

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Regulación de la expresión de la E-caderina por Estrógenos en las líneas celulares  
humanas HeLa, CaLo y SW480.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**IVONNE VARGAS SERRANO**

**MÉXICO, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Elena Zambrano González.
Vocal	Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Secretario	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez.
1er. Suplente	Prof. Diana Barrera Oviedo.
2do. Suplente	Prof. Miguel Ángel Peña Rico.

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio de Biología Molecular.  
Departamento de Biología.  
Facultad de Química.  
U.N.A.M.

**Asesor del tema:**

-----  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

**Supervisor técnico:**

-----  
M. en C. José Dolores Solano Becerra.

**Sustentante:**

-----  
Ivonne Vargas Serrano

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo con todo mi cariño a la gente que  
mas he amado en mi vida:

a mi madre,  
a la memoria de mi padre  
y a mis hermanos

porque me han apoyado incondicionalmente en todas  
las decisiones que he tomado en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

Por haberme otorgado la oportunidad de concluir mis estudios a nivel licenciatura, consiguiendo con ello una de las metas mas importantes en mi vida.

### **Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.**

Por haberme guiado de manera incondicional en el trabajo realizado, además de motivarme para finalizar este ciclo.

### **A la Dra. Angelina Quintero Ruíz<sup>+</sup>.**

Porque contribuyó de manera fundamental al desarrollo del trabajo por lo que le estamos profundamente agradecidos.

### **Al M. en C. José Dolores Solano Becerra.**

Por su ayuda en el desarrollo técnico del presente trabajo.

### **A la Dra. Adriana Mendoza Rodríguez.**

Contribuyó en el desarrollo técnico del trabajo por lo cual le agradezco en forma particular.

### **Al Q.F.B. Luciano Mendoza.**

Contribuyó en el desarrollo técnico del trabajo.

### **Al Jurado.**

Por sus consejos y críticas para el mejoramiento del presente trabajo.

### **A mis profesores.**

Porque de todos y cada uno me llevo valiosas enseñanzas.

### **A mi Familia.**

Por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

### **A mi hermana Olivia.**

Por ser la mas amada y mejor amiga que he tenido, y por darme valiosos consejos que me han permitido seguir adelante; aun en los momentos mas dificiles de mi vida.

### **A Juan.**

Por darme su apoyo y cariño en todo momento.

### **A mis amigos.**

Por haberme acompañado durante mi estancia en la Facultad.

# ÍNDICE

Página

Capítulo 1	Abreviaturas.....	6
Capítulo 2	Resumen.....	8
Capítulo 3	Antecedentes.....	11
	3.1 Cáncer.....	11
	3.2 Metástasis.....	13
	3.3 Caderinas.....	14
	3.3.1 E-caderina.....	15
	3.4 Efectos generales del estradiol (E2) y sobre E-caderinas.....	17
	3.5 Antiestrógenos : tamoxifeno (TAM).....	19
	3.6 Receptor a estrógenos.....	21
	3.7 Mecanismo de acción de los estrógenos.....	23
	3.7.1 Mecanismo genómico.....	23
	3.7.2 Mecanismo no genómico.....	24
Capítulo 4	Planteamiento del problema.....	26
Capítulo 5	Hipótesis.....	27
Capítulo 6	Objetivos.....	28
Capítulo 7	Materiales y métodos.....	29
	7.1 Líneas celulares empleadas.....	29
	7.2 Preparación de las soluciones.....	29
	7.3 Metodología experimental.....	35
	7.3.1 Descongelamiento de líneas celulares.....	35
	7.3.2 Propagación de las líneas celulares.....	36
	7.3.3 Congelamiento de líneas celulares.....	37
	7.3.4 Conteo celular.....	37
	7.3.5 Evaluación de niveles de expresión de las proteínas RE $\alpha$ y RE $\beta$ .....	38
	7.3.6 Evaluación de los niveles de expresión de la proteína E-caderina en las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480 tratadas con vehículo, E2, E2 y TAM, y TAM.....	38
	7.3.7 Fijación de células.....	39
	7.3.8 Inmunohistoquímica.....	39
	7.3.9 Cuantificación.....	40
	7.3.10 Análisis estadístico.....	41
Capítulo 8	Resultados.....	42
	8.1 Niveles de expresión de la proteína receptor a estrógenos en las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480.....	42
	8.2 Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina por los tratamientos con estrógenos y antiestrógenos en las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480.....	44
Capítulo 9	Análisis de resultados.....	54
Capítulo 10	Conclusiones.....	60
Capítulo 11	Perspectivas.....	61
Capítulo 12	Referencias.....	62

## CAPÍTULO 1. ABREVIATURAS

E2	17 $\beta$ -estradiol
DAB	3,3' diamino benzidina tetrahidrocloruro
ADN	Ácido desoxiribonucleico
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin N'-(2-etanosulfónico )
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CDK	Ciclinas dependientes de cinasas
Da	Dalton unidad de masa molecular equivalente al átomo de Hidrógeno
DE	Desviación estándar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
LBD	Dominio de unión a ligando
M	Fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células
S	Fase del ciclo celular durante la que se realiza la síntesis de ADN
G2	Fase del ciclo celular que se encuentra en el espacio entre la síntesis de ADN y la división celular
G1	Fase del ciclo celular que se encuentra entre en el espacio en la división celular y la síntesis de ADN
AF-2	Función activadora de la transcripción dependiente de hormonas
AF-1	Función activadora de la transcripción independiente de hormonas
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
HR	Humedad relativa
L	Litros

D-MEM	Medio Tagle modificado de Dulbecco
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolaridad
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
nM	Nanomolaridad
N <sub>2</sub> L	Nitrógeno líquido
N	Normalidad
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
%	Por ciento
RE	Receptor a estrógenos
RE $\alpha$	Receptor a estrógenos isoforma alfa
RE $\beta$	Receptor a estrógenos isoforma beta
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4
PBS-EDTA	Solución Salina amortiguada por Fosfatos-Ácido Etilendiaminotetracético
SFB	Suero Fetal Bovino
TAM	Tamoxifeno



## CAPÍTULO 2. RESUMEN

En general se ha considerado que el cáncer consiste en el crecimiento anormal y diseminación de células transformadas en el organismo, que invaden y dañan tejidos y órganos. El cáncer no es un grupo de enfermedades distintas, que aunque relacionadas, a menudo tienen causas diferentes.<sup>1</sup> El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de España reporta que el cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados.<sup>1</sup> El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática informó que en el 2004 en México los tumores malignos ocuparon el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país.<sup>4</sup>

La invasión ó metástasis de las células cancerosas permite su entrada a la circulación en donde pueden alcanzar órganos distantes y eventualmente formar tumores secundarios<sup>10</sup> y es una enfermedad maligna porque generalmente acaba por matar al individuo.

La metástasis por células cancerosas es debida a múltiples factores entre los cuales podemos mencionar la pérdida de contacto por diversos factores entre otros la disminución en la expresión de la proteína de adhesión célula-célula como la E-caderina.<sup>14,17,21</sup> La Metástasis es el proceso por el cual las células tumorales salen del tumor primario, viajan a sitios distantes vía el sistema circulatorio o linfático, y establecen un tumor secundario.<sup>11</sup> En líneas celulares de cáncer de mama que contienen el receptor a estrógenos tipo  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) por tanto son consideradas RE $\alpha$  positivo como es el caso de MCF-7, se ha sugerido que el estradiol (E2) regula a la baja los niveles de expresión E-caderina, dicha disminución es revertida por el uso del tamoxifeno (TAM) un antiestrógenos potente.<sup>21</sup>

Los estrógenos son hormonas endógenas con numerosas acciones fisiológicas en el organismo de mamíferos. En general los efectos de los estrógenos están mediados por el receptor a estrógenos y existen dos isoformas la  $\alpha$  y la  $\beta$ .<sup>32</sup> La proteína RE $\alpha$  se encuentra fundamentalmente en útero, endometrio, corazón, mama y estroma ovárico, mientras que la

proteína RE $\beta$  predomina en células granulosas ováricas, próstata, vejiga, mucosa intestinal, pulmón, médula ósea, hueso, cerebro, hipotálamo y células endoteliales.<sup>31,32,33,35</sup>

Debido a la declinación en la función ovárica, las concentraciones de estradiol decrecen en la menopausia, se recurre a la terapia de reemplazo hormona para incrementar los niveles de estrógenos.<sup>61,64</sup> Se ha reportado que el reemplazo hormonal con estrógenos puede estar asociado con un incremento en el riesgo de cáncer de mama dependiente de hormonas.<sup>58</sup> La proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de mama “in vivo” e “in vitro” es estimulada por el tratamiento con estrógenos.<sup>58,60</sup> El TAM es el antiestrógeno más ampliamente usado como agente preventivo y en el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormonas<sup>29,36,56,57</sup> con RE $\alpha$  positivo.<sup>48,58,59</sup> También es usado para abatir los efectos adversos de los estrógenos en la terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia.<sup>36,38,60</sup>

El objetivo de este trabajo fue estudiar si la expresión de E-caderina está regulada por estrógenos en líneas celulares humanas de cáncer de colon y cervix, y si el efecto de los estrógenos en los niveles de expresión de E-caderina es revertido con el uso de antiestrógenos.

Se analizó la expresión del RE en sus dos isoformas en las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480 encontrándose que las tres líneas celulares son RE $\alpha$  positivo, ya que expresan un alto nivel de esta proteína y niveles muy bajos de la proteína RE $\beta$ . HeLa es la línea que expresa una mayor cantidad de la proteína RE $\alpha$  y SW480 expresa mayor cantidad de la proteína RE $\beta$ .

La expresión de la proteína E-caderina parece haber aumentado por los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM en las líneas SW480 y CaLo, el máximo efecto de los tratamientos se encuentra a las 6 y 12 horas respectivamente. La expresión de la E-caderina parece no estar regulada por el E2 ni por el TAM en la línea celular HeLa. Por lo que el TAM y el E2 parecen actuar como agonistas del RE en las líneas SW480 y CaLo.

Debido a la diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo para las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480, y lo reportado para las células de mama MCF-7 podemos sugerir que la regulación de la E-caderina por el E2 es tejido específica.

## CAPITULO 3. ANTECEDENTES

### 3.1 CÁNCER

El cáncer consiste en el crecimiento descontrolado y diseminación de células anormales en el organismo, que invaden y dañan tejidos y órganos. El cáncer un grupo de al menos 100 enfermedades distintas aunque relacionadas, a menudo con etiología diferente. La aparición de un cáncer no se debe a un único factor sino a la combinación de varios factores que se engloban en dos grupos: la herencia genética y el ambiente. La herencia de versiones anormales de algunos genes es responsable de la predisposición a padecer algunos tipos de cáncer. Por otra parte, en la aparición de la mayoría de los cánceres influye sobre todo la exposición a agentes químicos y radiaciones que afectan a las células alterando sus genes, así como los hábitos de vida (tabaco, alcohol, dieta), y algunas infecciones (ciertos virus causantes de papilomas genitales y hepatitis B). Por todo lo anterior se ha considerado al el cáncer es un grupo de enfermedades de origen multigénico y multifactorial.<sup>1</sup>

El cáncer se ha considerado como un desorden multigenético originado por una acumulación de mutaciones en varios genes, los cuales pueden corresponder a diferentes categorías funcionales. Las mutaciones que inician la cadena de cambios genéticos llevan a tipos particulares de cáncer que parecen ser específicos para genes y tejidos.<sup>38</sup> El cáncer es una enfermedad genómica en la cual las células difieren de sus progenitoras normales por alteraciones genómicas que afectan genes reguladores del crecimiento, existen dos tipos de genes: los oncogenes,<sup>2,3</sup> que funcionan como reguladores positivos de la proliferación y, los genes supresores del tumor, que funcionan como reguladores negativos de proliferación.

Los oncogenes están ampliamente conservados en múltiples especies y sus principales funciones son de crecimiento celular. Sus señales pueden ocasionar cambios genéticos que resultan en un crecimiento celular alterado. Los genes supresores tumorales tienen un efecto atenuado sobre el crecimiento celular que se pierde como el resultado de mutaciones o deleciones del gen que terminan con su inactivación.<sup>3</sup>

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de España reporta que el cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, reporta que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad.<sup>1</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en mujeres es el cáncer, y las cardiopatías en hombres. El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) informó el pasado 4 de febrero de 2006 que en el 2004 se registraron en México 473,417 defunciones, en un 55.3 % sucedieron a hombres y 44.7 % a mujeres. Los tumores malignos ocuparon el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país; por este tipo de cáncer fallecieron 61,248 personas, el volumen representa el 12.9 % del total de defunciones registradas en el año. En los varones los tumores malignos representaron la segunda causa de muerte de este grupo demográfico con 29,797 defunciones, lo cual significó 11.4 % de los fallecimientos de hombres. En las mujeres, se ubica en el tercer lugar de las principales causas de muerte con 31,443 decesos; es decir el 14.9 % de las defunciones en la población femenina.<sup>4</sup>

En los hombres las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año corresponden a: tráquea, bronquios y pulmón (15.5 %), próstata (15.2 %) y estómago (9.4 %). En las mujeres, 13.4 % de las defunciones por cáncer maligno corresponden al de cuello del útero (cérvico-uterino) y 13.3 % más al de mama. El cáncer de colon representa un 4.1 % en hombres y 4.2 % mujeres.<sup>4</sup>

El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos. En 2004 se detectaron 100,000 nuevos casos y 57,000 muertes por esta enfermedad.<sup>5</sup> Tan sólo en España el cáncer colorrectal en 2005 era la segunda causa de muerte y se diagnostican 25,000 nuevos casos al año; en el mismo periodo de tiempo fallecen 12,500 personas.<sup>6</sup>

El cáncer colorrectal se ha asociado con la dieta y diversos factores genéticos. Un mecanismo tumorigénico es la ruta mutacional, la cual participa en la inactivación de genes

supresores de tumores tales como APC (por sus siglas en inglés, adenomatous polyposis coli)<sup>5,7</sup> y p53.

Por otro lado el cáncer cérvico-uterino también constituye un problema de salud mundial, éste ocupa en todo el mundo el segundo lugar en frecuencia entre los tumores malignos en mujeres, después del cáncer de mama, con una cifra aproximada de 500,000 casos detectados al año; por lo que, se han implementado extensos programas de detección con citología cervical. En el 2000 México ocupaba el 4º lugar en mortalidad por cáncer del cuello uterino en América Latina con 17.1 por cada 100,000; entre 1999 a 2000 se registraron 48,761 defunciones por cáncer de cuello uterino, apreciándose un incremento anual de 0.76 % en promedio.<sup>8</sup>

La mortalidad por cáncer cervical ha decrecido por las campañas de diagnóstico temprano mediante el uso del método de Papanicolaou, en 2005 la sociedad Americana de Cáncer predijo que 10,370 mujeres serían diagnosticadas y 3,710 morirían por cáncer cervical.<sup>9</sup>

Cuando el cáncer de cérvix es invasivo; es decir, que forma metástasis invariablemente causa la muerte.<sup>10</sup>

### **3.2 METÁSTASIS**

El cáncer es maligno por que las células cancerosas invaden tejidos vecinos y sobreviven en estos tejidos ectópicos; la invasión indica penetración y ocupación dentro de territorios vecinos. La invasión de las células cancerosas permite su entrada a la circulación en donde pueden alcanzar órganos distantes y eventualmente formar tumores secundarios, llamados metástasis. A los tumores no invasivos o benignos, se les considera así porque pueden ser curados mediante una simple remoción o extirpación quirúrgica, en cambio los tumores invasivos o metastásicos, invariablemente causan la muerte.<sup>10</sup>

De esta manera, la metástasis es el proceso por el cual células tumorales salen del tumor primario, viajan a sitios distantes vía el sistema circulatorio, y establecen uno o varios tumores secundarios. La Angiogénesis o la generación de nuevos vasos sanguíneos, es importante para la proliferación de tumores primarios, así como para la metástasis. Un alto grado de vascularización en el tumor parece aumentar la oportunidad de las células tumorales al entrar en el sistema circulatorio y hacer metástasis.<sup>11</sup>

El proceso de invasión requiere de múltiples pasos que conllevan a la metástasis: primero sucede la invasión del tejido en el cual el cáncer se originó, posteriormente la invasión del tejido circundante, la entrada a la circulación o al vaso linfático, el transporte por la circulación, salida de la circulación al sitio de metástasis, e invasión, angiogénesis y crecimiento dentro de los tejidos del órgano ocupado.<sup>10,12</sup>

Las metástasis por células cancerosas son debidas a múltiples factores entre los cuales podemos mencionar a la disminución en la expresión de la proteína de adhesión célula-célula como las caderinas.<sup>14,17,21</sup>

### **3.3 CADERINAS**

Las caderinas constituyen una superfamilia de glicoproteínas de superficie celular, gran parte de ellas participan en el reconocimiento y adhesión célula-célula. Las caderinas llamadas clásicas E-caderina, N-caderina y VE-caderina se encuentran en la mayoría de los tejidos sólidos del cuerpo.<sup>13,14,15</sup> Funcionan como complejos macromoleculares de cruce de membrana. Las secuencias del ectodominio divergen significativamente entre ellas, el requerimiento de estas regiones media la adhesión homofílica y está formado por cinco dominios de caderina denominados por convención caderina extracelular (EC)1 a EC5, unidos entre ellos por el calcio. En el caso de la E-caderina las interacciones homofílicas están localizadas en el primer amino terminal del dominio extracelular (EC1).<sup>13,15,16,17</sup> En contraste, el dominio intracelular está altamente conservado entre las caderinas clásicas.<sup>13,14</sup>

Las concentraciones de calcio intracelulares son un factor muy importante para las caderinas; ya que las protege contra la proteólisis, en ausencia del calcio la estructura terciaria de las caderinas se colapsa o modifica. La E-caderina en presencia de calcio tiene una apariencia de barra y se colapsa cuando éste es removido.<sup>18</sup>

Las interacciones homofílicas de las caderinas clásicas parecen deberse a la presencia de los aminoácidos His (histidina), Ala (alanina) y Val (valina) -llamados en su conjunto HAV- presentes en todos los dominios amino terminal.<sup>18,19</sup> En las interacciones entre caderinas se observan dos interfaces diferentes: la paralela (interfase cis o interfase del dímero que se da entre caderinas de la misma superficie celular) y la interfase llamada antiparalela (interfase trans que se da entre moléculas de caderina de células opuestas). En la interfase cis la unión del calcio presente entre EC1 y EC2 provoca un cambio conformacional en la estructura de HAV permitiendo al Trp-2 moverse dentro de la cavidad hidrofóbica con la subsecuente dimerización trans.<sup>18,20</sup>

Recientemente se ha incrementado el interés por la E-caderina como un mediador de la adhesión célula-célula, pero también como un gen supresor de tumor.<sup>21</sup> Se ha considerado recientemente que la pérdida de la expresión de E-caderina podría contribuir a la metástasis.<sup>97</sup>

### **3.3.1 E-CADERINA**

Como ya se ha mencionado la E-caderina es considerada una proteína mediadora de la adhesión célula-célula y además es un gen supresor de tumor,<sup>10,21</sup> es una glicoproteína de 120 kDa con un dominio largo extracelular, un dominio transmembranal y un dominio corto intracelular. El dominio intracelular interactúa con las cateninas formando un complejo,<sup>21,22</sup> está altamente conservado en las caderinas clásicas. Este complejo incluye a la  $\beta$ -catenina que se une con alta afinidad a la porción distal de la cola citoplasmática de la caderina, después es reclutada al complejo la  $\alpha$ -catenina, esta última se une a los filamentos de actina del citoesqueleto de manera directa o indirecta, en la indirecta es a través de otras proteínas de unión a la actina tales como vinculina,  $\alpha$ -actinina y ZO1. La p120-catenina se



une directamente a la región proximal a la membrana de la cola citoplasmática. Este conjunto de cuatro proteínas no es estático.<sup>14,15</sup>

La  $\beta$ -catenina es una molécula transdutora de la señal intracelular que media la ruta Wnt,<sup>15</sup> entre los efectos de esta ruta se encuentran la estimulación mitogénica, especificación de las características celulares y diferenciación celular. Cuando el ligando Wnt se une a su receptor, se inicia la transcripción de genes que regulan el crecimiento y la diferenciación celular.<sup>23</sup> Normalmente en la ausencia de un ligando Wnt extracelular, los niveles citosólicos de  $\beta$ -catenina son bajos porque es blanco de la degradación por complejos de proteínas. Cuando existe señalización Wnt no se lleva a cabo la degradación, lo que permite su acumulación de  $\beta$ -catenina en el citosol. Cuando la  $\beta$ -catenina penetra al núcleo entonces interactúa con el factor de transcripción TCF (por sus siglas en inglés T cell factor) y con el factor LEF (por sus siglas en inglés lymphoid enhancer factor), activando la expresión de diversos genes blanco,<sup>15,23,24,25</sup> como c-MYC y c-jun.<sup>26</sup> Las caderinas pueden regular la señalización de Wnt por el secuestro de  $\beta$ -catenina en competencia con APC, y en ausencia de las señales Wnt.<sup>27</sup> La E-caderina tiene la habilidad de inhibir la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina-TCF ya que existen reportes que sugieren que al aumentar la expresión de la E-caderina hay un decremento de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina-TCF y una supresión del crecimiento celular.<sup>23</sup>

La señalización Wnt permite una fosforilación diferencial de Dsh (deshevelled),<sup>25</sup> con lo que es activada y capaz de inhibir a GSK-3 $\beta$  (por sus siglas en inglés, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ).<sup>26</sup> En ausencia de la señalización Wnt, la  $\beta$ -catenina es fosforilada por CKI (por sus siglas en inglés, casein kinase I) y por la GSK-3 $\beta$ . La interacción entre esas cinasas y  $\beta$ -catenina, se facilita con las proteínas Axina y APC, es así como se forma un complejo de degradación que permite que la  $\beta$ -catenina fosforilada sea reconocida por  $\beta$ -TrCP, ubiquitinada, y degradada por el proteosoma.<sup>25,26,28</sup>

La disminución o pérdida de la expresión de la E-caderina ha sido documentada en una proporción significativa de tumores de varios órganos, incluyendo colon, estómago, páncreas, hígado, vejiga, próstata, mama, útero, ovario, piel y en carcinomas orales.<sup>92</sup>

En líneas celulares de cáncer de mama que son positivas para RE $\alpha$  como es el caso de MCF-7, se ha sugerido que el E2 regula a la baja los niveles de expresión E-caderina, dicha disminución es revertida por el uso del TAM.<sup>21</sup>

### **3.4 EFECTOS GENERALES DEL ESTRADIOL (E2) Y SOBRE E-CADERINAS**

Los estrógenos son hormonas endógenas con numerosas acciones fisiológicas en mamíferos. En la mujer algunas de sus acciones fisiológicas que se encuentran son el desarrollo de características sexuales secundarias; afectan el crecimiento, la diferenciación y la función de los tejidos del sistema reproductor (tales como: glándula mamaria, ovario, útero y vagina); la regulación de la ovulación; la preparación de tejidos para la respuesta a progesterona; el mantenimiento de la masa de los huesos; la prevención de atrofia urogenital; la regulación de respuestas a insulina; un efecto neuroprotector; la vasodilatación. En hígado estimulan la producción de proteínas, lipoproteínas, factores de coagulación y receptores hepáticos para lipoproteínas. En útero tienen efectos proliferativos en el endometrio; en la piel y las mucosas favorecen su hidratación.<sup>35,41</sup>

El estrógeno natural y más potente que se encuentra en los humanos es el 17 $\beta$ -estradiol (E2) y deriva principalmente de precursores androgénicos. El E2 es el estrógeno predominante durante la vida reproductiva en la mujer, los ovarios son la principal fuente de E2, es una hormona circulante que actúa sobre tejidos blanco distales.<sup>61,62</sup> Durante el embarazo contribuye al crecimiento del útero, desarrollo de la placenta y de las glándulas mamarias. Los estrógenos tienen un papel protector contra las enfermedades cardiovasculares<sup>61</sup> también están asociados con una disminución de riesgo de cáncer de colon.<sup>7,30,61,65</sup> Se estima que la terapia de reemplazo hormonal reduce el riesgo de cáncer de colon entre 30 y 40 % en mujeres postmenopáusicas, a todas las edades, las mujeres son menos propensas que los hombres a desarrollar cáncer de colon.<sup>66</sup> Hasta la menopausia el E2 es sintetizado y secretado de manera cíclica por los ovarios.<sup>29,44,61</sup>

Debido al decline en la función ovárica, las concentraciones de estradiol cambian de 40-400 pg/ml durante el ciclo menstrual y decrecen hasta 5-20 pg/ml en la menopausia, se recurre a la terapia de reemplazo hormonal para incrementar los niveles de estrógenos. En la menopausia unos de los síntomas tempranos son bochornos y sudoraciones nocturnas; entre los síntomas tardíos de deficiencia de estradiol se tienen cambios en tejidos como el tracto genital (sangrado anormal uterino y resequedad vaginal) y la vejiga (incontinencia urinaria).<sup>61,64</sup> Entre los efectos adversos más comunes del uso de estrógenos son náuseas, dolor de senos, sangrado vaginal, dolor de cabeza y aumento de peso. Mientras que los efectos adversos menos comunes incluyen cáncer de mama dependiente de hormonas, enfermedad tromboembólica y enfermedades en la vesícula biliar.<sup>30,61</sup>

La exposición a los estrógenos está asociada con un incremento en el riesgo de cáncer de mama dependiente de hormonas, ya que pueden ser considerados como promotores es decir como factores que estimulan la proliferación y/o supervivencia de células transformadas, o como iniciadores o factores que inducen daño genético que lleva a una transformación celular.<sup>58</sup> La proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de mama “in vitro” e “in vivo” es estimulado por el tratamiento con estrógenos.<sup>58,60</sup>

En términos de señalización transcripcional, uno de las respuestas tempranas a estrógenos es el incremento en la expresión de c-Myc. La región de unión al ADN de RE $\alpha$  es requerida para la inducción de c-Myc y la región del promotor del gen MYC contiene una región ERE atípica. Myc tiene efectos mitogénicos sobre células de cáncer de mama por su habilidad para modular reguladores de la progresión del ciclo celular. El principal mecanismo que gobierna los efectos de Myc sobre la progresión del ciclo celular de células de cáncer parece ser vía activación de la ciclina E/CDK2 por la pérdida del inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa p21.<sup>43</sup>

Los efectos de los estrógenos en la progresión del ciclo celular están finamente ligados a un incremento en la expresión de la ciclina D1. La inducción de la ciclina D1 en las líneas de cáncer de mama acorta la fase G1. Además de que la ciclina D1 tiene efectos similares a c-Myc sobre la activación de la ciclina E-CDK2.<sup>43</sup>

El E2 tiene un efecto antiapoptótico en células de cáncer de mama porque aumenta la expresión de Bcl-2 en MCF-7. Bcl-2 es una proteína antiapoptótica, por la formación de heterodímeros con Bax, proteína proapoptótica, previene la apoptosis celular.<sup>63</sup> En células epiteliales humanas normales de mama la acción antiapoptótica de E2 se debe a la activación de la expresión del gen Bcl-2 y un decremento en la expresión de las proteínas p53 y caspasa-3.<sup>63</sup>

Estrés oxidativo y daño genómico pueden producirse por el catabolismo oxidativo de los estrógenos, el cual se encuentra mediado por varios complejos citocromo P450, mecanismo por el cual se producen radicales libres. Los productos de la oxidación de los estrógenos (semiquinonas/quinonas) son electrofílicos capaces de unirse covalentemente a grupos nucleofílicos del ADN.<sup>44,58</sup>

Además de los efectos de los estrógenos sobre la proliferación, apoptosis y aumento de riesgo de cáncer dependiente de hormonas, en 2003 fue dada a conocer evidencia que sugiere que en líneas de cáncer de mama RE $\alpha$  positivo como es el caso de MCF-7 el E2 reduce los niveles de expresión de la proteína de adhesión célula-célula E-caderina, dicha disminución puede contribuir a la metástasis y es revertida por el uso del TAM.<sup>21</sup> No se han encontrado más reportes al respecto, ni en líneas de cáncer de mama y tampoco en líneas celulares de otros tejidos, por lo que nuestra investigación busca elucidar los efectos de estrógenos y antiestrógenos en líneas de cáncer de cérvix y de colon.

### **3.5 ANTIESTRÓGENOS : TAMOXIFENO (TAM)**

El TAM es un modulador selectivo del receptor a estrógenos, es ampliamente usado como agente preventivo y en el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormonas<sup>29,36,56,57</sup> con RE $\alpha$  positivo.<sup>48,58,59</sup> También es usado para abatir los efectos adversos de los estrógenos en la terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia,<sup>36,38,60</sup> además de prevenir la osteoporosis.<sup>60</sup>

El TAM al igual que el E2 entra por difusión pasiva a través de la membrana plasmática, los antiestrógenos y estrógenos compiten por la unión al RE y el TAM tiene una afinidad de unión de aproximadamente el 10 % comparado con el 100 % de estradiol, por lo que en estudios “in vitro” e “in vivo” se usa una relación de 10 a 100 veces mas de antiestrógeno que de estradiol.<sup>58</sup>

El TAM tiene efectos tejido específicos ya que se ha observado que recluta al co-represor N-CoR en células de mama, actúa como un antagonista, pero es agonista en células endometriales porque recluta al co-activador SRC-1.<sup>60</sup>

El TAM al igual que el raloxifeno y el ICI 164,384 son antiestrógenos sintéticos e inducen un agonismo parcial en los genes reporteros de ERE en presencia de RE $\alpha$  y un antagonismo puro en presencia de RE $\beta$ .<sup>32,36,38</sup>

Los efectos adversos comúnmente asociados con la terapia de TAM incluyen síntomas vasomotores, disturbios gastrointestinales, vaginitis atrófica y cambios en la función sexual.<sup>18</sup> Entre otros efectos adversos de menor incidencia, pero más graves, se encuentra la enfermedad tromboembólica venosa y el cáncer endometrial.<sup>36,38,58</sup> Por otra parte, el TAM en combinación con estrógenos tiene efectos benéficos cardiovasculares y en niveles de triglicéridos y colesterol.<sup>58</sup>

La actividad antagónica del TAM resulta por la inhibición de AF-2 mientras que su actividad agonista está mediada por la activación de AF-1. Se ha demostrado que el TAM tiene una función RE $\alpha$  agonista/antagonista parcial específica, mientras que en el RE $\beta$  tiene un efecto antagonista.<sup>43</sup> El TAM al unirse al RE induce a una conformación que no permite que se recluten co-activadores al gen blanco, funcionando así como un antagonista.<sup>59</sup>

En líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado que la exposición a antiestrógenos produce un arresto en G0/G1 del ciclo celular, inicialmente los antiestrógenos pueden producir un efecto citostático cuya consecuencia es la muerte celular.<sup>58</sup>

Los efectos de los estrógenos y los antiestrógenos están mediados por la proteína del receptor a estrógenos.<sup>32</sup>

### 3.6 RECEPTOR A ESTRÓGENOS

Los receptores a estrógenos son miembros de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides.<sup>29,30,31</sup> Los efectos de los estrógenos están mediados por la proteína receptor a estrógenos y existen dos isoformas la  $\alpha$  y la  $\beta$ ,<sup>32</sup> las proteínas RE $\alpha$  y RE $\beta$  son productos de distintos genes que se ubican en diferentes cromosomas. El RE $\alpha$  está localizado en el cromosoma 6q, mientras que el RE $\beta$  se encuentra en el cromosoma 12q.<sup>33</sup> El gen humano RE $\alpha$  codifica una proteína de 595 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 66 kDa, el gen RE $\beta$  codifica una proteína con un peso molecular estimado de 54 kDa.<sup>34</sup>

La proteína RE $\alpha$  se encuentra fundamentalmente en útero, endometrio, corazón, mama y estroma ovárico, mientras que la proteína RE $\beta$  predomina en células granulosas ováricas, próstata, vejiga, mucosa intestinal, pulmón, médula ósea, hueso, cerebro, hipotálamo y células endoteliales.<sup>31,32,33,35</sup>

El RE $\alpha$  y el RE $\beta$  tienen dominios de unión a ADN casi idénticos con un 97 % de homología en sus aminoácidos; estos receptores tienen sólo el 56 % de homología en su dominio de unión a hormona, y difieren marcadamente en sus regiones AF-1 amino terminal con sólo entre 18 %<sup>38</sup> y 21 % de homología de aminoácidos.<sup>30,36</sup> Lo anterior sugiere que ambas isoformas del RE pueden reconocer y unirse a los mismos elementos de respuesta a estrógenos, pero cada receptor puede tener un espectro distinto de ligandos.<sup>30</sup>

Ambas proteínas de RE están conformadas por seis dominios funcionales denominados de A a F.<sup>31,32,37</sup> El dominio amino terminal A/B contiene la función activadora de la transcripción independiente de hormonas (AF-1). El dominio C es responsable de la unión del RE a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) porque

contiene un dominio de unión al ADN, mientras que el dominio D está implicado en la unión a la proteína co-reguladora. El dominio de unión al ligando y una región implicada en la modulación de la actividad agonista de los antiestrógenos no esteroideos están contenidos en el dominio carboxilo terminal E y F; el dominio de unión al ligando comprende en si mismo la función de activación transcripcional dependiente del ligando (AF-2), una región de unión a proteínas de choque térmico y un dominio de dimerización.<sup>39,40,41,42</sup>

Más del 70 % de los cánceres de mama en mujeres es RE $\alpha$  positivo y muestra un crecimiento dependiente de estrógenos.<sup>29,32,44</sup> Se ha observado que en cáncer de mama y ovario hay un incremento en la expresión de RE $\alpha$  y una reducción en la expresión de RE $\beta$ ,<sup>30,44</sup> esta última proteína decrece también en tejido de cáncer de colon y próstata comparado con tejido normal.<sup>30</sup> Al RE $\beta$  se le atribuye un papel protector contra la actividad mitogénica de los estrógenos en lesiones premalignas de mama.<sup>30,33</sup> Se ha sugerido que el RE $\beta$  puede reducir la proliferación por la inhibición del gen de la ciclina D1 importante en el control de la transición de G1 a S del ciclo celular. Estudios “in vitro” indican que E2 activa la transcripción del gen ciclina D1 a través de RE $\alpha$  pero inhibe la transcripción del gen de la ciclina D1 por RE $\beta$  en células HeLa.<sup>30</sup>

Cuando el RE se une al agonista (E2) o a un antagonista parcial (TAM o raloxifeno) muestra importantes cambios conformacionales dependientes del ligando en ambas isoformas del RE. Algunas de estas diferencias están relacionadas con el posicionamiento de la hélice 12 en RE $\alpha$  que al unirse con E2, facilita las interacciones con proteínas co-activadoras. En contraste, después de unirse al TAM o raloxifeno, la conformación de la hélice 12 es alterada y menos accesible para interacciones con proteínas co-activadoras.<sup>33,45</sup>

Como habíamos mencionado la actividad antagonista del TAM resulta de la inhibición de AF-2 mientras que su actividad agonista es mediada por la activación de AF-1. Algunos estudios han demostrado que el TAM tiene una función parcial agonista/antagonista RE $\alpha$  específica, pero un efecto antagonista del RE $\beta$ .<sup>43</sup>

### 3.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS.

Existen dos mecanismos generales, que han sido reconocidos, de acción de las hormonas esteroides, el genómico mediado por los subtipos de receptores a estrógenos antes mencionados y el no genómico o rápido.<sup>37,46</sup>

#### 3.7.1 MECANISMO GENÓMICO

Los estrógenos pueden cruzar libremente por difusión las membranas plasmática y nuclear.<sup>41</sup> En el modelo clásico, la unión del RE al ligando permite cambios conformacionales, la disociación de proteínas de choque térmico como hsp70 y hsp90, la fosforilación, posterior dimerización y la asociación de proteínas co-regulatorias (co-activadores y co-represores) al RE, todos estos sucesos transforman al RE a su forma activa. Después de la unión del RE a un ERE, algunos componentes del complejo receptor:ligando:cofactor interactúan con factores de transcripción basal y otros con proteínas histonas. Finalmente se produce la estimulación o inhibición de la transcripción.<sup>40,48,49,50</sup> La acetilación de las proteínas histonas permite la descondensación de la cromatina, la cual es un requisito para la transcripción de genes.<sup>40</sup>

Las hormonas esteroidales y compuestos sintéticos con efectos agonistas o antagonistas entran a la célula blanco, una vez que la hormona se une al sitio de unión genera nuevas superficies que le permiten al co-activador unirse al LBD. La unión de antiestrógenos al RE $\alpha$  genera cambios conformacionales diferentes llevando a una orientación de la hélice 12 incompatible con la unión del co-activador.<sup>47</sup>

Los co-activadores son proteínas que interactúan con receptores esteroidales y aumentan la transcripción de sus genes blanco, entre ellos se pueden mencionar a SRC-1, SRC-2, SRC-3. En particular SRC-1 y SRC-3 pueden incrementar la proliferación de células tumorales debido al incremento de unión al RE.<sup>40,48</sup> Un co-activador es una proteína adaptadora que funciona como factor puente entre activadores específicos y la maquinaria transcripcional, y son requeridos para la transcripción eficiente.<sup>41</sup>



Los co-represores interactúan con el receptor a esteroides inhibiendo la transcripción de genes blanco. Los co-represores NCoR1 (nuclear receptor co-repressor 1) o NCoR2 (también conocido como SMRT) al estar altamente expresados puede decrecer los efectos antagonistas del TAM.<sup>40,48</sup>

En el modelo no clásico el RE pueden regular la expresión de genes sin la interacción directa con el ADN, a través de otros factores de transcripción tales como la proteína de AP-1 y Sp1. Estos complejos de unión al ADN por interacción directa de factores de transcripción asociados al RE, influyen la actividad transcripcional de genes que no contienen ERE pero tienen sitios de reconocimiento específicos para AP-1 y Sp-1.<sup>40</sup>

Las dos acciones de esteroides requieren localización nuclear del receptor a esteroides, toman de 30 a 60 minutos y son definidas como genómicas.<sup>46</sup> En contraste, las acciones esteroideas que ocurren entre segundos y pocos minutos han sido referidas como no genómicas o rápidas.<sup>37,46</sup>

### **3.7.2 MECANISMO NO GENÓMICO.**

Los efectos rápidos o no genómicos se inician a nivel de la membrana plasmática<sup>34</sup> y suceden entre segundos y pocos minutos.<sup>37,46,51</sup>

El mecanismo no genómico o extra nuclear recluta a segundos mensajeros como el calcio y el óxido nítrico, a receptores tirosina cinasa incluyendo al receptor del EGF (factor de crecimiento epidérmico) y al receptor de factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1, a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y a proteínas cinasas incluyendo PI3K, Akt, MAP cinasa, y a PKA y PKC.<sup>34,37</sup> Muchas de estas rutas estimuladas por estrógenos son iniciadas en la membrana citoplasmática así que muchos investigadores sugieren la existencia de un RE asociado a membrana.<sup>34,37,51,52</sup>

La activación de la cascada de señalización PI3K-Akt ha sido observada en sistema neuronal y vascular. La cascada de señalización MAP cinasas por RE $\alpha$  se activa en cáncer

de colon, cáncer de mama, hueso y otros tejidos normales permitiendo respuestas que incluyen la proliferación celular, progresión del ciclo celular y supervivencia.<sup>37,51</sup>

Akt puede fosforilar directamente RE $\alpha$ , resultando en un incremento de la transcripción ligando independiente de genes de respuesta a estrógenos.<sup>53</sup> MAP cinasa es responsable de la fosforilación del RE en la activación ligando independiente de RE.<sup>33</sup> La fosforilación del RE $\beta$  incrementa en respuesta a la activación de la ruta MAP cinasas. Mientras que RE $\alpha$  es fosforilado por MAP cinasas y Akt.<sup>54,55</sup>

## **CAPÍTULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen reportes que sugieren que en la línea celular humana de mama MCF-7 la cual expresa RE $\alpha$  los estrógenos disminuyen la expresión de la proteína de adhesión E-caderina, dicho efecto es contrarrestado con antiestrógenos. En el presente trabajo se estudia el impacto que tienen los estrógenos y antiestrógenos sobre la expresión de la E-caderina en líneas de cáncer de cérvix HeLa y CaLo, así como en la línea de colon SW480, lo que permitirá ampliar el conocimiento del efecto de estrógenos en la regulación de E-caderina en estas líneas celulares ya que no existen reportes acerca de este tipo de efectos.

## **CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS**

Se ha demostrado que en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 la cual expresa RE $\alpha$  y en la cual los estrógenos disminuyen la expresión de la proteína de adhesión E-caderina y dicho efecto es revertido por antiestrógenos; por lo tanto, se espera que si HeLa, CaLo y SW480 son líneas celulares que expresan RE $\alpha$ , entonces los estrógenos tendrán un efecto similar al de las células MCF-7.

## **CAPÍTULO 6. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar si la expresión de los niveles de E-caderina está regulada por estrógenos en líneas celulares humanas de cáncer de colon y cérvix, y si el efecto de los estrógenos en los niveles de expresión de E-caderina es revertido con el uso de antiestrógenos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar qué isoforma del RE,  $\alpha$  o  $\beta$ , expresan las líneas celulares de carcinoma de cérvix HeLa y CaLo, y la línea celular de adenocarcinoma colorrectal SW480 mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Evaluar los niveles de expresión de la proteína de adhesión célula-célula E-caderina en células tratadas con E2, E2 mas TAM y TAM, a 6, 12 y 24 horas, a través de la técnica de inmunohistoquímica.

## CAPÍTULO 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.

- CaLo: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, aisladas de una paciente mexicana y posee la información del virus del papiloma humano 18.<sup>68</sup>
- HeLa: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, aisladas de una paciente de raza negra de 31 años de edad. Posee la secuencia del virus del papiloma humano 18. Es la línea celular más estudiada.<sup>68</sup>
- SW480: Células de adenocarcinoma colorrectal. Es tumorigénica en ratones desnudos y produce el antígeno carcinoembrionario. Posee una morfología epitelial.<sup>68</sup>

### 7.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

#### MEDIO D-MEM

Medio D-MEM (GIBCO <sup>MR</sup> )	1 sobre para 1L
Se suplementó con:	
HEPES (SIGMA <sup>MR</sup> )	2.2 g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	3.7 g
Piruvato de Sodio (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
Aminoácidos no esenciales (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
Antibiótico antimicótico (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
SFB Inactivado por calor (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 % (v/v)

La adición de los componentes se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. En vaso de precipitados de 1 L se agregaron 700 mL de agua desionizada, se añadieron los componentes sólidos del medio, una vez que se disolvieron se agregaron los componentes líquidos y la solución se agitó hasta la disolución total. Se llevó al aforo con agua desionizada a un volumen de 900 mL y se esterilizó mediante membrana

millipore<sup>MR</sup>, poro 0.22  $\mu\text{m}$ . Este medio estéril se complementó (según la cantidad a emplear) con suero fetal bovino (SFB) al 10 % v/v. El control de esterilidad para el medio preparado se realizó colocando una alícuota en incubación a 37 °C, 99 % HR y, 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 h, al término de dicho periodo de tiempo no presentó desarrollo de microorganismos. Una vez complementado el medio D-MEM, el tiempo máximo para su empleo es de un mes aproximadamente en condiciones de refrigeración (4 °C aprox.). El SFB se inactivó en baño maría 30 minutos a 56 °C.

#### **MEDIO RPMI 1640 ADICIONADO CON GLUTAMINA**

Medio D-MEM (GIBCO <sup>MR</sup> )	1 sobre para 1 L
Se suplementó con:	
Dextrosa (GIBCO <sup>MR</sup> )	2.50 g
NaHCO <sub>3</sub> (BAKER <sup>MR</sup> )	2.00 g
Piruvato de Sodio (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
Aminoácidos no esenciales (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
Antibiótico antimicótico (GIBCO <sup>MR</sup> )	10 mL
SFB tratado con Carbón y Dextrán (Hyclone <sup>MR</sup> )	10 % (v/v)

A un volumen de 700 mL de agua desionizada a temperatura ambiente, se agregó el contenido de un sobre de medio de RPMI 1640 y los suplementos sólidos, se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos, posteriormente se adicionaron los suplementos líquidos y se agitó nuevamente hasta obtener una solución homogénea. Se completó el volumen a 900 mL con agua desionizada. Se esterilizó por filtración con membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ . La preparación del medio se llevó a cabo con material estéril y en campana de flujo laminar. Se guardó en refrigeración (4 °C) y se complemento con SFB tratado con Carbón y Dextrán poco antes de su uso para evitar contaminación microbiana.

## **PBS**

Para preparar 1 L

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (BAKER <sup>MR</sup> )	0.24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (BAKER <sup>MR</sup> )	1.44 g
NaCl (BAKER <sup>MR</sup> )	8.0 g
KCl (MERCK <sup>MR</sup> )	0.2 g

Los componentes se disolvieron en un vaso de precipitados con agua desionizada y agitación. Se ajustó el pH a 7.4, se aforó a 1 L con agua desionizada y se esterilizó la solución a 15 lb/in<sup>2</sup> y 121 °C durante 15 min.

## **PBS-EDTA**

Para preparar 1 L

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (BAKER <sup>MR</sup> )	0.24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (BAKER <sup>MR</sup> )	1.44 g
NaCl (BAKER <sup>MR</sup> )	8.0 g
KCl (MERCK <sup>MR</sup> )	0.2 g
EDTA (BAKER <sup>MR</sup> )	372 g

Los componentes se disolvieron en un vaso de precipitados de 1 L con agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó en un matraz volumétrico a 1 L con agua desionizada. La solución fue esterilizada a 15 lb/in<sup>2</sup> y 121 °C durante 15 minutos.

## **MEDIO DE CONGELAMIENTO**

Para líneas celulares como HeLa, CaLo y SW-480:

En un recipiente estéril se adicionó el medio de cultivo D-MEM estéril sin complementar con SFB, se agregó glicerol estéril de tal forma que la concentración fue 15



% v/v y se mezclaron homogéneamente. Este medio se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se descongeló cuando fue requerido, es decir, cuando se hizo necesario congelar células para preservar las líneas celulares.

#### **p-FORMALDEHÍDO AL 4%**

Para preparar 100 mL se pesaron 4 g de p-formaldehído (SIGMA<sup>MR</sup>), se disolvieron en PBS a agitación lenta y con calor (aproximadamente a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a fin de favorecer la disolución. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con PBS a 100 mL en un matraz volumétrico, finalmente se guardó en refrigeración hasta su uso.

#### **CITRATO DE SODIO 10mM**

La solución de citrato de sodio se preparó minutos antes de su uso. Para preparar 1 L de solución se disolvieron 2.94 g de citrato de sodio (BAKER<sup>MR</sup>) en agua desionizada, se aforó a 1 L y el pH de la solución se ajustó a 6.0.

#### **ALBÚMINA 5% p/v**

Para preparar 25 mL de esta solución se pesaron 1.25 g de Albúmina Bovina (SIGMA<sup>MR</sup>) y se disolvieron con agitación suave en PBS y con ligero calentamiento, una vez disuelta la albúmina se aforó a un volumen final de 25 mL con PBS. Esta solución se preparó minutos antes de ser usada.

#### **TRITÓN X-100 0.5% v/v**

Se tomó una alícuota de 0.5 mL de Tritón X-100 (SIGMA<sup>MR</sup>) y se vertió en un matraz volumétrico de 100 mL, el tritón se disolvió en PBS con agitación suave y se aforó a 100 mL con PBS.

### **PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) AL 3 % v/v**

Se tomó una alícuota de 5.0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (REPROQUIFIN<sup>MR</sup>) y se vertió en un matraz volumétrico de 50 mL, se mezcló perfectamente con PBS y se aforó a 50 mL con PBS.

### **COMPLEJO DE ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA (1:50)**

Se mezclaron la alícuota del complejo A y B en PBS y se aforó al volumen requerido con PBS. Se dejó reposar durante 30min antes de utilizarlo.

### **CROMÓGENO DAB**

En 5 mL de agua destilada se adicionaron dos gotas de la solución buffer, cuatro gotas de la solución DAB y dos gotas de la solución de peróxido de hidrógeno, se mezcló perfectamente entre cada adición.

### **ETANOL AL 50 %.**

Para preparar un litro de solución se midieron 500 mL de etanol absoluto, se aforó a 1L con agua destilada y se mezcló por agitación.

### **ETANOL AL 70 %.**

Para preparar un litro de solución se midieron 700 mL de etanol absoluto y se aforó a 1 L con agua destilada.

### **ETANOL AL 90 %.**

Para preparar un litro de solución se midieron 900 mL de etanol absoluto y se aforó a 1 L con agua destilada.

### **ETANOL AL 96 %.**

Para preparar un litro de solución se midieron 960 mL de etanol absoluto y se aforó a 1 L con agua destilada.

### **XILOL-ETANOL.**

Para preparar un litro de solución se midieron 500 mL de etanol absoluto, 500 mL de xilol y se mezclaron por agitación.

### **TAMOXIFENO (TAM) 0.5 $\mu$ M**

Se pesaron 1.3 mg de TAM (SIGMA<sup>MR</sup>, 99 % de pureza y PM de 371.5 g/mol), se disolvieron en etanol y se aforó a 10 mL con Etanol, de la solución anterior se tomaron 5.77  $\mu$ L para cada caja y se llevaron a 500  $\mu$ L con medio RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB tratado con carbón y dextrán, mismos que se adicionaron a cada caja para llegar a un volumen final de 4 mL, así que la alícuota de la solución stock fue de 8 veces mayor para conseguir una concentración final de 0.5 $\mu$ M de TAM en cada caja.

### **ESTRADIOL (E2) 5nM.**

Se pesaron 1.2 mg de 17 $\beta$ -estradiol (SIGMA<sup>MR</sup>, 4.66 % de pureza y PM igual a 272.4 g/mol), se disolvió en RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB tratado con carbón y dextrán, y se aforó a 10 mL, de esta solución se tomaron 0.9746  $\mu$ L y 5.77  $\mu$ L de etanol por caja y se aforó a 500  $\mu$ L, mismos que se adicionaron a cada caja para conseguir una concentración final de 5 nM por caja.

## **ESTRADIOL (E2) 5nM y TAMOXIFENO (TAM) 0.5 μM**

Se tomó una alícuota de 5.77 μL de la solución stock de TAM y una de 0.9746 μL de la solución stock de E2 y se aforó a 500 μL con RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB tratado con carbón y dextrán para cada caja.

### **CONTROL**

Una alícuota de 5.77 μL de Etanol se llevó a 500 μL con RPMI 1640 complementado con 10 % de SFB tratado con carbón y dextrán para cada caja.

### **ANTICUERPOS**

	ANTICUERPO	MARCA	DILUCIÓN
Primarios	Anti-RE $\alpha$ Anticuerpo policlonal IgG de conejo	Santa Cruz	1:750
	Anti-RE $\beta$ Anticuerpo policlonal IgG de cabra	Santa Cruz	1:250
	Anti-E-caderina policlonal IgG de conejo	Santa Cruz	1:100
Secundarios	Anticuerpo anti-conejo IgG biotinilado	Vector	1:200
	Anticuerpo anti-cabra IgG biotinilado	Santa Cruz	1:100
	Anticuerpo anti-cabra IgG biotinilado	Vector	1:200

## **7.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **7.3.1 DESCONGELAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES**

Se vertieron 3.5 mL de medio D-MEM complementado con SFB al 10%, previamente atemperado a 37 °C aproximadamente, en una caja de petri de 5 cm de diámetro previamente rotulada.

Se sacó un criotubo del banco de células contenidas en nitrógeno líquido (N<sub>2L</sub>) y con ayuda de la temperatura de la mano se descongeló casi en su totalidad. El contenido del criotubo se vertió en la caja con medio de cultivo de un solo paso y de manera rápida.

La caja se incubó por una hora (a 37 °C, 95 % de HR y 5 % de CO<sub>2</sub>) y se realizó un cambio de medio para desechar las células muertas porque que el fondo se encontraban adheridas a la caja las que eran viables. El mismo procedimiento se siguió para HeLa, CaLo y SW480.

### **7.3.2 PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES**

Se realizaron observaciones de las cajas de cultivo para determinar si era necesario una cambio de medio y una vez que el crecimiento celular alcanzaba una confluencia de entre 80 y 90 %, se decantó el medio y se realizó una lavado con PBS-EDTA con movimientos suaves.

Las cajas se incubaron por 10 minutos con 1 o 2 mL de PBS-EDTA y con ayuda de una pipeta estéril se succionó y expulsó para ayudar a la disgregación de las células, una vez que se hubo turbidez se observaba al microscopio para asegurar que en su mayoría las células se encontraban en forma individual.

Se homogenizó el contenido de la caja y se distribuyó en otras cajas rotuladas las cuales contenían D-MEM previamente atemperado. Se realizaron movimientos suaves para distribuir perfectamente la carga celular.

Después de haber dejado que las células se sedimentaran sobre una superficie horizontal y plana por 10 minutos aproximadamente se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en ambiente húmedo.

### **7.3.3 CONGELAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES**

El medio de cultivo de cada caja se decantó y se dio un primer lavado con PBS-EDTA a cada línea celular contenida en la caja Petri (aproximadamente 3 mL), todos los lavados fueron rápidos y en un movimiento. Se lavó por segunda vez con la misma solución. Las cajas fueron incubadas con PBS-EDTA por 10 minutos a 37 °C, 99 % HR y 5 % CO<sub>2</sub>.

Una vez transcurrido este tiempo las células se habían desprendido del plástico de la caja, entonces se cosecharon de la caja(s) en un tubo Falcón<sup>MR</sup> etiquetado con la ayuda de una pipeta Pasteur ó micropipeta, para centrifugar la suspensión celular a 1500 r.p.m, por 10 minutos. Se desechó sólo el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con pipetas Pasteur en 4 mL de medio de congelamiento.

Una vez que la suspensión fue homogénea se llevaron alícuotas de un volumen de 1.5 mL a criotubos previamente etiquetados, los cuales se mantuvieron por 1 h a -20 °C, a -70 °C por 2 h y finalmente a -190 °C en nitrógeno líquido (N<sub>2L</sub>).

### **7.3.4 CONTEO CELULAR**

El medio de cultivo de la caja Petri fue decantado, se lavó la caja con PBS-EDTA y se decantó. La monocapa celular se cubrió con PBS-EDTA y se incubó a 37 °C durante 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se desprendieron las células con ayuda de una pipeta Pasteur succionando y expulsando el PBS-EDTA hasta que se observó turbidez, se comprobó con el microscopio que las células se encontraban de manera individual.

La cámara o hemocitómetro de Neubauer se limpió con etanol al 70 %, se secó y se colocó en una superficie horizontal. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular, se colocó por capilaridad una gota de esta suspensión en la cámara y dejó reposar durante 2 minutos para que las células sedimentaran.

Se contaron las células de los ocho cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos y se promediaron, el número de células por mL de suspensión se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \text{promedio} * 10^4$$

### **7.3.5 EVALUACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RE $\alpha$ Y RE $\beta$ .**

Se llevó a cabo el conteo celular, se tomaron los mililitros suficientes de la suspensión celular que aseguraran una cantidad de 750,000 células y se aforó a un volumen final de 8.0 mL en medio D-MEM complementado con 10 % de SFB en un tubo falcón estéril. La suspensión se homogenizó perfectamente y se vertió de manera rápida y cuidadosa con ayuda de una pipeta estéril sobre los cubre objetos estériles que fueron colocados previamente en cajas petri de 10 cm de diámetro, las cajas se dejaron 10 minutos aproximadamente sobre una superficie horizontal y plana. Las cajas fueron incubadas por 48 horas a 37 °C, una vez transcurrido este periodo de tiempo las células fueron fijadas con p-formaldehído al 4 % y se realizó la inmunohistoquímica.

### **7.3.6 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E-CADERINA EN LAS LÍNEAS CELULARES HeLa, CaLo y SW480 TRATADAS CON VEHÍCULO, E2, E2 Y TAM, Y TAM**

Para las tres líneas celulares (HeLa, CaLo y SW480): En cajas petri de 5 cm de diámetro previamente rotuladas se colocaron cubreobjetos estériles. Se llevó a cabo el conteo celular y se hicieron las diluciones convenientes a fin de que en cada caja hubieran 375,000 células en 3.5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con SFB tratado con carbón y dextrán 10%, las cajas se incubaron por 48 horas para asegurar buena confluencia, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos después de las 48 horas de incubación: control, E2 (5 nM), E2 (5 nM) mas TAM (0.5  $\mu$ M) y TAM (0.5  $\mu$ M) a 6, 12 y 24 horas. Las células fueron fijadas a los tiempos antes mencionados con p-formaldehído al 4%, se realizó la inmunohistoquímica, cuantificación y análisis estadístico.

### 7.3.7 FIJACIÓN DE CÉLULAS

El medio de cultivo se eliminó con ayuda de una pipeta, se lavó una vez con PBS frío, las cajas se incubaron por un periodo de 45 a 60 min con aproximadamente 4 mL de p-formaldehído al 4 % frío; una vez transcurrido el tiempo el p-formaldehído se descartó suavemente por aspirado de las cajas y se lavó con PBS frío, finalmente se retiró el PBS casi en su totalidad, las cajas se sellaron con parafilm y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

### 7.3.8 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para realizar la inmunohistoquímica se procedió de la siguiente manera:

- Los cubre objetos fueron colocados en citrato de sodio 10 mM pH 6.0, se calentaron en horno de microondas (Horno de alta potencia) 10 minutos 2 veces, entre cada calentamiento se esperó 5 minutos.
- El citrato de sodio se enfrió a temperatura ambiente.
- Se lavó con PBS 2 veces por 5 minutos cada lavado.
- Se incubaron por 45 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %.
- Se lavó 2 veces con PBS por 5 minutos cada lavado.
- Se permeabilizó con tritón 0.5 % por 60 minutos.
- Se lavó con PBS 2 veces por 5 minutos cada lavado.
- Se bloqueó con Albúmina al 5 % por 1 hora.
- Se incubó con el Primer anticuerpo por 72 horas a 4° C en cámara húmeda.

	ANTICUERPO	DILUCIÓN
Expresión de RE $\alpha$	Anti-RE $\alpha$ policlonal IgG de conejo	1:750
Expresión de Re $\beta$	Anti-Re $\beta$ Anticuerpo policlonal IgG de cabra	1:250
Expresión de E-caderina	Anti-E-caderina policlonal IgG de conejo	1:100

- Se realizaron 10 lavados con PBS, por 5 minutos cada lavado.
- El anticuerpo secundario se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.



DETERMINACIÓN	LÍNEA CELULAR	ANTICUERPO	MARCA	DILUCIÓN
Expresión E-caderina Expresión de Re $\alpha$	HeLa, CaLo y SW480	Anticuerpo anti-conejo IgG biotinilado	Vector	1:200
Expresión de Re $\beta$	HeLa, CaLo	Anticuerpo anti-cabra IgG biotinilado	Santa Cruz	1:100
Expresión de Re $\beta$	SW480	Anticuerpo anti-cabra IgG biotinilado	Vector	1:200

- Se lavó con PBS 4 veces por 5 minutos cada lavado.
- Se incubó por 1 hora con el complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa AB.
- Se lavó con PBS 2 veces por 5 minutos cada lavado.
- Se incubó con el cromógeno DAB por 30 segundos.
- Se contratiñó con Hematoxilina por 5 minutos.
- Se lavó con agua por 5 minutos.
- Se viró en carbonato de litio por 2 minutos.
- Se lavó con agua 2 minutos.
- Se deshidrató con: Etanol 50 % por 1 min, Etanol 70 % por 1 min, Etanol al 90 % por 1 min, Etanol al 96 % por 1 min, Etanol absoluto por 1 min, Xilol-Etanol por 1 min, Xilol por 1 min y Xilol por 5 min.
- Se colocó una gota de clariol en un portaobjetos y se colocaron cuidadosamente los cubreobjetos sobre ésta teniendo cuidado de no formar burbujas.

### 7.3.9 CUANTIFICACIÓN

Para la cuantificación de E-caderina se seleccionaron 5 campos al azar de cada tiempo y tratamiento, y se tomaron fotografía de cada uno de ellos con un microscopio óptico acoplado a una computadora. La cuantificación fue realizada por densitometría usando para tal efecto el programa KS-300 y se obtuvieron como datos de la cuantificación valores en escala de grises.

### **7.3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se compararon entre todos y cada uno de los tratamientos para determinar si hubo diferencia significativa entre ellos con una prueba de t no pareada con una n igual a 5, de dos colas y con un intervalo de confianza del 95 %, para tal efecto se uso el programa Graphpad Prism versión 2.01.

## **CAPÍTULO 8. RESULTADOS**

### **8.1 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECEPTOR A ESTRÓGENOS EN LAS LÍNEAS CELULARES HELa, CaLo Y SW480**

La determinación de la expresión del RE en sus dos isoformas se realizó mediante la técnica inmunohistoquímica, empleando para tal efecto anticuerpos anti-RE alfa y anti-RE beta; las células fueron incubadas en medio y condiciones de cultivo normales además de que no se aplicó ningún tratamiento, las células se fijaron después de 48 horas de incubación, finalmente se realizó la inmunohistoquímica.

En la tabla 1 se reportan los resultados que fueron obtenidos en las tres líneas: HeLa, CaLo y SW480. En las tres líneas celulares se detectó una mayor expresión de la proteína RE $\alpha$ , por otro lado, poca expresión de RE $\beta$ . Considerando que las diluciones realizadas para la determinación son diferentes, esto es, que en el primer anticuerpo RE $\alpha$  la dilución fue tres veces mayor que para RE $\beta$ , lo que indica una mayor expresión de la proteína RE $\alpha$ .

La línea celular que expresa mayor proteína RE $\alpha$  es HeLa y SW480 es la línea que expresó mayor proteína RE $\beta$ . En la figura 1 se presentan fotografías de las tres líneas celulares y se hace evidente que hay una mayor expresión de RE $\alpha$  y muy poca expresión de RE $\beta$  en HeLa, CaLo y SW480. En la misma figura también se presentan fotografías denominadas positivo (con primer anticuerpo) y control (sin primer anticuerpo) para determinar si hubo unión inespecífica del segundo anticuerpo, los resultados sugieren que no hubo unión inespecífica para ninguna de las tres líneas celulares ya que no se ve inmunorreacción en las células control.

Línea	RE $\alpha$ (dilución 1:750)	RE $\beta$ (dilución 1:250)
HeLa	++++	+
CaLo	+++	+
SW480	+++	++

Tabla 1. Niveles de expresión de la proteína RE $\alpha$  y RE $\beta$  en las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480.

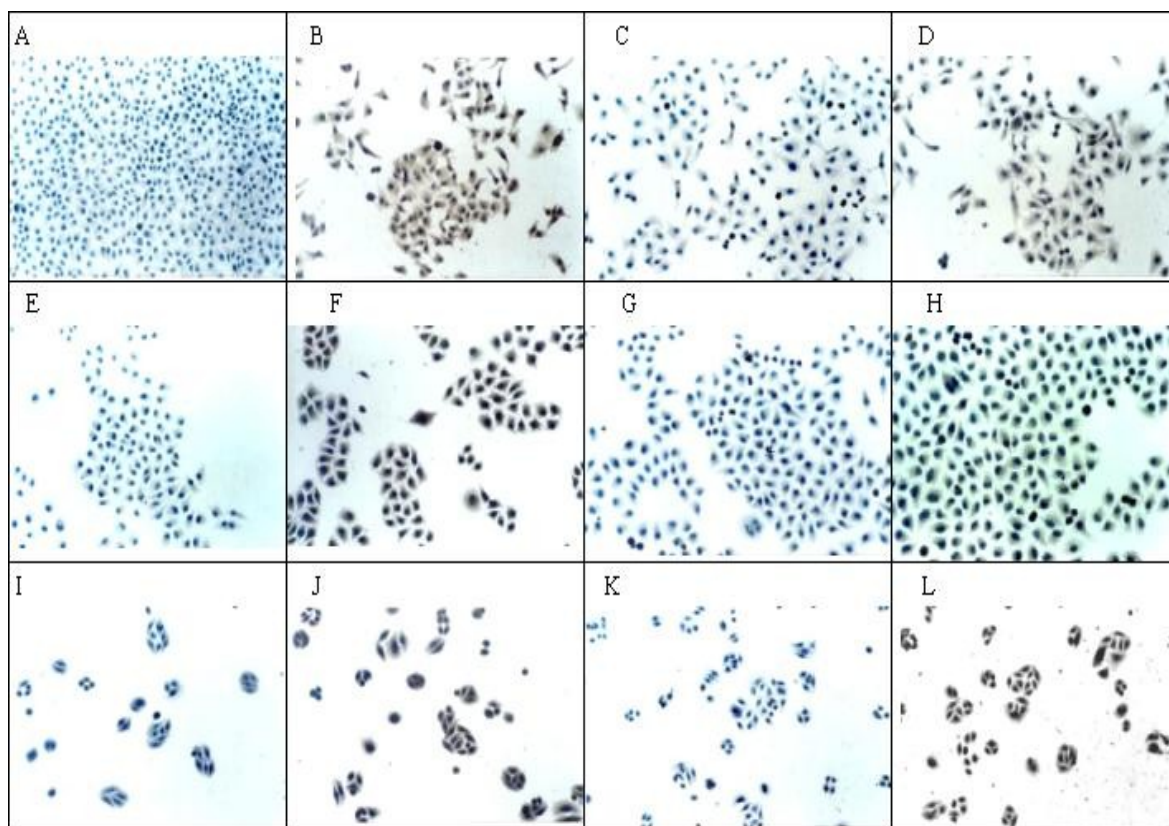


Figura 1. Expresión de la proteína RE por inmunohistoquímica: células Calo A) RE $\alpha$  control, B) RE $\alpha$  positivo, C) RE $\beta$  control, D) RE $\beta$  positivo. Células HeLa E) RE $\alpha$  control, F) RE $\alpha$  positivo, G) RE $\beta$  control, H) RE $\beta$  positivo. Células SW480 I) RE $\alpha$  control, J) RE $\alpha$  positivo, K) RE $\beta$  control, L) RE $\beta$  positivo.

## **8.2 CAMBIO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E-CADERINA POR LOS TRATAMIENTOS CON ESTRÓGENOS Y ANTIESTRÓGENOS EN LAS LÍNEAS CELULARES HeLa, CaLo Y SW480.**

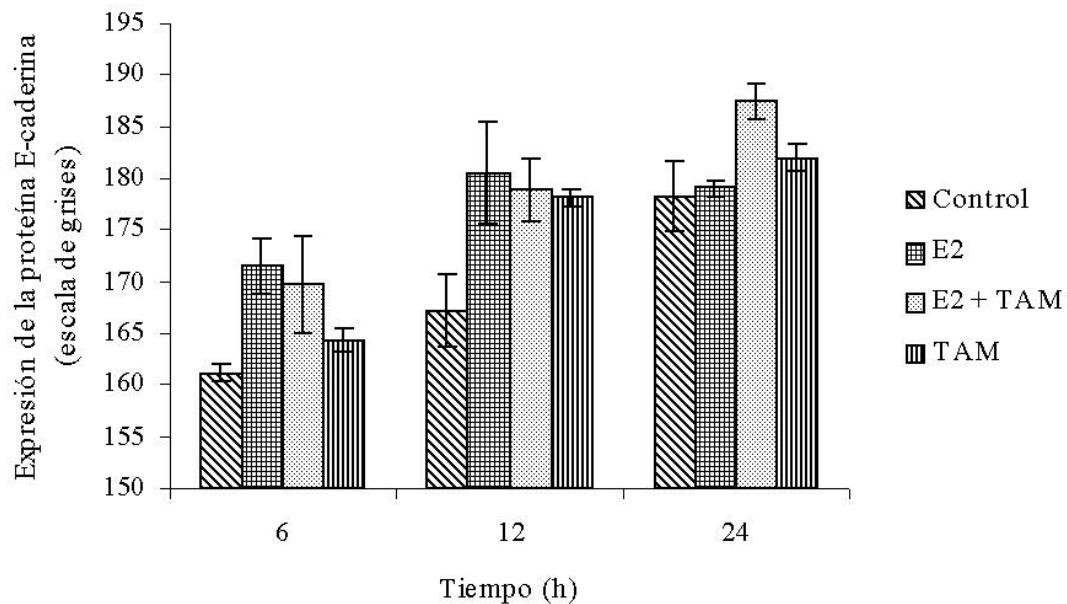
Existen reportes que sugieren que la línea celular MCF-7 RE $\alpha$  positivo al ser tratada con E2 disminuye la expresión de E-caderina y este efecto es revertido por el TAM<sup>21</sup>. La disminución en la expresión de la E-caderina puede contribuir a la metástasis<sup>14,17,21</sup>. Nuestros hallazgos sugieren que en HeLa, CaLo y SW480 la expresión de la proteína RE $\alpha$  fue alta comparada con la expresión de RE $\beta$ , por lo tanto, son líneas celulares humanas a las que se les denomina RE $\alpha$  positivo y se estudió el efecto en la expresión de E-caderina que causaron los tratamientos con E2 y TAM en estas líneas celulares.

Para el análisis de la expresión de la proteína E-caderina las tres líneas celulares HeLa CaLo y SW480 fueron incubadas por 48 horas en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SFB tratado con carbón y dextrán (libre de hormonas), una vez transcurrido este tiempo se trataron por 6, 12 y 24 horas con vehículo (control), E2 (5 nM), E2 (5 nM) y TAM (0.5  $\mu$ M), y TAM (0.5  $\mu$ M).

En la tabla 2 se presenta el promedio de cinco campos tomados al azar  $\pm$  DE en escala de grises que representa la cuantificación por densitometría (usando el programa KS-300) de la expresión de la E-caderina en la línea celular CaLo a los diferentes tiempos y tratamientos a que fue expuesta esta línea celular. Los datos de la tabla 2 se muestran en forma de gráfica de barras en la gráfica 1 donde se observa un aumento en la expresión de la E-caderina inducido por los diferentes tratamientos; a las 12 horas de tratamiento se encontró el mayor efecto del E2 sobre la expresión de la E-caderina con un incremento de 7.97 % con respecto al control, mientras que a 6 horas se observa un aumento en la expresión de 6.45 % para los mismos tratamientos. A 24 horas las células tratadas con E2 mas TAM, simultáneamente, la expresión de la E-caderina aumentó un 5.17 % con respecto al control.

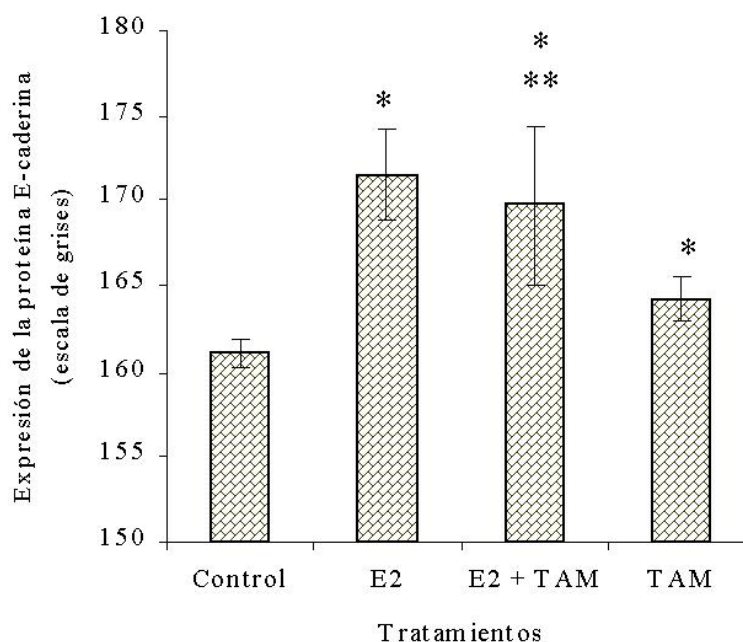
TIEMPO(h)	TRATAMIENTO							
	Control		E2		E2+TAM		TAM	
6	161.11	± 0.85	171.50	± 2.67	169.69	± 4.65	164.21	± 1.19
12	167.15	± 3.56	180.48	± 4.94	178.77	± 3.08	178.06	± 0.77
24	178.21	± 3.40	178.95	± 0.85	187.41	± 1.73	181.94	± 1.32

Tabla 2. Niveles de Expresión de la E-caderina en la línea celular CaLo, los datos están reportados en escala de grises y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE.



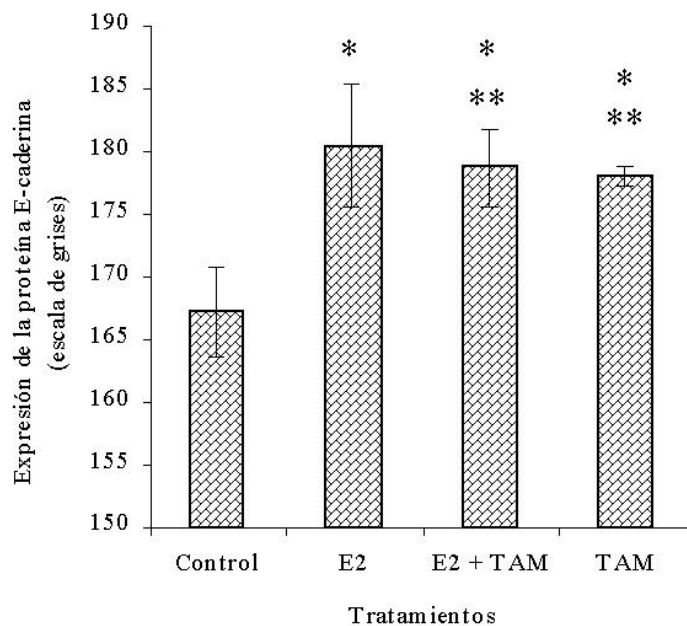
Gráfica 1.- Cinética de la expresión de la proteína E-caderina en la línea celular CaLo a diferentes tiempos y tratadas con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE.

Tal y como puede observarse en la gráfica 2 hubo diferencia significativa entre los tratamientos a excepción de E2 contra E2 y TAM, lo que sugiere que el TAM no revirtió los efectos del E2 sobre la expresión de la E-caderina a las 6 horas de tratamiento. Desde las 6 horas de tratamiento se puede observar que el E2 incrementó la expresión de la E-caderina y que este efecto no fue revertido por el TAM. También se puede observar en la gráfica que el TAM indujo un aumento en la expresión de la E-caderina, aunque en menor medida, ya que hay diferencia significativa entre este tratamiento y el control.



Gráfica 2.- Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea CaLo a las 6 horas de tratamiento con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE. \*p < 0.05 vs Control, \*\*p > 0.05 vs E2.

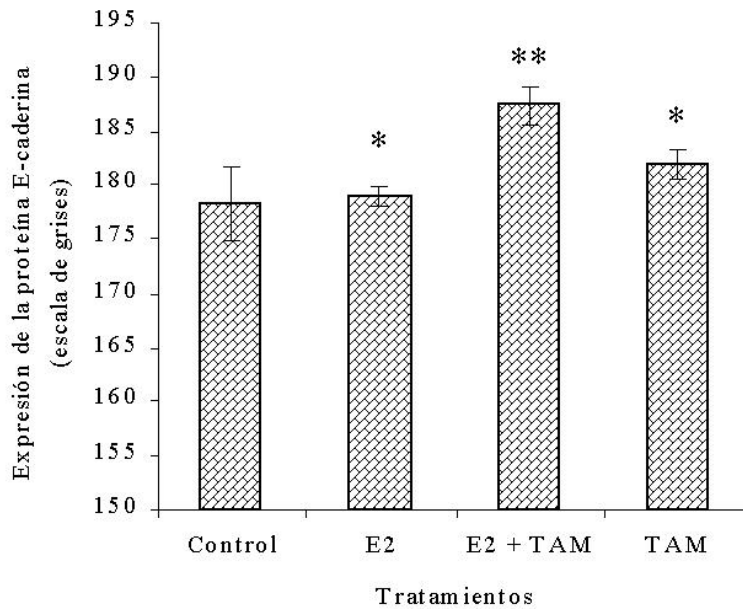
De acuerdo a lo observado, no hubo diferencia significativa a 12 horas de tratamiento entre E2, E2 y TAM, y TAM, al ser comparados entre sí, pero si hubo diferencia al compararlos con las células control (gráfica 3). A este tiempo se observó el mayor efecto en la regulación de la E-caderina por los tres tratamiento. En el tratamiento simultáneo con E2 y TAM, los resultados sugieren que los efectos del E2 no fueron revertidos por el TAM.



Gráfica 3.- Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea CaLo a las 12 horas de tratamiento con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE. \*p < 0.05 vs Control, \*\*p > 0.05 vs E2.

A las 24 horas de tratamiento no hubo diferencia significativa, tal como se muestra en la gráfica 4, entre el control y las células que fueron tratadas con TAM y con E2, el tratamiento que parece seguir teniendo un efecto significativo es el de E2 mas TAM al ser comparados contra el control.





Gráfica 4. Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea CaLo a las 24 horas de tratamiento con vehículo(Control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM) y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar  $\pm$  DE. \* $p > 0.05$  vs Control. \*\* $p < 0.05$  vs Control.

En la figura 2 se presentan fotografías de la línea CaLo a las 12 h de tratamiento, tiempo en el que se observó un mayor efecto en la expresión de la proteína E-caderina en las células tratadas con E2, E2 y TAM, y TAM, es evidente que hubo un aumento en la inmunorreacción de las células tratadas al ser comparadas con las células control. Destaca que en las células tratadas hubo una mayor proliferación al compararlas con las células control.

En las células control se puede observar que la E-caderina se encontró presente principalmente en citoplasma y en las células tratadas se localizaron zonas donde se observó la E-caderina en la membrana plasmática (figura 4B).

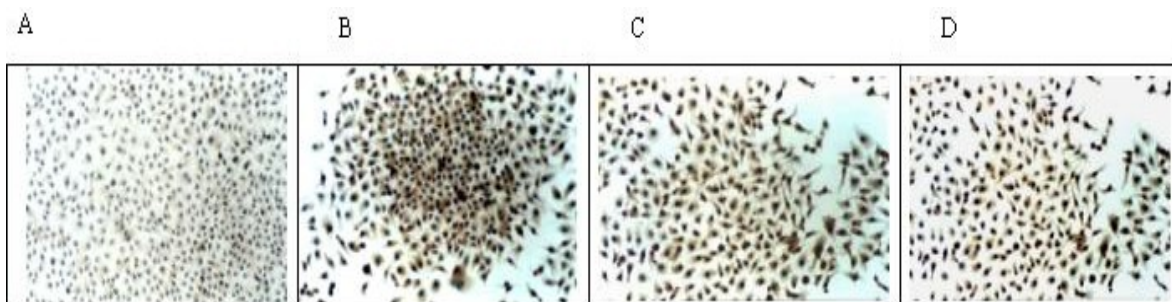


Figura 2. Expresión de la E-caderina en células CaLo a las 12 h de tratamiento. A)Control, B) E2, C) E2 y TAM, y D) TAM. La inmunohistoquímica se realizó como se indica en la sección 7.3.8 y como se puede observar las células del panel B muestran una mayor inmunorreacción.

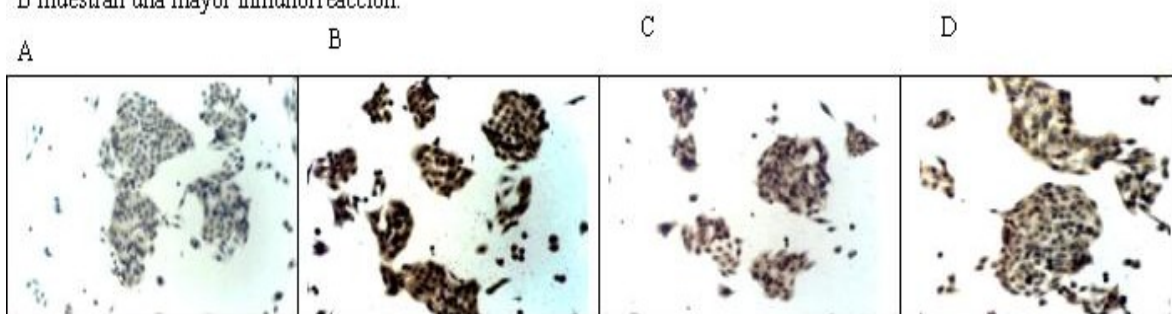


Figura 3. Expresión de la E-caderina en células SW480 a las 6 h de tratamiento. A)Control, B) E2, C) E2 y TAM, y D) TAM. La inmunohistoquímica se realizó como se indica en la sección 7.3.8 y como se puede observar las células del panel B muestran una mayor inmunorreacción.

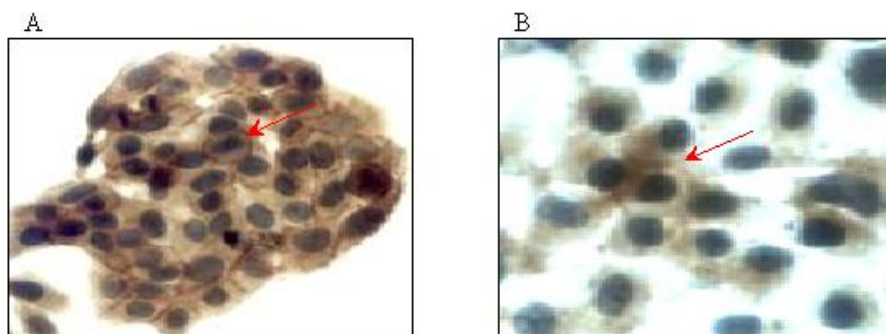
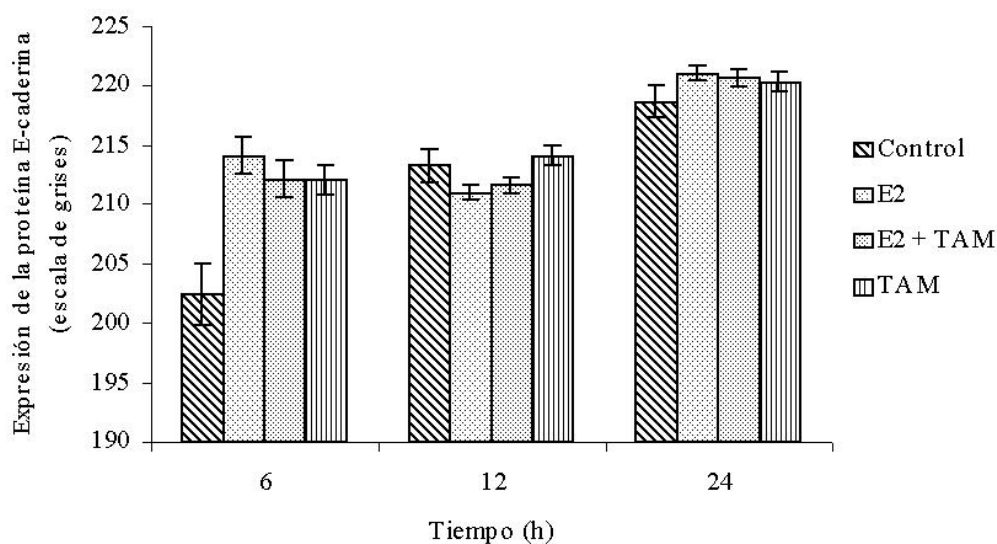


Figura 4. Expresión de la E-caderina a las 6 h con E2, A) Células SW480, B) Células Calo. La flecha indica la ubicación de la E-caderina a nivel de la membrana plasmática, la inmunohistoquímica se realizó como se indica en la sección 7.3.8 de la metodología.

La tabla 3 contiene los datos obtenidos de la expresión de la E-caderina en la línea celular SW480 por el efecto de los tratamientos a 6, 12 y 24 horas, estos datos son el promedio de 5 campos tomados al azar  $\pm$  DE expresados en escala de grises, la gráfica 5 es la representación de estos datos. Los resultados sugieren que el E2, E2 más TAM y TAM aumentaron la expresión de la E-caderina a las 6 horas de tratamiento, tiempo en el que se alcanzó el efecto máximo con un aumento de 5.79 % en la expresión de la proteína en las células tratadas con E2 al compararlas con las células control.

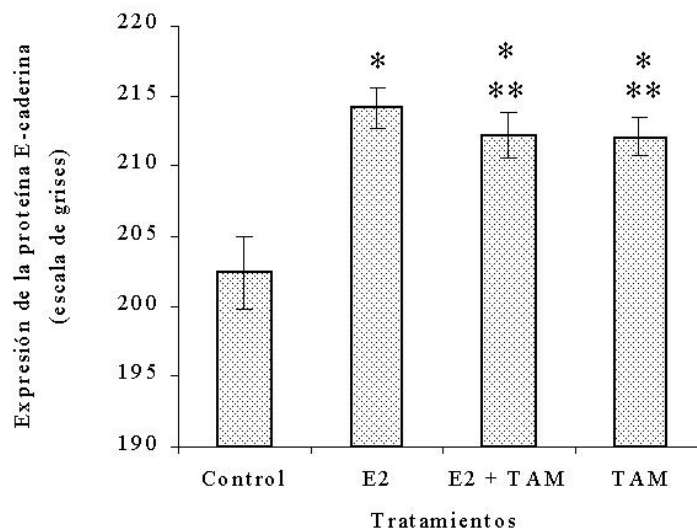
TIEMPO(h)	TRATAMIENTO			
	Control	E2	E2+TAM	TAM
6	202.40 $\pm$ 2.63	214.12 $\pm$ 1.53	212.12 $\pm$ 1.60	212.07 $\pm$ 1.34
12	213.25 $\pm$ 1.30	211.01 $\pm$ 1.22	211.61 $\pm$ 2.71	214.15 $\pm$ 2.14
24	218.69 $\pm$ 1.42	221.00 $\pm$ 0.63	220.60 $\pm$ 0.72	220.34 $\pm$ 0.80

Tabla 3. Niveles de Expresión de la E-caderina en la línea celular SW480, los datos están reportados en escala de grises y son el promedio de 5 campos tomados al azar  $\pm$  DE.



Gráfica 5.- Cinética de la expresión de la proteína E-caderina en la línea celular SW480 a diferentes tiempos y tratadas con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) + TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar  $\pm$  DE.

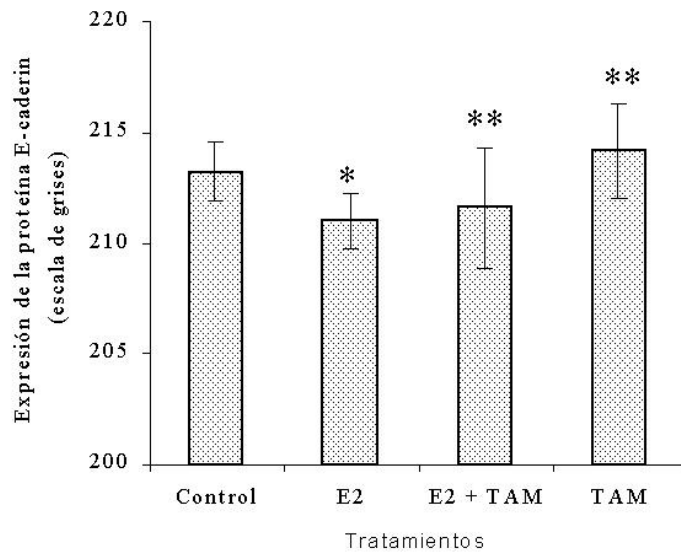
A las 6 horas de tratamiento no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM pero si cuando cada uno de ellos fue comparado con el control (gráfica 6). Los datos sugieren que el E2 y el TAM aumentaron la expresión de la E-caderina y que el TAM no revirtió los efectos del E2 sobre la expresión.



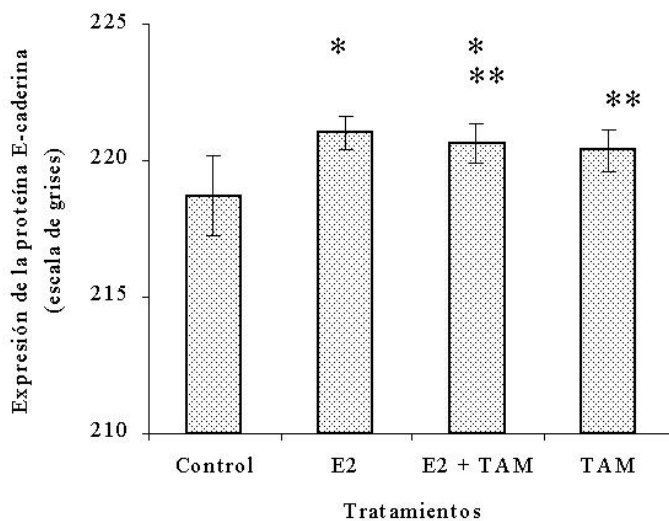
Gráfica 6.- Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea SW480 a las 6 horas de tratamiento con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE. \*p < 0.05 vs Control, \*\*p > 0.05 vs E2.

A 12 horas hubo diferencia significativa únicamente entre el tratamiento con E2 y el control, parece no haber efecto inducido por los tratamientos con E2 mas TAM y TAM ya que los niveles de expresión no presentan un cambio drástico y no hubo diferencia significativa al ser comparados contra el control (gráfica 7).

En la gráfica 8 se presentan los resultados obtenidos para la expresión de E-caderina a 24 horas de tratamiento donde no hubo diferencia significativa entre los tratamientos E2, E2 mas TAM y TAM, la diferencia se hizo evidente cuando fueron comparados los tratamientos de E2 y E2 mas TAM contra el control.



Gráfica 7.- Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea SW480 a las 12 horas de tratamiento con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE. \*p < 0.05 vs Control, \*\*p > 0.05 vs Control.



Gráfica 8.- Cambio en los niveles de expresión de la proteína E-caderina en la línea SW480 a las 24 horas de tratamiento con vehículo(control), E2(5nM), E2(5nM) y TAM(0.5µM), y TAM(0.5µM). Los datos mostrados se obtuvieron de la cuantificación de la inmunorreacción (sección de la metodología 7.3.6) y son el promedio de 5 campos tomados al azar ± DE. \*p < 0.05 vs Control, \*\*p > 0.05 vs E2.

Las fotografías que se muestran en la figura 3 de las células SW480 con los tratamientos de vehículo (control), E2, E2 más TAM y TAM a las 6 horas donde se observó el mayor efecto de los tratamientos sobre la expresión de la E-caderina y destacó el aumento de la inmunorreactividad en las células tratadas en su comparación con el control. También se pudo observar que en las células tratadas hubo un ligero aumento en la proliferación celular al ser comparadas con las células control.

En las células control de la línea celular SW480 se puede observar que la E-caderina se ubica principalmente en citoplasma a diferencia de los tratamientos donde se observa en citoplasma y en membrana plasmática, en la figura 4A se presenta una fotografía a 40x de células tratadas con E2 a 6 horas y se observa la ubicación de esta proteína en la membrana plasmática.

En la línea celular de cérvix HeLa en ninguno de los tiempos ni tratamientos se observó diferencia en la expresión de la proteína E-caderina así como tampoco se observó diferencia en la proliferación celular entre los diferentes tratamientos (datos no mostrados).

## CAPÍTULO 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Existen reportes que indican que en tumorigénesis la expresión de la proteína RE $\beta$  disminuye en la progresión del tumor mientras que la expresión de la proteína RE $\alpha$  se ve incrementada en cáncer comparada con tejido normal, este efecto ha sido reportado en muchos cánceres los cuales incluyen mama, ovario, colon y próstata.<sup>30</sup>

Se ha reportado que en mucosa de colon normal se expresan tanto ARNm de RE $\alpha$  y de RE $\beta$  pero existen mayores niveles de ARNm del RE $\beta$  que de  $\alpha$ .<sup>66</sup> En líneas celulares normales de colon el RE $\beta$  está altamente expresado y la expresión del RE $\alpha$  es mínima, tanto en mucosa normal como en células de cáncer de colon, la expresión de la proteína RE $\beta$  es marcadamente reducida en cáncer de colon comparada con colon normal in vivo<sup>49,65,66,67</sup>. En líneas de cáncer de colon ha sido reportado como esencialmente negativo el ARNm de RE $\alpha$  mientras que la expresión de RE $\beta$  es muy alta<sup>66</sup>.

En las líneas celulares de adenocarcinoma de colon Caco-2, T84, y SW1116 se ha observado que los niveles de ARNm de RE $\beta$  son mayores que de RE $\alpha$ , destaca el mismo efecto en otras líneas celulares de adenocarcinoma de colon.<sup>42,66</sup> En SW48 y HT29 se encontró muy bajo nivel de ARNm de RE $\beta$  comparado con las otras líneas.<sup>66</sup> Nuestros resultados indican que en SW480 hay una mayor expresión de la proteína RE $\alpha$  y muy poca cantidad de proteína RE $\beta$  (tabla 1) estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura para líneas celulares de adenocarcinoma de colon.

Tanto en mucosa como en líneas celulares de colon disminuye la expresión de RE $\beta$  como efecto de la carcinogénesis y se ha reportado que los niveles de ARNm del RE $\beta$  en mujeres decrecen significativamente en tumores de colon comprados con mucosa normal y en hombres no existe diferencia significativa, esta disminución en el ARNm puede ser debida a mutaciones e hipermetilación de regiones del promotor ya que se han encontrado alteraciones en varias secuencias en genes de adenocarcinomas y como consecuencia también los niveles de proteína RE $\beta$  se ven decrecidos en cáncer de colon.<sup>66</sup>

La línea celular SW480 al igual las líneas celulares HT29 y SW48 son de adenocarcinomas con morfología tipo epitelial, HT29 fue aislada de una mujer de 44 años, de SW480 y SW48 se desconoce si fueron aisladas de hombre o mujer; Caco-2, SW1116 y T84 fueron aisladas de hombres.<sup>68</sup> Nuestros resultados se podrían justificar sugiriendo que SW480 pudo haber sido aislada de adenocarcinoma de mujer y, por lo tanto, expresa menor cantidad de proteína RE $\beta$  que RE $\alpha$ .

Por otra parte existen hallazgos inmunohistoquímicos que sugieren que en adenocarcinoma de colon un 38 % de carcinomas de pacientes masculinos exhibieron RE $\beta$  débilmente positivo y otro 38 % negativo mientras que en mujeres los resultados no difieren en gran medida porque el 35 % son débilmente positivos y el 38 % negativos para RE $\beta$ .<sup>49</sup> La pérdida progresiva de la expresión de RE $\beta$  durante el proceso de carcinogénesis ha sido documentado también en próstata y cáncer de mama lo que sugiere el papel del RE $\beta$  como un inhibidor potencial en la proliferación y transformación celular.<sup>49,65</sup> En base a este reporte se podría sugerir que la línea celular SW480 pudo haber sido aislada de un adenocarcinoma con expresión débil de la proteína RE $\beta$ .

Con respecto a las líneas celulares de cérvix HeLa y CaLo se detectó una mayor expresión de la proteína RE $\alpha$  que de RE $\beta$  (figura 1), estos resultados van acorde con nuestras expectativas porque se ha reportado que en útero se expresa principalmente el RE $\alpha$ .<sup>31,32,33,35</sup>

En líneas de cáncer de mama que contienen RE $\alpha$  como es el caso de MCF-7, el E2 reduce los niveles de expresión de la proteína E-caderina, dicha disminución es revertida por el uso del TAM.<sup>21</sup> La disminución en la expresión de la E-caderina puede contribuir a la metástasis.<sup>14,17,21</sup> En el presente trabajo fue determinado el efecto del E2 y TAM en las líneas celulares RE $\alpha$  positivo Hela, CaLo y SW480, debido a que no se han encontrado reportes al respecto.

La expresión de la E-caderina se mantiene en todos los tejidos epiteliales pero durante el proceso de transición de células epiteliales a células mesenquimales (llamado



EMT, por sus siglas en inglés) se presenta la pérdida o disminución de la expresión de la E-caderina y la expresión aumentada de N-caderina, esta transición ha sido observada durante la progresión del tumor en la mayoría de los carcinomas epiteliales. En células epiteliales la E-caderina suprime la motilidad mientras que la N-caderina parece tener un efecto dominante sobre dicha motilidad de las células tumorales aun en presencia de E-caderina cuando esta última se encuentra en niveles bajos.<sup>75,81,93</sup>

Las células tumorales epiteliales que expresan N-caderina tienden a ser mas agresivas que las células que expresan E-caderina.<sup>23</sup> En ensayos “in vitro” se ha observado que tras la transfección con E-caderina las células invasivas se convierten a un fenotipo no invasivo, lo anterior es debido a que se suprime su motilidad.<sup>81</sup>

En las líneas celulares de carcinoma cervical como SiHa, C-33 y HeLa la expresión de E-caderina es mínima, mientras que en las líneas celulares Caski, ME-180 y HT-3 expresan mayor cantidad de E-caderina en comparación con las anteriores.<sup>73</sup> Las células HeLa casi exclusivamente expresan N-caderina, mientras que otras líneas celulares expresan por lo menos dos o tres diferentes caderinas en niveles comparables.<sup>74,80</sup>

Mediante inmunohistoquímica determinamos que en la línea celular HeLa hay muy poca expresión de E-caderina, tal como se señaló con anterioridad y ni el E2 ni el TAM regulan dicha expresión porque no se vio modificada con E2 y TAM a ningún tiempo.

Nuestros resultados sugieren que la línea celular HeLa es RE $\alpha$  positivo y que ni el E2 ni el TAM ejercen algún efecto en su proliferación, estos resultados contrastan con lo reportado ya que se ha sugerido que en células HeLa cuando son tratadas a concentraciones de 10-20  $\mu$ M de E2 y TAM se induce apoptosis, mientras que a concentraciones menores de las antes mencionadas el E2 y el TAM producen un estímulo la proliferación celular.<sup>59</sup> Esta diferencia en los resultados podría deberse a que la línea se ha desensibilizado a los estrógenos, posiblemente por su manipulación en el laboratorio y a lo vieja que es la línea ya que cabe mencionar que fue la primera en ser aislada.

Con respecto a CaLo los datos mostrados sugieren un aumento en la expresión de E-caderina inducida por el E2, E2 mas TAM y TAM, el máximo efecto en la regulación de la expresión se presentó a las 12 horas de tratamiento, donde no hubo diferencia significativa entre los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM, no así cuando fueron comparados con las células control, de tal manera que nuestros resultados sugieren que a este tiempo el E2 y el TAM podrían estar actuando como agonistas del RE y que por lo tanto los dos inducen un aumento en la expresión de la E-caderina.

A las 24 horas de tratamiento con E2 mas TAM en la línea celular CaLo hubo un aumento significativo en la expresión de E-caderina con respecto a los otros tratamientos (gráfica 4), dicho efecto podría deberse a que el E2 y el TAM aún seguían en competencia por su unión al RE, por lo que se observó una expresión aumentada de la proteína E-caderina comparada con los otros tratamientos, las células tratadas con E2 ya no presentan diferencia significativa con las células control.

Se ha reportado que el aumento del contacto físico entre las células también aumenta la expresión de la E-caderina,<sup>95</sup> de acuerdo con los resultados obtenidos la proliferación celular de la línea CaLo se vio ligeramente aumentada en las células tratadas con E2, E2 mas TAM y TAM; sin embargo, se piensa que el incremento en la expresión de la proteína no se debe al aumento de la confluencia, en la figura 2 se puede observar que en las células control hay mayor confluencia y contacto físico que en las células tratadas con E2, E2 más TAM y TAM, a pesar de ello la inmunorreactividad se ve significativamente aumentada en los tratamientos aún en células separadas unas de las otras. Así pues sugerimos que el aumento en la expresión de la E-caderina es debido a los tratamientos y no al contacto físico entre las células.

En un estudio realizado en México se ha reportado que en epitelio escamoso normal de cérvix fue observada una homogénea pero débil tinción citoplasmática y con una intensa reactividad en los bordes célula-célula en un análisis de expresión de la E-caderina. Un decremento o pérdida en la expresión de la E-caderina es un hallazgo común en muchos cánceres epiteliales humanos, incluyendo el cáncer cervical,<sup>72</sup> y como ya se ha señalado

con anterioridad podría deberse al proceso de transformación de células epiteliales a células mesenquimales.

En células de lesión intraepitelial escamosa y tumores invasivos, la E-caderina fue observada en la membrana plasmática y en el citoplasma. Una reducción en los niveles de proteína en la membrana se hicieron evidentes al reportar una reducción de hasta un 45 %. Esta reducción provoca un decremento en la adhesión celular normalmente observado en cáncer cervical y lesiones intraepiteliales.<sup>72</sup> En la línea CaLo se observó al tratamiento con E2, E2 mas TAM y TAM un claro aumento en la localización citoplasmática de la proteína E-caderina en comparación con el control. Cabe mencionar que en las células control a pesar de que el campo seleccionado es confluyente no se observa una localización de la E-caderina en la membrana citoplasmática mientras que en la figura 4B se presenta una imagen de células tratadas con E2 por 6 horas donde se hace evidente la localización de la proteína en la membrana citoplasmática, lo anterior puede deberse al aumento en la expresión de la proteína por lo que aumenta también su localización membranal.

En carcinoma colorrectal ha sido reportada una reducción del 57 % en la expresión de la E-caderina.<sup>72</sup> La línea SW480 tiene una ligera expresión endógena de E-caderina<sup>71</sup> y los niveles de expresión de esta proteína son menores a los detectados en otras líneas celulares derivadas de colon como son HT29 y HCT116.<sup>69</sup> En contraste ha sido sugerido que la E-caderina y las cateninas están altamente expresadas en líneas celulares de carcinoma colorrectal.<sup>70</sup>

En la línea celular SW480 los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM aumentaron la expresión de E-caderina y el máximo efecto se observó a las 6 horas con un incremento en la expresión de la proteína en las células tratadas con E2 de 5.79 % comparadas con las células control. El efecto del E2 no es revertido por el TAM en el tratamiento simultaneo con ambos y a las 6 horas no hay diferencia significativa entre los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM. Por lo que el E2 y el TAM parecen ser agonistas del RE en la línea celular SW480.

En líneas celulares de cáncer de colon como SW480 y SW620 se ha reportado que el contacto físico célula-célula parece tener un papel muy importante en el reclutamiento de la E-caderina a la membrana celular y que el complejo E-caderina/cateninas es el responsable de la estabilización de la adhesión célula-célula, se ha visto además que las células libres nunca parecen exhibir una localización membranal de la proteína E-caderina.<sup>70</sup> Por otra parte, se ha reportado que en células separadas se expresan muy bajos niveles de E-caderina y en cultivos densos, es decir con buena confluencia celular, aumentan los niveles de E-caderina, por lo tanto se ha sugerido que el contacto entre las células es el responsable de este efecto.<sup>95</sup> Las células expuestas a los diferentes tratamientos se muestran en la figura 3; tal como se puede observar en las células control la localización de la E-caderina es principalmente citoplasmática, no así en las células tratadas con E2, E2 mas TAM y TAM, donde es notorio un aumento en la expresión de la proteína y mayor localización en la membrana plasmática. Nuestros resultados sugieren que el aumento en la expresión de la E-caderina no se debe a que las células se encuentran juntas, ya que como se aprecia en la figura 3, en los cuatro tratamientos las células tienen contacto físico y es evidente el aumento de la inmunorreacción en las células tratadas a diferencia de las células control.

La línea celular SW480 es APC mutante,<sup>23,70</sup> al ser transfectada con construcciones de E-caderina se inhibe la señalización  $\beta$ -catenina-TCF y el crecimiento celular es suprimido.<sup>44</sup> La E-caderina tiene actividad supresora del crecimiento en SW480 mediada por la inhibición de la expresión de genes blanco dependientes de  $\beta$ -catenina-TCF.<sup>69</sup> Nuestros resultados sugieren que hay un ligero incremento en la proliferación de las células tratadas con los tratamientos con E2, E2 mas TAM y TAM al ser comparadas con el control, probablemente el aumento en la expresión de la E-caderina no fue suficiente para inhibir por completo la señalización  $\beta$ -catenina-TCF; también sugieren que, SW480 es RE $\alpha$  positivo y se ha reportado que en células RE $\alpha$  positivo los tratamientos con E2 aumentan la proliferación celular en cáncer de mama RE $\alpha$  positivo,<sup>29,32,44</sup> el efecto observado en la proliferación pudo deberse a lo antes mencionado; es decir, que el E2 y el TAM induzcan aumento en la proliferación de la línea celular SW480 por contener una expresión alta de RE $\alpha$ .

## **CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES**

En general las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480 presentaron mayor inmunorreactividad por el RE $\alpha$  y en menor grado por el RE $\beta$ . Por lo que se puede concluir que las 3 líneas celulares son RE $\alpha$  positivo, siendo HeLa la línea que expresa el mayor nivel de RE $\alpha$  y SW480 la línea que expresa mayores niveles de RE $\beta$ .

Los niveles de expresión de la proteína E-caderina parecen estar aumentados por el E2 en las líneas celulares CaLo y SW480, este efecto no es revertido por el TAM. El TAM en SW480 y CaLo parece actuar como un agonista del RE porque al igual que el E2 incrementa la expresión de la proteína de adhesión E-caderina.

En CaLo y SW480 la E-caderina parece localizarse principalmente en el citoplasma en las células control y al aumentar la expresión de la E-caderina también se detecta mayor localización en la membrana plasmática de la proteína.

En la línea celular HeLa no parece haber regulación por estrógenos en la expresión de la E-caderina; la localización de esta proteína parece ser principalmente citoplasmática.

Debido a la diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo para las líneas celulares HeLa, CaLo y SW480, y lo reportado para las células de mama MCF-7 podemos sugerir que la regulación de la E-caderina por el E2 es tejido específica.

## **CAPÍTULO 11. PERSPECTIVAS**

Evaluar si la expresión de E-caderina está relacionada con una disminución de la metástasis en modelos “in vivo”. Por ejemplo en ratones desnudos infectados con células tumorales y tratados con E2.

## CAPÍTULO 12. REFERENCIAS

1. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. España. <http://www.cnio.es/index.asp>.
2. Jun Yokota. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*.2000;21:497-503.
3. Peter K. Vogth. *Cancer Genes*. West J. Med.1993;158:273-278.
4. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/>
5. Franziska Michor, Yoh Iwasa, Christoph Lengauer, Martin A. Nowak. . Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15:484-493.
6. Jose Manuel Ramírez-Rodríguez y Vicente Aguilera-Diago. Local recurrence in colon and rectal cancer. *Cirugia Española*. 2005;78(6):344-50.
7. M. Dietel, M.A. Lewis y S. Shapiro. Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Human Reproduction*. 2005; 20:2052-2060.
8. Torres Lobaton A, Rojo Herrera G, Torres Rojo A, Hurtado Estrada G, Roman Bassaure E. Cervical cancer. Current view of its epidemiology and risk factors. *Ginecología y obstetricia de México*.2004;72:466-74.
9. Charles A. Leath III, J. Michael Straughn Jr., Tyler O. Kirby, Adam Huggins, Edward E. Partridge y Groesbeck P. Parham. Predictors of outcomes for women with cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*.2005;99:432-436.
10. Marc Mereel y Ancy Leroy. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiological Reviews*.2003;83:337-376.
11. Elisa C. Woodhouse, Rodrigo F. Chuaqui y Lance A. Liotta.. General Mechanisms of Metastasis. *Cancer*. 1997;80:1529-1537.
12. T. Meyer e I.R. Hart. Mechanisms of Tumour Metastasis. *European Journal of Cancer*.1998;34(2):214-221.
13. Alphas. Yap, William M. Briehner y Barry M. Gumbiner. Molecular and Functional Analysis of Cadherin-Based Adherens Junction. *Annual Reviews Cell Dev. Biol*. 1997;13:119-146.
14. Marita Goodwin y Alpha S. Yap. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cells adhesion, signaling and the cytoskeleton. *Journal of molecular Histology*. 2004;35:839-844.
15. Barry M. Gumbiner. Regulation of Cadherin-mediated Adhesion on Morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6: 622-634.
16. Sophie Chappuis-Flament, Ellen Wong, Les D. Hicks, Cyril M. Kay y Barry M. Gumbiner. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding an adhesion. *The Journal of Cell Biology*. 2001;154:231-243.
17. D.B. Ivanov, M.P. Philippova y V.A. Tkachuk. Structure and Functions of Classical Cadherins. *Biochemistry*.2001;66(10):1174-1186.
18. A. W. Koch, K.L. Manzur y W. Shan. Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61:1884-1895.
19. J.R. Alattia, H. Kurokawa y M. Ikura. Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999;55:359-367.
20. I.R.G. Beavon. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis structure, function an regulation. *European Journal of Cancer*.2000;36:1607-1620.

21. Steffi Oesterreich et al. Estrogen-mediated Down-Regulation of E-cadherin in Breast Cancer Cells. *Cancer Research*.2003;63:5203-5208.
22. Margaret J. Wheelock y Keith R. Johnson. Cadherin-mediated cellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*.2003;15:509-514.
23. Margaret J. Wheeloc y Reith R. Johnson. Cadherin-mediated cellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;5:509-514.
24. W. James Nelson y Roel Nusse. Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and Cadherin Pathways. *Science*.2004;303 :1483-1487.
25. Catriona Y. Logan y Roel Nusse. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annual review of cell and developmental biology*.2004;20:781-810.
26. C.Scully, J-V Bagan, M.black, M. carrozzo, D. Eisen, M. Escudier, P. Farthing, R. Kuffer, L. Lo Muzio, M. Mignogna y S.R. Porter. Epithelial biology. *Oral Diseases*.2005;11:58-71.
27. Sunit Telapatra y Craig B. Thompson. Growth Factor Signaling in Cell Survival : Implications for Cancer Treatment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;298:873-878.
28. Danette L. Daniels, Katharine Eklof Spink y William I. Weis.  $\beta$ -catenin: molecular plasticity and drug design. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001.26(11):672-678
29. Elizabeth Anderson y Robert B. Clarke. Steroid Receptors and Cell Cycle in Normal Mammary Epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.2004;7:3-13.
30. A. Bardin, N. Boulle, G. Lazennec, F. Vignon y P. Pujol. Loss of ER $\beta$  expression as a common sep in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer*.2004;11:537-551.
31. Gary C. Sieck. Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91:1860-1867.
32. Stefan Nilsson y Jan-Åke Gustafsson. Estrogen receptor transcription an transactivation Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Reserch*.2000;2:360-366.
33. Jason Matthews y Jan-Åke Gustafsson. Estrogen Signaling: A Subtle Balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Molecular interventions*.2003;3:281-292.
34. Michaela Luconi, Gianni Forti y Elisabetta Baldi. Genomic an nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*.2002;80:369-381.
35. Alejandro D. Teppa Garran y José Terán Dávila. Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos. *Ginecol obstet Mex*.2005;73:436-442.
36. Benita S. Katzenellenbogen and John A. Katzenellenbogen. Estrogen receptor transcription y transactivation Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Reserch*.2000;2:335-344.
37. Karen J. Ho y James K. Liao. Nonnuclear Actions of Estrogen. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.2002;22:1952-1961.
38. Benita S. Katzenellebogen et al. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*.2000;74:279-285.



39. IHL Hamelers y PH Steenbergh. Interactions between estrogen and insulin-like growth factor signaling pathways in human breast tumor cells. *Endocrine-Related Cancer*.2003;10:331-345.
40. Stephanie Sommer y Suzanne A. W. Fuqua. Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*.2001;11:339-352.
41. Linda R. Nelson y Serdar E. Bulun. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* .2001;45(3):S116-S124.
42. Gianna Fiorelli, Lucia Picariello, Valentina Martineti, Francesco Tonelli y Maria Luisa Brandi. Functional Estrogen Receptor  $\beta$  in Colon Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;261:521-527.
43. Alison J. Butt, Catriona M. McNeil, Elizabeth A. Musgrove y Robert L. Sutherland. Downstream targets of growth factor and oestrogen signaling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-Related Cancer*. 2005;12:S47-S59.
44. Jose Russo e Irma H. Russo. Genotoxicity of steroidal estrogens. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*.2004;15:211:214.
45. Emely Castro-Rivera y Stephen Safe.  $17\beta$ -Estradiol- and 4-hydroxytamoxifen-induced transactivation in breast, endometrial an liver cancer cells is dependent on ER-subtype, cell an promoter context. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003;84:23-31.
46. Andrew C. B. Cato, Andrea Nestl y Sigrun Mink. Rapid Actions of steroid Receptors in Cellular Signaling Pathways. *Science's STKE [electronic resource] : signal transduction knowledge environment*. 2002.
47. M. Beato y J. Klug. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*. 2000;6(3):225-236.
48. Alistair Ring y Mitch Dowsett. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*.2004;11:643658.
49. P.A. Konstantinopoulos, A. Kominea, G. VANDOROS, G.P. Sykiotis, P. Andicopoulos, I. Varakis, G. Sotiropoulou- Bonikou y A.G. Papavassiliou. Oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer*. 2003;39:1251-1258.
50. Raegan O'Lone, Martin C. Frith, Elinor K. Karlsson y Ulla Hansen. Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. *Molecular Endocrinology*.2004;18:1859-1875.
51. Tommaso Simoncini, Paolo Mannella, Letizia Fornari, Antonella Caruso, Gaetano Varone y Andrea Ricardo Genazzani. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids*.2004;69:537-542.
52. Tommaso Simoncini y Andrea R. Gennazzani. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology*. 2003;148:281-292.
53. Jonathan G. Moggs y George Orphanides. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *European Molecular Biology Organization*. 2001;21:775-781.
54. Margaret A. Shupnik. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene*. 2004;23:7979-7989.
55. Deborah A. Laningan. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*.2003;68:1-9.

56. J.S. Lewis, C. Osipo, K. Meeke, V.C. Jordan. Estrogen-induced apoptosis in a breast cancer model resistant to long-term estrogen withdrawal. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*.2005;94:131-141.
57. Ashby J. Morrison, Rafael E. Herrera, Ester Coronado Heinsohn, Rachel Schiff y C. Kent Osborne. Dominant-Negative Nuclear Receptor Corepressor Relieves Transcriptional Inhibition of Retinoic Acid Receptor But Does Not Alter the Agonist/Antagonist Activities of the Tamoxifen-Bound Estrogen Receptor. *Molecular Endocrinology*.2001;17(8):1543-1554.
58. Robert Clarke et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signalin. *Oncogene*.2003;22 :7316-7339.
59. Maria Obrero, David V. Yu y David J. Shapiro. Estrogen Receptor-dependent and Estrogen Receptor-independent Pathways for Tamoxifen and 4-hidroxitamoxifen-induced Programmed Cell Death. *The journal of Biological Chemistry*. 2002;277(47):45695-45703.
60. Meng Kian Tee, Inez Rogatsky, Christina Tzagarakis-Foster Alexandra Cvoro, Jinping An, Robert J. Christy, Keith R. Yamamoto y Dale C. Leitman. Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Gene With Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15:1262-1272.
61. Herjan J.T. Coelingh Bennink. Are all estrogens the same?. *Maturitas*.2004;47:269-275.
62. E.R. Simpson. Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003;86:225-230.
63. Sonia Somaï, Marc Chaouat, Denis Jacob, Jean-Yves Perrot, William Rostène, Patricia Forgez y Anne Gompel. Antiestrogens are pro-apoptotic in normal human breast epithelial cells. *International Journal Cancer*.2003;105:607-612.
64. Bradley J. Van Voorhis. Genitourinary symptoms in the menopausal transition. *The American Journal of Medicine*.2005;118:475-535.
65. Eugene F.Foley and al. Selective Loss of Estrogen Receptor  $\beta$  in Malignant Human Colon. *Cancer Research*.2004;60:245-248.
66. Martha Campbell-Thompson, I. Jeanette Lynch y Bhavna Bhardwaj. Expression of Estrogen Receptor (ER) Subtypes an ER $\beta$  Isoforms in Colon Cancer. *Cancer Research*.2001;61:632-640.
67. Gianna Fiorelli et al. Functional Estrogen Receptor  $\beta$  in Colon Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999.261:521-527.
68. ATTC, Catalogue of Cell lines an hybridomas, 7a ed. Rockville, Maryland, 1992;4:122.
69. Cara J. Gottardi, Ellen Wong y Barry M. Gumbiner. E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting  $\beta$ -Catenin Signaling in an Adhesion-independent Manner. *The Journal of Cell Biology*. 2001;153(5):1049-1059.
70. Mona El-Bahrawy, S. Richard Poulson, Andrew J. Rowan, Ian T. Tomlinson y Malcolm R. Alison. Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Experimental Pathology*.2004;85 :65-74.
71. Alice S.T. Wong y Barry M. Gumbiner. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *The Journal of Cell Biology*. 2003;161(6):1191-1203.

72. María Alexandra Rodríguez-Sastre, Leticia González-Maya, Ricardo Delgado, Marcela Lizano, Gerardo Tsubaki, Alejandro Mohar y Alejandro García-Carrancá. Abnormal distribution of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*.2005;97:330-336.
73. Hye-Sung Moon, Eun-Ah Choi, Hae-Young Park, Jung-Youn Choi, Hye-Won Chung, Jong-Il Kim y Won I. Park. Expression and Tyrosine Phosphorylation of E-Cadherin,  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin, and Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*.2001;81:355-359.
74. Hajime Yano, Yuichi Mazaki, Kazuo Kurokawa, Steven K. Hanks, Michiyuki Matsuda y Hisataka Sabe. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*.2004;166(2):283-295.
75. James K. Wahl, Young J. Kim, Janet M. Cullen, Keith R. Johnson y Margaret J. Wheelock. N-cadherin-Catenin Complexes Form Prior to Cleavage of the Proregion and Transport to the Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*.2003;278(19):17269-17276.
76. P.L. Pearson y R.B. Van Der Luijt. The genetic analysis of cancer. *Journal of Internal Medicine*.1998;243:413-417.
77. Takako Sakamoto, Hidetaka Eguchi, Yoko Omoto, Takuya Ayabe, hiroyuki Mori y Sin-ichi Hayashi. Estrogen receptor-mediated effects of tamoxifen on human endometrial cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*.2002;192:93-104.
78. Screenivasan Paruthiyil, Hema Parmar, Vaishali Kerekatte, Gerald R. Cunha, Gary L. Firestone y Dale C. Leitman. Estrogen Receptor  $\beta$  inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation y Tumor Formation by Causing a G<sub>2</sub> Cell Cycle Arrest. *Cancer Research*.2004;64:423-428.
79. Margie L. Clapper, Jacques Coudry y Wen-Chi L. Chang.  $\beta$ -catenin-mediated signaling: a molecular target for early chemopreventive intervention. *Mutation Research*.2004;555 :97-105.
80. Mireille Serres, Odile Filhol, Heiko Lichert, Christophe Grangeasse, Edmond M. Chambaz, Jorg Steppert, Claude Vincent y Daniel Schmitt. The disruption of Adherens Junctions is Associated with a Decrease of E-Cadherin Phosphorylation by Protein Kinase CK2. *Experimental Cell Research*. 2000;257:255-264.
81. Joe-Beom Kim, Shahidul Islam, Young J. Dim, Ryan S. Prudoff, Kristin M. Sass, Margaret J. Wheelock y Keith R. Johnson. N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epitelial to Mesenchymal Transition an Increased Motility. *The Journal of Cell Biology*. 2000;151:1193-1205.
82. Robert W-D. Song, Zhenguo Shang y Richard J. Santen. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER $\alpha$  and Src. *TRENDS in Endocrinology an Metabolism*.2005;16(8): 347:353.
83. Boris J. Cheskis. Regulation of Cell Signaling Cascades by Steroid Hormones. *Journal of Cellular Biochemistry*.2004;93 :20-27.
84. Ellis R. Levin. Integration of the extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Molecular Endocrinology*.2005;19(8) :1951-1959.
85. Marie A. Bogoyevitch y Naomi W. Court. Counting on mitogen-activated protein kinases-ERKs 3,4,5,6,7 and 8. *Cellular Signalling*.2004;16:1345-1354.

86. Philippe P. Roux y John Blenis. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Review*.2004;68(2):320-344.
87. Yasuto Taguchi, Mirek Koslowski y Donald L. Bodenner. Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA). *Nuclear Receptor*.2004,2:5
88. G.P. Skliris, P.J. Carder, M.R.J. Lansdown y V. Speirs. Immunohistochemical detection of ER $\beta$  in breast cancer: towards more detailed receptor profiling?. *British Journal of Cancer*.2001;84(8):1095-1098.
89. Stavroula Droufakou, Vinay Deshmane, Rebecca Roylance, Andrew Hanby, Ian Tomlinson e Ian R. Hart. Multiple ways of silencing e-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *International journal of Cancer*.2001;92:404-408.
90. Y. Gong, X. Sun, L. Huo, E.L.Wiley y M.S. Rao. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Histopathology*.2005;46:24-30.
91. Alexandran Schambony, Martin Kunz y Dietmar Gradl. Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation*. 2004;72:307-318.
92. V. Duong, A Licznar, R. Margueron, N. Boulle, M. Busson, M. Lacroix, BS Katzenellenbogen, V Cavailles y G. Lazennec. ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors. *Oncogene*. 2005.1-8.
93. Héctor Peinado, Francisco Portillo y Amparo Cano. Transcriptional Regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2004;48:365-375.
94. Hiroyoshi Sato, Satoko Nishida, Hiroko Tomyori, Masao Sato, Ikuo Ikeda y Katsumi Imaizumi. Oxysterol Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  -Mediated Gene Expression in a Transcriptional Activation Assay System Using HeLa Cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2004;68:1790-1793.
95. Maralice Conacci-Sorrell, Inbal Simcha, Tamar Ben-Yedidia, Janna Blechman, Pierre Savagner y Avri Ben-Ze'ev. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of  $\beta$ -catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of Cell Biology*. 2003;163(4):847-857.
96. Karen M. Hajra, David Y-S. Chen y Eric R. Fearon. The SLUG Zinc-Finger Protein Repress E-cadherin in Breast Cancer. *Cancer Research* .2002;62:1613-1618.
96. Yan-Nan Liu, Wen-Wen Lee, Chun-Yi Wang, Tung-Hui Chao, Yvan Chen y Ji Hshiang Chen. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*. 2005;24:8277-8290.