladora de la respuesta inmune. Está presente en el microambiente del tumor, donde interviene en la producción de MMP-7; por ello, los niveles de ambos se encuentran relacionados. [Sun J, 2010]
- Quimioquina ligando 1 (CXCL1): Es una quimioquina con actividad quimiotáctica para los neutrófilos [Artacho-Cordón F, y cols., 2012]. La MMP-7 regula la función de CXCL1 de forma indirecta [Kessenbrock K, y cols., 2010].

- FORMACIÓN DE NICHOS PRE-METASTÁSICOS

La MMP involucrada es: MMP-2.

Las células metastásicas del cáncer, por ejemplo en el cáncer de mama, tienen preferencia por ciertos órganos para el desarrollo de tumores secundarios, como son el hueso o el pulmón. [Drabsch Y y ten Dijke P, 2011; Patel LR, y cols., 2011] Para ello, requieren de un ambiente receptivo llamado nicho pre-metastásico, el cual está regulado por las MMPs. Por tanto, la difusión de las células tumorales no es un proceso aleatorio [Kessenbrock K, y cols., 2010].

En la formación del nicho pre-metastásico interviene una proteína llamada lisil oxidasa (LOX), la cual es secretada por las células tumorales hipóxicas. Dicha proteína, LOX, se acumula en los nichos e induce la reticulación del colágeno IV en la membrana basal, al cual se adhieren ciertas células para permitir la producción de MMP-2 [Erler JT, y cols., 2009; Kessenbrock K, y cols., 2010].

La MMP-2 interviene en la degradación del colágeno mediante la liberación de péptidos que orientan a las células tumorales metastásicas y a las células derivadas de la médula ósea hacia los sitios preferentes en cada tipo de tumor [Erler JT, y cols., 2009; Kessenbrock K, y cols., 2010].

9. ALTERACIÓN DE LAS MMPs TRAS IRRADIACIÓN

La exposición a radiación ionizante produce, en el microambiente tumoral, una des-regulación de las MMPs, las cuales pueden afectar Al proceso de carcinogénesis debido al comportamiento agresivo que inducen en las células cancerosas. Tal comportamiento se puede traducir como un aumento en la capacidad metastásica y en los efectos sobre la progresión tumoral [Barcellos-Hoff MH, y cols., 2005; Madani I, y cols., 2008; Sofia Vala I, y cols., 2010; Tsujino K, y cols., 2011]. A ello, se le debe añadir que la radioterapia por sí sola, es capaz de aumentar la tasa de proliferación celular y de reducir el control local del tumor y la respuesta al tratamiento [Brown JM y Giaccia AJ, 1998; Kunigal S, y cols., 2008].

Debido a los efectos negativos de las MMPs activadas por radiación ionizante sobre la carcinogénesis, parecería necesario combinar los regímenes de radioterapia correspondientes con una terapia orientada a las MMPs [Artacho-Cordón F, y cols., 2012],

Las lesiones inducidas por la radiación ionizante se atribuyen, principalmente, a los radicales libres generados, y la actividad de las MMPs se encuentra estrechamente relacionada con los niveles de éstos en las células. Entonces, un desequilibrio entre los mecanismos de producción de radicales libres y de los sistemas antioxidantes de defensa, puede afectar a la carcinogénesis debido a una des-regulación de las moléculas que la controlan [Klaunig JE y Kamendulis LM, 2004; Shen KK, y cols., 2011; Valko M, y cols., 2006]. Entre dichas moléculas se encuentran las MMPs, cuya des-regulación se debe a la modificación en la deacetilación de histonas inducida por la irradiación [Artacho-Cordón F, y cols., 2012].

Otro factor que afecta al control de la carcinogénesis son los cambios epigenéticos, sobre todo, los relacionados con alteraciones en el microambiente del estroma mamario [Tsai KK, y cols., 2005].

Por último, otra consecuencia de la exposición a radiación no ionizante, es la sobre-expresión de integrina $\alpha_v\beta_3$ en las células tumorales del cáncer de mama, la cual está implicada en la transformación del carcinoma de mama en un fenotipo más agresivo debido a la activación de ciertas MMPs [Cao Q, y cols., 2006].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis que se plantea en este trabajo de investigación es que la respuesta al tratamiento con radiación en cáncer de mama está, en gran parte, determinada por la fracción de CSCs presentes en el tumor. Ello se debe a un menor número de lesiones inducidas por radiación, a la mayor tasa de reparación de las mismas, a niveles más bajos de especies reactivas de oxígeno, a la menor proporción de células que mueren por apoptosis y a una expresión aumentada de MMPs. Además, el empleo de radiación puede ser decisivo para la selección de este tipo de células, de manera que la fracción de CSCs aumentaría con la dosis de radiación administrada. De tal modo que en las CSCs no eliminadas tras la radiación, se modula la expresión de enzimas asociadas con el microambiente y relacionadas con la resistencia, la invasión y la metástasis.

2. OBJETIVOS A DESARROLLAR

Los objetivos que se plantean para dar respuesta a la anterior hipótesis de trabajo son:

1. Establecer la proporción de CSCs para diferentes dosis de radiación mediante la expresión combinada de CD44+/CD24^{low} y ALDH1+ en dos líneas celulares tumorales humanas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231.
2. Determinar, en caso de que exista, la expresión diferencial de enzimas del microambiente tumoral (MMPs, HDACs y sus correspondientes inhibidores) en la población CSCs positiva y CSCs negativa aisladas de MCF-7 y MDA-MB-231 tras la administración de diferentes dosis de radiación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas para la realización de este estudio han sido dos líneas epiteliales de adenocarcinoma humano de mama:

- MDA-MB-231 (referencia ATCC nº HTB-26): Se caracteriza molecularmente por ser triple negativa, es decir, ER⁻/PR⁻/HER2⁻. Además es p53^{-/-}.
- MCF-7 (referencia ATCC nº HTB-22): Se caracteriza molecularmente como ER⁺/PR⁺/HER2⁻. Esta línea es p53^{+/+}.

Ambas líneas celulares se han adquirido del banco de cultivos celulares, situado en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células se han mantenido en cultivo dentro de un incubador (SANYO CO₂ Incubator), a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ y del 5% de O₂ saturada de humedad (90%).

Para ello, se han utilizado frascos T25 de 25 cm² de superficie. El medio de cultivo empleado ha sido Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (BioWittaker), con 4,5 g/L de Glucosa y L-Glutamina (Lonza, OMB187), 2,5 mg/ml (Invitrogen, MPP-32-01) y suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Lonza, OSB005H2).

El medio de cultivo ha sido cambiado cada 2-3 días, para evitar la variación del pH y la acumulación de metabolitos dañinos para las células. Para ello, se ha retirado el medio de los frascos y se ha añadido medio nuevo. Cuando las células han alcanzado el 80-90% de confluencia, se ha llevado a cabo la tripsinización. En dicho proceso, se ha retirado el medio contenido en los frascos y se han lavado las células con Phosphate Buffered Saline (PBS). A continuación, se ha añadido 1 volumen de tripsina a pH 7,5 para separar las células de los frascos, y se ha incubado durante 3-5 minutos. Cuando las células se han despegado, se añaden 2 volúmenes de medio nuevo para inactivar la tripsina. Por último, se ha realizado la siembra en nuevos frascos T25, aproximadamente 1/3 de éste contenido con un 80% de medio de cultivo nuevo.

El medio de cultivo, la tripsina y el PBS utilizados se encuentran en condiciones de esterilidad y, antes de su uso, han sido atemperados en un baño de agua a 37°C.

Además, toda la manipulación de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar (TellstarBio-II-A/M), previamente lavada con Etanol al 70%.

Para el control del crecimiento continuo de los cultivos celulares, se ha utilizado un microscopio óptico de modelo Olympus 1x51 conectado a una fuente de alimentación Olympus TH4-200.

3. CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

La congelación de los cultivos se realiza para poder almacenarlos y usarlos con el tiempo. El primer paso realizado, ha sido la tripsinización (explicada anteriormente). Tras ella, las células en suspensión se han pasado a tubos Falcon de 15 ml para hacer un recuento de las mismas mediante la cámara de Neubauer. Una vez calculada la cantidad de células en suspensión, se ha realizado una centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 1800-2000 rpm, de la cual se ha descartado el sobrenadante y re-suspendido el “pellet” celular. Para la re-suspensión, el “pellet” se ha traspasado a criotubos de 1 ml con medio de congelación, dejando una concentración aproximada de 500.000-1.000.000 células/ml. Por último, los criotubos se han congelado inmediatamente, a una temperatura de -196°C.

El medio de congelación utilizado se ha preparado con medio de cultivo nuevo (DMEN-FBS) y un 6% de dimetilsulfóxido (DMSO).

La descongelación de los cultivos celulares tiene lugar de forma progresiva a temperatura ambiente, pero con los criotubos metidos en hielo. Cuando el contenido celular está a punto de ser descongelado por completo, se ha traspasado a frascos T25 con medio de cultivo nuevo y estéril (DMEN-FBS) previamente atemperado en un baño a 37°C.

Todo el procedimiento de congelación/descongelación, excepto la descongelación de los criotubos en el hielo, se ha llevado a cabo en condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar (TellstarBio-II-A/M), previamente lavada con Etanol al 70%.

4. SEPARACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE CSCs

La separación de esta subpoblación celular se ha realizado en base a la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) mediante el kit

ALDEFLUOR® (StemCell 01700), el cual permite detectar las células que expresan altos niveles de esta enzima para poder separarlas de las células con baja actividad de la misma.

El primer paso para el proceso es la tripsinización (explicada anteriormente). Cuando las células estaban en suspensión, se han pasado a Falcon de 15 ml para hacer un recuento celular (mediante la cámara de Neubauer) y para centrifugarlos a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1500 rpm. Tras la centrifugación, el sobrenadante se ha descartado y el “pellet” se ha resuspendido en Aldefluor Assay Buffer (debe estar a 4°C) a una concentración de 2.000.000 células/ml. A continuación, se han incubado a 37°C durante 30-40 minutos con un sustrato fluorescente llamado BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA), que difunde pasivamente al interior celular. Tras la incubación, se han vuelto a centrifugar los Falcon de 15 ml durante el mismo tiempo (5 minutos) a 4°C y 1500 rpm.

Dentro de la célula, la enzima ALDH1 actúa sobre el sustrato BAAA, transformándolo en BODIPY-aminoacetato (BAA), el cual está cargado negativamente. Este último sustrato se va acumulando en la célula, debido a un inhibidor de las bombas de flujo MDR presente en el Aldefluor Assay Buffer utilizado, el cual impide la salida de BAA porque sólo puede ser eliminado mediante transporte activo.

La cantidad de fluorescencia emitida por las células es proporcional a la actividad de la enzima ALDH1, lo que permite separar las células en dos poblaciones: células con alta actividad en la enzima (CSCs – población positiva) y células con baja actividad (no CSCs – población negativa). La separación se lleva a cabo mediante un citómetro de flujo analizador y separador (BECTON DICKINSON FACS ARIA II), equipado con el Software de análisis FACS Diva.

Para contrarrestar la fluorescencia inespecífica, se ha utilizado como control negativo un inhibidor específico de ALDH1 llamado dietilaminobenzaldehído (DEAB).

Para la realización de este trabajo fin de máster, además de las dos poblaciones separadas mediante citometría de flujo (positiva y negativa) se ha considerado la población general, la cual contiene tanto CSCs como no CSCs. Todas las poblaciones han sido cultivadas en “medio de esferas”, el cual permite mantener las características de las CSCs durante un plazo máximo de 15 días (es aconsejable realizar los experimentos antes de los 10 días). Dicha forma de cultivo es libre de suero y se realiza en frascos de baja adherencia para permitir un crecimiento en suspensión. El “medio de esferas” está compuesto por medio DMEN-F12 (Sigma) suplementado con antibióticos (estreptomicina-penicilina),

heparina, insulina, hidrocortisona, vitamina B27, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb).

Al final, se han obtenido 4 frascos T25 para cada población (general, positiva y negativa); con un total de 12 frascos, los cuales han sido utilizados para llevar a cabo la irradiación de todas las poblaciones a diferentes dosis que se detallan en el siguiente apartado de esta memoria.

5. IRRADIACIÓN CELULAR

La población general, positiva y negativa procedentes del separamiento de CSCs han sido irradiadas utilizando un equipo de Rayos X (Krautkramer-Foster, modelo Xylon Smart) para animales de experimentación y cultivos celulares. La irradiación se ha llevado a cabo 24 horas después de la siembra en “medio de esferas”, bajo condiciones constantes de intensidad (4.5 mA) y voltaje (200 Kv). Los tiempos de irradiación aparecen detallados en la [Tabla 2](#).

Tabla 2: Dosis y tiempos utilizados en la irradiación de las distintas poblaciones celulares.

POBLACIONES GENERAL/POSITIVA/NEGATIVA	
Dosis	Tiempo
0 Gy	-
2 Gy	3' 21"
4 Gy	6' 45"
6 Gy	10' 09"

6. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS MADRE TRAS IRRADIACIÓN

En este trabajo, los marcadores de superficie determinados han sido: ALDH1, CD24 y CD44. Para ello, se ha utilizado el kit ALDEFLUOR® (StemCell 01700), el cual nos permite detectar las células que expresan altos niveles de ALDH1. Sin embargo, los marcadores CD24 y CD44 han podido ser medidos porque se han añadido a las células de forma externa al kit.

Las células han sido sembradas en diferentes frascos y, trascurridas 24 horas, se han irradiado a diferentes dosis (0, 2, 4 y 6 Gy). Tras la irradiación, se han dejado crecer durante una semana, aproximadamente, para permitir a las células supervivientes la formación de colonias.

Trascurrida la semana, las células han sido tripsinizadas (mediante el protocolo anteriormente descrito) y centrifugadas a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1500 rpm. El “pellet” obtenido, se ha lavado con PBS y transferido a tubos FACS con una cantidad máxima de 1 millón de células. Seguidamente, se ha utilizado el kit ALDEFLUOR® (StemCell 01700) según el protocolo explicado anteriormente. Tras la incubación de 30-40 minutos a 37°C, se han añadido los marcadores de superficie: CD44 (marcado en Phycoerythrin –PE-) y CD24 (marcado en allophycocyanin -APC-), y se han vuelto a incubar durante otros 30-40 minutos a 4°C. Tras la incubación en frío, las células se han vuelto a centrifugar, esta vez a 4°C durante 5 minutos a 1500 rpm. El “pellet” obtenido se ha resuspendido en el buffer del kit (Aldefluor Assay Buffer) y mantenido a 4°C en oscuridad, hasta ser procesados mediante citometría de flujo.

7. MEDIDAS DE EXPRESIÓN GÉNICA TRAS IRRADIACIÓN

Las medidas de expresión génica mediante PCR a tiempo real se han efectuado en todos los casos 24 horas después de la irradiación celular. Trascurrido este tiempo, se ha traspasado el contenido de cada uno de los frascos T25 a Falcon de 15 ml correctamente etiquetados. A continuación, los Falcon se han centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 2000 rpm. Tras la centrifugación, se han puesto los Falcon en hielo, se les ha retirado el sobrenadante y se les ha añadido 350 µl de tampón de lisis (RLT) perteneciente al kit de extracción de ARN (Kit RNeasy®) (74106 QIAGEN). Por último, se ha resuspendido el contenido con tampón de lisis de cada uno de los Falcon y se ha traspasado a un Eppendorf de 1,5 ml correctamente etiquetados.

Las células contenidas en los Eppendorf, pueden ser utilizadas para continuar con la extracción de ARN, o pueden congelarse a -20°C para ser utilizadas más adelante.

7.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN se procede a partir de los Eppendorf de 1,5 ml, los cuales contienen el lisado de las distintas poblaciones celulares irradiadas a

diferentes dosis. La extracción de ARN se ha llevado a cabo según el protocolo descrito por el Kit RNeasy Mini Handbook (Qiagen).

Se ha añadido a los Eppendorf un volumen de etanol al 70% para re-suspender los lisados celulares, que posteriormente han sido traspasados a las columnas del kit. Tras centrifugación de éstas a 4°C durante 15 segundos a 10000 rpm y, se ha descartado el decantado. Se ha añadido tampón RW1 y se ha repetido la centrifugación descartando de nuevo el decantado. Se ha añadido tampón RPE y se vuelve a centrifugar; se repite este proceso de centrifugación durante 2 minutos. Tras retirar el último decantado, se ha centrifugado una vez más a la misma temperatura durante 1 minuto a máxima velocidad (13500 rpm). A continuación, se han quitado las columnas de los colectores y se han colocado en nuevos Eppendorf de 1,5 ml (correctamente etiquetados). Por último, se han lavado las columnas con agua libre de RNasa y se han centrifugado a 4°C durante 1 minuto a 10000 rpm, quedándonos con el ARN contenido en los Eppendorf.

Durante la manipulación de la extracción de ARN, tanto el material utilizado como el espacio de trabajo han sido previamente lavados con “RNase Zap”, libre de la enzima RNasa, que ayuda a conseguir una obtención óptima de ARN.

La cuantificación del ARN se ha llevado a cabo en un espectrofotómetro, modelo NanoPhotometer Pearl de Bionova científica, que además proporciona información de la pureza del ARN obtenido mediante el ratio A260/A280. El rango de absorbancia del equipo va desde 0,010 a 1,6 con una exactitud de ± 2 nm. Las unidades en las que se obtienen los diferentes valores de concentración dependen del volumen de muestra y del factor de dilución (FD) utilizados. En este trabajo, se ha utilizado un volumen de 10 μ l, un FD de 10 y las unidades de medida han sido μ g/ml.

7.2. SÍNTESIS DE ADNc MEDIANTE RETRO-TRANSCRIPCIÓN (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por BioRad en el Kit iScript™ cDNA Synthesis. El equipo de RT-PCR utilizado ha sido el modelo 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. El ADNc obtenido ha sido de las poblaciones positiva y negativa, a cada una de las dosis irradiadas.

Para el proceso de RT-PCR se necesita un volumen de reacción de 20 μ l, que contiene: 0,5 μ g de ARN (el volumen utilizado depende de la concentración del ARN), 20% de 5x iScript reaction mix (volumen constante de 4 μ l), 5% de iScript

RT (RTasa) (volumen constante de 1 µl) y H₂O bidestilada (volumen necesario hasta completar los 20 µl).

Dichas cantidades se han añadido en nuevos Eppendorf de 1,5 ml (correctamente etiquetados), a los cuales se les ha realizado la RT-PCR. El mecanismo llevado a cabo en el interior del equipo ha sido: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y, por último, y modificado del protocolo, 1 minuto a 15°C.

7.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE qPCR

La PCR se realiza con el fin de amplificar el ADNc, para poder determinar la expresión de los genes acordados. Para ello, se ha utilizado el equipo CFX384TM Real-Time PCR Systems (BioRad), siguiendo el protocolo descrito por BioRad CFX96TM y CFX384TM Real-Time PCR Systems en el Kit SsoFast EvaGreen Supermix.

En este trabajo, se ha comprobado la expresión de los siguientes genes: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-4. Los valores obtenidos para estos genes han sido normalizados con los niveles de expresión de dos genes controles: GAPDH y 18S. Todas las muestras se han medido por triplicado, siendo el resultado final expresado la media de los tres puntos.

Para cada PCR realizada se ha utilizado: 100-500 nM de “primers” A y B (distintos para cada gen), 10% de ADNc, 50% de SsoFast EvaGreen supermix y la cantidad necesaria de H₂O bidestilada (mili Q). Todo ello constituye un volumen final de reacción de 10 µl, siendo las cantidades utilizadas las siguientes: 0,1 µl de “primer” A, 0,1 µl de “primer” B, 5 µl de EvaGreen, 3,8 µl de H₂O mili Q y 1 µl de ADNc.

El mecanismo llevado a cabo en el interior del equipo ha sido: 1 ciclo a 95°C durante 30 segundos, 40 ciclos alternando dos estados: 5 segundos a 95°C y 5 segundos a la temperatura de “annealing” (específica para cada gen), 1 ciclo a 95°C durante 10 segundos, 1 ciclo a 75,5°C durante 5 segundos y, por último, 1 ciclo a 95°C durante 5 segundos.

La temperatura de “annealing” de cada gen viene dada por las casas comerciales donde se compran. Para los genes utilizados en este trabajo, las temperaturas son las siguientes: 52°C (GAPDH), 57,9°C (18S), 58°C (MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-13), 60°C (TIMP-1, TIMP-2, HDAC-2 y HDAC-4) y 62°C (MMP-9 y HDAC-1).

Para terminar, los datos obtenidos en las PCRs fueron procesados mediante el programa BioRad CFX Manager 2.0.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el “test t de Student”, siendo considerado un valor estadísticamente significativo cuando p es menor a 0.05. Los valores considerados significativos se han nombrado de forma distinta, en función del valor de p: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$).

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CSCs TRAS IRRADIACIÓN

Como se ha descrito en el apartado “Material y métodos”, se han medido la expresión de distintos marcadores de superficie (ALDH1, CD24 y CD44) de células madre. Dicha determinación se ha llevado a cabo, mediante citometría de flujo, en las células supervivientes tras ser irradiadas a diferentes dosis (0, 2, 4 y 6 Gy).

Los valores de expresión obtenidos para los marcadores ALDH1 y CD44 se muestran en las [Tablas 3 y 4](#) y se representan en las [Figuras 3 y 4](#), para la línea celular MCF-7 y la MDA-MB-231, respectivamente, en función de las distintas dosis de radiación recibida.

Tabla 3: Valores de expresión de los marcadores ALDH1 y CD44 en la línea celular MCF-7 tras distintas dosis de radiación ionizante.

MCF-7					
ALDH1	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
	Valor	1.000000	13.9861534	16.6637249	10.9528302
	SD	0	1,006863247	1,622945631	1,347505375
CD44	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
	Valor	1.000000	0.75177482	0.68309877	0.32282974
	SD	0	0,274599445	0,203545297	0,078557635

Tabla 4: Valores de expresión de los marcadores ALDH1 y CD44 en la línea celular MDA-MB-231 tras distintas dosis de radiación ionizante.

MDA-MB-231					
ALDH1	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
	Valor	1.000000	0,718581989	3,144825269	7,611223118
	SD	0	0,206477081	0,296053444	1,286383103
CD44	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
	Valor	1.000000	1,455108359	1,601503759	5,061256081
	SD	0	0,27145895	0,042532739	0,246126951

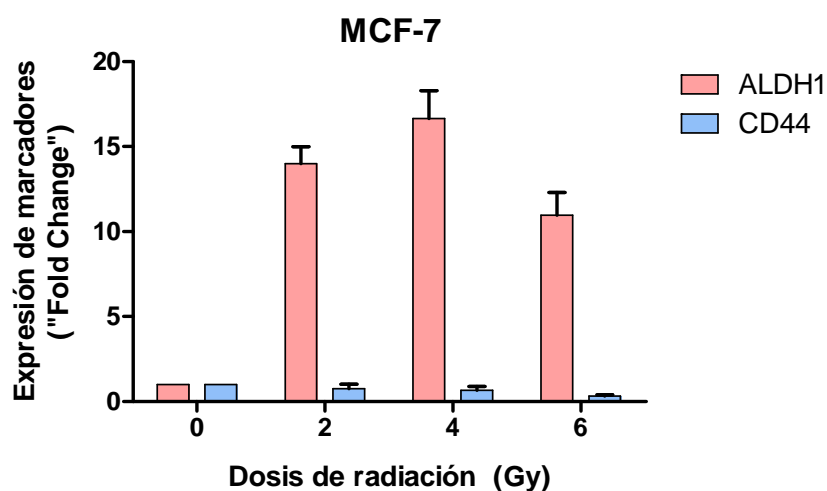


Figura 3: Representación de los valores de expresión de los marcadores ALDH1 y CD44 en la línea celular MCF-7 tras distintas dosis de radiación ionizante.

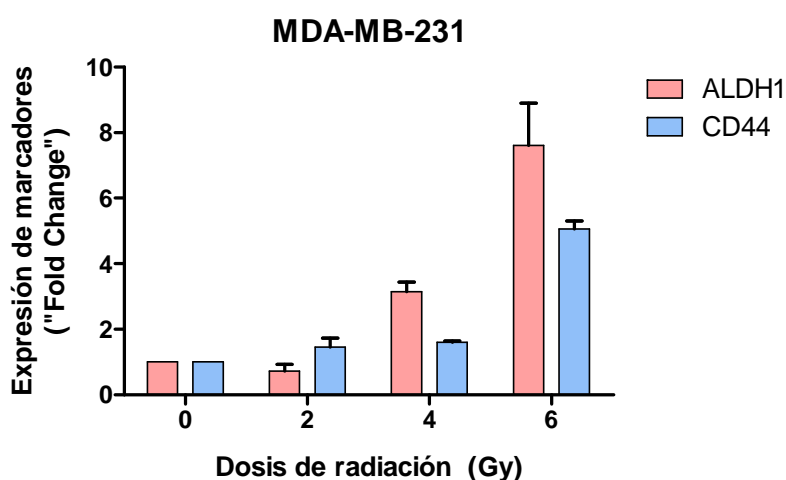


Figura 4: Representación de los valores de expresión de los marcadores ALDH1 y CD44 en la línea celular MDA-MB-231 tras distintas dosis de radiación ionizante.

2. EXPRESIÓN DE GENES TRAS IRRADIACIÓN

La determinación de la expresión génica se ha realizado mediante PCR a tiempo real (qPCR). Los genes medidos en ambas líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB-231) han sido: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2. La expresión de cada gen se refleja en las [Tablas 5](#) para MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente. Cada valor corresponde a la media \pm SEM de la expresión obtenida para cada dosis de radiación.

Además, dicha expresión se representa gráficamente mostrando la significación estadística: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$).

Tabla 5: Valores de expresión de los genes MMP-1, MMP-2, HDAC-4 y TIMP-1 en la línea celular MCF-7 tras distintas dosis de radiación ionizante.

MCF-7						
MMP-1	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.38409	1.51313	3.45734
		SEM	0.21779	0.06519	0.26946	0.18032
		Valor p	-	-	-	0.0010***
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.0000	0.6492	0.5406	0.5836
		SEM	0.10328	0.15708	0.08235	0.11609
		Valor p	-	-	0.0254*	-
MMP-2	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.22584	0.21540	0.76365
		SEM	0.17566	0.04383	0.03432	0.04372
		Valor p	-	0.0129*	0.0118*	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.02330	1.37910	1.56895
		SEM	0.10979	0.22744	0.15084	0.28937
		Valor p	-	-	-	-
HDAC-4	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.88476	1.37403	6.28161
		SEM	0.15787	0.22169	0.48998	1.73088
		Valor p	-	-	-	0.0384*
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.61145	1.07548	3.25175
		SEM	0.13281	0.11675	0.16641	0.88210
		Valor p	-	-	-	-

TIMP-1	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.41820	0.40706	1.47517
		SEM	0.16951	0.07349	0.06973	0.06301
		Valor p	-	0.0345*	0.0318*	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.61145	1.07871	1.01410
		SEM	0.09477	0.12315	0.23171	0.17147
		Valor p	-	-	-	-

Tabla 6: Valores de expresión de los genes MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-2, HDAC-4, TIMP-1 y TIMP-2 en la línea celular MDA-MB-231 tras distintas dosis de radiación ionizante.

MDA-MB-231						
MMP-1	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.000000	1.258610	1.787905	2.317200
		SEM	0.085380	0.215980	0.400965	0.585950
		Valor p	-	-	-	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	4.90113	4.14858	3.03066
		SEM	0.10251	0.31962	0.55247	0.34710
		Valor p	-	0.0003***	0.0050**	0.0050**
MMP-2	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.000000	0.384680	1.380135	2.375590
		SEM	0.043070	0.074390	0.268535	0.462680
		Valor p	-	0.0020**	-	0.0415*
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.92602	0.86199	0.87220
		SEM	0.11155	0.09984	0.04987	0.31555
		Valor p	-	-	-	-

MMP-3	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.84006	1.27152	1.70298
		SEM	0.135870	0.129960	0.137945	0.145930
		Valor p	-	-	-	0.0243*
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.37724	2.15097	1.87928
		SEM	0.10817	0.12169	0.10735	0.19601
		Valor p	-	-	0.0016**	0.0171*
MMP-9	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	5.18664	5.40405	5.62146
		SEM	0.16751	0.52904	0.58681	0.64458
		Valor p	-	0.0017**	0.0020**	0.0023**
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.25844	1.29017	1.91262
		SEM	0.09989	0.35270	0.24283	0.23245
		Valor p	-	-	-	0.0226*
MMP-13	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.000000	1.158350	1.590465	2.022580
		SEM	0.070220	0.071290	0.198905	0.326520
		Valor p	-	-	0.0488*	0.0376*
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.0000	2.3284	2.4621	2.4730
		SEM	0.09677	0.16276	0.27578	0.26393
		Valor p	-	0.0022**	0.0075**	0.0063**
HDAC-2	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.66311	0.93949	1.21587
		SEM	0.09873	0.11092	0.13550	0.16008
		Valor p	-	-	-	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.27669	0.86591	1.05066
		SEM	0.13633	0.11175	0.18249	0.21530
		Valor p	-	-	-	-

HDAC-4	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.000000	0.764840	1.356235	1.947630
		SEM	0.09726	0.06896	0.22843	0.38790
		Valor p	-	-	-	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.30006	1.45429	1.18241
		SEM	0.07055	0.09270	0.13696	0.15055
		Valor p	-	-	0.0420*	-
TIMP-1	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	0.81109	1.06951	1.32793
		SEM	0.050260	0.060020	0.083735	0.107450
		Valor p	-	-	-	-
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	1.69120	1.58930	1.66255
		SEM	0.10236	0.11856	0.12423	0.17447
		Valor p	-	0.0116*	0.0216*	0.0306*
TIMP-2	CSCs (+)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.000000	1.032570	1.339365	1.646160
		SEM	0.04503	0.09734	0.11986	0.14238
		Valor p	-	-	-	0.0124*
	CSCs (-)	Dosis	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
		Valor	1.00000	2.11578	2.14322	1.26153
		SEM	0.08350	0.34180	0.43345	0.19106
		Valor p	-	0.0338*	-	-

Al comparar las dos líneas celulares, distintos genes han sido expresados en cada una de ellas. En primer lugar se muestran los genes expresados en común (MMP-1, MMP-2, HDAC-4 y TIMP-1) y en segundo lugar, los genes expresados en la línea celular MDA-MB-231 que no lo han sido en MCF-7 (MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-2 y TIMP-2).

La MMP-1 ha tenido menor expresión en MCF-7 que en MDA-MB-231, estando más expresada en la población positiva de la primera línea celular y en la población negativa de la segunda (Figuras 5 y 6).

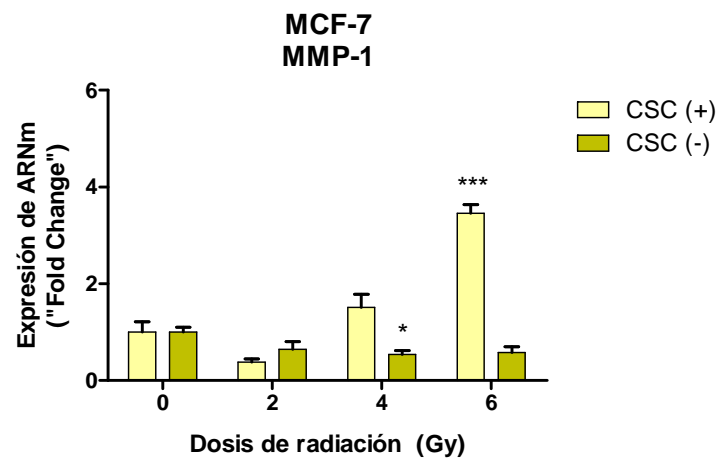


Figura 5: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-1 en la línea celular MCF-7 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

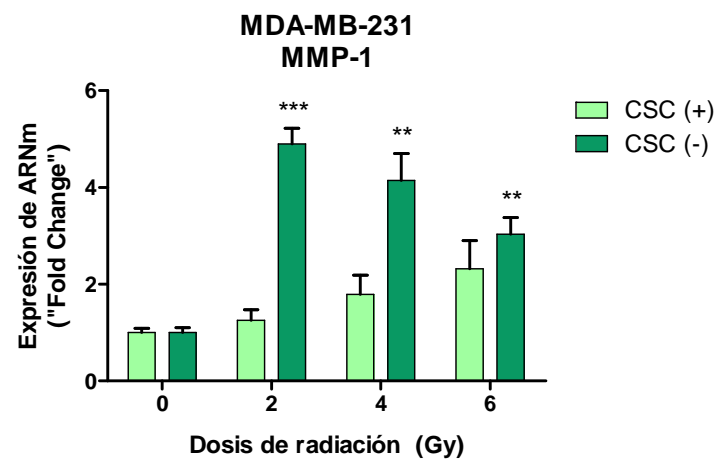


Figura 6: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-1 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

La expresión de MMP-2 también es menor en MCF-7, aunque en este caso en la población positiva de MDA-MB-231 está más expresada que en la población negativa de MCF-7 ([Figuras 7 y 8](#)).

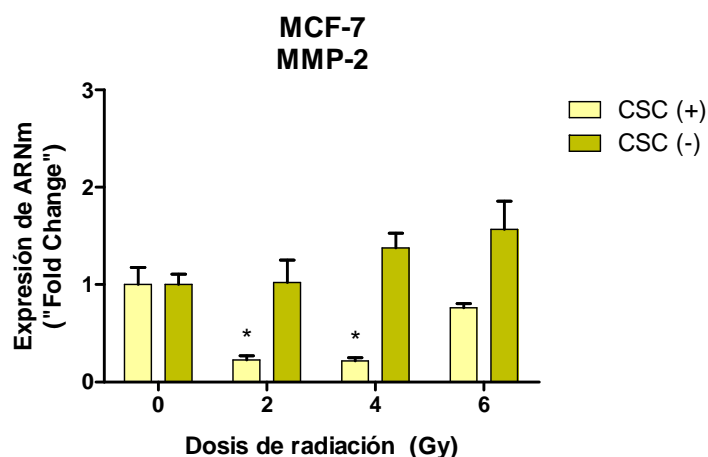


Figura 7: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-2 en la línea celular MCF-7 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

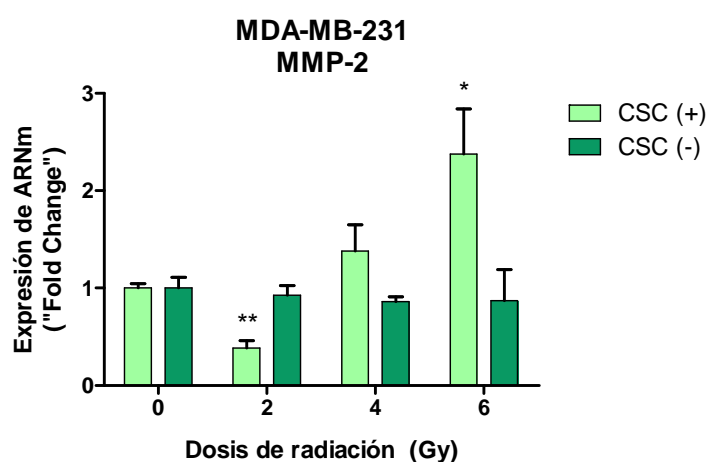


Figura 8: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-2 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

El HDAC-4 presenta una expresión similar en las dos líneas celulares para las distintas dosis de radiación (Figuras 9 y 10). Es importante destacar que para la dosis de 6 Gy, este gen está más expresado en ambas poblaciones de la línea celular MCF-7 (Figuras 9).

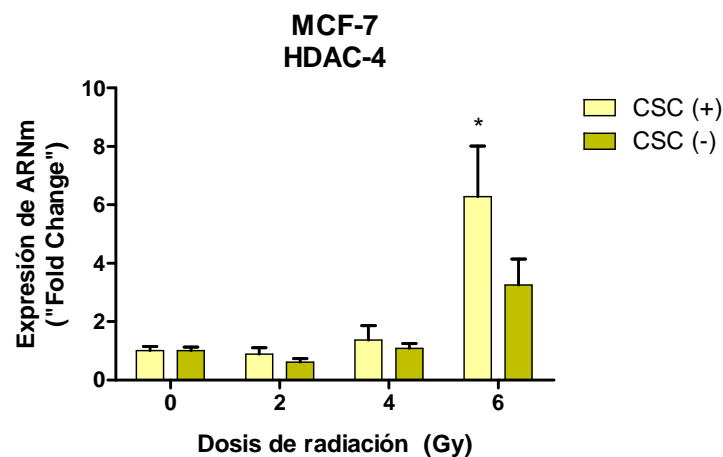


Figura 9: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del HDAC-4 en la línea celular MCF-7 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

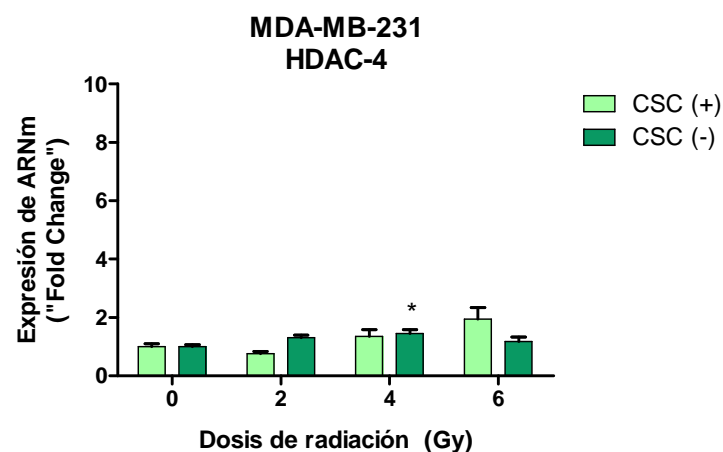


Figura 10: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del HDAC-4 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

El último gen expresado en ambas líneas celulares ha sido TIMP-1, cuya expresión es mayor en la población negativa de ambas líneas celulares excepto para la dosis 6 Gy de MCF-7 en el que hay mayor expresión para la población positiva (Figuras 11 y 12).

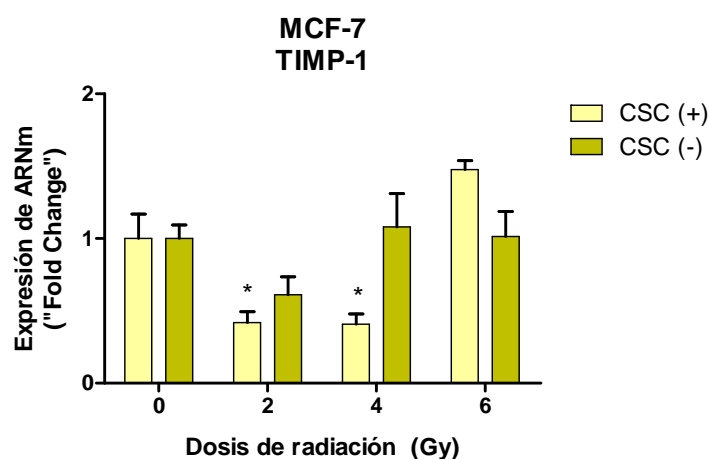


Figura 11: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del TIMP-1 en la línea celular MCF-7 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

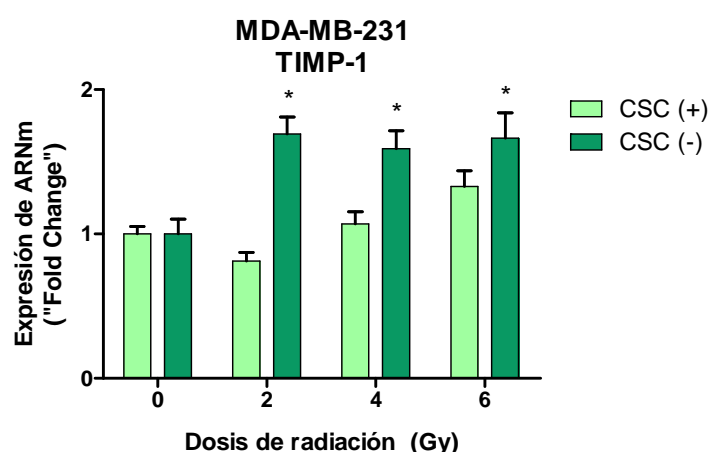


Figura 12: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del TIMP-1 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a los genes que solo se expresan en la línea celular MDA-MB-231: MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-2 y TIMP-2.

En la MMP-3 se puede observar un aumento de expresión tanto en la población positiva como en la negativa, aunque con un pequeño descenso en la dosis más alta de la negativa. Los valores encontrados han sido superiores en la población negativa para todas las dosis de radiación empleadas (Figura 13).

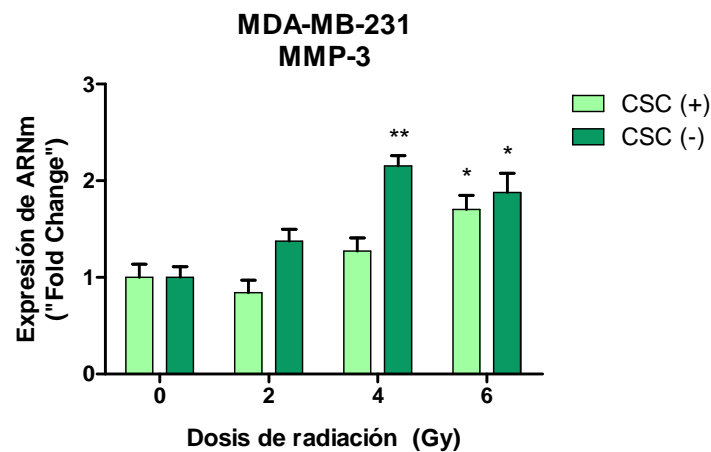


Figura 13: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-3 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

La expresión de MMP-9 ha sido muy diferente entre las poblaciones positiva y negativa, y con respecto al resto de los genes. Las dos poblaciones tienen la misma tendencia de aumentar de forma dosis dependiente. Además, los valores de expresión de este gen aumentan del orden de 5 veces con respecto al control tras la irradiación celular (Figura 14).

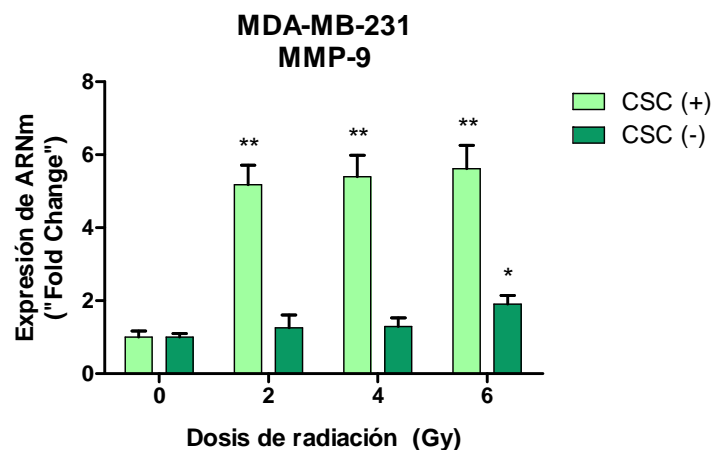


Figura 14: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-9 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

La MMP-13 aumenta su expresión con respecto las distintas dosis, aunque en este caso la población negativa presenta una expresión superior con respecto a la positiva (Figura 15).

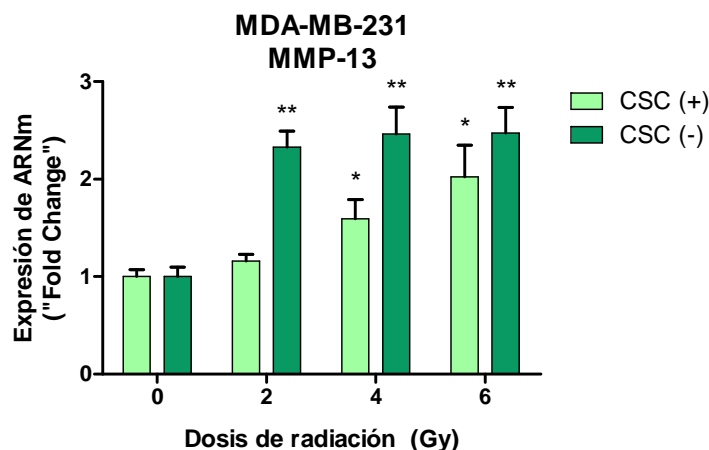


Figura 15: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm de la MMP-13 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

El HDAC-2 se expresa de forma similar en ambas poblaciones (positiva y negativa) para todas las dosis de radiación, excepto para la dosis de 2 Gy donde la expresión en la población negativa es casi el doble que en la positiva (Figura 16).

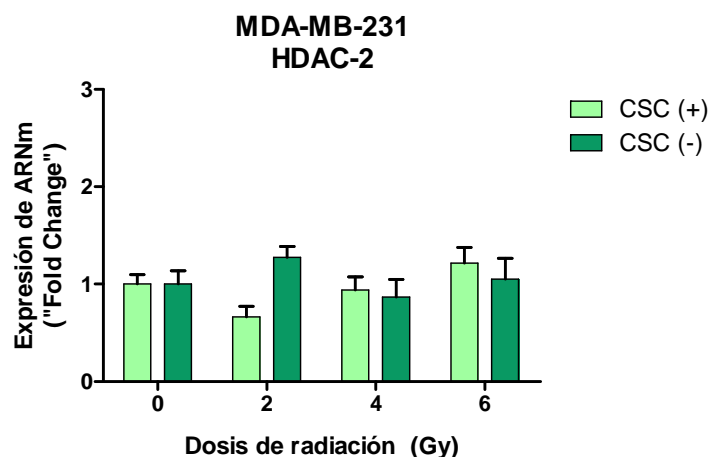


Figura 16: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del HDAC-2 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

Por último, con respecto a la expresión de TIMP-2 se observa un incremento en la población positiva para todas las dosis de radiación. En la población negativa este valor ha sido máximo para las dosis de 2 Gy y de 4 Gy (Figura 17).

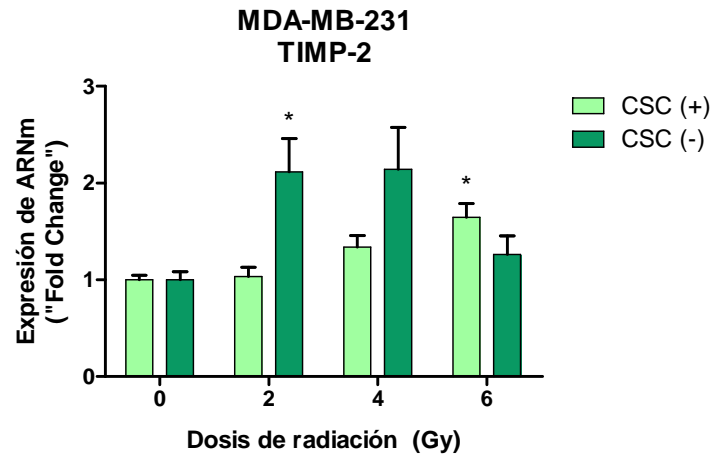


Figura 17: Representación de los valores medios normalizados de expresión de ARNm del TIMP-2 en la línea celular MDA-MB-231 (poblaciones positiva y negativa) tras distintas dosis de radiación ionizante.

DISCUSIÓN

El papel del microambiente en la regulación de la progresión tumoral ha sido ampliamente documentado, y constituye una fuente importante de factores pro-tumorales críticos que facilitan el crecimiento del tumor. Las células tumorales y las estromales secretan diferentes proteínas, metaloproteasas (MMPs), que están relacionadas en la degradación de todos los componentes de la matriz extracelular (MEC), contribuyendo a los procesos de adhesión, movilidad, comunicación e invasión celular y metástasis. [Mbeunkui F y Johann DJ Jr, 2009]

Como ya se ha descrito en el apartado “Introducción” de esta memoria, las MMPs forman parte de la familia de las endopeptidasas, que son activas a pH fisiológico y, a niveles bajos, regulan el remodelado de la matriz extracelular. Por tanto, modulan la respuesta del microambiente tumoral así como el proceso de transición de epitelio a mesénquima.

En condiciones fisiológicas, las MMPs se expresan en bajos niveles gracias a su regulación por inhibidores de MMPs endógenos del tejido (TIMPs), de manera que el equilibrio entre los niveles de MMPs y TIMPs es crítico para determinar el estado del microambiente tisular. [Mbeunkui F y Johann DJ Jr, 2009]

En condiciones patológicas, los niveles de MMPs aumentan rápidamente en comparación con los niveles de sus inhibidores dando lugar a activación de las MMPs y de los receptores de la superficie celular, desencadenando la puesta en marcha de las correspondientes cascadas de señalización. La expresión aumentada de MMPs se asocia con un mal pronóstico. [Artacho-Cordón F, y cols., 2012]

Zagouri y cols. ha documentado la utilización de MMP-2 y TIMP-2 en el diagnóstico precoz del cáncer de mama [Zagouri F, y cols., 2011]. Diferentes publicaciones muestran una relación entre niveles aumentados de alguna MMP y una disminución de la supervivencia en pacientes con tumores avanzados de mama, pulmón, páncreas, próstata, ovario y colo-rectal [Bendardaf R, y cols., 2010; Koç M, y cols., 2006; Lengyel E, y cols., 2001; Zucker S, y cols., 1999]. La regulación de las MMPs se lleva a cabo no solo a través de los TIMPs, sino también epigenéticamente mediante los HDACs. En este sentido, la utilización de inhibidores de histonas desacetilasas (HDACi) ha permitido poner de manifiesto la importancia de la acetilación de histonas en el remodelado de la matriz extracelular al modular el equilibrio entre las formas activas y latentes de las MMPs. [Estella C, y cols., 2012]

Considerando todo lo anteriormente descrito, la correcta activación tanto de MMPs como de sus inhibidores influye en un gran número de funciones como el remodelado y la renovación de los componentes de la matriz extracelular, el

crecimiento del tejido, la muerte celular programada, la angiogénesis, la invasión y el desarrollo de metástasis [Kessenbrock K, y cols., 2010].

Este trabajo se ha realizado para determinar si la radiación contribuye a la selección de las CSCs y si afecta a la expresión de diferentes enzimas que intervienen en la degradación de la MEC en una pequeña población de las células tumorales denominadas “Cancer Stem Cell” (CSCs), subpoblación muy importante a la hora de determinar la respuesta tumoral a la radiación, puesto que de no ser eliminadas tras este tratamiento, en gran parte, son las responsables de la recidiva tumoral. Por tanto, se ha analizado la expresión de distintas MMPs y de sus reguladores (TIMPs y HDACs) en las subpoblaciones de CSCs positiva y negativa de dos líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231).

En términos generales, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la línea celular MDA-MB-231 presenta mayor número de genes expresados que la línea MCF-7. Este hecho podría justificar el fenotipo más agresivo asociado a la línea MDA-MB-231 que, además, presenta mayor radio-resistencia.

Un estudio comparativo de las dos líneas, refleja que en ambas se expresan los genes MMP-1, MMP-2, HDAC-4 y TIMP-1. Esta expresión, de forma general, incrementa conforme aumenta la dosis de radiación, y se muestra distinta al comparar la población CSCs positiva y negativa. Considerando la expresión de la MMP-2, es importante destacar que la radiación aumenta la expresión de este gen en la población negativa de la línea MCF-7 y en la población positiva de MDA-MB-231.

La MMP-1, capaz de degradar cualquier tipo de fibra de colágeno de la glándula mamaria [Eck SM, y cols., 2009], presenta un aumento de expresión dosis dependiente bastante significativo en la población positiva de la línea MCF-7 respecto al control (3.45734 vs 1, $p=0.0010^{***}$).

Los genes que solo se han expresado en la línea celular MDA han sido MMP-3, MMP-9, MMP-13, HDAC-2 y TIMP-2. La radiación provoca un aumento de la expresión de las MMP-3 y MMP-13 en las dos poblaciones (positiva y negativa) y en la MMP-9 sólo en la población positiva. La mayor expresión de MMP-3 después del tratamiento con radiación, contribuiría al cambio de fenotipo epitelial a mesenquimal [Artacho-Cordón F, y cols., 2012], y, por tanto, potenciaría la capacidad invasiva de las células.

Además, la expresión aumentada de MMP-9 y MMP-13 tras irradiación favorece el crecimiento tumoral. En la MMP-13, también se ve aumentada su expresión tanto en la población positiva como en la negativa (5.62146 vs 1, $p=0.0023^{**}$; 1.91262 vs 1, $p=0.0226^{*}$, respectivamente). La MMP-13 se ha asociado a un

fenotipo tumoral más agresivo y a un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. [Powell WC, y cols., 1999; Zhang B, y cols., 2008]

La expresión de TIMP-2, se ve aumentada para las dosis de 2 Gy y 4 Gy en la población negativa. Por el contrario, la radiación no afecta los niveles de expresión de HDAC-2.

Para finalizar, nuestros resultados ponen de manifiesto una mayor expresión de MMP-2 y MMP-9 tras el empleo de radiación ionizante en la población positiva de la línea celular MDA-MB-231. Resultados similares han sido documentados por Kaliski y cols. en células de melanoma humano. [Kaliski A, y cols., 2005]

Recientemente, Milovanovic y cols. han descrito que pacientes de cáncer de mama con RE- muestran mayores niveles de MMP-9 determinados mediante ELISA en lisados tisulares de tumores primarios. Además, reflejan que la mayor expresión de MMP-2 se asocia a PR+. Estos autores han sugerido que la expresión de MMP-2 y MMP-9 está regulada por mecanismos diferentes que, a su vez, dependen de la distinta expresión de receptores hormonales en las células. [Milovanovic J, y cols., 2013]

La expresión aumentada de MMP-2 y MMP-9 tras el tratamiento con radiación estaría contribuyendo, por tanto, a que las células MDA-MB-231 modifiquen su capacidad de supervivencia celular, su estado de diferenciación y a que reflejen un fenotipo asociado al proceso de carcinogénesis. El hecho de que esta expresión aumente con la dosis de radiación en la población CSC+, podría justificar el desarrollo de tumores secundarios, dado que aquellas células que no han sido eliminadas con radiación degradarían la MEC con mayor facilidad. En este sentido, sería interesante utilizar, junto a la radioterapia, inhibidores de estas MMPs para evitar que, tras el empleo de radiación, las células desarrollaran un fenotipo más agresivo que favorezca la progresión tumoral. De esta manera, tanto MMP-2 como MMP-9 podrían ser consideradas como nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo de investigación, se establecen las siguientes conclusiones:

1. La expresión de marcadores de CSCs varía en función de la dosis de radiación y de la línea celular ensayada. La población de CSCs se enriquece para 4 Gy en MCF-7 y para 6 Gy en MDA-MB-231.
2. Tras irradiación, los genes expresados relacionados con la remodelación del microambiente tumoral, son mayores tanto en número como en nivel en la línea celular MDA-MB-231.
3. En MCF-7, la mayor expresión en la población CSCs(+) es para la MMP-1, la cual está asociada a los procesos de invasión y metástasis.
4. En MDA-MB-231, la mayoría de genes están más expresados en la población CSCs(-), excepto la MMP-2 y la MMP-9 donde la expresión es mayor en la población CSCs(+).
5. Puesto que la MMP-2 y la MMP-9 intervienen en la degradación de la MEC y, por tanto, están relacionadas con procesos asociados a la invasión y metástasis, la mayor expresión de estos genes en la población CSC(+) de la línea celular MDA-MB-231, permitiría poder utilizarlas como nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

ABREVIATURAS

ADNc – ADN complementario

ALDH1 – Aldehído deshidrogenasa 1

APC – Allophycocyanin = Aloficocianina (AF)

ATM – Ataxia telangiectasia mutada

BAA – Bodipy-Aminoacetato

BAAA – Bodipy-Aminoacetaldehído

BCSCs – Breast cancer stem cell = Células madre tumorales mamarias

BER – Reparación por escisión de bases

BRCA – Breast cancer

CD – Cluster of differentiation = Grupo de diferenciación

Chk – Checkpoint kinases = Kinasas de puntos de control

CIC – Centro de instrumentación científica

CSCs – Cancer stem cells = Células madre tumorales

DEAB – Dietilaminobenzaldehído

DMEN – Medio mínimo esencial modificado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSBs – Roturas de doble cadena (del ADN)

EGF – Factor de crecimiento epidérmico

EGFR – Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ER – Receptor de estrógenos

ESA – Antígeno específico epitelial

FasL – Fas ligando

FBS – Suero bovino fetal

FD – Factor de dilución

FGFb – Factor de crecimiento de fibroblastos básico

FSU – Subunidades funcionales

- HDACs** – Histonas deacetilasas
- HDACIs** – Inhibidores de HDACs
- HER2** – Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
- HIF-1 α** – Factor inducible por hipoxia
- HRR** – Reparación por recombinación homóloga
- IARC** – Agencia internacional de investigación del cáncer
- IGF** – Factor de crecimiento de la insulina
- LET** – Transferencia de energía lineal (de radiación)
- LOX** – Lisil oxidasa
- MAPK** – Proteína kinasa activada por mitógenos
- MEC** – Matriz extracelular
- miRNA** – MicroRNA
- MMPs** – Metaloproteasas
- NER** – Reparación por escisión de nucleótidos
- NHEJ** – Reparación por unión de extremos no homólogos
- OMS** – Organización mundial de la salud
- p53** – Proteína 53
- PBS** – Tampón fosfato salino
- PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa
- PE** – Phycoerythrin = Ficoeritrina (FE)
- PR** – Receptor de progesterona
- qPCR** – PCR a tiempo real
- RI** – Radiación ionizante
- ROS** – Especies reactivas de oxígeno
- rpm** – Revoluciones por minuto
- RT** – Retro-transcripción

TEM – Transición epitelio mesenquimal

TGF- β – Factor de crecimiento transformante β

TIMPs – Inhibidores tisulares endógenos de MMPs

TNF- α – Factor de necrosis tumoral α

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn GO, Brown JM (2008) Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer cell*; 13(3):193-205.
- Alkatout I, Order B, Klapper W, Weigel MT, Jonat W, Schaefer FK, Mundhenke C, Wenners A (2013) Surgical impact of new treatments in breast cancer. *Minerva ginecologica*; 65(4):363-83.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100(7):3983-8.
- Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Lara PC, Artacho-Cordón A, Calvente I, Núñez MI (2012) Matrix metalloproteinases: potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical oncology*; 21(3):e143-51.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*; 444(7120):756-60.
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG (2005) Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nature reviews. Cancer*; 5(11):867-75.
- Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S (2010) MMP-9 (gelatinase B) expression is associated with disease-free survival and disease-specific survival in colorectal cancer patients. *Cancer investigation*; 28(1):38-43.
- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*; 425(6960):846-51.
- Blazek ER, Foutch JL, Maki G (2007) Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *International journal of radiation oncology, biology, physics*; 67(1):1-5.

- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*; 286(5443):1358-62.
- Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP (2011) Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer research*; 71(3):634-9.
- Boyle P, and Levin B (2008) World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (Lyon, France).
- Brown JM, Giaccia AJ (1998) The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer research*; 58(7):1408-16.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell*; 11(1):69-82.
- Cao Q, Cai W, Li T, Yang Y, Chen K, Xing L, Chen X (2006) Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications*; 351(3):726-32.
- Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, de Paz AM, Rubio N, Arnal-Estapé A, Ell BJ, Bermudo R, Díaz A, Guerra-Rebollo M, Lozano JJ, Estarás C, Ulloa C, Álvarez-Simón D, Milà J, Vilella R, Paciucci R, Martínez-Balbás M, de Herreros AG, Gomis RR, Kang Y, Blanco J, Fernández PL, Thomson TM (2012) Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *The Journal of Clinical Investigation*; 122(5):1849-68.
- Chabottaux V, Noel A (2007) Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clinical & experimental metastasis*; 24(8):647-56.
- Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, Hou MF, Hsueh EJ, Lin SR (2009) MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncology reports*; 22(5):1119-27.
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet Nd, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current Biology*; 17(2):165-72.

- Dalhus B, Laerdahl JK, Backe PH, Bjoras M (2009) DNA base repair-recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiology Reviews*; 33(6):1044-78.
- DeSano JT, Xu L (2009) MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. *The AAPS Journal*; 11(4):682-92.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*; 26(22):3279-90.
- Dickey JS, Baird BJ, Redon CE, Sokolov MV, Sedelnikova OA, Bonner WM (2009) Intercellular communication of cellular stress monitored by γ -H2AX induction. *Carcinogenesis*; 30(10):1686-95.
- Diehn M, Cho RW, Clarke MF (2009) Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Seminars in radiation oncology*; 19(2):78–86.
- Dörr W, Hendry JH (2001) Consequential late effects in normal tissues. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*; 61(3):223-31.
- Drabsch Y, ten Dijke P (2011) TGF- β signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*; 16(2):97-108.
- Duru N, Candas D, Jiang G, Li JJ (2014) Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society. *Journal of cancer research and clinical oncology*; 140(1):1-14.
- Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, Burrage PS, Brinckerhoff CE (2009) Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and cancer. *Journal of autoimmunity*; 33(3-4):214-21.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ (2009) Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer cell*; 15(1):35-44.
- Estella C, Herrer I, Atkinson SP, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C (2012) Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion. *PloS one*; 7(1):e30508.

- Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ (2006) The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 12(20 Pt 1):5924-8.
- Eyler CE, Rich JN (2008) Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*; 26(17):2839-45.
- Fan SQ, Wei QY, Li MR, Zhang LQ, Liang QC (2003) Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma. *Ai zheng: Chinese journal of cancer*; 22(9):968-73.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM (2001) Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*; 3(6):459-68.
- Flidner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K (2002) Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*; 17(4):405-26.
- Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C (2011) Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene*; 30(46):4609-21.
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*; 285(21):1182-6.
- Ghotra VP, Puigvert JC, Danen EH (2009) The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy. *International journal of radiation biology*; 85(11):955-62.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*; 1(5):555-67.

- GLOBOCAN 2012. Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- Gupta R, Vyas P, Enver T (2009) Molecular targeting of cancer stem cells. *Cell stem cell*; 5(2):125-6.
- Haffty BG, Brown F, Carter D, Flynn S (1996) Evaluation of HER-2 neu oncoprotein expression as a prognostic indicator of local recurrence in conservatively treated breast cancer: a case-control study. *International journal of radiation oncology, biology, physics*; 35(4):751-7.
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*; 86(3):353-64.
- Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *The journal of clinical investigation*; 105(2):143-50.
- Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D (2002) Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The oncologist*; 7(6):492-508.
- Hendry JH (2012) Radiation biology and radiation protection. *Annals of the ICRP*; 41(3-4):64-71.
- Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, Swain E, Tarr S, Hartke M, Skacel M, Crowe JP, Budd GT, Tubbs RR (2005) The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Human pathology*; 36(4):348-56.
- Hittelman WN, Liao Y, Wang L, Milas L (2010) Are cancer stem cells radioresistant? *Future oncology (London, England)*; 6(10):1563-76.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE (2003) The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100(15):8933-8.
- Holthausen JT, Wyman C, Kanaar R (2010) Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA repair*; 9(12):1264-72.

- Hoshino I, Matsubara H (2010) Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surgery today*; 40(9):809-15.
- Hsieh A, Ellsworth R, Hsieh D (2011) Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells. *Journal of cellular physiology*; 226(4):1118-27.
- Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL (2008) CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *British journal of cancer*; 98(4):756-65.
- Ischenko I, Seeliger H, Schaffer M, Jauch KW, Bruns CJ (2008) Cancer stem cells: how can we target them? *Current medicinal chemistry*; 15(30):3171-84.
- Jezierska A, Motyl T (2009) Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*; 15(2):RA32-40.
- Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 7(5):335-46.
- Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*; 57(1):5-15.
- Kaliski A, Maggiorella L, Cengel KA, Mathe D, Rouffiac V, Opolon P, Lassau N, Bourhis J, Deutsch E (2005) Angiogenesis and tumor growth inhibition by a matrix metalloproteinase inhibitor targeting radiation-induced invasion. *Molecular cancer therapeutics*; 4(11):1717-28.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, McDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*; 438(7069):820-7.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*; 431(7009):707-12.
- Kass EM, Jasin M (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters*; 584(17):3703-8.

- Keith B, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*; 129(3):465-72.
- Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007) Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science (New York, N.Y.)*; 317(5836):337.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*; 141(1):52-67.
- Khaled WT, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg N, McKenzie AN, Watson CJ (2007) The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development (Cambridge, England)*; 134(15):2739-50.
- Kinsella TJ (2009) Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 15(6):1853-9.
- Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*; 44:239-67.
- Koç M, Ediger D, Budak F, Karadağ M, Oral HB, Uzaslan E, Ege E, Gözü RO (2006) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori*; 92(2):149-54.
- Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J (2009) Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC cancer*; 9:188.
- Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celià-Terrassa T, Mercatali L, Khan Z, Goodarzi H, Hua Y, Wei Y, Hu G, Garcia BA, Ragoussis J, Amadori D, Harris AL, Kang Y (2011) Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine*; 17(9):1101-8.
- Kunigal S, Lakka SS, Joseph P, Estes N, Rao JS (2008) Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 14(11):3617-26.

- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience*; 6(1):21-7.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*; 367(6464):645-8.
- Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL (2009) Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast cancer research and treatment*; 118(2):241-54.
- Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Späthe K, Härting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W (2001) Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology*; 82(2):291-8.
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC (2008) Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*; 100(9):672-9.
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*; 79:181-211.
- Liu L, Lee J, Zhou P (2010) Navigating the nucleotide excision repair threshold. *Journal of cellular physiology*; 224(3):585-9.
- Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T, Brodie C (2009) The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *International journal of cancer*; 125(3):717-22.
- Madani I, De Neve W, Mareel M (2008) Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis?. *Bulletin du cancer*; 95(3):292-300.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*; 133(4):704-15.

- Martinez NJ, Gregory RI (2010) MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell stem cell*; 7(1):31-5.
- Mathews LA, Cabarcas SM, Farrar WL (2011) DNA repair: the culprit for tumor-initiating cell survival? *Cancer metastasis reviews*; 30(2): 185-97.
- Mazeron R, Anderson B, Supiot S, Paris F, Deutsch E (2011) Current state of knowledge regarding the use of antiangiogenic agents with radiation therapy. *Cancer treatment reviews*; 37(6):476-86.
- Mbeunkui F, Johann DJ Jr (2009) Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology*; 63(4):571-82.
- McDermott SP, Wicha MS (2010) Targeting breast cancer stem cells. *Molecular oncology*; 4(5):404-19.
- Meirelles K, Benedict LA, Dombkowski D, Pepin D, Preffer FI, Teixeira J, Tanwar PS, Young RH, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Wei X (2012) Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 109(7):2358-63.
- Milovanovic J, Todorovic-Rakovic N, Abu Rabi Z (2013) The prognostic role of interleukin-8 (IL-8) and matrix metalloproteinases -2 and -9 in lymph node-negative untreated breast cancer patients. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*; 18(4):866-73.
- Mladenov E, Iliakis G (2011) Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation research*; 711(1-2):61-72.
- Mothersill C, Seymour C (1997) Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *International journal of radiation biology*; 71(4):421-7.
- Moynahan ME, Jasin M (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 11(3):196-207.
- Nagasawa H, Little JB (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer research*; 52(22):6394-6.

- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*; 18(5):1135-49.
- Nielsen BS, Rank F, López JM, Balbin M, Vizoso F, Lund LR, Dano K, López-Otín C (2001) Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer research*; 61(19):7091-100.
- Nigam A (2013) Breast Cancer Stem Cells, Pathways and Therapeutic Perspectives 2011. *The Indian journal of surgery*; 75(3):170-80.
- Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC (2012) Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor perspectives biology*; 4(2).
- Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *Journal of cell science*; 114(Pt 1):111-8.
- Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, Seo Y, Yoshida K, Yamazaki H (2013) Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anticancer research*; 33(3):747-54.
- Olayioye MA (2001) Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast cancer research: BCR*; 3(6):385-9.
- Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS (2011) Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future oncology (London, England)*; 7(11):1285-97.
- Pendás AM, Uría JA, Jiménez MG, Balbín M, Freije JP, López-Otín C (2000) An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry*; 291(2):137-55.
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F (2006) The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*; 98(24):1777-85.

- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current biology: CB*; 9(24):1441-7.
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, Leake D, Godden EL, Albertson DG, Nieto MA, Werb Z, Bissell MJ (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*; 436(7047):123-7.
- Radisky ES, Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*; 15(2):201-12.
- Ralhan R, Kaur J, Kreienberg R, Wiesmüller L (2007) Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer letters*; 248(1):1-17.
- Rassi H (2009) Stem cell therapy for hereditary breast cancer. *TSitologia I genetika*; 43(3):80-8.
- Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*; 434(7035):843-50.
- Rich JN (2007) Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer research*; 67(19):8980-4.
- Ropolo M, Daga A, Griffero F, Foresta M, Casartelli G, Zunino A, Poggi A, Cappelli E, Zona G, Spaziante R, Corte G, Frosina G (2009) Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Molecular cancer research: MCR*; 7(3):383-92.
- Rosen JM, Jordan CT (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science (New York, N.Y.)*; 324(5935):1670-3.
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*; 4(1-2):7-25.
- Sengupta S, Harris CC (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 6(1):44-55.
- Shen KK, Ji LL, Chen Y, Yu QM, Wang ZT (2011) Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *Bioscience trends*; 5(1):30-7.

- Sims-Mourtada J, Izzo JG, Apisarnthanarax S, Wu TT, Malhotra U, Luthra R, Liao Z, Komaki R, van der Kogel A, Ajani J, Chao KS (2006) Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 12(21):6565-72.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*; 63(18):5821-8.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*; 235(4785):177-82.
- Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM (2009) Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 alpha. *Oncogene*; 28(45):3949-59.
- Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, Carvalho LM, Rüegg C, Grillo IM, Barata JT, Mareel M, Santos SC (2010) Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS one*; 5(6):e11222.
- Sokolov MV, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2007) γ -H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*; 6(18):2210-2.
- Sokolov MV, Neumann RD (2012) Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges. *Stem cells international*; 2012:579104.
- Sokolov MV, Smilenov LB, Hall EJ, Panyutin IG, Bonner WM, Sedelnikova OA (2005) Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*; 24(49):7257-65.
- Soomro S, Shousha S, Taylor P, Shepard HM, Feldmann M (1991) c-erbB-2 expression in different histological types of invasive breast carcinoma. *Journal of clinical pathology*; 44(3):211-4.
- Sparmann A, Bar-Sagi D (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell*; 6(5):447-58.

- Steinbrech DS, Longaker MT, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin GS, Gerrets RP, Chau DC, Rowe NM, Gittes GK (1999) Fibroblast response to hypoxia: the relationship between angiogenesis and matrix regulation. *The journal of surgical research*; 84(2):127-33.
- Sun J (2010) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *Journal of signal transduction*; 2010:985132.
- Sun L, Cabarcas SM, Farrar WL (2011) Radioresistance and Cancer Stem Cells: Survival of the Fittest. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*; S1:004.
- Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW (2011) Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidants & redox signaling*; 14(12):2491-507.
- Tabruyn SP, Griffioen AW (2007) Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*; 355(1):1-5.
- Takebe N, Ivy SP (2010) Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 16(12):3106-12.
- Tichy ED, Stambrook PJ (2008) DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Experimental cell research*; 314(9):1929-36.
- Tsai KK, Chuang EY, Little JB, Yuan ZM (2005) Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer research*; 65(15):6734-44.
- Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF (2008) Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer research*; 68(24):10377-86.
- Tsujino K, Kashihara K, Kotani S, Hayakawa K, Imanaka K, Takada Y, Uno T, Hirata H, Kaneyasu Y, Sekiguchi K, Ogo E, Hiratsuka J, Yoden E, Soejima T (2011) A survey of patients with inflammatory skin recurrence corresponding to the area of previous irradiation after postoperative radiotherapy for breast cancer. *Journal of radiation research*; 52(6):797-803.
- Uno M, Otsuki T, Kurebayashi J, Sakaguchi H, Isozaki Y, Ueki A, Yata K, Fujii T, Hiratsuka J, Akisada T, Harada T, Imajo Y (2001) Anti-HER2-antibody

- enhances irradiation-induced growth inhibition in head and neck carcinoma. *International journal of cancer*; 94(4):474-9.
- Vaish M (2007) Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Molecular cancer*; 6:26.
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M (2007) Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*; 18(6):977-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*; 160(1):1-40.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*; 415(6871):530-6.
- Vargo-Gogola T, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM (2002) Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer research*; 62(19):5559-63.
- Vermeulen W (2011) Dynamics of mammalian NER proteins. *DNA repair*; 10(7):760-71.
- Weng AP, Aster JC (2004) Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Current opinion in genetics & development*; 14(1):48-54.
- Whetton AD, Graham GJ (1999) Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends in cell biology*; 9(6):233-8.
- Wilson DM 3rd, Kim D, Berquist BR, Sigurdson AJ (2011) Variation in base excision repair capacity. *Mutation research*; 711(1-2):100-12.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM (2007) Wnt/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104(2):618-23.
- Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian L, Edwards DR, Cawston TE, Clark IM (2005) Histone deacetylase inhibitors modulate

metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis research & therapy*; 7(3):R503-12.

- Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*; 14(2):163-76.
- Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG (2010a) microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *The American journal of pathology*; 176(3):1058-64.
- Yu Z, Pestell RG (2011) microRNAs and Cancer Stem Cells. In: *MicroRNAs in Cancer Translational Research*. Cho WCS, editor. Springer; P373-88.
- Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG (2012) Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*; 44(12):2144-51.
- Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, McCue PA, Quong AA, Lisanti MP, Pestell RG (2010b) microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 107(18):8231-6.
- Zagouri F, Sergeantanis TN, Kalogera E, Provatopoulou X, Chrysikos D, Zografos E, Bletsas G, Flessas I, Papadimitriou CA, Zografos GC, Gounaris A (2011) Serum MMPs and TIMPs: may be predictors of breast carcinogenesis? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*; 18;412(7-8):537-40.
- Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, Li H, Ning L, Fu L, Niu Y, Niu R, Sun B, Hao X (2008) Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC cancer*; 8:83.
- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY (2010) Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell*; 39(1):133-44.
- Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, Lawrence TS (2011) Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Translational oncology*; 4(4):227-33.
- Zong WX, Thompson CB (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*; 20(1):1-15.

Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S (1999) Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. Annals of the New York Academy of Sciences; 878:212-27.