

**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA**

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**ESTRÉS NITROSATIVO Y ALTERACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS DE S-NITROSOTIOLES EN
CÁNCER DE MAMA:
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Amanda Cañas Rodríguez

Córdoba, 2015

TITULO: *ESTRÉS NITROSATIVO Y ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE S-NITROSOTIOLES EN CÁNCER DE MAMA: IMPLICACIONES TERAPEUTICAS*

AUTOR: *Amanda Cañas Rodríguez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**ESTRÉS NITROSATIVO Y ALTERACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS DE S-NITROSOTIOLES EN
CÁNCER DE MAMA:
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Memoria presentada por
Amanda Cañas Rodríguez
Licenciada en Biología, para optar al grado de
Doctora en Biología

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de los Dres. Antonio Rodríguez
Ariza y Juan R. de la Haba Rodríguez en el Instituto Maimónides de
Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).
Programa de Doctorado de Biomedicina.

La doctoranda,



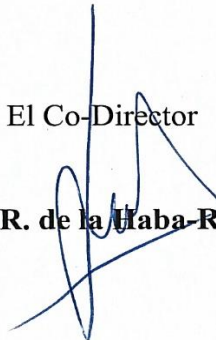
Amanda Cañas Rodríguez

El Director



Dr Antonio Rodríguez Ariza

El Co-Director



Dr. Juan R. de la Haba Rodríguez



TÍTULO DE LA TESIS: ESTRÉS NITROSATIVO Y ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE S-NITROSOTIOLES EN CÁNCER DE MAMA: IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

DOCTORANDO/A: AMANDA CAÑAS RODRÍGUEZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. Amanda Cañas Rodríguez presenta un trabajo original en el que se aborda el estudio de la implicación de la homeostasis de nitrosotioles y el estrés nitrosativo en el cáncer de mama. El desarrollo de dicho estudio ha permitido avanzar en el conocimiento del importante papel que juega el óxido nítrico en la biología del cáncer de mama. Los resultados obtenidos proporcionan información sobre mecanismos moleculares que contribuyen a la progresión del tumor y podrían facilitar el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para contrarrestar la eventual resistencia a terapias dirigidas en este tipo de tumor.

Los resultados obtenidos han sido publicados en Breast Cancer Research, una revista de reconocido prestigio internacional en el campo de la investigación del cáncer de mama.

La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de diversos proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/00428 y PI13-00553) y la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0230-2009).

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

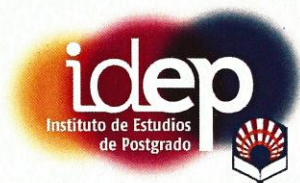
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral

Córdoba, 13 de Abril de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dr. Antonio Rodríguez Ariza

Fdo.: Dr. Juan R. de la Haba Rodríguez



TÍTULO DE LA TESIS: ESTRÉS NITROSATIVO Y ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE S-NITROSOTIOLES EN CÁNCER DE MAMA: IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

DOCTORANDO/A: AMANDA CAÑAS RODRÍGUEZ

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Por la presente ratifico el informe favorable presentado por los Dres. Antonio Rodríguez Ariza y Juan R. de la Haba Rodríguez, respecto a la presentación del trabajo de Tesis Doctoral de D^a Amanda Cañas Rodríguez. El citado trabajo aborda un tema de gran interés en biomedicina, como es la implicación de la homeostasis de nitrosotioles y el estrés nitrosativo en el cáncer de mama. La introducción recoge de manera adecuada todos los antecedentes a partir de los cuales se llega al planteamiento de los objetivos previstos. La bibliografía utilizada es amplia y actualizada. El diseño experimental y la metodología seguida son apropiados para la consecución de los objetivos propuestos, y los resultados obtenidos son de calidad y se han discutido de manera apropiada con respecto al conocimiento actual del tema, lo cual se refleja en su publicación en una revista de reconocido prestigio.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 13 de Abril de 2015

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Dr. Enrique Aranda Aguilar

ABREVIATURAS

- ADAM:** A Disintegrin and metalloproteinase (desintegrina A/metaloproteínasa).
- ADCC:** Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos).
- ADH5:** Alcohol deshidrogenasa 5.
- AIs:** Aromatase Inhibitors (inhibidores de aromatasas).
- AP-1:** Activator Protein 1 (proteína activadora 1).
- Apaf-1:** Apoptotic protease activating factor 1 (Factor 1 activador de las proteasas apoptogénicas).
- Bad:** Bcl-2 associated death promoter (promotor de muerte asociado con Bcl-2).
- BAG:** Biopsia con aguja gruesa.
- Bax:** Bcl-2 associated X protein (proteína X asociada con Bcl-2).
- Bcl-2:** B-cell lymphoma 2 (linfoma 2 de células B).
- bFGF:** Basic fibroblast growth factor (factor de crecimiento fibroblástico básico).
- Bid:** BH3 interacting-domain death agonist (agonista del dominio de muerte celular que interactúa con BH3).
- BRCA 1/2:** Breast cancer type 1/2 susceptibility protein (proteína de susceptibilidad al carcinoma de mama tipo 1/2).
- BSA:** Bovine serum albumin (albúmina sérica bovina).
- c-Abl:** Abl proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (protooncogén 1 Abl, receptor no tirosina quinasa).
- CD24:** Cluster of differentiation 24 (cluster de diferenciación 24).
- CD44:** Cluster of differentiation 44 (cluster de diferenciación 44).
- CDK:** Cyclin-dependent kinase (quinasa dependiente de ciclina).
- CDKN1B (p27^{kip1}):** Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Inhibidor 1B de la quinasa dependiente de ciclina).
- CKs:** Citoqueratinas.
- C-MET/MET/HGFR:** Hepatocyte growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento de los hepatocitos).
- CNA:** Calcineurin alpha subunit (subunidad α de la calcineurina).
- CSCs:** Cancer stem cells (células madre tumorales).
- CSNO:** Cysteine-SNO (S-nitroso-L-cisteína).
- CUGBP1:** CUG triplet repeat, RNA binding protein 1 (secuencia triplete CUG, proteína 1 de unión a ARN).
- CXCR4:** C-X-C (motif) chemokine receptor type 4 (receptor tipo 4 para la quimiocina con motivo C-X-C).

Cy3: Cyanine 3 (Cianina 3).

DAB: 3,3-Diaminobencidina.

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

DCIS: Ductal carcinoma *in situ* (carcinoma ductal *in situ*).

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio DMEM).

DMF: N-N-dimetilformamida.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DTT: Ditiotreititol.

E2: 17 β -estradiol.

ECACC: European collection of cell cultures (colección europea de cultivos celulares).

ECD: Extracellular domain (dominio extracelular).

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiamino tetraacético).

EGFR (ErbB1): Epidermal growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento epidérmico).

EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid (ácido etilén-glicol tetraacético).

eNOS (NOS3): Endothelial NOS (óxido nítrico sintasa endotelial).

EphA: Ephrin type-A receptor (receptor tipo A para la epinefrina).

ER: Estrogen receptor (receptor de estrógenos).

ERE: Estrogen response element (elemento de respuesta a estrógenos).

ERK: Extracellular signal-regulated kinase (quinasa regulada por señales extracelulares).

FGFR: Fibroblast growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento fibroblástico).

FITC: Fluorescein isothiocyanate (isotiocinato de fluoresceína).

5-FU: 5-Fluorouracilo.

GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

GCs: guanilato ciclasa soluble.

GMPc: guanosín monofosfato cíclico.

GPR30: G protein-coupled receptor 30 (receptor 30 acoplado a proteínas G).

GSH: Glutación reducido.

GSNO: S-nitrosoglutación.

GSNOR: S-nitrosoglutación reductasa.

GSSG: Glutación oxidado.

HE: Hematoxilina y eoxina (contra-tinción).

HEN: Solución con Hepes, EDTA y neocuproína.

HENS: Solución con Hepes, EDTA, neocuproína y SDS.

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-hidroxietyl)-1-ácido piperizina-etano-sulfónico).

HER: Human epidermal growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento humano epidérmico).

HER-2 (HER-2/neu, c-erbB2): Human epidermal growth factor receptor 2 (receptor 2 para el factor de crecimiento epidérmico humano).

HPDP-Biotina: N-[6-(biotinamido)hexil]-3'-(2'piridiltio) propionamida.

HRP: Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano).

HSF1: Heat shock factor 1 (factor de choque térmico 1).

Hsp: Heat shock protein (proteína de choque térmico).

IDC: Invasive ductal carcinoma (carcinoma ductal infiltrante).

IGF-1: Insulin like growth factor 1 (factor de crecimiento similar a la insulina).

IGF-1R: Insulin-like growth factor receptor 1 (receptor 1 para el factor de crecimiento similar a la insulina).

IgG: Immunoglobulina G.

IHC: Inmunohistoquímica.

ILC: Invasive lobular carcinoma (carcinoma lobulillar infiltrante).

iNOS (NOS2): Inducible NOS (óxido nítrico sintasa inducible).

IP: Ioduro de propidio.

JNKs: c-Jun N-terminal kinases (quinasas c-Jun N-terminal).

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (proteínas quinasas activadas por mitógenos).

MEM: Minimum Essential Medium (medio MEM).

mTOR: mammalian target of rapamycin (diana de la rapamicina en células de mamífero).

MUC4: Mucina 4.

NF-M (160KDa): Neurofilamento 160.

nNOS (NOS1): Neuronal NOS (óxido nítrico sintasa neuronal).

NO: Nitric oxide (óxido nítrico).

NOS: Nitric oxide synthase (óxido nítrico sintasa).

NP40: Nonidet-P40 (Igepal).

PARP: Poly ADP ribose polymerase (poli ADP-ribosa polimerasa).

PBS: Phosphate buffered saline (solución salina con tampón fosfato).

PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PE: Phycoerythrin (ficoeritrina).

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositol 3-quinasa).

PIK3CA: Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol 3-quinasa).

PKB/AKT: Protein kinase B (proteína quinasa B)/AKT.

- PMSF:** Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).
- PR:** Progesterone receptor (receptor de progesterona).
- PTEN:** Phosphatase and tensin homolog, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 3-phosphatase (fosfatasa y homólogo de la tensina, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa).
- ROS:** Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno).
- rpm:** revoluciones por minuto.
- RPMI 1640:** Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (medio RPMI 1640).
- RTK:** Receptor tyrosine kinase (receptor tirosina quinasa).
- SDS:** Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato sódico).
- SEM:** Standard error of the mean (error estándar de la media).
- SERDs:** Selective estrogen receptor down-regulators (reguladores negativos selectivos del receptor de estrógenos).
- SERMs:** Selective estrogen receptor modulators (moduladores selectivos del receptor de estrógenos).
- SFB:** Suero fetal bovino.
- SG:** Supervivencia global.
- siRNA:** Small interfering RNA (ARN pequeño interferente).
- SLE:** Supervivencia libre de enfermedad.
- SNOs:** nitrosotioles.
- TC:** Tomografía computarizada.
- TCEP (•HCL):** Tris (carboxietil) fosfina hidroclorehídrico.
- TFIIB:** Transcription factor IIB (factor de transcripción IIB).
- TKIs:** Tyrosine-kinase inhibitors (inhibidores de tirosina quinasa).
- TP63:** Tumor protein p63 (proteína tumoral p63).
- Trk/NRTK:** Tropomyosin receptor tyrosine kinase (receptor tirosina quinasa para la tropomiosina).
- Trx/TrxR:** Tioredoxina/ Tioredoxina Reductasa.
- TTBS:** Tween 20 and Tris-Buffered Saline (ampón salino con Tween 20).
- VEGF:** Vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular).
- VEGFR:** Vascular endothelial growth factor receptor (receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular).

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	5
1. <i>Cáncer de mama</i>	5
1.1. Epidemiología	5
1.2. Factores de Riesgo	6
1.3. Diagnóstico	6
1.4. Factores pronósticos y predictivos	7
1.5. Subtipos del cáncer de mama	9
2. <i>Tratamiento del cáncer de mama</i>	15
2.1. Quimioterapia	15
2.2. Receptor de estrógenos y hormonoterapia o terapia endocrina en cáncer de mama	16
2.3. Terapia dirigida	21
2.3.1. HER-2 y cáncer de mama	23
3. <i>Óxido nítrico, S-nitrosilación y cáncer</i>	29
3.1. Homeostasis de S-nitrosotioles	30
3.2. Nitrosilación y cáncer	35
II. Objetivos	39
III. Materiales y Métodos	43
1. <i>Líneas celulares y condiciones de cultivo</i>	43
1.1. Recuento y viabilidad celular	45
1.2. Criopreservación de las células	47
2. <i>Tratamientos</i>	47
3. <i>Determinación de la proliferación y la viabilidad celular</i>	49
4. <i>Ensayo de muerte celular o apoptosis</i>	50

5. <i>Análisis del ciclo celular</i>	51
6. <i>Análisis mediante Western-Blot</i>	52
6.1. Obtención de lisados celulares	52
6.2. Determinación de la concentración de proteína	53
6.3. Análisis mediante Western-Blot	54
7. <i>Análisis de quinasas de señalización con el array de anticuerpos</i> <i>Pathscan Array</i>	58
8. <i>Detección de proteínas S-nitrosiladas: Método Biotin-Switch</i>	58
9. <i>Detección de proteínas S-nitrosiladas mediante array de</i> <i>anticuerpos</i>	61
10. <i>Silenciamiento génico mediante ARN pequeño de interferencia</i> <i>(siRNA)</i>	62
10.1 Silenciamiento génico y preparación del complejo siRNA	63
11. <i>Inmunomarcaje y microscopía confocal</i>	64
12. <i>Ensayo de formación de mamosferas y análisis de expresión de</i> <i>CD24/CD44</i>	66
12.1 Análisis por citometría de flujo de marcadores CD24/CD44	67
13. <i>Análisis inmunohistoquímicos</i>	67
14. <i>Análisis estadísticos</i>	69
V. Resultados	73
1. <i>El grado de estrés nitrosativo modula la proliferación celular en</i> <i>células de cáncer de mama</i>	73
1.1. Un estrés nitrosativo severo reduce la proliferación celular en células de cáncer de mama	73
1.2. Un estrés nitrosativo moderado incrementa la proliferación celular y supervivencia en células MCF-7	75

2. <i>La funcionalidad de ER-α y una proteína p53 activa son requisitos necesarios para la proliferación celular causada por un estrés nitrosativo moderado en células MCF-7</i>	78
3. <i>La privación estrogénica en células MCF-7 potencia la proliferación en condiciones de estrés nitrosativo moderado</i>	81
4. <i>El estrés nitrosativo en células MCF-7 altera la distribución subcelular del receptor ER-α</i>	83
5. <i>La alteración de la homeostasis de SNO expande en células MCF-7 una subpoblación con características de células madre tumorales</i>	86
6. <i>El estatus del receptor de estrógenos en células de cáncer de mama se asocia significativamente con niveles más bajos de expresión de TXNRD1</i>	88
7. <i>La inhibición de la actividad GSNOR reduce el efecto antiproliferativo y apoptótico de trastuzumab en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2</i>	93
8. <i>La inhibición del sistema GSNOR no altera la detención del ciclo celular en la fase G1 provocada por trastuzumab</i>	98
9. <i>La inhibición de GSNOR aumenta los niveles de proteínas S-nitrosiladas en células de cáncer de mama</i>	99
10. <i>La expresión de GSNOR se asocia a una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER-2 positivos</i>	102
VI. Discusión	109
1. <i>El mantenimiento de la homeostasis de S-nitrosotioles juega un papel importante en la supresión del crecimiento de tumores de mama ER positivos</i>	109

2. *El mantenimiento de la homeostasis de S-nitrosotioles por parte del sistema enzimático GSNOR juega un papel importante en tumores de mama HER-2 positivos* 115

VII. Conclusiones 125

VIII. Bibliografía 129

IX. Anexo

- Canas, A., Lopez-sanchez, L. M., Valverde-estepa, A., Hernandez, V., Fuentes, E., Munoz-Castaneda, J. R., Lopez-Pedrerera, C., De la Haba-Rodriguez, J. R., Aranda, E. & Rodriguez-Ariza, a. 2012. *Maintenance of S-nitrosothiol homeostasis plays an important role in growth suppression of estrogen receptor-positive breast tumors. Breast Cancer Res*, 14, R153.

I. RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer y una de las principales causas de mortalidad femenina. Es una enfermedad heterogénea, con diversas histopatologías, variaciones genéticas y genómicas, así como respuestas clínicas diferentes. Generalmente en tumores se detectan niveles elevados de óxido nítrico (NO) comparado con el tejido sano circundante, y las modificaciones de proteínas inducidas por el NO, y en concreto la S-nitrosilación, pueden constituir un factor regulador significativo tanto en la tumorogénesis y progresión del tumor como en el tratamiento antitumoral. El mantenimiento de la homeostasis de S-nitrosotioles (SNOs) se regula a través de mecanismos enzimáticos específicos, y su alteración en células tumorales, puede proporcionar nuevos datos sobre el papel del NO en cáncer.

El objetivo de esta tesis doctoral fue determinar el papel del estrés nitrosativo y la homeostasis de SNOs en cáncer de mama, con el fin de establecer si la alteración de los sistemas de defensa frente a estrés nitrosativo como el sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TrxR) o la enzima S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR) influyen en la respuesta a terapia en cáncer de mama. Del mismo modo, también se determinó si los parámetros moleculares relacionados con la homeostasis de SNOs pueden constituir marcadores pronósticos o predictivos de respuesta a terapia en cáncer de mama.

Los resultados obtenidos indican que el metabolismo de SNOs juega un importante papel en la biología del cáncer de mama. La alteración de la homeostasis de SNOs confiere una ventaja adaptativa de supervivencia a las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos (ER). De hecho, se halló que un estado positivo para ER se asocia a niveles significativamente menores de expresión del gen que codifica para TrxR (TXNDR1), en comparación con tumores ER negativos. Estos resultados

sugieren que la expresión de ER en cáncer de mama determina la respuesta a una homeostasis alterada de SNOs, y que los mecanismos implicados pueden también jugar un importante papel en el desarrollo de resistencia a terapias endocrinas. Del mismo modo, se determinó que una menor actividad GSNOR proporciona una ventaja adaptativa a las células HER-2 positivas tratadas con trastuzumab, posiblemente alterando mediante S-nitrosilación procesos implicados en la muerte celular provocada por este fármaco anti-HER2. Además, al contrario que los tumores HER2-, la mayoría de tumores HER2+ expresaron niveles significativamente menores de la proteína GSNOR, y la expresión del gen que codifica para esta enzima (ADH5) tuvo impacto en la supervivencia en el subtipo de cáncer de mama HER2+, pero no en los otros subtipos de cáncer de mama.

En definitiva, los mecanismos que participan en el mantenimiento de una adecuada homeostasis de SNOs en cancer de mama, constituyen un importante factor pronóstico y predictivo, y pueden jugar un papel importante en el desarrollo de resistencia a terapia en estos tumores.

Palabras clave: cáncer, óxido nítrico, S-nitrosilación, tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TrxR), S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR), S-nitrosotioles (SNOs).

II. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE MAMA

1.1 Epidemiología

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer y una de las principales causas de mortalidad femenina, representando un 23% (1,38 millones) de todos los casos de cáncer a nivel mundial y un 14% (458,400) del total de muertes registradas por cáncer (Jemal et al., 2011). Constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, seguida del cáncer de pulmón y cuello uterino en mujeres de países desarrollados y por cáncer colorrectal y de pulmón en países en vías de desarrollo (Jemal et al., 2011). Se considera que a lo largo de la vida, una de cada 8-10 mujeres padecerá cáncer de mama y cada año se diagnostican 1.000.000 de nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo. No obstante, su incidencia varía notablemente en distintas regiones del planeta, aunque en general, las tasas son mayores en los países más industrializados, con mayor incidencia en EE.UU, Australia, Norte de Europa y Argentina (Angulo Martin, 2013). En el año 2014, la tasa de incidencia para el cáncer de mama en Estados Unidos representa un 29% con respecto al total de todos los casos de cáncer, y se estima un 15% del total de muertes este mismo año (Siegel et al., 2014). En Europa, la tasa de incidencia del cáncer de mama es de un 28,8%, estimándose un 16,8% de los casos de muerte por este tumor. Es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en la mayoría de los países europeos, salvo algunas excepciones como Albania, Dinamarca o Estonia, que lo tienen como segunda causa de muerte predominando en estos países la muerte por cáncer de pulmón para Albania y Dinamarca, y cáncer colorrectal para Estonia. Aun así, sigue siendo el cáncer con mayor incidencia en todos los países europeos (Ferlay et al., 2013).

En España se diagnostican más de 15.000 casos nuevos al año y fallecen anualmente 6.000 mujeres por esta causa. Aunque está en segundo lugar entre las causas de muerte tras las enfermedades cardiovasculares, conlleva el mayor número de años potenciales de vida perdidos (Angulo Martin, 2013). La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con una máxima incidencia entre los 45 y los 65 años. La mortalidad en España comenzó a descender en el año 1992 (un 2% anual), gracias a los programas de cribado y los nuevos tratamientos. Esta tendencia se mantiene hasta la actualidad y la supervivencia en nuestro país (83%) es superior a la media europea (Angulo Martin, 2013).

1.2 Factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama, todavía no está aclarada, aunque se relaciona con múltiples factores, entre los que se incluyen: la edad y el género, factores dietéticos y estilo de vida (consumo de bebidas alcohólicas, obesidad, actividad física insuficiente, etc.), menarquía precoz, menopausia tardía o nuliparidad. La exposición a radiaciones ionizantes y el tratamiento hormonal sustitutivo pueden ser también otros factores de riesgo de este tipo de tumor. Además, tener antecedentes familiares con algún familiar de primer grado que presente mutaciones en los genes BRCA1/2 y CHEK2 aumentan la posibilidad de padecer cáncer de mama (King et al., 2003, Tedaldi et al., 2014).

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de mama precisa de una exploración física de la paciente, con mayor detenimiento en la exploración mamaria, así como una revisión de los antecedentes de los hábitos de salud y antecedentes médicos de sus enfermedades y tratamientos anteriores. Además son necesarias pruebas de imagen como la mamografía, ecografía y resonancia magnética. Para la

estadificación de la enfermedad se emplean otras pruebas como la radiografía de tórax, la tomografía computarizada (TC), el mapa óseo y la ecografía abdominal. La biopsia con aguja gruesa (BAG) normalmente se emplea para la confirmación histológica, así como las determinaciones inmunohistoquímicas y moleculares pertinentes. Si se encuentra tumor, las decisiones sobre cuál es el mejor tratamiento se toman de acuerdo con el resultado de estas pruebas. Las pruebas proveen información sobre los siguientes aspectos: la rapidez con que puede crecer el tumor y la probabilidad de diseminación, la eficacia de ciertos tratamientos, así como la probabilidad de que el cáncer recidive.

1.4 Factores pronósticos y predictivos

Los factores pronósticos son cualquier característica que se obtiene del tumor tras la cirugía, o del propio paciente, que puede usarse para predecir la evolución que tendrá la enfermedad. Por otra parte, los factores predictivos indican la respuesta a una terapia específica (Angulo Martin, 2013, Hamilton and Piccart, 2000). Los factores pronósticos y predictivos más usados en la práctica clínica del cáncer de mama son el estado ganglionar y el tamaño tumoral, el subtipo y el grado histológico, la invasión vascular y linfática y marcadores de proliferación celular [como la expresión de la proteína Ki67 determinada mediante inmunohistoquímica (IHC)] (Oldenhuis et al., 2008, Viale et al., 2008).

El tratamiento y el pronóstico del cáncer de mama dependen en gran medida del **estadio (etapa del desarrollo)** en que se encuentra el tumor. La **estadificación** se basa en el tamaño del tumor, en su invasividad y en su diseminación hacia los ganglios linfáticos regionales o hacia otras partes del cuerpo. El estadio suele expresarse con un número entre 0 y IV. El estadio 0 corresponde al cáncer no invasivo que permanece en su ubicación original (carcinoma *in situ*) y el estadio IV al cáncer invasivo que se propaga fuera de

la mama hacia otras partes del cuerpo. Asimismo, también se puede utilizar otro sistema de estadificación conocido como **Sistema TNM**, que se basa en el análisis de los parámetros: tamaño del tumor (T), grado en que están afectados los ganglios linfáticos (N) y el hecho de si se ha propagado o metastatizado hacia otras partes del cuerpo (M).

Otros factores pronósticos y predictivos importantes son la expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión de HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2). Los receptores de estrógenos y progesterona (ER/PR) deben valorarse en el tumor primario, ya que su expresión determina el tratamiento tanto en la enfermedad localizada como metastásica. Los tumores con ER tienen mejor pronóstico, no estando tan claro el valor de los PR (Bauer et al., 2007). En el 25-30% de los carcinomas invasivos de mama, está amplificado el gen ERBB2 (cromosoma 17), causando una sobreexpresión del receptor HER-2, cuya activación pone en marcha vías de señalización celular relacionadas con la diferenciación, crecimiento y supervivencia celular, lo que conlleva una reducción en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) (Angulo Martin, 2013, Hamilton and Piccart, 2000, Menard et al., 2001).

Finalmente, las nuevas técnicas moleculares han propiciado el desarrollo de pruebas genómicas de carácter pronóstico y/o predictivo en cáncer diseñadas para estimar el riesgo de recurrencia a distancia de la enfermedad y/o predecir con la mayor precisión posible la respuesta a la terapia adyuvante. Estas pruebas genómicas, por lo tanto, permitirían la estratificación o clasificación de los pacientes en diferentes subtipos genéticos que podrían recibir un tratamiento de manera individualizada y más adecuada a cada uno de ellos. Actualmente, varias de estas pruebas pronóstico, como Oncotype DX®, MammaPrint® o Prosigna® están siendo comercializadas e

introducidas en la práctica clínica (Paik et al., 2004, Prat et al., 2012, van 't Veer et al., 2002).

1.5 Subtipos del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que incluye entidades clínicas, morfológicas y moleculares muy distintas. Esta heterogeneidad no puede ser explicada únicamente por parámetros clínicos como el tamaño tumoral, la afectación de nódulos linfáticos, el grado histológico, la edad o por biomarcadores como el ER, el PR o HER-2, usados de manera rutinaria en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes (Eroles et al., 2012).

De manera tradicional, los tumores mamarios infiltrantes se han clasificado basándose en sus características y los diferentes tipos histológicos, incluyendo el carcinoma ductal infiltrante (IDC, representando un 70% de los tumores mamarios) y el carcinoma lobulillar infiltrante (ILC, representando un 10% de los casos diagnosticados). Otros tipos histológicos son menos frecuentes y se han clasificado en función de su pronóstico: tubular, cribiforme, coloidal y carcinomas micropapilares con un buen pronóstico, o tumores metaplásicos con peor pronóstico (Tavassoli and Deville, 2003, Hergueta-Redondo et al., 2008). Sin embargo, esta clasificación es insuficiente para entender la heterogeneidad de esta neoplasia, especialmente con respecto a los tumores IDCs. Estos tumores se han clasificado de acuerdo a los criterios seguidos por Elston y Ellis (Elston and Ellis, 1998), y se subdividen en tres grados de diferenciación tumoral, del 1 al 3, en función de la presencia de túbulo/glándulas, atipia nuclear y número de mitosis (Hergueta-Redondo et al., 2008, Tavassoli and Deville, 2003). Además, como se ha comentado anteriormente el cáncer de mama se ha clasificado dependiendo de la expresión de receptores hormonales (ER y PR) y sobreexpresión/amplificación

de HER-2, dado que estos marcadores moleculares son particularmente importantes para predecir la respuesta clínica a los tratamientos específicos.

Aunque estos factores clínico-patológicos convencionales son útiles, resultan insuficientes para predecir una mala o buena respuesta de los pacientes al tratamiento. En la última década, el desarrollo de las metodologías de análisis de expresión génica mediante microarrays de ADN, ha permitido analizar miles de genes y clasificar el cáncer de mama en base a su perfil de expresión génica (Hergueta-Redondo et al., 2008). En el año 2000, Perou y colaboradores publicaron el primer estudio que clasificaba el cáncer de mama en los denominados “**subtipos intrínsecos**” basados en su perfil de expresión génica (Perou et al., 2000). Estos datos, junto con las numerosas contribuciones posteriores han cambiado la forma de entender, clasificar y estudiar el cáncer de mama y han conducido a reconsiderar la forma de diagnosticar y tratar a los pacientes, posibilitando la identificación de nuevas dianas terapéuticas alternativas (Eroles et al., 2012, Hergueta-Redondo et al., 2008).

Para entender la nueva taxonomía propuesta para la clasificación del cáncer de mama, es necesario conocer la organización anatómico-funcional de la glándula mamaria (**Figura 1**). El epitelio mamario desarrolla una elaborada red de conductos ramificados que maximizan la superficie dentro de un volumen limitado (Gjorevski and Nelson, 2011). El epitelio mamario se caracteriza por presentar dos tipos celulares distintos: basales y luminales. El epitelio basal consta de células mioepiteliales, que generan la capa externa de la glándula, y una pequeña población de células madre (stem cells), que proporcionan los diferentes tipos celulares. La capa interna del epitelio mamario forma conductos, y contiene poblaciones de células luminales que rodean un lumen hueco y que se diferencian en los alveolos productores de

leche; estas células están definidas por su estatus de receptores hormonales, de manera que la liberación de la leche a través del conducto se produce tras la contracción del mioepitelio activado por hormonas (Forsyth and Neville, 2009, Macias and Hinck, 2012). Junto con el mioepitelio, el epitelio luminal genera una bicapa, una estructura que permite cumplir con la función en la lactancia en la que las células mioepiteliales externas se contraen para exprimir la leche de las células luminales alveolares interiores (Macias and Hinck, 2012).

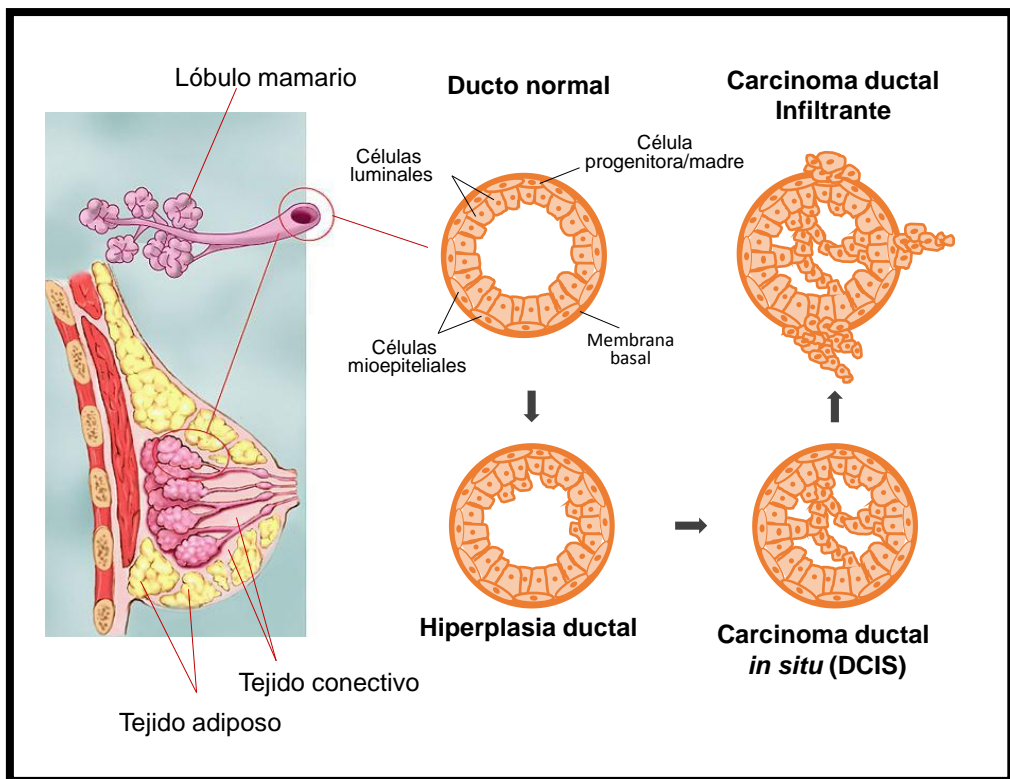


Figura 1. Organización anatómico-funcional de la glándula mamaria y cáncer de mama. El epitelio mamario constituye una elaborada red de conductos ramificados y consta de dos tipos celulares distintos: basales y luminales. El epitelio basal consta de células mioepiteliales y una pequeña población de células madre que genera los diferentes tipos celulares. La capa interna del epitelio mamario forma conductos, y contiene poblaciones de células luminales productoras de leche que expresan receptores hormonales y que rodean un lumen hueco.

Las células mamarias se identifican por la expresión diferencial de citoqueratinas (CKs): las células epiteliales luminales se caracterizan por la expresión de CKs 8, 18 y 19, mientras que las células mioepiteliales expresan CKs 5/6, 14 y 17. Sin embargo, de manera ocasional, las CKs mioepiteliales también pueden ser detectadas en células epiteliales, como ocurre con otros marcadores mioepiteliales como la vimentina, la actina del músculo liso, TP63 (tumor protein p63), CD10 (antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda) y la proteína S100, entre otras (Gusterson et al., 2005, Hergueta-Redondo et al., 2008).

Los estudios más relevantes han confirmado, mediante otros experimentos que implican expresión génica e inmunohistoquímica (Abd El-Rehim et al., 2005, Hu et al., 2006), la clasificación del cáncer de mama en **seis subtipos** principales: **Basal-Like**, **HER2+/ER-**, **Normal Breast-Like**, **Luminales A y B**, y el último subtipo identificado en 2007, **Claudin-Low** (Herschkowitz et al., 2007). Cada uno de los subtipos presenta marcadores inmunofenotípicos y características terapéuticas específicas (**Tabla 1**).

El subtipo **Basal-Like** es positivo para las queratinas específicas de las células basales (queratinas 5/6 y 17) y responde a la quimioterapia. El subtipo **HER2+/ER-**, no expresa los receptores de estrógenos y progesterona pero sobreexpresa el gen erbB2, siendo respondedor a la quimioterapia y a la terapia dirigida mediante anticuerpos anti-HER2, anti-EGFR e inhibidores de EGFR. El subtipo **Normal Breast-Like** está muy poco caracterizado y presenta genes característicos del tejido adiposo, agrupándose en la clasificación de los subtipos intrínsecos junto con los fibroadenomas y el tejido mamario normal, por lo que su existencia aún permanece en duda, creyéndose que podría ser el resultado de la contaminación con tejido procedente de los microarrays de expresión génica. El subtipo **Luminal A**, es

receptor de estrógenos y progesterona positivos, y únicamente responde a la terapia endocrina; sin embargo, el subtipo **Luminal B**, muestra baja expresión de ER, y a veces de HER-2, y responde a la terapia endocrina y a terapia dirigida contra HER-2. Por último, el subtipo **Claudin-Low** se caracteriza por presentar una baja expresión de genes implicados en las uniones estrechas y de adhesión celular, incluyendo claudina-3, -4, -7 cingulina, ocludina y E-cadherina, de ahí su nombre; comparte con el subtipo Basal-Like la expresión de HER-2 y genes luminales, sin embargo sobreexpresa un conjunto de genes relacionados con la respuesta inmune y genes relacionados con la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesenquimal. Por su parte, tienen un peor pronóstico y una respuesta insuficiente a la quimioterapia neoadyuvante con valores intermedios entre los tumores basales y los luminales (Eroles et al., 2012).

Subtipo Molecular	Basal-Like	HER2+/ER- (enriquecido en HER-2)	Normal Breast-Like	Luminal A	Luminal B	Claudin-Low
Frecuencia	10-20%	10-15%	5-10%	50-60%	10-20%	12-14%
ER/PR/HER-2	ER-, PR-, HER2-	ER-, PR-, HER2+	ER-/+, HER2-	ER+, PR+, HER2-	ER+/-, PR+/-, HER2+/-	ER-, PR-, HER2-
Marcadores IHC	ER-, PR-, HER2-, CK 5/6+, ↑EGFR+ (a menudo), Ki67	ER-, PR-, HER2+, CK 5/6 y EGFR+/-, ↑Ki67	ER-/+, HER2-, CK 5/6-, EGFR-	ER+ y/o PR+, HER2-, CK 5/6 y EGFR-, ↓Ki67	ER+ y/o PR+, HER2+ (a veces), CK 5/6 y EGFR-, ↓Ki67	ER-, PR-, HER2-, CK 5/6 +/-, EGFR +/-
Genes proliferativos	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Alto	Bajo
Genes característicos	CK 5/6/17, KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2, BRCA1 mut (80-90%)	HER-2/ c-erbB2	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	ESR1, GATA3, KRT 8/18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	ESR1, GATA3, KRT 8/18, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B	CD44/SNAI3
Grado histológico	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Intermedio/Alto	Alto
Mutaciones en p53	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto
Pronóstico	Malo	Malo	Intermedio	Excelente	Intermedio/Malo	Malo
Características terapéuticas	Responde a quimioterapia	Responde a quimioterapia, anti-HER2, anti-EGFR e inhibidores EGFR	Normalmente no responden a la quimioterapia neoadyuvante	Responde a terapia endocrina	Respuesta variable a la quimioterapia y respuesta a la terapia endocrina	Respuesta intermedia (entre el subtipo basal y el luminal) a la quimioterapia neoadyuvante

Tabla 1. Características principales de los subtipos moleculares intrínsecos del cáncer de mama (Eroles et al., 2012, Prat and Perou, 2011, Giordano and Normanno, 2009).

2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Para el tratamiento del cáncer de mama, en cualquier estadio, se realiza un abordaje multidisciplinar, que abarca la *cirugía*, la *quimioterapia*, la *hormonoterapia*, la *terapia dirigida* y la *radioterapia*. En función de las características anatomopatológicas del tumor, junto a la extensión de la enfermedad, se planificará un tratamiento individualizado, tanto en la terapia neoadyuvante, así como en la cirugía, la terapia adyuvante o en el tratamiento de la enfermedad extendida (Dowsett et al., 2010). Por su relevancia clínica, describiremos brevemente tres tipos principales de tratamientos usados en la práctica de la oncología médica: **Quimioterapia**, **Hormonoterapia** o **Terapia Endocrina** y **Terapia Dirigida**.

2.1 Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento para el cáncer, con un medicamento antineoplásico o una combinación de varios. La quimioterapia puede ser administrada después del tratamiento principal (cirugía), con el fin de destruir las posibles células tumorales que hayan quedado tras el tratamiento quirúrgico y prevenir la posible reaparición del tumor, recibiendo el nombre de **quimioterapia adyuvante**. Por otro lado, se denomina **quimioterapia neoadyuvante** si se administra antes de cualquier tratamiento quirúrgico o radioterapia, con la finalidad de evaluar la efectividad del tratamiento quimioterápico y disminuir el estadio tumoral. En muchas ocasiones es utilizada como factor pronóstico, o bien como tratamiento paliativo cuando la enfermedad está diseminada. Los quimioterapéuticos que se utilizan con más frecuencia para el tratamiento de cáncer de mama en etapa inicial son antraciclinas y taxanos. Las **antraciclinas** (como *Doxorrubicina/Adryamicin®* y su derivado *Epirubicina/Elvence®*), se comportan como agentes intercalantes que se insertan y unen a la doble hélice de ADN, interfiriendo

con la replicación, transcripción y reparación del ADN. Los **taxanos** (como *Paclitaxel/Taxol*® y *Docetaxel/Taxotere*®) impiden la división celular al inhibir la función de los microtúbulos. Estos medicamentos se pueden usar en combinación con otros como los **antimetabolitos antagonistas de la piridimina** [*fluorouracilo (5-FU)*, la *capecitabina (Xeloda*®) o la gemcitabina (*Gemzar*)], **antimetabolitos antagonistas del ácido fólico** como el *metotrexato*, o la *ciclofosfamida (Cytoxan*®) que es un agente citostático alquilante que actúa retardando o deteniendo el crecimiento de las células.

Se emplean muchos otros medicamentos quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer de mama, tales como agentes que contienen platino (*cisplatino, carboplatino*), *vinorelbina (Navelbine*®), *doxorubicina liposomal (Doxil*®), *mitoxantrona, ixabepilona (Ixempra*®) o paclitaxel basado en albúmina (*Abraxane*®).

2.2 Receptor de estrógenos y hormonoterapia o terapia endocrina en cáncer de mama

Aproximadamente el 75% de los cánceres de mama son positivos para los receptores de estrógeno y/o receptores de progesterona (ER, PR), y los estrógenos contribuyen primordialmente al desarrollo y crecimiento de estos tumores (Lumachi et al., 2011). La expresión del receptor de estrógenos y progesterona es el principal indicador de respuesta potencial a terapia hormonal (Lumachi et al., 2013).

El receptor de estrógenos pertenece a una superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas. Estas proteínas poseen unidades estructurales y funcionales bien definidas (Aranda and Pascual, 2001, Krishnan et al., 2000). Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como **ER α** y **ER β** , formados por una sola cadena peptídica de 565 y 530 aminoácidos respectivamente (Kuiper et al., 1996). Ambos están codificados por genes diferentes e independientes (**ESR1** y **ESR2**, respectivamente). Actualmente se reconocen cuatro mecanismos (**Figura 2**) mediante los cuales el ER regula el crecimiento y proliferación celular (Hall et al., 2001):

- 1. Activación dependiente del ligando.** La unión del ligando activa al receptor de estrógenos induciendo interacción con el ADN y activación transcripcional de los genes diana.
- 2. Activación independiente de ligando:** Varias quinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento (EGF, IGF-1...) logran activar mediante fosforilación al receptor de estrógenos y sus proteínas correguladoras en ausencia de ligando.
- 3. Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN:** El receptor de estrógenos unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción, como AP-1 (Activator Protein 1), utilizando los sitios de unión a ADN de éstos.
- 4. Señalización no-genómica (ER de membrana).** Activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrogénico anclado a la membrana [G protein-coupled receptor 30 (GPR30)].

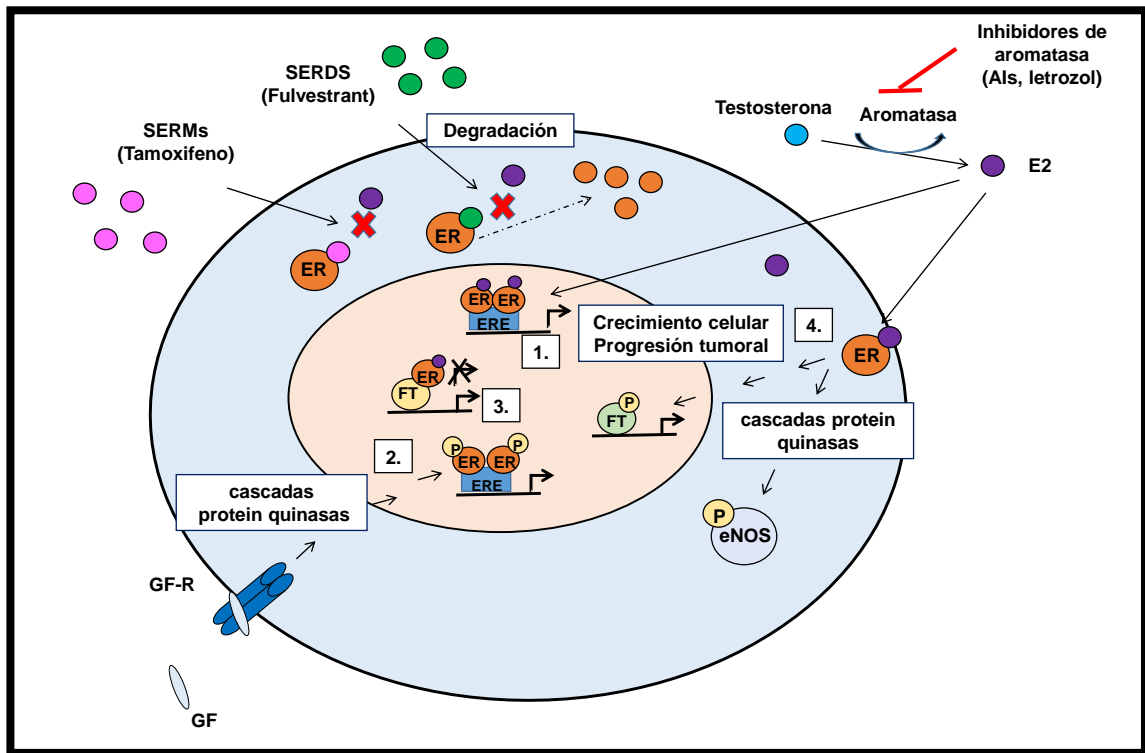


Figura 2. Mecanismos de acción del receptor de estrógenos y estrategias de terapia endocrina en cáncer de mama. Los efectos biológicos del estradiol (E2) están mediados al menos por cuatro vías independientes de señalización regulada por el receptor de estrógenos (ER). 1.-Activación dependiente del ligando; 2.-Activación independiente de ligando; 3.- Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN; 4.- Señalización no-genómica. La privación de esta señalización estrogénica es la base de la terapia hormonal en cáncer de mama, mediante el uso de inhibidores de aromatasa (AIs), como el letrozol, moduladores selectivos del ER (SERMs), como el tamoxifeno, o reguladores negativos selectivos del ER (SERDS), como el fulvestrant. E2: estradiol; FT: factor de transcripción, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; GF: factor de crecimiento; GF-R: receptor para el factor de crecimiento.

El mecanismo clásico de acción dependiente del ligando ha sido el más estudiado. El ER, en ausencia de ligando, se encuentra mayoritariamente en el núcleo, en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70. Cuando el receptor de estrógenos se une a los estrógenos en el núcleo, el ER se activa, disociándose de las proteínas de choque térmico, y

sufre varios cambios conformacionales y su homodimerización, logrando de este modo la unión con elementos de respuesta a estrógenos (**EREs**), localizados en los promotores de los genes diana (Hall et al., 2001, Nilsson et al., 2001). Los receptores unidos al ADN reclutan a los factores basales de transcripción y a la RNA polimerasa II por medio de su interacción directa o mediante proteínas intermediarias (Rosenfeld and Glass, 2001). El conjunto ER-coactivador regula el acceso a la cromatina y estabiliza el complejo de preiniciación transcripcional. La transcripción de muchos genes se incrementa en presencia de estradiol, sin embargo la transcripción de otros se inhibe (Frasor et al., 2003). En su mayoría, los genes regulados positivamente están involucrados en proliferación y progresión del ciclo celular, mientras que aquellos que se regulan negativamente están relacionados con apoptosis y antiproliferación.

De las dos principales isoformas de ER (ER- α y ER- β) identificadas hasta la fecha, la isoforma ER- α parece ser la principal responsable de los efectos estimuladores del crecimiento celular de los estrógenos en el cáncer de mama (McDonnell and Norris, 2002). Por tanto, la privación de esta señalización estrogénica ha sido la base de la terapia hormonal en aquellas pacientes con tumores ER- α /PR positivos. Las estrategias endocrinas disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer de mama (**Figura 2**) incluyen los moduladores selectivos del ER- α (SERMs), tales como el tamoxifeno (Osborne, 1998), el regulador negativo selectivo del ER- α (SERD) fulvestrant (Osborne et al., 2004) y los inhibidores selectivos de aromatasa (AIs) exemestano y letrozol (Lonning, 2011).

El **tamoxifeno** actúa uniéndose a ER- α e induciendo en éste un cambio conformacional diferente al producido por el estradiol. Como resultado, el tamoxifeno es incapaz de provocar la activación génica que sí realiza el estradiol, bloqueando los efectos del estrógeno y también inhibiendo la proliferación de células ductales de cáncer de mama (Lumachi et al., 2013). El **fulvestrant** es otro antiestrogénico, pero a diferencia del tamoxifeno, no modula la competencia con el estradiol por el ER, sino que tras la unión con el mismo bloquea su actividad (mediante la inhibición de la dimerización) y acelera su degradación, por lo que se considera un antiestrogénico puro (Lumachi et al., 2013, Lumachi et al., 2011, Puhalla et al., 2012, Santen, 2002). Los SERDs poseen varias ventajas potenciales frente a los SERMs, incluyendo su mayor afinidad de unión al ER comparada con el tamoxifeno y actividad no estrógena en el útero (Howell et al., 2004, Lumachi et al., 2013).

En mujeres post-menopáusicas con cáncer de mama temprano ER+, la terapia endocrina ha demostrado tener un mayor impacto sobre la tasa anual de mortalidad que la quimioterapia adyuvante (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005). Por tanto, dada su probada eficacia y su generalmente favorable perfil de efectos secundarios, las terapias endocrinas se usan ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama, tanto en estadios tempranos como en enfermedad avanzada metastásica o recurrente. Sin embargo, hasta un 50% de pacientes con enfermedad metastásica no responden a un tratamiento endocrino en primera línea (resistencia *de novo*), mientras que el resto finalmente recaerán a pesar de presentar una respuesta inicial (resistencia adquirida). Además, aproximadamente un 25% de los tumores de mama son ER-negativos, por lo que en estos pacientes el tratamiento está tradicionalmente limitado a fármacos quimioterápicos citotóxicos.

En las últimas dos décadas se han realizado grandes esfuerzos para intentar comprender los distintos mecanismos biológicos responsables del desarrollo de la resistencia a la terapia endocrina (Osborne and Schiff, 2011). Se han sugerido varios mecanismos, apoyados por datos pre-clínicos y en algunos casos clínicos, que podrían explicar esta resistencia al tratamiento hormonal del cáncer de mama. Entre ellos se incluyen mecanismos farmacológicos y/o farmacogenómicos (Normanno et al., 2005, Ring and Dowsett, 2004), la interacción de la señalización mediada por ER- α con la de otros receptores de factores de crecimiento, particularmente EGFR (Epidermal growth factor receptor) y HER-2 (Gee et al., 2005, Kaklamani et al., 2010, Schafer et al., 2002), y también mecanismos genómicos relacionados con ER- α , como es el caso del silenciamiento epigenético de la expresión de ER- α (Dworkin et al., 2009, Giacinti et al., 2006, Leu et al., 2004, Pathiraja et al., 2010).

2.3 Terapia dirigida

Una mayor comprensión de la biología subyacente del cáncer de mama ha dado lugar a la identificación de dianas moleculares y el desarrollo de nuevas terapias que van dirigidas específicamente contra estas dianas. Estos agentes se usan para una diana en concreto que está amplificada o sobreexpresada en las células tumorales, y con el objetivo de bloquear vías de señalización implicadas en el crecimiento tumoral y en la metástasis, lo que además de mejorar la respuesta al tratamiento, minimiza los efectos secundarios de la quimioterapia (Gerber, 2008, Higgins and Baselga, 2011, Nielsen et al., 2013, Giordano and Normanno, 2009).

Los aspectos clave en el desarrollo clínico de la terapia dirigida incluyen una adecuada selección de los pacientes, la identificación de combinaciones óptimas junto con los tratamientos convencionales, marcadores predictivos de actividad y toxicidad, y las estrategias terapéuticas más adecuadas (Giordano and Normanno, 2009).

Los dos tipos principales de terapia dirigida incluyen **anticuerpos monoclonales** que forman complejos con los antígenos en la superficie de las células tumorales y **pequeñas moléculas inhibitoras** que bloquean reacciones enzimáticas clave. Los agentes terapéuticos dirigidos contra el cáncer de mama incluyen agentes dirigidos específicamente contra el factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2) tales como **trastuzumab** o **lapatinib**, o inhibidores de la angiogénesis dirigidos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como **bevacizumab**. Los inhibidores tirosina quinasas (TKIs) están dirigidos a un gran número de dianas moleculares (HER-1, HER-2, HER-3, IGF-1R, C-MET, FGFR). Además existen terapias en desarrollo que incluyen inhibidores de vías de señalización intracelulares (PI3K, AKT, mTOR, ERK) y agentes que interfieren directamente con la reparación del ADN. Los inhibidores de la poli (ADP-ribosa)polimerasa (PARP), que promueven la apoptosis celular en tumores deficientes en BRCA, también están mostrando respuesta en la clínica (Baselga et al., 2010, Di Cosimo and Baselga, 2008, Higgins and Baselga, 2011, Macaskill et al., 2011, Tutt et al., 2010).

En la **Tabla 2** se resumen las características de algunos de los agentes terapéuticos dirigidos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama:

DIANA MOLECULAR	AGENTE TERAPÉUTICO	CLASE Y MECANISMO DE ACCIÓN
Receptores ErbB	Trastuzumab	Anticuerpo monoclonal dirigido contra HER-2
	Lapatinib	Inhibidor tirosina quinasa de EGFR y HER-2
	Pertuzumab	Anticuerpo monoclonal dirigido contra HER-2
	Trastuzumab emtansine (T-DM1)	Conjugado con Trastuzumab y el inhibidor citotóxico emtansine
Angiogénesis	Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF
	Sunitib	Inhibidor tirosina quinasa de VEGFRs, PDGFR, c-Kit
mTOR/PI3K	Temsirolimus	Inhibidor análogo de la rapamicina de mTOR
	Everolimus	Inhibidor análogo de la rapamicina de mTOR
	Buparlisib (BKM-120, NVP-BKM120)	Inhibidor pan-PI3K
	Dactolisib (BEZ, BEZ-235, NVP-BEZ235)	Inhibidor dual PI3K y análogo de la rapamicina de mTOR

Tabla 2. Agentes terapéuticos dirigidos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama.
Ampliado a partir de: (Giordano and Normanno, 2009).

2.3.1 HER-2 y cáncer de mama

El gen del receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2, HER-2/neu, c-erbB-2) fue descubierto en 1984 por Weinberg y colaboradores (Ross et al., 2009, Schechter et al., 1984). Se localiza en el cromosoma 17q y codifica un receptor tirosina quinasa, que es miembro de la familia de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o familia HER (Ross et al., 2004, Ross et al., 2009). La familia HER, también

conocida como familia ERBB, está compuesta por cuatro miembros: EGFR (ErbB1), HER-2 (ErbB2 ó neu), HER-3 (ErbB3) y HER-4 (ErbB4) (Arteaga and Engelman, 2014) y está implicada en la patogénesis del cáncer de mama. En particular, EGFR y HER-2/neu están sobreexpresados en un 50% y un 25% respectivamente, de todos los casos de cáncer de mama (Li and Li, 2013, Salomon et al., 1995, Kumar and Badve, 2008). La amplificación del gen HER-2 y/o la sobreexpresión de la proteína HER-2 ha sido identificada entre un 10-30% de todos los casos de cáncer de mama invasivos (Ross et al., 2009, Schechter et al., 1984). La amplificación de este gen en cáncer de mama se ha asociado con un incremento en la proliferación celular, así como la motilidad e invasión tumorales, metástasis regionales y a distancia, angiogénesis acelerada y apoptosis reducida (Moasser, 2007, Ross et al., 2009).

Los receptores ERBB son glicoproteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular (ECD) de unión al ligando, un dominio único transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Li and Li, 2013, Yarden and Sliwkowski, 2001). Tras la unión del ligando a su dominio de unión en el receptor (**Figura 3**), el receptor debe interactuar con otro receptor miembro de su familia, de estructura similiar (homodimerización) o diferente (heterodimerización). Tras la dimerización, se produce la autofosforilación de los dominios tirosina quinasa, que da lugar, por medio de fosforilaciones sucesivas, a la activación de una gran cantidad de vías de señalización intracelulares que son esenciales para el desarrollo y progresión del cáncer (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Li and Li, 2013, Ross et al., 2009, Yarden and Sliwkowski, 2001). Aunque no se ha identificado un ligando específico para HER-2, es el compañero heterodimérico preferido de esta familia (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Graus-Porta et al., 1997). Las vías de señalización afectadas por HER-2 incluyen la fosfatidilinositol3-quinasa (PI3K)/AKT y las vías de las proteínas

quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Schlessinger, 2004, Sliwkowski et al., 1999). La sobreexpresión de HER-2 conduce a la activación de EGFR y HER-2, con la consecuente activación de la vía MAPK (Worthylake et al., 1999). Las células que sobreexpresan HER-2 han mostrado tener activada Src con inhibición de PTEN y un incremento en la actividad AKT (Belsches-Jablonski et al., 2001, Gijssen et al., 2010, Lu et al., 2003, Nagata et al., 2004). Todas las vías de señalización afectadas por HER-2 (Worthylake et al., 1999), están asociadas con proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Li and Li, 2013, Yarden and Sliwkowski, 2001). Por tanto, el desarrollo de fármacos terapéuticos dirigidos específicamente contra HER-2, ha sido la base de la terapia dirigida en cáncer de mama HER2+, con una mejora sustancial de la supervivencia de estas pacientes en la última década (Arteaga and Engelman, 2014). Las terapias dirigidas contra HER-2 utilizadas actualmente incluyen anticuerpos monoclonales como **trastuzumab (Herceptín)** o inhibidores tirosina quinasa (TKIs) como lapatinib (Li and Li, 2013).

Trastuzumab (Herceptin; Genentech/Roche, South San Francisco, CA, USA) es el primer fármaco disponible dirigido contra HER-2. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1), que se une a un epítipo en la región yuxtamembrana IV del receptor HER-2 (**Figura 3**). Su mecanismo de acción no está completamente aclarado, aunque existen varios mecanismos propuestos que incluyen: **a)** regulación negativa del receptor HER-2, lo que se traduce en un descenso de las cantidades disponibles de receptor, **b)** inhibición de la dimerización de la familia HER, inhibiendo así la activación de las cascadas de señalización (Baselga et al., 2001), **c)** reducción de la escisión proteolítica del dominio ECD por la metaloproteasa ADAM 10, previniendo por tanto la formación de receptores HER-2 truncados y activos (Molina et al., 2001, Spector and Blackwell, 2009, Valabrega et al., 2007), **d)** inhibición de

las vías PI3K/AKT y MAPK de supervivencia y proliferación celular (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Spector and Blackwell, 2009), e) la inducción de p27 con la consecuente detención del ciclo celular en la fase G (Lane et al., 2001, Sliwkowski et al., 1999), f) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Clynes et al., 2000, Cooley et al., 1999, Spector and Blackwell, 2009), y g) activación de PTEN (Gijssen et al., 2010, Nagata et al., 2004).

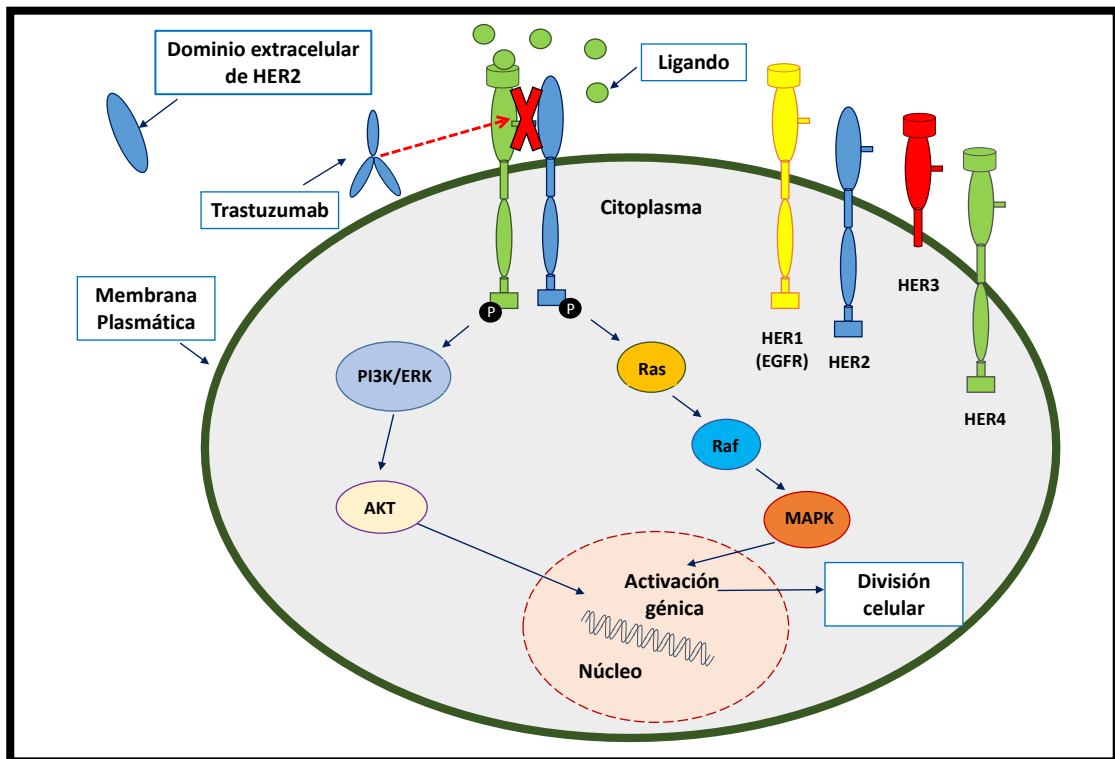


Figura 3. Cascada de señalización de HER2. La familia HER de receptores transmembrana para el factor de crecimiento está compuesta por cuatro miembros (HER1, también conocido como EGFR, HER2, HER3 y HER4). Todos, excepto HER3, poseen un dominio tirosina quinasa intracelular. No se han descubierto ligandos conocidos para HER2. La activación de HER2 ocurre a través de la heterodimerización con uno de los miembros de la familia HER, de los cuales HER2 es el compañero heterodimérico preferido. Tras la activación de HER2, se inicia una cascada de transducción de señales que da lugar a la proliferación celular y a la supervivencia. Trastuzumab bloquea el sitio de unión al ligando de HER2, impidiendo la activación de la cascada de señalización intracelular (Perik et al., 2007).

El uso de trastuzumab como terapia dirigida contra HER-2 ha mostrado tener una considerable eficacia clínica y un aumento en la supervivencia global (SG) de pacientes con tumores de mama positivos para HER-2. Alrededor del 15-20% de los pacientes con cáncer de mama tienen tumores HER-2 positivos, y la amplificación o sobreexpresión de HER-2 ha mostrado ser un importante factor predictivo tanto para la supervivencia global como para el tiempo de recaída en estos pacientes (Gijssen et al., 2010). El trastuzumab ha mostrado inducir la regresión tumoral de cerca de un tercio de los pacientes con cáncer de mama HER-2 positivo metastásico, pero la respuesta es difícilmente sostenible sólo con trastuzumab en monoterapia (Baselga et al., 1999). La tasa de respuesta global a trastuzumab sigue siendo modesta: aproximadamente un 26% de las pacientes responden cuando se administra trastuzumab como terapia única, y entre un 40-60% de las pacientes responden cuando se usa en combinación con la quimioterapia sistémica (Seidman et al., 2008, Slamon et al., 2001, Vogel et al., 2002, Zhang et al., 2011). Muchos pacientes no responden a un tratamiento inicial con trastuzumab (resistencia *de novo*), y otros muchos desarrollan resistencia a trastuzumab después de un tratamiento continuado (resistencia adquirida) (Lan et al., 2005, Piccart, 2008, Zhang et al., 2011). Un 10% de las pacientes desarrollan una recurrencia a distancia después de la quimioterapia adyuvante basada en trastuzumab, y todos los pacientes con cáncer de mama metastásico desarrollan eventualmente una progresión de la enfermedad. Por tanto, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos dirigidos para tratar los tumores mamarios HER2+ (Li and Li, 2013, Nahta and O'Regan, 2010).

En general, se han propuesto dos mecanismos principales de resistencia a trastuzumab: resistencia *de novo* debida a alteraciones genéticas de los receptores tirosina quinasa (RTKs), y resistencia primaria adquirida debida a la activación de vías de señalización alternativas al receptor tirosina quinasa, que compensan la inhibición de HER-2 tras el tratamiento con trastuzumab (Zhang et al., 2011). Los mecanismos de resistencia más frecuentes incluyen la activación constitutiva de la vía de la fosfatidilinositol3-quinasa (PI3K) (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Nahta and Esteva, 2006, Zhang et al., 2011), debido a la deficiencia de PTEN (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Lu et al., 2007, Nagata et al., 2004, Nielsen et al., 2013, Zhang et al., 2011) o a mutaciones en el gen PIK3CA (Berns et al., 2007, Nielsen et al., 2013, Zhang et al., 2011); y también a la acumulación de receptores HER-2 truncados (p95HER-2) que carecen del dominio extracelular de unión a trastuzumab (Anido et al., 2006, Arteaga and Engelman, 2014, Nielsen et al., 2013, Scaltriti et al., 2010, Scaltriti et al., 2007, Zhang et al., 2011). La disminución de la expresión del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina p27Kip1 y un aumento resultante de la actividad Cdk, también se ha asociado con la resistencia a trastuzumab (Arteaga and Engelman, 2014, Nahta et al., 2004, Nielsen et al., 2013, Yakes et al., 2002). Además, de manera más reciente se ha demostrado que los niveles más elevados del gen Src, confieren tanto resistencia *de novo* como adquirida en pacientes que reciben terapia con trastuzumab (Nielsen et al., 2013, Zhang et al., 2011). La sobreexpresión de otros receptores tirosina quinasa como EGFR (Diermeier et al., 2005, Moulder et al., 2001, Ritter et al., 2007, Zhang et al., 2011), el receptor 1 para el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R) (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Lu et al., 2001, Nahta et al., 2005, Zhang et al., 2011), receptores de membrana corregulados con HER-2 como CD44 (Ghatak et al., 2005, Ginestier et al., 2007, Wobus et al., 2001), el receptor tipo 4 para la quimiocina con motivo C-X-C (CXCR4) (Ginestier et al., 2007, Li et al.,

2004), la mucina 4 (MUC4) (Ginestier et al., 2007, Nagy et al., 2005, Ramsauer et al., 2003) o el factor de crecimiento de los hepatocitos (C-MET/MET/HGFR) (Shattuck et al., 2008, Zhang et al., 2011) también contribuyen al desarrollo de resistencia, tanto *de novo* como adquirida. La heterodimerización entre estos receptores tirosina quinasa puede desencadenar de manera importante señales de proliferación celular que confieren resistencia cuando HER-2 es inhibido por trastuzumab (Huang et al., 2010, Nahta et al., 2006, Narayan et al., 2009, Zhang et al., 2011). Se ha descrito también que ER podría actuar como una vía de escape alternativa que daría lugar al desarrollo de resistencia a la terapia dirigida contra HER-2 (Paplomata et al., 2015, Xia et al., 2006).

3. ÓXIDO NÍTRICO, S-NITROSILACIÓN Y CÁNCER

El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica simple que fue considerada un contaminante atmosférico, hasta que a partir de 1987 se demostró que es sintetizado *in vivo* y que actúa como una molécula señalizadora en el organismo (Ignarro et al., 1987). El NO está implicado en una gran cantidad de procesos fisiológicos como la vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, neurotransmisión y actividad antimicrobiana (Knowles et al., 1989, Moncada et al., 1991, Rees et al., 1989, Stuehr et al., 1989). El NO es sintetizado a través del metabolismo de L-arginina a L-citrulina a través de una compleja reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que presenta varias isoformas (Knowles and Moncada, 1994, Marletta, 1994). Las isoformas NOS1 (nNOS) y NOS3 (eNOS), son dependientes de Ca^{2+} -calmodulina y se expresan constitutivamente en células neuronales y endoteliales, respectivamente. La isoforma inducible NOS2 (iNOS) se identificó inicialmente en macrófagos y su unión a la calmodulina es fuerte, incluso en presencia de bajas concentraciones de calcio intracelular

($[Ca^{2+}]_i$), por lo que es independiente de Ca^{2+} y puede producir constantemente altos niveles de NO durante períodos prolongados (Alderton et al., 2001, Kleinert et al., 2004). Se ha demostrado que muchos tipos celulares (hepatocitos, células vasculares del músculo liso, fibroblastos y células epiteliales) expresan una o más de estas isoformas (Marletta, 1994, Villanueva and Giulivi, 2010). El exceso o deficiencia de NO participa en numerosas condiciones fisiopatológicas como artritis, esclerosis, cáncer, diabetes, numerosas enfermedades neurodegenerativas, infarto cerebral e infarto de miocardio (Villanueva and Giulivi, 2010). Muchas de las acciones del NO son mediadas por la estimulación de la hemoproteína soluble guanilato ciclasa (GCs), en la que el NO difunde libremente y se une al grupo hemo de la GCs produciendo el segundo mensajero GMPc (guanosín monofosfato cíclico), que regula el tono vascular o la neurotransmisión (Denninger and Marletta, 1999). Sin embargo, en los últimos años un gran número de estudios ha proporcionado pruebas de que el NO puede regular la señalización celular mediante la modificación de otras proteínas. De hecho, un mecanismo clave por el que el NO regula la funcionalidad de varias proteínas diana es a través de su reacción con un grupo tiol en residuos específicos de cisteína formando un S-nitrosotiol (SNO), en un proceso comúnmente conocido como **S-nitrosilación** (Foster et al., 2009, Stamler et al., 1992).

3.1 Homeostasis de S-nitrosotioles

La alteración del metabolismo de nitrosotioles y de la S-nitrosilación de proteínas juega un papel fundamental en patologías tales como artritis, diabetes, esclerosis múltiple, asma, fibrosis quística, pre-eclampsia, choque séptico y otras (Foster et al., 2009). La funcionalidad de un número cada vez más creciente de proteínas se regula a través de S-nitrosilación, incluyendo aquellas que participan en el metabolismo, proteínas del citoesqueleto,

estructurales, canales iónicos y proteínas reguladoras (Lopez-Sanchez et al., 2012, Lopez-Sanchez et al., 2014, Lopez-Sanchez et al., 2009).

Los S-nitrosotioles (SNOs) se pueden sintetizar mediante la reacción de un tiol con ácido nitroso. Sin embargo, en los sistemas biológicos la especie nitrosilante es el trióxido de nitrógeno (N_2O_3), que se forma a partir de O_2 y NO en ambientes hidrofóbicos, como por ejemplo en membranas biológicas (Liu et al., 1998a) (**Figura 4**).

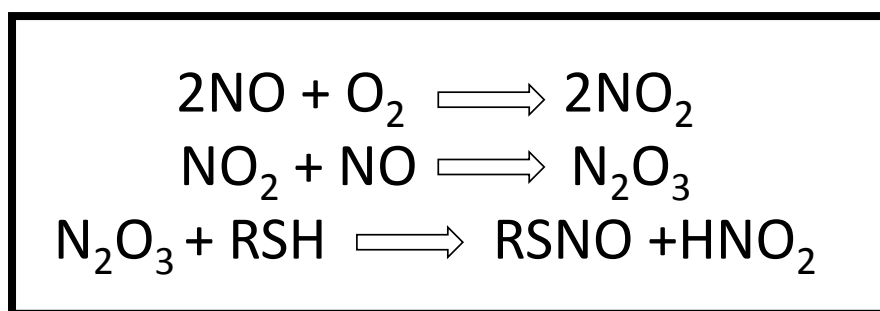


Figura 4. Formación de s-nitrosotioles. R es el sustrato a ser nitrosilado

Es importante destacar que los SNOs también pueden sufrir reacciones de transnitrosilación en las que la función nitroso se transfiere de un tiol a otro por ataque nucleofílico en el átomo de nitrógeno del SNO (Liu et al., 1998b). El grupo de SNO de bajo peso molecular está en equilibrio con el de las S-nitrosoproteínas, y esas reacciones de transnitrosilación son importantes en la captación y en el transporte celular de SNOs (Zhang and Hogg, 2005), así como en el mantenimiento de la homeostasis celular de SNOs (Liu et al., 2001, Liu et al., 2004).

Aunque las reacciones químicas implicadas en la formación de S-nitrosotioles se conocen relativamente bien, no son tan claros los mecanismos que determinan la formación de S-nitrosoproteínas. Numerosos factores (**Figura 5**) como el entorno del tiol de la proteína, la disponibilidad de iones metálicos, la abundancia de ROS, y la proximidad de ambientes hidrofóbicos o de los sistemas que producen óxido nítrico, desempeñan un papel importante en la S-nitrosilación de sulfhidrilos de proteínas (Lopez-Sanchez et al., 2012, Lopez-Sanchez et al., 2014).

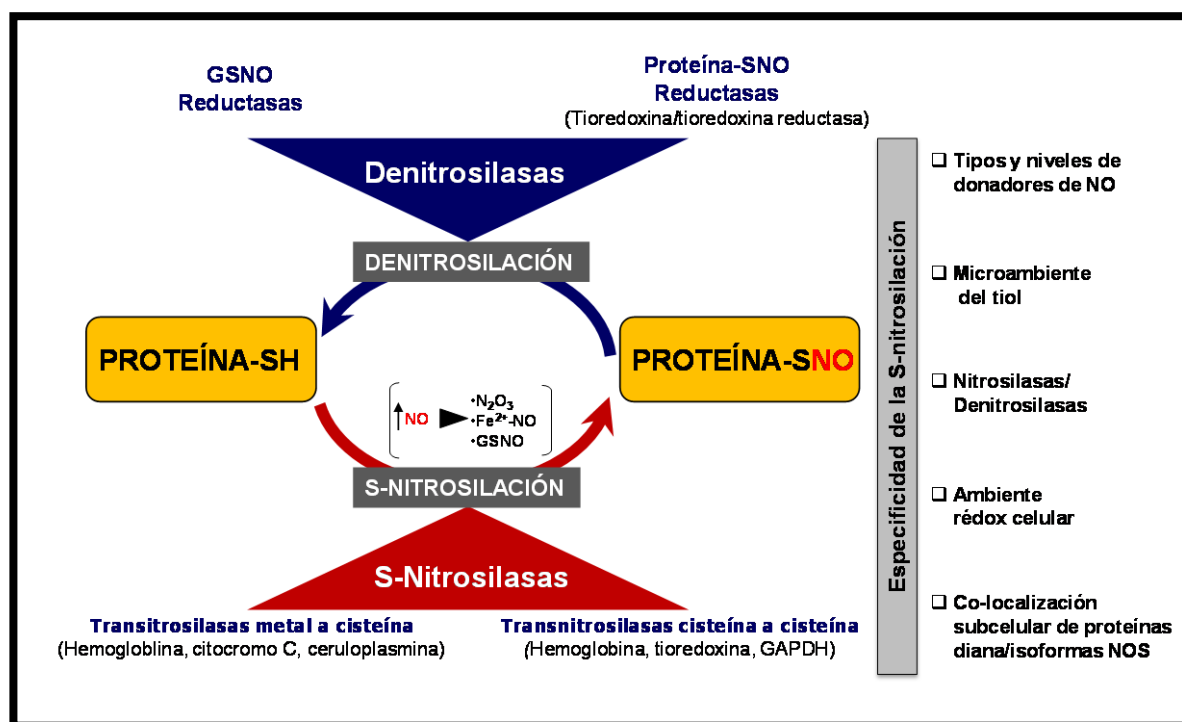


Figura 5. S-nitrosilación y denitrosilación de proteínas. Se muestran los mecanismos que participan en la S-nitrosilación y denitrosilación de proteínas, y que por tanto, contribuyen a la homeostasis de SNOs en las células. La S-nitrosilación aberrante de proteínas producida como consecuencia de la producción de NO y/o la alteración de la homeostasis de SNO está implicada en la patogénesis de numerosas enfermedades. GSNO, S-nitrosoglutatión; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; SNO, S-nitrosotiol [Figura modificada de (Lopez-Sanchez et al., 2014)].

Al igual que la fosforilación y la ubiquitinación, la S-nitrosilación de proteínas es regulable, reversible y específicamente selectiva. Sin embargo, aún no se conocen muy bien los mecanismos que subyacen a la S-nitrosilación selectiva de proteínas y la función de posibles secuencias consenso específicas en estas proteínas diana. Recientemente Jia y colaboradores (Jia et al. 2014) han descrito un complejo heterotrimérico con actividad S-nitrosilasa, dependiente del estímulo inflamatorio, formado por la NOS inducible (iNOS) y las proteínas S100A8 y S100A9, que reconoce específicamente una secuencia consenso específica en proteínas diana susceptibles de ser S-nitrosiladas. Estos resultados indican que la S-nitrosilación es un tipo de modificación postraduccional estímulo-dependiente mediante el reconocimiento selectivo de secuencias diana específicas.

En la homeostasis de S-nitrosotioles desempeñan funciones importantes varios mecanismos enzimáticos dependientes del tipo celular, que influyen en el metabolismo de los nitrosotioles y por tanto en la regulación celular de esta modificación postraduccional (**Figura 6**) (Lopez-Sanchez et al., 2012, Lopez-Sanchez et al., 2014). Uno de estos factores es la actividad nitrosoglutiación reductasa (GSNOR), una enzima muy conservada evolutivamente y que juega un papel fundamental en la homeostasis de los niveles de nitrosotioles (Liu et al., 2004). Estudios en nuestro grupo han demostrado que el tratamiento con S-nitroso-L-cisteína (CSNO) en hepatocitos humanos, induce la actividad GSNOR y la expresión del gen ADH5 (Alcohol deshidrogenasa 5), que codifica para esta enzima (Lopez-Sanchez et al., 2008). Además, también hemos demostrado que la recuperación de la expresión de ADH5/GSNOR en ratas colestásicas explica el beneficioso efecto terapéutico de la inhibición crónica de la síntesis de NO, incluyendo la inhibición de la proliferación de colangiocitos (Lopez-Sanchez et al., 2010a). De manera importante, experimentos realizados en nuestro laboratorio han indicado que el

pretratamiento con mitramicina en células de hepatoma es capaz de inhibir la inducción del gen ADH5/GSNOR y aumentar el nivel de S-nitrosoproteínas en condiciones de estrés nitrosativo (Lopez-Sanchez et al., 2010b). Por otro lado, recientes estudios sugieren que el uso de N6022, un fármaco con potente actividad inhibidora de la actividad GSNOR, tiene efectos beneficiosos en modelos animales de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad inflamatoria intestinal (Colagiovanni et al., 2012, Green et al., 2012, Sun et al., 2011).

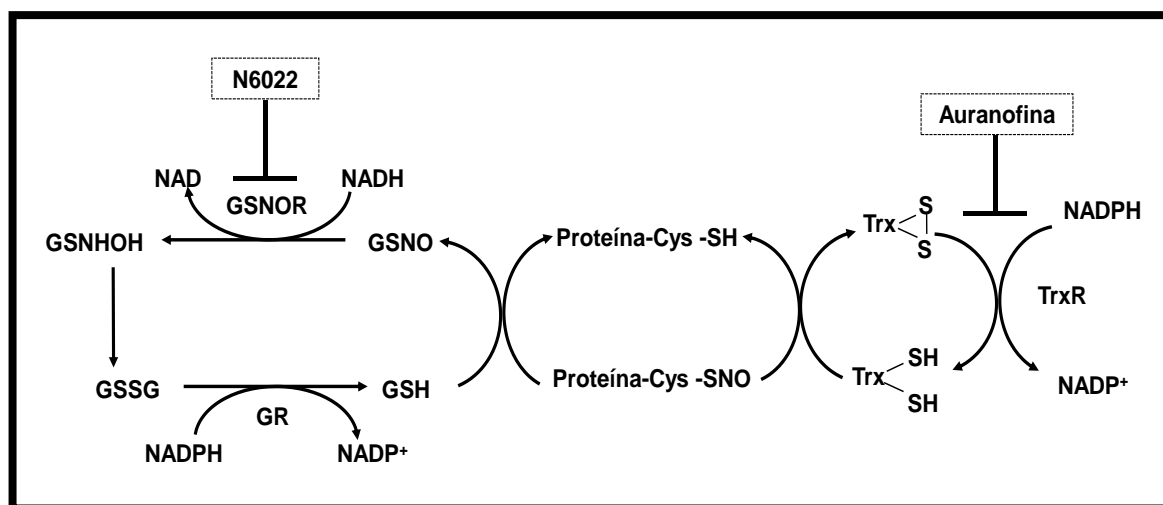


Figura 6. Homeostasis de S-nitrosotioles. Los sistemas enzimáticos S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) y tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TrxR) están directamente implicados en la homeostasis de nitrosotioles (SNOs). Algunos inhibidores específicos de estos sistemas enzimáticos, como auranofina y N6022, permiten alterar experimentalmente el metabolismo de los SNOs.

El sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TrxR) también ha demostrado ser capaz de denitrosilar S-nitrosoproteínas tanto de forma basal como inducida por estímulos (**Figura 6**). Este sistema es capaz de denitrosilar tanto SNOs de bajo peso molecular como proteínas nitrosiladas, (Benhar et al., 2008, Sengupta et al., 2007) y se ha demostrado que cuando las células se tratan con auranofina, un inhibidor altamente específico de la TrxR, se

incrementan los niveles de proteínas nitrosiladas (Benhar et al., 2008, Canas et al., 2012, Lopez-Sanchez et al., 2010b, Tello et al., 2009).

3.2 S-nitrosilación y cáncer

Existe controversia en cuanto al papel del NO en la modulación de la supervivencia de las células tumorales, que podría depender de la concentración y localización del NO, pero también del estímulo apoptótico, del estado redox y del tipo celular (Davis et al., 2001, Jeannin et al., 2008). Normalmente se observan niveles elevados de NO en tejido tumoral comparado con tejido normal y cuando se inhibe específicamente su síntesis se observa un retardo en el crecimiento del tumor (Orulevic and Lala, 1996). El NO está implicado en múltiples vías de señalización intercelulares e intracelulares, y cuando se modifican los niveles de NO, en los distintos tipos tumorales se pueden generar una gran variedad de respuestas. La expresión constitutiva de NO parece jugar un papel fundamental en el establecimiento del fenotipo de las células tumorales, con sus características inherentes de invasión tumoral, metástasis y angiogénesis. De esta manera, bajo concentraciones moderadas de NO, los efectos biológicos de éste podrían considerarse como pro-tumorales, protegiendo a las células de su entrada en apoptosis; sin embargo, a concentraciones elevadas, el NO podría actuar como un potente agente anticancerígeno, promoviendo la apoptosis y la necrosis, e inhibiendo la angiogénesis. Estas propiedades terapéuticas han sido demostradas en modelos preclínicos de cáncer, al disminuir el crecimiento del tumor e incrementar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia (Coulter et al., 2008).

Generalmente nos referimos con cáncer a una enfermedad genética; sin embargo las modificaciones de proteínas determinan los eventos celulares, mediante la regulación o interrupción de las vías de señalización, en particular de aquellas implicadas en muerte celular. Por lo tanto, las modificaciones inducidas por el NO pueden constituir un factor regulador clave, tanto en la tumorigénesis y progresión del tumor como en el tratamiento antitumoral (Aranda et al., 2012, Leon et al., 2008). De hecho, numerosos estudios indican un importante papel de la nitrosilación en cáncer (Aranda et al., 2012), y dada la importancia de la homeostasis de SNOs, en la propia regulación de esta modificación postraducciona, este aspecto debería tenerse en cuenta a la hora de investigar la biología tumoral. Sin embargo, aunque la participación del NO en el proceso de tumorigénesis y progresión tumoral es bien reconocida, hay escasos estudios que abordan la participación de SNOs en cáncer.

III. OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar el papel del estrés nitrosativo y la homeostasis de S-nitrosotioles en cáncer de mama.

Objetivos específicos

1.- Establecer si la alteración de sistemas de defensa frente a estrés nitrosativo, tales como el sistema Trx/Trx reductasa o la GSNOR/Adh5 (nitrosoglutatión reductasa) influye en la respuesta a terapia en cáncer de mama.

2.- Investigar si los parámetros moleculares relacionados con la homeostasis de nitrosotioles pueden constituir marcadores pronósticos o predictivos de respuesta a terapia en cáncer de mama.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizaron cuatro líneas celulares tumorales de cáncer de mama humano bien establecidas: **MCF-7**, **MDA-MB-231**, **BT-474** y **SKBR-3**. Aunque estas cuatro líneas comparten las características de presentar una morfología epitelial y un crecimiento celular de tipo adherente, cada una de ellas presenta unas características moleculares diferentes (Holliday and Speirs, 2011, Papanikolaou et al., 2009). En la **Tabla 3**, se resumen las principales características moleculares de cada una de ellas:

LÍNEA CELULAR	PROCEDENCIA	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES
MDA-MB-231	Colección Europea de cultivos celulares ECACC (UK)	Sigma Aldrich. Madrid, Spain.	92020424	ER-, PR-, HER2-
MCF-7	Colección Europea de cultivos celulares ECACC (UK)	Sigma Aldrich. Madrid, Spain.	86012803	ER+,PR+/-,HER2-
BT-474	Leibniz-Institut DSMZ- German Collection	DSMZ, GmbH	ACC-64 14706	ER+, PR+/-, HER2+
SKBR-3	ATCC Cell Lines Services, Germany	CLS Cell Lines Services, GmbH	CLS Number: 300333 ATCC Number: HTB-30	ER-, PR-, HER2+

Tabla 3. Líneas celulares utilizadas. ER, receptor de estrógenos; PR, receptor de progesterona, HER2, factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2.

Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² (156499, NUNC). Todos los medios empleados se complementaron con los antibióticos correspondientes: penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml). Para las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, el medio empleado fue medio de cultivo MEM con sales de Earle (E15-024, PAA Laboratories GmH, Pasching, Austria), suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) (A15-101, PAA), glutamina 2 mM (M11-004, PAA), 1% de aminoácidos no esenciales (M11-003, PAA) y sus correspondientes antibióticos; estas líneas celulares se sembraron, para su mantenimiento, a una densidad de 375.000 células/frasco. El medio utilizado para las células BT-474 fue medio RPMI 1640 (L0501-500, Biowest), suplementado con 20% de SFB, glutamina 2 mM, sus correspondientes antibióticos y 0.01 mg/ml insulina añadida en el momento de su uso; para su mantenimiento, esta línea se subcultivó a una densidad celular de 1x10⁶ células/frasco. La línea celular SKBR-3, se subcultivó para su mantenimiento a una densidad de 2x10⁶ células/frasco y el medio empleado fue DMEM (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, 11960-044), enriquecido con 4,5 g/L-glucosa y suplementado además con SFB al 10%, 2 mM de glutamina y sus correspondientes antibióticos. Las células se subcultivaron cada tres o cuatro días al alcanzar un 70-80% de confluencia celular.

Para los experimentos de exposición hormonal con 17β-estradiol (E2) en células MCF-7, así como en los experimentos de inmunomarcaje mediante microscopía confocal, el medio utilizado fue MEM ALPHA (41061-029; Gibco, Invitrogen). Este medio se suplementó con SFB tratado con carbón vegetal (para eliminar hormonas esteroideas) al 10%, insulina (10 µg/ml), 1% de aminoácidos no esenciales (M11-003, PAA), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml). En este caso el medio no contenía rojo fenol ya que este compuesto, usado como indicador de pH en

los medios de cultivo, posee semejanza estructural con los estrógenos no esteroideos y posee actividad estrogénica (Berthois et al., 1986).

Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera humificada al 5% de CO₂ y 37°C, renovándose el medio cada 1-3 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se dividieron en dos o más frascos, se criopreservaron o se utilizaron para los diferentes tratamientos. Para ello, tras eliminar el medio de cultivo, las células se lavaron con 7-5 ml de PBS estéril (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, P3813-10PAK, Sigma), para eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina. A continuación, una vez eliminado el PBS, se añadieron 2 ml (0,5 mg/ml) de Tripsina-EDTA (L00410-2242, PAA) para eliminar las uniones de las células al soporte, así como las uniones entre las células. Posteriormente, tras retirar la tripsina, los frascos se incubaron a 37°C durante unos cinco minutos y tras comprobar en el microscopio invertido la dispersión celular, se añadieron 10 ml/frasco de medio de cultivo para inactivar la acción de la tripsina. Las células se recogieron en un tubo y se procedió al recuento celular y a la determinación de la viabilidad celular mediante el test de exclusión del azul Tripán (véase más abajo). Las células se criopreservaron, se sembraron en placas para los distintos tratamientos o se mantuvieron en frascos para continuar su crecimiento.

1.1 Recuento y viabilidad celular

El recuento y la viabilidad celular (> 80%) se determinaron por el Test de Exclusión del Azul Tripán en una Cámara de Neubauer o Hemocitómetro. El azul tripán (Trypan Blue Stain 0.4%; 15250-061, GIBCO, Invitrogen) es un coloide (colorante de exclusión) que se introduce en el interior de las células que presentan daños en su membrana. De manera que cuando se observan las células a través del microscopio invertido, las células muertas aparecerán

teñidas de un color azul intenso, ya que son totalmente permeables al colorante, mientras que las vivas mantendrán su coloración blanco-amarillenta habitual debido a que han retirado activamente el colorante de su citoplasma. Para realizar el recuento se tomó una alícuota de la suspensión celular que se mezcló a partes iguales con una solución de azul tripán (15 µl de azul tripán y 15 µl de suspensión celular). Tras colocar un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, se depositó una gota de la mezcla de células más el colorante, de modo que por capilaridad, el líquido entra hasta llenar el espacio entre la cámara y el cubreobjetos. De esta forma podemos determinar la viabilidad celular:

$$(\text{Células vivas}/\text{Células totales}) \times 100 = \% \text{ Viabilidad}$$

La cámara de Neubauer tiene grabadas en su parte central dos cuadrículas microscópicas con cuatro áreas de 4x4 cuadrados. El volumen de cada zona es 1x1x0.1 ml. Se cuentan las células vivas que hay en cada área, y con la media, se puede calcular la concentración de la suspensión celular según la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ Células/ml} = \text{Células Vivas} \times 10.000 \times 2 \text{ (dilución)}$$

1.2 Criopreservación de las células

Después de levantar con tripsina y contar el número de células, se guardaron aproximadamente 2×10^6 células por criotubo. Para ello, el sedimento de células se resuspendió en SFB con un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) filtrado. Inmediatamente, el criotubo se guardó a -80°C en una caja de isopropanol que permite congelar gradualmente las células, y tras 48h, se trasladó a un contenedor de nitrógeno líquido (-196°C), donde se mantuvo hasta su descongelación. Para descongelar las células, el criotubo se extrajo del tanque de nitrógeno líquido, se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37°C y las células se resuspendieron en medio de cultivo para su posterior cultivo en frascos.

2. TRATAMIENTOS

Después de estimar la viabilidad y el recuento celular con azul tripán, se procedió a la siembra de las células en diferentes placas para la realización de los distintos ensayos y tratamientos. Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 4000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, a un volumen final de 100 μl por pocillo en el caso de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el caso de las líneas celulares BT-474 y SKBR-3, se sembraron 6000 y 5000 células por pocillo respectivamente. Para el ensayo de inmunomarcaje intracelular mediante microscopía confocal, se sembraron 800.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, a un volumen final de 2 ml. Para los ensayos de Biotin-Switch, silenciamiento génico y western-blot, se sembraron 2×10^6 células por placa (59 cm^2), en un volumen final de 6 ml por placa. Para los ensayos de apoptosis celular se sembraron 400.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos.

Tanto el inhibidor específico de la tioredoxina reductasa (TrxR), **auranofina[S-tretilfosfina-oro(I)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosido** (auranofin E1-206, BIOMOL)] como el estrógeno **17β-estradiol** (17 β-Estradiol E2758, SIGMA-ALDRICH), se disolvieron en etanol puro a una concentración de 50 mM utilizada como stock. El antagonista del receptor de estrógenos, **fulvestrant** (Fulvestrant I4409, Sigma-Aldrich) y el inhibidor específico de la actividad nitrosoglutación reductasa (**GSNOR**), **N6022** (N6022 1822, Axon Medchem) se disolvieron en DMSO a una concentración de 50 mM utilizada como stock. El inhibidor específico de p53, **pifitrina-α** (Pifithrin-alpha P4359, Sigma-Aldrich) se disolvió en DMSO a una concentración stock de 54,4 mM. La concentración final de etanol o DMSO fue del 0,01%. El anticuerpo monoclonal **trastuzumab** (comercializado con la marca **Herceptin®** por Roche), se preparó en 7,2 ml de agua para preparaciones inyectables, a una concentración de 21 mg/ml que se alícuotó y conservó a -20°C. Para su uso, se descongelaron las alícuotas necesarias y se diluyeron a la concentración adecuada en medio de cultivo.

La **S-nitroso-L-cisteína (CSNO)** se sintetizó siguiendo el método descrito por Mallis y Thomas (Mallis and Thomas, 2000, Shah et al., 2003). El CSNO se preparó en el momento de su uso, mezclando 440 µl de NaNO₂ 220 mM, 440 µl de L-cisteína 220 mM con 50 µl de HCl 4.0 N. Esta solución se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos, y pasado este tiempo se neutralizó añadiendo 50 µl de NaOH 4.0 N. La concentración final se calculó midiendo la absorbancia a 334 nm usando un coeficiente de absorción molar de 740 M⁻¹ cm⁻¹.

3. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR

La proliferación celular se determinó con el **ensayo XTT** [sodio3'-[1-fenilaminocarbonil)-3,4 tetrazolio]-bis(4-methoxi-6-nitro) benceno ácido hidratosulfónico], utilizando el kit comercial Cell Proliferation Kit II XTT (11465015001, Roche, Basilea, Suiza), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El método se basa en la reducción, por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, de la sal de tetrazolium XTT, de color amarillento, generando formazán, un compuesto soluble de color anarajando. Un incremento en el número de células vivas se traduce en un incremento total en la actividad deshidrogenasa mitocondrial en la muestra. Este incremento se correlaciona con la cantidad de formazán formado, y como sólo se puede producir esta reacción en células vivas, la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables presentes en el ensayo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos por triplicado en medio MEM con sales de Earle al 15% de SFB (para MCF-7 y MDA-MB-231). Para BT-474 y SKBR-3 se usó medio RPMI (20% SFB) y DMEM (10% SFB) respectivamente. Las células se sometieron a los diferentes tratamientos en un volumen final de 100 μ l. En el caso de los tratamientos con Herceptín/trastuzumab (5 μ g/ml) y/o N6022 (0,1 μ M/1 μ M), se redujo el porcentaje de suero al 2%. En todos los casos, después de 48 y 72 horas de tratamiento, se añadió a cada pocillo 50 μ l de la mezcla de reacción XTT hasta alcanzar una concentración final de 0,3 mg/ml, y las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Tras el período de incubación, la solución anaranjada de formazán formada se cuantificó espectrofotométricamente a 450-655 nm, usando un lector de placas (ImarkTM Microplate Reader, Biorad,

Hercules, Ca, USA). En cada ensayo se expresó la proliferación y viabilidad celular en porcentaje respecto a las células no tratadas.

4. ENSAYO DE MUERTE CELULAR O APOPTOSIS

La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana y esta localización puede ser detectada fácilmente mediante Anexina V, que se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluoróforos para detectar apoptosis mediante diversas técnicas como, por ejemplo, citometría de flujo. La Anexina-V conjugada con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) y la citometría de flujo, permite distinguir entre las células apoptóticas y las células normales, ya que la Anexina-V marcada, sólo podrá unirse a las células apoptóticas que tienen los restos fosfatidilserina externalizados. Para distinguir las células apoptóticas de las células necróticas se utiliza un colorante de unión al ADN, el yoduro de propidio (IP). Por tanto, para determinar los niveles de apoptosis o muerte celular se utilizó el kit comercial AnnexinV-FITC (BMS500FI/300; Bender MedSystems Inc, Vienna, Austria), acorde a las instrucciones del fabricante.

Las cuatro líneas celulares utilizadas: MCF-7, MDA-MB-231, BT-474 y SKBR-3, se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de 400.000 células por pocillo. Los medios utilizados fueron medio MEM con sales de Earle (E15-024, PAA) al 15% de SFB para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, y medio RPMI 1640 (20% SFB) y DMEM (10% SFB) para BT-474 y SKBR-3 respectivamente. Transcurridas 24 horas de incubación bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂, las células se sometieron a los

diferentes tratamientos, de 48 horas de duración. En el caso de los tratamientos con Herceptín/trastuzumab (5 $\mu\text{g/ml}$) y/o N6022 (0,1 $\mu\text{M}/1 \mu\text{M}$), se redujo el porcentaje de suero al 2%. Tras 48 horas de incubación con los distintos tratamientos, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y se resuspendieron en 195 μl de tampón de unión (1X), mezclado con 5 μl de ANV-FITC durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de este marcaje, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 190 μl de tampón de unión (1X) más 10 μl de Ioduro de Propidio (IP). Los análisis se realizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (FACS, Becton Dickinson, Biosciences, San José, California, USA) para cuantificar el porcentaje de células apoptóticas.

5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

La cuantificación del contenido de ADN mediante el uso de colorantes específicos de unión, como el IP y la citometría de flujo, permite el análisis del ciclo celular. Dado que la unión de IP es estequiométrica, las células en fase S contienen más ADN que aquellas en fase G1 y mostrarán más unión de este colorante, mientras que células en fase G2 mostrarán aproximadamente el doble de tinción. Para llevar a cabo el análisis del ciclo celular las células BT-474 y SKBR-3 se sembraron a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se sometieron a los tratamientos correspondientes. Tras 48 horas de tratamiento, las células ($0.5-1 \times 10^6$ células) se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS. A esta mezcla de células se le añadió lentamente, y gota a gota, etanol frío al 100 %, se agitó suavemente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 200 x g, a 4°C durante 5 minutos, se resuspendieron en PBS conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de IP más 100 $\mu\text{g/ml}$ RNasa A y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. El análisis y la

medición de la fluorescencia de IP se realizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

6. ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT

6.1 Obtención de lisados celulares

Las células cultivadas en placas de 60 mm se recogieron tras el tratamiento en 1 ml de PBS fresco, mediante un rascador y se centrifugaron a 300 x g y 4°C durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en tampón de lisis. Para el lisado total de las células se usó 50 mM Tris-HCl pH de 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), 1 mM EGTA (ácido etilén-glicol tetraacético), 1.5 mM MgCl₂ y 10% de glicerol. En el momento de su uso este tampón de lisis se complementó con 1% de NP40 (Nonidet-P40, Igepal), 0.1M ditioneitol (DTT), 0.1M PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y un cóctel inhibidor de proteasas (39102, SERVA, Heidelberg, Alemania) y de fosfatasa al 1% v/v [Phosphatase Inhibitor Cocktel 2 (For Tyrosine Protein Phosphatases, Acid and Alkaline Phosphatases; P5726, Sigma Aldrich); Phosphatase Inhibitor Cocktel 3 (For Serine/Threonine Protein Phosphatases and L-lysozymes of Alkaline Phosphatases; P0044, Sigma Aldrich)]. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 4°C y tras su centrifugación a 10.000 x g, a 4°C durante 15 minutos, se recogieron los sobrenadantes, que se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

En el caso de la determinación de la expresión génica de ER- α en diferentes fracciones celulares (nuclear y citosólica) se usaron dos tampones de lisis diferentes, uno de baja fuerza iónica (tampón A) para separar la fracción citosólica, seguido de otro tampón de alta fuerza iónica (tampón B)

para separar la fracción nuclear. El tampón A, ajustado a un pH de 7.9, estaba compuesto por 10 mM Hepes [4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperizina-etano-sulfónico], 10 mM KCl, 0.1 mM de EDTA y 0.1 mM EGTA; en el momento de su uso se complementó con 0.1M DTT, 0.1M PMSF y un cóctel inhibidor de proteasas y de fosfatasas al 1% v/v. El tampón B, ajustado a un pH de 7.9, estaba compuesto por 20 mM Hepes, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA; en el momento de su uso se complementó con 0.1M DTT, 0.1M PMSF y un cóctel inhibidor de proteasas y de fosfatasas al 1% v/v. Las muestras se resuspendieron en tampón de lisis A y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. A continuación se añadió una solución al 10% de NP40, se agitaron en vórtex durante 10 segundos, y tras centrifugar a 16000 x g durante 5 min a 4°C se recogió el sobrenadante (fracción citosólica) que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su uso. Por otro lado, el sedimento se resuspendió en tampón de lisis C y se mantuvo en hielo durante 15 minutos, agitándolo con el vórtex repetidas veces. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 5 minutos (18000 x g 4°C) y se recogió el sobrenadante (fracción nuclear) que se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

6.2 Determinación de la concentración de proteína

El contenido de proteína se determinó mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo colorimétrico de la casa comercial Bio-Rad (Biorad Protein Assay, 500-0001; Hercules, California, EEUU). Esta técnica se basa en la adición de un colorante de naturaleza ácida (Coomassie Brilliant Blue G-250) que reacciona con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables con un pico de absorbancia a 595 nm. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y la absorbancia a 595 nm se obtuvo en un lector de placas (ImarkTM Microplate Reader, Biorad). La concentración de proteína en las muestras se calculó mediante una recta

patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

6.3 Análisis mediante Western-Blot

Para el Análisis mediante “Western Blot” se cargaron 50 µg de proteína de cada muestra y se sometieron a una electroforesis en gradiente de poliacrilamida [4-12% Bis-Tris (Laboratorios Bio-Rad, Inc)], usando el sistema CriterionTM XT (Laboratorios Bio-Rad, Inc). Para ello se mezcló 50 µg de proteína con tampón de carga [XT Sample Buffer (4X) (Laboratorios Bio-Rad, Inc)], cuya composición es: glicerol (35-50%), litio dodecil sulfato (5-10%) y Tris (hidroximetil) aminometano (5-10%); y agente reductor [XT Reducing Agent (20X) (Laboratorios Bio-Rad, Inc)] compuesto por: Tris (carboxietil) fosfina hidroclorehídrico [TCEP (•HCL)] (20-35%) y cloruro de sodio (NaCl) (5-10%). El volumen final de la mezcla fue de 30 µl. En el caso de la inhibición de la expresión génica de ER- α mediante su siRNA específico, la electroforesis se realizó con el sistema Mini-PROTEAN[®]Tetra System (Biorad) en geles en gradiente de poliacrilamida [4-20% Bis-Tris (Biorad)]. Para ello se mezcló 50 µg de proteína con tampón de carga 10x, cuya composición es: Tris HCl 1M pH 6.8, glicerol 33%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, azul de bromofenol 2% y β -mercaptoetanol 10%. El volumen final de la mezcla fue de 30 µl. La mezcla se llevó a ebullición a 96°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Una vez montado el sistema de electroforesis, se cargaron las muestras y se cubrieron con tampón de electroforesis (Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM y 0.1% SDS; US Biological). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 200 V y a una intensidad de corriente constante de 85 mA.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia semiseco trans-blot (Trans-Blot SD, Laboratorios Bio-Rad, Inc), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la transferencia, el gel, las membranas y el papel Wathman (Extra Thick Blot Paper, Laboratorios Bio-Rad, Inc) se equilibraron durante 5 min en buffer de transferencia 1x (Tris Base 50 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.02% y 20% de metanol). La transferencia se realizó durante 1 hora a 230 mA, no superando el voltaje los 25 voltios. Para verificar la igualdad de concentración de proteína entre las distintas muestras, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (0.1% Ponceau disuelto en agua con un 5% de ácido acético) durante 5 min, lavando posteriormente con agua destilada para eliminar los restos de colorante hasta que los carriles fueron visibles. Posteriormente se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con TTBS [Tris 20 mM; Tween 20 0.2% (v/v); NaCl 150 mM; a pH 7.5; US Biological], para proceder a continuación con el bloqueo de la membranas.

Mediante el bloqueo de la membrana se evitan uniones inespecíficas de los anticuerpos, evitando un elevado ruido de fondo o falsos positivos. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente, y en agitación, con BSA al 3% en TTBS en el caso de análisis de proteínas fosforiladas [pAkt (Ser) y pErk] y con leche al 5% (Biorad) para el estudio de proteínas no fosforiladas (ciclina D1 y ER- α). En el caso del análisis por Biotin-Switch, la membrana se bloqueó con leche al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se realizaron tres lavados de 5 min con TTBS y se incubó la membrana con los anticuerpos primarios contra las proteínas de interés, diluidos en TTBS durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados así como el peso molecular de las bandas detectadas, se indican en la **Tabla 4**.

Después de realizar otros lavados de 5 minutos con TTBS, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios unidos a enzimas, que reconocen al anticuerpo primario. En concreto, se utilizaron **anti-IgG de conejo** (sc-2004) o **anti-IgG de ratón** (sc-2060) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP; Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:5000. Las membranas se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se lavaron nuevamente las membranas, tres lavados de TTBS durante 5 min. Los inmunocomplejos se detectaron mediante quimioluminiscencia [ECL Plus Western Blotting Detection System (PRPN 2132) y ECL Advance Western Blotting Detection Kit (RPN 2135), GE HEALTHCARE Life Sciences, Little Chalfont, UK]. Para ello se incubaron las membranas durante 5 minutos a temperatura ambiente. En algunos casos se realizó un “stripping” de la membrana para eliminar los anticuerpos y volver a analizar la membrana con otros anticuerpos. Para ello, se preparó una solución acuosa de SDS al 2% y se calentó a 95°C. Una vez alcanzada esta temperatura se realizaron tres lavados de la membrana de 5 min con esta solución y a continuación se lavó de nuevo la membrana, pero esta vez con TTBS, eliminando así los restos de SDS. De este modo, se pudo comenzar de nuevo el proceso de bloqueo, marcado y revelado de la membrana.

Anticuerpo primario	Referencias y casa comercial	Monoclonal	Policlonal	Dilución
Anti-fosfo-Akt (Ser 473)	587F11 Cell Signaling	Sí (ratón)	No	1:1000
Anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E Cell Signaling	Sí (conejo)	No	1:2000
Ciclina D1	DCS6 Cell Signaling	Sí (ratón)	No	1:2000
Receptor de estrógenos α	62A3 Cell Signaling	Sí (ratón)	No	1:1000
P53	1C12 Cell Signaling	Sí (ratón)	No	1:1000
Anti-fosfo-ER α (Thr311)	A300-BL1667 Bethyl Laboratories	No	Sí (conejo)	1:1000
TFIIB	C-18: sc-225 Santa Cruz Biotechnology	No	Sí (conejo)	1:500
Actina	I-19: sc-1616 Santa Cruz Biotechnology	No	Sí (cabra)	1:1000
Anti-Biotin Clone	BN-34 (B7653) Sigma-Aldrich	Sí (ratón)	No	1:2500

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección de proteínas.

7. ANÁLISIS DE QUINASAS DE SEÑALIZACIÓN CON EL ARRAY DE ANTICUERPOS PATHSCAN ARRAY

El array de anticuerpos (#7982, Cell Signaling Technology, USA) se incubó con 75 µg de proteína a partir del lisado celular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la incubación de las muestras, se detectaron en la membrana de nitrocelulosa las proteínas fosforiladas mediante quimioluminiscencia usando el equipo ImageQuantTM LAS4000 (Luminescent Image Analyzer). La quimioluminiscencia relativa de cada spot se cuantificó mediante densitometría usando el programa Quantity One. Los datos experimentales proceden de tres experimentos independientes normalizados con los controles negativos incluidos en el array y expresados como media ± SEM (error estándar de la media).

8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS: MÉTODO BIOTIN-SWITCH

La detección de proteínas S-nitrosiladas se realizó mediante la aproximación metodológica denominada Biotin-Switch (**Figura 7**) descrita inicialmente por Jaffrey y colaboradores (Jaffrey et al. 2001).

Las células se sembraron en placas de 59 cm² a una densidad de 2x10⁶ células por placa y se sometieron a los correspondientes tratamientos durante 6 horas. Pasado este tiempo se procedió al lisado total de las células, para ello se usó el Tampón de Lisis ajustado a un pH 7.4 y compuesto por 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM neocuproina (N-1501, Neocuproine, Sigma), 1% v/v Tritón X-100 (058K0073 Sigma-Aldrich); en el momento de su uso se complementó con 0.1M PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y un cóctel inhibidor de proteasas y de fosfatasa al 1% v/v. A este tampón también se le añadió N-etilmaleimida (N-Ethylmaleimide

E3876-56, Sigma- Aldrich) a una concentración final de 5 mM para bloquear los tioles libres durante la homogenización y prevenir su transnitrosilación *ex vivo*. En los lisados usados como control positivo se excluyó la N-etilmaleimida de la solución para posibilitar la S-nitrosilación *in vitro* con 1 mM de GSNO.

Los lisados celulares se ajustaron a 100 µg de proteína por ml de tampón de lisis (volumen total 100 µl). En el caso del control positivo, se mezcló 100 µg de muestra con 10 µl de GSNO 10 mM (S-nitrosoglutathione, N4148, Sigma-Aldrich) para obtener una concentración final de 1 mM. Las muestras se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad. Tras el período de incubación, las muestras se mezclaron con 3 volúmenes de solución de bloqueo [9 volúmenes de tampón HEN (250 mM HEPES pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1M neocuproina), 1 volumen de SDS (25% v/v en H₂O) y 0.1 volúmenes de metil metanotiosulfonato (MMTS, 20875; Sigma-Aldrich)] preparado a partir de una solución madre disuelta en DMF (N,N-dimetilformamida, 200-679-5, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 50°C durante 1 hora en agitación. El SDS y la temperatura a 50°C aseguran que todos los tioles de la proteína sean expuestos para su bloqueo con MMTS. Tras la etapa de bloqueo, el MMTS debe ser eliminado para impedir su interferencia con los tioles que se forman en la posterior reducción de los S-nitrosotioles de la proteína con ascorbato sódico. Para ello, las proteínas se precipitaron 2 veces con 2 volúmenes de acetona a -20°C, incubando durante 20 minutos y centrifugando a 2000 x g durante 10 minutos.

En el siguiente paso, los nitrosotioles se redujeron y marcaron específicamente con biotina. Para ello, los precipitados obtenidos anteriormente se resuspendieron en 60 µl de tampón HENS (250 mM HEPES pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproina y 1% SDS) y se añadieron 2 µl de

1.2 M de ascorbato sódico [(+)-Sodium L-Ascorbate, 11140, Sigma-Aldrich], alcanzándose una concentración final de 1.25 mM. A continuación se añadieron 20 μ l de 4 mM de N-[6-(biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (EZ-Link[®] Biotin-HPDP, 21341; Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL) de una solución madre 50 mM en DMF preparada inmediatamente antes), alcanzándose una concentración final de 1 mM, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Las proteínas se volvieron a precipitar con acetona y se resuspendieron en 40 μ l de tampón HENS. Después de este paso, las proteínas S-nitrosiladas están marcadas con biotina y ya no es necesario proteger las muestras de la luz. A continuación se añadió el tampón de carga 10X (no reductor, sin DTT ni β -mercaptoetanol) a las muestras y se guardaron a -80°C hasta el momento de realizar el correspondiente western blot.

Las muestras procedentes del método “Biotin-Switch”, se cargaron en geles con un porcentaje al 10% de acrilamida, usando el sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra System (Biorad). La unión de HPDP-biotina se rompe bajo condiciones reductoras, por lo que las muestras (50 μ g) se mezclaron con tampón de carga (LB) no reductor 10x [Tris HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 30% (v/v), SDS 4%, azul de bromofenol 0.08%] y además no se hirvieron antes de su carga en el gel para prevenir reacciones no específicas de la HPDP-biotina. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 100 V y a una intensidad de corriente constante de 85 mA.

La membrana se bloqueó con leche al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Tras el bloqueo se realizaron tres lavados de 5 min con TTBS y se incubó la membrana con el anticuerpo anti-biotina correspondiente [Anti-biotin Clone BN-34 (B7653); ver **Tabla 4**] durante toda la noche a 4°C, en agitación. Después de realizar otros lavados de 5 minutos con TTBS, las

membranas se incubaron con su anticuerpo secundario correspondiente anti-IgG de ratón (sc-2060), a una dilución 1:5000, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se lavó otra vez la membrana tres veces con TTBS durante 5 min. Los inmunocomplejos se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System y ECL Advance Western Blotting Detection Kit de GE HEALTHCARE Life Sciences, Little Chalfont, UK). Como control de carga se utilizó el anticuerpo β -actina (Ver **Tabla 4**).

9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS MEDIANTE ARRAY DE ANTICUERPOS

Una vez marcadas las proteínas S-nitrosiladas con biotina tras el ensayo Biotin-Switch, se procedió a su captura (150 μ g/5 ml buffer de incubación) con 100 μ l de estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy3 (Streptavidin-Cy3 conjugate, S 6402, Sigma Aldrich), y se incubaron durante 1 hora en los portabojetos recubiertos de nitrocelulosa del array de anticuerpos Panorama Antibody Microarray (XPRESS Profiler 725 Kit, XP725, Sigma-Aldrich), según el protocolo descrito por Numajiri et al. 2011 (Numajiri et al., 2011). Tras 5 lavados en buffer de lavado, se secaron los portaobjetos durante 20 minutos y se escanearon con un scanner de microarrays (Axon 4000B) utilizando las recomendaciones y ajustes descritos por el fabricante del array. Con este array de anticuerpos se pueden detectar a la vez 725 proteínas distintas. En la **Figura 7** se esquematiza el procedimiento seguido.

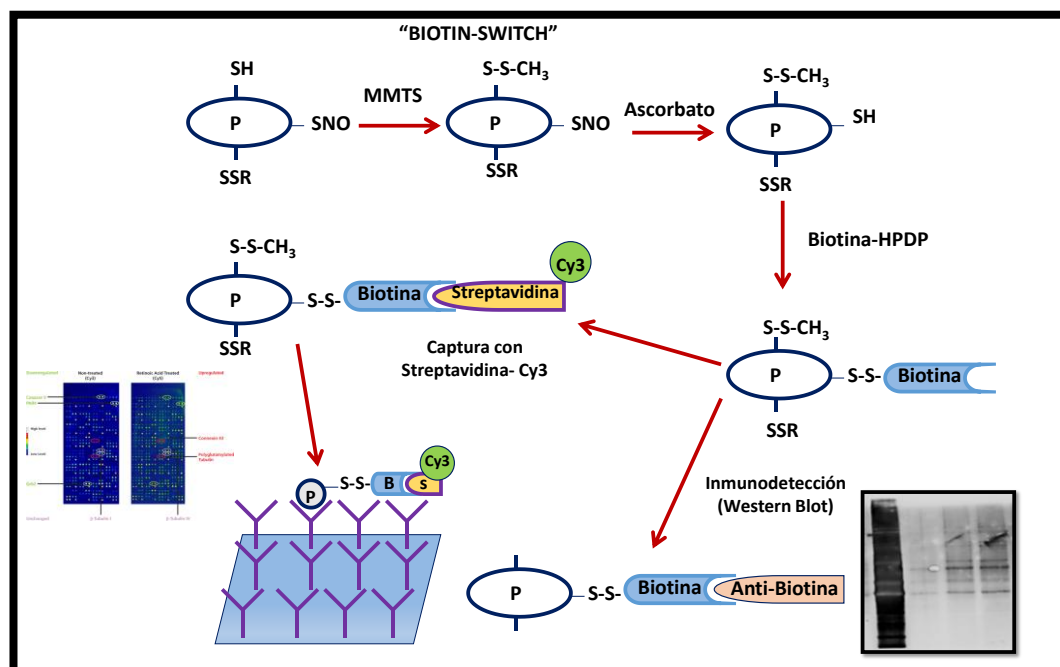


Figura 7. Esquema del método Biotin-Switch y de su acoplamiento a la detección de proteínas S-nitrosiladas mediante Western-Blot o mediante un array de anticuerpos.

10. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN PEQUEÑO DE INTERFERENCIA (siRNA)

Para inhibir específicamente la expresión génica de ER- α , las células MCF-7 se transfectaron transitoriamente con un ARN pequeño interferente (siRNA) específico para el gen ESR1 (ER- α) durante 24 horas, período tras el cual se realizaron los correspondientes tratamientos con Auranofina (2 μ M) y/o CSNO (100 nM/500 μ M). Los niveles de proteína ER- α , tras silenciar su expresión durante 24 horas con su siRNA específico para ER- α , se determinaron mediante western blot usando el anticuerpo específico.

Para validar el anticuerpo empleado en los estudios inmunohistoquímicos, las células MCF-7 también se transfectaron transitoriamente con un siRNA control (si-C) o con dos siRNAs específicos para el gen TrxR1 (si-TrxR1), y la expresión de TrxR1 se analizó mediante western blot usando el anticuerpo específico en lisados celulares totales.

10.1 Silenciamiento génico y preparación del complejo siRNA

Las células se transfectaron con los siRNAs específicos para ER- α (Hs_ESR1_8 FlexiTube siRNA, SI02781401; QIAGEN, Hilden, Alemania) o TXNRD1 (Hs_TXNRD1_1, SI00050876 y Hs_TXNRD1_2, SI00050883, QIAGEN, Hilden, Alemania) y un control negativo (AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN). El siRNA se disolvió en agua destilada, para obtener una solución stock y se alicuotó a -20°C hasta su uso. En el momento de la transfección, el siRNA se disolvió en medio MEM al 0% de suero, hasta alcanzar la concentración indicada por el fabricante. A continuación, este complejo disuelto en medio sin suero, se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente con el reactivo de transfección Hiperfect Transfection Reagent (301704, QIAGEN, Hilden, Alemania). Pasado este tiempo, las placas se incubaron con el complejo de transfección durante 24-48 horas, período tras el cual se reemplazó el medio para llevar a cabo los diferentes tratamientos en las células transfectadas.

11. INMUNOMARCAJE Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células MCF-7 se sembraron sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro, previamente recubiertos con el sustrato poli-l-lisina (Poly-L-lysine hydrobromide, P1524, Sigma), a una dilución 1:20 en H₂O Milli-Q (mq), en placas de seis pocillos a una densidad de 800.000 células/pocillo, y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Tras el crecimiento de las células sobre los cubreobjetos, se sometieron a los diferentes tratamientos, y transcurridas seis horas de incubación, se procedió al protocolo de inmunomarcaje. Para ello, se aspiró cuidadosamente el medio de cultivo de cada pocillo de la placa, se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS y se procedió a la fijación de las células a 4°C con paraformaldehído al 4% (m/v) (252931.1315, Panreac) diluido en PBS durante 20 minutos. Transcurrido el período de fijación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se procedió al bloqueo y permeabilización. Para el proceso de bloqueo, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS conteniendo 1% BSA (p/v) y 0.3% Tritón X-100 (v/v) (058K0073 Sigma-Aldrich). Tras el período de incubación se aspiró la solución de bloqueo y permeabilización y se incubaron las células durante toda la noche a 4°C y en oscuridad con el anticuerpo diluido en la misma solución de bloqueo y permeabilización. El marcaje fue directo, ya que los anticuerpos usados estaban marcados con fluoróforos. Los anticuerpos usados y sus correspondientes diluciones fueron: [**anti-ER α** (MC-20): sc-542 (Alexa Fluor-488 conjugate, Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:50]; [**anti-p53** (1C12) Mouse mAb (Alexa Fluor 647 Conjugate, Cell Signaling) dilución 1:25]. Tras la incubación durante toda la noche con los anticuerpos, se lavaron las células tres veces durante 5 minutos con PBS y se incubaron durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con el colorante nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate; D3751, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),

a una concentración de 300 nM (previamente alicuotado a -20°C a una concentración utilizada como stock de $10.9\ \mu\text{M}$). Tras esta incubación se procedió a un breve lavado de 5 minutos con PBS y se procedió al montaje. Para el montaje se depositó, con la punta amarilla de una micropipeta, una gota de medio de montaje (glicerol al 70% diluido en PBS) sobre el portaobjetos. A continuación se colocó el cubreobjetos con la superficie de las células en contacto con la gota del medio de montaje, y se presionó ligeramente con papel de filtro para que quedase exclusivamente una fina capa de medio entre el portaobjetos y el cubreobjetos, eliminando el medio sobrante de los bordes. Tras dejar secar, se sellaron los bordes del cubreobjetos sobre el portaobjetos con laca de uñas y se dejó secar. Una vez secadas las preparaciones, se procedió a la visualización de las muestras en el microscopio confocal.

Los análisis se realizaron en un microscopio confocal (LSM 5 Exciter confocal microscope), con el programa ZEN 2008 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) usando un objetivo Plan-Neofluar 40x (AN 1.30), de la unidad de citómica, microscopía e imagen científica de la *Unidad Central de Apoyo a la Investigación Biomédica del IMIBIC*. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa gratuito de análisis de imagen Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

12. ENSAYO DE FORMACIÓN DE MAMOSFERAS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD24/CD44

La expresión de los marcadores de superficie celular CD24 y CD44, en células MCF-7 o en mamíferas, se determinó mediante citometría de flujo. Las células adherentes y las mamíferas, se recogieron, se trataron con tripsina, se lavaron en PBS y se marcaron con anticuerpos anti-CD24PE (12-0247; mAb; 1:20) y anti-CD44FITC (11-0441; mAb; 1:100), de la casa comercial eBioscience (eBioscience, San Diego, CA, USA). Se usaron los correspondientes isotipos IgG como controles: Mouse IgG1 K Isotype Control PE (12-4714, 1:20) y Mouse IgG2bK Isotype Control FITC (11-4732, 1:100), también de la casa comercial eBioscience (eBioscience, San Diego, CA, USA). El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

El cultivo de mamíferas se realizó según el método descrito por Karimi-Busheri y Ponti, y colaboradores (Karimi-Busheri et al., 2010, Ponti et al., 2005). Tras el cultivo de las células MCF-7, en condiciones normales de adherencia, en medio MEM con sales de Earle (E15-024, PAA) al 15% SBF, las células se tripsinizaron y se contaron. Posteriormente, las células se sembraron a densidad clonal (1 cél/μl) en placas de seis pocillos de muy baja adherencia (Ultra Low Cluster Plate 3471, Costar, Corning NY, USA) en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F+12 Ham suplementado con 10 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor), 20 ng/ml EGF (epidermal growth factor), 5 μg/ml insulina, 0.4% BSA (4 mg/ml) y en presencia de 0.5% v/v de metilcelulosa (HSC001, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), para prevenir la agregación celular. Los complementos se añadieron cada dos días, y tras 7 días en cultivo, las mamíferas se contaron, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a

temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. El pellet de mamíferas se resuspendió en 1ml de tripsina-EDTA (1X) y se incubó durante 2-5 minutos a una temperatura de 37°C. Pasado este tiempo de incubación, las células se hicieron pasar por una aguja de 22G (0,7 mm x 30 mm de calibre) para asegurar su disgregación, se centrifugaron de nuevo a 300 x g, durante cinco minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugadas las células, tripsinizadas y contadas, se procedió al ensayo de expresión de los marcadores de superficie celular CD24/CD44 mediante el análisis por citometría de flujo.

12.1 Análisis por citometría de flujo de marcadores CD24/CD44

Tras realizar el recuento celular, se lavaron varias veces las células en PBS, para posteriormente resuspender el sedimento celular en 1 ml de solución de lavado/marcaje (1% BSA en PBS). Se volvió a realizar un lavado de cinco minutos y las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes a 4°C y durante 30 minutos. Posteriormente se agitó suavemente en un vórtex y se centrifugó para lavar con 1 ml de PBS, a 600 x g, 5min, 4°C. Tras este último lavado, se resuspendió en 200 µl de PBS y se procedió a la adquisición en el citómetro (FACS, Becton Dickinson).

13. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron en un array de tejidos que incluía 64 tumores distintos de mama (Biochain, Newark, CA, USA). Se usaron secciones de parafina de 4 µm de grosor en portabobjetos recubiertos de poli-l-lisina tras su secado durante 30 minutos a 60°C. Las secciones tisulares se desparafinaron en xilol (2 x 10 minutos), se rehidrataron en etanol a concentraciones decrecientes (desde 100% hasta el 70%; 1 x 5 minutos) y se lavaron con H₂O durante 5 minutos. Posteriormente, las secciones se sometieron a un baño con tampón citrato ChemMate™ Target Retrieval

Solution (Dako, Barcelona, España) a pH 6.0 (TrxR1, ADH5) ó pH 9.0 (ER, p53) a 100°C durante 20 minutos, para desenmascarar los antígenos. Después de lavar las secciones en PBS durante cinco minutos, las muestras se incubaron durante 10 minutos con una solución de peróxido de hidrógeno (Dako) al 10% para bloquear las peroxidasas endógenas. Posteriormente, las secciones se incubaron con los distintos anticuerpos primarios (**Tabla 5**). Para el anticuerpo monoclonal anti-TrxR1 (Santa Cruz Biotechnology) se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y a una dilución de 1:2500. En el caso de los anticuerpos monoclonales anti-ER clone EP1 y anti-p53 clone D07, de la casa comercial Dako, se incubaron durante 1 hora a 4°C, ambos a una dilución de 1:600. Para el anticuerpo policlonal anti-ADH5 (Human protein Atlas, Sigma) la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C, a una dilución 1:10. Tras un lavado de 5 minutos con PBS, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos con el polímero marcado con HRP (DAKO Envision™ System), y seguidamente se incubaron durante cinco minutos con el cromógeno diaminobencidina (DAB). A continuación, los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina durante 10 minutos. Finalmente, tras dos lavados de 5 min con H₂O, las muestras se deshidrataron siguiendo de manera inversa las etapas de rehidratación y se montaron con medio de montaje sintético Eukkit. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio digital Coolscope (Nikon, Tokio, Japón). Los estatus ER y p53 se consideraron positivos cuando mostraron un mínimo de tinción nuclear de un 10% para ER y p53 respectivamente. La expresión de TrxR1 se puntuó semicuantitativamente en: inmunotinción ausente (0), leve (1), moderada (2) o intensa (3). Las secciones se analizaron por una patóloga con reconocida experiencia en el cáncer de mama.

Anticuerpo	Referencias y casa comercial	Monoclonal	Policlonal	Dilución
Anti-TrxR1(B-2)	sc-28321, Santa Cruz Biotechnology	Sí (ratón)	No	1:2500
Anti-ER clone EP1	M3643,Dako	Sí (conejo)	No	1:600
Anti-p53 clone D07	IR616,Dako	Sí (ratón)	No	1:600
Anti-ADH5	HPA044578, Human protein Atlas (SIGMA)	No	Sí (conejo)	1:10

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los análisis inmunohistoquímicos.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes y las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante la prueba paramétrica *Test t de Student*. Las asociaciones entre el estatus del receptor de estrógenos (ER) y HER-2 y las características clínicas se evaluaron por la prueba de chi-cuadrado. Los valores de p se consideraron significativos si eran menores a 0.05. La significación de la diferencia entre las medianas de los datos obtenidos a partir de la base de datos Oncomine se calculó como se describe por McGill y colaboradores (McGill et al. 1978).

V. RESULTADOS

1. EL GRADO DE ESTRÉS NITROSATIVO MODULA LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

1.1 Un estrés nitrosativo severo reduce la proliferación celular en células de cáncer de mama

Para determinar el efecto que el estrés nitrosativo y la alteración de la homeostasis de nitrosotioles, pueda tener sobre el crecimiento de células tumorales, las células de cáncer de mama se sometieron al tratamiento con el nitrosotiol CSNO en ausencia o en presencia de auranofina, que es un inhibidor específico de la actividad tioredoxina reductasa (TrxR). Como puede observarse en la **Figura 8**, el tratamiento con CSNO 500 μ M redujo la proliferación celular en las tres líneas celulares utilizadas, y la inhibición de TrxR potenció este efecto antiproliferativo del nitrosotiol.

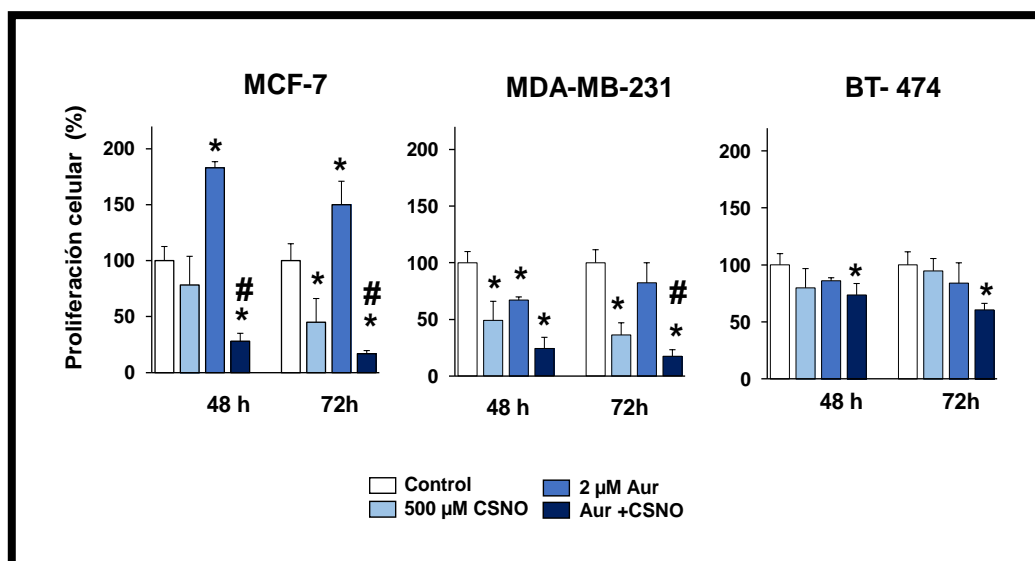


Figura 8. El estrés nitrosativo severo reduce la proliferación celular en células de cáncer de mama. Las células se expusieron a los tratamientos indicados y la proliferación celular se determinó después de 48 y 72 horas. La proliferación celular se expresa como el porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. # $p < 0.05$, comparado con el tratamiento con S-nitrocisteína (CSNO).

En concordancia con estos resultados, cuando las células MCF-7 se sometieron a un estrés nitrosativo severo con CSNO 500 μ M se observó un incremento de las proteínas S-nitrosiladas, detectables mediante el método Biotin-Switch (**Figura 9**). Además, el pretratamiento con auranofina incrementó los niveles de S-nitrosoproteínas en células de cáncer de mama. Por tanto, la nitrosilación masiva de proteínas clave para la supervivencia celular, podría explicar el efecto inhibitorio del estrés nitrosativo severo en células de cáncer de mama.

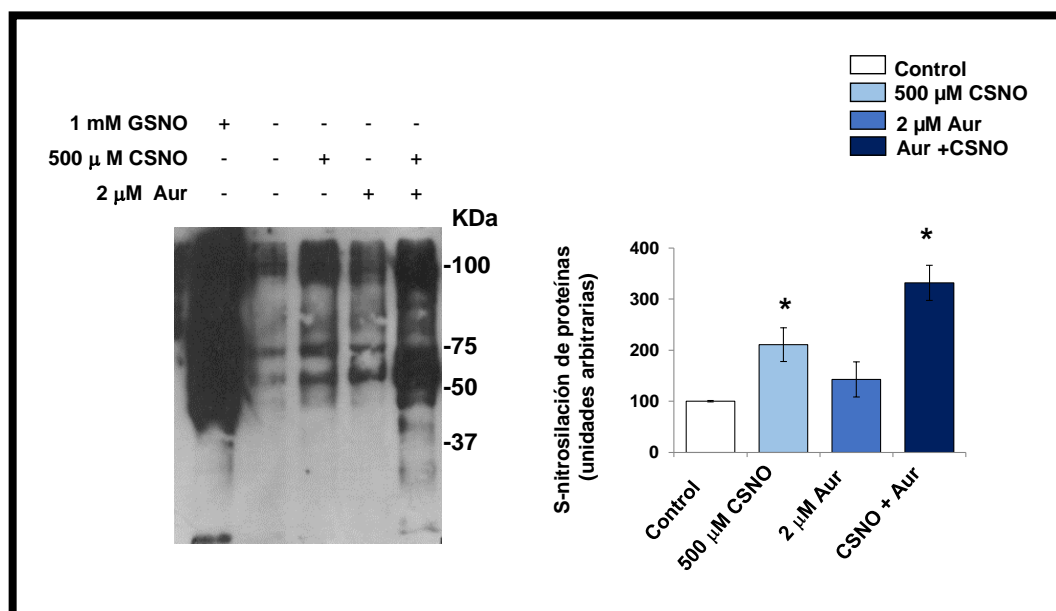


Figura 9. Detección de proteínas S-nitrosiladas en células MCF-7 pretratadas o no con auranofina. Los lisados celulares de células MCF-7, pretratadas o no con auranofina (Aur), y sometidas a los tratamientos indicados, se analizaron mediante el ensayo Biotin-Switch para la detección de proteínas S-nitrosiladas. También se muestra el correspondiente análisis densitométrico del total de bandas proteicas detectadas mediante el método Biotin-Switch y normalizado con la tinción Ponceau del total de proteína. Los datos son medias \pm SEM de la media de tres experimentos independientes. La S-nitrosilación de proteínas mostró un aumento significativo ($*p < 0.05$) comparando el tratamiento con CSNO y Aur+CSNO con las células no tratadas.

1.2 Un estrés nitrosativo moderado incrementa la proliferación celular y supervivencia en células MCF-7

A pesar del efecto antiproliferativo obtenido al alterar la homeostasis de nitrosotioles mediante un estrés nitrosativo severo, en células MCF-7 se observó que la inhibición de TrxR con auranofina indujo un efecto proproliferativo (**Figura 8**). Además, como puede observarse en la **Figura 10**, el tratamiento con auranofina en presencia o ausencia de una menor dosis del nitrosotiol (CSNO 100 nM) incrementó la proliferación en células MCF-7 (ER+), pero no en células MDA-MB-231 (ER-, p53 mut) o BT-474 (ER+, p53 mut). Por tanto, aunque un estrés nitrosativo severo es capaz de promover una detención del crecimiento en células de cáncer de mama, un estrés nitrosativo moderado es capaz de promover el crecimiento de las células tumorales en un contexto ER+ y p53 no mutado.

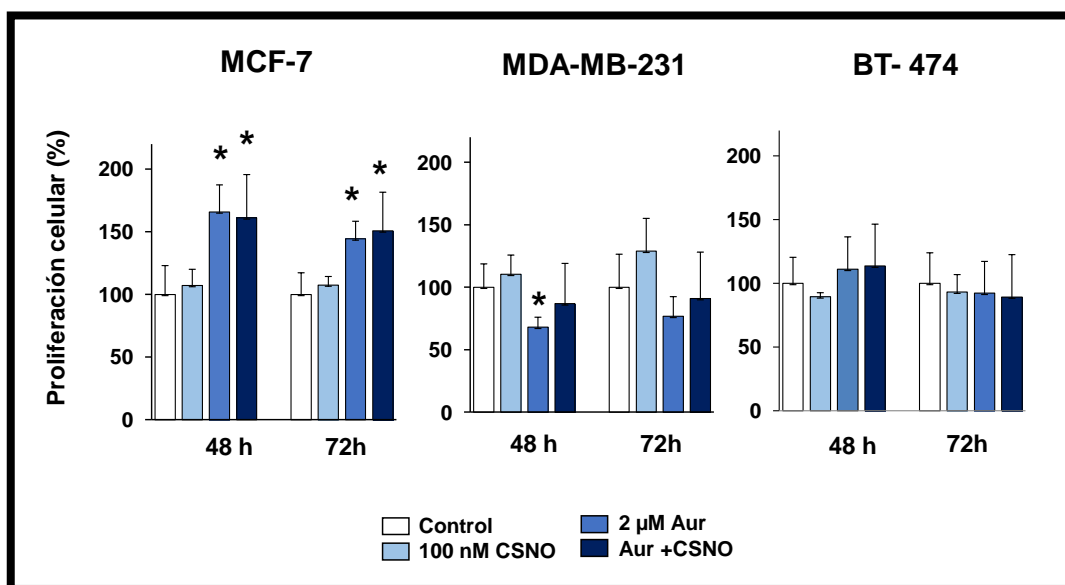


Figura 10. El estrés nitrosativo moderado incrementa la proliferación celular en células MCF-7. Las células se expusieron a los tratamientos indicados y la proliferación celular se determinó después de 48 o 72 horas. La proliferación celular se expresa como porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas.

Para profundizar en los mecanismos implicados en el aumento de la proliferación de las células de cáncer de mama sometidas a un estrés nitrosativo moderado, se analizaron rutas de señalización celular implicadas en proliferación y supervivencia.

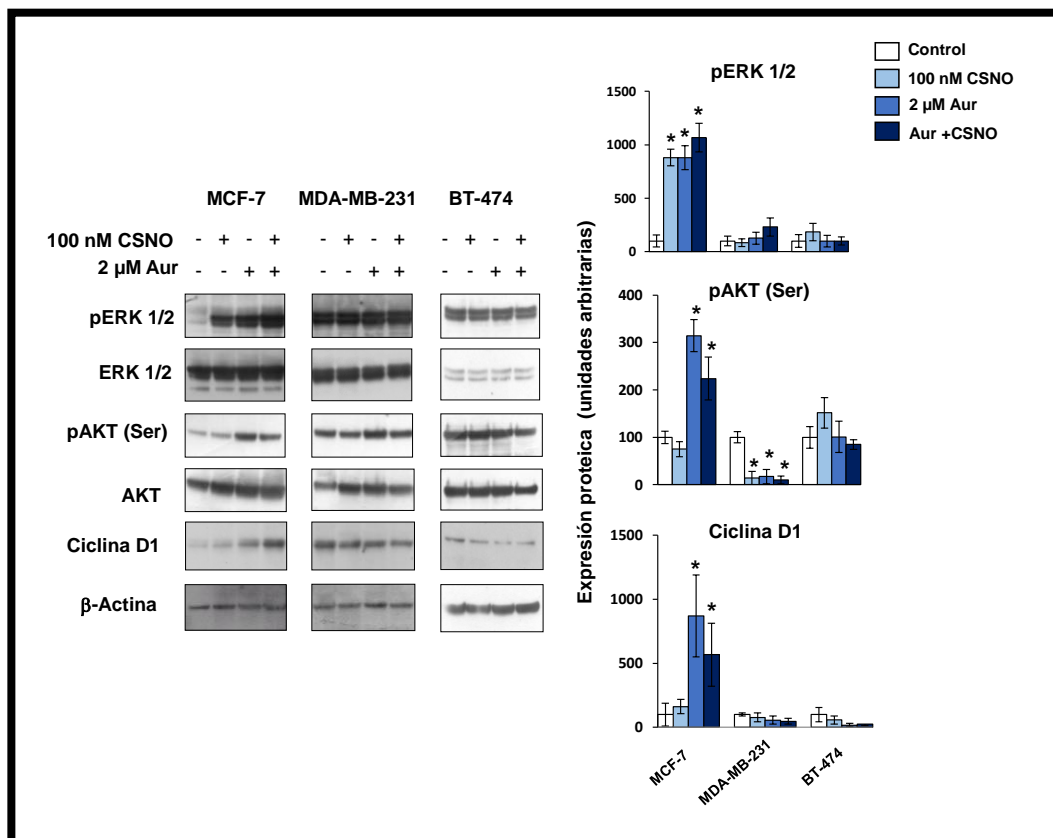


Figura 11. Un estrés nitrosativo moderado incrementa la señalización de ERK1/2, AKT y la expresión de ciclina D1 en células MCF-7. Las células se expusieron durante 6 horas a los tratamientos indicados y los niveles de fosforilación de AKT y Erk1/2, así como la expresión de ciclina D1 se determinaron mediante Western-Blot usando los anticuerpos específicos. Los análisis densitométricos correspondientes de las bandas proteicas detectadas en los western blot se normalizaron usando los niveles de expresión de β-actina. Los datos obtenidos son media ± SEM de tres experimentos independientes. *p < 0.05, comparado con células no tratadas.

El análisis mediante Western-Blot de las formas fosforiladas de ERK 1/2 y AKT, reveló que el tratamiento con CSNO 100 nM, con auranofina o con la combinación de ambos, incrementó los niveles de las formas fosforiladas de ERK 1/2 y AKT únicamente en células MCF-7 (**Figura 11**). De manera notable, estos tratamientos también indujeron en células MCF-7 la expresión de la proteína ciclina D1 (**Figura 11**), una proteína necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. Por tanto, en células MCF-7 (ER+), bajo condiciones de estrés nitrosativo moderado, se induce la activación de rutas intracelulares de señalización encaminadas a la supervivencia y proliferación celular.

Para confirmar la activación de las vías de supervivencia en células MCF-7 tras sufrir un estrés nitrosativo moderado, se analizó la tasa de muerte celular por apoptosis en las tres líneas celulares.

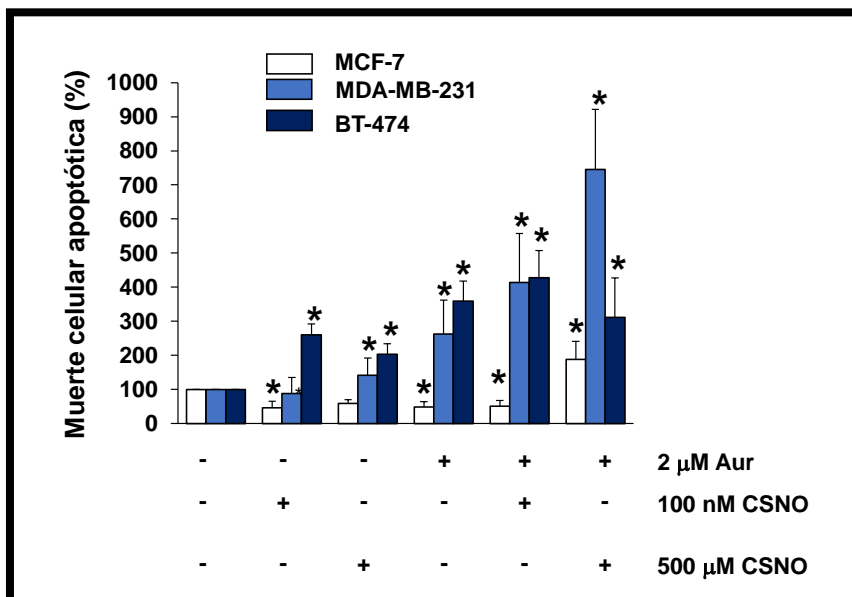


Figura 12. Un estrés nitrosativo moderado disminuye la tasa de muerte celular por apoptosis en células MCF-7. Las células se expusieron a los tratamientos indicados y se determinó la tasa de muerte celular apoptótica. El porcentaje de células apoptóticas en los controles fue 1.74, 2.4 ± 0.94 y 2.2 ± 1.04 para células MCF-7, MDA-MB-231 y BT-474 respectivamente. La muerte celular apoptótica se expresa como el porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas.

De manera significativa, sólo en células MCF-7, pero no en células MDA-MB-231 o BT-474, el tratamiento con auranofina o el tratamiento con CSNO 100 nM redujo la tasa de apoptosis, confirmando la activación de vías de supervivencia en estas células. Sólo cuando se indujo una S-nitrosilación masiva de proteínas, se observó un aumento en la tasa de muerte por apoptosis (**Figura 12**).

2. LA FUNCIONALIDAD DE ER- α Y UNA PROTEÍNA p53 ACTIVA SON REQUISITOS NECESARIOS PARA LA PROLIFERACIÓN CELULAR CAUSADA POR UN ESTRÉS NITROSATIVO MODERADO EN CÉLULAS MCF-7

El efecto proliferativo causado por el estrés nitrosativo moderado en células de cáncer de mama no se observó en aquellas células que no expresaban ER- α (MDA-MB-231), o aun expresándolo portaban una mutación en p53 (BT-474). Por tanto, el papel de ambas proteínas se exploró mediante el tratamiento de células MCF-7 con fulvestrant (FV), que es un antagonista del ER- α , o el tratamiento con pifitrina- α (PFT- α), que es un inhibidor de p53. Como puede observarse en la **Figura 13**, el pre-tratamiento de las células MCF-7 con fulvestrant 100 nM o con 10 μ M de PFT- α , eliminó por completo el efecto proliferativo del estrés nitrosativo moderado. Por tanto, la funcionalidad de ER- α y una proteína p53 activa, son requisitos necesarios para la proliferación celular causada por condiciones de estrés nitrosativo moderado en células de cáncer de mama.

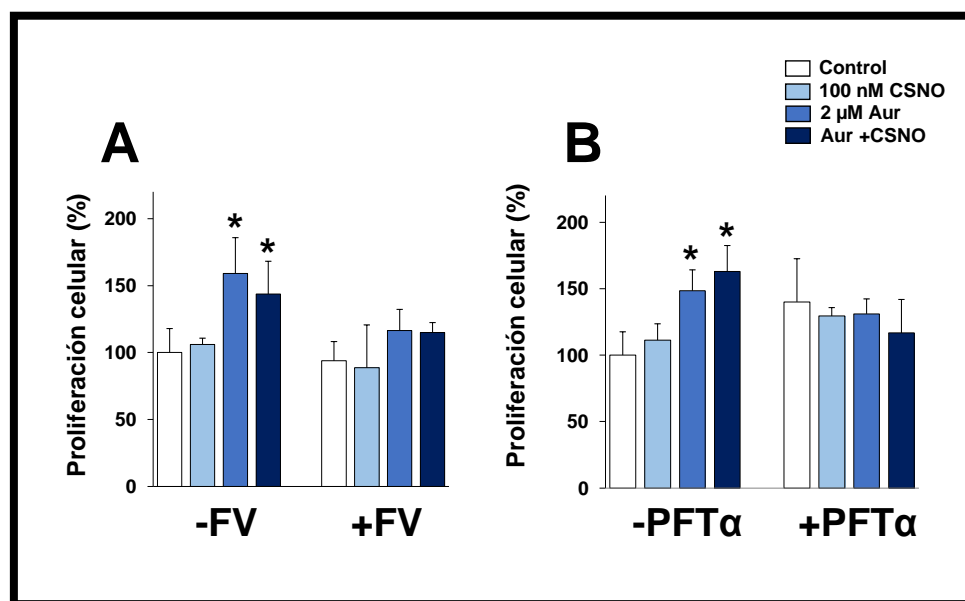


Figura 13. El efecto proliferativo de un estrés nitrosativo moderado es eliminado por un antagonista del ER- α o por un inhibidor de p53. Las células MCF-7 se preincubaron con (A) fulvestrant (FV) 100 nM o (B) pifitrina- α (PFT- α) 10 μ M antes de los tratamientos indicados, y la proliferación celular se determinó después de 48 horas. La proliferación celular se expresa como porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. ER: receptor de estrógenos, Aur: auranofina, CSNO: S-nitroso-L-cisteína.

Para confirmar la implicación de ER- α en el efecto proliferativo de la auranofina en células MCF-7, se llevaron a cabo una serie de experimentos con un siRNA específico para el gen ESR1 (ER- α). Como se observa en la **Figura 14A**, el silenciamiento específico de la expresión del gen ESR1 (si-ER α) en células MCF-7, redujo de manera notable los niveles de expresión de la proteína ER- α . En la **Figura 14B**, se muestra que bajo estas condiciones donde ER- α no se expresa, se eliminó el efecto proliferativo de la inhibición de la TrxR en presencia o ausencia de CSNO 100 nM.

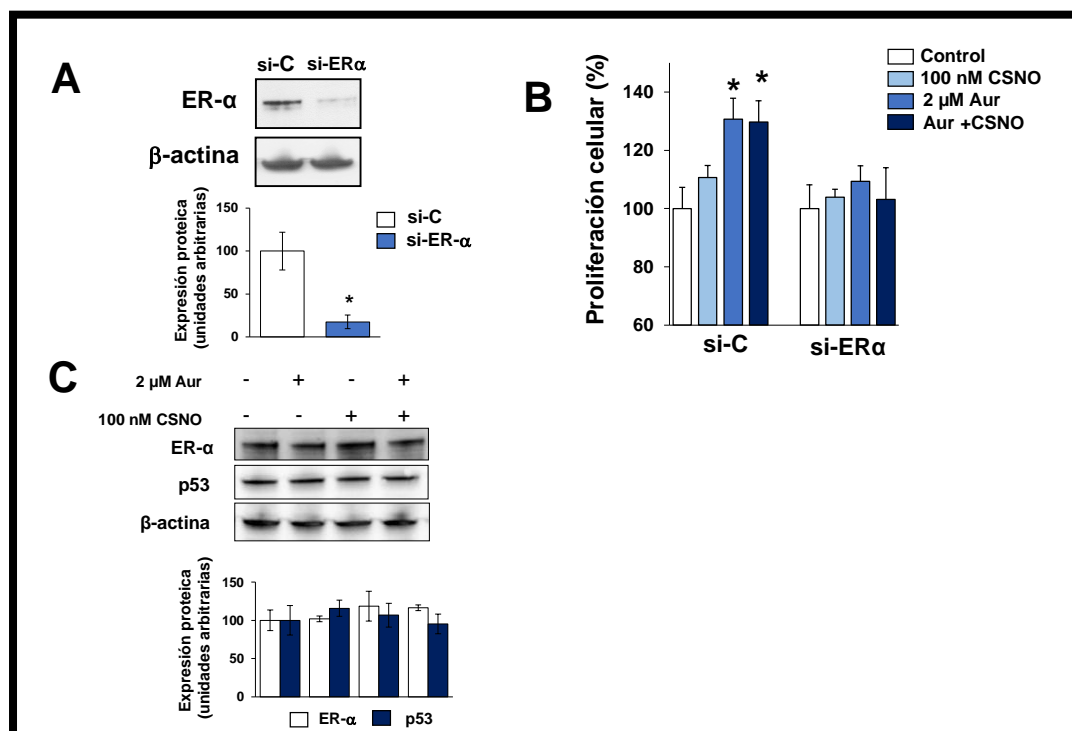


Figura 14. El efecto proliferativo del estrés nitrosativo moderado se eliminó mediante el silenciamiento específico de ER- α en células MCF-7. (A) Las células se transfectoron transitoriamente con un siRNA control (si-C) ó con un siRNA específico (si-ER α), y la expresión de ER- α se analizó mediante western blot en lisados celulares totales. Los análisis densitométricos correspondientes de las bandas de proteínas detectadas se normalizaron con la banda de β -actina. Los datos son medias \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, comparado con células transfectadas con si-C. (B) Las células transfectadas transitoriamente con si-C ó si-ER α , se sometieron a los tratamientos indicados, y la proliferación celular se determinó después de 48 horas de tratamiento. La proliferación celular se expresa como el porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. (C) Las células se sometieron a los tratamientos indicados y la expresión de ER- α y p53 se analizó mediante western blot. Los correspondientes análisis densitométricos de las proteínas detectadas se normalizaron con la banda de β -actina. Los datos son medias \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas.

Por tanto, es necesaria la expresión del receptor estrogénico ER- α en células tumorales de mama para que se produzca una proliferación incrementada a causa de un estrés nitrosativo moderado. Además, la exposición de células MCF-7 a auranofina, en presencia o ausencia de CSNO, no alteró significativamente los niveles de las proteínas ER- α ó p53 (**Figura 14C**). Estos datos sugieren que el estrés nitrosativo moderado aumenta la capacidad proliferativa de células de cáncer de mama ER+ a través de mecanismos en los que se altera la funcionalidad de ER- α y/o p53, pero no los niveles de expresión de ambas proteínas.

3. LA DEPRIVACIÓN ESTROGÉNICA EN CÉLULAS MCF-7 POTENCIA LA PROLIFERACIÓN EN CONDICIONES DE ESTRÉS NITROSATIVO MODERADO

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores sugieren que el incremento de la proliferación observado en células ER+/p53 no mutado, cuando se exponen a condiciones de estrés nitrosativo moderado, podría estar relacionada con una respuesta similar a la estrogénica. Por tanto, se realizaron una serie de experimentos donde las células MCF-7 se privaron de cualquier estímulo estrogénico antes de su exposición a los distintos tratamientos. Para ello, las células se mantuvieron durante 24 horas en un medio sin rojo fenol y en presencia de suero tratado con carbón vegetal, antes de su tratamiento con auranofina y/o CSNO 100 nM. Como puede observarse en la **Figura 15**, la privación estrogénica potenció el efecto proliferativo del estrés nitrosativo moderado en células de cáncer de mama. En estas condiciones el tratamiento de las células con CSNO 100 nM incrementó la proliferación celular en un 50%, y cuando las células se trataron con auranofina la proliferación aumentó al doble, en comparación con las células no tratadas.

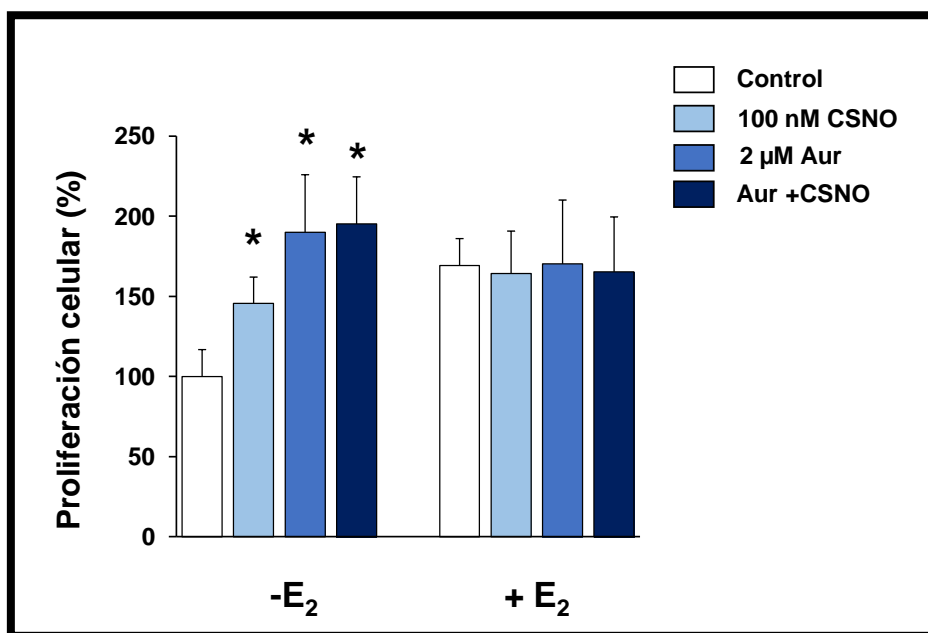


Figura 15. La privación estrogénica incrementa el efecto proliferativo del estrés nitrosativo moderado en células MCF-7. Las células MCF-7 se mantuvieron en medio sin rojo fenol con suero tratado con carbón vegetal, durante 24 horas antes de la exposición con los tratamientos indicados. * $p < 0.05$, comparado con las células no tratadas. Aur: auranofina; CSNO: S-nitroso-L-cisteína, E₂: 17 β -estradiol.

Significativamente, cuando las células se expusieron previamente a estradiol 10 nM, el efecto proliferativo del estrés nitrosativo no se observó (**Figura 15**). Por tanto, estos experimentos indican que el estrés nitrosativo moderado induce una respuesta similar a la estrogénica y sugieren también que el estrés nitrosativo moderado facilita la proliferación celular en cáncer de mama a través de un mecanismo regulado por ER- α .

4. EL ESTRÉS NITROSATIVO EN CÉLULAS MCF-7 ALTERA LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR ER- α

A continuación se decidió investigar si la alteración de la homeostasis de nitrosotioles altera la distribución subcelular de ER- α en células de cáncer de mama. Para este propósito, las células MCF-7 deprivadas de estrógeno se trataron con CSNO 100 nM, auranofina, o la combinación de ambos y la distribución subcelular de ER- α y p53 se analizó mediante microscopía confocal (**Figura 16**).

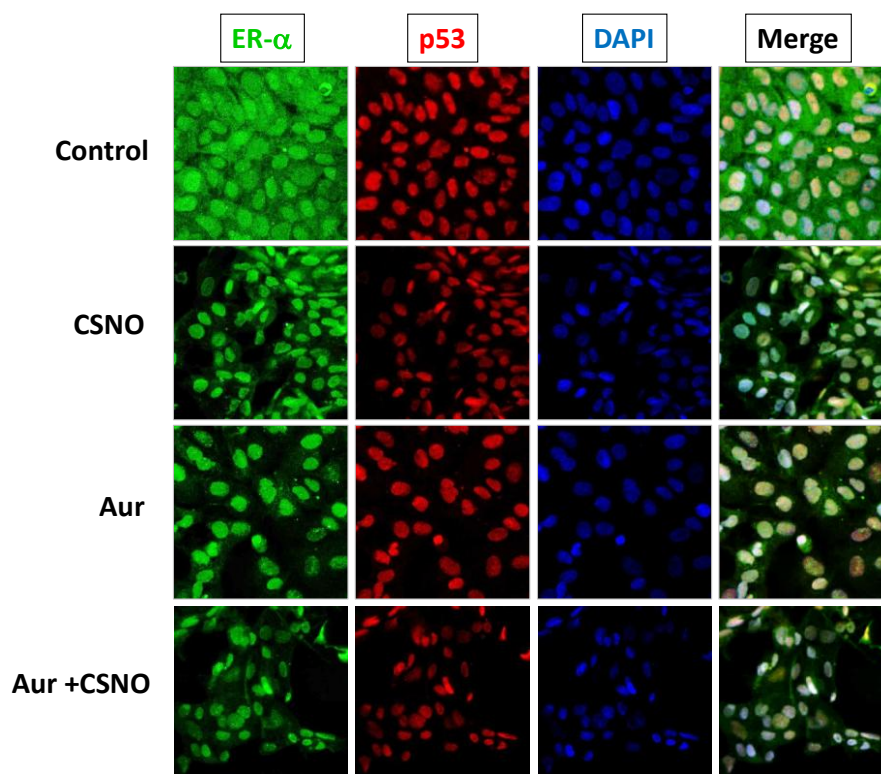


Figura 16. La alteración de la homeostasis de S-nitrosotioles modifica la localización subcelular de ER- α . Para determinar la localización de ER- α y p53, las células MCF-7 deprivadas de estrógeno se expusieron a los tratamientos indicados durante 6 horas y se procedió al inmunomarcaje de ER- α (verde) y p53 (rojo). Los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; azul). Se muestra también la imagen fusionada (merge) de las tinciones verde, rojo y azul. Aumento original: 40x. Aur, auranofina; CSNO, S-nitro-L-cisteína; ER, receptor de estrógenos.

Como se observa en la **Figura 16**, el tratamiento de las células deprivadas de estrógeno con CSNO o auranofina, añadidos por separado o en combinación, indujo una localización de ER- α casi exclusivamente nuclear, con una clara disminución de los niveles de ER- α citoplasmáticos. Por otra parte, en células MCF-7 deprivadas de estrógeno, los análisis mediante microscopía confocal revelaron una distribución predominantemente nuclear de la proteína p53, que no fue modificada por ninguno de los tratamientos.

Para confirmar los resultados anteriores, las células MCF-7 deprivadas de estrógeno se expusieron a los distintos tratamientos y, tras la separación en fracciones citosólica y nuclear, se analizó la expresión de ER- α mediante western blot. Como se muestra en la **Figura 17**, el tratamiento con auranofina y/o CSNO disminuyó los niveles de ER- α citosólicos, comparado con las células control, donde la ausencia de la señal estrogénica indujo altos niveles de proteína ER- α estabilizada. Por el contrario, la alteración de la homeostasis de SNO incrementó la presencia de este receptor en la fracción nuclear de estas células (**Figura 17**). La fosforilación de ER- α en el residuo de Thr311 se ha descrito que no sólo dirige al receptor hacia el núcleo, sino que también previene su retorno al citoplasma debido a la alteración de una probable secuencia de exportación nuclear (Lee and Bai, 2002). Por lo tanto, se analizó si la distribución subcelular alterada de ER- α debida a la alteración de la homeostasis de SNO, estaba asociada a la fosforilación de ER- α en el residuo de Thr311. Como se muestra en la **Figura 17**, esta forma fosforilada del receptor fue prácticamente indetectable en las fracciones citosólicas o nucleares de las células MCF-7 no tratadas. Por el contrario, p-ER- α (Thr311) sí se detectó en las fracciones nucleares de células de cáncer de mama tratadas con auranofina y/o CSNO.

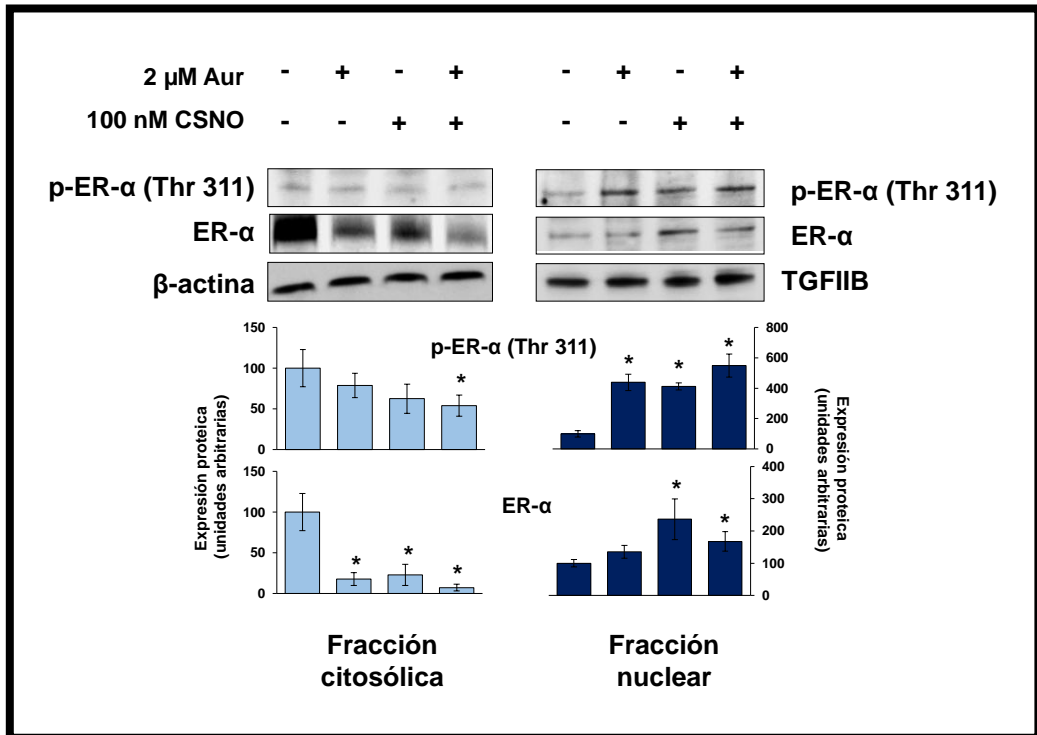


Figura 17. La alteración de la localización subcelular de ER- α se asocia con su fosforilación en el residuo Thr311. Las células MCF-7 deprivadas de estrógeno se expusieron a los tratamientos indicados durante 6 horas, y tras la separación en fracciones nuclear y citosólica, la expresión de ER- α y p53 se analizó mediante western blot. La inmunodetección de β -actina y TFIIB se incluyó como controles de carga para las fracciones citosólica y nuclear respectivamente. Los correspondientes análisis densitométricos de las bandas de proteínas detectadas en los western blot se normalizaron con la señal de β -actina y TFIIB. Los datos son medias \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. Aur, auranofina; ER, receptor de estrógenos; TFIIB, factor de transcripción IIB.

5. LA ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE SNO EXPANDE EN CÉLULAS MCF-7 UNA SUBPOBLACIÓN CON CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS MADRE TUMORALES

Los tumores y líneas celulares tumorales constituyen una población celular heterogénea, y sólo alguna de estas poblaciones exhibe una tumorigenicidad incrementada y resistencia a la terapia antitumoral. Estas células tumorales más agresivas son llamadas células madre tumorales o “cancer stem cells” (CSCs), y parecen ser responsables de los procesos de progresión tumoral, recurrencia y metástasis (Clevers, 2011). La actividad estrogénica no sólo es responsable de la expansión normal de células madre en el epitelio mamario durante el desarrollo, sino que también incrementa la población de células madre tumorales en los procesos tumorales (Fillmore et al., 2010). Por tanto, se decidió explorar esta posibilidad en las condiciones experimentales utilizadas. En el caso de cáncer de mama, la identificación de estas CSCs puede realizarse mediante ensayos funcionales *in vitro*, como el ensayo de formación de mamosferas. En este ensayo, las células se cultivan en ausencia de suero, y las células supervivientes crecen en forma de esferas en suspensión, que están enriquecidas en CSCs. Como se muestra en la **Figura 18A**, el cultivo de células MCF-7 bajo estas condiciones dio lugar a la formación de mamosferas, que cuando se tripsinizaron, disgregaron y analizaron por citometría de flujo, mostraron una población enriquecida en células $CD44^+/CD44^{low/-}$, una característica fenotípica de CSCs en tumores de mama (Al-Hajj et al., 2003, Bhat-Nakshatri et al., 2010, Cufi et al., 2011).

Como se muestra en la **Figura 18B**, los análisis por citometría de flujo indicaron un incremento en la población de células $CD44^+$ cuando la homeostasis de SNO se alteró en células MCF-7. Además, se incrementó su posterior capacidad para formar mamóferas cuando se sembraron a densidad clonal. Estos datos, indican por tanto, que la alteración de la homeostasis de SNO en células MCF-7 expande una sub-población celular con características de CSCs.

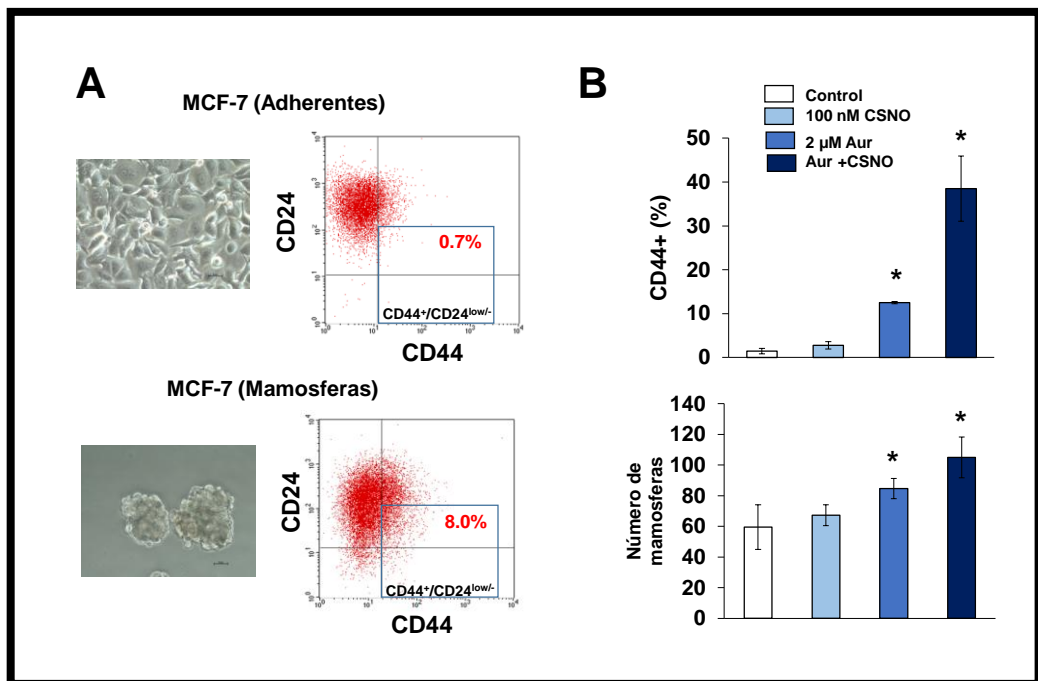


Figura 18. La alteración de la homeostasis de S-nitrosothioles expande una subpoblación con características de “cancer stem cells” en células MCF-7. (A) Las células MCF-7 crecieron en suspensión en ausencia de suero, y las mamóferas formadas se tripsinizaron, disgregaron y la expresión de CD24 y CD44 se analizó por citometría de flujo. El porcentaje de células $CD44^+/CD44^{low/-}$ se comparó con las células MCF-7 parentales. **(B)** Las células MCF-7 deprivadas de estrógeno se expusieron durante 24 a los tratamientos indicados y, después de su tripsinización y disgregación, el nivel de expresión de CD44 se determinó por citometría de flujo y su capacidad para formar mamóferas se evaluó mediante su siembra a densidad clonal en suspensión y en ausencia de suero. * $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. Aur, auranofina; CSNO, S-nitroso-L-cisteína.

6. EL ESTATUS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS EN CÁNCER DE MAMA SE ASOCIA SIGNIFICATIVAMENTE CON NIVELES MÁS BAJOS DE EXPRESIÓN DE TXNRD1

Tomados en conjunto, los resultados hasta ahora obtenidos indican que la alteración de la homeostasis de SNO, ya sea a través de exposición de SNO o mediante la inhibición de TrxR, podría constituir una ventaja adaptativa para tumores de mama ER+. Por tanto, se analizó en la base de datos Oncomine, la expresión del gen de la tioredoxina reductasa, TXNRD1, en cáncer de mama. De los estudios de cáncer de mama incluidos en la base de datos, se seleccionaron para el análisis aquella cohorte de pacientes en las que se definía el estatus ER para los pacientes, y en las que al menos había 30 pacientes tanto ER+ como ER-. Como se muestra en la **Figura 19A**, el estatus ER+ en cáncer de mama, se asoció significativamente con menores niveles de expresión de TXNRD1. Por el contrario, no se encontró una asociación significativa con el estatus de sobreexpresión de HER-2/Neu en los 3 estudios de cáncer de mama donde esta condición se definía (**Figura 19B**). Por tanto, los niveles más bajos de expresión de TrxR1/TXNRD1, parecen asociarse al crecimiento dependiente de ER- α en cáncer de mama.

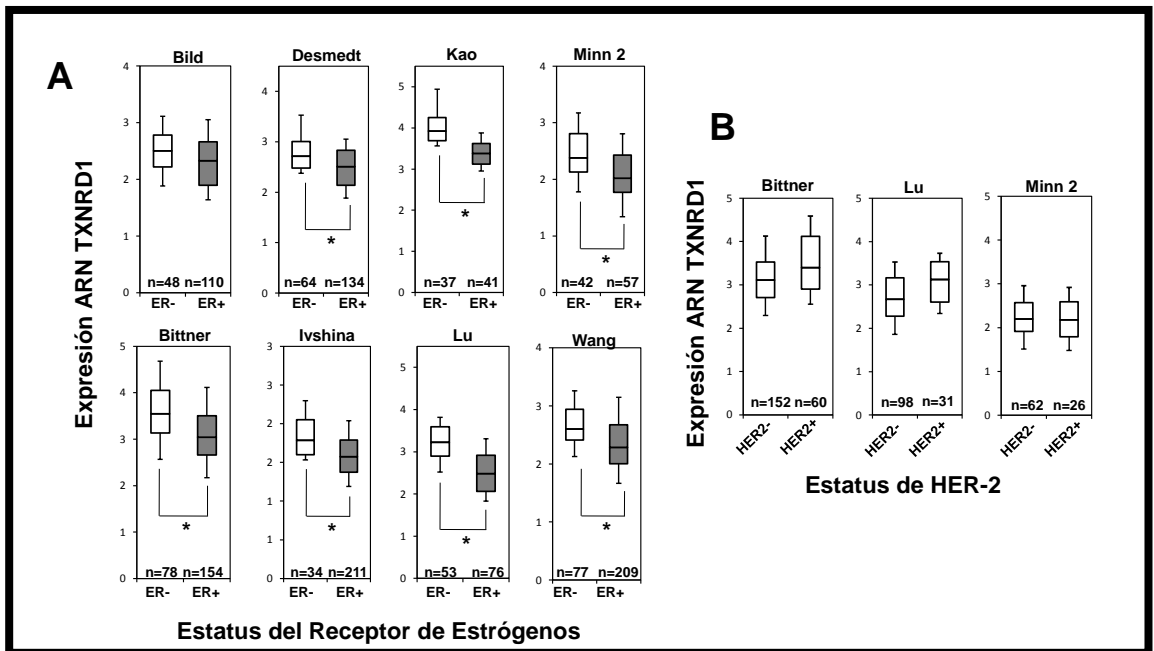


Figura 19. Asociación significativa del estatus ER y la expresión de TXNRD1 en cáncer de mama. Para estudiar la asociación entre el estatus ER, HER-2 y la expresión del gen TXNRD1 se analizaron (A) ocho estudios de cáncer de mama incluidos en la base de datos Oncomine, con estatus ER definido y (B) tres estudios con estatus HER-2 definido.

Para confirmar la relación entre la expresión de ER y TXNRD1 en cáncer de mama, se analizó a continuación la expresión de las proteínas TrxR1, ER- α y p53 mediante inmunohistoquímica, en un panel de 57 tumores de mama, cuyas características se resumen en la **Tabla 6**.

Características patológicas de los tumores de mama:

Características	ER- (n=36)	ER+ (n=21)	Valor de p
Histología	36	21	0.101
Invasivo ductal	35 (97.2)	18 (85.7)	
Invasivo lobular	1 (2.3)	3 (14.3)	
Tamaño tumoral	35	20	0.687
T1	1 (2.8)	1 (5.0)	
T2	31 (88.6)	16 (80.0)	
T3	3 (8.6)	3 (15.0)	
T4	0	0	
Estadío nodular	35	20	0.438
N0	21 (60.0)	9 (45.0)	
N1	7 (20.0)	4 (20.0)	
N ≥2	7 (20.0)	7 (35.0)	
Metástasis	35	20	0.483
M0	25 (71.4)	9 (45.0)	
M1	10 (28.6)	12 (34.3)	
Estadío	35	20	0.386
I	1	1	
II	22	11	
III	2	4	
IV	10	4	

Tabla 6. Características patológicas de los tumores de mama analizados comparados de acuerdo al estatus del receptor de estrógenos (ER). Todos los parámetros se adaptaron bien entre los dos grupos de estudio. n= número de casos. Se muestra entre paréntesis el porcentaje. Ninguna de las variables clínico-patológicas fue significativamente diferente entre los grupos ER- y ER+ ($p > 0.05$, prueba de chi cuadrado).

La especificidad del anticuerpo anti-TrxR1 empleado en los estudios de inmunohistoquímica se confirmó previamente mediante western blot y silenciamiento génico con un siRNA específico. El anticuerpo reconoció una única proteína de 55 KDa que se silenció mediante silenciamiento específico del gen TXNRD1 (**Figura 20**).

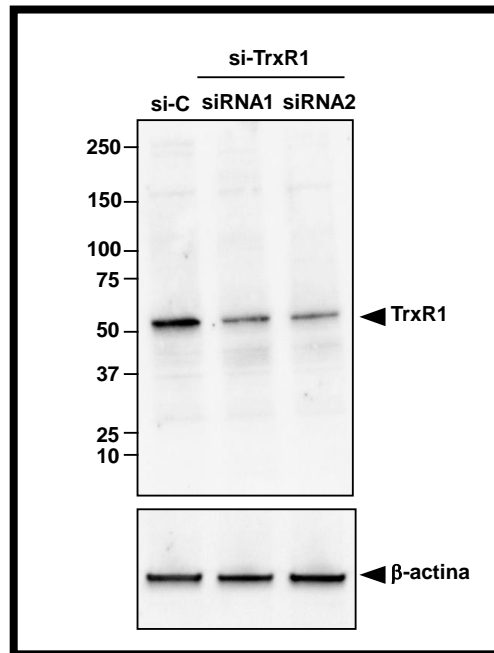


Figura 20. Validación del anticuerpo anti-TrxR1 empleado en los ensayos inmunohistoquímicos. Las células MCF-7 se transfirieron transitoriamente con un siRNA control (si-C) o con un siRNA específico si-TrxR1, y la expresión de TrxR1 se analizó mediante western blot.

Como se muestra en la **Figura 21A**, no se observó la expresión de ER- α en algunos tumores, mientras que en otros se inmunodetectó en el núcleo de las células tumorales, definiendo así el estatus ER de los tumores como ER- (n=36) o ER+ (n=21), respectivamente. También se evaluó la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica, ya que la acumulación de dicha proteína puede usarse como un biomarcador de la mutación en p53 en carcinomas de mama (Alsner et al., 2008, Bremer et al., 2009).

En el presente estudio, el 58% de los tumores fueron p53+, como indicó la inmunodetección de la proteína p53 en el núcleo de las células tumorales (**Figura 21A**). Por el contrario, la proteína TrxR1 se inmunodetectó en todos los tumores de mama analizados, principalmente en el citosol de las células tumorales epiteliales. Significativamente, el estatus ER+ en tumores de mama se asoció con menores niveles de expresión de TrxR1 (**Figura 21B**). Además, la asociación de menor expresión de TrxR1 con la ausencia de alteraciones en p53 se observó en tumores ER+ pero no en tumores ER- (**Figura 21C**).

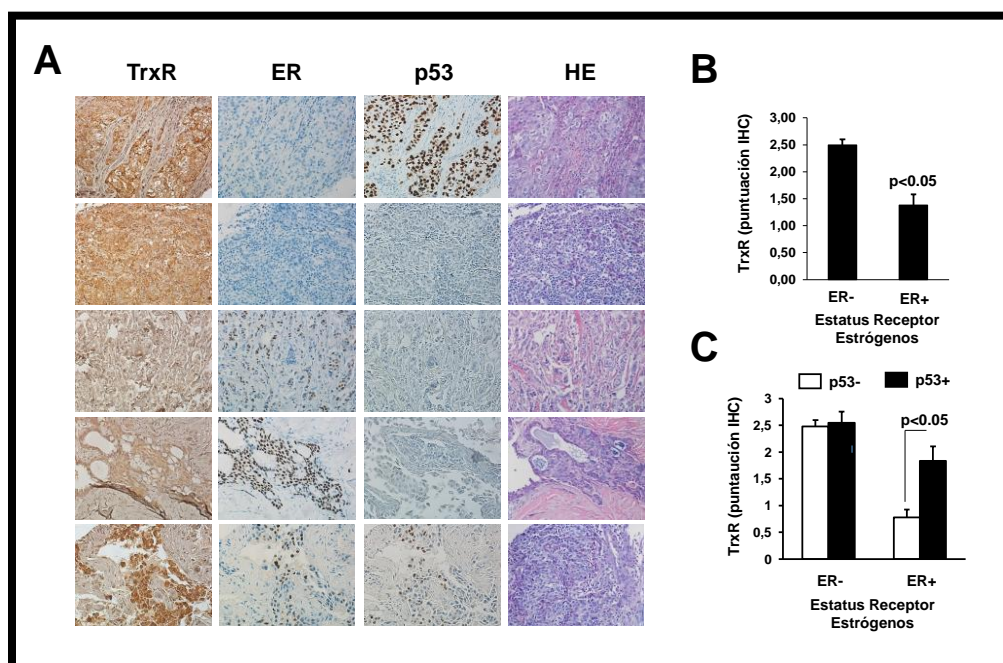


Figura 21. El estatus del receptor de estrógenos en cáncer de mama se asocia significativamente con menores niveles de expresión de TrxR1. (A) La expresión de TrxR1, el receptor de estrógenos (ER) y p53 se analizó mediante inmunohistoquímica (IHC) en un panel de 57 tumores de cáncer de mama (36 ER-, 21 ER+). Imágenes representativas de IHC y contratinción de hematoxilina y eosina (HE) de tumores de mama ER-/p53+ (fila 1), ER-/p53- (fila 2), ER+/p53- (filas3 y 4) y ER+/p53+ (fila5). Ampliación original: 20x. (B) Valoración TrxR1 (IHC) en tumores ER- y ER+. (C) Valoración TrxR1 (IHC) en tumores p53- y p53+. TrxR, tioredoxina reductasa.

7. LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD GSNOR REDUCE EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO DEL TRASTUZUMAB EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA QUE SOBREENPRESAN HER-2

Al igual que la actividad tioredoxina reductasa (TrxR), la actividad nitrosoglutatión reductasa (GSNOR/Adh5) juega un papel fundamental en la homeostasis de los niveles de S-nitrosotioles (Liu et al., 2004). Por tanto, se decidió estudiar el efecto de la inhibición de esta actividad enzimática sobre el crecimiento de células de cáncer de mama. Para ello se utilizó el compuesto N6022, un derivado pirrólico con potente actividad inhibidora sobre GSNOR (Colagiovanni et al., 2012, Green et al., 2012, Sun et al., 2011b). Al contrario que en el caso de la inhibición de TrxR, cuando se inhibió la actividad GSNOR con N6022 no se observó ningún efecto sobre la proliferación celular. Por tanto, se analizó el efecto de la inhibición de este sistema enzimático sobre el crecimiento de células tumorales de cáncer de mama en relación a la presencia del receptor HER-2. Para ello, se trataron células de cáncer de mama BT-474, que sobreexpresan HER-2, con el anticuerpo monoclonal trastuzumab, en ausencia o en presencia de diferentes dosis de N6022. Como se observa en la **Figura 22A**, la acción antiproliferativa ejercida por trastuzumab en células BT-474, es suprimida de manera significativa cuando se inhibe la actividad GSNOR. Por otro lado, la acción antiproliferativa del fármaco anti-HER-2 no se observó en células MCF-7, que no sobreexpresan este receptor (**Figura 22B**).

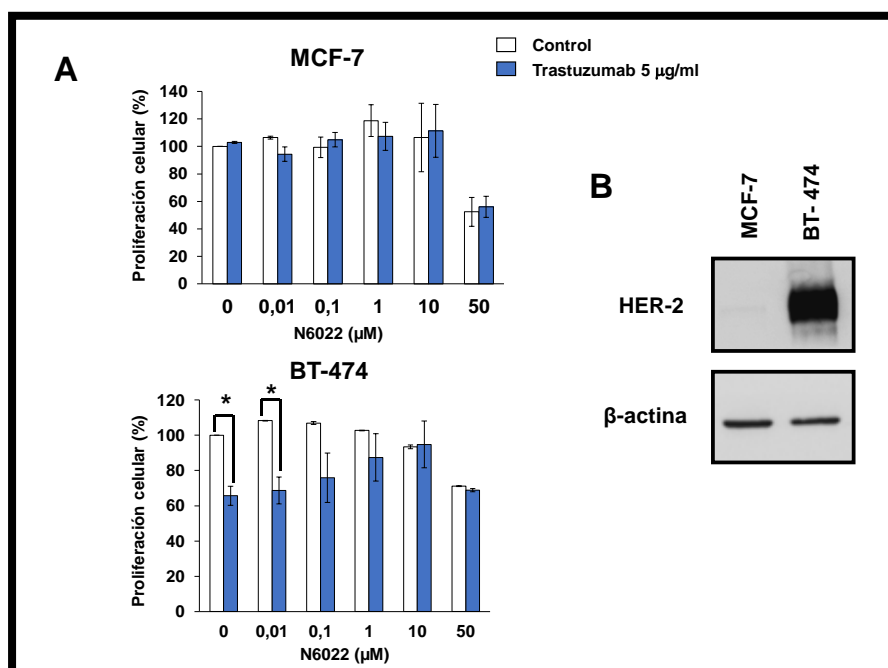


Figura 22. El efecto antiproliferativo del trastuzumab es eliminado cuando se inhibe específicamente el sistema GSNOR. (A) Las células MCF-7 y BT-474 se expusieron a los tratamientos indicados y la proliferación celular se determinó después de 72 horas. La proliferación celular se expresa como el porcentaje de células no tratadas. $*p < 0.05$, comparado con células no tratadas con trastuzumab. **(B)** La expresión de HER-2 en células MCF-7 y BT-474 se analizó mediante western blot utilizando el anticuerpo correspondiente.

Para profundizar en los mecanismos implicados en esta resistencia a la terapia anti-HER-2 cuando se inhibe GSNOR, se analizaron rutas de señalización celular implicadas en proliferación y supervivencia. Como puede observarse en la **Figura 23**, el análisis mediante western-blot reveló que el trastuzumab no inhibió ERK1/2 ni la expresión de ciclina D1. No obstante, la terapia anti-HER-2 sí ejerció un potente efecto inhibitorio en la ruta de supervivencia AKT, como indicaron los menores niveles de la forma fosforilada de esta proteína en células tratadas con trastuzumab. Sin embargo, cuando se inhibió GSNOR, la disminución en la fosforilación de AKT por trastuzumab fue significativamente menor.

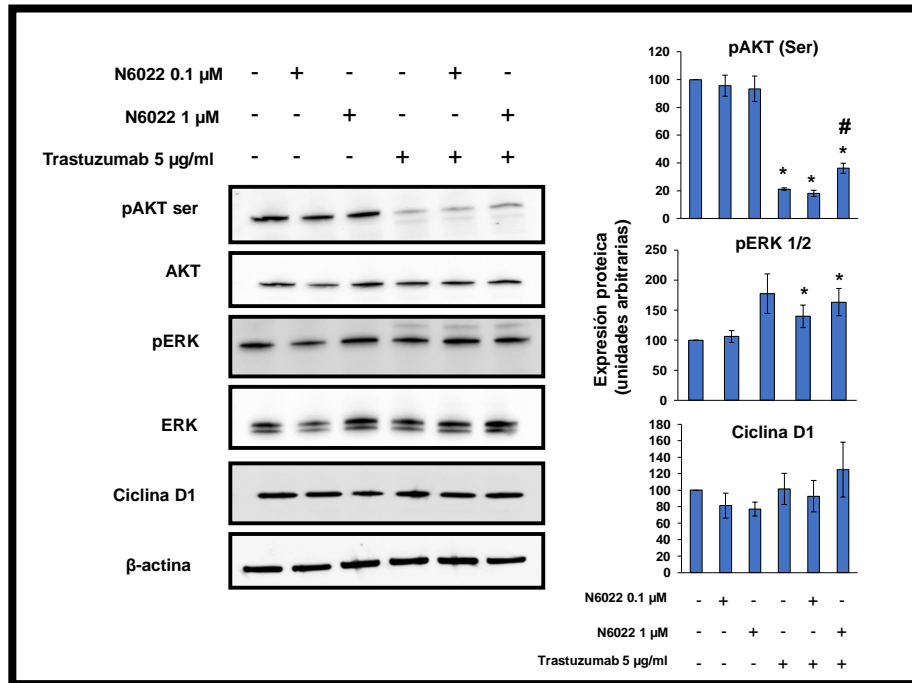


Figura 23. La inhibición de la actividad GSNOR disminuye la inhibición de AKT por trastuzumab en células BT-474. Las células se expusieron durante 6 horas a los tratamientos indicados y los niveles de fosforilación de AKT y ERK 1/2, así como la expresión de ciclina D1 se determinaron mediante western-blot usando los anticuerpos específicos. Los análisis densitométricos correspondientes de las bandas proteicas detectadas en los western blot se normalizaron usando los niveles de expresión de β -actina. Los datos obtenidos son media \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. # $p < 0.05$, comparado con el tratamiento con trastuzumab).

Los receptores tirosina quinasa, y las rutas reguladas por ellos, juegan un papel importante en el control de la mayoría de los procesos celulares fundamentales, incluido el ciclo celular, la migración celular, el metabolismo celular y la supervivencia, así como la proliferación y diferenciación celular. Por ello se decidió analizar el perfil de activación de receptores tirosina quinasa y las quinasas de señalización en las distintas condiciones experimentales. Para ello se utilizó un array de anticuerpos contra distintas quinasas de señalización (Pathscan RTK Signaling Antibody Array Kit), que permite detectar de forma simultánea 28 receptores tirosina quinasa y 11

importantes vías de señalización, cuando son fosforilados en tirosina u otros residuos. Como se observa en la **Figura 24**, cuando se trataron las células BT-474 con N6022, se recuperó la inhibición por trastuzumab de los **receptores tirosina quinasa TrkA/NRTK1 y TrkB/NRTK2**, los **receptores tipo A1 y A3 para la epinefrina (EphA1 y EphA3)**, y de las **quinasas de señalización Src, c-Abl, AKT (Thr 308) y AKT (Ser 473)**. Por tanto, la inhibición del sistema GSNOR, revierte la inhibición de estas rutas de señalización de proliferación y supervivencia celular en células tratadas con trastuzumab.

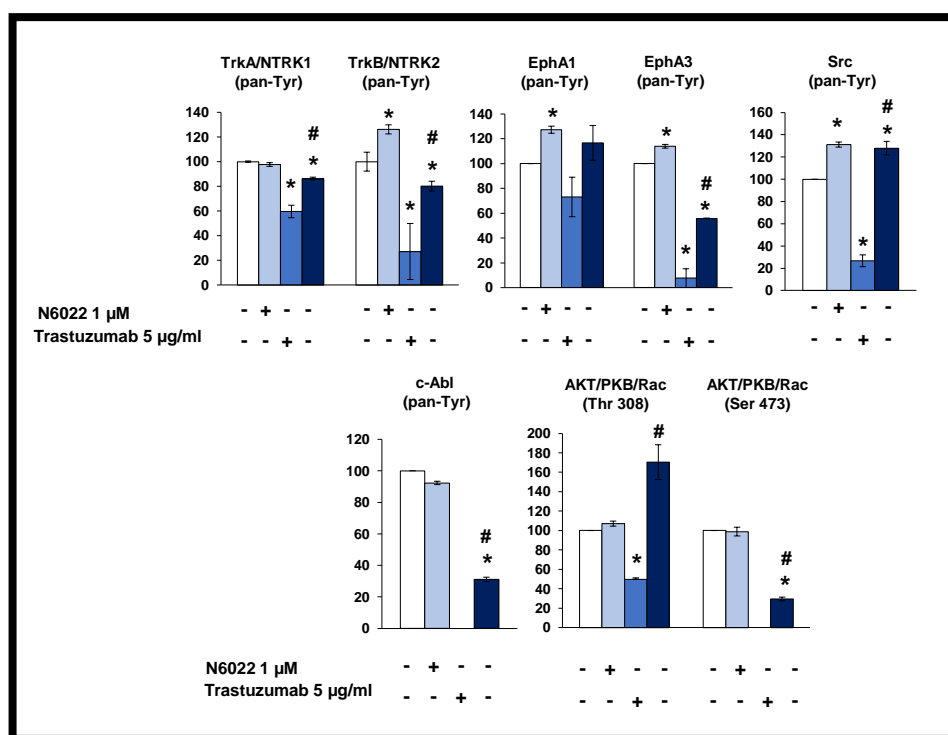


Figura 24. La inhibición del sistema GSNOR, revierte la disminución de la activación de rutas de señalización de proliferación y supervivencia en células tratadas con trastuzumab. Las células BT-474 se trataron durante 6 horas con los tratamientos indicados y la expresión de las quinasas de señalización se analizó mediante el array de quinasas de señalización PathScan RTK, tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Los datos experimentales proceden de tres experimentos independientes normalizados con los controles negativos y expresados como media \pm SEM (* $p < 0.05$, comparado con células no tratadas. # $p < 0.05$, comparado con células tratadas con trastuzumab).

Para confirmar estos resultados, se analizó la tasa de muerte celular por apoptosis en células BT-474 sometidas a terapia anti-HER-2 en presencia o ausencia de N6022. Como puede observarse en la **Figura 25**, el tratamiento con el inhibidor N6022 redujo el efecto apoptótico de trastuzumab en células BT-474. Significativamente, se obtuvieron resultados similares en células de cáncer de mama SKBR-3, que también sobreexpresan HER-2.

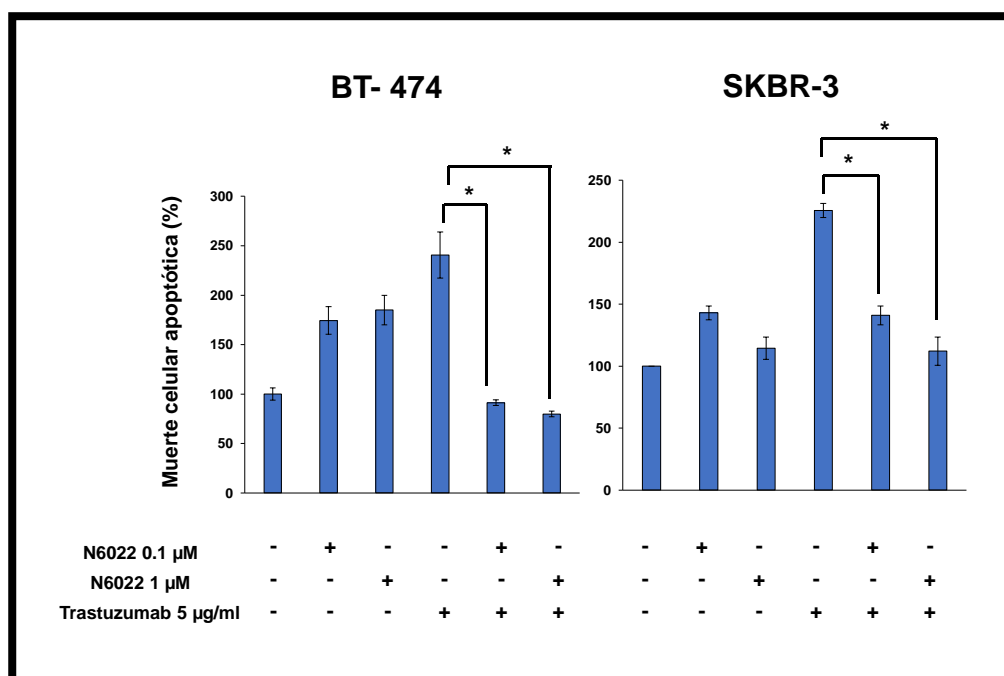


Figura 25. La inhibición de la actividad GSNOR reduce el efecto apoptótico de trastuzumab en células BT-474 y SKBR-3. Las células se expusieron a los tratamientos indicados y se determinó la tasa de muerte celular apoptótica después de 48h para BT-474, y de 72 para SKBR-3. La muerte celular apoptótica se expresa como el porcentaje de células no tratadas. * $p < 0.05$, comparado con las células no tratadas con trastuzumab.

8. LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA GSNOR EN PRESENCIA O AUSENCIA DE TRASTUZUMAB, PRODUCE UNA DETENCIÓN DE DEL CICLO CELULAR EN LA FASE G1

Uno de los efectos conocidos del trastuzumab, es la detención del ciclo celular en la fase G1 (Arteaga and Engelman, 2014, Baselga et al., 2001, Dean-Colomb and Esteva, 2008, Li and Li, 2013, Spector and Blackwell, 2009). En efecto, cuando las células se expusieron a este anticuerpo monoclonal, aumentó de manera significativa el porcentaje de células en fase G1, con la correspondiente disminución de células en fase S y G2/M (Figura 25). Sin embargo, la inhibición de GSNOR en estas células no revirtió este efecto, aunque recuperó parcialmente el número de células en fase G2/M, posiblemente debido al efecto anti-apoptótico de N6022 en este modelo experimental, y confirmando que este compuesto no induce proliferación en las células tratadas con trastuzumab. Alteraciones similares, aunque de menor magnitud, se obtuvieron en el caso de células SKBR-3 (Figura 25).

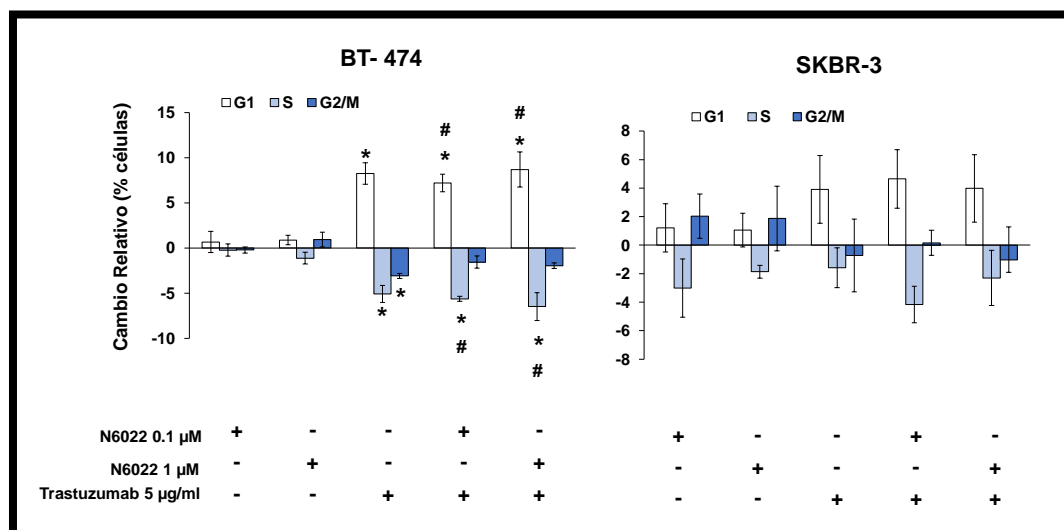


Figura 26. Alteraciones del ciclo celular en células tratadas con trastuzumab en presencia o ausencia de N6022. Las células BT-474 y SKBR-3 se sometieron a los tratamientos indicados y después de 48 horas se procedió al análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. * $p < 0.05$, comparado con las células no tratadas con trastuzumab.

9. LA INHIBICIÓN DE GSNOR AUMENTA LOS NIVELES DE PROTEÍNAS S-NITROSILADAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Para confirmar la alteración de la homeostasis de nitrosotioles causada por la inhibición de la actividad GSNOR, se analizó la S-nitrosilación de proteínas en células BT-474 tratadas con N6022. Como se observa en la **Figura 27**, el tratamiento con N6022 en células BT-474 incrementó los niveles de S-nitrosoproteínas, detectables mediante el ensayo Biotin-Switch.

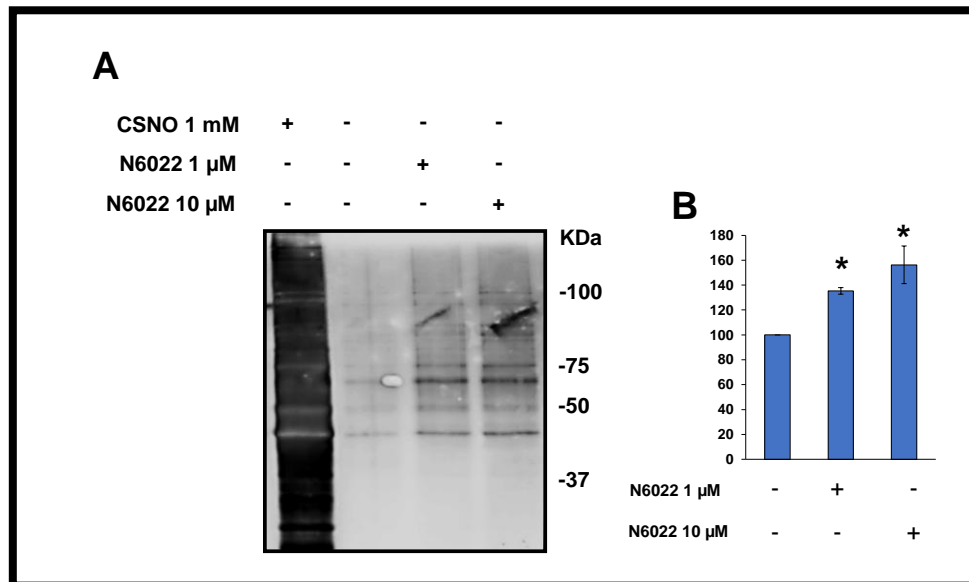


Figura 27. Detección de proteínas S-nitrosiladas en células BT-474 tratadas con N6022. (A) Los lisados celulares de células BT-474, sometidas durante 6 horas a los tratamientos indicados, se analizaron mediante el ensayo Biotin-Switch para la detección de proteínas S-nitrosiladas. (B) El correspondiente análisis densitométrico del total de bandas proteicas detectadas mediante el método Biotin-Switch, se normalizó con la tinción Ponceau del total de proteína. Los datos son medias \pm SEM de la media de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control.

A continuación se decidió identificar aquellas proteínas cuyos niveles de S-nitrosilación se incrementan cuando se inhibe la actividad GSNOR en células BT-474. El análisis proteómico directo de aquellas proteínas biotiniladas en el ensayo Biotin-Switch es factible, pero con la importante limitación de un sesgo hacia la identificación de proteínas abundantes (Lopez-Sanchez et al., 2014). Por esa razón se utilizó como alternativa el acoplamiento del ensayo Biotin-Switch a la identificación de proteínas mediante un array de anticuerpos. En esta aproximación (**Figura 7, Materiales y Métodos**), tras la aplicación del método Biotin-Switch, las proteínas biotiniladas se capturaron con estreptavidina marcada con el fluoróforo Cy3 y posteriormente se incubaron con un array de anticuerpos (Panorama Antibody Array).

Como se observa en la **Figura 28**, las proteínas Apaf1, las formas fosforiladas de cJun en Ser 63 y en Ser 73, la subunidad α de la calcineurina, la proteína de unión a CUG-ARN (CUGBP1), el factor de choque térmico 1 (HSF1) y el neurofilamento 160, presentaron unos mayores niveles de S-nitrosilación tras la inhibición con N6022 (**Tabla 7**). Significativamente, la gran mayoría de estas proteínas juegan papeles importantes en la regulación y modulación de distintos aspectos de la apoptosis celular (Bao and Shi, 2007, Corrente et al., 2002, Dhanasekaran and Reddy, 2008, Kumar et al., 2013, Li et al., 2004a, Okuno et al., 2004, Soengas et al., 2001, Springer et al., 2000). Por tanto, estos resultados confirman que la alteración por S-nitrosilación de procesos implicados en la muerte celular puede explicar el efecto antiapoptótico de N6022 en células de cáncer de mama tratadas con trastuzumab.

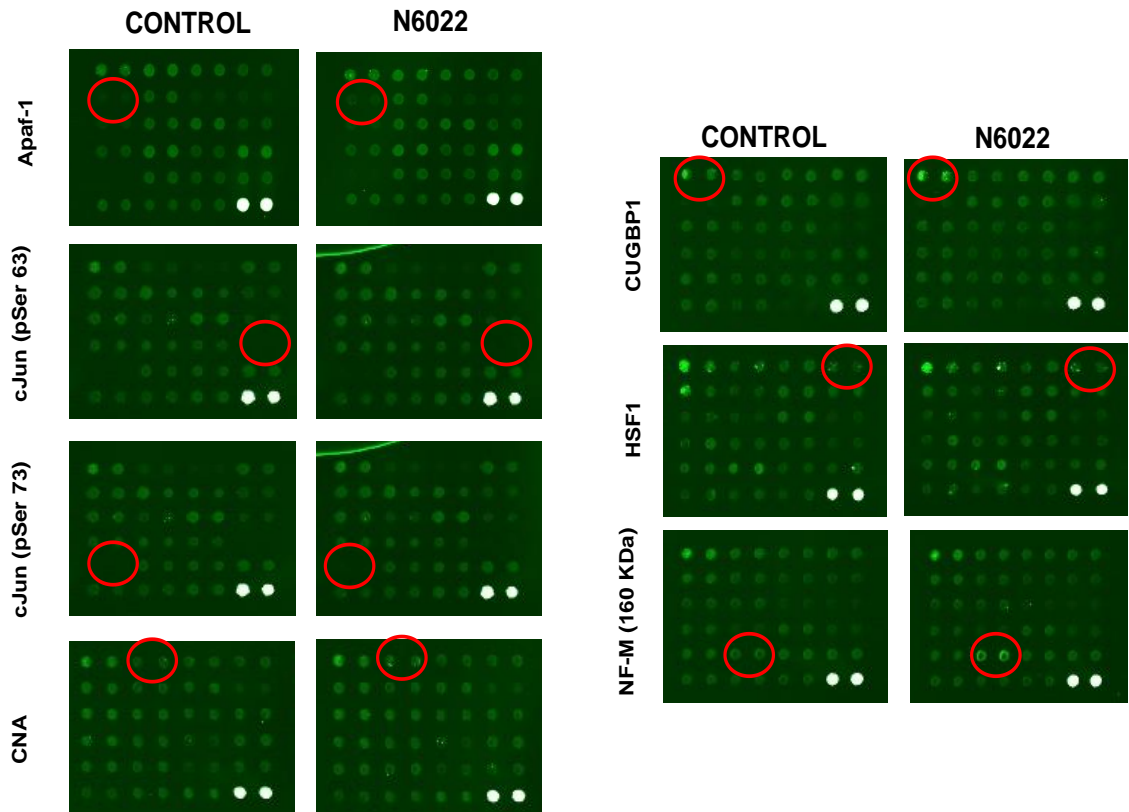


Figura 28. La inhibición de la GSNOR induce un aumento en la S-nitrosilación de proteínas implicadas en muerte celular detectables mediante un array de anticuerpos. Las células BT-474 se incubaron con o sin N6022 10 μ M durante 6 horas, y los lisados celulares se sometieron al ensayo Biotin-Switch acoplado a un array de anticuerpos, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se representan las regiones del array correspondientes a las proteínas que mostraron un cambio significativo en la intensidad de fluorescencia tras el tratamiento con N6022. Apaf-1: Factor 1 activador de las proteasas apoptogénicas; cJun (pSer73/63): proteína c-Jun activa (fosforilada en los residuos Ser63 y Ser73); CNA: subunidad α de la calcineurina; CUGBP1: secuencia triplete CUG, proteína 1 de unión a ARN; HSF1: Factor de choque térmico 1; NF-M (160KDa): neurofilamento 160.

Proteína	Intensidad de fluorescencia: Unidades arbitrarias				Cociente D/C
	A: Media Control	B: Media N6022	C: A/ β -actina	D: B/ β -actina	
APAF-1	172,5	348	0,213	0,426	1,996
c-Jun (pSer63)	20,5	49,5	0,025	0,060	2,605
c-Jun (pSer73)	19,5	43,5	0,024	0,053	2,199
CNA	792,5	1542	0,979	1,886	1,949
CUGBP1	3356,5	7249,5	4,150	8,868	2,260
HSF1	888	1680,5	1,097	2,056	1,864
NF-M (160KDa)	1037,5	3353	1,283	4,101	3,181
β -actina	808,75	817,5			

Tabla 7. Proteínas S-nitrosiladas detectadas mediante el ensayo Biotin-Switch acoplado a un array de anticuerpos. Se muestran los valores medios de fluorescencia (unidades arbitrarias) obtenidos del análisis del array de anticuerpos tratados o no con N6022. Se consideraron como proteínas con mayores niveles de S-nitrosilación a aquellas con un cociente (D/C) ≥ 1.7 .

10. LA EXPRESIÓN DE GSNOR SE ASOCIA A UNA MAYOR SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVOS

Los resultados in vitro descritos anteriormente sugieren que la alteración de la homeostasis de SNO, podría suponer una ventaja adaptativa para algunos tipos de cáncer de mama que sobreexpresen HER-2. Por ello se realizó un estudio de la relación entre la expresión de HER-2 y GSNOR en cáncer de mama. Primero se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de GSNOR en un panel de 64 tumores de cáncer de mama. Como se muestra en la **Figura 30A**, la expresión de GSNOR se detectó fundamentalmente en el estroma tumoral. Según la expresión de HER-2 y la inmunodetección de GSNOR, los tumores analizados se clasificaron como HER2-/GSNOR-

(n=11), HER2-/GSNOR+ (n=29), HER2+/GSNOR- (n=7), HER2+/GSNOR+ (n=4). Significativamente, la mayoría de tumores que no expresaban HER-2 mostraron positividad para GSNOR, mientras que por el contrario, la mayoría de tumores que sobreexpresaban HER-2 fueron negativos para GSNOR (Figura 30B).

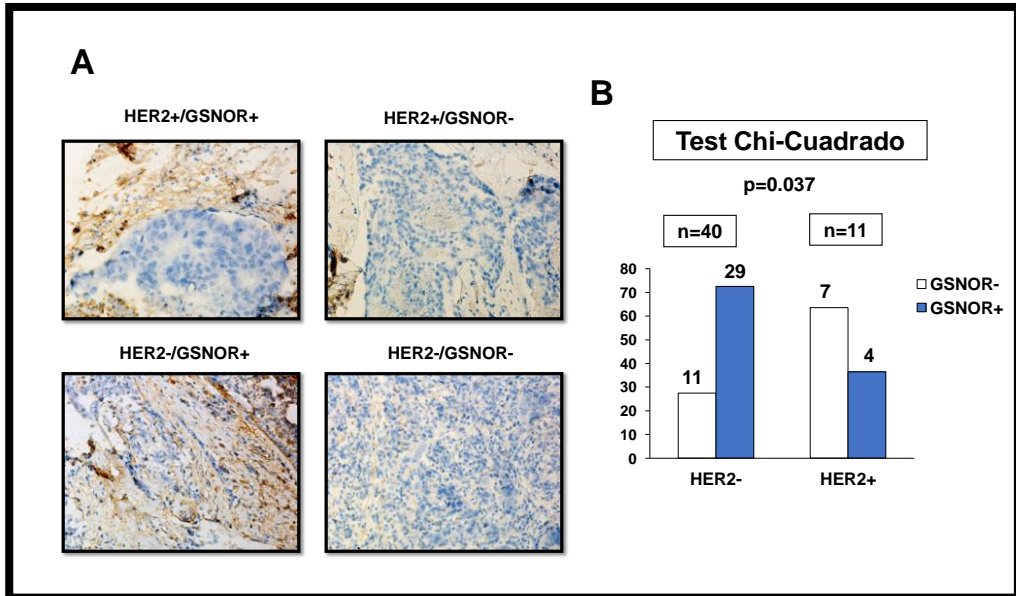


Figura 30. La expresión del receptor HER-2 en cáncer de mama se asocia significativamente con menores niveles de GSNOR. (A) La expresión de GSNOR se analizó mediante inmunohistoquímica (IHC) en un panel de 64 tumores de cáncer de mama (40 HER2-, 11 HER2+). Imágenes representativas de IHC y contratinción de hematoxilina y eosina de tumores de mama HER2+/GSNOR+, HER2+/GSNOR-, HER2-/GSNOR+ y HER2-/GSNOR-. Ampliación original: 20x. (B) Representación del porcentaje de tumores en función de la expresión GSNOR y HER-2.

Los resultados derivados del análisis inmunohistoquímico sugerían por tanto una menor expresión de GSNOR en tumores HER-2 positivos, comparados con el resto de tumores. Se decidió por tanto explorar si la expresión de GSNOR en tumores de mama HER-2 positivos también tenía impacto en la supervivencia, y para ello se analizó la tasa de supervivencia en pacientes de cáncer de mama según la expresión en el tumor del gen ADH5, que codifica para GSNOR. Para ello se utilizó una herramienta “on-line” que permite analizar la relevancia del gen de interés y obtener curvas Kaplan-Meier a partir de datos de expresión génica y supervivencia de cerca de 2.000 pacientes (Gyorffy et al., 2010).

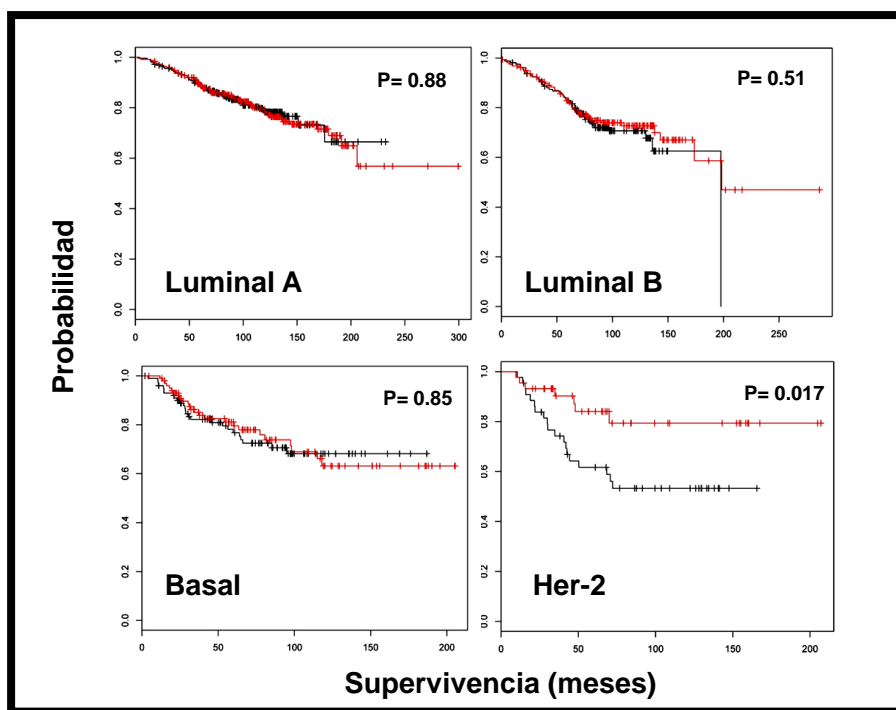


Figura 31. Una mayor expresión de GSNOR favorece la supervivencia de los pacientes con tumores de mama HER2+. De manera significativa la mayor expresión de GSNOR se asocia a una mayor supervivencia en tumores de mama HER2+, pero no en otros subtipos de cáncer de mama. Las curvas en rojo o en negro son las correspondientes a la supervivencia en pacientes con tumores que expresan altos o bajos niveles del gen ADH5 (GSNOR), respectivamente.

Como puede observarse en la **Figura 31**, la expresión del gen ADH5/GSNOR solo tuvo impacto en la supervivencia en el subtipo de cáncer de mama HER-2. Concretamente, aquellos pacientes con tumores HER-2 con mayor expresión de ADH5/GSNOR mostraron una supervivencia significativamente mayor que aquellos con menores niveles de expresión de este gen. Por tanto, estos datos de análisis de supervivencia, coinciden con los datos de expresión de GSNOR en tumores, y sugieren que una menor expresión de GSNOR supone una ventaja adaptativa para tumores de cáncer de mama HER-2 positivos, con el resultado de menores tasas de supervivencia.

VI. DISCUSIÓN

1. El mantenimiento de la homeostasis de S-nitrosotioles juega un importante papel en la supresión del crecimiento de tumores de mama ER positivos

Hay numerosas pruebas experimentales que indican que las modificaciones postraduccionales relacionadas con el NO, y en concreto la S-nitrosilación, desempeñan un papel fundamental en la regulación mediada por el NO, tanto en la tumorigénesis como en la progresión tumoral (Aranda et al., 2012). Sin embargo, existen escasos estudios que aborden la participación del NO y la homeostasis de SNOs en cáncer. Además, desde hace mucho tiempo se ha hecho evidente que el cáncer es una enfermedad heterogénea. En este sentido, es importante tener en cuenta, como se ha indicado anteriormente, que el cáncer de mama no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que tienen diversas histopatologías, variaciones genéticas y genómicas, así como respuestas clínicas diferentes (Eroles et al., 2012, Hergueta-Redondo et al., 2008, Perou et al., 2000). La determinación del estatus del receptor de estrógenos (ER) en el tumor es esencial para determinar si un paciente con cáncer de mama es candidato para la terapia hormonal o no. En general, aproximadamente entre un 50-60% de todos los cánceres de mama son positivos para el receptor de estrógenos.

En estudios previos, se ha demostrado en distintos modelos experimentales, que la alteración de los sistemas enzimáticos que mantienen la homeostasis de nitrosotioles (SNOs) provoca un incremento celular en los niveles de proteínas S-nitrosiladas detectables mediante el método Biotin-Switch (Lopez-Sanchez et al., 2010a, Lopez-Sanchez et al., 2010b). El presente estudio muestra que un estrés nitrosativo severo en células de cáncer de mama, producto de la inhibición específica de uno de estos sistemas enzimáticos reguladores, y la exposición a una dosis alta del nitrosotiol CSNO,

inhibe la proliferación celular y está asociada a un acusado incremento en el nivel de proteínas nitrosiladas detectables mediante el método Biotin-Switch. La nitrosilación masiva de proteínas clave para la supervivencia celular, podría explicar este efecto inhibitorio del estrés nitrosativo severo. Estos resultados sugieren un potencial uso terapéutico de los sistemas farmacológicos capaces de alterar la homeostasis de nitrosotioles en tumores (Lopez-Sanchez et al., 2010b). No obstante, y de manera significativa, la inducción de un estrés nitrosativo moderado fue capaz de estimular la proliferación celular de células tumorales de mama en un contexto ER+ con p53 intacto. Estos resultados confirman la dualidad del NO en cáncer y subrayan la complejidad subyacente en el papel que la S-nitrosilación puede jugar en la biología tumoral (Aranda et al., 2012).

En el presente estudio, el aumento de la proliferación en células de cáncer de mama ER+ sometidas a un estrés nitrosativo moderado se asoció a una activación de rutas celulares de proliferación y supervivencia. AKT, también conocida como proteína quinasa B (PKB), es una serina/treonina proteína quinasa que está implicada en rutas de supervivencia celular mediante la inhibición de procesos apoptóticos. Por otro lado, ERK 1/2 (quinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares) son miembros de la familia MAP (proteínas activadas por mitógenos) (MAP) quinasas (MAPK), que actúan como un punto de integración clave en las rutas de señalización celular. Tanto AKT como ERK 1/2 se traslocan al núcleo celular tras su activación por fosforilación, y allí fosforilan a su vez a otras dianas moleculares induciendo la expresión de genes implicados en la proliferación y supervivencia celular. Además, la activación de estas rutas de señalización en células MCF-7 estuvo asociada a la inducción de la expresión de la ciclina D1. Esta proteína se induce de manera temprana en la fase G1 del ciclo celular, y los complejos formados entre quinasas dependientes de ciclina y la ciclina D1 son claves

para la fosforilación de sustratos que son esenciales para la proliferación celular. Significativamente, la ciclina D1 juega un importante papel en la progresión a través del ciclo celular inducida por estrógenos y el ER (Doisneau-Sixou et al., 2003). Por tanto, los datos del presente estudio sugieren que el receptor ER- α interviene en el aumento de proliferación de las células MCF-7 con una alteración de la homeostasis de SNOs alterada.

Los experimentos de silenciamiento génico del gen ESR1 (ER- α) confirmaron que la expresión de ER- α es necesaria para que el estrés nitrosativo moderado aumente la capacidad proliferativa de células de cáncer de mama. Dado que los tratamientos no alteraron los niveles de expresión de esta proteína, este aumento debe producirse a través de mecanismos en los que se altere la funcionalidad de este receptor estrogénico. Los experimentos de privación estrogénica apoyaron esta hipótesis, ya que en estas condiciones el efecto proliferativo provocado por la alteración de la homeostasis de SNO se potenció, e incluso la exposición a CSNO 100 nM en células privadas de estrógenos aumentó 1,5 veces la proliferación celular en comparación con las células no tratadas. Significativamente, este efecto no se observó si las células estaban expuestas a una señal estrogénica (estradiol). Todos estos resultados indican que la alteración de la homeostasis de SNO en células de cáncer de mama ER+, induce un crecimiento celular dependiente de ER, generando de esta forma una respuesta similar a la estrogénica en células de cáncer de mama. Otros estudios han mostrado una asociación entre el sistema enzimático Trx/TrxR y la respuesta estrogénica en células de cáncer de mama humano. Así, se ha descrito que la alteración del sistema enzimático Trx/TrxR incrementa la expresión del receptor de progesterona en células MCF-7 en respuesta al estrógeno (Rao et al., 2009).

A diferencia de otros receptores nucleares, como los de las hormonas tiroideas o el de la vitamina D, que residen en el núcleo en ausencia de sus ligandos, los receptores estrogénicos como ER- α se traslocan al núcleo tras su unión al ligando, mientras que antagonistas puros como el fulvestrant dirigen a ER- α hacia el citoplasma (Dauvois et al., 1993, Lee and Bai, 2002). En el presente estudio, los experimentos con fulvestrant indicaron que la alteración del tráfico de ER- α entre citoplasma y núcleo elimina el efecto pro-proliferativo del estrés nitrosativo moderado en células de cáncer de mama. Por otro lado, la concentración intracelular de ER- α es el resultado de un equilibrio dinámico entre su síntesis y su degradación (Nonclercq et al., 2004). Se sabe que el ER- α reside en el citoplasma, formando un complejo estable con algunas chaperonas, como la proteína Hsp70, y tras su unión al ligando (estradiol), el receptor se disocia de este complejo. Una vez disociado, el receptor es ubiquitinado para su degradación en el citoplasma, pero también se trasloca al núcleo gracias a una señal de localización nuclear (dominio D), aunque los mecanismos moleculares implicados no se conocen bien (Thomas and Gustafsson, 2011). Nuestros datos sugieren que el estrés nitrosativo moderado, altera la homeostasis de SNO, induciendo una clara disminución de los niveles de ER- α en el citoplasma celular, con el resultado de una localización de este receptor estrogénico casi exclusivamente nuclear. Se ha descrito que en células tumorales endometriales que expresan ER- α , el estradiol induce la fosforilación de ER- α en el residuo Tre118 a través de la activación de la MAPK p38. Esta fosforilación no sólo dirige al ER- α hacia el núcleo, sino que previene su retorno al citoplasma debido a la alteración de una probable secuencia de exportación nuclear (Lee and Bai, 2002). Aunque en este estudio no se detectó activación de p38, sí se detectó la forma p-ER- α (Thr311) en fracciones nucleares de células de cáncer de mama cuando se sometieron a una alteración de la homeostasis de SNO. Por tanto, es posible

que la activación de otras MAPKs, tales como AKT, como consecuencia de la alteración de la homeostasis de SNOs, puedan participar en la fosforilación de ER- α en su residuo de Thr311 y en la alteración de la distribución subcelular de ER- α .

La participación de p53 en el efecto proliferativo de la alteración de la homeostasis de SNOs no está todavía muy clara. Los experimentos realizados en el presente estudio indicaron que la alteración de la homeostasis de SNOs aumenta la proliferación celular, como consecuencia del estrés nitrosativo moderado, en células MCF-7, pero no en células BT-474 que también expresan ER- α pero presentan una proteína p53 mutada. Además, un inhibidor específico de p53, pifitrina- α también abolió el efecto proliferativo en las células MCF-7. Los análisis realizados por microscopía confocal revelaron una distribución predominantemente nuclear de p53 en células MCF-7 deprivadas de estrógeno. Sin embargo, la localización subcelular de p53 no se alteró en ninguno de los tratamientos. Por tanto, estos datos indican la existencia de otros mecanismos mediante los cuales pueda participar esta proteína supresora tumoral. Por ejemplo, se sabe que ER- α es capaz de unirse a p53 y reprimir su función (Liu et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que ER- α utiliza una estrategia dual para promover una proliferación celular anormal aumentando la transcripción de genes pro-proliferativos con secuencias ERE en sus promotores, pero también reprimiendo la transcripción de genes anti-proliferativos regulados por p53 (Konduri et al., 2010). Esto ayudaría también a explicar por qué la mayoría de tumores de mama ER+ expresan una proteína p53 no mutada, ya que ER- α ejerce una represión de la funcionalidad de p53. Además, también se ha sugerido que la señalización normal regulada por interacciones entre ER- α y p53 podría estar alterada en células madre tumorales de mama (CSCs) (Konduri et al., 2010). En nuestro estudio, la alteración de la homeostasis de SNOs en células MCF-7 expandió una

población celular con características de células madre, y es posible que las alteraciones en las interacciones entre ER- α y p53 estén involucradas en este fenómeno.

Curiosamente, la expresión de tioredoxina se ha asociado con un menor crecimiento tumoral en cáncer de mama ER+ y con una proteína p53 intacta, en comparación con tumores que presentan anomalías en ER o p53 (Matsutani et al., 2001). Este estudio sugiere que la tioredoxina podría jugar un papel importante en la supresión de la proliferación en tumores de mama en un contexto ER+/p53 silvestre. Los autores demuestran que en tumores ER+/p53 silvestre, una menor expresión de tioredoxina se asocia con un aumento del índice mitótico, que es un parámetro de proliferación tumoral. De este modo, la expresión de Trx podría conllevar un mejor pronóstico en un contexto ER+/p53 intacto en comparación con otras situaciones. Los resultados del presente estudio coinciden al demostrar que el estrés nitrosativo provocado por la inhibición del sistema Trx/TrxR aumenta la proliferación celular en células ER+/p53 silvestre. Además, se encontró que una menor expresión de TrxR1 se asocia con tumores ER+, sobre todo cuando están ausentes las anomalías en p53, apoyando la hipótesis de que el sistema enzimático Trx/TrxR podría actuar como un supresor de la proliferación celular en tumores ER+/p53 intacto. Se conoce poco sobre el posible valor pronóstico de la expresión de TrxR en cáncer de mama. Sin embargo, la asociación entre la expresión del gen TXNRD1 con la expresión de HER-2, se ha asociado con un peor pronóstico (Cadenas et al., 2010). De manera significativa, en ese estudio los autores encontraron que la condición ER+ en tumores de mama se asoció con bajos niveles de TXNRD1. Por lo tanto, el potencial valor pronóstico de TXNRD1/TrxR en cáncer de mama podría depender en gran medida del estatus del receptor hormonal que presenta el tumor. Los datos del presente trabajo son consistentes con esos estudios y proporcionan una base funcional

para la asociación de la alteración del sistema enzimático Trx/TrxR, la alteración de la homeostasis de SNO y la proliferación tumoral en un contexto ER+/p53 intacto. Además, la mayoría de los tumores de mama desarrollan independencia hormonal y resistencia a las terapias endocrinas, a pesar de la expresión continuada de ER- α . Se han sugerido varios mecanismos que contribuyen a la progresión del cáncer de mama hacia la independencia hormonal, incluyendo la activación de ER- α de manera ligando independiente (Kurebayashi, 2003). Por lo tanto, los mecanismos moleculares descritos en nuestro estudio podrían también jugar un papel fundamental en el desarrollo de resistencia a terapia hormonal en cáncer de mama.

2. El mantenimiento de la homeostasis de S-nitrosotioles por parte del sistema enzimático GSNOR juega un importante papel en tumores de mama HER-2 positivos

La S-nitrosoglutation reductasa (GSNOR/Adh5), como la tioredoxina reductasa, es otro de los sistemas enzimáticos que participan en el mantenimiento celular de la homeostasis de nitrosotioles (Benhar et al., 2008, Liu et al., 2001, Lopez-Sanchez et al., 2010b). Recientes estudios sugieren que el uso de N6022, un derivado pirrólico de primera clase con potente actividad inhibidora de la actividad GSNOR, tiene efectos beneficiosos en modelos animales de enfermedades como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad inflamatoria intestinal, ya que reducidos niveles de GSNO y nitrosotioles han estado implicados en la patogénesis de tales enfermedades (Colagiovanni et al., 2012, Green et al., 2012, Sun et al., 2011).

Aunque la inhibición de TrxR con auranofina indujo un efecto pro-proliferativo en células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor de estrógenos (ER) y presentan una proteína p53 intacta, la inhibición de la actividad GSNOR con el inhibidor específico N6022 en células de cáncer de mama, no ejerció ningún efecto sobre la proliferación celular. Los diferentes mecanismos a través de los cuales estos dos sistemas enzimáticos participan en el mantenimiento de la homeostasis de nitrosotioles pueden explicar su efecto diferencial sobre la homeostasis de nitrosotioles y la proliferación celular. De hecho, estudios previos en nuestro grupo han indicado que la alteración de estos sistemas enzimáticos en células de hepatoma induce diferentes perfiles de proteínas S-nitrosiladas (Lopez-Sanchez et al., 2010b).

Alrededor del 15-20% de los pacientes con cáncer de mama tienen tumores HER2+, y la amplificación o sobreexpresión de HER-2 ha mostrado ser un importante factor predictivo tanto para la supervivencia global como para el tiempo de recaída en estos pacientes (Gijssen et al., 2010, Slamon et al., 1987). La terapia con el anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab para el tratamiento de tumores de mama HER2+ ha mostrado tener una considerable eficacia clínica y un aumento en la supervivencia global de pacientes con este tipo de tumores (Arteaga and Engelman, 2014). Sin embargo, muchos pacientes no responden a un tratamiento inicial con trastuzumab (resistencia *de novo*), y otros muchos desarrollan resistencia a trastuzumab después de un tratamiento continuado (resistencia adquirida) (Lan et al., 2005, Piccart, 2008, Zhang et al., 2011).

Significativamente, los resultados del presente estudio indican que la acción antiproliferativa ejercida por trastuzumab en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2 es suprimida de manera significativa cuando se inhibe la actividad GSNOR. Por tanto, una homeostasis de nitrosotioles

alterada podría suponer una ventaja de supervivencia en los tumores de mama HER2+ y constituir un mecanismo de resistencia a este tipo de terapia dirigida en cáncer de mama.

Una de las vías de señalización afectadas por el receptor HER-2 es la cascada de señalización PI3K/AKT, implicada en proliferación y supervivencia celular (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Schlessinger, 2004, Sliwkowski et al., 1999). La activación de AKT estimula la progresión del ciclo celular, supervivencia, metabolismo y migración a través de la fosforilación de muchos sustratos fisiológicos (Manning and Cantley, 2007, Paplomata and O'Regan, 2014, Zhao and Vogt, 2008); además se ha demostrado que AKT juega un papel muy importante en la supresión de la apoptosis a través de HER-2 (Carpenter and Lo, 2013). Se sabe que AKT está constitutivamente activada en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2 y uno de los principales mecanismos de acción descritos del trastuzumab es la inhibición de PI3K y AKT (Dean-Colomb and Esteva, 2008, Spector and Blackwell, 2009, Yakes et al., 2002). De hecho, en el presente estudio el tratamiento con trastuzumab en células de cáncer de mama HER2+ ejerció un potente y rápido efecto inhibitorio de la ruta de supervivencia AKT, como indicaron los menores niveles de la forma fosforilada de esta proteína. Sin embargo, cuando se inhibió la actividad GSNOR, con su inhibidor específico N6022, la disminución en la fosforilación de AKT por trastuzumab fue significativamente menor. En enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito que las concentraciones elevadas de NO aumentan la S-nitrosilación de PTEN y/o AKT, modulando esta cascada de señalización (Kwak et al., 2010).

Dado que en el presente estudio ni PTEN ni AKT fueron detectadas como proteínas S-nitrosiladas tras la inhibición de la GSNOR, la recuperación de activación de AKT en células tratadas por trastuzumab podría deberse a otras modificaciones mediadas por SNOs en los residuos específicos de cisteína del dominio catalítico de PTEN, como por ejemplo la S-glutathionilación (Ross et al., 2007, Yu et al., 2005). Esta inhibición de la actividad fosfatasa de PTEN, que es el inhibidor natural de la ruta PI3K/AKT, contribuiría por tanto, en condiciones de una alteración de la homeostasis de SNOs, a una recuperación parcial de esta ruta de supervivencia celular. Además, se sabe que la activación de la vía de señalización PI3K/AKT es necesaria para la supresión de la apoptosis celular mediada por HER-2 (Carpenter and Lo, 2013). En nuestro estudio la inhibición de la actividad GSNOR en células de cáncer de mama HER2+ redujo el efecto apoptótico del trastuzumab, lo que apoya la hipótesis de que la alteración de la homeostasis de nitrosotioles reactiva en estas células mecanismos de supervivencia celular.

La disminución en la activación de los receptores tirosina quinasa Trk (TrkA/NR1K1 y TrkB/NR1K2), tras el tratamiento con trastuzumab, confirmó los resultados obtenidos por otros autores que demuestran que la expresión de TrkA en células de cáncer de mama se ha asociado con la activación de HER-2/neu (Tagliabue et al., 2000). Por otro lado, el papel de otros receptores tirosina quinasa, como son los receptores Eph y de sus ligandos las efrinas, en cáncer de mama, es también importante. Así, se ha demostrado que EphA2, está sobreexpresado entre un 60-80% de los casos registrados de cáncer de mama y además está implicado en el desarrollo de resistencia al tratamiento con trastuzumab en tumores de mama HER-2+ (Brantley-Sieders et al., 2011, Kaenel et al., 2012, Ogawa et al., 2000, Wu et al., 2004, Zelinski et al., 2001). De manera interesante, se sabe que la exposición prolongada al tratamiento con trastuzumab activa la quinasa Src,

que fosforila a EphA2, y por tanto, la vía de supervivencia PI3K/AKT y la vía mitogénica PI3K/MAPK (Kaenel et al., 2012, Zhuang et al., 2010). En células de mama de mama que sobreexpresan HER-2, la tirosina quinasa c-Src se activa por unión a este receptor, y el tratamiento con trastuzumab es capaz de inhibir su actividad al impedir esta unión (Belsches-Jablonski et al., 2001, Muthuswamy and Muller, 1995, Nagata et al., 2004). En el presente estudio, el tratamiento con trastuzumab disminuyó la activación de Src y de c-abl, otra tirosina quinasa relacionada con la señalización a través de HER-2, que también está implicada en la progresión y migración de células de cáncer de mama, y que además se activa a través de Src (Srinivasan and Plattner, 2006). Estudios realizados en modelos animales, células de cáncer de mama (Boyer et al., 2013, Lu et al., 2003, Wang et al., 2009) y tumores humanos (Liang et al., 2010, Nagata et al., 2004, Zhang et al., 2011) han demostrado que Src es un modulador clave en el desarrollo de resistencia a trastuzumab. De manera importante, la inhibición de GSNOR con N6022 abolió la inactivación de estas tirosinas quinasa por trastuzumab, lo que de nuevo confirma que la alteración de la homeostasis de nitrosotioles reactiva mecanismos de resistencia en células sometidas al tratamiento anti-HER-2.

En el presente estudio, cuando las células de cáncer de mama HER2+ se trataron con el inhibidor específico de la actividad GSNOR, N6022, se observó un incremento en los niveles de S-nitrosilación de las proteínas celulares. Además, la gran mayoría de las proteínas S-nitrosiladas participan en distintos aspectos relacionados con la regulación y modulación de la apoptosis celular. Se sabe que la S-nitrosilación está implicada en la cascada de señalización apoptótica, y que el NO es capaz de regular la apoptosis mediante la nitrosilación de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (Aranda et al., 2012). La vía intrínseca de apoptosis celular es inducida por la familia de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (linfoma de células B)

como Bid (agonista del dominio de muerte celular BH3), Bax (proteína x asociada con Bcl-2) y Bad (promotor de muerte asociado con Bcl-2) que residen en el citosol pero se translocan a la mitocondria tras la señal de muerte celular. En la mitocondria, estas proteínas promueven la liberación de citocromo c, que se une a Apaf-1 (factor 1 activador de las proteasas apoptogénicas) y forma un complejo de activación (apoptosoma) con la procaspasa-9, conduciendo a su escisión y activación en la forma de caspasa-9 activa, que a su vez activa a caspasas efectoras como la caspasa-3, desencadenando la apoptosis celular (Iyer et al., 2008). Posiblemente la S-nitrosilación de Apaf-1 comprometa la funcionalidad del apoptosoma y, por tanto, una adecuada activación del proceso de apoptosis. Otra de las proteínas con mayores niveles de S-nitrosilación tras el tratamiento con N6022 fue la proteína c-Jun activa (fosforilada en los residuos Ser63 y Ser73). La proteína c-jun es un componente del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1), que regula un amplio rango de procesos biológicos, incluyendo la apoptosis, la cual puede promover o inhibir dependiendo del tejido, el estadio de desarrollo o el estímulo apoptótico (Li et al., 2004, Morton et al., 2003). La fosforilación de c-jun en Ser-63 y Ser-73 por las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) puede desencadenar efectos tanto proapoptóticos como antiapoptóticos (Behrens et al., 1999, Li et al., 2004) y se sabe que el NO inhibe la interacción entre JNK y c-jun a través de nitrosilación (Park et al., 2006).

En conjunto, los resultados del presente estudio indican que la alteración por S-nitrosilación de procesos implicados en la muerte celular podría explicar el efecto antiapoptótico de N6022 en células de cáncer de mama tratadas con trastuzumab. Además, estos datos también sugieren que, al menos en el contexto de terapia anti-HER-2 en cáncer de mama HER2+, una menor actividad GSNOR también proporcionaría una ventaja adaptativa a este tipo de tumores. En efecto, y de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, los

análisis inmunohistoquímicos mostraron que, al contrario que los tumores HER2-, la mayoría de tumores que sobreexpresaban HER-2 fueron negativos para GSNOR. Además, los datos del análisis de expresión génica confirmaron que la expresión del gen ADH5/GSNOR tuvo impacto en la supervivencia en el subtipo de cáncer de mama HER2+, pero no en los otros subtipos de cáncer de mama. Por tanto, la expresión de ADH5 y la actividad GSNOR, y su participación en el control de la homeostasis de nitrosotioles, puede constituir un importante factor pronóstico, y también predictivo de respuesta a tratamiento anti-HER-2, en tumores de mama HER-2 positivos.

VII. CONCLUSIONES

1.- El metabolismo de nitrosotioles juega un importante papel en la biología del cáncer de mama.

2.- El estatus de ER y p53 influye en la respuesta tumoral a diferentes niveles de estrés nitrosativo y aquellos factores que alteren el sistema Trx/TrxR pueden facilitar la supervivencia en tumores ER+. Por tanto, la expresión de TrxR u otros factores implicados en la homeostasis de nitrosotioles podrían ayudar en el pronóstico de tumores ER+.

3.- La participación del sistema Trx/TrxR en la homeostasis de nitrosotioles en cáncer de mama proporciona información sobre mecanismos moleculares que contribuyen a la progresión del tumor bajo independencia hormonal y podría facilitar el desarrollo de opciones terapéuticas para contrarrestar su eventual resistencia a terapias hormonales.

4.- El mantenimiento de la homeostasis de nitrosotioles por parte del sistema enzimático GSNOR juega un importante papel en tumores HER2+, y la expresión de ADH5 y la actividad GSNOR, pueden constituir importantes factores pronóstico, y también predictivos de respuesta a tratamiento anti-HER-2, en tumores de mama HER-2 positivos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Rehim, D. M., Ball, G., Pinder, S. E., Rakha, E., Paish, C., Robertson, J. F., Macmillan, D., Blamey, R. W. & Ellis, I. O. 2005. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*, 116, 340-50.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-8.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357, 593-615.
- Alsner, J., Jensen, V., Kyndi, M., Offersen, B. V., Vu, P., Borresen-Dale, A. L. & Overgaard, J. 2008. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol*, 47, 600-7.
- Angulo Martin, M., Yustos Arroyo, M., Villalobos León, L., Álvarez De Mon Soto, M. 2013. Cáncer De Mama. *Medicine*, 11, 1629-40.
- Anido, J., Scaltriti, M., Bech Serra, J. J., Santiago Josefat, B., Todo, F. R., Baselga, J. & Arribas, J. 2006. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J*, 25, 3234-44.
- Aranda, A. & Pascual, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-304.
- Aranda, E., Lopez-Pedraza, C., De La Haba-Rodriguez, J. R. & Rodriguez-Ariza, A. 2012. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. *Curr Mol Med*, 12, 50-67.
- Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25, 282-303.
- Bao, Q. & Shi, Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14, 56-65.
- Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A. & Arribas, J. 2001. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol*, 28, 4-11.
- Baselga, J., Gelmon, K. A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P., Miles, D., Bianchi, G., Cortes, J., McNally, V. A., Ross, G. A., Fumoleau, P. & Gianni, L. 2010. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor

receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*, 28, 1138-44.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C. & Norton, L. 1999. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, 26, 78-83.

Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. 2007. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 109, 1721-8.

Behrens, A., Sibilio, M. & Wagner, E. F. 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet*, 21, 326-9.

Belsches-Jablonski, A. P., Biscardi, J. S., Peavy, D. R., Tice, D. A., Romney, D. A. & Parsons, S. J. 2001. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene*, 20, 1465-75.

Benhar, M., Forrester, M. T., Hess, D. T. & Stamler, J. S. 2008. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science*, 320, 1050-4.

Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., Van De Vijver, M. J. & Bernards, R. 2007. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12, 395-402.

Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A. & Katzenellenbogen, B. S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2496-500.

Bhat-Nakshatri, P., Appaiah, H., Ballas, C., Pick-Franke, P., Goulet, R., Jr., Badve, S., Srour, E. F. & Nakshatri, H. 2010. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer*, 10, 411.

Boyer, A. P., Collier, T. S., Vidavsky, I. & Bose, R. 2013. Quantitative proteomics with siRNA screening identifies novel mechanisms of trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancers. *Mol Cell Proteomics*, 12, 180-93.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Brantley-Sieders, D. M., Jiang, A., Sarma, K., Badu-Nkansah, A., Walter, D. L., Shyr, Y. & Chen, J. 2011. Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PLoS One*, 6, e24426.
- Bremer, T. M., Jacquemier, J., Charafe-Jauffret, E., Viens, P., Birnbaum, D. & Linke, S. P. 2009. Prognostic marker profile to assess risk in stage I-III hormone receptor-positive breast cancer patients. *Int J Cancer*, 124, 896-904.
- Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrman, M., Hermes, M., Geppert, B., Schormann, W., Maccoux, L. J., Schug, M., Schumann, A., Wilhelm, C., Freis, E., Ickstadt, K., Rahnenfuhrer, J., Baumbach, J. I., Sickmann, A. & Hengstler, J. G. 2010. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, R44.
- Canas, A., Lopez-Sanchez, L. M., Valverde-Esteba, A., Hernandez, V., Fuentes, E., Munoz-Castaneda, J. R., Lopez-Pedreira, C., De La Haba-Rodriguez, J. R., Aranda, E. & Rodriguez-Ariza, A. 2012. Maintenance of S-nitrosothiol homeostasis plays an important role in growth suppression of estrogen receptor-positive breast tumors. *Breast Cancer Res*, 14, R153.
- Carpenter, R. L. & Lo, H. 2013. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer *J Carcinogene Mutagene (Rew)*.
- Clevers, H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 17, 313-9.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6, 443-6.
- Colagiovanni, D. B., Drolet, D. W., Langlois-Forget, E., Piche, M. P., Looker, D. & Rosenthal, G. J. 2012. A nonclinical safety and pharmacokinetic evaluation of N6022: a first-in-class S-nitrosoglutathione reductase inhibitor for the treatment of asthma. *Regul Toxicol Pharmacol*, 62, 115-24.
- Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T. & Miller, J. S. 1999. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol*, 27, 1533-41.
- Corrente, G., Guardavaccaro, D. & Tirone, F. 2002. PC3 potentiates NGF-induced differentiation and protects neurons from apoptosis. *Neuroreport*, 13, 417-22.

- Coulter, J. A., Mccarthy, H. O., Xiang, J., Roedl, W., Wagner, E., Robson, T. & Hirst, D. G. 2008. Nitric oxide--a novel therapeutic for cancer. *Nitric Oxide*, 19, 192-8.
- Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L. & Menendez, J. A. 2011. Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle*, 10, 3871-85.
- Dauvois, S., White, R. & Parker, M. G. 1993. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci*, 106 (Pt 4), 1377-88.
- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V. & Murad, F. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 203-36.
- Dean-Colomb, W. & Esteva, F. J. 2008. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer*, 44, 2806-12.
- Denninger, J. W. & Marletta, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 334-50.
- Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27, 6245-51.
- Di Cosimo, S. & Baselga, J. 2008. Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer*, 44, 2781-90.
- Diermeier, S., Horvath, G., Knuechel-Clarke, R., Hofstaedter, F., Szollosi, J. & Brockhoff, G. 2005. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res*, 304, 604-19.
- Doisneau-Sixou, S. F., Sergio, C. M., Carroll, J. S., Hui, R., Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. 2003. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 10, 179-86.
- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., Buyse, M., Baum, M., Buzdar, A., Colleoni, M., Coombes, C., Snowdon, C., Gnant, M., Jakesz, R., Kaufmann, M., Boccardo, F., Godwin, J., Davies, C. & Peto, R. 2010. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*, 28, 509-18.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H. & Toland, A. E. 2009. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol*, 19, 165-71.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365, 1687-717.

Elston, C. & Ellis, I. 1998. *Assessment of histological grade*, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38, 698-707.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49, 1374-403.

Fillmore, C. M., Gupta, P. B., Rudnick, J. A., Caballero, S., Keller, P. J., Lander, E. S. & Kuperwasser, C. 2010. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 21737-42.

Forsyth, I. A. & Neville, M. C. 2009. Introduction: the myoepithelial cell and milk letdown; entrance to the multifunctional role of oxytocin. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14, 221-2.

Foster, M. W., Hess, D. T. & Stamler, J. S. 2009. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*, 15, 391-404.

Frasor, J., Danes, J. M., Komm, B., Chang, K. C., Lyttle, C. R. & Katzenellenbogen, B. S. 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*, 144, 4562-74.

Gee, J. M., Robertson, J. F., Gutteridge, E., Ellis, I. O., Pinder, S. E., Rubini, M. & Nicholson, R. I. 2005. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12 Suppl 1, S99-S111.

Gerber, D. E. 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*, 77, 311-9.

Ghatak, S., Misra, S. & Toole, B. P. 2005. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem*, 280, 8875-83.

Giacinti, L., Claudio, P. P., Lopez, M. & Giordano, A. 2006. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Oncologist*, 11, 1-8.

- Gijsen, M., King, P., Perera, T., Parker, P. J., Harris, A. L., Larijani, B. & Kong, A. 2010. HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer. *PLoS Biol*, 8, e1000563.
- Ginestier, C., Adelaide, J., Goncalves, A., Repellini, L., Sircoulomb, F., Letessier, A., Finetti, P., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Jacquemier, J., Viens, P. & Birnbaum, D. 2007. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*, 26, 7163-9.
- Giordano, A. & Normanno, N. 2009. *Cancer in the post-genomic era*.
- Gjorevski, N. & Nelson, C. M. 2011. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 581-93.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. & Hynes, N. E. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 16, 1647-55.
- Green, L. S., Chun, L. E., Patton, A. K., Sun, X., Rosenthal, G. J. & Richards, J. P. 2012. Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosoglutathione reductase. *Biochemistry*, 51, 2157-68.
- Gusterson, B. A., Ross, D. T., Heath, V. J. & Stein, T. 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 7, 143-8.
- Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q. & Szallasi, Z. 2010. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 123, 725-31.
- Hall, J. M., Couse, J. F. & Korach, K. S. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*, 276, 36869-72.
- Hamilton, A. & Piccart, M. 2000. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol*, 11, 647-63.
- Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A. & Moreno-Bueno, G. 2008. "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol*, 10, 777-85.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khrantsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., Furth, P. A., Palazzo, J. P., Olopade, O. I., Bernard, P. S., Churchill, G. A., Van Dyke, T. & Perou, C. M. 2007. Identification of conserved

gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8, R76.

Higgins, M. J. & Baselga, J. 2011. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*, 121, 3797-803.

Holliday, D. L. & Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13, 215.

Howell, S. J., Johnston, S. R. & Howell, A. 2004. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 18, 47-66.

Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L. R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., Dreher, D., Palazzo, J. P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J. F., Ellis, M. J., Olopade, O. I., Bernard, P. S. & Perou, C. M. 2006. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96.

Huang, X., Gao, L., Wang, S., Mcmanaman, J. L., Thor, A. D., Yang, X., Esteva, F. J. & Liu, B. 2010. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res*, 70, 1204-14.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9.

Iyer, A. K., Azad, N., Wang, L. & Rojanasakul, Y. 2008. Role of S-nitrosylation in apoptosis resistance and carcinogenesis. *Nitric Oxide*, 19, 146-51.

Jeannin, J. F., Leon, L., Cortier, M., Sassi, N., Paul, C. & Bettaieb, A. 2008. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide*, 19, 158-63.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.

Kaenel, P., Mosimann, M. & Andres, A. C. 2012. The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer. *Cell Adh Migr*, 6, 138-47.

Kaklamani, V. G., Cianfrocca, M., Ciccone, J., Kindy, K., Rademaker, A., Wiley, E. L., Gradishar, W. & O'regan, R. M. 2010. Increased HER2/neu expression in recurrent hormone receptor-positive breast cancer. *Biomarkers*, 15, 191-3.

- Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Mackey, J. R. & Weinfeld, M. 2010. Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res*, 12, R31.
- King, M. C., Marks, J. H. & Mandell, J. B. 2003. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302, 643-6.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. & Schwarz, P. M. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*, 500, 255-66.
- Knowles, R. G. & Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-58.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. & Moncada, S. 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5159-62.
- Konduri, S. D., Medisetty, R., Liu, W., Kaiparettu, B. A., Srivastava, P., Brauch, H., Fritz, P., Swetzig, W. M., Gardner, A. E., Khan, S. A. & Das, G. M. 2010. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15081-6.
- Krishnan, V., Heath, H. & Bryant, H. U. 2000. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Vitam Horm*, 60, 123-47.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5925-30.
- Kumar, L. G. & Badve, S. S. 2008. Milestones in the discovery of Her2 proto-oncogene and trastuzumab (Herceptin™). *Connection (Suministrado por Dako North America, Inc)*.
- Kumar, S., Tomar, M. S. & Acharya, A. 2013. HSF1-mediated regulation of tumor cell apoptosis: a novel target for cancer therapeutics. *Future Oncol*, 9, 1573-86.
- Kurebayashi, J. 2003. Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer*, 10, 112-9.
- Kwak, Y. D., Ma, T., Diao, S., Zhang, X., Chen, Y., Hsu, J., Lipton, S. A., Masliah, E., Xu, H. & Liao, F. F. 2010. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 5, 49.
- Lan, K. H., Lu, C. H. & Yu, D. 2005. Mechanisms of trastuzumab resistance and their clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1059, 70-5.

- Lane, H. A., Motoyama, A. B., Beuvink, I. & Hynes, N. E. 2001. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol*, 12 Suppl 1, S21-2.
- Lee, H. & Bai, W. 2002. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 22, 5835-45.
- Leon, L., Jeannin, J. F. & Bettaieb, A. 2008. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide*, 19, 77-83.
- Leu, Y. W., Yan, P. S., Fan, M., Jin, V. X., Liu, J. C., Curran, E. M., Welshons, W. V., Wei, S. H., Davuluri, R. V., Plass, C., Nephew, K. P. & Huang, T. H. 2004. Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8184-92.
- Li, L., Feng, Z. & Porter, A. G. 2004a. JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 279, 4058-65.
- Li, S. G. & Li, L. 2013. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomed Rep*, 1, 499-505.
- Li, Y. M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B. P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G. N., Yu, D. & Hung, M. C. 2004b. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 6, 459-69.
- Liang, K., Esteva, F. J., Albarracin, C., Stemke-Hale, K., Lu, Y., Bianchini, G., Yang, C. Y., Li, Y., Li, X., Chen, C. T., Mills, G. B., Hortobagyi, G. N., Mendelsohn, J., Hung, M. C. & Fan, Z. 2010. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell*, 18, 423-35.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. & Stamler, J. S. 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 410, 490-4.
- Liu, L., Yan, Y., Zeng, M., Zhang, J., Hanes, M. A., Ahearn, G., McMahon, T. J., Dickfeld, T., Marshall, H. E., Que, L. G. & Stamler, J. S. 2004. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 116, 617-28.
- Liu, W., Konduri, S. D., Bansal, S., Nayak, B. K., Rajasekaran, S. A., Karuppayil, S. M., Rajasekaran, A. K. & Das, G. M. 2006. Estrogen receptor-alpha binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function. *J Biol Chem*, 281, 9837-40.

- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D. & Lancaster, J. R., Jr. 1998a. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2175-9.
- Liu, Z., Rudd, M. A., Freedman, J. E. & Loscalzo, J. 1998b. S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 526-34.
- Lonning, P. E. 2011. The potency and clinical efficacy of aromatase inhibitors across the breast cancer continuum. *Ann Oncol*, 22, 503-14.
- Lopez-Sanchez, L. M., Corrales, F. J., Barcos, M., Espejo, I., Munoz-Castaneda, J. R. & Rodriguez-Ariza, A. 2010a. Inhibition of nitric oxide synthesis during induced cholestasis ameliorates hepatocellular injury by facilitating S-nitrosothiol homeostasis. *Lab Invest*, 90, 116-27.
- Lopez-Sanchez, L. M., Corrales, F. J., Gonzalez, R., Ferrin, G., Munoz-Castaneda, J. R., Ranchal, I., Hidalgo, A. B., Briceno, J., Lopez-Cillero, P., Gomez, M. A., De La Mata, M., Muntane, J. & Rodriguez-Ariza, A. 2008. Alteration of S-nitrosothiol homeostasis and targets for protein S-nitrosation in human hepatocytes. *Proteomics*, 8, 4709-20.
- Lopez-Sanchez, L. M., Corrales, F. J., Lopez-Pedrerera, C., Aranda, E. & Rodriguez-Ariza, A. 2010b. Pharmacological impairment of s-nitrosoglutathione or thioredoxin reductases augments protein S-Nitrosation in human hepatocarcinoma cells. *Anticancer Res*, 30, 415-21.
- Lopez-Sanchez, L. M., Lopez-Pedrerera, C. & Rodriguez-Ariza, A. 2012. Proteomics insights into deregulated protein S-nitrosylation and disease. *Expert Rev Proteomics*, 9, 59-69.
- Lopez-Sanchez, L. M., Lopez-Pedrerera, C. & Rodriguez-Ariza, A. 2014. Proteomic approaches to evaluate protein S-nitrosylation in disease. *Mass Spectrom Rev*, 33, 7-20.
- Lopez-Sanchez, L. M., Muntane, J., De La Mata, M. & Rodriguez-Ariza, A. 2009. Unraveling the S-nitrosoproteome: tools and strategies. *Proteomics*, 9, 808-18.
- Lu, C. H., Wyszomierski, S. L., Tseng, L. M., Sun, M. H., Lan, K. H., Neal, C. L., Mills, G. B., Hortobagyi, G. N., Esteva, F. J. & Yu, D. 2007. Preclinical testing of clinically applicable strategies for overcoming trastuzumab resistance caused by PTEN deficiency. *Clin Cancer Res*, 13, 5883-8.
- Lu, Y., Yu, Q., Liu, J. H., Zhang, J., Wang, H., Koul, D., McMurray, J. S., Fang, X., Yung, W. K., Siminovitch, K. A. & Mills, G. B. 2003. Src family protein-tyrosine

- kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem*, 278, 40057-66.
- Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D. & Pollak, M. 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst*, 93, 1852-7.
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U. & Basso, S. M. 2013. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem*, 20, 596-604.
- Lumachi, F., Luisetto, G., Basso, S. M., Basso, U., Brunello, A. & Camozzi, V. 2011. Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem*, 18, 513-22.
- Macaskill, E. J., Bartlett, J. M., Sabine, V. S., Faratian, D., Renshaw, L., White, S., Campbell, F. M., Young, O., Williams, L., Thomas, J. S., Barber, M. D. & Dixon, J. M. 2011. The mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in early breast cancer: results of a pre-operative study. *Breast Cancer Res Treat*, 128, 725-34.
- Macias, H. & Hinck, L. 2012. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1, 533-57.
- Mallis, R. J. & Thomas, J. A. 2000. Effect of S-nitrosothiols on cellular glutathione and reactive protein sulfhydryls. *Arch Biochem Biophys*, 383, 60-9.
- Manning, B. D. & Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-74.
- Marletta, M. A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78, 927-30.
- Matsutani, Y., Yamauchi, A., Takahashi, R., Ueno, M., Yoshikawa, K., Honda, K., Nakamura, H., Kato, H., Kodama, H., Inamoto, T., Yodoi, J. & Yamaoka, Y. 2001. Inverse correlation of thioredoxin expression with estrogen receptor- and p53-dependent tumor growth in breast cancer tissues. *Clin Cancer Res*, 7, 3430-6.
- Mcdonnell, D. P. & Norris, J. D. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science*, 296, 1642-4.
- Menard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R. & Balsari, A. 2001. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2, 67-72.
- Moasser, M. M. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26, 6469-87.

- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J. & Baselga, J. 2001. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61, 4744-9.
- Moncada, S., Rees, D. D., Schulz, R. & Palmer, R. M. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2166-70.
- Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A. & Cohen, P. 2003. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J*, 22, 3876-86.
- Moulder, S. L., Yakes, F. M., Muthuswamy, S. K., Bianco, R., Simpson, J. F. & Arteaga, C. L. 2001. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 61, 8887-95.
- Muthuswamy, S. K. & Muller, W. J. 1995. Activation of Src family kinases in Neu-induced mammary tumors correlates with their association with distinct sets of tyrosine phosphorylated proteins in vivo. *Oncogene*, 11, 1801-10.
- Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T., Hortobagyi, G. N., Hung, M. C. & Yu, D. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6, 117-27.
- Nagy, P., Friedlander, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J. & Jovin, T. M. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res*, 65, 473-82.
- Nahta, R. & Esteva, F. J. 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*, 8, 215.
- Nahta, R. & O'regan, R. M. 2010. Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Clin Breast Cancer*, 10 Suppl 3, S72-8.
- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N. T., Hung, M. C. & Esteva, F. J. 2004. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*, 64, 3981-6.
- Nahta, R., Yu, D., Hung, M. C., Hortobagyi, G. N. & Esteva, F. J. 2006. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 269-80.

- Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R. & Esteva, F. J. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*, 65, 11118-28.
- Narayan, M., Wilken, J. A., Harris, L. N., Baron, A. T., Kimbler, K. D. & Maihle, N. J. 2009. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 69, 2191-4.
- Nielsen, D. L., Kumler, I., Palshof, J. A. & Andersson, M. 2013. Efficacy of HER2-targeted therapy in metastatic breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Breast*, 22, 1-12.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. & Gustafsson, J. A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81, 1535-65.
- Nonclercq, D., Journe, F., Body, J. J., Leclercq, G. & Laurent, G. 2004. Ligand-independent and agonist-mediated degradation of estrogen receptor-alpha in breast carcinoma cells: evidence for distinct degradative pathways. *Mol Cell Endocrinol*, 227, 53-65.
- Normanno, N., Di Maio, M., De Maio, E., De Luca, A., De Matteis, A., Giordano, A. & Perrone, F. 2005. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12, 721-47.
- Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S. A. & Uehara, T. 2011. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10349-54.
- Ogawa, K., Pasqualini, R., Lindberg, R. A., Kain, R., Freeman, A. L. & Pasquale, E. B. 2000. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene*, 19, 6043-52.
- Okuno, S., Saito, A., Hayashi, T. & Chan, P. H. 2004. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 24, 7879-87.
- Oldenhuis, C. N., Oosting, S. F., Gietema, J. A. & De Vries, E. G. 2008. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*, 44, 946-53.

- Orucevic, A. & Lala, P. K. 1996. NG-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice. *Br J Cancer*, 73, 189-96.
- Osborne, C. K. 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 339, 1609-18.
- Osborne, C. K. & Schiff, R. 2011. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 233-47.
- Osborne, C. K., Wakeling, A. & Nicholson, R. I. 2004. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*, 90 Suppl 1, S2-6.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F. L., Walker, M. G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., Bryant, J. & Wolmark, N. 2004. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 2817-26.
- Papanikolaou, V., Iliopoulos, D., Dimou, I., Dubos, S., Tsougos, I., Theodorou, K., Kitsiou-Tzeli, S. & Tsezou, A. 2009. The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells. *Int J Oncol*, 35, 1141-9.
- Paplomata, E., Nahta, R. & O'regan, R. M. 2015. Systemic therapy for early-stage HER2-positive breast cancers: time for a less-is-more approach? *Cancer*, 121, 517-26.
- Paplomata, E. & O'regan, R. 2014. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*, 6, 154-66.
- Park, H. S., Mo, J. S. & Choi, E. J. 2006. Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 281-6.
- Pathiraja, T. N., Stearns, V. & Oesterreich, S. 2010. Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer--role in treatment response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 35-47.
- Perik, P. J., De Korte, M. A., Van Veldhuisen, D. J., Gietema, J. A., Sleijfer, D. T. & De Vries, E. G. 2007. Cardiotoxicity associated with the use of trastuzumab in breast cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther*, 7, 1763-71.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52.

- Piccart, M. 2008. Circumventing de novo and acquired resistance to trastuzumab: new hope for the care of ErbB2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 8 Suppl 3, S100-13.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A. & Daidone, M. G. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65, 5506-11.
- Prat, A., Ellis, M. J. & Perou, C. M. 2012. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol*, 9, 48-57.
- Prat, A. & Perou, C. M. 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5, 5-23.
- Puhalla, S., Bhattacharya, S. & Davidson, N. E. 2012. Hormonal therapy in breast cancer: a model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol*, 6, 222-36.
- Ramsauer, V. P., Carraway, C. A., Salas, P. J. & Carraway, K. L. 2003. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*, 278, 30142-7.
- Rao, A. K., Ziegler, Y. S., Mcleod, I. X., Yates, J. R. & Nardulli, A. M. 2009. Thioredoxin and thioredoxin reductase influence estrogen receptor alpha-mediated gene expression in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*, 43, 251-61.
- Rees, D. D., Palmer, R. M. & Moncada, S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3375-8.
- Ring, A. & Dowsett, M. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer*, 11, 643-58.
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A. & Arteaga, C. L. 2007. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res*, 13, 4909-19.
- Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*, 276, 36865-8.
- Ross, J. S., Fletcher, J. A., Bloom, K. J., Linette, G. P., Stec, J., Symmans, W. F., Pusztai, L. & Hortobagyi, G. N. 2004. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*, 3, 379-98.

Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Ravdin, P. M. & Hortobagyi, G. N. 2009. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 14, 320-68.

Ross, S. H., Lindsay, Y., Safrany, S. T., Lorenzo, O., Villa, F., Toth, R., Clague, M. J., Downes, C. P. & Leslie, N. R. 2007. Differential redox regulation within the PTP superfamily. *Cell Signal*, 19, 1521-30.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19, 183-232.

Santen, R. J. 2002. To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 3007-12.

Scaltriti, M., Chandarlapaty, S., Prudkin, L., Aura, C., Jimenez, J., Angelini, P. D., Sanchez, G., Guzman, M., Parra, J. L., Ellis, C., Gagnon, R., Koehler, M., Gomez, H., Geyer, C., Cameron, D., Arribas, J., Rosen, N. & Baselga, J. 2010. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin Cancer Res*, 16, 2688-95.

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocana, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon Y Cajal, S., Arribas, J. & Baselga, J. 2007. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 99, 628-38.

Schafer, J. M., Bentrem, D. J., Takei, H., Gajdos, C., Badve, S. & Jordan, V. C. 2002. A mechanism of drug resistance to tamoxifen in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83, 75-83.

Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I. & Weinberg, R. A. 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312, 513-6.

Schlessinger, J. 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, 306, 1506-7.

Seidman, A. D., Berry, D., Cirincione, C., Harris, L., Muss, H., Marcom, P. K., Gipson, G., Burstein, H., Lake, D., Shapiro, C. L., Ungaro, P., Norton, L., Winer, E. & Hudis, C. 2008. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J Clin Oncol*, 26, 1642-9.

- Sengupta, R., Ryter, S. W., Zuckerbraun, B. S., Tzeng, E., Billiar, T. R. & Stoyanovsky, D. A. 2007. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry*, 46, 8472-83.
- Shah, C. M., Locke, I. C., Chowdrey, H. S. & Gordge, M. P. 2003. Rapid S-nitrosothiol metabolism by platelets and megakaryocytes. *Biochem Soc Trans*, 31, 1450-2.
- Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L., 3rd & Sweeney, C. 2008. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res*, 68, 1471-7.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64, 9-29.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-82.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783-92.
- Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M. & Fox, J. A. 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol*, 26, 60-70.
- Soengas, M. S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cordon-Cardo, C. & Lowe, S. W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409, 207-11.
- Spector, N. L. & Blackwell, K. L. 2009. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 27, 5838-47.
- Springer, J. E., Azbill, R. D., Nottingham, S. A. & Kennedy, S. E. 2000. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 20, 7246-51.
- Srinivasan, D. & Plattner, R. 2006. Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Res*, 66, 5648-55.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. & Loscalzo, J. 1992. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide:

synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 444-8.

Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R. & Nathan, C. F. 1989. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med*, 169, 1011-20.

Sun, X., Qiu, J., Strong, S. A., Green, L. S., Wasley, J. W., Blonder, J. P., Colagiovanni, D. B., Mutka, S. C., Stout, A. M., Richards, J. P. & Rosenthal, G. J. 2011a. Discovery of potent and novel S-nitrosoglutathione reductase inhibitors devoid of cytochrome P450 activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 5849-53.

Sun, X., Wasley, J. W., Qiu, J., Blonder, J. P., Stout, A. M., Green, L. S., Strong, S. A., Colagiovanni, D. B., Richards, J. P., Mutka, S. C., Chun, L. & Rosenthal, G. J. 2011b. Discovery of s-nitrosoglutathione reductase inhibitors: potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases. *ACS Med Chem Lett*, 2, 402-6.

Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C. & Menard, S. 2000. Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, 275, 5388-94.

Tavassoli, F. & Deville, P. 2003. *World Health Organization: tumours of the breast and female genital organs (Who/IARC Classification of Tumours)*. Lyon.

Tedaldi, G., Danesi, R., Zampiga, V., Tebaldi, M., Bedei, L., Zoli, W., Amadori, D., Falcini, F. & Calistri, D. 2014. First evidence of a large CHEK2 duplication involved in cancer predisposition in an Italian family with hereditary breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 478.

Tello, D., Tarin, C., Ahicart, P., Breton-Romero, R., Lamas, S. & Martinez-Ruiz, A. 2009. A "fluorescence switch" technique increases the sensitivity of proteomic detection and identification of S-nitrosylated proteins. *Proteomics*, 9, 5359-70.

Thomas, C. & Gustafsson, J. A. 2011. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 11, 597-608.

Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S. M., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R. K., Wardley, A., Mitchell, G., Earl, H., Wickens, M. & Carmichael, J. 2010. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376, 235-44.

Valabrega, G., Montemurro, F. & Aglietta, M. 2007. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*, 18, 977-84.

Van 'T Veer, L. J., Dai, H., Van De Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., Van Der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. & Friend, S. H. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415, 530-6.

Viale, G., Giobbie-Hurder, A., Regan, M. M., Coates, A. S., Mastropasqua, M. G., Dell'orto, P., Maiorano, E., Macgrogan, G., Braye, S. G., Ohlschlegel, C., Neven, P., Orosz, Z., Olszewski, W. P., Knox, F., Thurlimann, B., Price, K. N., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R. D., Gusterson, B. A., Goldhirsch, A. & Breast International Group, T. 2008. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*, 26, 5569-75.

Villanueva, C. & Giulivi, C. 2010. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*, 49, 307-16.

Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J. & Press, M. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20, 719-26.

Wang, S. E., Xiang, B., Zent, R., Quaranta, V., Pozzi, A. & Arteaga, C. L. 2009. Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res*, 69, 475-82.

Wobus, M., Kuns, R., Wolf, C., Horn, L. C., Kohler, U., Sheyn, I., Werness, B. A. & Sherman, L. S. 2001. CD44 mediates constitutive type I receptor signaling in cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 83, 227-34.

Worthylake, R., Opreko, L. K. & Wiley, H. S. 1999. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*, 274, 8865-74.

Wu, Q., Suo, Z., Risberg, B., Karlsson, M. G., Villman, K. & Nesland, J. M. 2004. Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 10, 26-33.

Xia, W., Bacus, S., Hegde, P., Husain, I., Strum, J., Liu, L., Paulazzo, G., Lyass, L., Trusk, P., Hill, J., Harris, J. & Spector, N. L. 2006. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7795-800.

Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S. & Arteaga, C. L. 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*, 62, 4132-41.

Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127-37.

Yu, C. X., Li, S. & Whorton, A. R. 2005. Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol Pharmacol*, 68, 847-54.

Zelinski, D. P., Zantek, N. D., Stewart, J. C., Irizarry, A. R. & Kinch, M. S. 2001. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 61, 2301-6.

Zhang, S., Huang, W. C., Li, P., Guo, H., Poh, S. B., Brady, S. W., Xiong, Y., Tseng, L. M., Li, S. H., Ding, Z., Sahin, A. A., Esteva, F. J., Hortobagyi, G. N. & Yu, D. 2011. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*, 17, 461-9.

Zhang, Y. & Hogg, N. 2005. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med*, 38, 831-8.

Zhao, L. & Vogt, P. K. 2008. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, 27, 5486-96.

Zhuang, G., Brantley-Sieders, D. M., Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., Muraoka-Cook, R., Arteaga, C. & Chen, J. 2010. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res*, 70, 299-308.

IX. ANEXO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Maintenance of S-nitrosothiol homeostasis plays an important role in growth suppression of estrogen receptor-positive breast tumors

Amanda Cañas^{1,2}, Laura M López-Sánchez³, Araceli Valverde-Esteva^{1,2}, Vanessa Hernández^{1,2}, Elena Fuentes⁴, Juan R Muñoz-Castañeda², Chary López-Pedraza², Juan R De La Haba-Rodríguez¹, Enrique Aranda¹ and Antonio Rodríguez-Ariza^{1,2*}

Abstract

Introduction: Protein denitrosylation by thioredoxin reductase (TrxR) is key for maintaining S-nitrosothiol (SNO) homeostasis, although its role in tumor progression is unknown. Therefore, the present study aimed to assess the role of altered SNO homeostasis in breast cancer cells.

Methods: The impairment of SNO homeostasis in breast cancer cells was achieved with the highly specific TrxR inhibitor auranofin and/or exposure to S-nitroso-L-cysteine. S-nitrosylated proteins were detected using the biotin switch assay. Estrogen receptor (ER) alpha knockdown was achieved using RNA silencing technologies and subcellular localization of ER α was analyzed by confocal microscopy. The Oncomine database was explored for TrxR1 (TXNRD1) expression in breast tumors and TrxR1, ER and p53 expression was analyzed by immunohistochemistry in a panel of breast tumors.

Results: The impairment of SNO homeostasis enhanced cell proliferation and survival of ER+ MCF-7 cells, but not of MDA-MB-231 (ER-, mut p53) or BT-474 (ER+, mut p53) cells. This enhanced cell growth and survival was associated with Akt, Erk1/2 phosphorylation, and augmented cyclin D₁ expression and was abolished by the ER antagonist fulvestrant or the p53 specific inhibitor pifithrin- α . The specific silencing of ER α expression in MCF-7 cells also abrogated the growth effect of TrxR inhibition. Estrogenic deprivation in MCF-7 cells potentiated the pro-proliferative effect of impaired SNO homeostasis. Moreover, the subcellular distribution of ER α was altered, with a predominant nuclear localization associated with phosphorylation at Thr311 in those cells with impaired SNO homeostasis. The impairment of SNO homeostasis also expanded a cancer stem cell-like subpopulation in MCF-7 cells, as indicated by the increase of percentage of CD44⁺ cells and the augmented capability to form mammospheres *in vitro*. Notably, ER+ status in breast tumors was significantly associated with lower TXNRD1 mRNA expression and immunohistochemical studies confirmed this association, particularly when p53 abnormalities were absent.

Conclusion: The ER status in breast cancer may dictate tumor response to different nitrosative environments. Impairment of SNO homeostasis confers survival advantages to ER+ breast tumors, and these molecular mechanisms may also participate in the development of resistance against hormonal therapies that arise in this type of mammary tumors.

* Correspondence: antonio.rodriguez.exts@juntadeandalucia.es

¹Oncology Department, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Córdoba 14004, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

One key mechanism by which nitric oxide (NO) regulates the function of target proteins is through the coupling of a nitroso moiety to a reactive thiol group in specific cysteine residues, leading to the formation of *S*-nitrosothiol (SNO), a process usually known as *S*-nitrosylation [1-3]. Recent research has uncovered the key role of enzyme-mediated processes in the nitrosylation and denitrosylation of proteins and therefore in the maintenance of SNO homeostasis [4,5]. The thioredoxin/thioredoxin reductase (Trx/TrxR) system is one of the specific enzymatic systems regulating basal and stimulus-induced protein denitrosylation. The Trx/TrxR system denitrosylates low molecular weight SNOs as well as SNO proteins [6,7], and we and others have shown that increased protein nitrosylation levels are observed when cells are treated with auranofin, a highly specific TrxR inhibitor [7-9].

A broad spectrum of pathologies, including cardiovascular diseases [10], respiratory diseases [11,12], hepatic diseases [13], neurodegenerative diseases [14,15] and neoplastic diseases [16], has been associated with impaired SNO homeostasis and aberrant *S*-nitrosylation of proteins. In this regard, we have recently reported that the inhibition of NO synthesis during induced cholestasis ameliorates hepatocellular injury, and that this therapeutic effect is in part mediated by the improvement of liver proficiency in maintaining SNO homeostasis [13].

Evidence is accumulating that *S*-nitrosylation has a key role in cancer [17] and, given the importance of SNO homeostasis in the proper regulation of this post-translational modification, this aspect must also be taken into account when investigating tumor biology. However, although the participation of NO in the process of tumorigenesis and tumor progression is well recognized, there are scarce studies addressing the participation of SNO metabolism in cancer. The present study aimed to assess the role of the alteration of SNO homeostasis in breast cancer cells. Unexpectedly, we found that impairment of SNO homeostasis may confer survival advantages to estrogen receptor (ER)-positive breast cancer cells. Indeed, positive ER status in breast tumors was found to be associated with significantly lower levels of TrxR/TXNDR1 expression compared with ER- tumors. Our results suggest that the ER status in breast cancer may dictate the tumor response to impaired SNO homeostasis, and the molecular mechanisms involved may also play a significant role in the development of resistance against hormonal therapies.

Materials and methods

The experimental research complies with the institution's guidelines and was conducted with the approval of the Ethics Committee from the Reina Sofia Hospital, Cordoba, Spain. Patient consent was not required for this study because the de-identified human breast tumor

samples were from a paraffin tissue array of breast tumors provided by Biochain (Newark, CA, USA).

Materials

Auranofin (1-thio- β -D-glucopyranosatotriethyl phosphine gold-2,3,4,6-tetraacetate) was obtained from Enzo Life Sciences (Exeter, UK). Fulvestrant (ICI 182,780), pifithrin- α and 17 β -estradiol were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Stock solutions of auranofin or 17 β -estradiol (prepared in ethanol) and of fulvestrant or pifithrin- α (prepared in dimethylsulfoxide) were diluted in culture medium and added to cells as described in figure legends. The final concentration of vehicle (ethanol or dimethylsulfoxide) was 0.01%. *S*-nitrosocysteine (CSNO) was synthesized as described elsewhere [18] by incubation of L-cysteine with acidified sodium nitrite and quantification by absorbance at 334 nm using a molar absorption coefficient of 0.74/mM/cm.

Cell culture

MCF-7, MDA-MB-231 and BT-474 cells were from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) and obtained through Sigma-Aldrich. Cells were grown in MEM with Earle's salts (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), containing 15% fetal bovine serum (PAA Laboratories) and supplemented with 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acids, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and amphotericin B (2.5 μ g/ml).

Cell proliferation and cell death assays

Cells were seeded in 96-well plates and treated as described in the figure legends for 3 days with a medium change on day 2. After 48 or 72 hours of treatment, cell proliferation was assayed using the XTT Cell Proliferation Assay Kit (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions. The formazan dye produced through the reduction of XTT tetrazolium salt by dehydrogenases and reductases of viable cells was detected spectrophotometrically (450 to 655 nm) using a Imark™ Microplate Reader (Biorad, Hercules, CA, USA). In each assay, cell proliferation was expressed as the percentage of untreated cells. Apoptotic cell death was measured using fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V/propidium iodide assay (Bender MedSystems Inc., Vienna, Austria) following the manufacturer's recommendations. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to quantify the percentage of apoptotic cells.

Immunoblotting

Cells grown in 60 mm dishes were harvested with cold PBS, and after centrifugation (1,500 \times g, 4°C, 5 minutes) the cell pellet was incubated for 15 minutes on ice with 1 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM

NaCl, 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 1.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1% NP40, 0.1 M dithiothreitol (DTT), 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1% v/v protease inhibitor cocktail (SERVA, Heidelberg, Germany) and 1% v/v phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 15,000 × *g* for 15 minutes at 4°C. Cell lysates were stored at 80°C until analysis. To obtain cytosolic and nuclear fractions, cells were incubated for 15 minutes at 4°C in low ionic strength lysis buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 M DTT, 0.1 M PMSF, 1% v/v protease inhibitor cocktail and 1% v/v phosphatase inhibitor cocktails), vortexed for 10 seconds and centrifuged at 14,000 × *g* for 5 minutes at 4°C, and supernatants (cytosol fractions) were collected and stored at -80°C until use. The remaining nuclear pellets were incubated on ice in high ionic strength lysis buffer B (20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 M DTT, 0.1 M PMSF, 1% v/v protease inhibitor cocktail and 1% v/v phosphatase inhibitor cocktails) for 15 minutes, with repeated vortexing, and centrifuged at 14,000 × *g* for 5 minutes at 4°C, and then supernatants (nuclear fractions) were collected and stored at -80°C until use.

The total protein content of the lysates was determined by a standard Bradford assay using the reagent from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Proteins were separated on SDS polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with primary antibodies dissolved in Tris buffered saline with 0.2% Tween 20 followed by incubation with secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase, a chemiluminescent reaction with the ECL Plus Western Blotting Detection System or ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) and protein bands were visualized by autoradiography by exposing the membrane to X-ray film. Densitometric analyses of protein bands detected were performed with image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Sources of antibodies were as follows: monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473), polyclonal anti-Akt, monoclonal anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), polyclonal anti-ERK1/2, monoclonal anti-cyclin D₁, and monoclonal anti-ERα were from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Polyclonal anti-p53, polyclonal anti-TFIIB, polyclonal anti-actin and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Detection of protein S-nitrosylation by the biotin switch method

The procedure was performed as previously described [13]. Briefly, cells lysates obtained in lysis solution (50

mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 1% Triton X-100 and 1 mM PMSF plus aprotinin and leupeptin) were incubated with 20 mM methyl methanethiosulfonate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) followed by acetone precipitation. Precipitates were centrifuged and resuspended in HENS buffer (250 mM HEPES (pH 7.7), 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, and 1% SDS) and then incubated with 1 mM ascorbic acid and 4 mM *N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (biotin-HPDP; Pierce, Rockford, IL, USA) for 1 hour. Because biotin-HPDP is cleavable under the reduced conditions, prepared samples were loaded onto SDS-PAGE gels without DTT. All steps preceding SDS-PAGE were carried out in the dark. Biotinylated samples were then detected by immunoblotting using a primary monoclonal anti-biotin antibody (Sigma-Aldrich).

Knockdown of ERα with specific siRNA

ESR1 gene-specific siRNA (Hs_ESR1_8 FlexiTube siRNA) and nonspecific siRNA were obtained from QIAGEN (Hilden, Germany) and used according to the manufacturer's instructions. In brief, siRNA was dissolved (600 ng/ml) in MEM medium, 0% fetal bovine serum and incubated with Hyperfect Transfection Reagent (QIAGEN) for 10 minutes at room temperature. Cells were incubated with the transfection complexes under their normal growth conditions for 24 hours, and then the medium was replaced to perform the different treatments in the transfected cells.

Immunofluorescent confocal microscopy

Cells grown on sterile glass coverslips in six-well plate were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 minutes. Cells were permeabilized in 1% BSA and 0.3% Triton X-100 for 1 hour at room temperature. The cells were incubated with Alexa Fluor-488-conjugate anti-ERα (Santa Cruz Biotechnology) and Alexa Fluor-647-conjugate anti-p53 (Cell Signaling) antibodies overnight at 4°C. Cells were washed with PBS and incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for nuclear staining. Confocal images were captured under Zeiss LSM 5 Exciter confocal microscope using ZEN 2008 software (Carl Zeiss, Jena, Germany), and analyzed with image-J software (National Institutes of Health).

Analysis of CD24/CD44 expression and mammosphere formation assay

Expression of cell surface markers CD24 and CD44 in MCF-7 cells or mammospheres was examined by flow cytometry. In brief, adherent cells or mammospheres were harvested, trypsinized, washed in PBS and labeled with monoclonal anti-CD24 phycoerythrin and anti-

CD44 fluorescein isothiocyanate antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA), using the corresponding IgG isotypes as controls, and analyzed in a FACSCalibur (BD Biosciences). For the mammosphere formation assay, after treatment MCF-7 cells were trypsinized, counted and re-seeded at clonal density (1 cell/ μ l) in ultra-low attachment plates (Costar, Corning, NY, USA) in Dulbecco's MEM Nutrient Mixture F+12 Ham supplemented with 10 ng/ml basic fibroblast growth factor, 20 ng/ml epidermal growth factor, 5 μ g/ml insulin, 4 mg/ml BSA and 0.5% v/v methylcellulose (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to prevent cell aggregation. The supplements were added every 2 days and the numbers of mammospheres were counted on day 7 after seeding.

Immunohistochemical analyses

Immunohistochemical analyses were performed in a paraffin tissue array of breast tumors (Biochain, Newark, CA, USA). Paraffin sections (4 μ m) on poly-L-lysine-coated slides were used after drying for 30 minutes at 60°C. The sections were dewaxed in xylene, rehydrated in ethanol and incubated at 100°C in ChemMate™ Target Retrieval Solution (Dako, Barcelona, Spain), pH 6.0 (TrxR1) or pH 9.0 (ER, p53), for 20 minutes. After washing in PBS, the sections were incubated for 10 minutes in 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase, and then incubated for 30 minutes with monoclonal anti-TrxR1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-ER- α clone EP1 and anti-p53 clone DO7 (Dako) for 1 hour at 4°C. After washing for 5 minutes in PBS, the slides were incubated for 30 minutes with a horseradish peroxidase-labeled polymer (DAKO Envision™ System) and developed for 3 minutes using diaminobenzidine. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt mounting medium. Microscopy images were obtained using a Coolscope digital microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The ER and p53 status was defined as positive when showing a minimum of 10% nuclear staining for ER α and p53, respectively. TrxR1 expression was semiquantitatively scored on TrxR1 immunostained sections as absent (0), mild (1), moderate (2), or intense (3). Sections were independently scored by two experienced pathologists.

Statistical analysis

Reported values are the means \pm standard error of the mean ($n = 3$) and statistical comparisons were determined with two-tailed Student's *t* tests. Associations between the ER status and clinical characteristics were assessed by chi-square test. All *P* values resulted from two-sided tests and were considered significant when *P* < 0.05. The significance of the difference between medians of data obtained from the Oncomine database was calculated as described by McGill and colleagues [19].

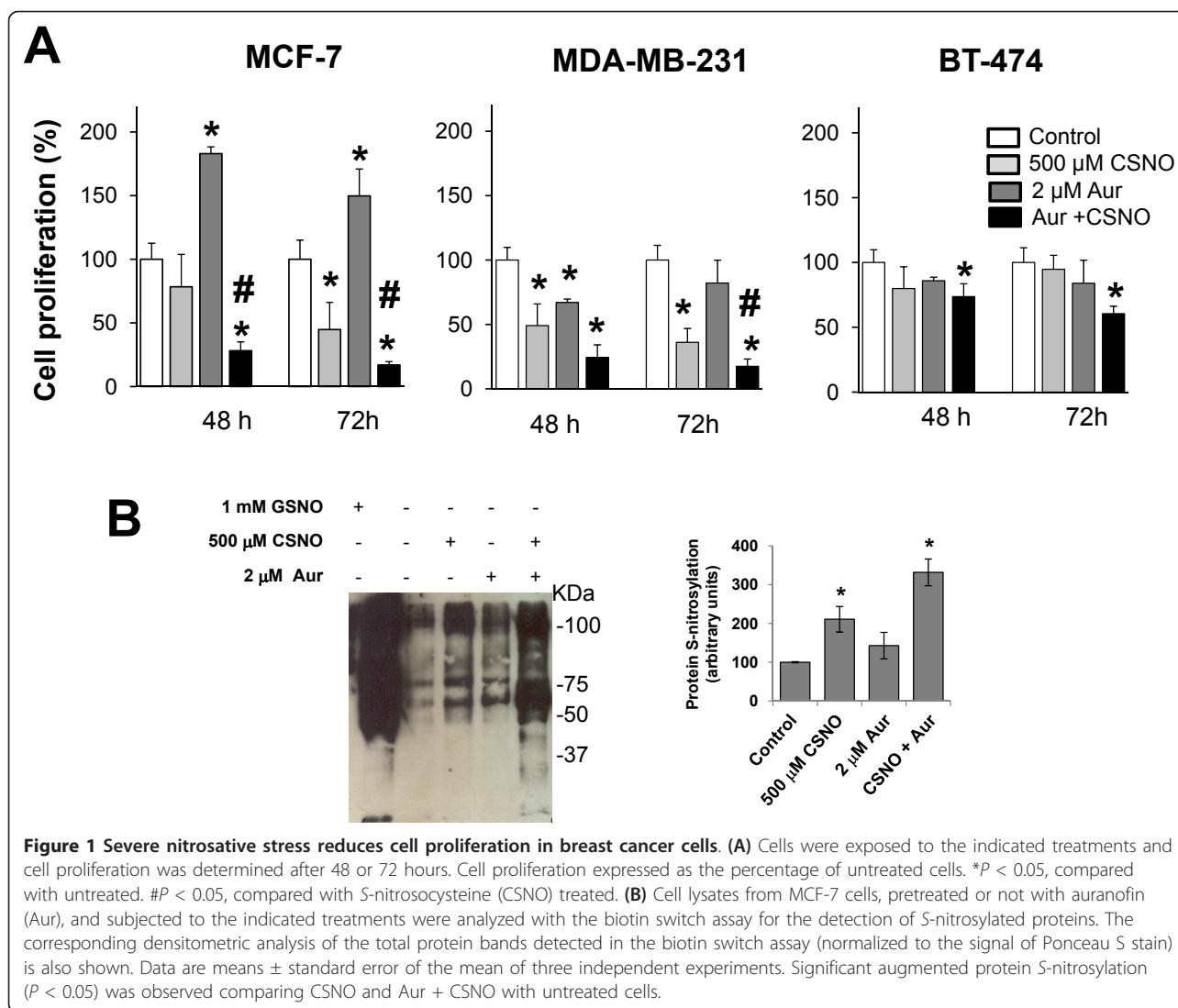
Results

To determine the effect that impaired SNO homeostasis may have on cancer cell growth, breast cancer cells were subjected to treatment with the nitrosothiol CSNO in the absence of or in the presence of the TrxR specific inhibitor auranofin. As shown in Figure 1A, treatment with 500 μ M CSNO reduced cell proliferation in all three cell lines used, especially when TrxR was inhibited. Consistent with these results, MCF-7 cells treated with 500 μ M CSNO exhibited an increase in *S*-nitrosylated proteins, as detected by the biotin switch method (Figure 1B). Moreover, pretreatment with auranofin enhanced the levels of nitrosoproteins in breast cancer cells.

However, despite the antiproliferative effect obtained by a severe alteration of SNO homeostasis, the inhibition of TrxR with auranofin in MCF-7 cells induced a pro-proliferative effect. Besides, as shown in Figure 2A, the treatment with auranofin in the presence or in the absence of a lower dose of nitrosothiol (100 nM CSNO) increased proliferation in MCF-7 (ER+) cells but not in MDA-MB-231 (ER-, p53 mut) or BT-474 (ER+, p53 mut) cells. Therefore, although a severe nitrosative stress caused growth arrest in breast cancer cells, a mild nitrosative stress promoted the growth of tumor cells in an ER+ and intact p53 setting.

Cellular signaling pathways involved in cell proliferation and survival were analyzed to further explore the mechanisms responsible for the pro-proliferative effect exerted by mild nitrosative stress in breast cancer cells. Analysis by immunoblotting of the phosphorylated forms of ERK1/2 and Akt revealed that 100 nM CSNO, auranofin, or a combination of both treatments increased phosphorylation of ERK1/2 and Akt, but only in MCF-7 cells (Figure 2B). Notably, these treatments also induced in MCF-7 cells the expression of cyclin D₁, a protein required for cell cycle G₁/S transition. Thus, in MCF-7 (ER+) cells, mild conditions of nitrosative stress induce the activation of intracellular signaling pathways aimed at cell survival and proliferation. Notably, only in MCF-7 cells, but not in MDA-MB-231 or BT-474 cells, the treatment with auranofin or 100 nM CSNO significantly reduced the rate of apoptosis, confirming the activation of survival pathways in MCF-7 cells. Only when a severe nitrosative stress was induced in MCF-7 cells, which induced massive *S*-nitrosylation of proteins, was an increase in apoptotic death observed (Figure 2C).

The proliferative effect caused by moderate nitrosative stress in breast cancer cells was not observed in cells that do not express ER α (MDA-MB-231), or, even in cells expressing ER α , also carried a mutation in p53 (BT-474). The role of both proteins was therefore explored by treating MCF-7 cells with fulvestrant, an antagonist of ER α , or with pifitrin- α , an inhibitor of p53. As shown in Figure 3, pretreatment of MCF-7 cells with 100 nM fulvestrant or

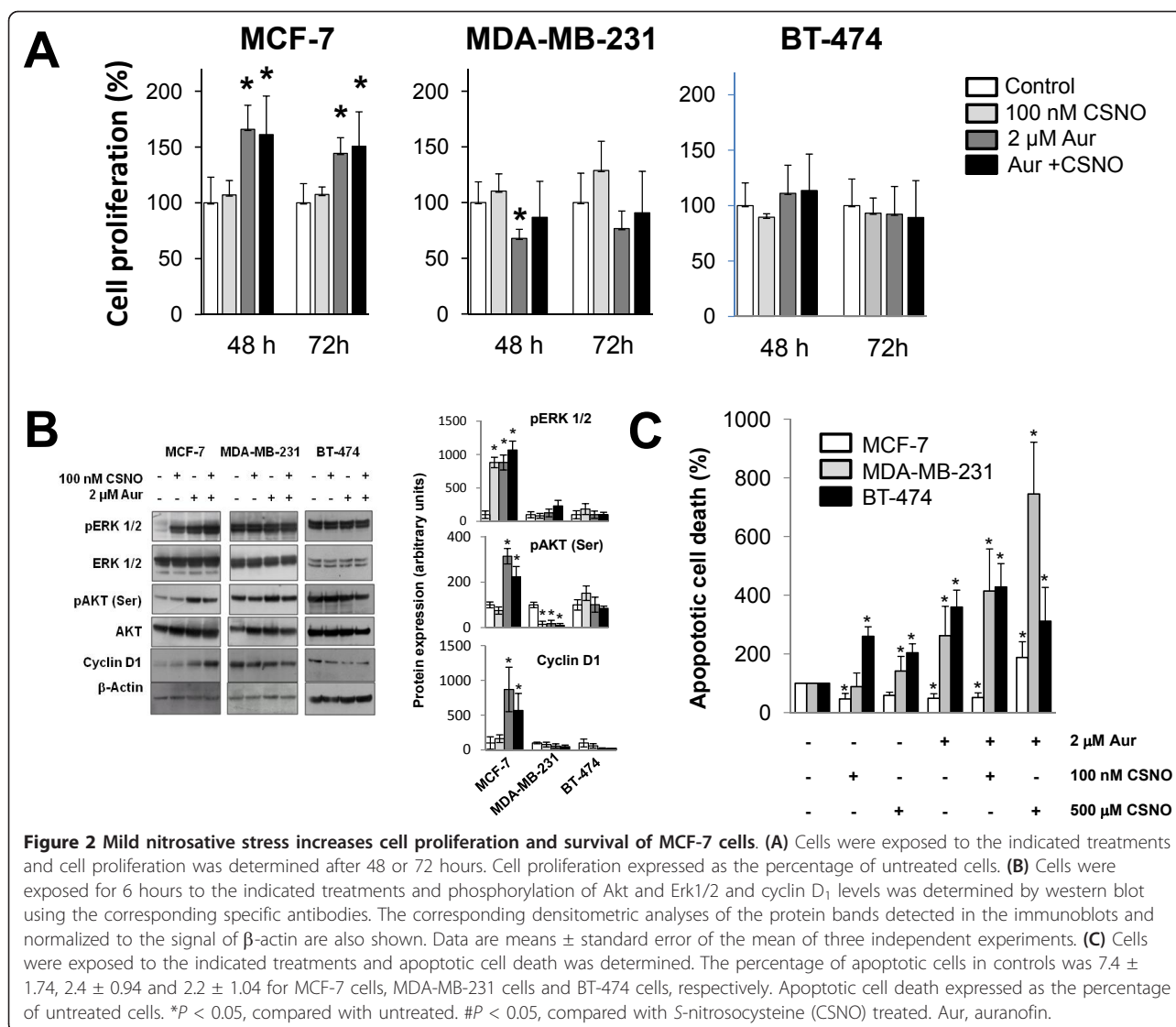


10 μM pifitrin-α completely abrogated the proliferative effect of moderate nitrosative stress. Functional ERα and active p53 are therefore prerequisites for the cellular proliferation directed by mild conditions of nitrosative stress in breast cancer cells.

To confirm the involvement of ERα in the proliferative effect of auranofin in MCF-7 cells, a series of experiments with a siRNA specific for the ESR1 gene were performed. As shown in Figure 4A, the specific silencing of the ESR1 gene (si-ER-α) in MCF-7 cells significantly reduced the expression of ERα protein. Notably, under these conditions where ERα is not expressed, the proliferative effect of TrxR inhibition in the presence or the absence of 100 nM CSNO was abrogated (Figure 4B). The expression of ERα is thus required for the augmented cell proliferation under moderate conditions of nitrosative stress in breast tumor cells. However, exposure of MCF-7 cells to auranofin, in the presence or in the absence of CSNO, did

not significantly alter the levels of ERα or p53 proteins (Figure 4C). The increased proliferative capacity of ER+ breast cancer cells subjected to mild nitrosative stress therefore arises through mechanisms altering the functionality of ERα and/or p53.

The results obtained in the previous experiments suggested that the increase in cell proliferation observed in ER+/p53wt breast cancer cells when exposed to moderate nitrosative stress conditions could be related to a response similar to estrogenic response. Consequently, we conducted a series of experiments in which the MCF-7 cells were deprived of any estrogenic stimulus before exposure to the different treatments. To this end, cells were maintained in phenol red-free medium and charcoal-stripped serum, prior to treatment with auranofin and/or 100 nM CSNO. As shown in Figure 4D, estrogen deprivation further increased the proliferative effect of moderate nitrosative stress in breast cancer cells. Under these conditions,

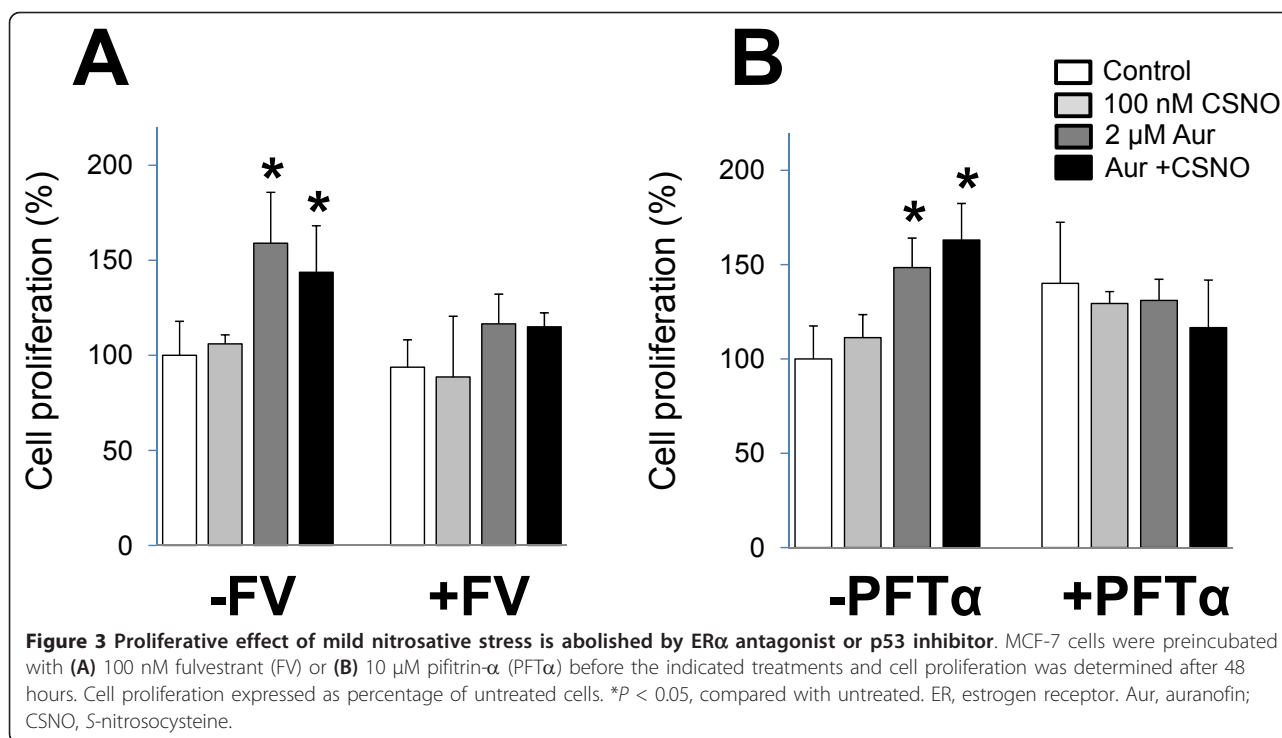


the treatment of cells with 100 nM CSNO increased cell proliferation by 50%; and when cells were treated with auranofin, cell proliferation was increased twofold compared with untreated cells. Significantly, when the cells were previously exposed to 10 nM estradiol, this proliferative effect was not observed (Figure 4D). These experiments therefore indicate that moderate impairment of SNO homeostasis induces a response similar to estrogen and also suggest that mild nitrosative stress may facilitate cell proliferation in breast cancer through an ER-mediated pathway.

We next investigated whether the impairment of SNO homeostasis may alter the subcellular distribution of ERα. To this end, estrogen-deprived MCF-7 cells were treated with 100 nM CSNO, auranofin, or both and confocal microscopy was performed to study the subcellular distribution of ERα (Figure 5). Since p53 also

appeared to be involved in the observed increase in proliferation, the subcellular distribution of this protein was also analyzed. As shown in Figure 5, treatment of estrogen-deprived MCF-7 cells with CSNO or auranofin, added separately or in combination, induced an almost exclusively nuclear localization of ERα, with a clear reduction of the cytoplasmic levels of the receptor. In estrogen-starved MCF-7 cells, confocal analysis revealed a prevalent nuclear distribution of p53 protein, which was not modified by any of the treatments.

To confirm the previous results, estrogen-starved MCF-7 cells were exposed to the different treatments and, after separation of cytosolic and nuclear fractions, the expression of ERα was analyzed by immunoblotting. As shown in Figure 6, treatment with auranofin and/or CSNO decreased the levels of cytosolic ERα, compared with control cells, where the absence of the estrogen

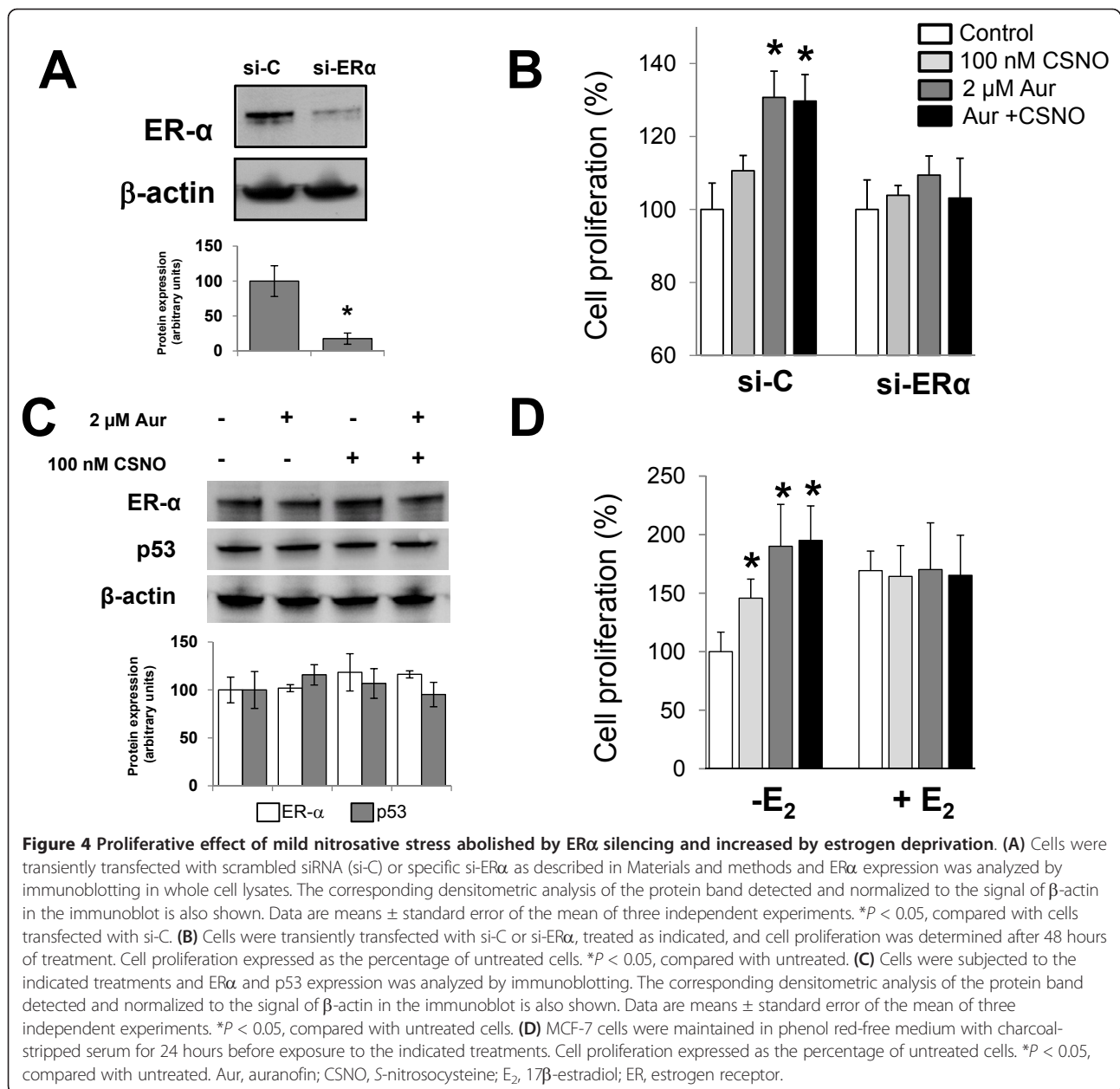


signal induced higher levels of stabilized cytosolic ER α protein. On the contrary, the impairment of SNO homeostasis increased the presence of this receptor in the nuclear fraction from these cells (Figure 6). Phosphorylation of ER α at Thr311 has been described not only to direct the receptor to the nucleus but also to prevent its return to the cytoplasm due to the alteration of a probable nuclear export sequence [20]. We therefore also explored whether the altered subcellular distribution of ER α by impairment of SNO homeostasis could be associated with phosphorylation of ER α at Thr311. As shown in Figure 6, this phosphorylated form of the receptor was almost undetectable in the cytosolic or nuclear fractions from untreated MCF-7 cells. On the contrary, p-ER α (Thr311) was readily detected in the nuclear fractions from auranofin-treated and/or CSNO-treated breast cancer cells.

Tumors and tumor cell lines constitute a heterogeneous cell population, and only some of these cell subpopulations exhibit increased tumorigenicity and resistance to antitumor therapy. These more aggressive tumor cells are called tumor stem cells or cancer stem cells (CSCs), and appear to be responsible for the processes of tumor progression, recurrence and metastases [21]. Estrogen activity is not only responsible for the normal expansion of the population of stem cells in the mammary epithelium during development but also increases the population of CSCs in the tumoral process [22]. We therefore decided to explore this possibility under our experimental conditions. In the

case of breast cancer, identifying those cancer cells with stem cell characteristics can be accomplished by functional assays *in vitro*, such as the mammosphere formation assay. In this assay, cells are grown in suspension in the absence of serum and the surviving cells grow into mammospheres, which are enriched in cancer cells with stem cell characteristics. As shown in Figure 7A, the culture of MCF-7 cells under these conditions resulted in the formation of mammospheres that were then trypsinized, disaggregated and analyzed by flow cytometry showing an enrichment in CD44⁺/CD24^{low/-} cells, a phenotypic characteristic that is considered a marker of CSCs in breast tumors [23-25]. As shown in Figure 7B, flow cytometry analysis indicated an increase in the subpopulation of CD44⁺ cells when SNO homeostasis was impaired in MCF-7 cells. Moreover, the impairment of SNO homeostasis in MCF-7 cells increased their subsequent capability to form mammospheres when seeded at clonal density. These data therefore indicate that the impairment of SNO homeostasis expands a CSC-like subpopulation in MCF-7 cells.

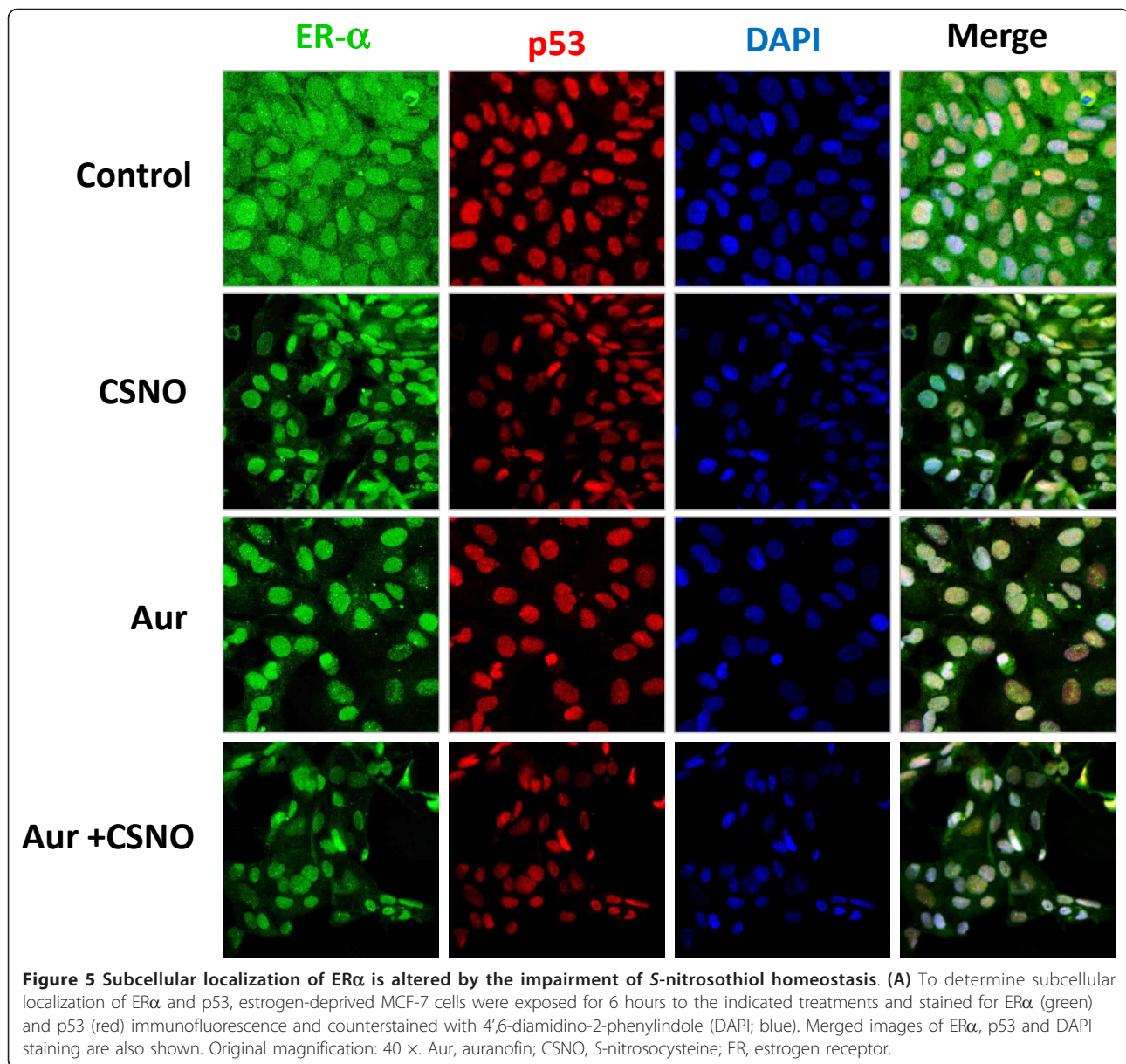
Taken together, our results indicate that the alteration of SNO homeostasis, either through exposure to nitrosothiols or by the inhibition of TrxR, may constitute an adaptive advantage for ER⁺ breast tumors. We therefore decided to interrogate the Oncomine database for TXNRD1 expression in breast cancer. From the breast cancer datasets in the database, those with ER status defined for samples and with at least 30 samples in both ER⁺ and ER⁻ groups were selected for the analysis. As shown in Additional file 1,



positive ER status in breast tumors was found to be significantly associated with lower levels of TXNDR1 expression. On the contrary, no significant association was found with HER2 status in the three breast cancer datasets where this condition was defined (Additional file 2). Lower expression of TrxR1/TXNDR1 therefore appears to be linked to the ER-dependent growth of breast cancer.

To confirm the relationship between the expression of ER and TrxR1 in breast cancer we next analyzed TrxR1, ER and p53 expression by immunohistochemistry in a panel of 57 breast tumors, whose clinical characteristics are summarized in Additional file 3. The specificity of the anti-TrxR1 antibody employed in the immunohistochemistry

studies was previously confirmed by western blot and siRNA silencing. The antibody recognized a single 55 kDa protein that was knocked-down by specific silencing of the TXNDR1 gene (Additional file 4). As shown in Figure 8A, ER expression was not observed in some tumors whereas in others ER was immunodetected in the nucleus of tumoral cells, thus defining the ER status of tumors as ER- ($n = 36$) or ER+ ($n = 21$), respectively. Also, p53 expression was evaluated by immunohistochemistry, since p53 accumulation might serve as a surrogate biomarker of p53 mutation in breast carcinomas [26,27]. In our study, 58% of tumors were p53+ as indicated by the immunodetection of p53 protein in the nucleus of tumoral cells (Figure 8A).



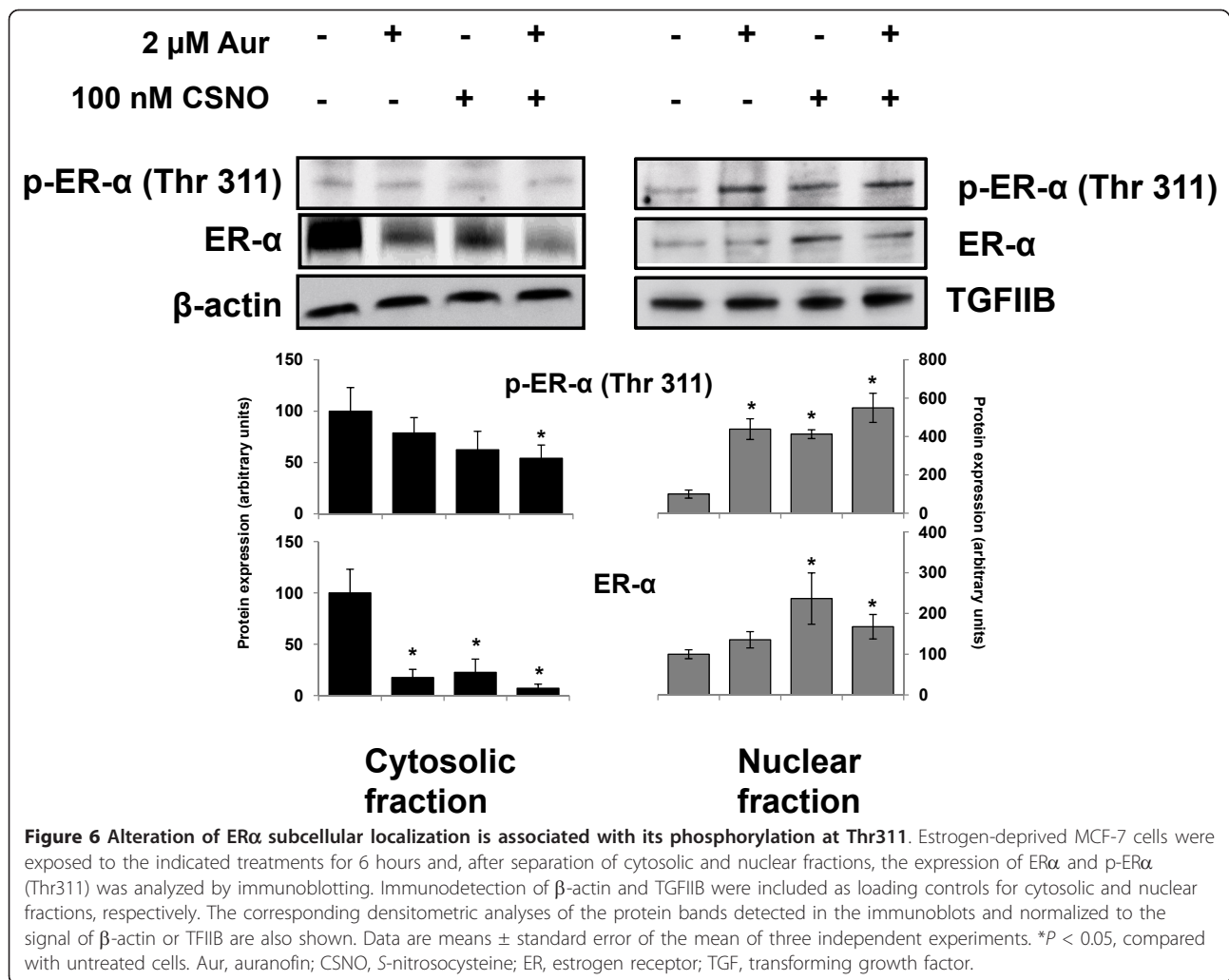
On the contrary, TrxR1 protein was immunodetected in all of the analyzed breast tumors, mostly in the cytosol of epithelial tumor cells. Importantly, positive ER status in breast tumors was found to be significantly associated with lower levels of TrxR1 expression as detected by immunohistochemistry (Figure 8B). Furthermore, the association of a lower TrxR1 expression with the absence of p53 alterations was observed in ER+ tumors but not in ER- tumors (Figure 8C).

Discussion

Evidence is accumulating that S-nitrosylation has an important role in the NO-mediated regulation of tumorigenesis and tumor progression [17]. However, few

mechanisms regarding NO/SNO and cancer have been clearly established. In addition, it has long been evident that cancer is a heterogeneous disease. In this regard it is important to note that breast cancer is not a single disease but is instead a collection of breast diseases that have diverse histopathologies, genetic and genomic variations, and clinical outcomes [28]. Determination of the ER status of the tumor is essential to determine whether or not a breast cancer patient is a candidate for hormonal therapy. Overall, about 50 to 60% of all breast cancers are ER+.

In previous studies we have shown in different experimental models that impairment of the enzymatic systems that maintain SNO homeostasis cause increased cellular S-nitrosoprotein levels [9,13]. In the present study the

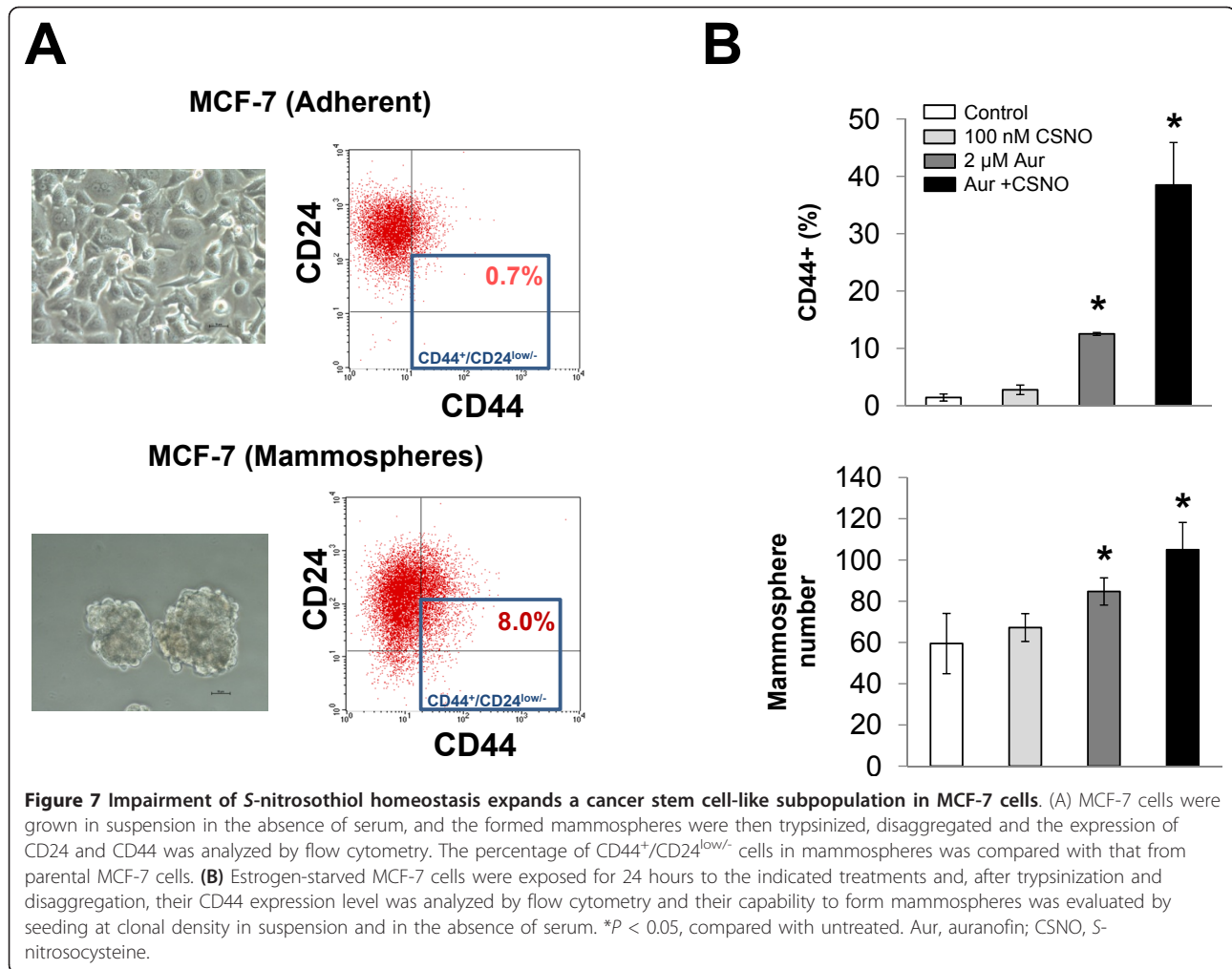


biotin switch assay indicated greater S-nitrosylation levels when cells were treated with 500 μ M CSNO compared with auranofin. Furthermore, previously we have demonstrated in human hepatocytes that the profile of S-nitrosylated proteins after TrxR inhibition with auranofin is different from those identified when cells are treated with CSNO or when S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity is impaired [9]. Thus, 500 μ M CSNO may exceed the capacity of other defense systems participating in nitrosothiol homeostasis, such as GSNOR, and the threshold between mild and nitrosative stress may be determined not only by the level of protein S-nitrosylation but also by the type of proteins that are modified.

We have shown that severe nitrosative stress in breast cancer cells, resulting from specific inhibition of one of these enzyme systems regulators and exposure to a high dose of nitrosothiol CSNO, inhibited cell proliferation. This growth inhibition was associated with a marked increased level of S-nitrosylated proteins detectable by the biotin switch method. The massive S-nitrosylation of

key proteins for cell survival could explain the inhibitory effect of severe nitrosative stress. These results suggest a potential therapeutic use of drugs capable of altering SNO homeostasis in tumors [9]. However, and significantly, induction of a moderate nitrosative stress was able to stimulate cell proliferation of breast tumor cells in a context of intact ER+/p53. Our results indicate that the effect of impairing SNO homeostasis in cancer cells depends on the intensity of the resulting nitrosative stress and also on the cellular context. This confirms the duality of NO in cancer and underscores the complexity underlying the role that S-nitrosylation may play in tumor biology [17].

In the present study, the increased proliferation in ER+ breast cancer cells subjected to a moderate nitrosative stress was associated with the activation of cellular proliferation and survival signaling pathways. Akt, also known as protein kinase B, is a serine/threonine protein kinase that is involved in cell survival pathways by inhibiting apoptotic processes. On the other hand, ERK1/2 are

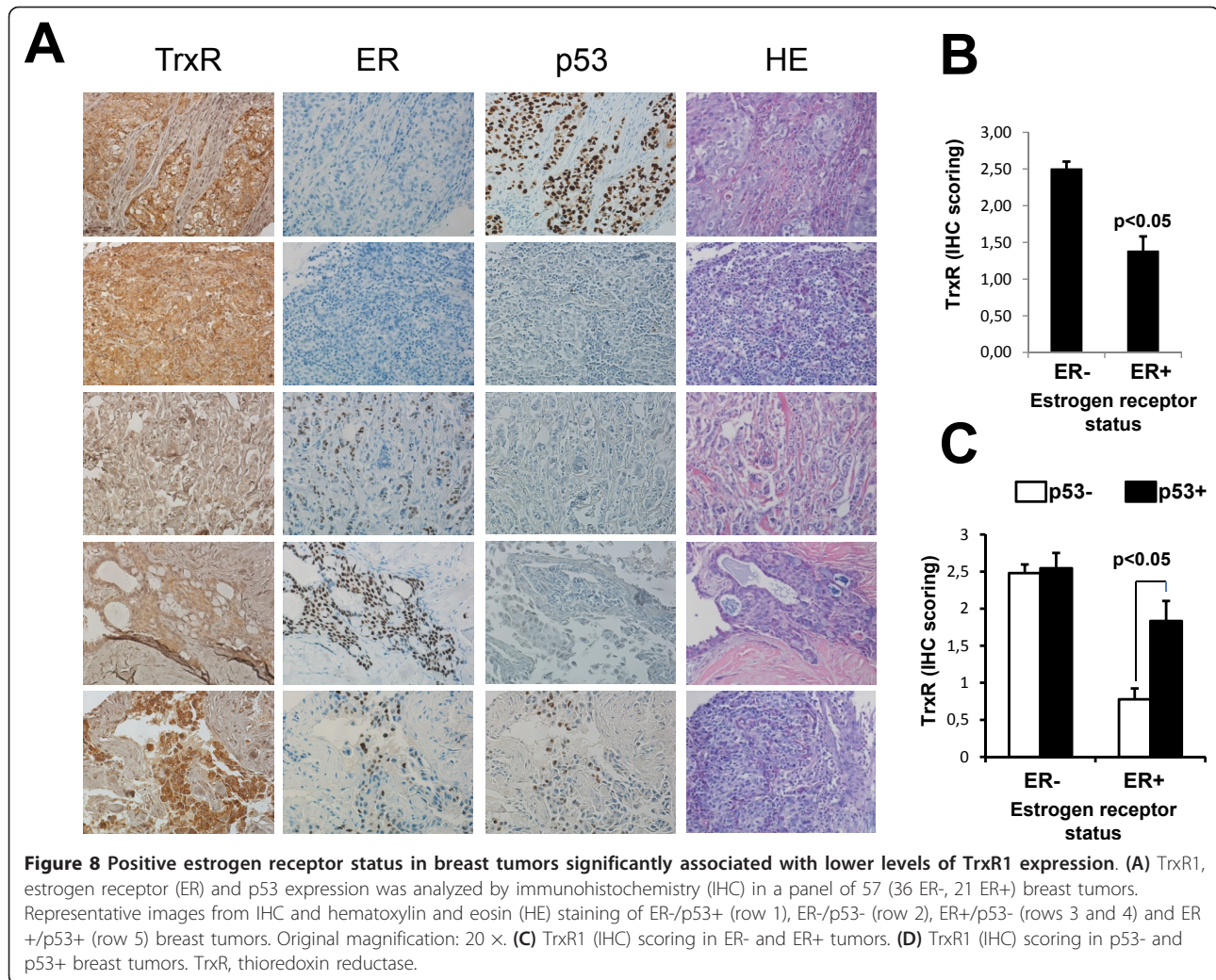


members of the mitogen-activated protein family of kinases that act as key integration points in cell signaling. Both Akt and ERK1/2 are translocated to the cell nucleus upon activation by phosphorylation, and there in turn phosphorylate other molecular targets by inducing the expression of genes involved in proliferation and cell survival. Furthermore, in our hands, activation of these signaling pathways in MCF-7 cells was associated with the induction of cyclin D₁ expression. This protein is induced early in the G₁ phase of cell cycle, and the complex formed between cyclin-dependent kinases and cyclin D₁ is critical for phosphorylation of substrates that are essential for cell proliferation. Significantly, cyclin D₁ plays an important role in the progression through the cell cycle induced by estrogen and ER [29]. These data therefore suggest that the ER α receptor is involved in the augmented proliferation of MCF-7 cells with impaired SNO homeostasis.

The experiments of ESR1 gene silencing confirmed that the expression of ER α is required for moderate nitrosative stress to increase the proliferative capacity of breast cancer

cells. Since the treatments did not alter the levels of expression of this protein, this increase must occur through mechanisms that alter the functionality of ER α . Estrogen deprivation experiments supported this hypothesis, since under these conditions the proliferative effect of SNO homeostasis impairment was enhanced, and this effect was abrogated when cells were previously subjected to an estrogenic signal. Taking together this results indicate that the impairment of SNO homeostasis in ER⁺ breast cancer cells induces a ER-dependent cell growth response comparable with estrogen response in breast cancer cells. Other studies have shown association between Trx/TrxR and the estrogen response in human breast cancer cells. The impairment of the Trx/TrxR system has thus been described to increase the progesterone receptor expression in MCF-7 cells in response to estrogen [30].

Unlike other nuclear receptors such as thyroid or vitamin D receptors, which reside in the nucleus in the absence of their ligands, estrogenic receptors such as ER α are translocated into the nucleus after ligand binding,



whereas pure antagonists such as fulvestrant target ER α to the cytoplasm [20,31]. Our experiments support that fulvestrant disruption of ER α traffic between cytoplasm and nucleus eliminates the pro-proliferative effect of moderate nitrosative stress in breast cancer cells. On the other hand, the intracellular concentration of ER α is the result of a dynamic equilibrium between synthesis and degradation [32]. The absence of an estrogen signal induces higher levels of stabilized cytosolic ER protein, forming a complex with chaperones [33]. This stabilized cytosolic ER pool may explain why the pro-proliferative effects of CSNO and auranofin treatment are enhanced in estrogen-starved cells and abolished by 17 β -estradiol. On ligand (17 β -estradiol) binding, the receptor dissociates from the complex, and is either ubiquitinated for degradation in the cytoplasm or translocates to the cell nucleus by a nuclear localization signal (domain D), although the molecular mechanisms involved are not well understood [33]. Our data indicate that impairment of SNO homeostasis

induces a distinct decrease of cytoplasmic ER α levels, resulting in an almost exclusively nuclear localization of this receptor.

In endometrial tumor cells that express ER α , estradiol induces phosphorylation of ER α at residue Thr311 through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase [20]. This phosphorylation not only directs ER α to the nucleus, but also prevents its return to the cytoplasm due to the alteration of a probable nuclear export sequence. Although we did not find p38 activation, p-ER α (Thr311) was readily detected in the nuclear fractions of breast cancer cells when subjected to impairment of SNO homeostasis. Activation of other mitogen-activated protein kinases, such as Akt, due to SNO homeostasis impairment may therefore possibly participate in the phosphorylation of ER α at residue Thr311 and in the alteration of its subcellular distribution in breast cancer cells.

The participation of p53 in the proliferative effect of impaired SNO homeostasis remains uncertain. We have

shown that impairment of SNO augments cell growth in MCF-7 cells but not in BT-474 cells, which also express ER α but harbor a mutated p53 protein. Furthermore, a specific inhibitor of p53 also abolished the proliferative effect in MCF-7 cells. Confocal analysis revealed a prevalent nuclear distribution of p53 protein in serum-starved MCF-7 cells, in agreement with previous reports [34]. However, the subcellular localization of p53 was not altered by any of the treatments, hence other p53-related mechanisms might be involved. For example, it is known that ER α is capable of binding to p53 and suppressing its function [35]. In fact, it has been suggested that ER α uses a dual strategy to promote an abnormal cellular proliferation enhancing the transcription of pro-proliferative genes, but also suppressing the transcription of anti-proliferative genes regulated by p53 [36]. Furthermore, normal signaling regulating interactions between ER and p53 have also been suggested to be disrupted in breast CSCs [36]. In our study the impairment of SNO homeostasis in MCF-7 cells expanded a CSC-like subpopulation, and it is conceivable that the disturbances of the interactions between ER and p53 might be involved.

Interestingly, thioredoxin expression has been associated with lower tumor growth in ER+ and p53 intact breast cancers than in cases that had abnormalities in ER or p53 [37]. This study suggested that thioredoxin may play an important role in suppressing the proliferation of ER+/p53 intact breast tumors, and that Trx expression may mean better prognosis in ER+/p53 intact conditions than in other conditions. In our study we found that lower TrxR1 expression is associated with ER+ tumors, particularly when p53 abnormalities are absent, supporting the notion that the Trx/TrxR enzyme system may act as a suppressor of cell proliferation in ER+/p53 intact tumors. Little is known about the possible prognostic value of TrxR expression in breast cancer. However, the association of TXNRD1 expression with HER2 expression and a worse prognosis has been described [38]. Significantly, in that study the authors also found that positive ER status in breast tumors was associated with lower levels of TXNRD1 expression. The potential prognostic value of TXNRD1/TrxR1 in breast cancer may therefore strongly depend on hormonal receptor status of the tumor. Our data are consistent with these studies and provide a functional basis for the association of the alteration of the Trx/TrxR enzymatic system, the impairment of SNO homeostasis and tumor proliferation in an ER+/p53 intact setting. Besides, the majority of breast tumors that develop hormone independence and resistance to endocrine therapies do so despite the continued expression of ER α . Several mechanisms contributing to the progression of breast cancer to hormone independence, including ligand-

independent activation of ER α , have been suggested [39]. The molecular mechanisms described in our study may therefore also play a role in the development of resistance against hormonal therapies in breast cancer.

Conclusions

Our study highlights the importance of SNO metabolism in cancer. The adequate maintenance of SNO homeostasis plays an important role in the suppression of growth of ER+ breast tumors, since the impairment of SNO homeostasis confers survival advantages to ER+ breast cancer cells. Our findings have potential clinical relevance, as they predict that the expression of TrxR or other factors involved in SNO homeostasis could help in the prognosis of ER+ tumors. Also, they provide evidence of other molecular mechanisms contributing to the progression of breast cancers to hormone independence and could facilitate the development of therapeutic options to counteract their eventual hormone independence.

Additional material

Additional file 1: Association of ER status and TXNRD1 expression in breast cancer. Eight breast cancer datasets from the Oncomine database with ER status defined for samples and with at least 30 samples in both ER- and ER+ groups were analyzed to study association of ER status and TXNRD1 expression.

Additional file 2: Association of HER2 status and TXNRD1 expression in breast cancer. Three breast cancer datasets from the Oncomine database with ER and HER2 status defined for samples and with at least 30 samples in both ER- and ER+ groups were analyzed to study association of HER2 status and TXNRD1 expression.

Additional file 3: Pathological characteristics of breast tumors. Table summarizing the clinical characteristic of the breast tumor panel used.

Additional file 4: Validation of the anti-TrxR1 antibody employed in the immunohistochemical studies. MCF-7 cells were transiently transfected with scrambled siRNA (si-C) or with two specific si-TrxR1 siRNAs, and TrxR1 expression was analyzed by immunoblotting in whole cell lysates.

Abbreviations

Akt: protein kinase B; BSA: bovine serum albumin; CSC: cancer stem cell; CSNO: S-nitrosocysteine; DTT: dithiothreitol; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; EGTA: ethyleneglycol tetraacetic acid; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; ER: estrogen receptor; MEM: modified Eagle's medium; NO: nitric oxide; PBS: phosphate-buffered saline; PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride; siRNA: small interfering RNA; SNO: S-nitrosothiol; Trx: thioredoxin; TrxR: thioredoxin reductase.

Acknowledgements

Supported by grants to AR-A from Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (JA0230/09) and Programa de Promoción de la Investigación en Salud del Ministerio de Economía y Competitividad (P110/00428). The authors grateful acknowledge the excellent technical assistance of Dr Esther Peralbo with the confocal microscope studies.

Author details

¹Oncology Department, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Córdoba

14004, Spain. ²Research Unit, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Córdoba 14004, Spain. ³Cell Biology Department, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, Córdoba 14004, Spain. ⁴Pathology Department, Hospital Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, Córdoba 14004, Spain.

Authors' contributions

AC, LML-S, AV-E, and VH performed all the experiments and analyses except where noted below. EF and JRM-C performed immunohistochemical analyses. EF, JRDLH-R and EA evaluated the clinical pathological parameters. CL-P, JRM-C, JRDLH-R and EA provided valuable feedback during the project and revised the manuscript draft. AR-A conceived the study, participated in its design and coordination and drafted the manuscript. All authors contributed to the interpretation and discussion of the findings and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 July 2012 Revised: 2 November 2012

Accepted: 4 December 2012 Published: 5 December 2012

References

1. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J: **S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:444-448.
2. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH: **Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:193-197.
3. Foster MW, Hess DT, Stamler JS: **Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective.** *Trends Mol Med* 2009, **15**:391-404.
4. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS: **Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:721-732.
5. Stamler JS, Hess DT: **Nascent nitrosylases.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:1024-1026.
6. Sengupta R, Rytter SW, Zuckerbraun BS, Tzeng E, Billiar TR, Stoyanovsky DA: **Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols.** *Biochemistry* 2007, **46**:8472-8483.
7. Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS: **Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins.** *Science* 2008, **320**:1050-1054.
8. Tello D, Tarin C, Ahicart P, Breton-Romero R, Lamas S, Martinez-Ruiz A: **A 'fluorescence switch' technique increases the sensitivity of proteomic detection and identification of S-nitrosylated proteins.** *Proteomics* 2009, **9**:5359-5370.
9. Lopez-Sanchez LM, Corrales FJ, Lopez-Pedraza C, Aranda E, Rodriguez-Ariza A: **Pharmacological impairment of S-nitrosoglutathione or thioredoxin reductases augments protein S-nitrosation in human hepatocarcinoma cells.** *Anticancer Res* 2010, **30**:415-421.
10. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS: **S-nitrosylation in cardiovascular signaling.** *Circ Res* 2010, **106**:633-646.
11. Ckless K, Lampert A, Reiss J, Kasahara D, Poynter ME, Irvin CG, Lundblad LK, Norton R, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM: **Inhibition of arginase activity enhances inflammation in mice with allergic airway disease, in association with increases in protein S-nitrosylation and tyrosine nitration.** *J Immunol* 2008, **181**:4255-4264.
12. Wu H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Estela Del Rio-Navarro B, Anderson DM, Jenchura CA, Li H, Ramirez-Aguilar M, Del Carmen Lara-Sanchez I, London SJ: **Genetic variation in S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) and childhood asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **120**:322-328.
13. Lopez-Sanchez LM, Corrales FJ, Barcos M, Espejo I, Munoz-Castaneda JR, Rodriguez-Ariza A: **Inhibition of nitric oxide synthesis during induced cholestasis ameliorates hepatocellular injury by facilitating S-nitrosothiol homeostasis.** *Lab Invest* 2010, **90**:116-127.
14. Nakamura T, Lipton SA: **Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases.** *Cell Death Differ* 2011, **18**:1478-1486.
15. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, Garcia-Arencibia M, Rose C, Luo S, Underwood BR, Kroemer G, O'Kane CJ, Rubinsztein DC: **Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy.** *Mol Cell* 2011, **43**:19-32.
16. Wei W, Li B, Hanes MA, Kakar S, Chen X, Liu L: **S-nitrosylation from GSNOR deficiency impairs DNA repair and promotes hepatocarcinogenesis.** *Sci Transl Med* 2010, **2**:19ra13.
17. Aranda E, Lopez-Pedraza C, De La Haba-Rodriguez JR, Rodriguez-Ariza A: **Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation.** *Curr Mol Med* 2012, **12**:50-67.
18. Shah CM, Locke IC, Chowdrey HS, Gordge MP: **Rapid S-nitrosothiol metabolism by platelets and megakaryocytes.** *Biochem Soc Trans* 2003, **31**:1450-1452.
19. McGill R, Tukey JW, Larsen WA: **Variations of box plots.** *Am Stat* 1978, **32**:12-16.
20. Lee H, Bai W: **Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:5835-5845.
21. Clevers H: **The cancer stem cell: premises, promises and challenges.** *Nat Med* 2011, **17**:313-319.
22. Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick JA, Caballero S, Keller PJ, Lander ES, Kuperwasser C: **Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:21737-21742.
23. Al-Hajj M, Wicha MS, Ito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:3983-3988.
24. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Martin-Castillo B, Vellon L, Menendez JA: **Autophagy positively regulates the CD44(+)/CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype.** *Cell Cycle* 2011, **10**:3871-3885.
25. Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet R Jr, Badve S, Srour EF, Nakshatri H: **SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype.** *BMC Cancer* 2010, **10**:411.
26. Alsner J, Jensen V, Kyndi M, Offersen BV, Vu P, Borresen-Dale AL, Overgaard J: **A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients.** *Acta Oncol* 2008, **47**:600-607.
27. Bremer TM, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Viens P, Birnbaum D, Linke SP: **Prognostic marker profile to assess risk in stage I-III hormone receptor-positive breast cancer patients.** *Int J Cancer* 2009, **124**:896-904.
28. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**:747-752.
29. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL: **Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells.** *Endocr Relat Cancer* 2003, **10**:179-186.
30. Rao AK, Ziegler YS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM: **Thioredoxin and thioredoxin reductase influence estrogen receptor alpha-mediated gene expression in human breast cancer cells.** *J Mol Endocrinol* 2009, **43**:251-261.
31. Dauvois S, White R, Parker MG: **The antiestrogen ICI 162780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling.** *J Cell Sci* 1993, **106**(Pt 4):1377-1388.
32. Nonclercq D, Journe F, Body JJ, Leclercq G, Laurent G: **Ligand-independent and agonist-mediated degradation of estrogen receptor-alpha in breast carcinoma cells: evidence for distinct degradative pathways.** *Mol Cell Endocrinol* 2004, **227**:53-65.
33. Thomas C, Gustafsson JA: **The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:597-608.
34. Molinari AM, Bontempo P, Schiavone EM, Tortora V, Verdicchio MA, Napolitano M, Nola E, Moncharmont B, Medici N, Nigro V, Armetta I, Abbondanza C, Puca GA: **Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution.** *Cancer Res* 2000, **60**:2594-2597.
35. Liu W, Konduri SD, Bansal S, Nayak BK, Rajasekaran SA, Karuppaiyl SM, Rajasekaran AK, Das GM: **Estrogen receptor-alpha binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function.** *J Biol Chem* 2006, **281**:9837-9840.
36. Konduri SD, Medisetty R, Liu W, Kaiparettu BA, Srivastava P, Brauch H, Fritz P, Swetzig WM, Gardner AE, Khan SA, Das GM: **Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:15081-15086.

37. Matsutani Y, Yamauchi A, Takahashi R, Ueno M, Yoshikawa K, Honda K, Nakamura H, Kato H, Kodama H, Inamoto T, Yodoi J, Yamaoka Y: **Inverse correlation of thioredoxin expression with estrogen receptor- and p53-dependent tumor growth in breast cancer tissues.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**:3430-3436.
38. Cadenas C, Franckenstein D, Schmidt M, Gehrman M, Hermes M, Geppert B, Schormann W, Maccoux LJ, Schug M, Schumann A, Wilhelm C, Freis E, Ickstadt K, Rahnenfuhrer J, Baumbach JJ, Sickmann A, Hengstler JG: **Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**:R44.
39. Kurebayashi J: **Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance.** *Breast Cancer* 2003, **10**:112-119.

doi:10.1186/bcr3366

Cite this article as: Cañas et al.: Maintenance of S-nitrosothiol homeostasis plays an important role in growth suppression of estrogen receptor-positive breast tumors. *Breast Cancer Research* 2012 **14**:R153.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



