



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

*Estudio de la proteína mal en el tránsito celular de
MUC1-C en líneas celulares de cáncer pulmonar*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

MÓNICA FLORES TORRES

ASESOR

DR. ANTONIO ROBERTO DE JESUS LARA LEMUS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estudio de la proteína MAL en el tránsito celular de MUC1-C en líneas celulares de cáncer pulmonar.

Que presenta la pasante: **Mónica Flores Torres**
Con número de cuenta: **407095263** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Antonio Roberto de Jesús Lara Lemus	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Al Dr. Roberto Lara Lemus, por su tiempo y esfuerzo dedicado a mi enseñanza y formación como investigador, además de su minuciosa revisión del trabajo.

A la M. en C. Ana Karina Saldaña Villa, por sus aportaciones, enseñanza, tiempo y apoyo incondicional en el trabajo.

A la Dra. Patricia Sofía Gorocica Rosete, por haberme brindado el espacio para poder realizar mi trabajo.

Al Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García, por su revisión de la tesis.

DEDICATORIA

A mis papás, José Manuel Flores Pérez y Margarita Torres Huerta, por su apoyo incondicional, su amor, por escucharme, darme fuerza para seguir adelante y estar siempre a mi lado.

A mi hermano, Juan Manuel Flores Torres, por siempre sacarme una sonrisa, creer en mí y apoyarme en lo que pueda.

A mi novio, Rafael Saucedo Pérez Arce, por ayudarme en todo momento de mi vida, creer y confiar siempre en mí y brindarme amor a manos llenas e incondicionalmente.

A todos mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, especialmente a Kari Saldaña por brindarme su amistad, darme confianza, consejos y apoyo incondicional.

A la Sra. Dolores Pérez Arce Ibarra, por su apoyo y confianza que me ha brindado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS	7
ABREVIATURAS	8
1.- INTRODUCCIÓN	10
1.1.- CARCINOGENÉNESIS	10
1.1.1. EL CICLO CELULAR Y LA REGULACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR	10
1.2.- TIPOS DE CÁNCER	13
1.2.1. CARCINOMAS	13
1.2.2. SARCOMAS	13
1.2.3. LEUCEMIAS Y LINFOMAS	14
1.3.- ETAPAS DE LA CARCINOGENÉNESIS	14
1.3.1.- INICIACIÓN	15
1.3.2.- PROMOCIÓN	16
1.3.3.- PROGRESIÓN	16
1.4.- CÁNCER Y TIPOS DE CARCINÓGENOS	17
1.4.1.- CARCINÓGENOS GENOTÓXICOS	18
1.4.2.- CARCINÓGENOS ENDÓGENOS	18
1.4.3.- CARCINÓGENOS EXÓGENOS	19
1.4.4.- CARCINÓGENOS NO GENOTÓXICOS O EPIGENÉTICOS	19
1.5.- EL CÁNCER PULMONAR	21
1.5.1.- ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	23
1.6.- MUC1	23
1.6.1.- LAS MUCINAS HUMANAS	23
1.6.2.- MUC1 Y EL CÁNCER	23
1.6.3.- ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE MUC1	24
1.6.4.- SUBUNIDAD α (MUC1-N)	25
1.6.5.- SUBUNIDAD β (MUC1-C)	27
1.6.6.- EXPRESIÓN DE MUC1 EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR	30
1.7.- MEMBRANA PLASMÁTICA Y BALSAS LIPÍDICAS (GEM)	31
1.7.1.- PROTEÍNAS ASOCIADAS A GEM	35
1.8.- PROTEÍNA MAL	36
2.- JUSTIFICACIÓN	37
3.- OBJETIVOS	38
3.1.- OBJETIVO GENERAL	38
3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES	38
4.- HIPÓTESIS	38

5.- MATERIALES Y MÉTODOS_____	39
5.1.- LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR_____	39
5.2.- PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES_____	40
5.2.1.- ELECTROFORESIS EN AGAROSA_____	41
5.3.- INMUNOPRECIPITACIÓN_____	41
5.3.1.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA_	42
5.4.- FRACCIONAMIENTO CELULAR: MÉTODO REAP, Y FRACCIONAMIENTO BASADO EN SOLUBILIDAD EN DETERGENTES_	42
5.5.- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA_____	43
5.6.- ELECTROFORESIS E INMUNOTRANSFERENCIAS TIPO WESTERN_	43
6.- RESULTADOS_____	45
6.1.- PLÁSMIDOS_____	45
6.2.- EXPRESIÓN ENDÓGENA DE MAL EN CÉLULAS HCC827_____	45
6.3.- EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MUC1-C EN CÉLULAS HCC827 Y HEK293_____	46
6.4.- CÉLULAS HEK293 TRANSFECTADAS CON MUC1_____	47
6.5.- LA SOBREENEXPRESIÓN DE MAL DISMINUYE LA CANTIDAD DE MUC1-C EN EL NÚCLEO, TANTO EN CÉLULAS HCC827 COMO EN HEK293/MUC1_____	49
6.6.- INMUNOPRECIPITACIÓN CON ANTICUERPO ANTI-B-CATENINA E IET DE FRACCIONES SUBCELULARES DE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON MAL Y SUS CONTROLES_____	51
7.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS_____	52
8.- CONCLUSIONES_____	55
9.- PERSPECTIVAS_____	56
10.- REFERENCIAS_____	57

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura 1.- Fases del ciclo celular _____	11
Figura 2.- Representación esquemática de la evolución espontánea de un cáncer estándar ___	15
Tabla 1.- Tasa de mortalidad por principales tumores malignos _____	22
Figura 3.- Mucina transmembranal _____	25
Figura 4.- Subunidad MUC1-C _____	29
Figura 5.- Modelo de la estructura de la membrana plasmática _____	32
Figura 6.- Modelo de la estructura de los GEM _____	33
Figura 7.- Modelos de formación de vesículas de transporte _____	34
Figura 8.- Células HCC827 _____	39
Figura 9.- Células HEK293 _____	40
Figura 10.- Electroforesis en agarosa _____	45
Figura 11.- IET de células HCC827 y HEK293 _____	46
Figura 12.- IET de células HCC827 _____	47
Figura 13.- IET de células HEK293 _____	47
Figura 14.- IFI de células HCC827 y HEK293-MUC1 _____	48
Figura 15.- IFI de células HEK293-MUC1 transfectadas con MAL-GFP _____	48
Figura 16.- IET de células HCC827 nativas y transfectadas con MAL-GFP _____	49
Figura 17.- IET de células HEK293 nativas y transfectadas con MAL _____	49
Gráfica 1.- Porcentaje de expresión de MAL (Gel Analyzer 2010) _____	50
Figura 18.- Inmunoprecipitación de células HEK293 _____	51

ABREVIATURAS

- INEGI.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- NSCLC.- Cáncer pulmonar de células no pequeñas (del inglés Non-Small Cells Lung Cancer)
- SCLC.- Cáncer pulmonar de células pequeñas (del inglés Small Cells Lung Cancer)
- MUC1.- Proteína tipo mucina 1
- MUC1-N.- Proteína tipo mucina 1, subunidad extracelular
- MUC1-C.- Proteína tipo mucina 1, subunidad citoplásmica
- VNTR.- Número de repetición en tándem (del inglés Variable Number Tandem Repetition)
- FDA.- Administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos de América (del inglés Food and Drug Administration)
- m-RNA.- Ácido Ribonucleico mensajero (del inglés messenger Ribonucleic Acid)
- c-DNA.- Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés complementary Deoxyribonucleic Acid)
- NCBI.- Centro Nacional para la Información en Biotecnología (del inglés National Center for Biotechnology Information)
- RefSeq.- Base de Datos de Secuencias de Referencia del NCBI
- MUC1-CD.- Dominio citoplásmico de MUC1-C
- RTK.- Familia de receptores cinasas de tirosina
- HER.- Receptor epidermal humano (del inglés Human Epidermal Receptor)
- HGFR.- Receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (del inglés Hepatocyte Growth Factor Receptor)
- EGFR.- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (ErB-1 o HER1)
- GRB2.- Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento (del inglés Growth factor receptor-bound protein 2)
- PKCd.- Proteína cinasa C tipo delta (del inglés Protein Kinase C, delta type)
- Src.- Familia de proteínas tirosina cinasa (del inglés Stored Response chain)
- GSK3b.- Glicógeno sintasa cinasa 3 beta (del inglés Glycogen Synthase Kinase 3 beta)
- CTGF.- Factor de crecimiento de tejido conectivo (del inglés connective tissue growth factor)
- GEM.- Complejo enriquecido en glicolípidos insolubles al detergente (del inglés detergent insoluble glycolipid-enriched complex)
- DIG.- Dominio rico en glicolípidos insolubles en detergentes.

MDCK.- Riñón canino Madin-Darby (del inglés Madin-Darby Canine Kidney)

TGN.- Red del trans-Golgi (del inglés Trans-Golgi Network)

Cav-1.- Caveolina 1

MAL.- Proteína de la mielina y linfocitos (del inglés Myelin and Lymphocyte Protein)

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

HCC827.- Células epiteliales humanas de pulmón, con crecimiento adherente

HEK 293.- Células embrionarias de riñón humano, número de clona 293 (del inglés Human Embryonic Kidney 293)

RPMI.- Medio Roswell Park Memorial Institute (del inglés Roswell Park Memorial Institute medium)

DMEM.- Medio de Eagle modificado de Dulbecco (del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

GFP.- Proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein)

IET.- Inmuno-electrotransferencia

CDK.- Cinasas dependientes de ciclina

PLK.- Cinasas tipo Polo

MAPK.- Cinasas activadas por mitógeno

OMS.- Organización Mundial de la Salud

OPS.- Organización Panamericana de la Salud

HMFG.- Glóbulo de grasa de leche humana

BCA.- Ácido bicinconánico

DNA.- Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic Acid)

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Carcinogénesis

1.1.1.- El Ciclo Celular y la regulación de la división celular

La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo. La regulación de la proliferación celular, del crecimiento y de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA), están controlados por la maquinaria de regulación del ciclo celular ⁽¹⁾ (***Fig. 1***).

Existen puntos de control que evitan la progresión del ciclo celular, por ejemplo, cuando ocurren daños en el DNA ⁽²⁾, la progresión del ciclo celular se detiene, dando tiempo para que la reparación se produzca de inmediato y así prevenir alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores. Consistentemente, los puntos de control proporcionan una barrera para el desarrollo del cáncer. ⁽³⁻⁵⁾

La progresión del ciclo celular es activada directamente por una serie de proteínas heterodiméricas representadas por las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDK). La decisión de una célula para entrar en fase S o de síntesis, que es cuando se duplica el genoma celular, está estrechamente controlada por el complejo ciclina D/CDK4/6 y los complejos ciclina E/CDK2, seguido del complejo ciclina A/CDK2 a lo largo de la fase S. ⁽⁶⁾

La progresión de la fase G1 a S también está regulada por la proteína Rb, que es una proteína supresora de tumor, particularmente alterada en el **retinoblastoma**. En el estado hipofosforilado, la proteína supresora de tumores Rb, está activa y lleva a cabo su función mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular, ⁽⁷⁾ bloqueando a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3a, que son esenciales para la expresión de genes que le darán continuidad al ciclo. ⁽⁸⁾

La proteína reguladora de la progresión del ciclo celular p21 es un inhibidor de CDK. La proteína p21 se une e inhibe la actividad de los complejos ciclina CDK2 o CDK1 y, por lo tanto, funciona como un regulador negativo de la progresión del ciclo celular en la transición G1 a S. La expresión del gen p21 está estrechamente controlada por la proteína p53. Esta proteína media la detención del ciclo celular en fase G1, en respuesta a una variedad de estímulos de estrés. ^(7,9,10)

El punto conocido como G₂/M ocurre antes de la división celular. En este punto se debe evitar el inicio de la mitosis, cuando el DNA ha sufrido algún daño durante G₁, S ó G₂; el estrés genotóxico activa a los sistemas ATM/ATR, que son cinasas de treonina y serina conduciendo a su vez a la fosforilación y activación de las cinasas CHK1 y CHK2, seguido de la fosforilación de Cdc25C. El sistema ATM/ATR también activa la vía de señales p53 que contribuye a mantener a las células en la fase G₂, al retener en el citoplasma mediante la proteína 14-3-3 a la cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1). En esta fase actúa el complejo ciclina B/CDK1 o MPF (promotor de la fase M), el cual es activado por la cinasa tipo Polo (PLK) y translocado al núcleo en prometafase coincidiendo con la desintegración de la membrana nuclear. La citocinesis es mediada por la ciclina B y es la fase en que se lleva a cabo la separación de las células hijas. Ésta ocurre sólo después del término de la mitosis, pues ambos procesos están vinculados espacial y molecularmente de una manera altamente precisa y no menos compleja. Cuando la ciclina B no es degradada por carecer de la secuencia de reconocimiento por el complejo APC, arresta a las células en anafase y no se procede a la citocinesis, marcando el final del ciclo celular. ⁽¹⁾

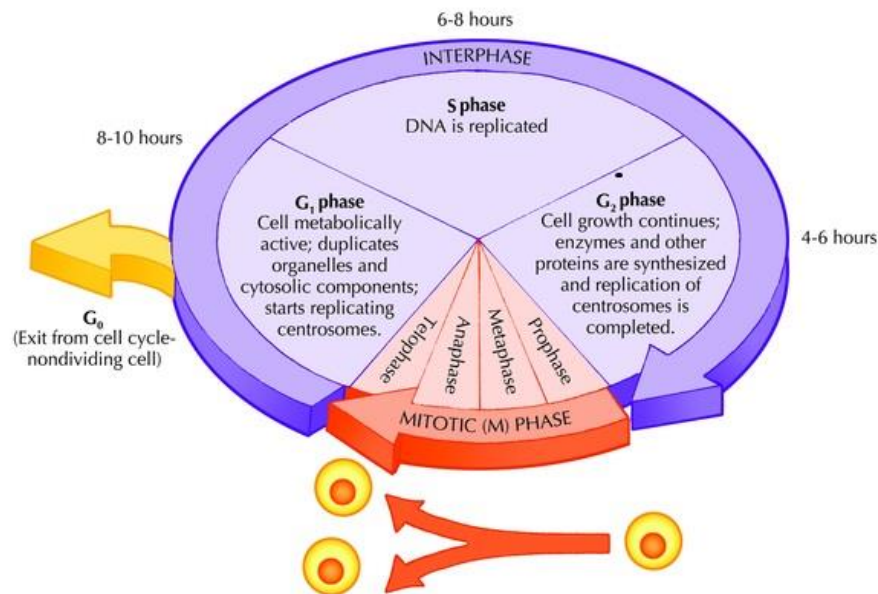


Figura 1.- Fases del ciclo celular ⁽¹⁾

Varios agentes empleados contra el cáncer se han contemplado para mediar la fase G2/M y generar detención del ciclo celular en las células cancerosas a través de varios mecanismos: regulación a la baja de los complejos de CDK1 y las ciclinas A/B, la inactivación de la actividad Cdc25C, la interrupción de la polimerización de tubulina y el montaje del huso. Un ejemplo de estos agentes se probó en las células A549 de adenocarcinoma tratadas con dioscoreanona, la cual indujo detención del ciclo celular en la fase G2/M, y un porcentaje de apoptosis mediada por las proteínas Bax y Bcl-2 por medio de la permeabilización de la membrana mitocondrial, conduciendo a la activación de la caspasa 3. ⁽¹²⁾

El sistema de p53 es sensible al estrés celular de fuentes externas tales como la radiación, que a menudo resulta en daño al DNA. Si el daño no es demasiado grave, la detención del ciclo celular inducida por p53 se produce mientras que se repara el DNA. Sin embargo, si el daño es grave, la célula es impulsada hacia la senescencia o la apoptosis inducida por p53, ya que ésta interacciona directamente con la endonucleasa AP y la DNA-polimerasa, que están implicados en la reparación por escisión. El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que regula el metabolismo, las señales de estrés, la supervivencia celular, el control del ciclo celular y la estabilidad del genoma.

Por otra parte, el proceso de regulación del ciclo celular desempeña un papel crítico en la oncogénesis y en el desarrollo de la resistencia terapéutica. Aunque la estimulación constitutiva de la proliferación celular, a través de factores de crecimiento normales, es necesaria para el desarrollo tumoral, es insuficiente para causar transformación oncogénica de células normales, ya que se requiere de la interacción de varios factores para desarrollar un tumor. ⁽¹³⁾

Las vías de señalización involucradas en proliferación son sistemas altamente dinámicos, con elementos reguladores positivos y negativos. Muchos de los elementos positivos son protooncogenes, que a menudo están mutados para convertirse en genes activos constitutivamente, originando los oncogenes encontrados en muchas células tumorales.

La célula presenta receptores de superficie para factores de crecimiento cuyo blanco principal son las ciclinas. Existen diferentes vías de señalización involucradas en proliferación que conducen a las células mediante la activación de los primeros eventos en G1. Entre estas vías de señalización se encuentra la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la vía JAK-STAT, mTOR, y Wnt, entre otras. ^(14,15)

La vía de señalización de Wnt actúa a través de β -catenina para aumentar el nivel del factor de transcripción Myc. El factor Myc aumenta la transcripción de la ciclina D, que es un componente inicial de la maquinaria de señalización del ciclo celular. ⁽¹⁴⁾

Se ha reportado que la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (STAT3) es importante en la inducción de la detención del ciclo celular en G1 a través de la supresión de la expresión de p21 y la degradación de la ciclina D141. Estos hallazgos sugieren que la vía de JAK/STAT juega un papel crucial en la regulación del ciclo celular. ⁽¹⁶⁾

Cuando las células envejecen inician una etapa de senescencia que posteriormente la llevará a su muerte. En caso de que la célula sufra daño al DNA, se inicia el proceso de apoptosis.

1.2.- Tipos de cáncer

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el órgano en el que se originan y con el tipo de células involucradas, habiéndose descrito muchas formas distintas aparentemente relacionadas con causas diferentes. ⁽¹⁷⁾ De acuerdo con el lugar en el que se producen, las diversas variedades se agrupan en:

1.2.1.- Carcinomas

Es una forma de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno. Los dos grandes grupos de carcinomas son los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas. Los carcinomas constituyen el tipo más común de cáncer. Lugares comunes de carcinomas son la piel, la boca, el pulmón, la mama, el tracto digestivo y el útero. ⁽¹⁸⁾

1.2.2.- Sarcomas

Derivan de estructuras de soporte como el tejido fibroso y vasos sanguíneos, son localmente agresivos mediante invasión y/o destrucción, recidivan y pueden dar metástasis a distancia. Sin embargo, no todos los sarcomas son igual de agresivos ni tienen la misma capacidad de dar metástasis, por lo que es importante entender el término sarcoma según el grado de diferenciación de la neoplasia. Generalmente un sarcoma bien diferenciado es de

bajo grado, y uno poco diferenciado suele ser de alto grado. Los de diferenciación intermedia suelen recidivar, pero rara vez dan metástasis. ⁽¹⁸⁾

1.2.3.- Leucemias y linfomas

Se generan a partir de células formadoras de sangre que residen en médula ósea y en tejidos linfáticos.

La principal diferencia entre estos tipos de cáncer es que las leucemias como la leucemia linfoblástica aguda afectan principalmente a la médula ósea y la sangre, y se puede propagar a otras partes del cuerpo, mientras que los linfomas afectan principalmente a los ganglios linfáticos u otros órganos, aunque también pueden afectar la médula ósea. ⁽¹⁸⁾

1.3.- Etapas de la carcinogénesis

Cuando un médico se encuentra ante un tumor, no observa más que un pequeño momento de la vida del proceso canceroso, el denominado periodo clínico. Este periodo, a su vez, puede ser subdividido en dos fases, una fase local, en la que el tumor se encuentra todavía localizado en las estructuras primarias afectadas, y una fase de generalización, en la que en ocasiones se produce la diseminación del tumor (aparición de metástasis).

Sea con una sola o con las dos subfases, este periodo puede ser asimilado a lo que representa la parte visible de un iceberg, que mantiene fuera de nuestra vista el periodo más largo, el que va desde la actuación de la causa hasta la emergencia clínica y que encierra el periodo precanceroso (iniciación, promoción y una parte más o menos importante de la progresión) ⁽¹⁹⁾ (**Fig. 2**).

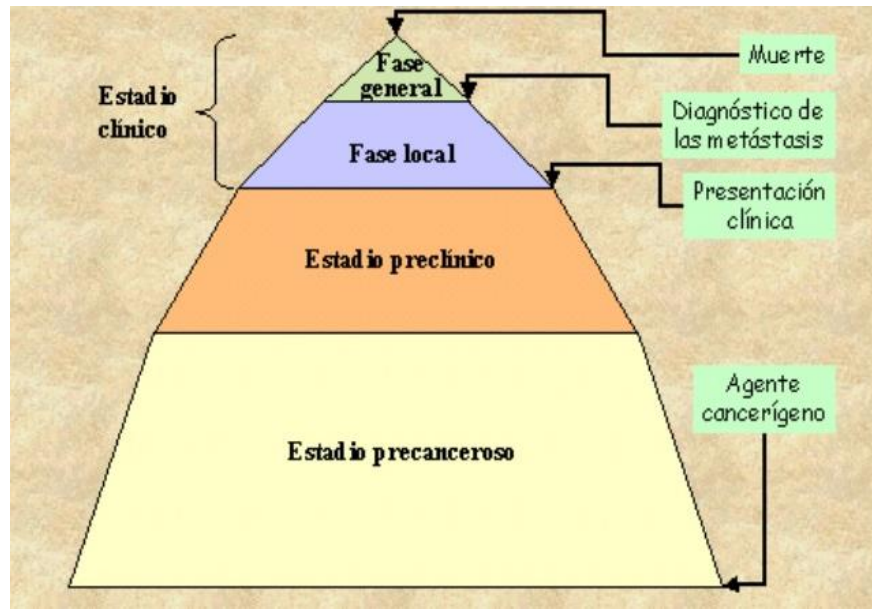


Figura 2.- Representación esquemática de la evolución espontánea de un cáncer estándar. ⁽¹⁸⁾

La primera etapa del proceso de la carcinogénesis, absolutamente preclínica y en una primera etapa precancerosa, consta de tres etapas principales:

1.3.1.- Iniciación

En este proceso inicial de alteración de una célula (a nivel del genoma de la misma), la alteración de cualquiera de sus tres principales procesos: metabolismo, reparación del DNA y proliferación celular, puede iniciar la carcinogénesis.

Al compuesto químico implicado en este proceso se le denomina agente iniciador o carcinógeno incompleto y es aquel que sólo es capaz de iniciar a las células. Este agente es muy escaso. Algunos de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la iniciación de la carcinogénesis son: mutaciones en el genoma como transiciones, pequeñas deleciones, mutaciones puntuales de protooncogenes y/o oncogenes y mutaciones en genes implicados en la transducción de señales celulares, las cuales pueden producir alteraciones fenotípicas.

Las características morfológicas y biológicas de este proceso son: irreversible, la célula afectada no se distingue morfológicamente de la célula normal, es necesario que se produzca al menos un ciclo celular completo con división de la misma para que se "fije" el daño inducido, la eficiencia del proceso de iniciación puede ser modulada por agentes exógenos y/o hormonas endógenas.

Es de destacar que la aparición de células iniciadas puede ser espontánea. En la mayor parte de los casos, la iniciación se desencadena por los agentes completos (aquellos capaces de inducir la iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis a partir de células normales), éstos son mucho más abundantes en nuestro medio que los incompletos. Las dosis necesarias de los carcinógenos completos para iniciar las células son muy bajas, pero no suficientes para que el proceso de carcinogénesis sea permanente. ⁽¹⁹⁾

1.3.2.- Promoción

El agente promotor se define como aquel compuesto químico capaz de causar la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares. Por lo tanto, su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada a través de receptores específicos.

Algunos mecanismos moleculares y celulares de esta etapa son: no hay alteraciones estructurales directas en el DNA y es reversible tanto a nivel de la expresión genética como a nivel celular.

Algunas características morfológicas y biológicas de este proceso son: la continuidad del estado de promoción en una población celular depende de la administración continuada del agente promotor, la eficiencia de esta etapa es sensible a la edad de la célula, a factores de la dieta y hormonales, agentes promotores endógenos pueden producir una promoción espontánea. ⁽¹⁹⁾

1.3.3.- Progresión

El agente progresor es aquel compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada o en estado de promoción en una célula potencialmente maligna. La progresión de la carcinogénesis se puede producir también mediante la incorporación en el genoma de información genética exógena (por ejemplo, de virus) o alteraciones cromosómicas espontáneas.

Las características morfológicas y biológicas de esta etapa son: irreversible, se distingue morfológicamente la alteración en la estructura genómica celular reflejada por inestabilidad cariotípica. Esta última es la característica molecular de esta etapa.

Los mecanismos implicados son: la inestabilidad cariotípica es múltiple e incluye la alteración en el aparato mitótico, trastorno en la función de los telómeros, hipometilación del DNA, recombinación, amplificación y transposición génica.

El estado de progresión se puede desarrollar a partir de células en estado de promoción o bien directamente a partir de células normales como resultado de la administración de dosis relativamente altas (dosis citotóxicas) de agentes carcinógenos completos.

En algunas ocasiones tras estas primeras etapas en el proceso carcinogénico es posible objetivar lesiones tisulares (evidenciables microscópicamente) denominadas precancerosas (situaciones patológicas que, de manera estadísticamente significativa, preceden o favorecen la aparición de procesos tumorales).⁽¹⁹⁾

1.4.- Cáncer y Tipos de carcinógenos

Se define como cáncer a un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, en las cuales se observa un proceso de crecimiento celular descontrolado. Lo más peligroso de este padecimiento es que, aunque comienza de manera localizada, tiende a diseminarse a tejidos circundantes y distantes. Los mecanismos que inician este proceso involucran una serie de alteraciones en la maquinaria genética de la célula normal, las cuales pueden ser heredadas o adquiridas debido a factores físicos, químicos o biológicos. Luego de un período de tiempo variable, los tumores malignos evolucionan, su población celular se torna heterogénea y progresan a formas capaces de evadir la respuesta inmune antitumoral, proveerse de oxígeno y nutrientes a través de la formación de una red vascular propia, invadir tejidos vecinos o producir metástasis a distancia.⁽²⁰⁾

La asociación entre distintas alteraciones genéticas y el cáncer se ha estudiado desde hace mucho tiempo, y durante la década de los años 1970 , Harold Varmus y Michael Bishop descubrieron que las secuencias genéticas virales de un retrovirus, capaces de inducir la transformación neoplásica de las células, eran homólogas a genes normales presentes en las mismas; más tarde, determinaron que estos genes codificaban proteínas que ordenaban a la célula entrar en el ciclo de división celular, y que la mutación de estos genes actuaba de forma dominante, por lo que los denominaron oncogenes.⁽²¹⁾

En general, para su estudio, los agentes con capacidad carcinogénica se clasifican atendiendo a que actúen o no afectando al DNA celular, diferenciándose entre agentes genotóxicos y no genotóxicos o epigenéticos.

1.4.1.- Carcinógenos genotóxicos

Algunos agentes carcinógenos, en especial los agentes iniciadores y progresores se caracterizan por su capacidad de alterar la estructura del DNA y/o de los cromosomas. Estos efectos genotóxicos inducen directamente la aparición de células neoplásicas (transformadas o malignas). En la mayor parte de los casos, la acción carcinógena de estos agentes consiste en un aumento del potencial oxidativo de las células, lo cual resulta en modificaciones en el DNA (oxidación del DNA) o formación de uniones covalentes de los agentes o sus metabolitos a las cadenas de DNA (aductos).

En la acción de este tipo de sustancias, el metabolismo celular juega un papel fundamental, produciendo la biotransformación de sustancias en principio inocuas a compuestos (generalmente reactivos) que presentan capacidad genotóxica y que son llamados carcinógenos finales. En todo caso, la acción de un agente carcinogénico debe acompañarse, para que ésta sea efectiva, de un desbalance en los mecanismos de reparación de DNA. ⁽²²⁾

1.4.2.- Carcinógenos endógenos

Los mecanismos implicados en la carcinogénesis endógena son: oxidación por especies reactivas del oxígeno, reducción con antioxidantes, reacción con radicales libres e inhibición en la reparación de la oxidación del DNA.

Los carcinógenos endógenos son especies reactivas del oxígeno. Las más importantes son los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el oxígeno singulete (O_2), destacando también el anión superóxido (O'_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), especies peroxiladas ($\text{RO}\cdot_2$) y especies alcoxiladas ($\text{RO}\cdot$).

Las especies reactivas del oxígeno se producen a partir de las reacciones celulares como la respiración celular (transporte electrónico mitocondrial), procesos de síntesis y degradación del metabolismo (metabolismo del ácido araquidónico, oxidación de los ácidos grasos de alto peso molecular, oxidación de aminoácidos, síntesis del ácido ascórbico, oxidación de poliaminas, esteroidogénesis, oxidación de purinas), biotransformación de

xenobióticos (transporte electrónico microsomal, oxidación peroxidativa, funciones de las oxidasas) y activación de células fagocíticas (leucocitos periféricos, macrófagos, células de Kupffer del hígado y células Clara del pulmón).

La oxidación endógena del DNA puede ser nuclear o mitocondrial. La oxidación del DNA mitocondrial es mucho más elevada debido a una mayor producción del anión superóxido durante la respiración mitocondrial. La mayor parte de los metabolitos responsables de la oxidación del DNA celular son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno y sus derivados. Las células poseen mecanismos eficaces de protección como la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa las cuales inactivan estos compuestos o antioxidantes específicos (metabolitos hidrofóbicos como el α -tocoferol e hidrofílicos como el ascorbato, ciertas proteínas, entre otros), los cuales disminuyen la cantidad de bases oxidadas del DNA. ⁽²²⁾

1.4.3.- Carcinógenos exógenos

Los carcinógenos exógenos son aquellos que incrementan la oxidación del DNA como, por ejemplo, agentes de proliferación de peroxisomas, benceno, arsénico, estradiol, nitrosaminas, bromuro de potasio, radiaciones ultravioletas (UVA y UVB) e ionizantes (rayos X). Muchas sustancias inorgánicas, particularmente hierro, cromo, cobalto (II) y sales de níquel en presencia de H_2O_2 producen la oxidación de las bases del DNA. Por otro lado, la exposición a la polución de los ambientes urbanos produce también altos niveles de DNA oxidado. La luz UVB (290-320 nm) produce mutaciones en el DNA y como consecuencia tumores de piel. La luz UVA (320-400 nm) es menos carcinógena y produce mayormente oxidación del DNA mediante la activación fotodinámica de especies reactivas del oxígeno. Hay compuestos químicos que pueden ser afectados por la radiación UV y producir la oxidación del DNA, principalmente mediante la generación de especies reactivas del oxígeno. ⁽²²⁾

1.4.4.- Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos

Son aquellos compuestos químicos que actúan por mecanismos que no incluyen la modificación directa del DNA, dando lugar finalmente a células genéticamente inestables (tumor). Aparentemente, estos agentes modulan el crecimiento y la muerte celular. En general,

estos compuestos actúan modificando la fisiología normal de órganos y sistemas específicos produciéndose una sobre-estimulación persistente cuyo resultado es la replicación celular intensificada (alteración del ciclo celular con efecto mitogénico). Esto puede dar lugar a un incremento de mutaciones espontáneas y de las probabilidades de alterar el DNA tanto por factores endógenos como exógenos antes de que haya posibilidad de reparación. Normalmente se trata de compuestos exógenos, aunque en determinadas circunstancias compuestos endógenos (hormonas) podrían considerarse como carcinógenos epigenéticos.

La acción carcinógena de estos compuestos puede tener diferentes mecanismos, pero todos ellos comparten las siguientes características principales:

Especificidad.- Los compuestos epigenéticos, al contrario que los genotóxicos, pueden ser más específicos en su capacidad de inducir carcinogénesis ya que frecuentemente inducen la formación de tumores en una especie animal, un sexo determinado y en la mayor parte de los casos en uno o varios órganos determinados dentro de una especie. Esta especificidad puede ser explicada por diferencias fisiológicas, metabólicas y de sensibilidad inter especies.

Existencia de un umbral en el desarrollo del tumor.- En la mayoría de los casos el efecto carcinógeno se produce solamente cuando se administran altas dosis de los compuestos, por lo que la carcinogénesis no aparecerá hasta que se alcance un determinado umbral. Según estos datos, se pueden construir curvas de dosis-respuesta para correlacionar qué dosis son perjudiciales. El análisis de estas curvas dosis-respuesta es de especial utilidad para determinar a qué niveles de un compuesto determinado no se produce efecto adverso y cuales constituyen factores de riesgo para el desarrollo del tumor en humanos.

Reversibilidad.- Los carcinógenos epigenéticos actúan generalmente como promotores del tumor cuando son administrados continua y prolongadamente. Los efectos producidos pueden revertir parcialmente cuando se interrumpe la administración del compuesto.

Citotoxicidad.- Los agentes epigenéticos son citotóxicos, produciendo un perjuicio crónico en las células que resulta en un aumento en la proliferación celular. Este incremento en la proliferación celular puede ser responsable del desarrollo neoplásico, ya que el DNA es cada vez más sensible a mutaciones a lo largo de sucesivas divisiones celulares. Por otro lado, la modificación producida en el DNA ya sea de forma endógena o exógena tiene posibilidades muy altas de convertirse en mutaciones heredables puesto que las posibilidades de reparación disminuyen. En general, los agentes epigenéticos se pueden considerar como promotores en la

expansión de células espontáneamente iniciadas. Algunos de estos agentes químicos son el benceno, cloroformo, tricloroetileno, furfural, metapirileno, lindano y bifenilos policlorinados.

Un ejemplo clásico de carcinogénesis epigenética es la aparición de hepatomas o hepatocarcinomas inducidos en modelos animales y en humanos tras la exposición prolongada a estrógenos (hepatocarcinogénesis).⁽²²⁾

1.5.- El cáncer pulmonar.

El cáncer pulmonar fue considerado hasta mediados del siglo pasado como una enfermedad poco frecuente. A partir de 1930 su frecuencia ha aumentado y en la actualidad es el tumor maligno más frecuente en el mundo. Desde 2007 esta enfermedad se ha convertido en la principal causa de muerte, superando a los padecimientos cardiovasculares y otras patologías de elevada mortalidad. En México, el cáncer de pulmón se encuentra entre las tres principales causas de muerte por tumores malignos en adultos mayores de 35 años y es más frecuente en varones, aunque se ha reportado un incremento mundial en las mujeres.⁽²³⁾

Esto es el resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2008 que la principal causa de muerte en el mundo es el cáncer (7.6 millones de casos), localizados en su mayoría en pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011). Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2011), reportó que de 2007 a 2009 en América Latina, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de cáncer es de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes. Ya en 2012, la OMS señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago. Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado (OMS, 2015). Las tasas más altas en la región se localizan en Uruguay (168.4 por cada 100 mil habitantes), Cuba (143.3) y Perú (136.6); México, como resultado de los esfuerzos que se han llevado a cabo en materia de prevención, atención oportuna y sensibilización, tiene la tasa más baja de Latinoamérica (75.4).⁽²⁴⁾

En México durante 2010, se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico son el cáncer de mama (24.3%), el cervicouterino (9.7%) y el de colon (3.2 por ciento), en los varones adultos se concentran en cáncer de próstata (7.9%), bronquios y pulmón (4.9%) y colon (4.6 por ciento) (*Tabla 1*).⁽²⁵⁾

Tasa de mortalidad observada de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según grupo de edad y sexo								
2011								
Por 100 mil habitantes de cada grupo de edad y sexo								
Principales tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Bronquios y pulmón	0.35	0.80	2.98	11.98	30.18	67.18	115.27	131.00
Estómago	0.41	1.51	3.91	10.34	20.87	36.16	61.72	81.22
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.18	0.41	1.29	5.58	12.15	25.79	41.80	61.89
Colon	0.35	1.05	2.71	6.75	13.76	20.31	35.76	47.03
Mama	0.01	0.04	0.09	0.09	0.00	0.39	0.65	1.44
Próstata	0.02	0.06	0.55	5.69	22.36	68.75	180.09	361.69
Mujeres								
Bronquios y pulmón	0.10	0.67	2.07	7.98	14.32	28.30	47.14	62.28
Estómago	0.44	1.59	3.83	9.12	14.09	24.80	43.39	67.21
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.16	0.45	1.57	6.69	12.80	26.19	41.72	50.18
Colon	0.24	0.90	2.13	4.45	11.23	16.98	25.73	40.55
Mama	0.40	4.46	14.55	26.74	35.55	38.07	43.39	65.64
Cervicouterino	0.79	3.78	10.44	17.40	22.22	30.25	42.83	54.66

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C16, C18, C22, C34, C50, C53 y C61.
Fuente: INEGI (2012). *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos*; y CONAPO (2012). *Proyecciones de la Población de México 2010-2050*. Procesó INEGI.

Tabla 1.- Tasa de mortalidad por principales tumores malignos.⁽²⁵⁾

Existen 2 tipos principales de cáncer de pulmón: cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) que representa entre el 85% y 90% de los casos, y cáncer de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) que representa entre el 10% y 15% del mismo. El tratamiento para cada tipo de cáncer de pulmón es distinto, pero en general el pronóstico de los pacientes es malo y su sobrevivida a 5 años es muy baja. Existen subtipos de NSCLC dependiendo del tipo celular en el que inicie el cáncer, pero todos se agrupan como NSCLC porque su tratamiento y pronóstico por lo general son similares.⁽²⁶⁾

1.5.1.- Adenocarcinoma de pulmón

Los adenocarcinomas corresponden aproximadamente al 40% del cáncer de pulmón y tiene su origen en las células epiteliales que forman el revestimiento interno de los bronquios y bronquiolos, principalmente a nivel de las células glandulares. Estas células son las encargadas de sintetizar y secretar los productos que generan, sobre todo mucinas, en la luz glandular. Este tipo de cáncer se ha asociado con el mal hábito de fumar, pero también es el tipo de cáncer más común entre los no fumadores, es más frecuente en mujeres que en hombres, y en jóvenes se presenta más a menudo que otros tipos de cáncer de pulmón. ⁽²⁶⁾

1.6.- MUC1.

1.6.1.- Las mucinas humanas

Los términos mucoso, mucinoso o mucina hacen referencia a la capa viscosa que recubre los epitelios de los órganos huecos del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario, a la que, históricamente, se le asignó una función protectora frente a las agresiones tanto exógenas como endógenas. Las mucinas son el principal componente de esta capa viscosa, pertenecen a una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales. ⁽²⁷⁾ La principal característica de las mucinas es su capacidad para formar geles; cumpliendo funciones que van desde la lubricación, hasta la señalización celular, pasando por la formación de barreras físicas y químicas. ⁽²⁸⁾

La sobreexpresión de mucinas, en especial de la proteína tipo mucina 1 (MUC1), se encuentra asociada a varios tipos de cáncer ⁽²⁹⁾ principalmente carcinomas.

1.6.2.- MUC1 y el cáncer

MUC1 es una glicoproteína tipo mucina y fue una de las primeras en ser descrita en 1973, y desde entonces se ha acumulado una gran cantidad de datos referentes a ella. Se trata de una O-glicoproteína heterodimérica que es sobreexpresada aberrantemente en células malignizadas e induce firmas genéticas asociadas a una baja tasa de supervivencia de pacientes con NSCLC. ⁽³⁰⁾

MUC1 se expresa en la parte apical de epitelios normales, pero cambia su distribución, estructura e inmunogenicidad en células tumorales de adenocarcinomas, y estos cambios se

asocian al comportamiento tumoral. ⁽³¹⁾ Esta proteína es traducida como un sólo polipéptido que experimenta autoproteólisis derivando en las subunidades N-terminal (MUC1-N, también llamada α) y C-terminal (MUC1-C o β), ⁽³²⁾ las cuales, a pesar de sufrir un corte proteolítico, se mantienen unidas por fuerzas no covalentes. MUC1-N se encuentra plenamente expuesta en la superficie celular externa y contiene una serie de aminoácidos que se repiten muchas veces y que se encuentran O-glicosiladas (secuencias VNTR, números de repetición en tándem). En contraste, MUC1-C es más pequeña y se encuentra anclada en la membrana celular, con un pequeño dominio amino-terminal expuesto hacia el espacio extracelular, y su dominio carboxilo-terminal en el citosol. Diversos estudios en los últimos años han desafiado la antigua creencia de que el papel de MUC1 en el desarrollo del cáncer recaía principalmente en la subunidad MUC1-N, confiriendo propiedades a las células tumorales que les permitían evadir el reconocimiento y destrucción por el sistema inmune, ya que ahora se sabe que MUC1-C tiene actividad de oncogén, participando en diferentes vías de señalización responsables de la iniciación y progresión tumoral. Este cambio de enfoque se apoya aún más por la ausencia de polimorfismo alélico y la glicosilación variable de MUC1-N, así como la presencia de MUC1-C en casi todas las isoformas de MUC1 expresadas en células tumorales. MUC1-N es un biomarcador sérico para el cáncer de mama aprobado por la administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos de América (FDA), aunque su uso ya no es recomendado por la Sociedad Americana de Oncología Clínica. Sin embargo, la comparación en la expresión de MUC1-C en células normales y malignas de tejidos mamarios nos ofrece un enfoque novedoso hacia la explotación de las mucinas de membrana como biomarcadores, ya que se han reportado firmas genéticas inducidas con MUC1-C con pronóstico y valores predictivos para cáncer de mama. Estudios preclínicos con péptidos que interfieren con funciones oncogénicas de MUC1-C también parecen prometedores. ⁽³³⁾

1.6.3.- Estructura y características de MUC1

El gen humano MUC1 contiene 8 exones y ocupa cerca de 4.4 kbp en locus 1q21. El número de elementos VNTR es alelo dependiente, y en el caso de MUC1, varía entre 20 y 125. La variabilidad en el número de transcritos de MUC1 es el resultado del empalme alternativo que toma lugar principalmente en las regiones de MUC1-N, en tanto que las regiones carboxilo-terminales que incluyen a MUC1-C permanecen imperturbadas. La

estructura general de las proteínas MUC1 en la superficie celular epitelial se ilustra en la **Fig. 3.** ⁽³³⁾

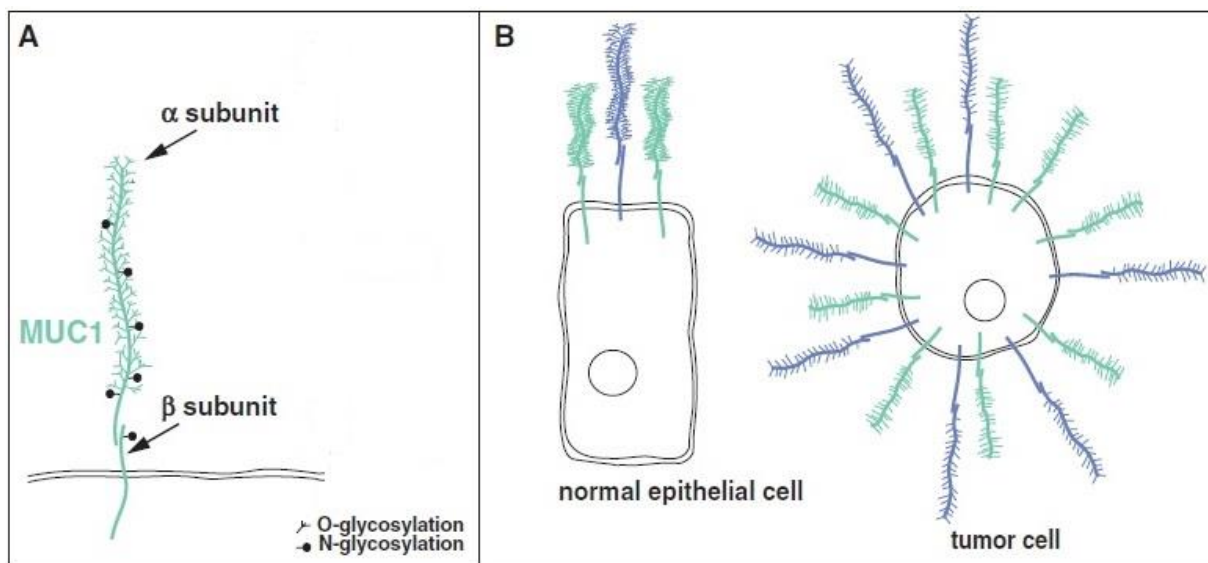


Figura 3.- Mucina transmembranal MUC1. (A) Estructura general de la proteína MUC1 en la superficie del epitelio celular. (B) Expresión de MUC1 en células epiteliales normales contra células tumorales. ⁽³¹⁾

1.6.4.- Subunidad α (MUC1-N)

En general, las subunidades α de MUC1 llevan a cabo las funciones canónicas de las mucinas de lubricación y protección de la superficie epitelial. El alto grado de O-glicosilación de MUC1-N, aunado a que, estas subunidades son propensas a oligomerizarse, resulta en la formación de geles en la superficie apical celular que son permeables selectivamente a iones, moléculas, partículas y otras células. ⁽³³⁾

MUC1 ha tenido múltiples nombres, incluyendo antígeno de membrana epitelial, mucina epitelial polimórfica, mucina urinaria polimórfica, antígeno DF3, CD227 y epsialina. Esta multiplicidad de nombres refleja la gran cantidad de anticuerpos monoclonales (MAbs) que han surgido independientemente en contra de MUC1-N, usando células tumorales o sus membranas, glóbulo de grasa de leche humana (HMFG), péptidos u oligosacáridos como inmunógenos. La investigación de la reactividad y especificidad de 56 MAbs conlleva a las siguientes conclusiones: 34 MAbs son direccionados hacia epítopes localizados dentro del motivo VNTR; 16 MAbs mostraron evidencia de restos de carbohidratos involucrados en sus

epítopes; no se encontró relación obvia entre el tipo de inmunógeno y la especificidad de cada MAb; y la secuencia hidrofílica PDTRPAP estuvo siempre presente tanto en epítopes completos como en partes dentro del núcleo proteínico de MUC1. ⁽³⁴⁾

Se cree que las propiedades adhesivas y anti-adhesivas de MUC1-N promueven la migración celular, un requerimiento para la metástasis. Por una parte, la estructura de MUC1-N (larga, sobresaliente a la superficie celular, rígida y altamente cargada negativamente) confiere propiedades anti-adhesivas a células que sobreexpresan MUC1, las cuales interfieren con las interacciones célula-célula. ⁽³⁵⁾

Por otro lado, MUC1-N asociada a tumores gana propiedades adhesivas atando moléculas de adhesión. Se sabe que la unión de estas moléculas a MUC-N expresadas en células endoteliales, tales como moléculas tipo selectinas y molécula de adhesión intracelular 1, contribuyen a la propagación metastásica hematogena de células que sobreexpresan MUC1, y la Galectina 3 podría ser también un protagonista en este proceso. ⁽³⁶⁾

Por su gran complejidad y diversidad, los O-glicanos se encuentran participando en funciones tan diversas como en la conformación de la estructura secundaria, terciaria e inclusive de la cuaternaria de algunas proteínas, como en el caso de las mucinas, y también participan evitando la agregación de las proteínas. ⁽³⁷⁾

Como consecuencia de la transformación maligna ocurren cambios muy importantes en la glicosilación, sobre todo en la etapa de elongación de los O-glicanos. Esto determina que las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas se acorten (glicosilación incompleta) y entonces algunos tipos de núcleos de glicanos, que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer. ⁽³⁸⁾

La expresión de estos antígenos suele ser discontinua a lo largo de la cadena polipeptídica. El antígeno Tn es el precursor del antígeno T o TF que se forma por la acción de una β -galactosil transferasa, la cual puede estar bloqueada y provocar una sialilación temprana del antígeno Tn ⁽³⁹⁾, que normalmente se encuentra sustituido con galactosa o N-acetilglucosamina, lo que permite la formación del esqueleto del oligosacárido y finalmente su terminación con la adición del ácido siálico. La expresión del antígeno sialil-Tn se ha asociado con diferentes carcinomas, como el adenocarcinoma gástrico difuso, los cánceres de pulmón, cervico-uterino y de hígado. ⁽⁴⁰⁾

1.6.5.- Subunidad β (MUC1-C)

MUC1-C, aparentemente, contribuye a la señalización del crecimiento celular. No es inmediatamente obvio el por qué una proteína cuya función principal es la protección física de la superficie expuesta de células epiteliales diferenciadas terminales debe, adicionalmente, influir en el crecimiento celular. Una teoría apoyada por evidencia experimental es que, las mucinas de membrana (como MUC1) actúan como sensores primarios de ataques y daño a la superficie epitelial y la subunidad β podría entonces iniciar respuestas que favorecen supervivencia, proliferación y motilidad celular para la reparación de daños epiteliales. ⁽⁴¹⁾

La actividad proliferativa de MUC1-C podría iniciar o favorecer la progresión tumoral si ésta no se regula, o si MUC1 se sobreexpresa. Se ha detectado una gran cantidad de MUC1-C intracelularmente en células neoplásicas, particularmente en mitocondria y núcleo; dentro del núcleo, se encuentra principalmente en la matriz nuclear y en el nucléolo. ⁽³²⁾

MUC1 surgió como un oncogén casi tres décadas después de su caracterización molecular inicial. Hallazgos de que la sobreexpresión de MUC1 de longitud completa promueve la transformación, tanto *in vitro* (fibroblastos 3Y1) como *in vivo* (ratones), fueron seguidos rápidamente por la demostración de que la sobreexpresión del dominio citoplásmico de MUC1-C (MUC1-CD) por sí solo es suficiente para inducir el crecimiento independiente del anclaje y la tumorigenicidad *in vitro*. ⁽⁴²⁾

MUC1-CD consta de 72 aminoácidos, y es altamente conservado entre especies de mamíferos (> 95% de identidad). MUC1-CD resume bien el número todavía creciente de mecanismos por los cuales MUC1-C promueve la progresión del tumor y la metástasis. ⁽⁴³⁾ MUC1-CD posee varios residuos de serina, y tirosina (**Fig. 4**), los cuales pueden fosforilarse diferencialmente y determinar la unión de ciertas proteínas con actividad reguladora de mecanismos de proliferación celular, como se describe a continuación.

Estudios bioquímicos en líneas celulares y estudios genéticos en ratones transgénicos han implicado a MUC1-CD en una variedad de vías oncogénicas. La señalización de MUC1-C en la membrana celular se inicia tras la fosforilación de residuos de tirosina. MUC1-CD contiene siete residuos de tirosina y es un sustrato para RTK, incluyendo los cuatro miembros de la familia del receptor epidermal humano (HER), el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas β , y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La N-glicosilación del único residuo de asparagina presente

en la región extracelular de MUC1-C proporciona un sitio de unión para la Galectina-3. Se cree que la Galectina-3 sirve como un puente para asociar MUC1-C con EGFR y posiblemente otros RTKs, y que MUC1-C N-glicosilado aumenta los niveles de mRNA de Galectina-3 suprimiendo la expresión de miR-322. ⁽⁴²⁾

El EGFR activado, fosforila a MUC1-CD en Tyr 60 (**Fig. 4**) y permite la unión de la proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento (GRB2) y la proteína SOS de intercambio de nucleótidos de guanina Ras, lo que da como resultado la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno y Ras. Las cinasas proto-oncogénicas intracelulares, tales como PKC δ , Src y glicógeno sintasa cinasa 3b (GSK3b), a través de la fosforilación de residuos de serina y treonina (**Fig. 4**), regulan las interacciones entre MUC1-CD y otras proteínas de unión intracelular. A través de su interacción con EGFR, MUC1-C potencia la señalización del receptor, aumentando el reciclaje más que la degradación después de la endocitosis; la entrega de factores de receptor internalizados a la superficie de la célula da como resultado la re-exposición al factor de crecimiento y, por lo tanto, una señalización aumentada. ⁽⁴³⁾ En las células pancreáticas, la Galectina-3 parece regular la endocitosis tanto de MUC1 como de EGFR. ⁽⁴⁴⁾

MUC1-C es detectado en el citoplasma y núcleo de células transformadas que sobreexpresan MUC1. Sin embargo, si toda la subunidad MUC1-C o sólo MUC1-CD se libera de la membrana plasmática o, alternativamente, si MUC1-C citoplásmico y nuclear se insertan incluso en las membranas durante la síntesis, son preguntas que aún no se han resuelto. Sin embargo, el tráfico de MUC1-CD en células expuestas al estrés y que sobreexpresan MUC1 está bien establecido *in vitro*. La dimerización de MUC1-CD, a través del motivo CQC inmediatamente adyacente al dominio trans-membranal (**Fig. 4**), se requiere para la importación de MUC1-CD en las mitocondrias y el núcleo. Este mismo motivo regula el reciclado de MUC1 de los endosomas a la membrana plasmática, lo que sugiere que la oligomerización también puede jugar un papel importante en este proceso. La asociación con proteínas diana, como importina β , sirven para llevar a MUC1-CD al núcleo, donde actúa como un poderoso regulador transcripcional. ⁽⁴⁵⁾ En asociación con β catenina, MUC1-CD coactiva la transcripción de genes diana de la vía de señalización WNT, incluyendo ciclina D1 y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). ⁽⁴⁶⁾ Mediante la inducción de la expresión de CTGF, un potente mediador de la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis,

MUC1-CD, facilita la creación de un microambiente reactivo de tumor; la inducción MUC1-CD-dependiente de CTGF requiere fosforilación de una tirosina específica de MUC1-CD (Fig. 4).⁽⁴⁵⁾

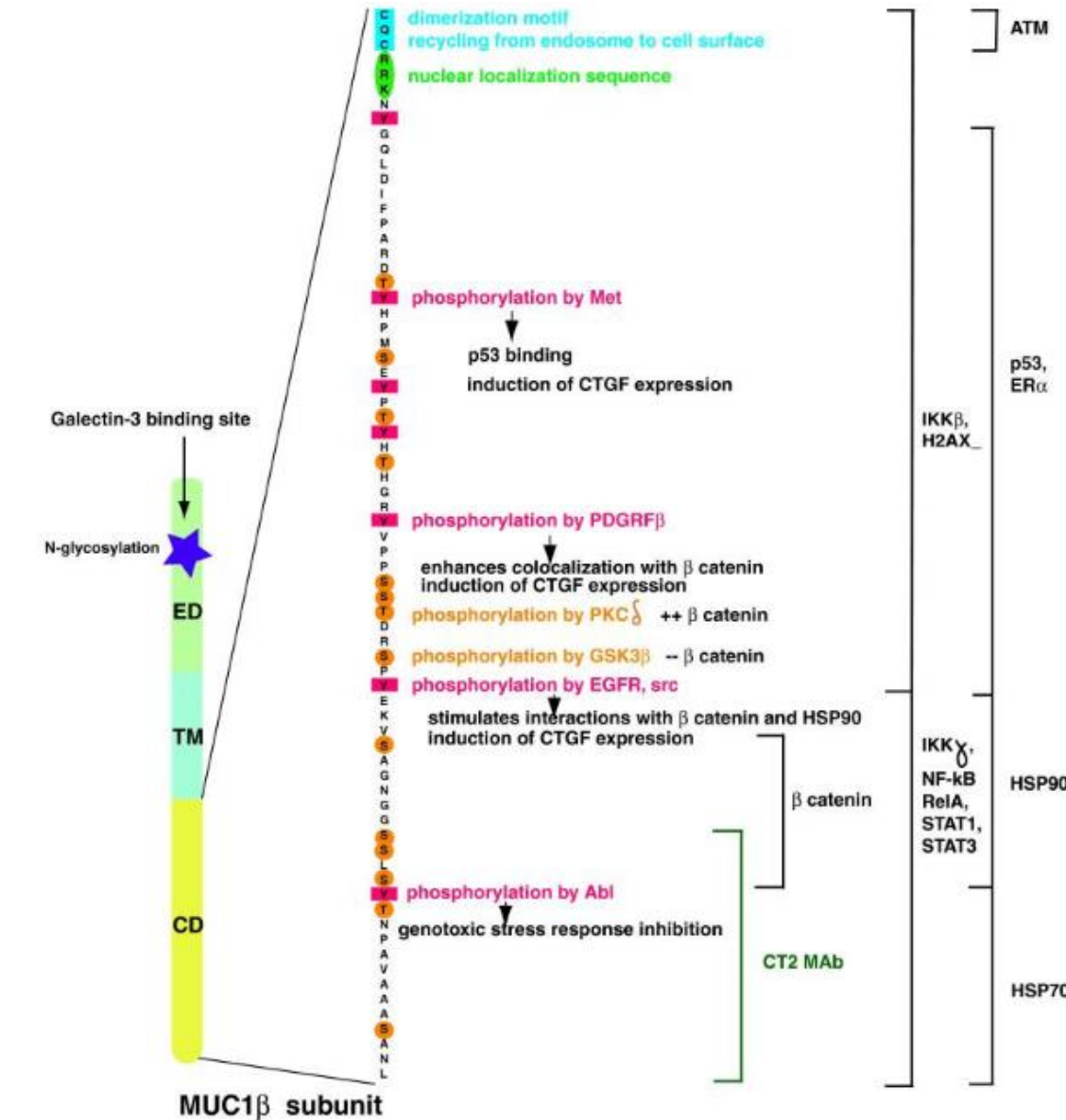


Figura 4.- Subunidad MUC1-C. Se ilustran: dominios estructurales, dominio extracelular (ED), dominio transmembranal (TM), y dominio citoplásmico (CD) de la subunidad MUC1-C, y se muestran sus respectivas secuencias de aminoácidos del dominio citoplásmico. El pequeño dominio extracelular contiene un sitio de unión a Galectina 3. El CD de MUC1-C contiene numerosos sitios de fosforilación, algunos de los cuales (indicados) son cruciales para sus funciones. Se delimitan las subregiones del CD involucradas en la unión con varios efectores indicados y el comercialmente disponible anti-MUC1-N CT2 MAb. Se resaltan los motivos de dimerización y localización nuclear requeridos para la importación nuclear y mitocondrial de MUC1-C.⁽⁴⁵⁾

1.6.6.- Expresión de MUC1 en células de adenocarcinoma pulmonar

MUC1 se encuentra presente en la superficie apical de células epiteliales polarizadas normales, mientras que, en células malignas, ésta se distribuye, expresa y glicosila aberrantemente (**Fig. 3B**). MUC1 es sobre-expresada en la mayoría de los carcinomas, así como en tumores malignos de tipo hematológicos. Recientes estudios sugieren que la sobre-expresión de MUC1 se logra en los niveles transcripcionales en el control de la expresión genética. ⁽⁴²⁾

Se ha observado en células de cáncer de mama una amplificación del locus del gen de MUC1 (1q21). MUC1, a través de asociaciones entre MUC1-C y otros factores de transcripción, tales como STAT1 ó 3, regula su propia actividad promotora. Estudios acerca de la O-glicosilación en glándulas mamarias muestran que las células normales sintetizan MUC1 con glicanos más largos y altamente ramificados, mientras que las células tumorales producen MUC1 con menos glicanos, y éstos, a su vez, tienden a ser más cortos y menos ramificados, y frecuentemente difieren en la composición del carbohidrato. Los antígenos Tn, sialil-Tn y el antígeno oncofetal Thomson Friedenreich se encuentran frecuentemente presentes dentro de MUC1 asociado a tumores. ⁽⁴⁷⁾

En células tumorales que han perdido su polaridad, las proteínas MUC1 ya no se encuentran restringidas al dominio apical y son extendidas a lo largo de toda la superficie celular (**Fig. 3B**), la pérdida de la polaridad en células malignas permite interacciones entre mucinas unidas a la membrana y otras proteínas de membrana plasmática, tales como el receptor para el factor de crecimiento epidermal humano (hEGFR), perteneciente a la familia de receptores cinasas de tirosina (RTKs), que normalmente reside dentro del dominio basolateral de células polarizadas. Interacciones entre mucinas y RTKs conllevan a la activación de vías de señalización resultantes en la proliferación y la supervivencia celular. ⁽⁴⁸⁾

Dichas interacciones son transitorias en células epiteliales normales durante la pérdida reversible de la polaridad inducida por estrés, mientras que son constitutivas en células malignas debido a la pérdida permanente de la polaridad y son frecuentemente aumentadas a través de la sobreexpresión de estas proteínas que interaccionan con las mucinas. ⁽⁴⁵⁾

1.7.- Membrana plasmática y balsas lipídicas (GEM).

La membrana plasmática es una estructura formada por dos láminas de fosfolípidos, glucolípidos y proteínas que rodean, limitan la forma y contribuyen a mantener el equilibrio entre el interior y el exterior de las células. Regula la entrada y salida de muchas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular.

Está compuesta por dos láminas que sirven de "contenedor" para el citosol y los distintos compartimentos internos de la célula, así como también otorga protección mecánica. Está formada principalmente por fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas).

La principal característica de esta barrera es su permeabilidad selectiva, lo que le permite regular el paso de agua, iones y metabolitos, a la vez que mantiene el potencial electroquímico. La membrana plasmática está compuesta por una doble capa de fosfolípidos, por proteínas unidas no covalentemente a esa bicapa, y glúcidos unidos covalentemente a los lípidos o a las proteínas.

El orden de las cabezas hidrofílicas y las colas hidrofóbicas de la bicapa lipídica impide que solutos polares, como sales minerales, agua, carbohidratos y proteínas, difundan a través de la membrana, pero generalmente permite la difusión pasiva de las moléculas hidrofóbicas. Esto permite a la célula controlar el movimiento de estas sustancias vía complejos de proteína trans-membranal tales como poros y caminos, que permiten el paso de iones específicos como el sodio y el potasio. ⁽⁴⁹⁾

Antiguamente se creía que la membrana plasmática era un conjunto estático formado por la sucesión de capas proteínas-lípidos-lípidos-proteínas. Hoy en día se concibe como una estructura dinámica cuyo modelo se conoce como "mosaico fluido", término acuñado por S. J. Singer y G. L. Nicolson en 1972. Esta estructura general -modelo unitario- se presenta también en todo el sistema de endomembranas (membranas de los diversos orgánulos del interior de la célula), como retículo endoplasmático, aparato de Golgi y envoltura nuclear, y los de otros orgánulos, como las mitocondrias y los plastos, que proceden de endosimbiosis.

El 98% de los lípidos presentes en las membranas celulares son anfipáticos. Los tres principales tipos de lípidos en las membranas eucarióticas son los fosfoglicéridos (fosfolípidos), los esfingolípidos y el colesterol; cabe mencionar que los fosfoglicéridos y los esfingolípidos se encuentran en todas las células. Le siguen los glucolípidos, así como

esteroides (sobre todo colesterol). Estos últimos no existen o son escasos en las membranas plasmáticas de las células procariotas. Existen también grasas neutras, que son lípidos no anfipáticos, pero solo representan un 2% del total de lípidos de membrana. Se ha postulado que los lípidos de membrana se podrían encontrar en dos formas: como un líquido bidimensional, y de una forma más estructurada, en particular cuando están unidos a algunas proteínas formando las llamadas balsas lipídicas. Se cree que el colesterol podría tener un papel importante en la organización de estas últimas.

El porcentaje de proteínas oscila entre un 20% en la mielina de las neuronas y un 70% en la membrana interna mitocondrial ⁽⁵⁰⁾ el 80% son intrínsecas, mientras que el 20% restantes son extrínsecas. Las proteínas son responsables de las funciones dinámicas de la membrana, por lo que cada membrana tiene una dotación muy específica de proteínas; las membranas intracelulares tienen una elevada proporción de proteínas debido al elevado número de actividades enzimáticas que albergan. En la membrana las proteínas desempeñan diversas funciones: transportadoras, conectoras (conectan la membrana con la matriz extracelular o con el interior), receptoras (encargadas del reconocimiento celular, adhesión) y enzimas.

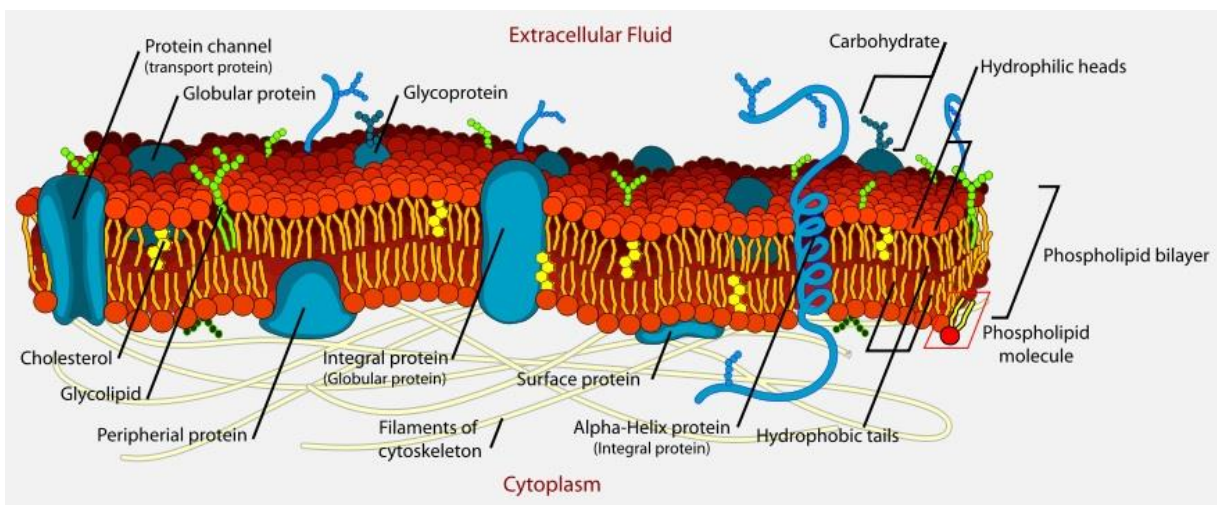


Figura 5.- Modelo de la estructura de la membrana plasmática. ⁽⁴⁷⁾

Las balsas lipídicas o GEM, son microdominios moleculares situados en la membrana plasmática, que consisten en asociaciones estables entre los esfingolípidos, glicolípidos y el colesterol (GEM). Por ello, estos grupos forman una fase lipídica más densa que los glicerofosfolípidos, y así constituyen zonas especiales de la membrana plasmática que

funcionan como "balsas" (del inglés rafts) que flotan entre el conjunto de los demás lípidos. Estas unidades en la membrana plasmática son muy diversas y dinámicas en cuanto a tamaño y composición, y tienen asociadas proteínas de membrana las cuales les confieren distintas propiedades y funciones. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas balsas de lípidos, debemos ver la membrana plasmática como un componente celular heterogéneo, en el cual se disponen numerosas balsas de lípidos que cambian en sus propiedades y definen funciones distintas en las regiones de la membrana celular. Este empaquetamiento lateral de los esfingolípidos y el colesterol conduce a la formación de dominios dispersos que se encuentran en una fase similar a la fase líquida ordenada ⁽⁵¹⁾ dentro de la bicapa de las membranas (**Fig. 6**).

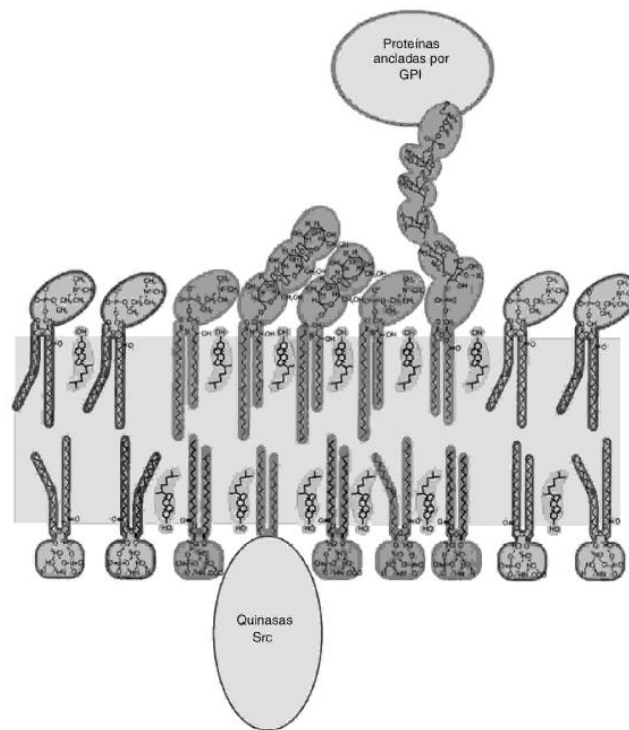


Figura 6.- Modelo de estructura de los GEM. La bicapa lipídica es *asimétrica* en los GEM, con la esfingomielina y los glicoesfingolípidos enriquecidos en la cara exoplásmica de la membrana y los glicerolípidos (p.e. fosfatidilcolina) en la cara citoplásmica. El colesterol está presente en las dos caras y se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas. ⁽⁵²⁾

La estructura peculiar de los GEM les confiere la propiedad de ser insolubles en detergentes no iónicos (Tritón X-100) a bajas temperaturas. De esta forma, las proteínas y lípidos de los GEM pueden ser aislados bioquímicamente por centrifugación de equilibrio como complejos de baja densidad insolubles en el detergente Tritón X-100 (DIGs). ⁽⁵³⁾

Los DIGs, sin embargo, al ser aislados aparecen como agregados más grandes que los GEM intracelulares. Los últimos datos indican que el tamaño de los GEM es considerablemente pequeño y por debajo del poder de resolución de las técnicas microscópicas aplicadas hasta el momento. ⁽⁵⁴⁾

Simons y Wandinger-Ness propusieron en 1990 un modelo de transporte apical basado en distintas observaciones independientes. Se conocía que la membrana apical de las células epiteliales está enriquecida en glicolípidos y colesterol. ⁽⁵⁵⁾ Por otro lado, se había observado que existe un co-transporte de glicolípidos y proteínas a la membrana apical de las células MDCK (riñón canino Madin-Darby). ⁽⁵⁶⁾ El modelo basado en los GEM postula que el mecanismo de transporte apical está fundamentado en las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (**Fig. 7**) que tienen lugar en microdominios específicos con un contenido elevado en glicolípidos y colesterol. ⁽⁵²⁾

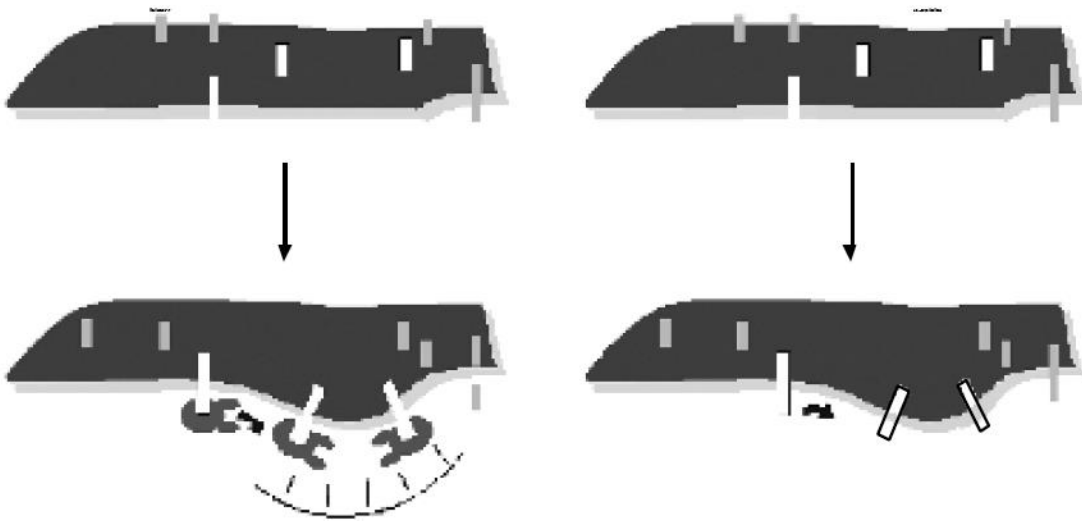


Figura 7.- Modelos de formación de vesículas de transporte. El transporte basolateral está fundamentado en interacciones proteína-proteína. El mecanismo propuesto para el transporte apical, sin embargo, se basa en interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. ⁽⁵²⁾

De esta forma, los glicosfingolípidos se asocian y forman agrupamientos en las membranas de la red del trans-Golgi (TGN), donde podrían actuar como plataformas para la inclusión de proteínas destinadas a ser transportadas a la membrana apical, mientras que las proteínas con destino a la membrana basolateral serían excluidas. Estos lípidos y proteínas podrían ensamblarse junto con proteínas accesorias en la cara citoplásmica de la TGN para

formar un subdominio capaz de formar vesículas que engloben la maquinaria necesaria para asegurar una distribución específica a la membrana apical. Las proteínas basolaterales, cuyo transporte está basado en interacciones proteína-proteína, no son capaces de acceder a estos dominios y son excluidas específicamente de las vesículas de transporte apical. Es importante diferenciar las proteínas que son transportadas unidireccionalmente por los GEM, es decir, proteínas carga, de aquellas que estarían formando parte de la maquinaria de transporte mediada por GEM, ciclando entre la TGN y la membrana plasmática. ⁽⁵²⁾

1.7.1.- Proteínas asociadas a GEM.

La organización de los GEM para los procesos de transporte o señalización requiere de una maquinaria proteínica especializada, en la cual las familias de MAL (proteína de la mielina y linfocito) ⁽⁵⁷⁾ y caveolina ⁽⁵⁸⁾ son los elementos mejor caracterizados. En particular la proteína MAL fue el primer miembro identificado en la maquinaria proteínica integral involucrada en el tráfico mediado por GEM a la superficie apical en células epiteliales polarizadas MDCK. ^(59,60)

Caveolina-1 (cav-1), una proteína de membrana multifuncional asociada a GEM, es el miembro fundador de la familia de las caveolinas. ⁽⁶¹⁾ Esta familia se encuentra principalmente en invaginaciones de membrana plasmática llamadas caveolas y en la región del Golgi, y forma un andamio en el cual son reclutadas muchas clases de moléculas de señalización para generar complejos de señalización preensamblados. ⁽⁶²⁾ La caveolina es la proteína asociada a GEM mejor caracterizada. Se ha visto que esta proteína se une al colesterol, pudiendo estar implicada en su transporte a la membrana plasmática. ^(63,64)

Las anexinas son una familia de proteínas que se unen a las membranas en presencia de calcio. Se ha descrito que la anexina XIIIb se localiza apicalmente en las células MDCK, mientras que la anexina XIIIa se distribuye en las dos membranas de estas células, estando ambas implicadas en el transporte apical de proteínas mediado por GEM. ^(65,66)

El proteolípido MAL también se asocia específicamente a los GEM de células epiteliales polarizadas y de linfocitos T. ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ De hecho, MAL es la única proteína asociada a GEM que se ha demostrado que tiene una función esencial como componente de la maquinaria para el transporte apical de proteínas de membrana y secretadas en las células epiteliales. ^(59,60,70)

1.8.- Proteína MAL

MAL es un proteolípido de membrana de aproximadamente 17-kDa que está asociada a los GEM y cuya función ha sido descrita como proteína reguladora del flujo apical de proteínas tanto en la vía directa como en la indirecta, por lo que son buenos candidatos para mediar la clasificación apical de proteínas lípido-dependiente. ⁽⁷¹⁾

El gen MAL fue identificado originalmente por Alonso y Weissman en 1987, durante una búsqueda de genes diferencialmente expresados durante el desarrollo de células T. ⁽⁷²⁾ Se predijo que el gen MAL codificaba una proteína de membrana integral de 17 kDa denominada MAL. Más recientemente, esta proteína fue identificada como un componente de GEM, en linfocitos T, células epiteliales de riñón canino Madin-Darby y células formadoras de mielina. ^(68,69,73) Se ha demostrado que MAL juega un papel esencial como un componente de la maquinaria proteínica para el transporte apical de membrana (especialmente de proteínas ancladas con glicofosfatidil inositol o GPI) y proteínas secretadas. ^(59,60,70)

El primer reporte de MAL como una proteína supresora de tumores fue publicado en 2003. Este estudio mostró que la expresión exógena de MAL en células TE3 reprimió la formación de tumores inducidos por células TE3 en ratones desnudos, inhibió la motilidad celular y produjo apoptosis mediante la vía Fas. ⁽⁷⁴⁾

Estudios recientes muestran que el gen de MAL, y particularmente su región promotora, está hipermetilada en diferentes tipos de cáncer de origen epitelial, lo cual produce que este gen no se exprese, por lo que ha sido descrita como un gen supresor de tumores con valor diagnóstico en cáncer esofágico, colorectal, gástrico y NSCLCs. ^(75,76)

Rancano et. Al. (1994), determinaron que MAL contiene 4 segmentos hidrofóbicos transmembranales, cada uno con una secuencia hidrofílica adyacente. ⁽⁷⁷⁾ La amplificación por PCR del c-DNA de MAL a partir de diferentes muestras de células T, indicaron la existencia de 4 diferentes isoformas del mRNA de MAL, nombradas MAL-a, -b, -c y -d. Se ha reportado que MAL tiene una arquitectura de cuatro hélices transmembranales con las regiones N y C terminales citoplásmicas. Ellos llamaron a esta región el dominio MARVEL, que es un dominio compartido por miembros de la familia MAL, así como por miembros de las familias fiscina, girina y ocludina. ⁽⁷⁸⁾

2.- JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo y a pesar de los avances en terapias multimodales, el pronóstico de los pacientes sigue siendo pobre. Debido a esto y a que en varias líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar existe una sobreexpresión de MUC1 y baja expresión de MAL, y hasta la fecha no se ha descrito un mecanismo anti-oncogénico de MAL, por lo que la presente tesis pretende estudiar la relación entre la subunidad MUC1-C y MAL, así como el tránsito intracelular de MUC1-C, principalmente hacia el núcleo.

Se ha descrito que, al restablecer los niveles de expresión MAL, ésta puede de algún modo desconocido, revertir el fenotipo tumoral en ciertos adenocarcinomas, ⁽⁷⁴⁾ y éstos a su vez sobreexpresan MUC1, por lo que resulta interesante determinar si la actividad supresora de la proteína MAL está relacionada con una inhibición de la oncogénesis promovida por MUC1. Esto permitiría en un futuro la posible utilización del gen MAL en la terapia génica contra el desarrollo de adenocarcinomas, y significaría un tratamiento alternativo, novedoso y probablemente más efectivo para este tipo de cáncer.

3.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Determinar el efecto de la sobreexpresión de MAL en el tráfico celular de MUC1-C en la línea celular de cáncer pulmonar HCC827, y en células HEK293 transfectadas establemente con MUC1 humana.

2.2.- Objetivos particulares

- Determinar los niveles de expresión endógena de la proteína MAL, en las células HCC827.
- Determinar la distribución subcelular mediante inmunotransferencias e inmunofluorescencia, y cuantificar la expresión de MUC1-C en células HCC827 transfectadas transitoriamente con la construcción MAL-GFP y en células HCC827 no transfectadas (expresión endógena).
- Generar una línea celular que no exprese endógenamente MUC1 (células HEK 293) mediante la transfección y expresión estable de MUC1 humana transgénica, para comparar con células que sí la expresan endógenamente.

4.- HIPÓTESIS

Al aumentar la expresión de MAL, cambiará la distribución subcelular de MUC1-C, disminuyendo la cantidad de MUC1-C en el núcleo celular.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Líneas celulares y cultivo celular

Células HCC827.- Son células epiteliales humanas de pulmón, con crecimiento adherente, provenientes de un paciente caucásico, de sexo femenino y 39 años de edad con adenocarcinoma aisladas en 1994 (**Fig.8**). Este adenocarcinoma de pulmón tiene una mutación adquirida en el dominio tirosin-cinasa del EGFR (eliminación de E746 - A750).⁽⁸²⁾

Estas células crecen en monocapa con medio RPMI a 37 °C y 5% de bióxido de carbono. Se ha demostrado que MUC1 es ampliamente sobreexpresada en células de NSCLC incluyendo las HCC827.⁽⁷⁹⁾

ATCC Number: **CRL-2868**™
Designation: **HCC827**

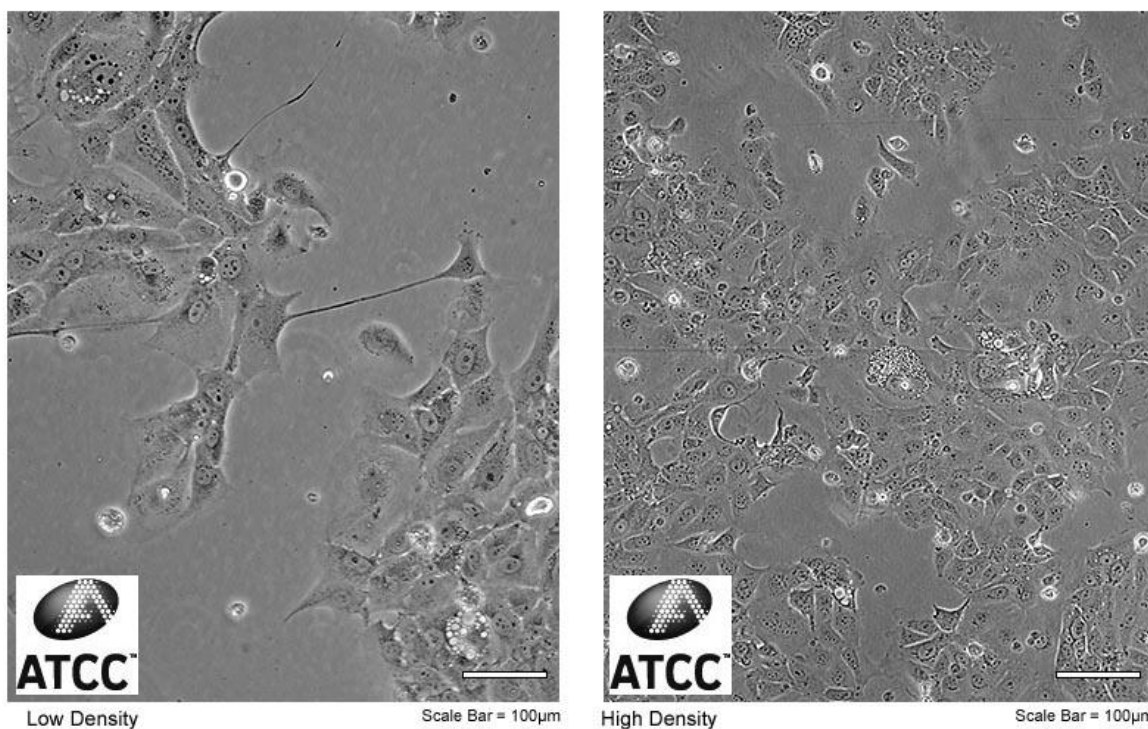


Figura 8.- Células HCC827 cultivadas en medio RPMI y condiciones estándar.⁽⁷⁹⁾

Células HEK 293.- Estas células, conocidas como HEK293, son una línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano (**Fig.9**). Estas células son muy sencillas de cultivar en medio DMEM a una temperatura de 37 °C en condiciones estándar y presentan alta eficiencia de transfección. ⁽⁸⁰⁾

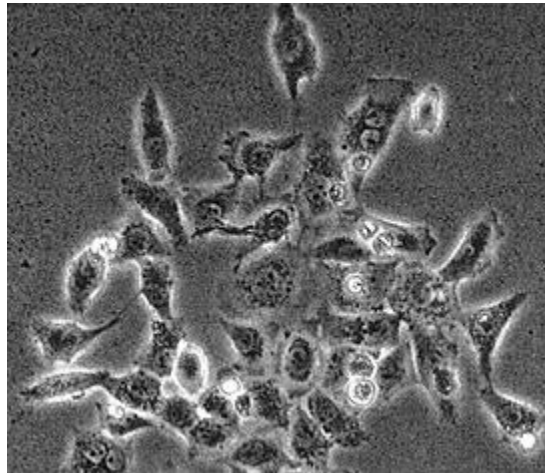


Figura 9.- Células HEK 293 cultivadas durante varios días en medio de cultivo estándar. Células e imagen de EnCor Inc. de Biotecnología. ⁽⁸⁰⁾

5.2.- Plásmidos y transfecciones

El plásmido pcDNA3.1/higromicina y las construcciones pcDNA3.1/higromicina-MAL-GFP y pcDNA3.1/higromicina-MAL-myc fueron donadas por el Dr. Peter Arvan, de la Universidad de Michigan, Estados Unidos. Esos plásmidos se usaron para hacer transfecciones transitorias de las células HCC827, usando liposomas (Lipofectamina 2000, Invitrogen) en proporción 8uL/2ug DNA, en medio Opti-MEM (Gibco), sin suero fetal. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 60%, y se dejaron 6 horas con la mezcla de plásmido y liposomas. Posteriormente se cambió el medio a RPMI suplementado con suero y el fenotipo se analizó a las 48 horas post-transfección. Para transfectar las células HEK293 y generar una línea celular estable que exprese MUC1-22r humana, se siguió el mismo protocolo, pero con la construcción pcDNA3.1/higromicina-hMUC122r, donada por la Dra. Hughey, Pensilvania, Estados Unidos, y las células que expresaban MUC1-22r humana se seleccionaron con 250 µg/mL de higromicina B en el medio de cultivo.

La replicación de los plásmidos se hizo en células competentes *E. coli* DH5- α . Aproximadamente 5 ng de plásmido se incubó con las bacterias y se indujo la transformación mediante choque térmico (45 seg a 37°C y 2 min en hielo). Las bacterias fueron cultivadas 1 hr en medio líquido SOC y se sembraron en placas de LB agar conteniendo 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, y se dejó crecer colonias toda la noche a 37°C. Se picaron 2 o 3 colonias y se crecieron en LB líquido con la misma concentración de ampicilina. El plásmido amplificado se purificó a partir de los medios líquidos de LB utilizando el kit Ultra Clean Mini o Midi Plasmid Prep (MO BIO, California, USA), dependiendo del volumen de cultivo. Brevemente, se hizo el lisado de las bacterias en cultivo, se precipitó la proteína y el DNA cromosómico, manteniendo soluble el DNA del plásmido. El plásmido se adsorbió en una membrana de sílica, y se lavó con etanol para mantener precipitado el DNA, y finalmente se eluyó el plásmido purificado con un amortiguador de TRIS-EDTA pH: 7.4, el plásmido se guardó a 4°C. La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente.

5.2.1.- Electroforesis en agarosa

Para analizar la pureza de los plásmidos se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% en, amortiguador tris-etanolamina pH 8.0, y bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 100 V por media hora, se pusieron marcadores de peso y el gel se observó en un trans-iluminador con luz UV.

5.3.- Inmunoprecipitación

Una vez transfectadas las células HCC 827 (aproximada mente 3×10^6 con MAL-GFP y otra cantidad igual con un vector pcDNA3.1-higromicina vacío), fueron lisadas con el método REAP, ⁽⁸¹⁾ obteniendo 3 fracciones celulares: lisado total, fracción citosólica y fracción nuclear. Posteriormente se midió la concentración de proteína en las fracciones con el Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ver más adelante). Se tomó el volumen necesario de cada lisado para obtener una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína utilizando como disolvente buffer de dilución (Tris 0.1M, pH 7.4; NP40 10%; EDTA 0.5M). Se llevó a un volumen de 1.3 mL con buffer de dilución y a cada fracción se le agregó 2 μL de anticuerpo anti- β catenina. Se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente se le retiró la agitación y se centrifugó pop-spin, se le agregó a cada fracción 30 μL de proteína G-agarosa y

se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos y el sobrenadante se guardó en congelación. El pellet se lavó una vez con buffer de lavado (Tris 1M, pH 7; EDTA 0.5M; NaCl 5M), y se resuspendió y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm, posteriormente, se agregaron 20 μ L de agua y 20 μ L de buffer de muestra de electroforesis (tris 0.5M, SDS 1%, β -mercaptoetanol 5%, pH: 6.8, de acuerdo al método de Laemmli, ⁽⁸²⁾ una vez homogenizado de hirvió por 5 minutos para después centrifugarlo. Se tomó el sobrenadante y se procedió a la electroforesis y la IET.

5.3.1.- Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit de Pierce TM (BCA Protein Assay Kit), el cual se basa en dos reacciones de quelación. Este kit combina la bien conocida reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas en medio alcalino, con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión Cu^{1+} en ácido bicinconínico (BCA). El primer paso es la quelación del cobre con las proteínas en un ambiente alcalino para formar un complejo azul claro. En esta reacción, conocida como reacción de Biuret, los péptidos que contiene 3 o más residuos de aminoácidos forman un complejo quelato colorido con los iones Cu^{2+} en medio alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio. En el segundo paso de la reacción, el BCA reacciona con el catión Cu^{1+} que se formó en el paso 1, el producto de reacción de color púrpura intenso es el resultado de la quelación de 2 moléculas de BCA con 1 ión Cu^{1+} . Este complejo es hidrosoluble y muestra una fuerte absorbancia lineal a 562 nm al incrementar las concentraciones de proteína.

5.4.- Fraccionamiento celular: método REAP, y fraccionamiento basado en solubilidad en detergentes

El fraccionamiento se realizó con dos métodos:

- 1) El método REAP (Rapid, Efficient And Practical, por sus siglas en inglés) ⁽⁷⁹⁾. Este método, además de ser económico, nos permite obtener tres fracciones, citoplasma, núcleo y lisado total en poco tiempo. Para obtener las fracciones las células crecidas en placas de 6 pozos, se despegaron con tripsina al 0.25%, se lavaron con PBS frío y se centrifugaron; el sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 450 μ L de buffer

PBS frío con NP40 0.1%, y se lisaron mecánicamente. Se tomaron 150 uL de lisado y se etiquetó como la fracción de lisado total. El remanente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 segundos y se tomaron 150 µL del sobrenadante lo cual es la fracción citosólica, finalmente el sedimento se resuspendió en PBS, se centrifugó para lavarlo, y el botón se resuspendió en 90 µL de buffer PBS-NP40 y se congeló a -80 ° C, la fracción nuclear se obtuvo al sonicar el sedimento.

- 2) Un método alternativo usado para obtener más fracciones subcelulares fue usando el kit de fraccionamiento subcelular basado en la solubilidad en detergentes (Pierce Thermo Scientific, #Lote: 78840), el cual nos permitió la separación de proteínas de cinco compartimentos subcelulares (unidas al citoesqueleto, unidas a cromatina, nucleares solubles, de membrana y citoplasmáticas), ya que cuenta con cuatro amortiguadores de extracción, y esto nos permitió realizarlo en poco tiempo y sin necesidad del uso de ultracentrífuga por gradiente.

5.5.- *Inmunofluorescencia directa e indirecta.*

Las células se crecieron en cubreobjetos de vidrio redondos colocados en pozos de una placa de 24, entre 50 y 60% de confluencia en el medio correspondiente. Después de lavarlas dos veces con PBS se fijaron con una solución de formaldehído al 4% en PBS, pH 7.2, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Se bloquearon con albúmina ultrapura al 1% y los anticuerpos primarios y secundarios se colocaron en una solución de albúmina al 0.1% en amortiguador de Tritón X100 PBS durante 4 horas o toda la noche.

Las muestras fueron examinadas en un microscopio Leica SP8 confocal (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron procesadas con el paquete Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

5.6.- *Electroforesis e inmuno electrotransferencia (IET).*

Las electroforesis se realizaron de acuerdo al método de Laemmli ⁽⁸²⁾ en gel de poliacrilamida al 10% ó 5% dependiendo del peso molecular de las proteínas para analizar.

El gel se preparó de la siguiente manera:

Gel separador:

Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	4.5MI
Amortiguador Tris 1.5M, pH: 8.8, 4X	2.5mL
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30%	3.3 mL
APS (Persulfato de amonio) 10%	50uL
TEMED	50uL

Gel empacador (4%):

Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	3.05mL
Amortiguador Tris 0.5M, pH:6.8 4X	1.25mL
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30%	0.67mL
APS (Persulfato de amonio)	50uL
TEMED	50uL

Se determinó la concentración de proteína de cada muestra utilizando el método del ácido bicinónico, se hirieron 2 minutos en amortiguador desnaturizante (tris 0.5M, SDS 1%, β -mercaptoetanol 5%, pH: 6.8, buffer de Laemmli), y se cargó la misma cantidad de proteína en el gel de acrilamida. La electroforesis se realizó a 120V aproximadamente durante 1 hora en un sistema Mini-Protean Tetra (BioRad, USA).

El gel de acrilamida se transfirió en un sistema semi-seco Power Pac 1000 (BioRad) a una membrana de nitrocelulosa, a 20V durante 1 hora en amortiguador de transferencia (tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% y SDS al 0.1%). La membrana se bloqueó usando una solución de leche sin grasa al 3% en amortiguador TBST (tris 20 mM, cloruro de sodio 0.5 M, tween-20 0.5%, pH7.5) durante al menos 1 hora o toda la noche en agitación suave. El primer anticuerpo se colocó en una solución de leche al 1% en el mismo amortiguador y en dilución de 1:1000 a 1:5000 dependiendo del anticuerpo usado, incubando toda la noche.

Después de lavar la membrana con TBST 2 veces, se colocó el segundo anticuerpo específico para cada anticuerpo primario, acoplado a la enzima peroxidasa de rábano a una dilución 1:5000 y se dejó incubando al menos 1 hora.

Las bandas se detectaron mediante la actividad enzimática de la peroxidasa mediante quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron y procesaron en un equipo Chemi-doc (BioRad, USA).

6.- RESULTADOS

6.1.- Plásmidos.

La pureza de los plásmidos utilizados para los experimentos se comprobó mediante EF en agarosa. Como se puede observar en la **Fig. 10** se observan diferentes tamaños de los plásmidos y las bandas corresponden a por lo menos 3 estados distintos de superenrollamiento.

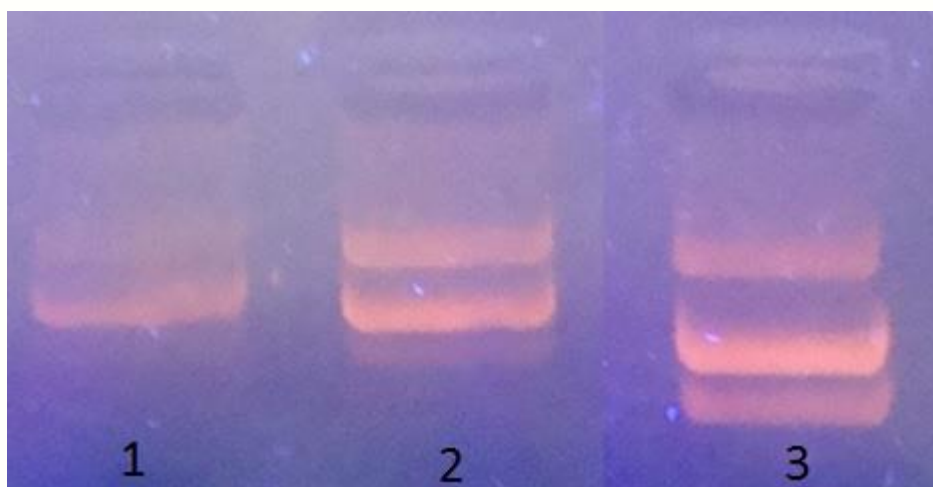


Figura 10.- Electroforesis en agarosa al 1% con bromuro de etidio, para comprobar pureza de los siguientes plásmidos: En el carril 1 se observa un plásmido vacío (*pcDNA3.1/Higromicina*), en el carril 2 se observa el plásmido *hMUC1 22r*, y el tercer carril se observa el plásmido *MAL-GFP* ambos *cDNA* clonados en el mismo vector mostrado en el carril 1.

6.2.- Expresión endógena de MAL en células HCC827.

Primeramente, se determinó la expresión endógena de MAL en las células HCC827 mediante IET, con lisados celulares totales. En la **Fig. 11** se observa que no se detecta una banda de proteína correspondiente a MAL en los lisados totales de esta línea celular (carril 1). Con este dato confirmamos que podíamos usar esta línea celular para realizar los experimentos de expresión transgénica de MAL y observar el fenotipo respecto a MUC1-C.

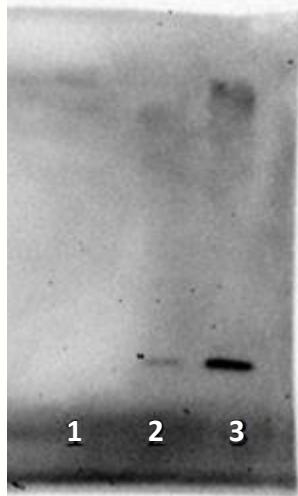


Figura 11.- IET de lisados celulares totales de células HCC287. Carriles: 1) 20 μ g de proteína de lisado total de células HCC827 nativas, 2) 10 μ g de proteína de lisado total de células HEK293 transfectadas transitoriamente con MAL-myc 3) 20 μ g de proteína de lisado total de células HEK 293 transfectadas transitoriamente con MAL-myc. El anticuerpo usado fue anti-MAL, diluido 1/1000.

6.3.- Expresión y distribución de MUC1-C en células HCC827 y HEK293.

La proteína MUC1-C se distribuye en las tres fracciones subcelulares obtenidas por el método REAP, así observamos en la **Fig. 12**, que se detecta MUC1-C en el lisado total y en citoplasma, sin embargo, presenta una cantidad mucho mayor en la fracción nuclear de estas células. Esta distribución corresponde a lo esperado para esta oncoproteína, ya que en células transformadas su localización nuclear favorece la activación transcripcional de genes de proliferación celular, como se mencionó anteriormente en la introducción. Por su parte las células HEK293 no tienen expresión endógena de MUC1, ya que como se observa en la **Fig. 13**, no se detecta la banda correspondiente a MUC1-C en los lisados totales de estas células, pero cuando se transfectaron, y se generó una línea celular que expresa establemente esta proteína, los lisados celulares si son positivos en el IET. En la **Fig. 14** podemos observar la distribución de MUC1 mediante IFI, tanto en las células HEK293-hMUC1-22r y HCC827. La distribución es muy diferente ya que en las HEK293-hMUC1-22r, MUC1 se localiza predominantemente en la región del Golgi y en la membrana plasmática, mientras que las HCC827 muestran un patrón vesicular disperso en todo el citoplasma. Debido a que hay señal

de MUC1 en la región nuclear, hicimos la proyección en el plano z para determinar si se encontraba realmente en el núcleo o cerca de él. En el panel C observamos que MUC1 se encuentra en la región peri-nuclear pero no en el núcleo.

6.4.- Células HEK293 transfectadas con MUC1

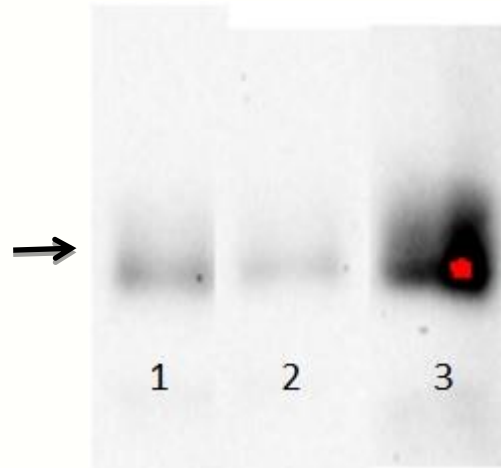


Figura 12.- IET de fracciones subcelulares obtenidas por el método REAP de células HCC827. Carril 1) Lisado total, 2) Fracción citosólica, y 3) Fracción nuclear. El anticuerpo anti-MUC1-C se diluyó 1/5000, y se corrieron 20µg de proteína en cada caso. La flecha indica la posición del marcador de peso molecular correspondiente a 25kDa. Como se puede apreciar, la mayor expresión de MUC1-C se encuentra en la fracción nuclear.

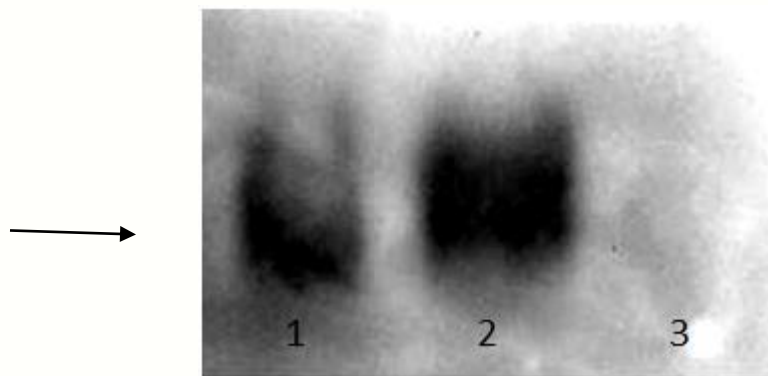


Figura 13.- IET de células HEK293: carriles: 1) lisado total de células HEK293 transfectadas establemente con hMUC-22r. 20µg de proteína, 2) lisado total de células HEK293 transfectadas establemente con hMUC-22r, 40µg de proteína, 3) lisado total de células HEK293, sin transfectar, 40µg de proteína. Anticuerpo anti-MUC1-C 1/5000. La flecha indica la posición del marcador de peso molecular correspondiente a 25kDa. Los carriles 1 y 2 son el control positivo y el carril 3 es el control negativo para mostrar que las células HEK293 no expresan endógenamente MUC1.

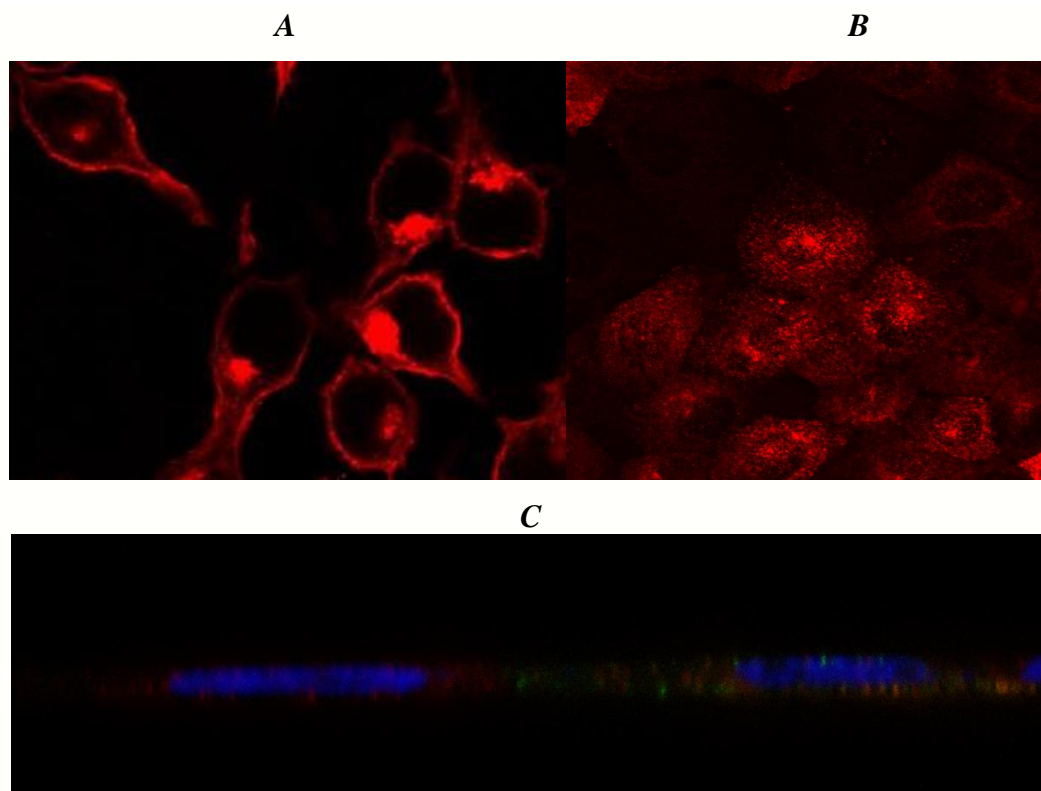


Figura 14.- Inmunofluorescencia indirecta en microscopio confocal A.- de células HEK293-MUC1 y B.- células HCC827. MUC1 (rojo) se distribuye de forma distinta en ambas células, en las primeras se observa principalmente en membrana plasmática y aparato de Golgi y no se aprecia señal de MUC1-C en la región nuclear. En las últimas se observa un patrón vesicular difuso, inclusive en la región nuclear, para determinar si MUC1 está o no en el núcleo se obtuvo la imagen en el plano z. (C). El fluoróforo usado en ambos casos fue Alexa 555.

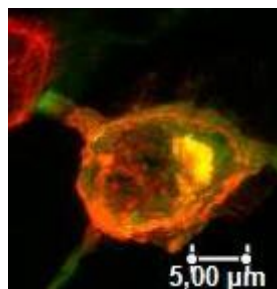


Figura 15.- Inmunofluorescencia indirecta en microscopio confocal de células HEK293-MUC1 transfectadas transitoriamente con la construcción MAL-GFP. La señal verde corresponde a la proteína verde fluorescente fusionada con MAL, y la señal roja corresponde a MUC1 (Alexa 555). Se observa la distribución de ambas proteínas en la membrana plasmática, pero sin clara co-localización (color naranja), lo cual sí se observa en la región del aparato de Golgi (color amarillo).

6.5.- La sobreexpresión de MAL disminuye la cantidad de MUC1-C en el núcleo, tanto en células HCC827 como en HEK293/MUC1.

Como podemos observar en el IET mostrado en la **Fig. 16**, cuando se transfectaron las células HCC827 con el plásmido MAL-GFP, la cantidad de MUC1-C en la fracción nuclear disminuyó importantemente (60%). Esta reducción es significativa y aunque no llega a ser un bloqueo total de la translocación de MUC1-C al núcleo, nos permite determinar que la expresión de MAL interfiere ostensiblemente con el tráfico nuclear de MUC1-C. El mismo resultado se observó con las células HEK293-hMUC1-22r, como podemos ver en la **Fig. 17**.

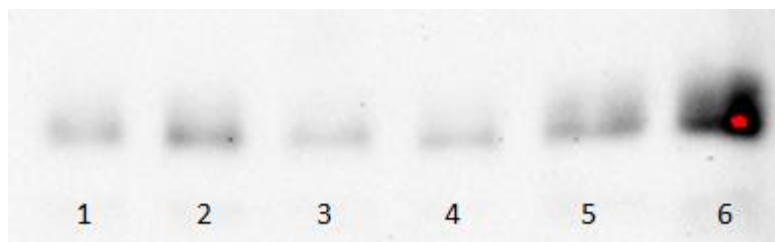


Figura 16.- IET de células HCC827, fraccionadas con el método REAP. Carriles: 1) lisado total, células transfectadas con MAL-GFP, 2) lisado total, células transfectadas con el vector vacío, 3) fracción citosólica, células transfectadas con MAL-GFP, 4) fracción citosólica, células con vector vacío, 5) fracción nuclear, células transfectadas con MAL-GFP, 6) fracción nuclear, células con vector vacío. Se normalizó por concentración de proteína y se corrieron 15 μ g de proteína total, el anticuerpo anti-MUC1-C fue 1/5000. Se aprecia una clara diferencia entre la cantidad de MUC1-C en el núcleo de las células control (vector vacío) y aquellos núcleos de células que sobreexpresan MAL. MAL disminuye la cantidad de MUC1-C en el núcleo. Así mismo se aprecia menos MUC1-C en el lisado total de las células que expresan MAL.

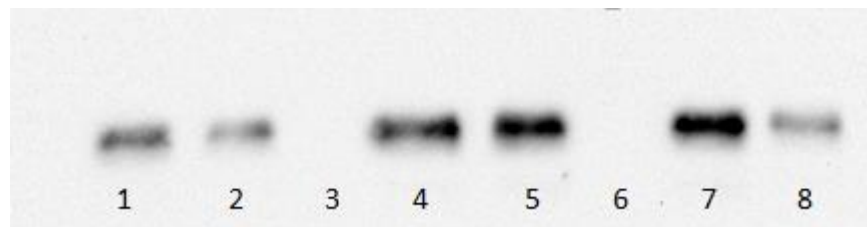
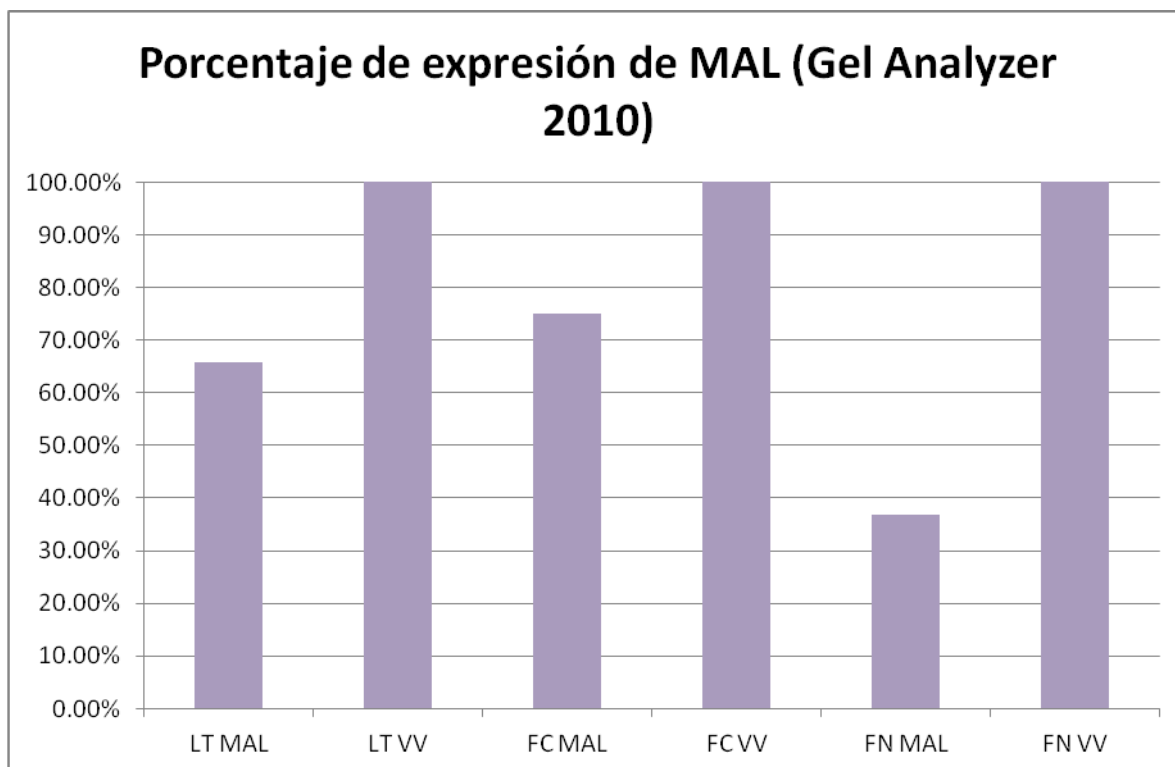


Figura 17.- IET de células HEK293, fraccionadas con el método REAP. Carriles: 1) lisado total células transfectadas con el vector vacío, 2) lisado total, células transfectadas con MAL, 3) carril vacío, 4) Fracción citosólica, células transfectadas con vector vacío, 5) Fracción citosólica, células transfectadas con MAL, 6) carril vacío, 7) Fracción nuclear, células transfectadas con vector vacío, 8) Fracción nuclear, células transfectadas con MAL, Observamos el mismo patrón encontrado en las células HCC827 (**Fig. 16**).



Gráfica 1.- Valores obtenidos por medio del programa Gel Analyzer 2010 para la expresión de MAL en fracciones celulares de células HCC827 transfectadas y no transfectadas mostrada en la **Fig. 16**. LT= lisado total, FC= fracción citoplasmática, FN= fracción nuclear, VV= células transfectadas con el vector vacío y MAL, células transfectadas con el plásmido con la construcción MAL-GFP. Para cada fracción celular el número de pixeles que corresponde al 100% se tomó para los valores obtenidos con el vector vacío, y los correspondientes a los valores con MAL se muestran en % de inhibición.

6.6.- La expresión de MAL disminuye la cantidad de MUC1-c unida a la β -catenina.

En la **figura 18** observamos el resultado de un experimento de co-inmunoprecipitación, usando anticuerpo anti- β -catenina y un anticuerpo anti MUC1-C para la IET. La β -catenina es ligando de MUC1-C, y como podemos observar existe menor cantidad de MUC1 que precipita unido a esta proteína, lo cual indica que la disminución en la cantidad de MUC1-C encontrada cuando se expresa MAL también repercute en cuánto MUC1-C se puede unir a la β -catenina.

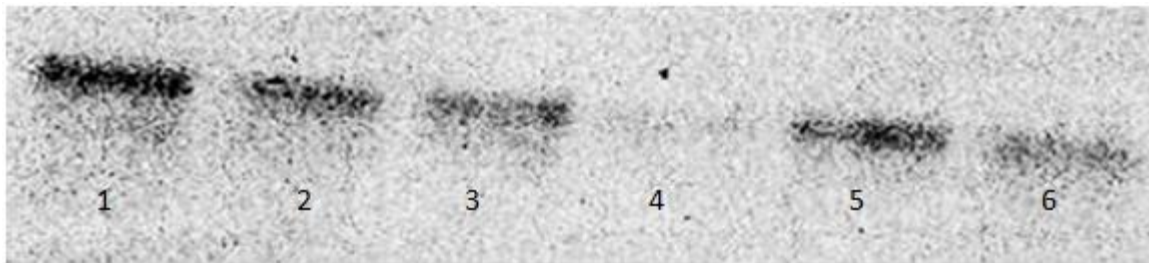


Figura 18.- IET de fracciones subcelulares de células HEK 293-MUC1 transfectadas transitoriamente con MAL-GFP. Las fracciones se inmunoprecipitaron con exceso de anticuerpo anti- β -catenina. La IET se hizo con anti-MUC1-C en las condiciones anteriormente señaladas. Carriles: 1) lisado total, vector vacío, 2) lisado total, células transfectadas con MAL, 3) fracción citosólica, vector vacío, 4) fracción citosólica, células transfectadas con MAL, 5) fracción nuclear, vector vacío, 6) fracción nuclear, células transfectadas con MAL. Aunque se observa que en general hay menos MUC1-C co-inmunoprecipitada con la β -catenina, son notorias las diferencias en las fracciones citosólicas y nucleares.

7.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En la literatura, no hay datos reportados que indiquen si las células HCC827 expresan endógenamente MAL, por ello probamos esa posibilidad ya que esa línea celular sería nuestro modelo de estudio. Como observamos en la **Fig. 11**, no se detectó por IET la presencia de proteína MAL en las células HCC827 silvestres, por lo que se concluimos que no existe expresión endógena considerable de dicha proteína. Con respecto a la expresión de la proteína MUC1 por estas células se puede observar en la **Fig. 12** que sí expresan una cantidad considerable de MUC1 de forma endógena y la proteína se detecta en las diferentes fracciones celulares obtenidas: lisado total, fracción citosólica y fracción nuclear, notándose mayor cantidad de MUC1-C en la fracción nuclear. Aunque cabría esperar que el lisado total tuviera más cantidad de MUC1, ya que debería sumar las fracciones citosólica y nuclear, en este caso esto no es así porque el detergente usado en el método REAP, (NP-40) no produce la lisis de la membrana nuclear, y los núcleos se rompen y liberan su contenido sólo hasta que son lisados por sonicación. Esta característica del método REAP nos permitió obtener en forma muy pura y sin contaminación las fracciones citoplásmica y nuclear, y por ello decidimos usarlo en este proyecto, ya que además los resultados obtenidos con el kit de separación subcelular comercial (Pierce) fueron muy semejantes y no se muestran.

La distribución predominantemente nuclear de MUC1-C nos permitió analizar con mejor precisión la disminución de esta proteína en el núcleo cuando se sobreexpresó la proteína MAL en las células HCC827. Por otro lado, observamos que las células HEK293 no expresan endógenamente MUC1 (**Fig. 13**), por esta razón decidimos usarlas para la expresión transgénica de MUC1, y generar un modelo alternativo que nos permitiera saber si el fenotipo que observamos en las células HCC827 era algo más general o una particularidad de esas células. La distribución celular de MUC1 expresada transgénicamente en células HEK293, determinada mediante IFI se observa en la **Fig. 14**. MUC1-C se localiza principalmente en membrana plasmática (como se esperaba) y en el Golgi. No se detectó señal en la zona correspondiente al núcleo. Este dato no descarta que MUC1-C esté presente en los núcleos, ya que no teñimos este organelo, ni tampoco hicimos una amplificación alta de las imágenes. Es importante señalar que es muy difícil encontrar en la literatura referencias en las cuales hayan podido detectar MUC1-C en el núcleo mediante esta técnica ⁽⁸³⁾. Se esperaba poder observarlo debido a que la línea celular HEK293-hMUC122r sobreexpresa MUC1 y la cantidad de ésta

en el núcleo debería ser alta, sin embargo, las células HCC827 sobreexpresan endógenamente MUC1 y tampoco se pudo ver MUC1-C en sus núcleos (**Fig. 14**), ya que como se observa en el panel C, no hay co-localización de la señal de MUC1 en rojo y los núcleos teñidos en azul con el fluoróforo Hoescht 33258. Por otra parte, la distribución tan distinta de MUC1 observada en las dos líneas celulares podría explicarse porque en principio las células HEK293 no son epiteliales y no expresan MUC1, sin embargo al ser transfectadas con un cDNA con el gen hMUC1-22r, la proteína se distribuye en las regiones en donde se ha descrito en células epiteliales “normales” lo cual indica que estas células poseen la maquinaria proteica necesaria para transportar la proteína transgénica en forma semejante a como sucede en células epiteliales. Por otra parte, las células HCC827 derivan de un adenocarcinoma pulmonar (NSCLC), por lo que su sobreexpresión ahora está influenciada también por la transformación de las células, lo cual produce probablemente una distribución anormal de la mucina, esto concuerda con lo descrito para la distribución de MUC 1 en células de cáncer y de mama de tiroides, en donde se observa a MUC1 presente en vesículas citoplásmicas. ^(84,85)

El efecto de la expresión transgénica de la proteína MAL se caracterizó por una reducción significativa de los niveles de MUC1 en células HCC827, y ésta fue mayor en la cantidad de MUC1-C en la fracción nuclear, representada por un 63%, como se observa en la **Fig. 16** y **Gráfica 1**. De igual forma, observamos el mismo fenotipo causado por la expresión de MAL en el modelo alternativo generado en células HEK293-hMUC1-22r, **Fig. 17**. Lo cual nos indica que la expresión de la proteína MAL, está relacionada con la disminución de los niveles de la proteína MUC1, y es un proceso más general, no sólo limitado a una línea celular de cáncer pulmonar humano. El fenotipo descrito tiene implicaciones importantes debido a que hasta ahora en la literatura no se ha descrito alguna asociación ya sea fisiológica o asociada a alguna patología entre MAL y MUC1-C. Tampoco se ha establecido que la expresión de la primera altere el tráfico celular de la segunda, sin embargo, sí se ha demostrado que MUC1 es un ligando natural de otro miembro de la familia MAL, la proteína MAL-2, la cual está implicada en el tráfico de proteínas a la región baso-lateral de la membrana de células epiteliales. Interesantemente, en este mismo trabajo también se demostró que MUC1 interacciona físicamente con MAL mediante el método de doble-híbrido en levaduras, no obstante, no se postuló algún significado fisiopatológico de dicha interacción.

(84)

En la **Fig. 15**, Se puede observar claramente que cuando las células HEK293-hMUC1-22r expresan MAL transgénicamente, existe co-localización de MUC1 y MAL en la región del Golgi, sin embargo, no se puede determinar con precisión si esa co-localización se debe a que ambas están transitando por el sistema RE-Golgi, o están interactuando físicamente a ese nivel. Por otro lado, tampoco se puede observar que exista colocalización de ambas en la MP o en el citoplasma, lo cual podría indicar que probablemente MAL y MUC1-C no interaccionan al menos en los modelos celulares usados en este trabajo. Por este motivo se buscó una explicación del fenotipo encontrado, siguiendo el siguiente razonamiento: MUC1-C interacciona con la proteína β -catenina en el citoplasma y en el núcleo, ⁽⁸⁶⁾ y esta interacción resulta importante para que MUC1-C sea traslocada al núcleo y actúe activando genes como Myc y Ciclina D1, los cuales favorecen la progresión del ciclo celular. Por ello decide determinar si la expresión de la proteína MAL, afectaba la unión de MUC1-C con la proteína β -catenina mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Es importante mencionar también que, en las células cancerosas, el aumento de la expresión de MUC1 promueve la invasividad de células cancerígenas a través de la interacción de β -catenina con la E-caderina, lo que resulta en la iniciación de la transición epitelio-mesenquimal y promueve la formación de metástasis, ⁽⁸⁷⁾ ya que las uniones entre las células transformadas son más débiles. En la **Fig. 18**, se demostró que la expresión de MAL reduce la cantidad de MUC1-C que co-precipita con el anticuerpo anti- β -catenina, y la cantidad de MUC1-C en el núcleo cuando se expresa la proteína MAL es menor aproximadamente en el mismo porcentaje que observamos en la **Fig. 16**. Por lo que este dato coincide con el fenotipo descrito antes, pero, además encontramos que la cantidad de MUC1-C en el citoplasma de las células transfectadas con MAL es cercana a cero, lo cual indica que muy probablemente MUC1-C no se está uniendo en el citoplasma a la β -catenina y por ello llega menos MUC1-C al núcleo. La explicación de este fenómeno podría deberse a que el dominio citoplásmico MUC1-C no está fosforilado en la tirosina de la secuencia SPY (Y46) (**Fig. 4**). La fosforilación de esa tirosina la realizan tanto el EGFR como la cinasa de tirosinas c-Src. La actividad cinasa de tirosinas de c-Src es potenciada por auto-fosforilación en tirosina 418 (Y418) en respuesta a estímulos extracelulares como factores de crecimiento y matrices extracelulares, mientras que la actividad de c-Src es regulada negativamente por fosforilación de su tirosina regulatoria (Y529), la cual es catalizada por la cinasa SRC c-terminal (CsK). ⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾ El mecanismo

regulatorio para la función de c-Src ha sido intensivamente analizado por estudios moleculares,⁽⁹¹⁾ así como por estudios teóricos.

Es importante mencionar que la actividad catalítica de c-Src está regulada por la miristoilación y/o palmitoilación. Cuando c-Src tiene unidos estos ácidos grasos se inhibe su actividad de cinasa de tirosinas, porque se encuentra unido a los rafts específicamente a las caveolas en la MP y su dominio catalítico no es accesible.⁽⁹²⁾ Como se mencionó antes, MAL es un componente de los GEM de membrana, y aunque no se encuentra en las caveolas, sí es posible que al aumentar la expresión de MAL, se incremente la cantidad de GEM o rafts en la membrana de las células transformadas, y que estos GEM ahora estén accesibles para que c-Src miristoilado pueda interactuar con ellos, ya que como se ha perdido la polaridad debido a la transformación c-Src podría estar muy cercano a estos GEM distintos a las caveolas, de esta forma, la posibilidad de que c-Src sea inhibida es mayor, lo cual explicaría el hallazgo encontrado en el con la inmunoprecipitación de la β -catenina. En concordancia con esta suposición, se sabe que los GEM y particularmente MAL, sirven como ancla para unir otras cinasas de esa familia c-Src como Lck, y esta interacción también la inactiva.⁽⁶²⁾

8.- CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que la sobreexpresión de MAL en células epiteliales transformadas (HCC827) y en células no epiteliales que expresan transgénicamente MUC1 (HEK293), interfiere en el tráfico de la subunidad MUC1-C, provocando que haya una menor cantidad de ésta en el núcleo. Esto constituye la primera evidencia experimental que describe un mecanismo por el cual la proteína MAL puede ejercer su función antioncogénica.

También se encontró que MUC1-C se une menos a la proteína beta-catenina sobretodo en el citoplasma, por lo que pensamos que esto podría explicar que haya menos MUC1-C en los núcleos.

Por otra parte, se logró crear una línea celular que exprese de forma endógena MUC1 mediante la transfección estable de células HEK293.

9.- PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se piensa y se propone como siguiente paso para este proyecto, el estudio de la fosforilación de MUC1-C por c-Src en células transfectadas con MAL para determinar si ese es el mecanismo responsable por el cual MAL disminuye la translocación de MUC1-C al núcleo. Es necesario comprobar si MUC1-C cambia su estado de fosforilación cuando se expresa MAL, y si esto se debe a que c-Src puede estar inactivándose en las balsas lipídicas (GEM), lo que no permitiría que c-Src pueda fosforilar la tirosina en la secuencia SPY de la subunidad MUC1-C, ya que, al encontrarse anclada a las balsas, su dominio catalítico se encuentra inaccesible, provocando que beta-catenina no pueda unirse a la subunidad y así migrar al núcleo.

10.- REFERENCIAS

1. Young, T., y Min, Z. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. *Yonsei Medical Journal*, 46(5), 597–613.
2. Zhou, B., y Elledge, S. (2010). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.
3. Kastan, M., y Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323.
4. Sperka, T., Wang, J., y Rudolph, K. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(9), 579-90.
5. Klermund, J., Bender, K., y Luke, B. (2014). High Nutrient Levels and TORC1 Activity Reduce Cell Viability following Prolonged Telomere Dysfunction and Cell Cycle Arrest. *Cell reports*, 9(1), 324-35.
6. Duronio, R., y Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a008904.
7. Miettinen, H., Paunu, N., Rantala, I., Kalimo, H., Paljärvi, L., Helin, H., y Haapasalo, H. (2001). Cell cycle regulators (p21, p53, pRb) in oligodendrocytic tumors: a study by novel tumor microarray technique. *J. Neurooncol*, 55(1), 29-37.
8. Wu, J., Lv, Q., He, J., Zhang, H., Mei, X., Cui, K., ... y Zhang, Y. (2014). MicroRNA-188 suppresses G1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 66.
9. Lee, M., Song, B.J., y Kwon, Y. (2014). Ethanol Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis in SK-N-SH Neuroblastoma Cells. *Journal of cancer prevention*, 19(1), 39-46.
10. Casini, T., y Pelicci, P. (1999). A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. *Oncogene*, 18(21), 3235-3243.
11. Quezada, M. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Contactos*, 65, 5-12.
12. Hansakul, P., Aree, K., Tanuchit, S., e Itharat, A. (2014). Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non small-cell lung cancer A549

- cells. *BioMed Central complementary and alternative medicine Complementary and alternative medicine*, 14(1), 413.
13. Hanahan, D., y Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
 14. Koay, M., Crook, M., y Stewart, C. (2012). Cyclin D1, E-cadherin and beta-catenin expression in FIGO Stage IA cervical squamous carcinoma: diagnostic value and evidence for epithelial–mesenchymal transition. *Histopathology*, 61(6), 1125–1133.
 15. Tan, H., Moad, A., y Tan, M. (2014). The mTOR Signalling Pathway in Cancer and the Potential mTOR Inhibitory Activities of Natural Phytochemicals. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 15(16), 6463-6475.
 16. Okinaga, T., Ariyoshi, W., Akifusa, S., y Nishihara, T. (2013). Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Medical microbiology and immunology*, 202(2), 167-174.
 17. Doll, R., y Peto, R. (1981). The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 1193-1308.
 18. Domínguez, L. (2004). Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer*, 1, 1-9.
 19. Pitot H. y Dragan Y. (1996). Chemical Carcinogenesis. In Casaret and Doulls Toxicology V edition. C D. Klaasen (eds). Mc Graw-Hill. New York. Páginas, 201-267.
 20. What is Cancer? (2015). Maryland, E.U.: *National Cancer Institute*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
 21. Varmus, H., Weiss, R., Friis, R., Levinson, W., y Bishop, J. (1972). Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs (reassociation kinetics-RNA tumor viruses-gas antigen-Rous sarcoma virus, chick cells). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69(1), 20-24.
 22. Columbano A. (1991). Chemically Induced Cell Proliferation and Carcinogenesis. In: Chemically induced cell proliferation: implications for risk assessment. B. E. Butterworth T. J. Slaga (eds.). Wiley-Liss Inc., New York. Páginas, 217-275.
 23. Moctezuma, C., y Patiño, M. (2009). Cáncer de pulmón. *Anales de Radiología México*, 1, 33-45.

24. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. (2014). México: *Infocáncer*. Recuperado de <http://www.infocancer.org.mx/estadsticas-a-proposito-del-da-mundial-contra-el-cncer-con783i0.html>
25. Morbilidad (Tumores malignos en la población de 20 y más). (2014). México: *Infocáncer*. Recuperado de <http://www.infocancer.org.mx/morbilidad-tumores-malignos-en-la-poblacin-de-20-y-ms-con787i0.html>
26. What Is Non-Small Cell Lung Cancer? (2016). Georgia, E.U.: *American Cancer Society*. Recuperado de <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>
27. Rabassa, M, & Segal-Eiras, A. (2005). *Estudio de las mucinas polimórficas epiteliales asociadas a tumores malignos* (tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
28. Marin, F., Luquet, G., Marie, B., y Medakovic, D. (2007). Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. *Current Topics in Developmental Biology*, 80(209), 76.
29. Niv, Y. (2008). MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J. Gastroenterol*, 14(14), 2139-2141.
30. Raina, D., Kosugi, M., Ahmad, R., Panchamoorthy, G., Rajabi, H., Alam, M., ...Kufe D. (2011). Dependence on the MUC1-C Oncoprotein in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.*, 10(5), 806-816.
31. Atzin, J., Saldaña, A., Bernal, D., Vázquez, M., Serrato, A., y Gorocica, P. (2009). Expresión de MUC1 hipoglicosilada en adenocarcinoma pulmonar y sus metástasis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 22(4), 295-303.
32. Nath, S., y Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), 332-342.
33. Albrecht, H., y Carraway, K. (2011). MUC1 and MUC4: Switching the Emphasis from Large to Small. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals*, 26(3), 261-271.
34. Price, M., Rye, P., Petrakou, E., Murray, A., Brady, K., Imai, S., ...Hilgers, J. (1998). Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. *Tumour Biol.*, 19(1), 1-20.

35. Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D., y Dalziel, M. (1999). MUC1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455(2-3), 301-313.
36. Gendler, S. (2001). MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6(3), 339-353.
37. Carraway, K., Hull, S. (1991). Cell surface mucin-type glycoprotein and mucin like domains. *Glycobiology*, 1(2), 131-138.
38. Gallegos, I., Coutiño, R., Martínez, G., y Hernandez, P. (2008). Marcadores glicosilados en cáncer de mama. *Rev. Educ. Bioquímica*, 27(2), 52-59.
39. Zhuang, D., Yousefi, S., y Dennis J. (1991). Tn antigen and UDP-Gal:GalNAc alpha-R beta1-3Galactosyltransferase expression in human breast carcinoma. *Cancer Biochem. Biophys.*, 12(3), 185-198.
40. Cao, Y., Karsten, U., Otto, G., y Bannasch, P. (1999). Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch.*, 434(6), 503-509.
41. Hollingsworth, M., y Swanson, B. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer*, 4(1), 45-60.
42. Kufe, D. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 9(12), 874-885.
43. Pochampalli, M., el Bejjani, R., y Schroeder, J. (2007). MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*, 26(12), 1693-1701.
44. Merlin, J., Stechly, L., de Beaucé, S., Monté, D., Leteurtre, E., van Seuniungen, I., ... y Pigny, P. (2011). Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 30(22), 2514-2525.
45. Behrens, M., Grandgenett, P., Bailey, J., Singh, P., Yi, C., Yu, F., y Hollingsworth, M. (2010). The reactive tumor microenvironment: MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF. *Oncogene*, 29(42), 5667-5677.
46. Kufe, D. (2010). Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation. *Oncogene*, 29(42), 5663-5666.
47. Burchell, J., Mungul, A., y Taylor-Papadimitriou, J. (2001). O-linked glycosylation in the mammary gland: Changes that occur during malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6(3), 355-364.

48. Carraway, K., Funes, M., Workman, H., y Sweeney, C. (2007). Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 78, 1-22.
49. Welsch, U. (2006). *Fisiología*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. S.A.
50. Devlin, T. (2004). *Bioquímica*. Barcelona, España: Editorial Reverté.
51. Brown, D., y London, E. (1997). Structure of detergent resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240(1), 1-7.
52. Martín-Belmonte, F., Millán, J. (2001). Estructura y función de las balsas lipídicas ("rafts"), dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. *Inmunología*, 20(4), 216-224.
53. Brown, D., y Rose, J. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533-44.
54. Brown, D., y London, E. (2000). Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.*, 275(23), 17221-17224.
55. Simons, K., y Van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197-6202.
56. Skibbens, J., Roth, M., y Matlin, K. (1989). Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 108(3), 821-832.
57. Pérez, P., Puertollano, R. y Alonso, M. (1997). Structural and biochemical similarities reveal a family of proteins related to the MAL proteolipid, a component of detergent-insoluble membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232(3), 618-621.
58. Razani, B., Woodman, S., y Lisanti, M. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, 54(3), 431-467.
59. Puertollano, R., Martín-Belmonte, F., Millán, J., de Marco, M., Albar, J., Kremer, L. y Alonso, M. (1999). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.*, 145(1), 141-151.

60. Cheong, K., Zacchetti, D., Schneeberger, E., y Simons, K. (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(11), 6241-6248.
61. Liu, P., Rudick, M., y Anderson, R. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.*, 277(44), 41295-41298.
62. Llorente, A., de Marco, M., y Alonso, M. (2004). Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *Journal of Cell Science*, 117, 5343-5351.
63. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T., y Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(22), 10339-10343.
64. Smart, E., Ying, Y., Donzell, W., y Anderson, R. (1996). A role for caveolin in the transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 271(46), 29427-29435.
65. Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., y Simons, K. (1998). Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J. Cell. Biol.*, 142(6), 1413-1427.
66. Lecat, S., Verkade, P., Thiele, C., Fielder, K., Simons, K., y Lafont, F. (2000). Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells. *J. Cell. Sci.*, 113(14), 2607-2618.
67. Millán, J., Puertollano, R., Fan, L., Rancaño, C., y Alonso, M. (1997). The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membranes subdomains on human T-lymphocytes. *Biochem. J.*, 321(1), 247-252.
68. Martín-Belmonte, F., Kremer, L., Albar, J., Marazuela, M., y Alonso M. (1998). Expression of the MAL gene in the thyroid: the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, is apically distributed in thyroid follicles. *Endocrinology*, 139(4), 2077-2084.
69. Millán, J., y Alonso, M. (1998). MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.*, 28(11), 3675-3684.
70. Martín-Belmonte, F., Puertollano, R., Millán, J., Alonso, M. (2000). The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the

- polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol. Biol. Cell.*, 11(6), 2033-2045.
71. Ramnarayanan, S., Cheng, C., Bastaki, M., y Tuma, P. (2007). Exogenous MAL Reroutes Selected Hepatic Apical Proteins into the Direct Pathway in WIF-B Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2707–2715.
72. Alonso, M., y Weissman, S. (1987). cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(7), 1997–2001.
73. Kim, T., Fiedler, K., Madison, D., Krueger, W., y Pfeiffer, S. (1995). Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 42(3), 413–422.
74. Mimori, K., Shiraishi, T., Mashino, K., Sonoda, H., Yamashita, K., Yoshinaga, K., ... y Mori, M. (2003). MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway. *Oncogene*, 22, 3463–3471.
75. Buffart, T., Overmeer, R., Steenbergen, R., Tijssen, M., van Grieken, N., Snijders, P., ... y Meijer, G. (2008). MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 99(11), 1802-1807.
76. Suzuki, M., Shiraishi, K., Eguchi, A., Ikeda, K., Mori, T., Yoshimoto, K., ... y Baba, H. (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 29(4), 1308-1314.
77. Rancaño, C., Rubio, T., Alonso, M. (1994). Alternative splicing of human T-cell-specific MAL mRNA and its correlation with the exon/intron organization of the gene. *Genomics*, 21(2), 447-450.
78. Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A., y Alonso, M. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.*, 27(12), 599–601.
79. HCC827 (ATCC® CRL-2868™). (2016) Virginia, E.U.: *American Type Culture Collection*. Recuperado de <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2868.aspx>

80. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., y Graham, F. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.*, 16(8), 869-871.
81. Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R., Fujita, D., y Riabowol, K. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Research Notes*, 3, 294.
82. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
83. Kumar, P., Lindberg, L., Thirkill, T., Ji, J., Martsching, L., y Douglas G. (2012). The MUC1 Extracellular Domain Subunit Is Found in Nuclear Speckles and Associates with Spliceosomes. *PLOS one*, 7(8), e42712.
84. Fanayan, S., Shehata, M., Agterof, A., McGuckin, M., Alonso, M., y Byrne, J. (2009). Mucin1 (MUC1) is a novel partner for MAL2 in breast carcinoma cells. *BMC Cell Biology*, 10, 7.
85. Bièche, I., Ruffet, E., Zweibaum, A., Vildé, F., Lidereau, R., y Franc, B. (1997). MUC1 mucin gene, transcripts, and protein in adenomas and papillary carcinomas of the thyroid. *Thyroid*, 7(5), 725-731.
86. Udhayakumar, G., Jayanthi, V., Devaraj, N., y Devaraj, H. (2007). Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in H. pylori-induced gastric cancer. *Mol. Carcinog.*, 46(9), 807-817.
87. Huang, L., Lu, J., Wroblewski, V., Beals, J., y Riggin, R. (2005). In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal. Chem.*, 77(5), 1432-1439.
88. Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J., y Nakagawa, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature*, 351, 69-72.
89. Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., ... y Aizawa, S. (1993) Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, 73(6), 1125-1135.
90. Okada, M. (2012). Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int. J. Biol. Sci.*, 8(10), 1385-1397.
91. Yeatman, T. (2004). A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer*, 4(6), 470-480.

92. Saitou, T., Kajiwara, K., Oneyama, C., Suzuki, T., y Okada, M. (2014). Roles of Raft-Anchored Adaptor Cbp/PAG1 in Spatial Regulation of c-Src Kinase. *PLOS one*, 9(3), e93470.