



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

REGULACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA DE  
ADHESION E-CADERINA POR ESTROGENOS EN LAS LINEAS  
CELULARES HUMANAS MCF-7, C-33 Y SW620.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A:

**ANEL MONICA GALVAN SANDOVAL**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra.
Vocal	Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Secretario	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez.
1er. Suplente	Prof. Oscar Armando Pérez Méndez.
2º. Suplente	Prof. Diana Barrera Oviedo.

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

Laboratorio de Biología Molecular.

Departamento de Biología.

Facultad de Química. UNAM.

Asesor del tema: \_\_\_\_\_

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Supervisor técnico: \_\_\_\_\_

M. en C. José Dolores Solano Becerra.

Sustentante: \_\_\_\_\_

Anel Mónica Galván Sandoval.

## **DEDICATORIAS.**

### **A Dios:**

Por concederme la gracia de la vida, por tu amor y por haberme entregado el tesoro más importante de mi vida: mi familia.

### **A mis Padres: Gilberto y Ofelia.**

Gracias por su infinito amor y por todos los sacrificios que hicieron para que yo consiguiera una de las metas más importantes de mi vida. Gracias por todos sus sabios consejos y apoyo para que yo siguiera adelante. A mi padre, mi ángel, por cuidarme y haberme enseñado amar la vida. A mi madre, mi fe de lucha, gracias por tu amor puro e incondicional y por dar tu vida por mi. Gracias papá, Gracias mamá, los amo infinitamente.

### **A mis hermanos: Odilón, Gilberto, José Luís y Magdaleno:**

Por todos los momentos que hemos pasado juntos y por su incondicional apoyo, sin ustedes, este camino hubiera sido muy difícil. Gracias por ser mi sostén y estímulo. Los amo.

### **A mis cuñadas: Guadalupe y Verónica.**

Por el apoyo y cariño que me han dado.

### **A mis sobrinas: Diazaret, Maleny y Nayeli.**

Por que su sonrisa, inocencia y ternura me motiva a seguir adelante.

### **A mi familia:**

Por su amor, motivación y apoyo. Los llevo en el corazón.

### **A mis amigos:**

Gracias por formar parte de mi vida, por todos los momentos que pasamos juntos en la lucha de nuestros sueños y por su sincera y hermosa amistad. Los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente a la Facultad de Química:**

Por tener el privilegio de pertenecer a esta honorable y reconocida institución, en la cual recibí una excelente formación humana y profesional.

### **A la Dra. Angelina Quintero Ruiz:**

Un reconocimiento especial con respeto y admiración a la Dra. Angelina Quintero por haber entregado su vida a la investigación. Muchas gracias por haber compartido conmigo sus conocimientos y amistad, y por su motivación constante en la realización de este trabajo de investigación.

### **Al Dr. Marco Antonio Cerbón:**

Con especial agradecimiento al Dr. Marco Antonio Cerbón por haber aceptado continuar con la realización de este trabajo de investigación. Muchas gracias por su apoyo, dedicación y por compartir sus conocimientos e inquietudes conmigo.

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

Muchas gracias por tu amistad, apoyo, paciencia y por compartir tus conocimientos conmigo.

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

Gracias por sus consejos y apoyo durante la realización de este trabajo.

### **Al M. en C. Luciano Mendoza:**

Gracias por tu amistad y apoyo constante en la realización de este trabajo.

### **Al Dr. Mauricio Rodríguez.**

Gracias por su apoyo en la realización de este trabajo.

### **Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la delegación 024 de AAPAUNAM:**

Por el apoyo otorgado a través de la cátedra "Fernando González Vargas" para el desarrollo de este trabajo.

### **A los integrantes del jurado:**

Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra.

Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Prof. José Ignacio Páramo Ramírez.

Prof. Oscar Armando Pérez Méndez.

Prof. Diana Barrera Oviedo.

Por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

## INDICE.

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. HIPÓTESIS	5
4. ANTECEDENTES	
Cáncer	6
Metástasis	6
Angiogénesis	8
Adhesión Celular	9
Caderinas	13
Generalidades de las Caderinas clásicas tipo I	13
E-caderina	19
Expresión de E-caderina en tumores y líneas celulares	21
Regulación de la función adhesiva de E-caderina	23
Generalidades de los Estrógenos	23
Biosíntesis de estrógenos	24
Generalidades de los Receptores de estrógenos	25
Expresión de los receptores de estrógenos en cáncer	27
Mecanismo de acción de los estrógenos	27
Generalidades del Estradiol	30
Moduladores selectivos del receptor de estrógenos	32
Generalidades del Tamoxifeno	33
Regulación de E-caderina por estrógenos	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
Líneas celulares humanas	37
Mantenimiento de las líneas celulares humanas	37
Conteo celular	39
Fijación de células	39
Técnica de inmunohistoquímica	40
Expresión de los receptores de estrógenos	42

Tratamiento de las líneas celulares con estradiol y tamoxifeno	43
Expresión de E-caderina	44
Análisis de la expresión de E-caderina	44
Análisis estadístico	45
5.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	
Medio de cultivo	45
Medio libre de rojo fenol y hormonas	46
Medio de congelamiento	47
Solución de PBS	47
Solución de PBS-EDTA	47
Solución de p-formaldehído	48
Estradiol	48
Tamoxifeno	49
Solución de citrato de sodio	49
Solución de peroxido de hidrogeno	49
Solución de Tritón X-100	50
Solución albúmina	50
Solución del complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa	50
Solución DAB	50
Solución de etanol	51
6. RESULTADOS	52
7. DISCUSIÓN	86
8. CONCLUSIONES	92
9. REFERENCIAS	93

## 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un desequilibrio entre la división celular y la muerte celular<sup>53</sup>. En nuestro país, este padecimiento representa la tercera causa de muerte.

La mayoría de los cánceres humanos (80-90%) son originados por células epiteliales. Normalmente, las células epiteliales están estrechamente interconectadas por varias estructuras de unión. Durante la transición de células normales a células tumorales altamente malignas, la expresión de algunas de estas moléculas de adhesión se inhiben, mientras que otras se inducen, en el caso particular de la pérdida de la expresión de E-caderina da lugar a la metástasis<sup>24</sup>.

Las proteínas de adhesión tienen una función importante durante el desarrollo del cáncer y en la formación de metástasis. Entre estas proteínas se ha demostrado que las caderinas, modulan la migración de células y la invasividad del tumor<sup>58, 121</sup>. La pérdida de la adhesión celular mediada por E-caderina tiene una función importante en la transición de tumores epiteliales de un estado benigno a un estado invasivo<sup>58</sup>.

La E-caderina es una glicoproteína con un dominio extracelular largo que comprende 5 subdominios de motivos de caderina, un segmento transmembranal y un dominio citoplasmático corto altamente conservado, el cual interacciona con varias proteínas. Estas se llaman cateninas, y son la  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina; consecutivamente interactúan con la  $\alpha$ -catenina y la actina. Recientemente se ha incrementado el interés en E-caderina como un mediador dependiente de calcio de las adhesiones célula-célula y como un gen supresor del tumor.

La regulación de la expresión de E-caderina puede ofrecer un poderoso mecanismo para controlar la propagación del cáncer. La función adhesiva del complejo E-caderina-catenina y la expresión de sus componentes puede ser regulada por una gran variedad de factores de crecimiento y hormonas.

Los estrógenos promueven su efecto biológico a través de su unión al receptor de estrógenos (RE) en sus dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ . Ambos, son miembros de la superfamilia del receptor de estrógenos esteroide nuclear. De manera clásica llevan a



cabo su función por la unión a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) permitiendo la regulación de la transcripción.

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). El  $E_2$  administrado durante la menopausia incrementa el riesgo en cáncer de mama, en contraste con el efecto protector en cáncer de colón.

El receptor de estrógenos se puede unir al promotor de caderina aumentando la represión de E-caderina, sugiriendo que el estrógeno media la regulación a la baja de E-caderina reduciendo los niveles de esta proteína en cáncer de mama RE estrógeno positivo<sup>110</sup>. Por otro lado el  $E_2$  promueve un fenotipo no adherente mientras que el antiestrógeno induce la formación de células adherentes en algunas células en cultivo<sup>59</sup>.

En el presente trabajo se estudio el efecto del estradiol y tamoxifeno (TAM) en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en tres líneas celulares humanas sensibles a estrógenos: MCF-7, C-33 y SW620, que expresan o no las isoformas del receptor de estrógenos (alfa o beta) por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

La línea celular humana de adenocarcinoma de mama, MCF-7, solamente expresó el RE $\alpha$ . El tratamiento con  $E_2$  en esta línea celular disminuyó la proliferación celular e indujo una regulación negativa de la expresión de E-caderina. Este efecto fue revertido por TAM, sugiriendo que, tamoxifeno posiblemente actúa como antagonista parcial en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$ , en la línea celular humana MCF-7.

En la línea celular de cáncer de cerviz, C-33, únicamente se observó la expresión del RE $\alpha$ . El tratamiento con  $E_2$  incrementó la proliferación celular y reguló positivamente la expresión de E-caderina, observándose el mayor efecto a las 6 horas de tratamiento, mientras que, el tratamiento con TAM, promovió una regulación positiva de la expresión de E-caderina. Estos resultados sugieren que, el tamoxifeno actúa como agonista en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$  en la línea celular humana C-33.

En la línea celular humana de adenocarcinoma de colon, SW620, la expresión del RE $\alpha$  fue mayor con respecto a la expresión del RE $\beta$ . El tratamiento con  $E_2$  indujo una regulación negativa de la expresión de E-caderina, mientras que el tratamiento con  $E_2$  y TAM adicionados de manera conjunta, disminuyó la expresión de dicha proteína en función del tiempo. El tratamiento con TAM solo, inhibió la expresión de E-caderina a 6

y 12 horas pero estimuló la expresión de dicha proteína a 24 horas. Los resultados sugieren que, el TAM puede actuar como agonista y/o antagonista en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$  y/o RE $\beta$  en la línea celular SW620.

## **2. OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la regulación de la expresión de la proteína de adhesión E-caderina por estradiol y tamoxifeno en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620 que expresan o no las isoformas del receptor de estrógenos (alfa o beta).

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Analizar la concentración del primer anticuerpo (anti-RE $\alpha$  y anti-RE $\beta$ ) para lograr la expresión óptima de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- Estudiar la expresión del RE $\alpha$  y RE $\beta$ , en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- Analizar la concentración del primer anticuerpo (anti-E-caderina) para lograr la detección óptima de la proteína de adhesión E-caderina en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- Estudiar el efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- Estudiar el efecto del estradiol y tamoxifeno en la proliferación y adhesión celular en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- Estudiar la regulación de la proteína de adhesión E-caderina por la expresión de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620 tratadas con estradiol y tamoxifeno.

### **3. HIPÓTESIS.**

En líneas celulares de cáncer mama RE positivo, el estradiol regula negativamente la expresión de E-caderina, por lo tanto, el estradiol disminuirá la proliferación celular y regulara negativamente la expresión de E-caderina en la línea celular humana MCF-7. El efecto producido por el estradiol será revertido por el modulador selectivo del receptor de estrógenos, tamoxifeno.

Y en líneas celulares de cáncer de cerviz y colon, el estradiol aumenta la proliferación celular, por lo tanto, en las líneas celulares humanas C-33 y SW620; el estradiol incrementara la proliferación celular y regulara positiva y/o negativamente la expresión de E-caderina. El efecto producido por el estradiol será incrementado y/o reducido por el modulador selectivo del receptor de estrógenos, tamoxifeno.

## **4. ANTECEDENTES.**

### **4.1. CÁNCER.**

El cáncer es una enfermedad compleja y la carcinogénesis es la transformación de una célula normal a una cancerosa en un proceso que involucra muchas etapas.

El cáncer es un enfermedad de crecimiento celular inapropiado, defectuosa diferenciación celular y una inapropiada organización del tejido<sup>78</sup>; producto de la expresión alterada de oncogenes y supresores tumorales. Esta expresión anormal ocurre a través de un número de mecanismos que incluyen daño al ADN y una traducción o transcripción anormal de genes<sup>136</sup>.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En México, representa la tercera causa de mortalidad, y en los últimos años se ha incrementado el número de defunciones por esta enfermedad; siendo más susceptibles las mujeres. En los análisis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se indica que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, y las cardiopatías en los hombres. En el año 2004 el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) registro 61 248 fallecimientos por dicha causa. En el caso de los varones, el número de fallecimientos por cáncer fue de 29 797, los cuales representan 11.4% de las muertes en este grupo de población. En las mujeres el monto fue de 31 443 decesos; es decir, 14.9% de las defunciones en la población femenina<sup>67</sup>.

Las tres principales causas de muerte por tumores malignos en los hombres corresponden a cáncer de traquea, bronquios y pulmón (15.5%), de próstata (15.2%) y estómago (9.4%), mientras que el cáncer de colon solo tiene una incidencia del 4.1%. En las mujeres 13.5% de las defunciones por cáncer corresponden al cáncer cérvico-uterino y 13.3% al de mama. El cáncer de colon representa el 4.2%<sup>67</sup>.

#### **4.1.1. METASTASIS.**

La capacidad de las células tumorales para invadir el tejido adyacente y diseminarse a distintos órganos ha sido considerada como un marcador biológico de malignidad<sup>8</sup>.

La invasión del tejido y metástasis son características comunes de los tumores más agresivos y letales, y requieren generalmente que las células pierdan el contacto con células vecinas<sup>89</sup>.

La metástasis es un proceso de múltiples pasos coordinados por medio del cual, una célula tumoral se desprende del tumor primario, viaja hacia un sitio distinto vía el sistema circulatorio y establece un tumor secundario<sup>170</sup>.

La cascada metastásica comienza con una alteración en la integridad del epitelio el cual posibilita a las células tumorales a abandonar estructuras epiteliales, para invadir el estroma de alrededor, entrar hacia la sangre o vasos linfáticos y extravasarse en el órgano blanco apropiado<sup>44</sup>

El proceso de metástasis parece estar regulado por una variedad de productos de genes<sup>50</sup>. Estos incluyen: 1) receptores célula-célula y receptores célula-matriz extracelular<sup>12,73</sup>; 2) enzimas proteolíticas (catepsinas, colagenasas, metaloproteinasas)<sup>23</sup> las cuales facilitan la descomposición y invasión de la membrana basal, canales vasculares y órganos<sup>39,88,95</sup>; 3) factores de movilidad que permiten la migración a través del tejido<sup>150,162</sup>; receptores que median la invasión a órganos<sup>106</sup>; factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento de las microcolonias en el órgano secundario<sup>7</sup>; y factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>23</sup> que resultan en neovascularización de la metastasis, permitiendo el suministro de nutrientes, eliminación de metabolitos<sup>42,89</sup>. El debilitamiento del mecanismo de adhesión célula-célula puede ser un prerrequisito básico para que la metastasis del tumor pueda ocurrir<sup>8</sup>.

La terapia clínica que bloquea la metástasis puede ser usada en el tratamiento de muchos tipos de cánceres de varios orígenes genéticos. Varias terapias anti-metásticas son actualmente probadas clínicamente, incluyendo aquellas cuyo blanco es la superficie celular y proteínas extracelulares que median la degradación de la matriz extracelular, enzimas que degradan y sus inhibidores, y citocinas que estimulan la movilidad y la proliferación<sup>170</sup>.

#### 4.1.2. ANGIOGÉNESIS.

Angiogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso es crítico para el crecimiento normal, desarrollo y en respuesta protectora en el caso de sanar heridas e inflamación. En adultos sanos, normalmente no ocurre angiogénesis excepto en ciertas fases del ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, angiogénesis aberrante puede ocurrir en una variedad de patologías; estas incluyen la neovascularización de tumores sólidos, el crecimiento de vasos dentro de la retina en retinopatía diabético y el crecimiento de vasos no deseados en enfermedades inflamatorias crónicas<sup>13</sup>.

El proceso de angiogenesis puede ser dividido en los siguientes tres pasos que son paralelos a aquellos requeridos para la invasión de células tumorales: 1) proliferación de células endoteliales, 2) rompimiento de la matriz extracelular, y 3) migración de las células endoteliales<sup>33</sup>. Estos pasos pueden ser promovidos por factores de crecimiento secretados por células tumorales. Estos factores son llamados factores angiogénicos; la producción de estos factores conduce al crecimiento del tumor y causa un concomitante incremento en la vascularización. La angiogénesis requiere interacciones entre las células tumorales, células endoteliales y la matriz extracelular. Las enzimas que median estas interacciones son serina proteasas y metaloproteinasas. La expresión de estas enzimas puede ser afectada por factores angiogénicos<sup>170</sup>.

Existe un gran número de inhibidores angiogénicos; estos pueden servir como tratamientos en cáncer por que la angiogénesis es necesaria para soportar el crecimiento del tumor y metástasis. El inhibidor derivado de cartílago es un angiogénico que funciona al inhibir la actividad de las colagenasas, además de inhibir la angiogenesis, inhibe la migración celular y la proliferación<sup>170</sup>. Otros inhibidores de angiogénesis son el factor de plaquetas 4 (PF4) y la angiostatina. El factor de plaquetas 4 probablemente funcione por inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos básico unido a heparina (bFGF)<sup>93</sup>. La angiostatina es un fragmento de plasminógeno de 38 kDa con capacidad para suprimir la metástasis<sup>108</sup>.

#### 4.2. ADHESIÓN CELULAR.

La adhesión célula-célula determina la polaridad de las células y participa en el mantenimiento del tejido. La adhesividad célula-célula es generalmente reducida en los tumores humanos. La reducción de la adhesividad intercelular es indispensable para la invasión del cáncer y metástasis<sup>60</sup>. Ahora se conoce que la adquisición de movilidad por las células cancerígenas se correlaciona con la pérdida de su capacidad de reconocimiento y adherencia a células vecinas<sup>10</sup>

La adhesión celular es un proceso fundamental que influencia la vida de muchas células y puede ser dividida dentro del contacto celular con la matriz extracelular o con células vecinas. Las interacciones entre células son principalmente mediadas por cuatro estructuras altamente ordenadas en la membrana plasmática: unión comunicante, uniones estrechas, desmosomal y unión adherente. La unión adherente y desmosomal median la adhesión célula-célula<sup>126</sup>.

La adhesión célula-célula es un proceso dinámico que es regulado a varios niveles, incluyendo transcripción de genes, estabilidad de proteínas y modificaciones después de la traducción del complejo caderina-catenina, en particular la fosforilación de  $\beta$ -catenina y p120. Muchas rutas de señalización intracelular pueden afectar el ensamble del complejo de caderina y su fuerza de adhesión, el compromiso de adhesión mediado por caderina puede iniciar la señalización intracelular. Este puede involucrar a GTPasas Rho, o indirectamente la actividad de receptores de factores de crecimiento, incluyendo receptores de fibroblastos (FGF), epitelial (EGF) y el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF). El resultado final de perturbar la señalización dependiente de caderina altera muchos procesos celulares como son: proliferación, supervivencia, polarización, diferenciación y migración, lo cual puede afectar la embriogénesis, formación del tejido, y eventos patogénicos como el cáncer<sup>78</sup>.

Un importante grupo de moléculas involucradas en estos eventos, son las moléculas de adhesión celular (CAM), las cuales participan en la interacción célula-célula e interacciones entre células y componentes de la matriz extracelular. Estas moléculas han sido implicadas en una variedad de funciones celulares incluyendo señales de transducción, comunicación celular y reconocimiento, embriogénesis, respuesta inflamatoria e inmune, y apoptosis<sup>25</sup>.



Existen cuatro grupos de CAM involucradas en la adhesión célula-célula y célula-matriz de las cuales las caderinas son las más importantes<sup>61, 124</sup>.

Las CAM son: integrinas, inmunoglobulinas, selectinas (Figura 1).

a) INTEGRINAS.

Los miembros de la familia de las integrinas son glicoproteínas de la superficie celular que actúan como receptores para proteínas de la matriz extracelular (ECM) como fibronectina, laminina o colágena. Los sitios de adhesión célula-matriz soportados por integrinas son complejos, estructuras especializadas llamadas contactos focales o adhesión focal<sup>70</sup>. Las integrinas son heterodímeros que tienen una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ; cada subunidad tiene un dominio extracelular largo, una sola región que atraviesa la membrana y un dominio citoplasmático corto (excepto para la subunidad  $\beta 4$ )<sup>5,65</sup>. Las integrinas experimentan cambios dinámicos durante el proceso de unión al ligando<sup>64,90</sup>. Las integrinas pueden existir en varios estados de afinidad para sus ligandos; estos estados de afinidad pueden ser regulados por factores extracelulares (Ej. Cationes divalentes) o por complejos procesos intracelulares que involucran las GTPasas pequeñas R-Ras y Rap1<sup>62, 76,117</sup>. El dominio citoplasmático de una integrina es la clave para el nexo de interacción con estructuras intracelulares y cascadas de señalización. La subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  del dominio citoplasmático hacen varias contribuciones importantes para varios aspectos de la función total de las integrinas, incluyendo organización del citoesqueleto, movilidad celular, señales de transducción y regulación de la afinidad de la integrina. Un gran número de proteínas del citoesqueleto, adaptadoras y de señalización pueden interactuar con el dominio citoplasmático de la integrina y tienen un desempeño importante en las funciones realizadas por ésta<sup>74</sup>.

b) SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS (Ig).

La superfamilia Ig, es una gran familia de moléculas de adhesión celular, independientes de calcio<sup>111</sup>. Los miembros de esta familia son definidos por la presencia de una o más copias de Ig, una estructura compacta con dos residuos de cisteína separados por entre 55 a 75 aminoácidos arreglados como dos estructuras beta plegada<sup>163</sup>. Las Ig CAM contienen un dominio extracelular largo en el extremo amino terminal que contiene las Igs, un solo segmento helicoidal transmembranal y un dominio citoplasmático<sup>5</sup>. Los miembros de la familia Ig CAM funcionan en una extensa

variedad de tipos celulares y son involucrados en muchos procesos biológicos diferentes<sup>74</sup>.

Uno de los más importantes contextos para Ig CAM es en el desarrollo del sistema nervioso, donde muchos miembros distintos de esta superfamilia son involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la conexión neuronal<sup>102</sup>.

c) SELECTINAS.

Las moléculas L-, E-, y P-selectina comprenden una pequeña familia de receptores de adhesión análogos a lectina<sup>82</sup>. La estructura de las selectinas incluyen un dominio amino terminal que es homólogo a las lectinas animales dependientes de calcio, seguido por un dominio tipo factor de crecimiento epidermal (EGF), dos a nueve motivos similares a las proteínas reguladoras del complemento (CRP), un segmento helicoidal transmembranal, y un dominio citoplasmático corto. Las selectinas median interacciones célula-célula heterotípicas<sup>74</sup>.

Las selectinas están involucradas en la adherencia de leucocitos a células endoteliales y plaquetas durante el proceso inflamatorio<sup>150</sup>. Existe regulación de la expresión y función de las selectinas de manera que éstas se presentan solo en el momento apropiado, como cuando los leucocitos necesitan adherirse a la pared de los vasos durante el tráfico celular del sistema inmune normal o durante el proceso inflamatorio<sup>74</sup>.

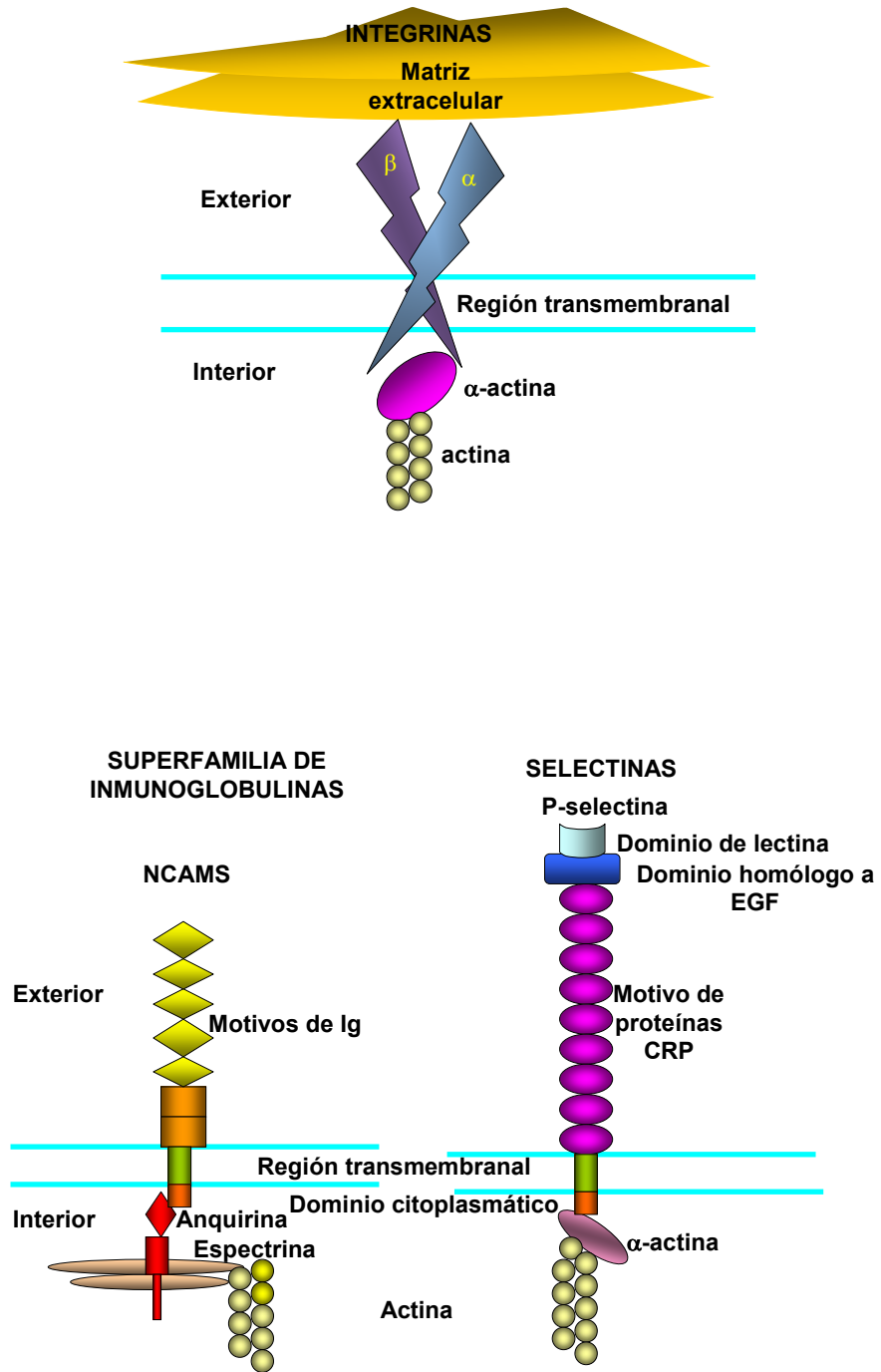


FIGURA 1. Receptores de adhesión celular y componentes asociados al citoesqueleto (Modificado de Juliano RL.<sup>74</sup>).

### **4.3. CADERINAS.**

Las caderinas forman una superfamilia de moléculas de adhesión que funcionan en el reconocimiento celular, mantenimiento y arquitectura del tejido y supresión del tumor. Además, están implicadas en la regulación de eventos de señalización.

Por comparación de secuencias de aminoácidos y características estructurales, las caderinas pueden ser subdivididas en cinco grupos, caderinas clásicas tipo I y II, caderinas desmosomales, protocaderinas y otras relacionadas a caderinas<sup>139, 153,154,156</sup> (Tabla 1).

#### **4.3.1. GENERALIDADES DE LAS CADERINAS CLÁSICAS TIPO I.**

Las caderinas clásicas tipo 1 son moléculas de adhesión célula-célula dependientes de calcio, las cuales interactúan de manera homofílica<sup>10</sup>, es decir, moléculas de una célula se unen a otras moléculas de la misma clase en células adyacentes<sup>2</sup>.

Las caderinas están formadas por tres dominios (Figura 2): un dominio adhesivo extracelular de aproximadamente 550 residuos, seguido por un dominio transmembranal que atraviesa la membrana plasmática y un dominio citoplasmático altamente conservado de aproximadamente 150 residuos<sup>127</sup>.

El dominio extracelular forma dímeros laterales en la superficie de la célula, los cuales interactúan con dímeros de células opuestas para crear una estructura de "cierre"<sup>103,143</sup>.

El dominio extracelular está compuesto por cinco subdominios de motivos de caderina (EC1-EC5), cada uno consiste de aproximadamente 110 residuos<sup>145</sup> y requieren calcio para su adhesividad, rigidez y estabilidad<sup>49</sup>. EC1 media la adhesión celular y en este dominio el motivo HAV (secuencia de adhesión celular) junto con residuos variables en estas inmediaciones son implicados en la unión selectiva de caderinas. Cuatro residuos conservados de cisteína en EC5 son probablemente importantes para la unión intramolecular disulfuro<sup>14,107,132</sup>.

Tabla 1. Miembros de la familia caderina.

NOMBRE	SIMBOLO	LOCUS	PRINCIPAL EXPRESION	TIPO <sup>a</sup>
E-caderina, uvomorulin (ratón), L-CAM (gallina)	CDH1	16q22.1	Epitelio	I
N-caderina	CDH2	18q11.2	Células Neuronales.	I
P-caderina	CDH3	16q22.1	Piel, próstata, placenta.	I
R-caderina, caderina-4	CDH4		Retina, cerebro.	I
VE-caderina, caderina-5	CDH5	16q22.1	Endotelio vascular, cerebro.	II
K-caderina, caderina-6	CDH6		Riñón fetal/cerebro	II
Caderina-7	CDH7		Cerebro.	II
Caderina-8	CDH8		Cerebro.	II
Caderina-9, T1- caderina.	CDH9		Cerebro.	II
Caderina-10	CDH10		Cerebro.	II
OB-caderina, caderina-11 (ratón, rata y gallina)	CDH11	16q22.1	Osteoblastos, cerebro, testículo, pulmón y placenta.	II
Br-caderina, caderina-12	CDH12	5p13-p14	Cerebro.	II
H-caderina, caderina-13, T- caderina (gallina, humano)	CDH13	16q24.2	Cerebro.	O
M-caderina, caderina-15	CDH15	16q24.3	Músculo, cerebro.	I
Ksp-caderina	CDH16	16q21-q22	Riñón.	O
HPT1, LI-	CDH17	8q22.1	Hígado, intestino.	O

caderina (rata)				
Caderina-18, caderina-14	CDH18		Cerebro.	II
Pcdh1, protocaderina 42	PCDH1	5q31-33?	Cerebro, células melanoma.	PC
Pcdh2, protocaderina 43	PCDH2	5q31-33?	Cerebro, fibroblastos.	PC
BH-protocaderina	PCDH7	4p15	Cerebro, corazón.	PC
Desmogleina 1	DSG1	18q12.1	Piel.	D
Desmogleina 2	DSG2	18q12.1	Epitelio.	D
Desmogleina 3	DSG3	18Q12.1	Piel.	D
Desmocolina 1	DSC1	18q12.1	Piel.	D
Desmocolina 2	DSC2	18q12.1	Epitelio.	D
Desmocolina 3	DSC3	18q12.1	Piel.	D
RET	RET	10q11.2	Células derivadas de neuronas.	O
hFAT	FAT	4q34-q35	Epitelio, células- T, fibroblastos, keratinocitos.	O
F1B1, F1B2, F1B3			Fibroblastos.	O
ME1a ME6			Células de melanoma, melanocitos.	O

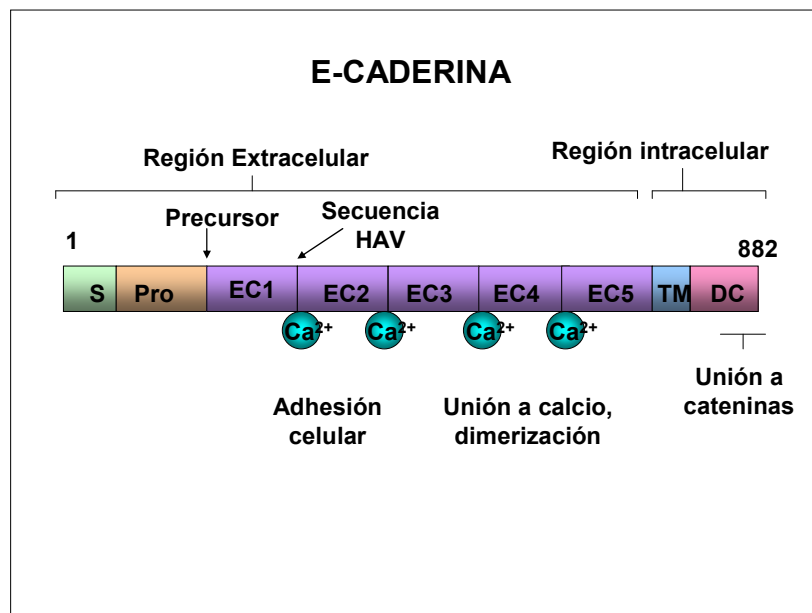
<sup>a</sup>Cinco grupos de caderinas: I, II caderinas clásicas tipo I y II, respectivamente; D, caderinas desmosomales; PC, protocaderinas; O, otras caderinas<sup>127</sup>.

Estructuras de alta resolución de los primeros motivos extracelulares de EC1 de N-caderina, E-caderina y EC1-2 de E-caderina<sup>103</sup> proveen interesantes características dentro de estas moléculas. De acuerdo a estos datos, la estructura EC1-2 muestra que tres iones calcio son unidos en un arreglo continuo en la interfase entre EC1 Y EC2. Veinte residuos de aminoácidos contribuyen por ambos dominios y la región de unión participa en la unión a Ca<sup>2+</sup>. Un ión calcio es unido principalmente por residuos de EC1,

otro principalmente por EC2, y el tercero es coordinado por residuos de ambos dominios. Los iones calcio forman interacciones no covalentes entre EC1 y EC2<sup>127</sup>.

El dominio transmembranal, que atraviesa la membrana, conecta el dominio extracelular al dominio citoplasmático de la caderina, el cual contiene el sitio de reconocimiento para las cateninas.

El dominio citoplasmático de las caderinas clásicas es altamente conservado y sirve para interactuar con proteínas citoplasmáticas que unen a las caderinas con el citoesqueleto de la célula y rutas de señalización intracelular<sup>46</sup>.



**FIGURA 2. Representación esquemática de E-caderina y sus dominios funcionales.** El sitio de procesamiento del precursor de E-caderina y la secuencia motivo HAV involucrada en la unión homofílica son indicadas por flechas. El sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> se muestra en la interfase del dominio repetido. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia de la proteína precursora humana. EC1 a EC5, motivos de caderina 1-5 en la región extracelular; S, señal de secuencia; Pro, propéptido; TM, región transmembranal; DC, dominio citoplasmático (Modificado de Potter et al<sup>127</sup>).

Las caderinas se asocian con un grupo de proteínas intracelulares llamadas cateninas (Figura 3), las cuales unen a la molécula caderina a los microfilamentos de actina y median los mecanismos de transducción señales que regulan el crecimiento

celular y diferenciación<sup>113</sup>, además, de que son necesarias para la adhesión célula-célula.

Las cateninas inicialmente identificadas por inmunoprecipitación con E- y N-caderina, consisten de tres miembros clásicos llamados  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina (plakoglobulina) de acuerdo a disminución aparente en su peso molecular de 102 kDa, 92 kDa y 83 kDa, respectivamente<sup>113,114,123,165</sup>.

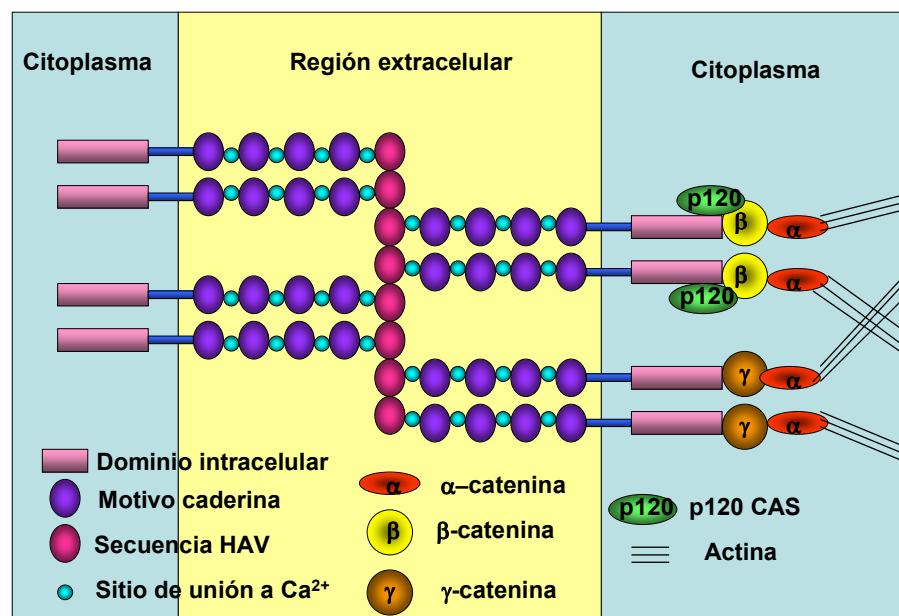


FIGURA 3. Representación esquemática de la adhesión célula-célula mediada por E-caderina (Modificada de Christofori G y Semb Henrik<sup>24</sup>).

Recientemente se ha encontrado que p120<sup>CAS</sup> se encuentra asociada al complejo caderinas-cateninas en varios tipos celulares y representa un nuevo miembro de las cateninas llamado p120<sup>ctn</sup><sup>77, 129,130</sup>. p120<sup>ctn</sup> tiene cuatro isoformas y fue identificado primero como un prominente sustrato de la cinasa Src<sup>130</sup>, subsecuentemente se mostró que se encuentra asociado a E-caderina en el empalme célula-célula<sup>19</sup>. Su función en el complejo caderina-catenina no es claro pero puede estar involucrada en la estabilización de los dímeros de caderina<sup>171</sup>.



La estructura primaria de  $\beta$ -catenina consiste de tres dominios: un dominio N-terminal de aproximadamente 150 aminoácidos, un dominio central repetido armadillo (arm) de aproximadamente 550 aminoácidos y un dominio C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos<sup>119</sup>. El dominio amino terminal contiene el sitio de unión a  $\alpha$ -catenina, así como, el sitio de fosforilación para GSK3 $\beta$  (glicogeno sintasa cinasa), por medio del cual esta proteína es degradada<sup>1, 125,174</sup>. La región repetida arm funciona como un dominio múltiple de unión al ligando, interactuando con proteínas como Tcf/Lef, APC, axina y E-caderina<sup>11, 53, 63, 100,136</sup>. El dominio C-terminal es altamente ácido y es esencial para la coactivación transcripcional con Tcf/Lef<sup>11, 136</sup>. La importancia de  $\beta$ -catenina en la ruta de señalización Wnt esta bien establecida.

Además de su función en la adhesión celular, p120 y  $\beta$ -catenina interactúan con factores de transcripción para alterar la expresión de genes<sup>3, 105</sup>.

La  $\alpha$ -catenina interactúa con el citoesqueleto mientras que  $\gamma$ -catenina esta estrechamente relacionada a  $\beta$ -catenina y además se encuentra en la unión desmosomal.

La región carboxilo terminal del dominio citoplasmático de las caderinas se asocia con  $\beta$ -catenina o plakoglobulina, mientras que la región juxta-membrana se une a p120<sup>ctn</sup> <sup>114,171</sup>.  $\beta$ -catenina y la plakoglobulina se unen directamente al dominio citoplasmático de las caderinas. A través de su dominio amino terminal ambas proteínas se asocian con la proteína  $\alpha$ -catenina la cual subsecuentemente une a estas dos proteínas a la red de filamentos de actina<sup>19</sup>. El anclaje al citoesqueleto es crucial para la adhesión, la perturbación del sitio de unión a  $\beta$ -catenina en el dominio citoplasmático de caderina provoca una adhesión inestable mientras que el anclaje directo de E-caderina a  $\alpha$ -catenina soporta la adhesión<sup>30</sup>.

La E-caderina contiene un sitio común de unión para adaptarse a  $\beta$ -catenina o plakoglobulina en una forma exclusiva, la cual se une a  $\alpha$ -catenina. Por lo tanto, por lo menos dos complejos de caderina-catenina independientes pueden existir en la misma célula, uno contiene  $\beta$ -catenina y uno contiene plakoglobulina.

Estructuralmente, las caderinas y cateninas forman complejos altamente organizados los cuales estabilizan una conexión directa entre células adyacentes y la red del citoesqueleto<sup>10</sup>.

La asociación de cateninas a caderinas es un paso clave en la función del complejo de adhesión y alteraciones en la molécula de catenina pueden perturbar la adhesión célula-célula, resultado en un agresivo tumor e invasión en enfermedad neoplásica<sup>111</sup>.

#### **4.4. E-CADERINA.**

La E-caderina (120 kDa, cromosoma 16q22.1) además conocida como uvomorulina, L-CAM o Arc-1, está limitada a células epiteliales originadas de tejido ectodérmico, mesodérmico y endodérmico. La E-caderina es formada de un precursor de 135 kDa, el cual sufre cortes enzimáticos en el dominio extracelular en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal para formar una molécula madura y esta es dirigida principalmente hacia la superficie basolateral de las células epiteliales<sup>83, 85</sup>. El rompimiento enzimático es importante para que la proteína madura pueda ejercer la adhesión célula-célula<sup>113</sup>.

La E-caderina es el componente clave para la función adherente de células epiteliales<sup>147</sup> y una de las mejores caderinas caracterizadas. Generalmente se encuentra localizada en una región de contacto célula-célula que es conocida como unión adherente<sup>49</sup>. El periodo de desintegración de la E-caderina en la superficie de la célula es de 5 horas aproximadamente<sup>19</sup>.

Generalmente, la expresión de la E-caderina es alta en tumores bien diferenciados, lo cual mantiene su adhesividad célula-célula y son menos invasores, pero es reducida en tumores no diferenciados, lo que produce pérdida de la adhesión célula-célula y muestra una amplia tendencia invasora<sup>60</sup>.

La pérdida de la expresión de la E-caderina reduce la adhesión célula-célula y está asociada con la transición de adenoma a carcinoma y la adquisición de propiedades metastásicas<sup>121</sup>. El restablecimiento de la función adherente en células de cáncer por reestructuración de la expresión de la E-caderina ejerce un efecto supresor del tumor, incluyendo disminución en la proliferación y movilidad<sup>26</sup>. Las células que no expresan E-caderina no se agregan o adhieren una a otra. En aquellas células que

expresan E-caderina, si se neutraliza la molécula a través de un anticuerpo, o si existe alguna delección o mutación del gen que codifica para esta proteína o agotamiento de calcio, provoca que las células se disocien. La transfección de células que no expresan E-caderina con ADNc de E-caderina invierte el comportamiento no adhesivo de las células<sup>19</sup>. Además, células que expresan E-caderina no son capaces de filtrarse por matrices de colágena, pero después de la incubación con un anticuerpo contra E-caderina, éstas muestran comportamiento invasor<sup>9</sup>.

Con respecto a las cateninas, células con expresión normal de E-caderina pero que no expresan algunas de las cateninas no son capaces de agregarse o adherirse mutuamente; la delección de los genes que codifican para las cateninas o mutaciones en las proteínas de las cateninas resulta en células que no son capaces de adherirse o agregarse; y mutaciones en el dominio intracelular de E-caderina presentan el mismo comportamiento<sup>19</sup>. Además, la pérdida de E-caderina no solo provoca la reducción en la adhesión célula-célula, provee un estímulo oncogénico al liberar a  $\beta$ -catenina de la membrana, la cual viaja hacia el núcleo y activa genes regulados por TCF como son: c-myc, ciclina D1, fibronectina y matrilisina, las cuales son importantes para la proliferación e invasión.

La alteración del complejo E-caderina-catenina puede ser reversible (epigenético) o irreversible (genético)<sup>19</sup>.

El sistema de adhesión celular de E-caderina en células de cáncer es inactivado por varios mecanismos que reflejan las características biológicas y morfológicas del tumor. La metilación del ADN frecuentemente causa regulación negativa de genes supresores de tumores en células cancerígenas al cambiar la estructura de la cromatina, creándose un ADN inaccesible para factores de transcripción y la ARN polimerasa II<sup>71</sup>. La represión del gen de E-caderina por hipermetilación alrededor de la región promotora ocurre frecuentemente, aun en condiciones precancerosas<sup>60</sup>. Además se demostró que la metilación CpG alrededor de la región promotora para el gen de E-caderina y la inducción de la expresión de E-caderina seguida por el tratamiento con el inhibidor 5-azacitidina en líneas celulares de cáncer humano pierde la expresión de E-caderina<sup>173</sup>. Otros estudios muestran que la metilación del ADN alrededor de la región promotora se correlaciona significativamente con la reducción de la expresión de E-

caderina detectada por inmunohistoquímica en carcinomas hepatocelulares<sup>75</sup>. De esta manera, el gen de E-caderina es un ejemplo de genes supresores de tumores que son reprimidos por hipermetilación de ADN. En cánceres difusamente infiltrados, se han encontrado mutaciones en los genes para E-caderina  $\alpha$  y  $\beta$  cateninas. El sistema de adhesión celular E-caderina es inactivado por la fosforilación de tirosina en  $\beta$ -catenina, un oncogen producto de la proteína c-erb-2, es encontrado asociado directamente a  $\beta$ -catenina<sup>60</sup>.

Puesto que la pérdida de la expresión de E-caderina es una característica común en muchos tipos de carcinoma y la introducción de E-caderina dentro de las células cancerosas reduce la invasión y metástasis, la terapia del cáncer cuyo blanco es la regulación de la expresión de E-caderina puede ofrecer un poderoso medio para controlar la propagación del cáncer. En células de cáncer de colon humano, SW480, la expresión del ARNm de E-caderina y la adhesión celular son inducidas por el tratamiento con la vitamina D3<sup>116</sup>. Esta vitamina es un potencial candidato para el tratamiento de cáncer de colon por inhibir el crecimiento celular.

#### **4.4.1. EXPRESIÓN DE E-CADERINA EN TUMORES Y LINEAS CELULARES.**

La reducción o la pérdida de expresión de E-caderina ha sido documentada en un gran número de tumores de varios órganos, incluyendo colon<sup>36,161</sup>, estómago<sup>97,146,172</sup>, hígado<sup>149</sup>, pulmón<sup>15,16</sup>, próstata<sup>101,112,160</sup>, mama<sup>31,43,101,111,116,129,155</sup>, útero<sup>139</sup> y ovario<sup>165</sup>.

Las E- y P-caderina tienen una función importante en la arquitectura y función de la glándula mamaria normal. La E-caderina es requerida para la diferenciación normal y supervivencia del epitelio. La señalización  $\beta$ -catenina/LEF en el epitelio parece ser importante para la formación del capullo mamario, extensión ductal y alveologénesis, así como para el mantenimiento del tejido glandular mamario<sup>66, 56</sup>. La pérdida de la E-caderina en las células epiteliales mamarias, pueden promover el cáncer de mama y su metástasis, y su ausencia puede servir como un marcador de pobre pronóstico. En cáncer de mama, la expresión o falta de E-caderina puede diferenciar tipos de tumores. En carcinomas de mama lobulares (menor forma prevalente de cáncer de mama) la pérdida de E-caderina tiende a ser un resultado más favorable que en otros tumores. En estos tumores, la pérdida de E-caderina parece ser un evento temprano. En

contraste, en carcinoma ductal, el cual representa la forma predominante de cáncer de mama, expresa E-caderina. Sin embargo, el nivel de expresión puede reducirse y su localización celular ser anormal, pues, no está restringido a sitios de adhesión célula-célula. Células de la forma más agresiva de cáncer de mama, cáncer de mama inflamatorio (IBC) y carcinoma microcapilar invasivo (IMPC) frecuentemente sobreexpresan E-caderina<sup>78</sup>.

La E-caderina y las cateninas son ampliamente expresadas en líneas celulares de carcinoma colorectal, con el predominante complejo de ensamble E-caderina/ $\beta$ -catenina/ $\alpha$ -catenina. La distribución subcelular de las proteínas es influenciada por el contacto célula-célula y el complejo E-caderina/catenina tiene una función en la estabilización e iniciación del contacto célula-célula. La expresión del complejo y el ensamble no parece ser afectado por la presencia de mutaciones en APC y/o  $\beta$ -catenina, sugiriendo que el rol de las mutaciones en el desarrollo del tumor es improbable a través de disturbios en el complejo E-caderina/catenina<sup>38</sup>. En tumores de pacientes con carcinoma colorectal esporádico se determinó que en más del 80% de carcinomas se incremento la expresión de E-caderina y cateninas, con acumulación citoplasmática de las proteínas. Además muestran niveles incrementados de RNAm para E-caderina y cateninas en carcinomas. Con respecto a  $\beta$ -catenina se reporta expresión incrementada de estas proteínas en tumores colorectales<sup>37</sup>. Otras investigaciones muestran que la expresión de la E-caderina y cateninas es evidente en el límite célula-célula en mucosa colorectal normal. La expresión de E-caderina y  $\alpha$ -catenina era reducida en carcinomas colorectales, mientras que la expresión de  $\beta$ -, y  $\gamma$ -catenina permanece normal<sup>44</sup>. Estas variaciones en los resultados quizá se deban a que se utilizaron diferentes técnicas para determinar la expresión de E-caderina y cateninas.

En cáncer cervical se han reportado alteraciones en el patrón de expresión de E-caderina en lesiones intraepiteliales escamosas y carcinomas. Existe disminución de la inmunoreactividad para E-caderina en la membrana y progresivo incremento en citoplasma, relacionándolo con la pérdida de diferenciación, como consecuencia de transformación neoplásica<sup>41</sup>.

#### **4.5. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ADHESIVA DE E-CADERINA.**

La función adhesiva del complejo E-caderina-catenina y la expresión de sus componentes puede ser controlada por una gran variedad de factores de crecimiento y hormonas. Estos moduladores pueden actuar a nivel de la proteína directamente o indirectamente, resultando en modificaciones del complejo por medio de fosforilaciones reversibles, o pueden afectar la cantidad de los componentes provocando efectos sobre la transcripción o cambios en la proteína<sup>127</sup>.

##### **4.5.1. GENERALIDADES DE LOS ESTRÓGENOS.**

Los estrógenos son hormonas endógenas sintetizadas del colesterol y son secretados en la mujer principalmente por los ovarios<sup>86</sup>. Los estrógenos producen una gran variedad de efectos fisiológicos. En el caso de las mujeres estos incluyen, efectos vinculados al desarrollo, efectos neuroendocrinos involucrados en el control de la ovulación, preparación cíclica del tracto reproductivo para la fecundación e implantación y los principales efectos sobre el metabolismo de minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos<sup>45</sup>. Además, regulan procesos fisiológicos como crecimiento celular, desarrollo y regulación de genes en el tracto reproductivo y en el sistema nervioso central<sup>28, 123</sup>.

Los estrógenos, además influyen los procesos patológicos de enfermedades dependientes de hormonas, como son: cáncer de mama, útero y ovario, así como, próstata<sup>28</sup>.

El cáncer de mama es la primera enfermedad reconocida como dependiente de estrógenos. Los estrógenos a través de procesos mediados por receptores, estimulan la proliferación de células normales y malignas a través de la inducción de proteínas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos y la activación de genes que regulan el crecimiento. El aumento en la proliferación puede incrementar la oportunidad para producir errores en la reparación del ADN, resultando en una acumulación de mutaciones. Estas mutaciones pueden contribuir a la progresión del crecimiento celular a través de hiperplasia o neoplasia<sup>86</sup>. Hay además evidencia de que metabolitos específicos de estrógenos llamados catecoles estrógeno-3,4-quinonas (CE-3,4-Q) son capaces de formar aductos de ADN lo cual puede resultar en mutaciones que inician

tumores<sup>138, 176</sup>. En contraste, los estrógenos ejercen un efecto protector en cáncer de colon<sup>135</sup>.

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17- $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), seguido por la estrona (E<sub>1</sub>) y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A, un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D<sup>45</sup>.

#### 4.5.2. BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS.

Los estrógenos esteroides se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos. La reacción comprende aromatización del anillo A, y está catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa o CYP19) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como cosustratos. En el primer paso de esta reacción C19 sufre hidroxilación. Una segunda hidroxilación origina eliminación del grupo C19 hidroximetil recién formado y una hidroxilación final de C2 resulta en la formación de un intermediario inestable que se reordena para formar el anillo fenólico A. La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembranal (familia P450 de monooxigenasas), una flavoproteína, NADPH-citocromo P450 reductasa<sup>45</sup>.

El E<sub>2</sub> es el principal producto secretado por los ovarios, es sintetizado por las células de la granulosa a partir de precursores androgénicos proporcionados por las células de la teca. El E<sub>2</sub> secretado se oxida de manera reversible hasta generar E<sub>1</sub> mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa y estos dos estrógenos pueden convertirse en estriol<sup>45</sup>.

En mujeres posmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo donde se sintetiza E<sub>1</sub> a partir de deshidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. Es posible que se generen estrógenos a partir de andrógenos mediante la acción de la aromatasa o a partir de conjugados de estrógenos por medio de hidrólisis. Esa producción local de estrógenos podría tener una participación causal en la aparición de algunas enfermedades como cáncer mamario, puesto que las neoplasias de mama contienen tanto aromatasa como enzimas hidrolíticas. De modo similar, los estrógenos pueden ser producidos a partir de

andrógenos por medio de la aromatasa presente en el sistema nervioso central y ejercer efectos locales cerca del sitio de su producción. La placenta sintetiza grandes cantidades de estrógenos y utiliza deshidroepiandrosterona fetal y su derivado 16- $\alpha$ -hidroxilo para producir E<sub>1</sub> y estriol, respectivamente<sup>45</sup>.

#### 4.5.3. GENERALIDADES DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS.

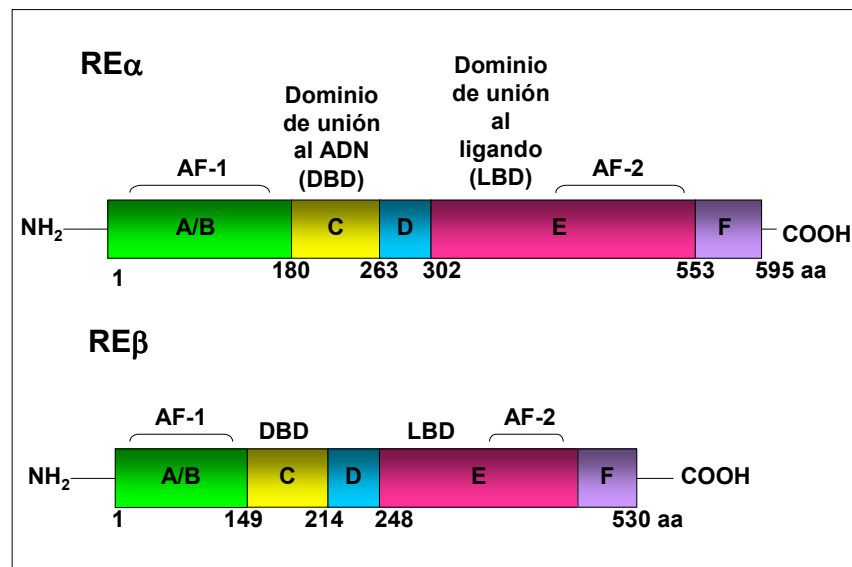
Los estrógenos ejercen sus efectos por interacción con receptores que son miembros de una superfamilia de receptores nucleares. Hay dos receptores de estrógenos distintos, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , los cuales, son productos de genes separados. El RE $\alpha$  y RE $\beta$  son proteínas modulares, poseen dominios discretos; para llevar cabo sus funciones estos receptores necesitan factores de transcripción regulados por ligando<sup>86</sup>.

Ambos receptores poseen seis dominios distintos (Fig. 4): el dominio A/B se refiere al dominio amino terminal y contiene el segmento AF-1, el cual puede activar la transcripción independiente de ligando, una región del receptor involucrada en la interacción proteína-proteína y la activación transcripcional para la expresión de genes blanco<sup>86</sup>. La actividad de AF-1 es regulada por fosforilación y es independiente de hormonas<sup>132</sup>. El dominio C corresponde al dominio de unión al DNA (DBD), este dominio es ampliamente conservado<sup>86</sup>. El DBD consiste de dos distintos y funcionales motivos de zinc y es responsable de la unión específica al receptor de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora de genes blanco<sup>143</sup>. El dominio D es la región "bisagra", la cual separa el DBD y el dominio de unión al ligando. La flexibilidad en la estructura secundaria de esta región permite cambios conformacionales en la molécula del receptor durante la activación y es importante en la dimerización del receptor. El dominio E/F contiene el dominio de unión al ligando (LBD) localizado en la porción carboxilo terminal de los receptores. Esta región consiste de 12 hélices, las cuales forman una región hidrofóbica responsable de la unión al ligando. El LBD además contiene el segmento AF-2, el cual puede activar la transcripción dependiente de ligando<sup>86</sup> y es dependiente de hormonas<sup>132</sup>, por ejemplo activa la transcripción en respuesta a E<sub>2</sub> o agonistas sintéticos por reclutamiento y unión de coactivadores a los receptores<sup>86</sup>.



El RE $\alpha$  y RE $\beta$  son altamente homólogos en el DBD (aprox. 96%) y posee moderada identidad de secuencia en el LBD (aprox. 53%)<sup>80</sup>. La mayor diferencia en el dominio funcional entre el RE $\alpha$  y RE $\beta$  esta contenido en la región amino terminal (AF-1). Comparaciones hechas al dominio AF-1 en ambos receptores, revela que en el RE $\alpha$ , este dominio es muy activo en estimular la expresión de genes reporteros de una variedad de construcciones ERE-receptor, mientras que la actividad del dominio AF-1 del RE $\beta$  es insignificante<sup>52</sup>. Esta diferencia en la región amino terminal del RE $\alpha$  y RE $\beta$  sugiere ser la razón que existe entre estos receptores para responder de manera diferente a varios ligandos<sup>86</sup>.

El RE $\alpha$  está localizado abundantemente en el tracto reproductivo femenino (especialmente en útero, vagina y ovario), así como en la glándula mamaria, el hipotálamo, células endoteliales, músculo liso, hígado y corazón. Mientras que el RE $\beta$  está expresado en sistema nervioso central, sistema cardiovascular, sistema inmune, sistema gastrointestinal, riñón, próstata, pulmón y diferente expresión en la glándula mamaria. Estas diferencias en la distribución del tejido entre estos receptores pueden explicar algunas de las acciones selectivas de los estrógenos en diferentes tejidos<sup>80, 96</sup>.



**Figura 4. Representación esquemática de los dominios funcionales del RE $\alpha$  y RE $\beta$ .** Los números que se encuentran en el exterior de cada recuadro se refieren al número de aminoácidos (Modificado de Lewis JS y Jordan VC<sup>86</sup>).

#### **4.5.3.1. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN CÁNCER.**

En tejido de mama varios estudios han indicado un incremento en la relación de la proteína del RE $\alpha$ /RE $\beta$  y ARNm en cáncer, cuando es comparada con tumores benignos y tejido normal<sup>6</sup>. Shaw et al 2002<sup>145</sup>, revela menor expresión de la proteína de RE $\beta$  en carcinomas y demuestra que la expresión del RE $\alpha$ , pero no la del RE $\beta$ , era correlacionada con el grado del tumor. Estudios similares usando PCR-RT, mostraron que el ARNm del RE $\alpha$  está incrementado y que el ARNm del RE $\beta$  disminuye durante la carcinogénesis<sup>69</sup>.

En cáncer de colon, los estrógenos tienen un efecto protector. Desde que se reportó una expresión mínima del RE $\alpha$  en mucosa de colón normal y células de cáncer de colón<sup>20, 168</sup>, se sugirió que el efecto de los estrógenos en cáncer de colón puede ser mediado por el RE $\beta$ . Usando la técnica de RT-PCR semicuantitativa Campbell-Thompson et al 2001<sup>20</sup>, mostraron que el RE $\beta$  es el subtipo predominante del RE en el colon humano y que la disminución de los niveles de ARNm del RE $\beta$  están asociados con tumorogénesis en colon en mujeres. Konstantinopoulos et al 2003<sup>74</sup>, mostró que la expresión del RE $\beta$  era significativamente más baja en células de cáncer de colon que en epitelio de colon normal. Weyant et al<sup>169</sup> trabajó con un modelo en ratón el cual desarrolla múltiples tumores intestinales que muestran pérdida de la proteína APC. En este modelo, la prevención inducida por E<sub>2</sub> en la formación del tumor asociada a APC era correlacionada con un incremento en la proteína del RE $\beta$  y una disminución en el RE $\alpha$ . Juntos estos resultados sugieren ampliamente el efecto protector del RE $\beta$  contra carcinogénesis de colon.

#### **4.5.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS.**

Ambos receptores de estrógenos son factores de transcripción activados por ligando, incrementan o disminuyen la síntesis del RNAm de genes blanco.

El mecanismo de acción del RE puede ser genómico o no-genómico. El mecanismo acción genómico a su vez se divide en mecanismo de acción clásico y no-clásico<sup>132</sup> (Figura 5).

En el mecanismo de acción genómico clásico, el estrógeno después de entrar a la célula se une al RE en el núcleo. En el núcleo el RE está presente como un

monómero, y al unirse el estrógeno, un cambio en la conformación ocurre, fosforilación y dimerización; lo cual incrementa la afinidad y la velocidad de unión del receptor al DNA<sup>132</sup>. El RE se une a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en genes blanco, con la secuencia consenso GGTCANNNTGACC<sup>22</sup>. En el mecanismo genómico no-clásico, el RE puede regular la expresión de genes sin interactuar directamente con el DNA, vía otros factores de transcripción como Fos/Jun<sup>32, 81,142</sup>.

El mecanismo no-genómico consiste en la interacción del RE con factores de crecimiento dependientes de cinasas. Esta acción ocurre rápidamente seguida por la unión al ligando y es independiente de la transcripción de genes<sup>132</sup>.

La acción genómica y la no-genómica del RE no necesariamente son mecanismos independientes, bajo algunas circunstancias pueden ser rutas complementarias<sup>132</sup>.

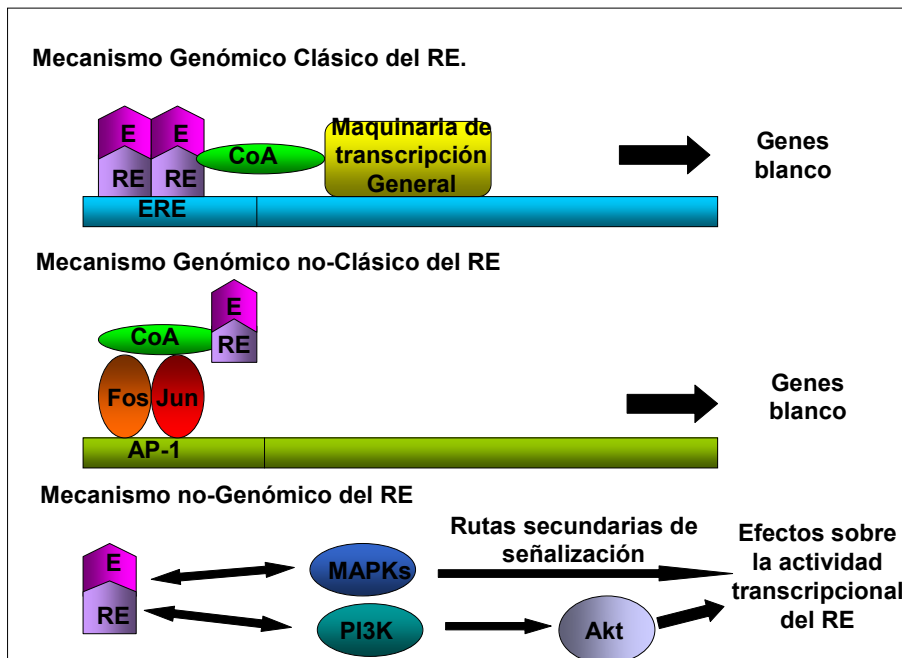


FIGURA 5. Representación esquemática del mecanismo genómico (clásico y no-clásico) y no-genómico del RE (Modificado de Ring A y Dowsett M<sup>132</sup>).

La transcripción mediada por el RE puede ser modulada por la presencia de proteínas correguladoras las cuales son reclutadas e interactúan con complejos ligando-receptor unidos al promotor. Los coactivadores (CoA) aumentan la transcripción y los correpresores (CoR) suprimen la transcripción<sup>132</sup>.

Los coactivadores incluyen la familia p160, los cuales estimulan la actividad del RE a través de la interacción con AF-1. Los tres miembros son el coactivador receptor nuclear 1 (NCoA1 además conocido como SRC1), NCoA2 (TIF2 o GRIP1) y NCoA3 (A1B1, TRAM1, RAC3 o ACTR)<sup>84,99</sup>. Otros coactivadores incluyen el complejo SWI/SNF, proteína unión a CREB (CBP), p300/factor asociado a CBP (PCAF), y el complejo TRAP/DRIP/SMCC<sup>21, 68, 153,167</sup>.

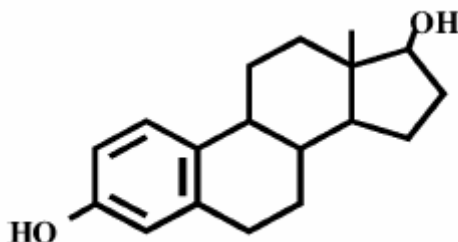
Estas proteínas asociadas con otras y la maquinaria de transcripción general de la célula forman complejos de alto peso molecular capaces de sinergizar la activación transcripcional conducida por estrógenos<sup>132</sup>.

Muchos coactivadores además tienen actividad histona-acetil transferasa (HAT)<sup>132</sup> y/o reclutan otras proteínas con esta actividad. La acetilación de histonas altera la estructura de la cromatina en la región promotora de genes blanco y permite a las proteínas preparar el aparato de transcripción general para ensamblar e iniciar la transcripción<sup>170</sup>.

La interacción de RE con un antagonista promueve la dimerización y unión al DNA. Sin embargo, un antagonista produce una conformación del RE que es diferente de la que se forma por la unión de un agonista al receptor. La conformación inducida por el antagonista facilita la unión de correpresores<sup>170</sup>. Los correpresores son: el correpresor receptor nuclear 1 (NCoR1) y NCoR2 (además conocida como SMRT). El complejo correpresor/RE entonces promueve el reclutamiento de otras proteínas con actividad histona-desacetilasa (HDAC). La desacetilación altera la conformación de la cromatina y reduce la capacidad del aparato de transcripción general para formar el complejo de iniciación<sup>132</sup>.

#### 4.5.5. GENERALIDADES DEL ESTRADIOL (E<sub>2</sub>).

El estrógeno intracelular predominante es el 17-β-estradiol (Figura 6); su mecanismo de acción (Figura 7) puede ser a través del modelo clásico de estrógenos.



17-β-Estradiol

FIGURA 6. Estructura química del 17-β-estradiol (Tomada de Lewis JS y Jordan VC<sup>86</sup>).

El E<sub>2</sub> se une al RE<sub>α</sub> o RE<sub>β</sub> e induce un cambio conformacional en el receptor, provocando la disociación de estos de las proteínas de choque térmico y la formación de homodímeros o heterodímeros con el receptor. El complejo RE:E<sub>2</sub> entonces se une a pequeñas secuencias palindrómicas de DNA, llamadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs), típicamente localizados en la región 5' de la región promotora de genes sensibles a estrógenos<sup>159</sup>. Una vez unido al DNA, el complejo receptor ocupado por el ligando recluta y une coactivadores y correpresores, los cuales subsecuentemente modulan la actividad transcripcional de genes sensibles a estrógenos<sup>86</sup>.

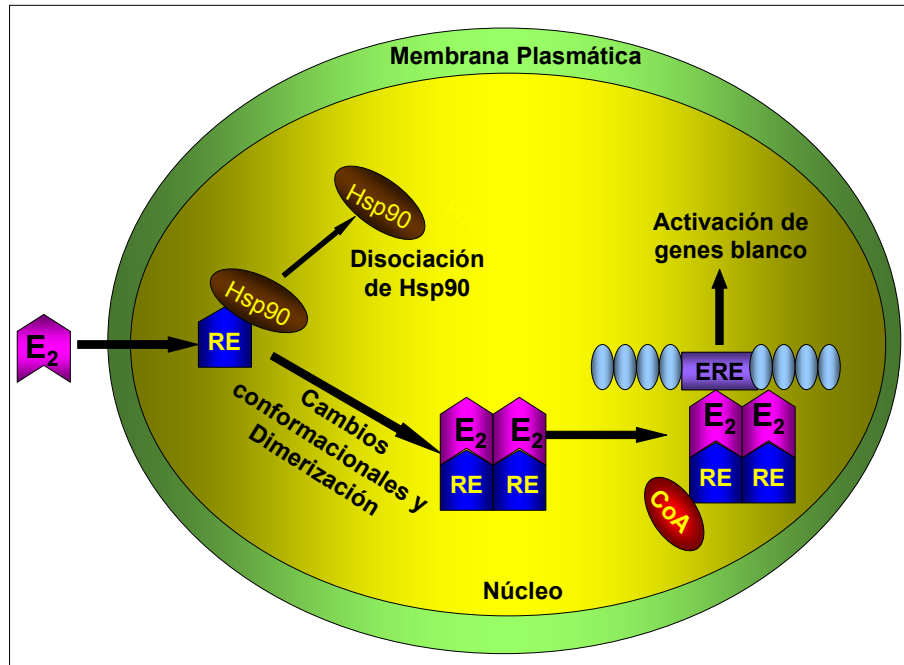


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de acción del E<sub>2</sub> (Modificado de Lewis JS y Jordan VC<sup>86</sup>).

El E<sub>2</sub> tiene un papel importante en apoptosis y proliferación celular. Existe evidencia que sugiere que el E<sub>2</sub> suprime la apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7, RE positivo, a través de la fosforilación e inactivación de la proteína proapoptótica BAD, la cual es fosforilada en S112A y S136A. La habilidad del E<sub>2</sub> para prevenir la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) era bloqueada al utilizar una mutante de la proteína BAD, la cual carecía de los sitios de fosforilación, y no podía ser fosforilada en presencia de E<sub>2</sub>. Además demostraron que el E<sub>2</sub> induce la fosforilación de BAD a través de la ruta Ras/PI-3K/Akt y Ras/ERK/p90<sup>RSK1</sup> y que la ruta del PI-3K/Akt es requerida para que el E<sub>2</sub> bloquee la apoptosis inducida por el TNF- $\alpha$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ausencia de suero. Juntos estos resultados muestran que el E<sub>2</sub> puede prevenir la apoptosis a través de un mecanismo no-genómico<sup>134</sup>. También se ha reportado que el E<sub>2</sub> inhibe la apoptosis en las células MCF-7 induciendo la expresión de la proteína Bcl-2<sup>121</sup>.

El E<sub>2</sub> incrementa la proliferación celular y causa la formación del tumor de células MCF-7 que solo expresan RE $\alpha$ . La expresión del RE $\beta$  por medio de adenovirus cambia

el fenotipo de las células MCF-7, RE positivo. Introduciendo el RE $\beta$  dentro de células MCF-7 provoca la inhibición de la proliferación celular in vitro y evita la formación del tumor in vivo en respuesta a E<sub>2</sub>. El RE $\beta$  inhibe la proliferación celular al inhibir la transcripción de genes como c-myc, ciclina D1, ciclina A e incrementar la expresión de p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>, lo cual conduce a una detención del ciclo celular en G<sub>2</sub><sup>119</sup>.

En las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y SW620 se determinó un aumento en la proliferación después del tratamiento con E<sub>2</sub>, mientras que con E<sub>1</sub> se inhibió la proliferación celular<sup>35, 40</sup>.

El E<sub>2</sub> desarrolla un papel importante en el crecimiento de células glandulares de endometrio normal por medio de la regulación a la alta de ciclina D1; esta activación transcripcional es mediada por la unión de c-Jun a la secuencia AP-1 del promotor. En células de Ishikawa de carcinoma endometrial se cree que el mecanismo es diferente a la expresión de ciclina D1<sup>149</sup>.

#### **4.5.6. MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (SERMs).**

Los SERMs son una nueva categoría de agentes terapéuticos disponibles para la prevención y tratamiento de enfermedades como osteoporosis y cáncer de mama<sup>72</sup>. Estos compuestos son diferentes de los estrógenos (los cuales son agonistas) y antiestrógenos (los cuales son antagonistas) los SERMs tienen una actividad farmacológica selectiva del tejido; pueden ser agonistas en algunos tejidos (hígado y el sistema cardiovascular) y antagonistas en otros tejidos (cerebro, mama) y agonistas/antagonistas en útero<sup>86</sup>.

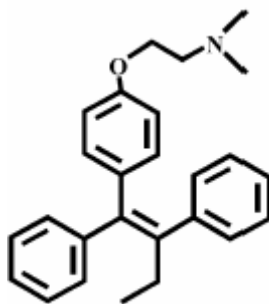
Los SERMs más conocidos son: tamoxifeno (Nolvadex), raloxifeno (Evista) y toremifeno (Fareston)<sup>86</sup>.

Aun no se conoce como los SERMs, como tamoxifeno y raloxifeno, pueden ser antiestrogénicos en unas células y estrogénicos en otras, se cree que muchas de las actividades de los SERMs pueden ser explicadas a través de tres mecanismos: 1) diferente conformación del RE sobre la unión del ligando; 2) diferente expresión y unión al RE de proteínas correguladoras; y 3) diferente expresión del RE y activación del gen a través de no interactuar con ERE<sup>86</sup>.

#### 4.5.6.1 GENERALIDADES DEL TAMOXIFENO (TAM).

TAM (Figura 8) es un antagonista en la glándula mamaria y es el más comúnmente usado en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama RE positivo<sup>86</sup>. El TAM además puede ser usado como un agente preventivo para el cáncer de mama dependiente de hormonas<sup>29</sup>.

TAM pertenece a la clase trifeniletileno, compuestos derivados del mismo núcleo estilbeno como dietilestilbestrol; compuestos de esta clase tienen diferentes actividades estrogénicas y antiestrogénicas. En general, la conformación *trans* tiene actividad antiestrogénica, mientras que la conformación *cis* posee actividad estrogénica. Sin embargo, la actividad farmacológica de compuestos *trans* depende de la especie, tejido blanco y gen<sup>45</sup>.



**Tamoxifeno**

**Figura 8. Estructura química del tamoxifeno (Tomada de Lewis JS y Jordan VC<sup>86</sup>).**

TAM actúa como un antagonista vía ERE, pero es agonista a través de AP-1. Tamoxifeno se une al RE y produce diferentes cambios conformacionales que facilitan la interacción de correpresores, los cuales inhiben el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, inhibiéndose la transcripción. En la ruta de unión a AP-1, el RE ligado a tamoxifeno en vez de unirse a ERE, interactúa con las proteínas AP-1, c-Jun c-Fos, y inicia la transcripción de un elemento de respuesta alternativo<sup>86</sup> (Figura 9).

El TAM inhibe la activación de AF-2 y funciona como un antagonista sobre genes los cuales dependen de la región AF-2 para la transcripción mediada por RE. Sin embargo, en genes donde la función de AF-2 no es necesaria y la transcripción es llevada a cabo por AF-1, TAM puede actuar como agonista<sup>98, 160</sup>.



Además, TAM funciona como antagonista cuando actúa a través del RE $\beta$  en genes que contienen EREs pero puede funcionar como agonista parcial cuando opera a través del RE $\alpha$ <sup>52</sup>.

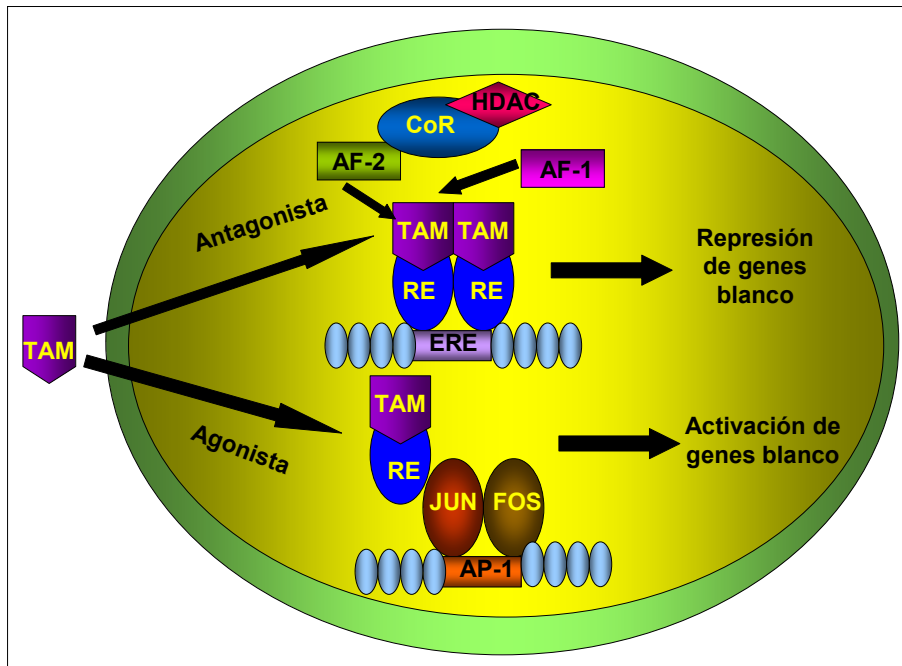


FIGURA 9. Mecanismo de acción del tamoxifeno (Modificado de Lewis JS y Jordan VC<sup>86</sup>).

La eficacia clínica del TAM ha sido atribuida al arresto e inducción de apoptosis en células de cáncer de mama. El mecanismo primario de acción del TAM se cree que es a través de la inhibición del RE, sin embargo, existen reportes que no involucran al RE, incluyen proteínas moduladoras como: proteína cinasa C (PKC), calmodulina, el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y el protooncogen c-myc. Además se ha implicado el rol de las caspasas y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Estrés oxidativo, transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT), generación de ceramidas, así como, cambios en la fluidez de la membrana de la célula pueden ser importantes en la apoptosis inducida por tamoxifen<sup>94</sup>. En una línea celular de

glioblastoma humana, TAM induce apoptosis in vitro dependiente de p-53, por un mecanismo ligado a la inhibición de proteína cinasa C<sup>158</sup>.

Estudios in vitro demostraron el efecto del TAM en el crecimiento de diferentes líneas celulares. El tratamiento de la línea celular Ishikawa (cáncer de endometrio) con *trans*-OH-TAM resulta en un incremento significativo en el número de células y este es correlacionado con la concentración del OH-TAM. En una variante de células Ishikawa, se observó el efecto estimulador del TAM, mientras que este no era observado con el tratamiento de E<sub>2</sub><sup>4</sup>. En otro estudio se encontraron efectos contrarios; TAM induce la inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer endometrial HEC-1 y KLE, RL95-2, el efecto es reversible cuando TAM y E<sub>2</sub> eran simultáneamente adicionados al medio de cultivo<sup>48</sup>.

Estudios in vivo han demostrado que TAM solo o en combinación con E<sub>2</sub>, estimulan el crecimiento del tumor endometrial. TAM solo no estimula el crecimiento de tumores de mama y tiene un efecto antagonista sobre el crecimiento estimulado por E<sub>2</sub><sup>47</sup>.

Varios estudios han reportado la capacidad de TAM para limitar el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama, sin embargo, algunas líneas no siguen este patrón. Para la línea celular MCF-7, TAM disminuye el crecimiento celular solo a bajas concentraciones (10<sup>-8</sup> y 10<sup>-7</sup>M)<sup>27</sup>.

#### **4.6. REGULACIÓN DE E-CADERINA POR ESTRÓGENOS.**

El efecto de esteroides sexuales en el complejo E-caderina-catenina es dependiente del sistema celular usado. Cuando se trata con 17-β-estradiol, la línea celular humana de carcinoma mamario MCF-7 experimenta diferenciación morfológica in vitro, incluyendo nuevos arreglos de la actina-F y la tinción de plakoglobulina muestra un patrón más uniforme y una pérdida gradual de vinculina de la función adherente célula-célula y célula-matriz<sup>34</sup>. La deficiente función del complejo E-caderina-catenina en estas células es restaurado en ensayos de agregación por tamoxifeno y en menor grado por sus metabolitos 4-OH-tamoxifeno y N-desmetil-tamoxifeno, confirmando un mecanismo medido por el mecanismo de receptores nucleares clásicos, sin embargo, este efecto no era observado en líneas celulares de cáncer de mama RE-negativo<sup>17,18</sup>.

Se ha reportado que E-caderina es un gen regulado negativamente por estrógenos en células de cáncer de mama humano. En líneas celulares de cáncer de mama RE-positivo tratadas con E<sub>2</sub>, disminuyen los niveles de expresión de la proteína y ARNm de E-caderina. Esta regulación negativa puede ser reversible por el uso de antiestrógenos usados en la clínica para el tratamiento del cáncer de mama<sup>110</sup>.

Prinsac et al 2001<sup>128</sup> y Habermann et al 2001<sup>51</sup> mostraron que la exposición a estrógenos era asociada con cambios en la adhesión de células epiteliales y disminución de los niveles de E-caderina en próstata de rata adulta. El tratamiento con E<sub>2</sub> resulta en la disminución de N-caderina<sup>92</sup> e incremento en los niveles de E-caderina<sup>91</sup> en ovario de ratón.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS.**

En el presente trabajo se utilizaron las líneas celulares humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), C-33 (cáncer de cerviz) y SW620 (adenocarcinoma de colon) para determinar: 1) Expresión de los RE y 2) El efecto del E<sub>2</sub> y TAM en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina.

Las células C-33 y MCF-7 fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro García-Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología de México y las células SW620 por el Dr. Manuel Perucho del Instituto Burnham de la Jolla, Estados Unidos de América.

### **5.2. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES HUMANAS MCF-7, C-33 Y SW620.**

Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar (zona aséptica) y el material utilizado estéril.

#### **5.2.1. Descongelación de las líneas celulares humanas mantenidas en nitrógeno líquido.**

- a) Adicionar 4 mL de medio de cultivo fresco a una caja Petri de 5 cm de diámetro donde crecerán las células e incubarla por 10 minutos a 37°C.
- b) Sacar los criotubos que contienen a las células del nitrógeno líquido y descongelar mediante agua tibia o frotándolo con las manos.
- c) Se agrega el contenido del criotubo a la caja Petri con el medio y se distribuye el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incuba a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> alrededor de dos horas o hasta que por observación al microscopio se observe que las células se hallan adherido a la superficie de la caja Petri.
- e) Se elimina el medio de cultivo y se cambia por medio fresco.

### 5.2.2. Propagación de las líneas celulares.

Una vez que las líneas celulares llegan a confluencia, es necesario resembrarlas, transfiriendo una alícuota de suspensión celular a otras cajas de cultivo.

- a) Eliminar el medio de cultivo de la caja Petri por decantación.
- b) Lavar la caja con PBS-EDTA y decantar.
- c) Se adiciona PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular y se incuba a 37°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se desprenden las células con ayuda de una pipeta, vertiendo el PBS-EDTA sobre la monocapa hasta observar turbidez.
- d) Se disgregan las células desprendidas succionando y expulsando el PBS-EDTA hasta que por observación microscópica se compruebe que se han obtenido células individuales.
- e) Se adiciona un alícuota de la suspensión celular en una caja Petri con medio de cultivo fresco previamente atemperado a 37°C y se distribuyen las células con movimientos circulares suaves.
- f) Se dejan sedimentar las células en una superficie horizontal durante 10 minutos y posteriormente se incuban a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.3. Congelación y preservación de las líneas celulares humanas.

Para realizar este procedimiento se necesita de un cultivo celular en confluencia elevada (>80%).

- a) Se llevan acabo los pasos de los incisos a-d de la sección 5.2.2
- b) La suspensión se colecta con ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo y se centrifuga a 225g durante 5 minutos.
- c) Se decanta el PBS-EDTA y se resuspende el botón celular con el PBS-EDTA residual.
- d) Se adicionan 4.5 mL de medio de congelamiento por cada caja de cultivo cosechada homogenizando la suspensión celular.
- e) Se alícuota la suspensión celular en criotubos y se congela en posición vertical.

- f) Se introducen los criotubos en nitrógeno líquido.

### 5.3. CONTEO CELULAR EN CÁMARA DE NEWBAUER.

- a) Se llevan acabo los pasos de los incisos a-d de la sección 5.2.2.
- b) Limpiar la cámara de Newbauer con etanol al 70%, secarla y colocarla en una superficie horizontal.
- a) Tomar 100  $\mu$ L de la suspensión celular, colocarla en la cámara y dejar reposar durante 2 minutos para que las células sedimenten.
- b) Se coloca la cámara en el microscopio y se cuentan las células que se encuentran en los ocho cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos siguiendo el siguiente criterio: se cuentan las células que se encuentran dentro de los 16 cuadros que corresponden a cada cuadrante. Si hay células en el limite de dos cuadros, se toman en cuenta solo dos lados de tal manera que formen un a L invertida, las células que se encuentren entre estos lados solamente se adicionan al cuadro que se estaba contando, con el fin de evitar que la célula se cuente en dos o más cuadros.
- c) Se obtiene el promedio de la cuenta de ocho cuadrantes y se aplica la siguiente formula:

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

### 5.4. FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS.

Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar (zona aséptica) y el material utilizado estéril.

- a) Eliminar el medio de cultivo de la caja Petri con ayuda de una pipeta Pasteur.
- b) Lavar con 2-2.5 mL de PBS goteando sobre los cubreobjetos.
- c) Retirar el PBS con ayuda de una pipeta Pasteur y adicionar 4 mL de p-formaldehído al 4%.
- d) Incubar a temperatura ambiente por 45-60 minutos.

- e) Retirar el PBS con ayuda de una pipeta Pasteur y sellar la caja Petri con parafilm®.
- f) Conservar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

### **5.5 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).**

#### **Hidratación de las células.**

- a) Colocar los cubreobjetos en agua destilada durante 3 minutos.

#### **Permeabilización celular.**

- a) Colocar los cubreobjetos en citrato de sodio (nuevo) 10mM pH 6.0 y calentar en horno de microondas; 10 minutos, 2 veces, entre cada calentamiento, esperar 5 minutos. (Horno en alta potencia).
- b) Esperar a enfriar el citrato de sodio a temperatura ambiente.
- c) Lavar con PBS, 2 veces por 5 minutos c/u.

#### **Bloqueo de peroxidasa endógena.**

- a) Incubar los cubreobjetos con la solución bloqueadora (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS al 3%) por 45 minutos a temperatura ambiente.
- b) Lavar con PBS, 2 veces por 5 minutos c/u.

#### **Permeabilización celular.**

- a) Incubar los cubreobjetos con la solución permeabilizante (Tritón X-100 al 0.5% en PBS) durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- b) Lavar con PBS, 2 veces por 5 minutos c/u.

#### **Bloqueo.**

- a) Incubar los cubreobjetos con la solución bloqueadora (albúmina sérica bovina al 5% en PBS) durante 60 minutos a temperatura ambiente.

**Detección de antígenos.**

- a) Incubar los cubreobjetos con el primer anticuerpo durante 72 horas (diluir el anticuerpo en PBS más tritón X-100 al 0.3%) a 4°C en cámara húmeda.
- b) Transcurrido el tiempo lavar con PBS, 10 veces por 5 minutos c/u.
- c) Incubar los cubreobjetos con el anticuerpo secundario (diluir el anticuerpo en PBS más albúmina sérica bovina al 5%) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- d) Transcurrido el tiempo lavar con PBS, 2 veces por 5 minutos c/u.

**Marcaje.**

- a) Incubar los cubreobjetos con el complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa durante 60 minutos.

**Revelado.**

- a) Incubar los cubreobjetos con el cromógeno DBA (3,3'diamino benzidina tetrahidrocloreuro), a temperatura ambiente hasta observar tinción. Generalmente es entre 30-60 segundos.

**Contratinción.**

- a) Adicionar a las muestras la solución de hematoxilina de Mayer® durante 2 min.
- b) Lavar con agua durante 5 min.
- c) Virar con carbonato de litio o agua caliente por 2 min.
- d) Lavar con agua a temperatura ambiente por 2 min.

**Deshidratación:**

- a) Deshidratar las muestras con el siguiente tren de deshidratación:
  - 1. Etanol 50%, 1 minuto.
  - 2. Etanol 70%, 1 minuto.
  - 3. Etanol 90%, 1 minuto.
  - 4. Etanol 95%, 1 minuto.
  - 5. Etanol absoluto, 1 minuto.
  - 6. Xilol-Etanol, 1 minuto.



7. Xilol, 1 minuto.
8. Xilol, 5 minutos.

**Montaje de las muestras.**

- a) Colocar en un portaobjetos una gota de Clariol® y montar el cubreobjetos sobre la gota con la superficie de la muestra hacia el portaobjetos, evitando formar burbujas.

**5.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN LAS LÍNEAS CELULARES HUMANAS.**

Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar (zona aséptica) y el material utilizado estéril

- a) Las líneas celulares se crecen en cajas de 10cm en medio DMEM hasta alcanzar una confluencia mayor del 80%.
- b) Se llevan acabo los pasos de los incisos a-d de la sección 5.2.2.
- c) Se realiza el conteo celular con ayuda de una cámara de Newbauer, considerando los pasos de la sección 5.3.
- d) Se prepara una caja Petri de 10cm de diámetro con cubreobjetos circulares estériles en el interior.
- e) Colocar 750, 000 células en un tubo Falcon® y adicionar medio DMEM suplementado con 10% SFB hasta completar 8mL. Posteriormente gotear sobre los cubreobjetos con ayuda de una pipeta, tratando de que queden con un alto número de células adheridas.
- f) Incubar las cajas a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48Hrs para asegurar una alta confluencia.
- g) Transcurrido el tiempo fijar las células repitiendo los pasos de la sección 5.4.
- h) Se realiza la técnica de IHQ, siguiendo los pasos de la sección 5.5. En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO.	DESCRIPCIÓN
Primer anticuerpo RE $\alpha$ (Santa Cruz Biotechnology®)	Anticuerpo policlonal IgG de conejo.
Segundo anticuerpo RE $\alpha$ (Vector®)	Anticuerpo anti-conejo biotinilado IgG.
Primer anticuerpo RE $\beta$ (Santa Cruz Biotechnology®)	Anticuerpo policlonal IgG de cabra.
Segundo anticuerpo RE $\beta$ (Santa Cruz Biotechnology®)	Anticuerpo anti-cabra IgG biotinilado

### 5.7. TRATAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES HUMANAS CON ESTRADIOL (5nM) y TAMOXIFENO (0.5 $\mu$ M)

Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar (zona aséptica) y el material utilizado estéril.

- a) Las líneas celulares se crecen en cajas de 10cm en medio DMEM hasta alcanzar una confluencia mayor del 80%.
- b) Se llevan acabo los pasos de los incisos a-d de la sección 5.2.2.
- c) Realizar el conteo celular con ayuda de una cámara de Newbauer, considerando los pasos de la sección 5.3.
- d) Se prepara una caja Petri de 5 cm de diámetro con cubreobjetos circulares estériles en el interior.
- e) Colocar 500, 000 células en un tubo Falcon® y adicionar medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino hasta completar un volumen de 4 mL. Gotear sobre los cubreobjetos con ayuda de una pipeta, tratando de que queden con un alto número de células adheridas. Se incuban durante 24 horas a 37°C y en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.
- f) Transcurrido el tiempo de incubación, se elimina el medio con ayuda de una pipeta. Se realizan dos lavados con PBS goteando sobre los cubreobjetos y se elimina con pipeta. Adicionar 3 mL de medio RPMI 1640 libre de rojo fenol y suplementado con

10% de suero fetal bovino sin hormonas. Incubar durante 24 Horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

g) Transcurrido el tiempo de incubación las líneas celulares son tratadas con estradiol y tamoxifeno a las siguientes concentraciones: control (etanol 0.14%); E<sub>2</sub> (5nM); E<sub>2</sub> (5nM) + TAM (0.5µM) y TAM (0.5µM).

h) Las cajas se incuban a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a los siguientes intervalos de tiempo: 0, 6, 12, 24 Hrs.

i) Al termino de cada intervalo de tiempo las células (tratamiento y controles) se fijan repitiendo los pasos de la sección 5.4.

### 5.8 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN E-CADERINA EN LAS LINEAS CELULARES HUMANAS TRATADAS CON ESTRADIOL Y TAMOXIFENO.

a) Se realiza la técnica de IHQ en las diferentes líneas celulares (tratamiento y control) a los diferentes intervalos de tiempo, repitiendo los pasos de la sección 5.5.

Los anticuerpos que se utilizaron en este trabajo fueron los siguientes:

ANTICUERPO	DESCRIPCIÓN.
Primer anticuerpo (Santa Cruz Biotechnology®)	Anticuerpo E-caderina, policlonal IgG de conejo.
Segundo anticuerpo (Santa Cruz Biotechnology®)	Anticuerpo anti-conejo IgG biotilado.

### 5.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEINA DE ADHESIÓN E-CADERINA.

Los resultados obtenidos en los experimentos se analizaron en un microscopio Nikon Compuesto. Se tomaron al azar cinco campos de cada experimento a un aumento de 20X y posteriormente se analizo la expresión de E-caderina

densitométricamente utilizando el Software Zeiss; KS300. Las lecturas reportadas son unidades densitométricas (unidades de “grises”) asignadas por el programa. Estas unidades tienen una escala de 0 (negro) a 250 (blanco); valores cercanos a cero indican mayor inmunoreactividad, mientras que valores cercanos a 250 menor inmunoreactividad.

### 5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó usando la prueba “t” de Student (Software Prisma; GraphPad) y p 0.05 es considerada significativa.

### 5.11. PREPARACION DE SOLUCIONES.

#### Medio de cultivo.

#### Medio de cultivo D-MEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium)

Componentes	Cantidad.
Medio D-MEM (Gibco)	1 sobre para disolver en 1 L.
Suplementado con:	
$\text{NaHCO}_3$ (Baker)	3.5 g.
Hepes (Sigma)	2.2 g.
Solución de aminoácidos no esenciales (Gibco)	10 mL.
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10 mL.
Piruvato de sodio (Gibco)	10 mL.
Suero fetal bovino (Gibco)	100 mL.

a) Disolver el contenido de un sobre de medio D-MEM en 700 mL de agua desionizada estéril.

b) Adicionar todos los suplementos excepto el suero fetal bovino. La solución se agita hasta disolución completa.

- c) Aforar a 900 mL con agua desionizada estéril.
- d) Esterilizar la solución por filtración con membrana Millipore® de tamaño de poro de 0.22µm.
- e) Suplementar el medio con 100 mL de suero fetal bovino. Conservar el medio en refrigeración a 4°C.
- f) Como control de contaminación se sugiere incubar una alícuota del medio a 37°C durante 48 horas. Si al término de este tiempo hay turbidez en el medio o vira el indicador a color amarillo, es señal de que hay contaminación.

**Medio de cultivo libre de rojo fenol y hormonas.**

**Medio RPMI 1640.**

Componentes	Cantidad.
Medio RPMI 1640 (Gibco)	1 sobre para disolver en 1L.
Suplementado con:	
N <sub>a</sub> HCO <sub>3</sub> (Baker)	2.0 g
Dextrosa (Baker)	2.5 g.
Solución de aminoácidos no esenciales (Gibco)	10 mL.
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10 mL.
Piruvato de sodio (Gibco)	10 mL.
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	100 mL.

- a) Disolver el contenido de un sobre de medio RPMI 1640 en 700 mL de agua desionizada estéril.
- b) Adicionar todos los suplementos excepto el suero fetal bovino. La solución se agita hasta disolución completa.
- c) Aforar a 900 mL con agua desionizada estéril.
- d) Esterilizar la solución por filtración con membrana Millipore® de tamaño de poro de 0.22µm.
- e) Suplementar el medio con 100 mL de suero fetal bovino inactivado. Conservar el medio en refrigeración a 4°C.

f) Como control de contaminación se sugiere incubar una alícuota del medio a 37°C durante 48 horas. Si al término de este tiempo hay turbidez en el medio es señal de que hay contaminación.

**Medio de congelamiento.**

- a) Se utiliza medio DME-M, sin complementar con suero fetal bovino y se le adiciona 15% de glicerol estéril.
- b) Guardar en recipientes estériles y congelar a – 20°C.

**Solución de PBS.**

Para preparar un litro de solución.

Componentes	Cantidad
NaCl (Baker)	8.0 g.
KCl (Baker)	0.2 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Baker)	0.24 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Baker)	1.44 g.
Agua desionizada c.b.p.	1 L.

- a) Disolver las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada.
- b) Ajustar el pH a 7.4.
- c) Aforar a 1L con agua desionizada.
- d) Alicuotar en recipientes limpios y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup>.
- e) Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración a 4°C.

**Solución de PBS-EDTA**

Para preparar un litro de solución.

Componentes	Cantidad
NaCl (Baker)	8.0 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Baker)	0.24 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Baker)	1.44 g.
KCl (Baker)	0.2 g.

EDTA (Sigma)	0.37 g.
Agua desionizada c.b.p.	1 L.

- Disolver las sales en 900 mL de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7.4.
- Aforar a 1 L con agua desionizada.
- Alicuotar en recipientes limpios y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup>.
- Guardar la solución a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C.

#### **Solución de p-formaldehído al 4%**

Para preparar 100 mL de solución de p-formaldehído.

Componentes	Cantidad.
PBS (estéril) c.b.p.	100 mL.
p-formaldehído* (Sigma)	4 g.

\*NOTA: Pesar el p-formaldehído con guantes y cubrebocas.

- Disolver el p-formaldehído en 60 mL de PBS estéril, con ayuda de calentamiento y agitación.
- Esperar a enfriar la solución a temperatura ambiente.
- Aforar a 100 mL con PBS estéril.
- Esterilizar la solución por filtración con membrana Millipore<sup>®</sup> de tamaño de poro de 0.22µm.
- Guardar en un recipiente estéril y conservar en refrigeración a 4°C.

#### **Estradiol<sup>®</sup> (5nM).**

Para preparar 10 mL de solución stock de estradiol.

Componentes	Cantidad.
β-Estradiol (Sigma)	1 mg.
Agua desionizada (estéril) c.b.p.	10 mL.

- a) Disolver el estradiol en 10 mL de agua desionizada estéril, de modo que se obtiene una concentración de  $1.71 \cdot 10^4$  nM.
- b) Alicuotar en tubos estériles y conservar en refrigeración a 4°C.

**Tamoxifeno<sup>®</sup> (0.5µM).**

Para preparar 10 mL de solución stock de Tamoxifeno.

Componentes	Cantidad.
Tamoxifeno (Sigma)	1 mg.
Etanol c.b.p.	10 mL.

- a) Disolver el tamoxifeno en 10 mL de etanol, de modo que se obtiene una concentración de  $2.6 \cdot 10^5$  nM.
- b) Alicuotar en tubos estériles y conservar en refrigeración a 4°C.

**Solución de citrato de sodio.**

Para preparar un litro de solución.

Componentes	Cantidad.
Citrato de sodio (Baker)	2.94 g.
Agua destilada c.b.p.	1 L.

- a) Disolver el citrato de sodio en 900 mL de agua destilada.
- b) Ajustar el pH a 6.0.
- c) Aforar a 1 L con agua destilada.

**Solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en PBS.**

Para preparar 50 mL de solución.

Componentes	Cantidad.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (Reproquifin)	5 mL.
PBS c.b.p.	50 mL.



- a) Disolver el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 50 mL con agua destilada.
- b) Mezclar por agitación la solución.

**Solución de Tritón X-100<sup>®</sup> al 0.5%.**

Para preparar 250 mL de solución.

Componentes	Cantidad.
Tritón X-100 (Sigma)	1.2 mL.
Agua destilada c.b.p.	250 mL.

- a) Disolver el tritón X-100 en agua destilada.
- b) Mezclar por agitación la solución, evitando formar demasiada espuma.

**Solución de albúmina al 5%.**

Para preparar 50 mL de solución.

Componentes	Cantidad.
Albúmina sérica bovina (Sigma)	3.8 g.
PBS c.b.p.	50 mL.

- a) Disolver la albúmina sérica bovina en 40 mL de PBS.
- b) Aforar a 50 mL con PBS.

**Solución del complejo de Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (dilución 1:50)<sup>®</sup> (Santa Cruz).**

- a) Mezclar la solución A y la solución B.
- b) Aforar al volumen requerido con PBS.
- c) Dejar reposar durante 30 minutos antes de utilizarlo.

**Solución del cromógeno DAB (3,3'diamino benzidina tetrahidrocloruro)<sup>®</sup> (Vector)**

- a) A 5mL de agua destilada adicionar dos gotas de la solución buffer y mezclar.
- b) Adicionar cuatro gotas de la solución DAB y mezclar.

- c) Adicionar dos gotas de la solución de  $H_2O_2$  y mezclar.

**Solución de etanol al 50%.**

Para preparar un litro de solución.

- a) A 500 mL de etanol absoluto adicionar 400 mL de agua destilada.  
b) Mezclar por agitación la solución.  
c) Aforar a 1 L con agua destilada.

**Solución de etanol al 70%.**

Para preparar un litro de solución.

- a) A 700 mL de etanol absoluto adicionar 200 mL agua destilada.  
b) Mezclar por agitación la solución.  
c) Aforar a 1 L con agua destilada.

**Solución de etanol al 90%.**

Para preparar un litro de solución.

- a) A 900 mL de etanol absoluto adicionar 50 mL de agua destilada.  
b) Mezclar por agitación la solución.  
c) Aforar a 1 L con agua destilada.

**Solución de etanol al 95%.**

Para preparar un litro de solución.

- a) A 950 mL de etanol absoluto adicionar agua destilada hasta aforar a 1 L.  
b) Mezclar por agitación la solución.

**Solución de Xilol-etanol.**

Para preparar un litro de solución.

- a) A 500 mL de etanol absoluto adicionar 500 mL de xilol.  
b) Mezclar por agitación la solución

## 6. RESULTADOS.

El primer objetivo que se planteó para este trabajo fue determinar la expresión de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), C-33 (cáncer de cerviz) y SW620 (adenocarcinoma colon) por medio de la técnica de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo policlonal anti-RE $\alpha$  y anti-RE $\beta$ .

### 6.1. Determinación de la concentración óptima del primer anticuerpo (anti-RE $\alpha$ y anti-RE $\beta$ ) para la expresión de los RE en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.

Uno de los aspectos que se consideró para estudiar la expresión de los receptores de estrógenos, a través de la técnica de inmunohistoquímica, fue establecer la concentración del primer anticuerpo. Se probaron diferentes diluciones menores y mayores a las recomendadas por el proveedor. Las concentraciones que se ensayaron se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Diluciones ensayadas del primer anticuerpo para la expresión de los RE.**

RECEPTOR	DILUCIONES				
RE $\alpha$	-----	-----	1:500	<b>1:750</b>	1:1000
RE $\beta$	<b>1:250</b>	<b>1:300</b>	1:500	1:750	1:1000

De acuerdo a las características observadas en la tinción, se decidió trabajar en los siguientes ensayos con una dilución 1:750 para el RE $\alpha$  en todas las líneas celulares, mientras que para el RE $\beta$  fue 1:250 para la línea celular MCF-7 y C-33 y para la línea celular SW620 1:300. La dilución del segundo anticuerpo que se utilizó en este trabajo para ambos receptores fue 1:100 en todas las líneas celulares.

**6.2. Expresión de los Receptores de Estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.**

En la tabla 3 se muestra la expresión relativa del RE $\alpha$  y RE $\beta$  para las tres líneas celulares humanas a través de la técnica de inmunohistoquímica. El control negativo era obtenido al sustituir el primer anticuerpo con solución de PBS.

En la tabla 3 y Figura 10 se muestra que las tres líneas celulares probadas en este trabajo expresaron la isoforma  $\alpha$  del RE, siendo más evidente para MCF-7 y SW620 comparado con la expresión de éste en la línea celular C-33.

En la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7, se observó la expresión del RE $\alpha$  (Tabla 3, Figura 10B) pero ausencia del RE $\beta$  (Tabla 3, Figura 11B).

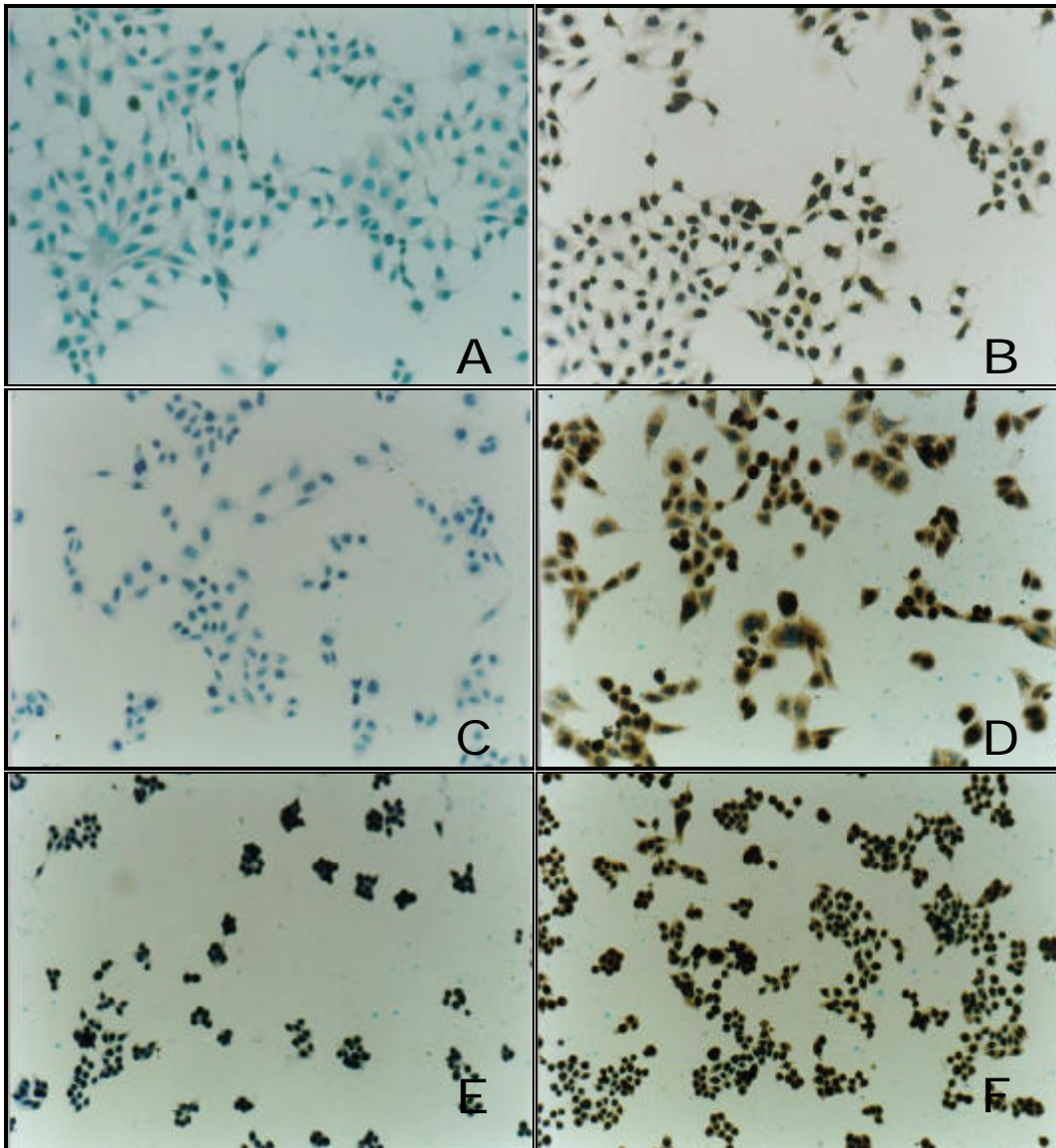
La línea celular de cáncer de cerviz C-33 siguió el mismo comportamiento de la línea celular MCF-7. Esta línea celular expresó la isoforma  $\alpha$  del RE (Tabla 3, Figura 10D) pero ausencia de la isoforma  $\beta$  (Tabla 3, Figura 11D).

En la línea celular de adenocarcinoma colon (SW620) se observó la expresión de ambos receptores (Figura 10F y 11F). Sin embargo, la expresión del RE $\alpha$  se observó mayor con respecto a la expresión del RE $\beta$  (Tabla 3).

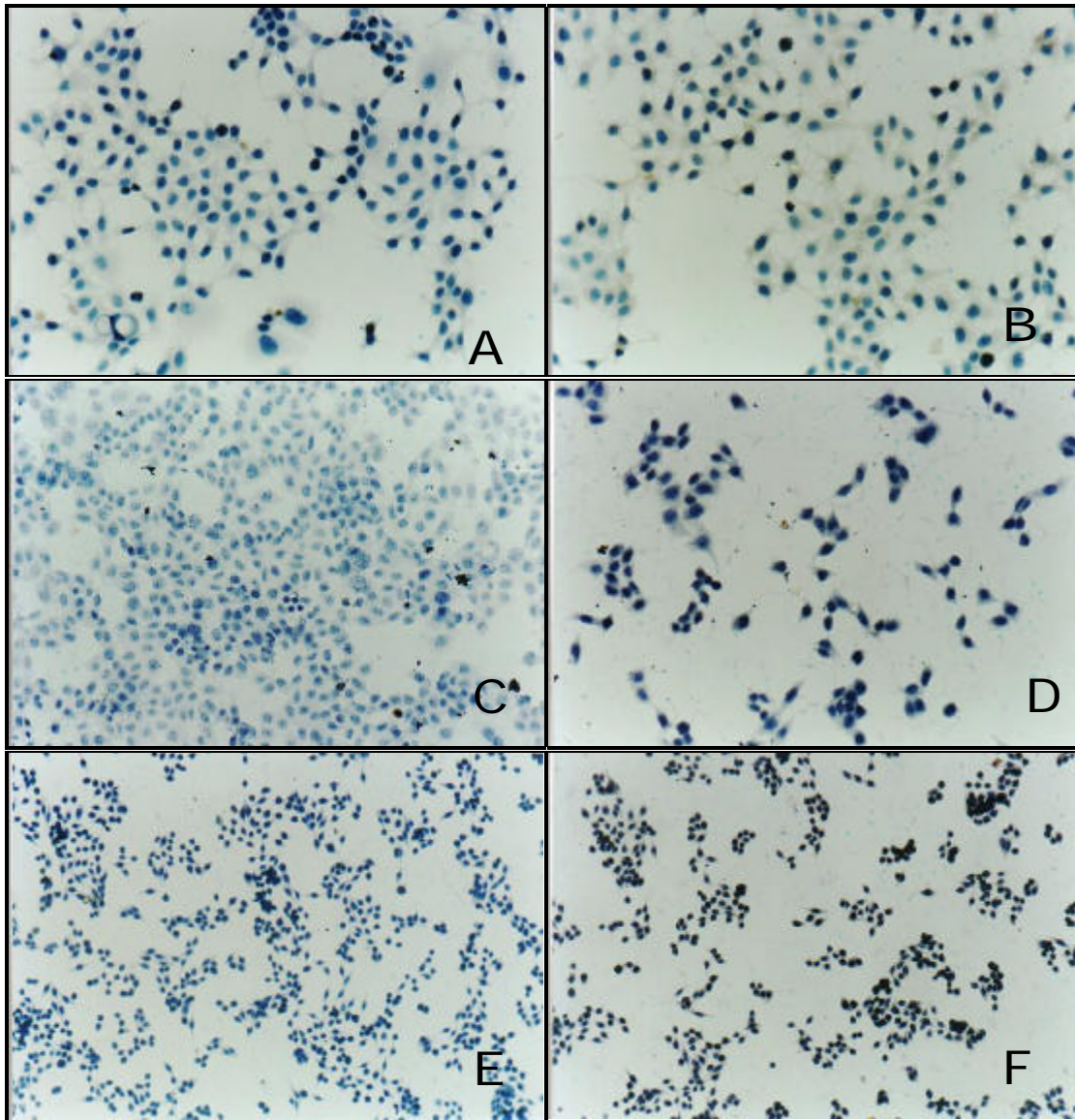
**Tabla 3. Expresión relativa de las de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.**

Línea celular.	RE $\alpha$	RE $\beta$
MCF-7	+++	-
C-33	++	-
SW620	+++	++

El número de (+) indica la expresión relativa del RE. El signo (-) indica que no existió expresión del receptor.



**FIGURA 10.** Expresión del RE $\alpha$  a través de la técnica de inmunohistoquímica en las líneas celulares humanas. A) MCF-7, control negativo; B) MCF-7, anti-RE $\alpha$  (1:750); C) C-33, control negativo; D) C-33, anti-RE $\alpha$  (1:750); E) SW620, control negativo; F) SW620, anti-RE $\alpha$  (1:750). Las fotografías fueron tomadas con el Microscopio de luz Nikon Eclipse C600, aumento de 20X.



**Figura 11. Expresión del RE $\beta$  a través de la técnica de inmunohistoquímica en las líneas celulares humanas.** A) MCF-7, control negativo; B) MCF-7, anti-RE $\beta$  (1:250); C) C.-33, control negativo; D) C-33, anti-RE $\beta$  (1:250); E) SW620, control negativo; F) SW620, anti-RE $\beta$  (1:300). Las fotografías fueron tomadas con el Microscopio de luz Nikon Eclipse C600, aumento de 20X.

**6.3. Determinación de la concentración óptima del primer anticuerpo (anti-E-caderina) para la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.**

La expresión de la proteína de adhesión E-caderina se realizó a través de la técnica de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal anti-E-caderina.

La determinación de la concentración óptima del primer anticuerpo se realizó de la misma forma que para los RE, probando diferentes concentraciones, menores y mayores a las recomendadas por el proveedor. Las diluciones que se probaron se muestran en la tabla 4.

De acuerdo a las características observadas en la tinción la dilución óptima del primer anticuerpo para E-caderina fue 1:100 para todas las líneas celulares. Mientras que la dilución que se utilizó para el segundo anticuerpo fue 1:200.

**Tabla 4 Diluciones ensayadas del primer anticuerpo (anti-E-caderina) para la expresión de la proteína de adhesión E-caderina.**

ANTICUERPO	DILUCIÓN			
E-caderina	1:50	<b>1:100</b>	1:250	1:500

Una vez establecidas las condiciones experimentales, se procedió a realizar la determinación de esta proteína en las líneas celulares humanas tratadas con E<sub>2</sub> y TAM.

**6.4. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.**

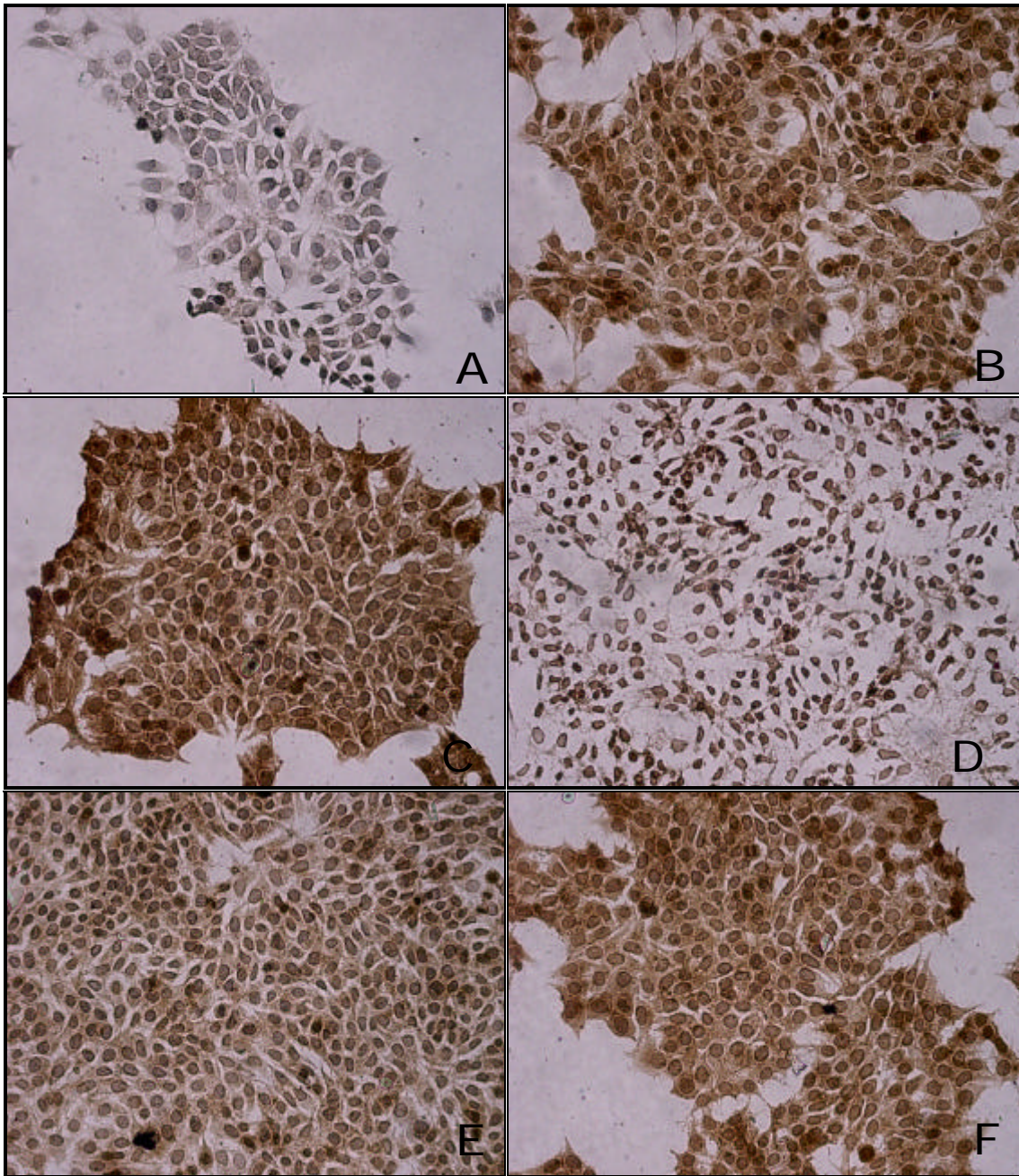
Las líneas celulares humanas fueron sometidas a diferentes tratamientos con E<sub>2</sub> y TAM de acuerdo a los experimentos planteados en función de la concentración y el tiempo. Las líneas celulares humanas fueron tratadas con E<sub>2</sub> (5nM), E<sub>2</sub> (5nM)+TAM (0.5µM), TAM (0.5µM) y como control disolvente, etanol al 0.14% a diferentes intervalos de tiempo (0, 6 12, 24 horas). La expresión de E-caderina se realizó a través de la

técnica de inmunohistoquímica. El control negativo era obtenido al sustituir el primer anticuerpo con solución de PBS.

Los resultados se analizaron con un microscopio Nikon Compuesto y se tomaron fotografías de cinco campos al azar a 20X. Posteriormente se realizó la cuantificación de dicha proteína por densitometría utilizando el Software Zeiss, KS300. Las lecturas reportadas son unidades densitométricas (escala de “grises”) asignadas por el programa. Estas unidades tienen una escala de 0 (negro) a 250 (blanco); valores cercanos a cero indican mayor inmunoreactividad, mientras que valores cercanos a 250 menor inmunoreactividad.

La línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama) se caracteriza por tener una morfología de células grandes en forma de estrella. A las 0 horas (Figura 12B) y 6 horas (Figura 12C) las células MCF-7 presentaron dicha morfología, se observaron grupos confluentes con contacto intracelular normal. La expresión de E-caderina se observó a nivel citoplasmático y en menor proporción en el contacto célula-célula (Figura 12B y 12C). El tratamiento con E<sub>2</sub> produjo daños importantes en la morfología de la célula; se observaron células prominentemente dañadas (Figura 12D); y la expresión de E-caderina estaba completamente interrumpida (Figura 12D). Este efecto se observó revertido por el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM (Figura 12E) y TAM (Figura 12F); observándose un aumento en la proliferación; grupos confluentes de células grandes en forma de estrella y la expresión de E-caderina a nivel citoplasmático y en el contacto célula-célula. Sin embargo, se observó una menor inmunoreactividad en el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM (Figura 12E).





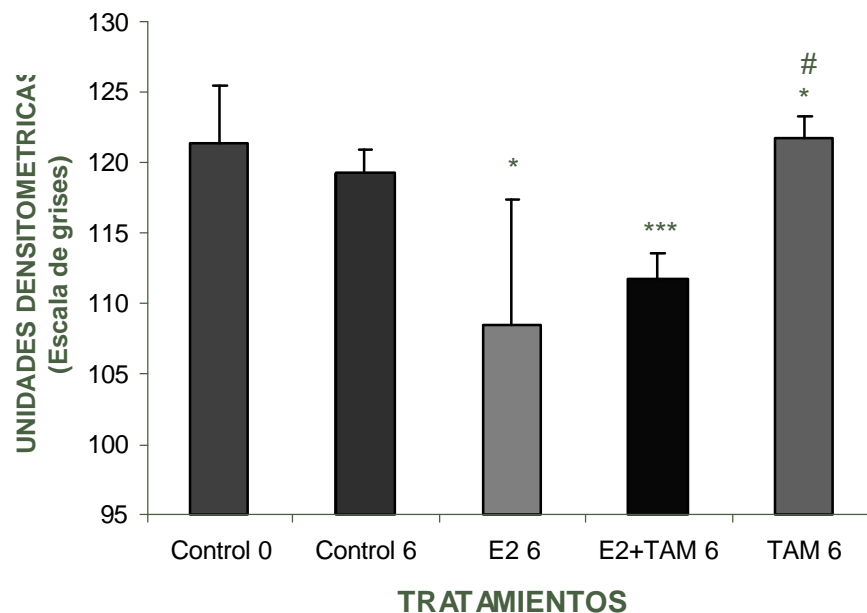
**FIGURA 12.** Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular humana MCF-7 a 6Hrs. A) Control negativo; B) Control 0Hrs; C) Control 6Hrs; D) E<sub>2</sub>; E) E<sub>2</sub>+TAM; F) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100) y las fotografías se tomaron en el Microscopio Nikon Compuesto a 20X.

El análisis cuantitativo de la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 tratada con E<sub>2</sub> y TAM a 6 horas se muestra en la tabla 5 y gráfica 1. Con respecto al control 6 horas, el tratamiento con E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>+TAM disminuyó la expresión de E-caderina (p=0.0294; p=0.0001, respectivamente); mientras que el tratamiento con TAM aumentó la expresión de dicha proteína (p=0.0444) en esta línea celular. El tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub> tendió a aumentar la expresión de E-caderina, pero no fue estadísticamente significativo (p=0.4390), mientras que, el tratamiento con TAM aumentó la expresión de E-caderina (p=0.0117).

**Tabla 5. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 6 horas\*.**

TRATAMIENTOS (6Hrs)				
Control 0	Control 6	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
120.011962	118.399843	112.434287	114.750353	121.966198
128.678596	120.011962	93.006596	112.002886	122.905128
118.360721	119.786857	112.19711	111.124227	122.16861
119.375775	116.862658	115.898704	110.810993	122.631151
120.108153	121.115585	108.505527	110.068116	118.851904
X=121.3	X=119.2	X=108.4	X=111.8	X=121.7
ó=4.179	ó=1.641	ó=8.998	ó=1.814	ó=1.637

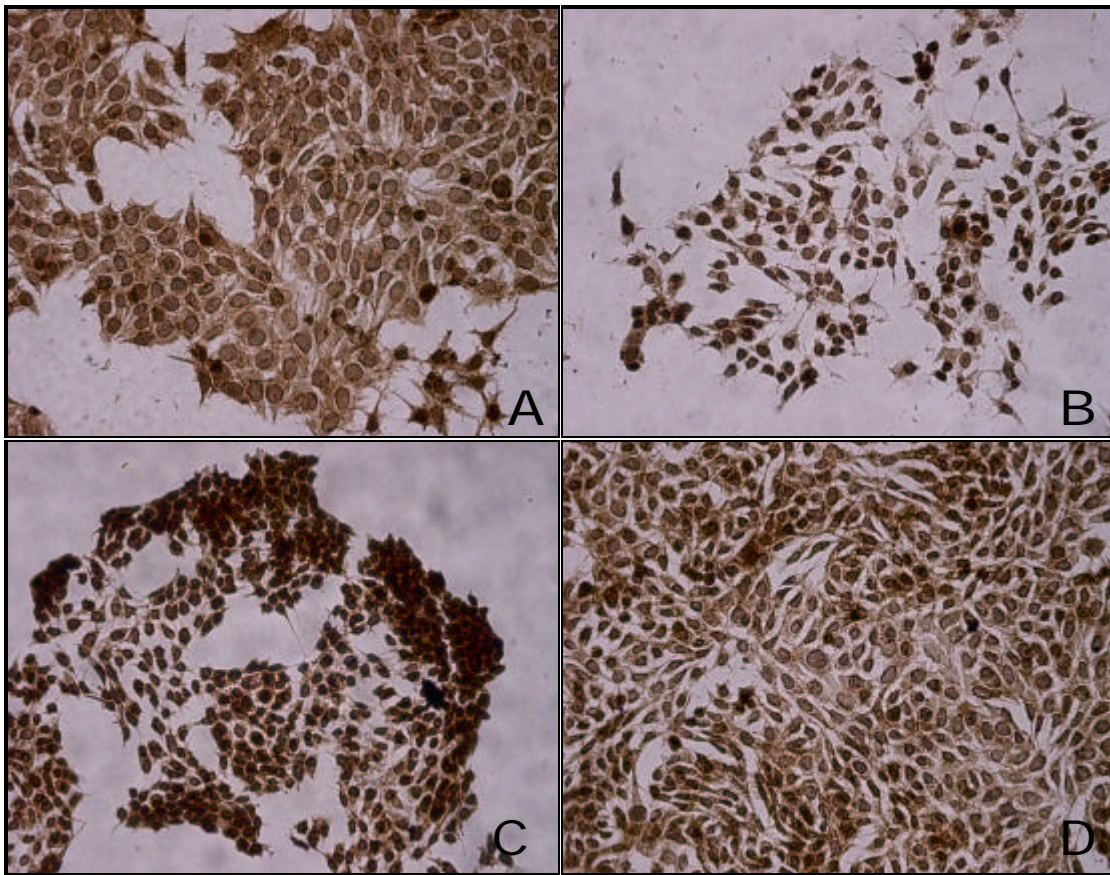
\*El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas están reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Gráfica 1. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 6 horas.** El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas están reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \*=diferencia significativa con respecto al control 6 horas. #=diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

En la figura 13 se muestra la expresión de E-caderina en la línea celular humana MCF-7 a 12 horas de tratamiento. Las células control mostraron un aumento en la proliferación celular y morfología normal; esto es, células grandes, en forma de estrella y la distribución de E-caderina se observó incrementada en el contacto célula-célula y en el citoplasma (Figura 13A). El tratamiento de la línea celular MCF-7 con E<sub>2</sub> a las 12 horas mostró un patrón similar al observado a las 6 horas de tratamiento, existió disminución en la proliferación celular y las células se observaron más pequeñas y alargadas. La expresión de E-caderina se observó disminuida tanto en citoplasma como en el contacto célula-célula; las células se observaron aisladas, con espacios intracelulares ensanchados entre ellas (Figura 13B). En las células MCF-7 tratadas con E<sub>2</sub>+TAM (Figura 13C) y TAM (Figura 13D), se observó revertido el efecto del E<sub>2</sub>, sin embargo, se observó daño en la célula, siendo más evidente para las células tratadas con E<sub>2</sub>+TAM. En el caso de las células MCF-7 tratadas con E<sub>2</sub>+TAM (Figura 13C) existió disminución en la proliferación celular, las células se observaron más pequeñas

y alargadas; mientras que la expresión de E-caderina aumento en el contacto célula-célula y citoplasma. Dicho efecto fue contrario en las células MCF-7 tratadas con TAM (Figura 13D), en este caso, hubo un aumento en la proliferación celular, pero las células perdieron su morfología característica, observándose células pequeñas y alargadas con disminución en la adhesión celular.



**FIGURA 13.** Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular MCF-7 a 12Hrs. A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub>+TAM; D) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

El análisis cuantitativo de la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a las 12 horas de tratamiento se muestra en la tabla 6 y gráfica 2.

El tratamiento de la línea celular MCF-7 con E<sub>2</sub> siguió el mismo patrón observado a 6 horas; dicho tratamiento disminuyó la expresión de E-caderina con respecto al

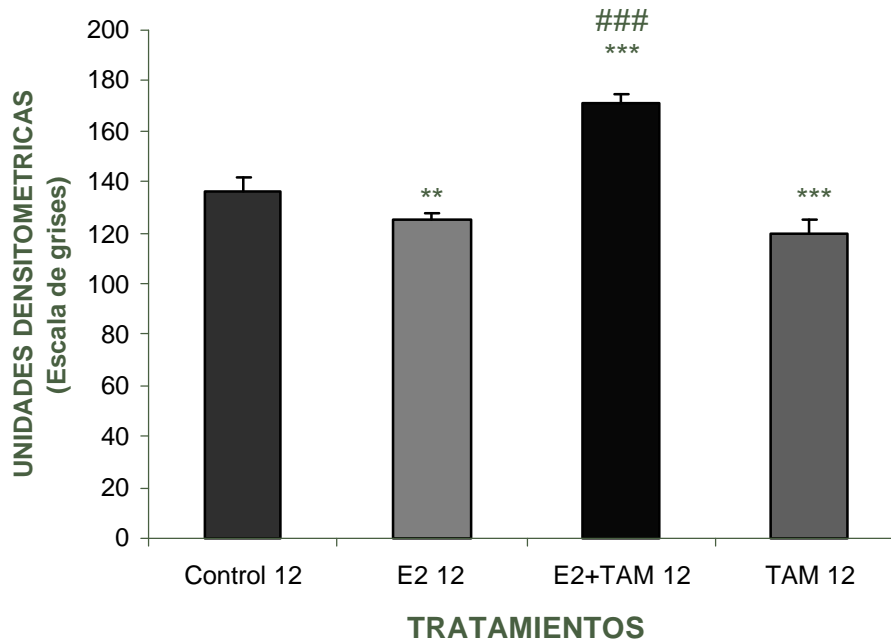
control 12 horas ( $p=0.0021$ ). Mientras que el tratamiento con  $E_2$ +TAM aumentó la expresión de esta proteína ( $p<0.0001$ ) y TAM disminuyó la expresión ( $p=0.0010$ ) con respecto al control 12 horas

A las 12 horas, con respecto al  $E_2$ , el tratamiento con  $E_2$ +TAM aumentó la expresión de E-caderina ( $p<0.0001$ ). En el caso de TAM existió una tendencia a disminuir la expresión de E-caderina, aun mayor que la que se obtuvo para el  $E_2$ ; sin embargo, no fue estadísticamente significativa ( $p=0.0759$ ).

**Tabla 6. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 12 horas\*.**

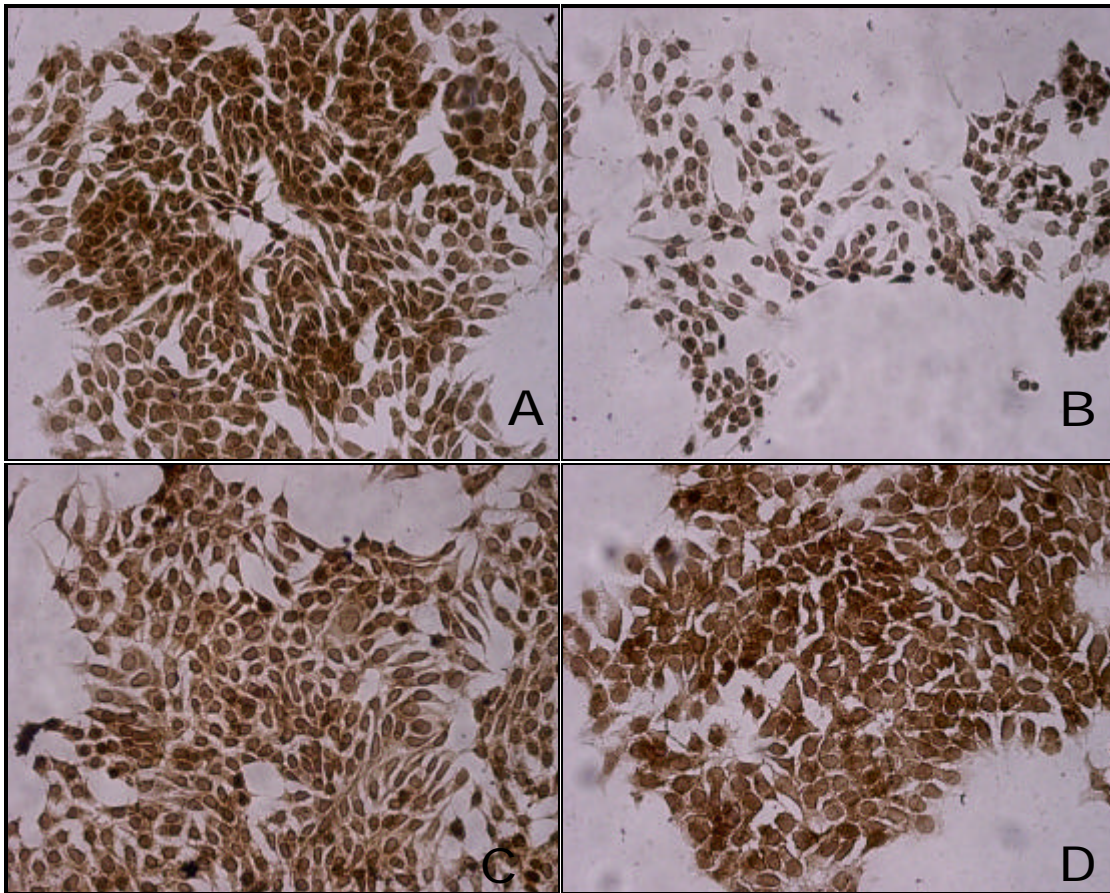
TRATAMIENTOS (12Hrs)			
Control	$E_2$	$E_2$ +TAM	TAM
132.428164	125.951694	172.172567	115.518986
132.622502	126.402864	174.300639	113.871539
139.791579	126.052923	167.110108	123.673518
144.066465	126.331818	164.909949	126.847845
134.040165	120.212673	174.540283	116.589825
X=136.6	X=125.0	X=170.6	X=119.3
ó=5.141	ó=2.677	ó=4.366	ó=5.639

\*El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas están reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 2. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 12 horas.** El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \*=diferencia significativa con respecto al control 12 horas. #=diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

La inmunohistoquímica realizada a 24 horas a las células control MCF-7 reveló, disminución en la proliferación celular y daño celular. Las células se observaron más pequeñas y alargadas; con alteración en la adhesión celular (Figura 14A). El tratamiento con E<sub>2</sub> (Figura 14B) concordó con lo que se observó en los tiempos anteriores. Las células MCF-7 se observaron pequeñas, alargadas y la expresión de E-caderina estaba disminuida en el contacto célula-célula y en el citoplasma; observándose células aisladas y espacios intracelulares ensanchados entre ellas. El efecto del tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM (Figura 14C) y TAM (Figura 14D) revirtió el efecto del E<sub>2</sub>. La morfología de las células es normal y se regeneró la expresión de E-caderina en el contacto célula-célula y en el citoplasma.



**Figura 14. Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular MCF-7 a 24Hrs. A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub> + TAM; D) TAM** Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

Los resultados de la cuantificación de E-caderina a 24 horas en la línea celular MCF-7 se muestran en la tabla 7 y gráfica 3.

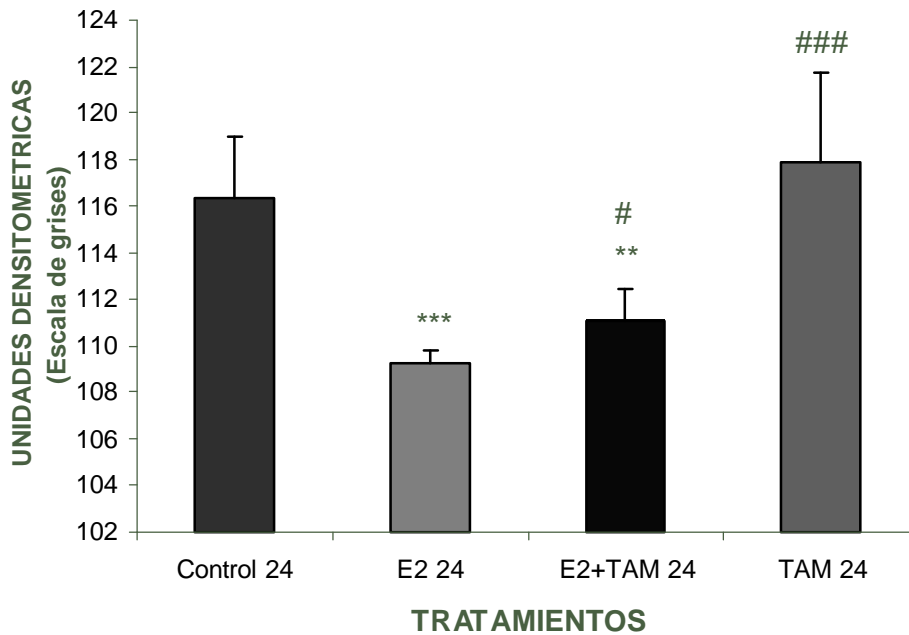
El análisis estadístico realizado a 24 horas mostró que con respecto al control 24 horas, el E<sub>2</sub> disminuyó la expresión de E-caderina ( $p=0.0003$ ) al igual que el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM ( $p=0.0037$ ), mientras que, TAM tendió a aumentar la expresión de dicha proteína, pero no fue estadísticamente significativo ( $p=0.4781$ ).

Por otro lado, los tratamientos con E<sub>2</sub>+TAM y TAM aumentaron la expresión de E-caderina ( $p=0.0203$  y  $p=0.0010$ , respectivamente) con respecto al E<sub>2</sub> siendo más evidente en las células que fueron tratadas con TAM.

**Tabla 7. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 24 horas\*.**

TRATAMIENTOS (24Hrs)			
Control	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
116.928889	109.796083	111.354025	111.490712
115.561218	109.832759	110.125123	120.903633
115.65022	109.092346	109.614775	120.349859
120.440139	108.69796	111.359334	117.778816
113.34219	108.846697	113.039687	119.054833
X=116.4	X=109.2	X=111.1	X=117.9
ó=2.609	ó=0.5315	ó=1.328	ó=3.790

\*El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.

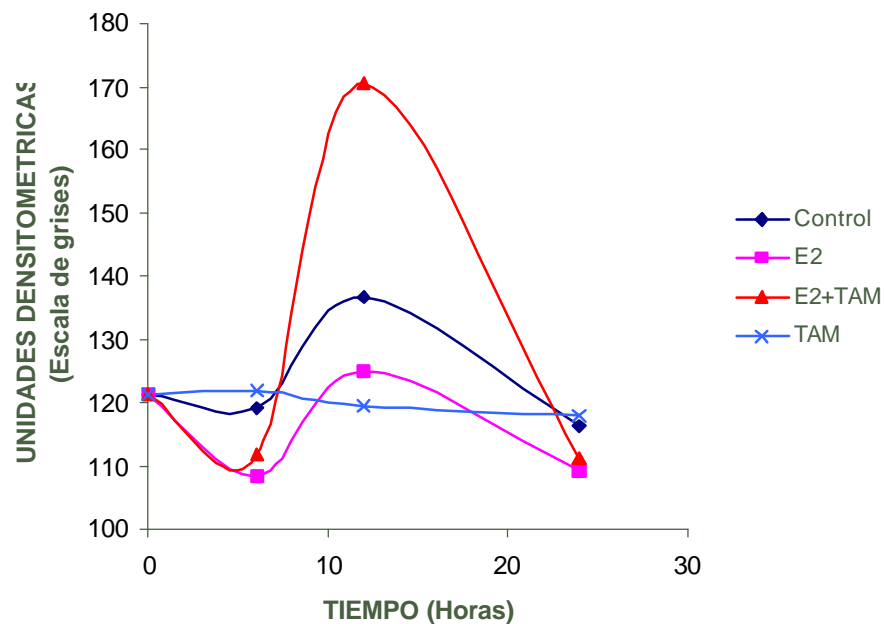


**Grafica 3. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 a 24 horas.** El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio ± DE. \* = diferencia significativa con respecto al control 24 horas. # = diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.



Con el fin de determinar el efecto de los diferentes tratamientos en la expresión de E-caderina con respecto al tiempo en la línea celular MCF-7, se graficaron los valores obtenidos en la cuantificación en función del tiempo. Los resultados se muestran en la gráfica 4.

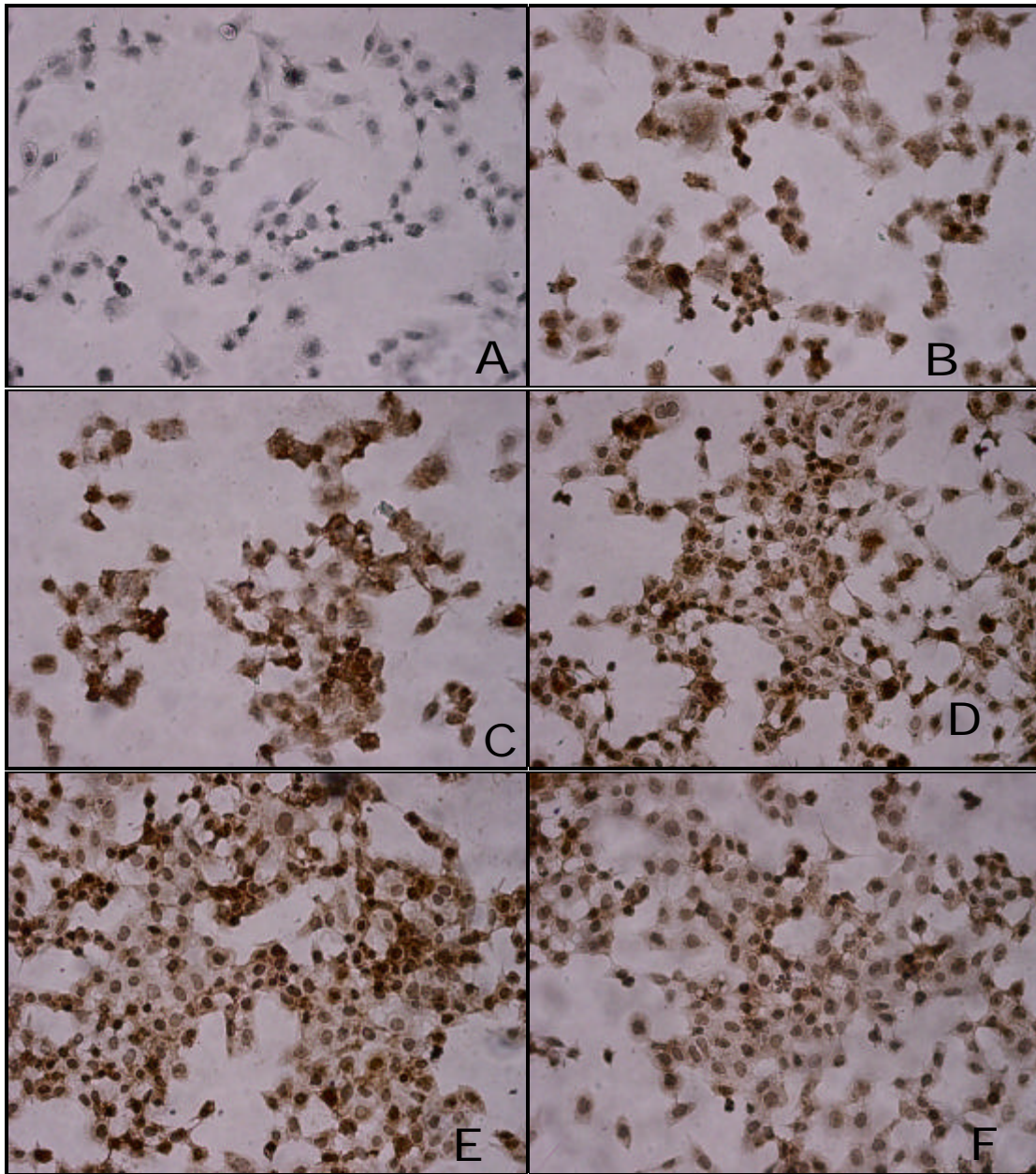
En la gráfica 4 se muestra que en las células control MCF-7 la mayor expresión de E-caderina se observó a las 12 horas. El tratamiento con E<sub>2</sub> disminuyó la expresión de E-caderina; observándose la mayor reducción en la expresión a las 6 horas de tratamiento, mientras que, el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM tuvo un efecto peculiar, dicho tratamiento aumentó la expresión de E-caderina a las 12 horas de tratamiento, mientras que a 6 y 24 horas disminuyó la expresión de esta proteína. Por otro lado, el tratamiento con TAM no tuvo efecto significativo en la expresión de E-caderina.



**Gráfica 4. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular MCF-7 en función del tiempo.** El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.

La línea celular de cáncer de cerviz, C-33, se caracteriza por formar grupos confluentes de células grandes en forma de hexágono. En la figura 15 se muestra la expresión de E-caderina en esta línea celular a las 6 horas de tratamiento. Las células control a las 0 y 6 horas se observaron como células aisladas con daño celular y morfología difusa, es decir, núcleo y citoplasma no definido, siendo más evidente a 6 horas (Figura 15B y 15C, respectivamente). Las células C-33 a 0 y 6 horas mostraron débil inmunoreactividad en citoplasma y en el contacto célula-célula para E-caderina, (Figura 15B y 15C, respectivamente).

El tratamiento con E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>+TAM y TAM en la línea celular C-33 a 6 horas indujeron un aumento en la proliferación celular, observándose, grupos confluentes de células en forma de hexágono con núcleo y citoplasma bien definido (Figura 15D, 15E y 15F, respectivamente). Con respecto a E-caderina existió un aumento indudable en la expresión de dicha proteína en el contacto célula-célula, siendo más evidente para el tratamiento con E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>+TAM (Figura 15D y 15E, respectivamente). Además se observó que la inmunoreactividad fue mayor en el contacto célula-célula cuando las células crecían en grupo; mientras que en células aisladas la inmunoreactividad se observó en citoplasma predominantemente.



**FIGURA 15. Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular C-33 a 6Hrs.** A) Control negativo; B) Control 0Hrs; C) Control 6Hrs; D) E<sub>2</sub>; E) E<sub>2</sub>+TAM; F) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

Los resultados generados de la cuantificación de la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 6 horas se muestran en la tabla 8 y gráfica 5.

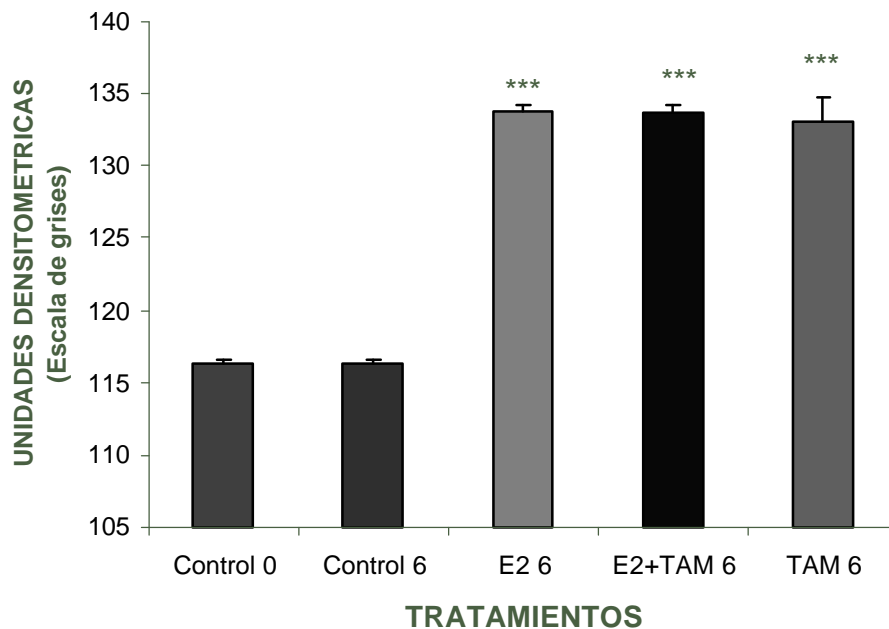
Con respecto al control 6 horas el análisis estadístico confirma lo observado en la IHQ. El tratamiento de las células C-33 con E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>+TAM y TAM aumentaron la

expresión de E-caderina ( $p < 0.0001$ , en todos los tratamientos). Además, no existió diferencia significativa en la expresión de E-caderina entre estos tratamientos.

**Tabla 8. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 6 horas\*.**

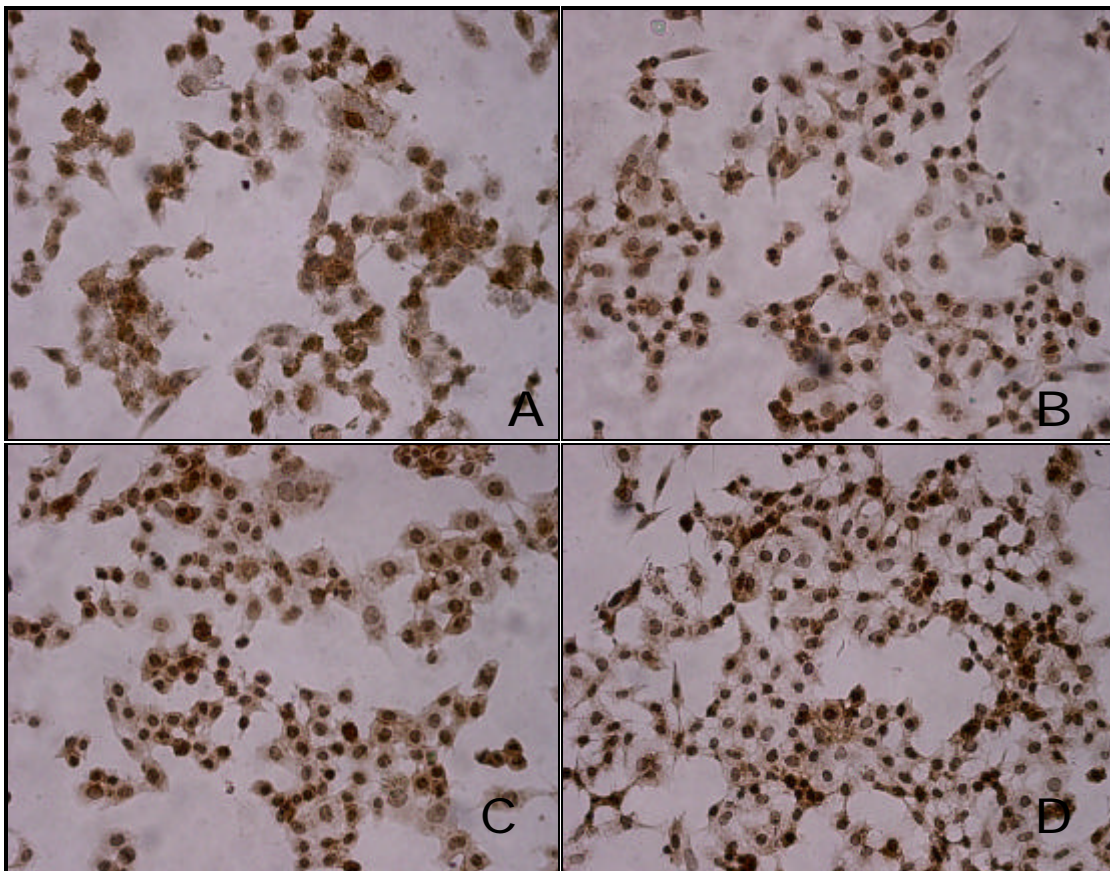
TRATAMIENTOS (6Hrs)				
Control 0	Control 6	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
116.3036	116.2419	134.120355	134.240479	132.53179
116.1344	116.3374	133.2892	132.973579	134.307748
116.0502	116.4597	133.3329	134.027497	134.926981
116.2407	116.667	134.17679	134.075918	130.834375
116.8382	116.3369	134.033029	133.352691	133.113795
X=116.3	X=116.4	X=133.8	X=133.7	X=133.1
ó=0.3091	ó=0.1638	ó=0.4409	ó=0.5439	ó=1.600

\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 5. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 6 horas.** El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \* = diferencia significativa con respecto al control 6 horas. # = diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

La inmunohistoquímica realizada a las células C-33 a 12 horas mostró que el resultado para las células control concuerda con lo observado a las 6 horas de tratamiento. Las células se observaron aisladas con pérdida de la morfología normal; núcleo y citoplasma no definido, sin embargo, existió un aumento en la expresión de E-caderina en el contacto célula-célula y citoplasma (Figura 16A). Los tratamientos con E<sub>2</sub> (Figura 16B), E<sub>2</sub>+TAM (Figura 16C) y TAM (Figura 16D) promovieron una recuperación evidente en las células C-33. Se observó aumento en la proliferación celular, recuperación de la morfología de la célula y una red de adhesión celular mejor estructurada. Con respecto a la expresión de E-caderina se observó el mismo patrón de inmunoreactividad; menor expresión en citoplasma con respecto al observado en el contacto célula-célula.



**FIGURA 16. Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular C-33 a 12 Hrs. A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub>+TAM; D) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.**

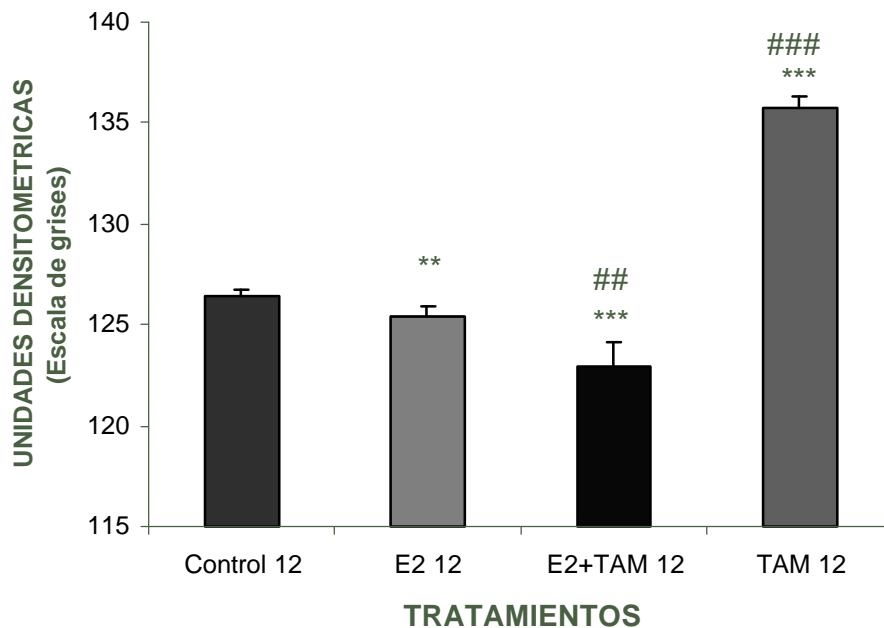
El análisis cuantitativo de la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en la línea celular C-33 a 12 horas se muestra en la tabla 9 y gráfica 6.

Con respecto al control 12 horas el tratamiento de las células C-33 con E<sub>2</sub> disminuyó la expresión de E-caderina (p=0.0046). Este efecto además se observó más pronunciado para las células C-33 tratadas con E<sub>2</sub>+TAM (p=0.0003). El tratamiento de esta línea celular con TAM incrementó la expresión de E-caderina (p<0.0001). Con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>+TAM disminuyó la expresión de E-caderina (p=0.0033), mientras que, TAM incrementó la expresión de dicha proteína (p<0.0001).

**Tabla 9. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 12 horas\*.**

TRATAMIENTOS (12Hrs)			
Control	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
126.561972	125.279943	124.080475	135.385371
126.114409	125.048563	124.313125	135.630844
126.321878	126.214557	122.376593	134.94976
126.327869	125.632987	122.661339	136.659551
126.830567	124.997061	121.292166	135.85778
X=126.4	X=125.4	X=122.9	X=135.7
ó=0.2737	ó=0.5030	ó=1.255	ó=0.6349

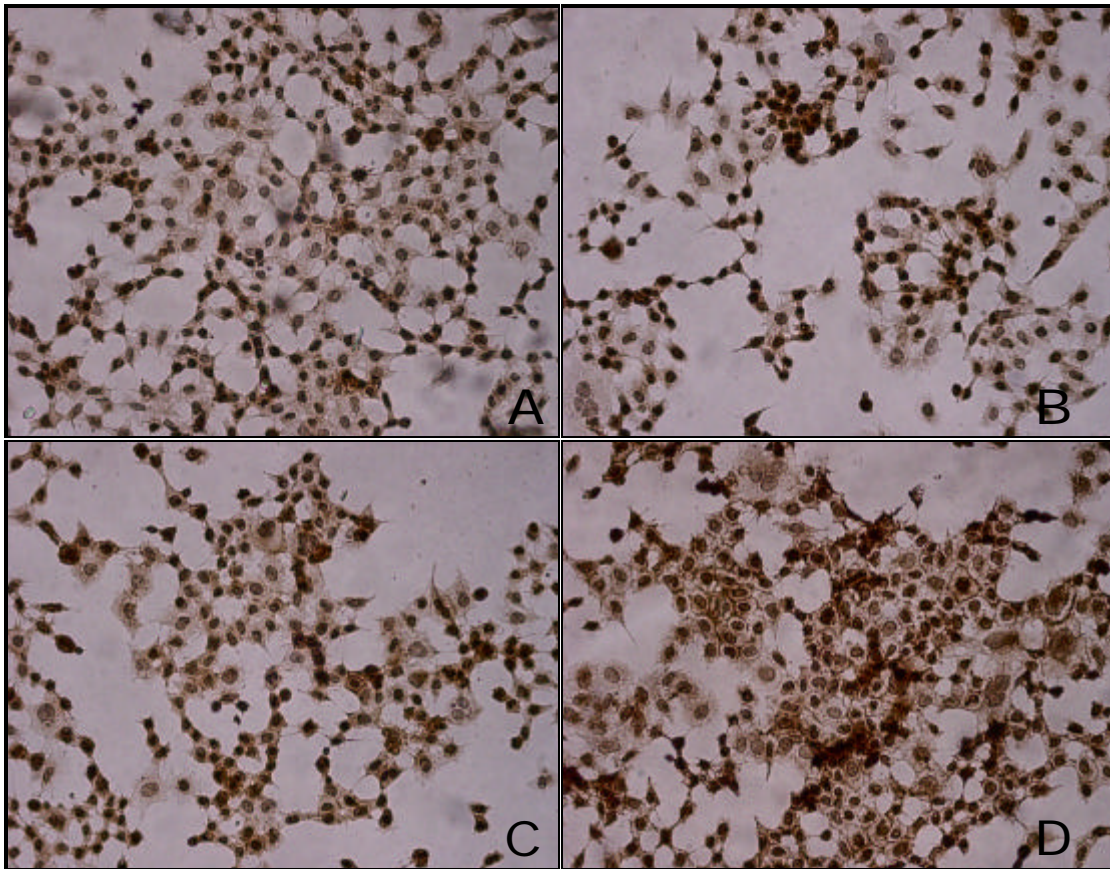
\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 6. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 12 horas.** El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \*=diferencia significativa con respecto al control 12 horas. #=diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

La inmunohistoquímica realizada a 24 horas en la línea celular C-33 mostró que a este tiempo existió una adaptación de las células al medio carente de hormonas. A 24 horas las células control mostraron un aumento en la proliferación celular, morfología normal y una red de adhesión celular mejor estructurada (Figura 17A). La expresión de E-caderina se observó en mayor proporción en el contacto célula-célula con respecto a la expresión en citoplasma (Figura 17A).

Los tratamientos con E<sub>2</sub> (Figura 17B), E<sub>2</sub>+TAM (Figura 17C) y TAM (Figura 17D) en la línea celular C-33 incrementaron la proliferación celular y la adhesión celular no se observó alterada. La expresión de E-caderina se observó incrementada en el contacto célula-célula con respecto a lo observado en citoplasma; este efecto además se observó intensificado en las células tratadas con TAM (Figura 17D)



**FIGURA 17. Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular C-33 a 24Hrs.** A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub>+TAM D) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

El análisis cuantitativo de la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 24 horas se muestra en la tabla 10 y gráfica 7.

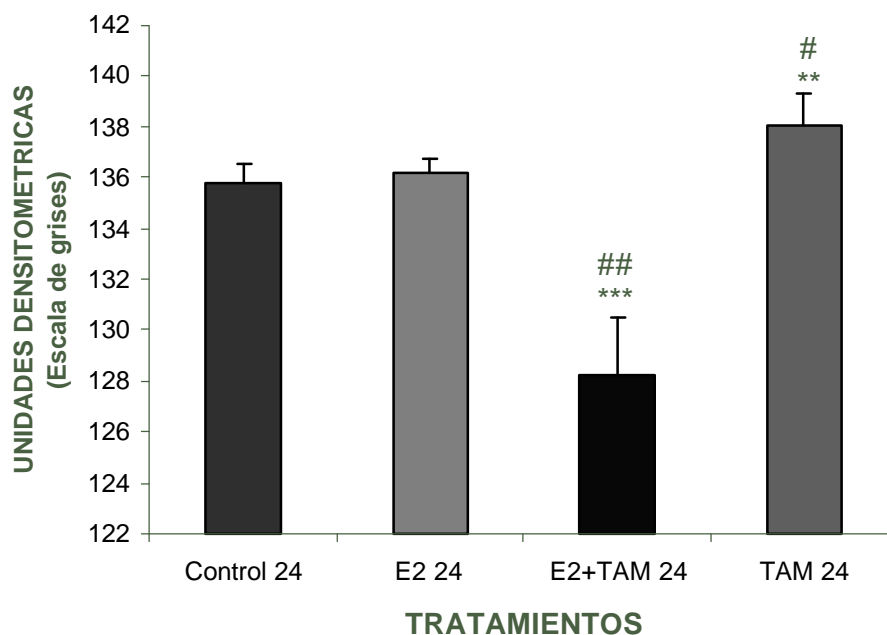
Con respecto al control 24 horas el tratamiento de las células C-33 con E<sub>2</sub> tendió a aumentar la expresión de E-caderina, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p= 0.3586$ ). El tratamiento de esta línea celular con E<sub>2</sub>+TAM disminuyó la expresión de E-caderina ( $p=0.0001$ ); por otra parte, el tratamiento con TAM incrementó la expresión de dicha proteína ( $p=0.0094$ ). Con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub>; E<sub>2</sub>+TAM disminuyó la expresión de E-caderina ( $p<0.0001$ ); mientras que, el tratamiento con TAM aumentó la expresión de esta proteína ( $p=0.0167$ ).



**Tabla 10. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 24 horas\*.**

TRATAMIENTOS (24Hrs)			
Control	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
136.72201	136.027226	129.41704	139.617246
135.578101	135.553548	127.040194	138.147389
136.113728	136.725455	128.154302	138.793653
134.711938	136.108543	131.346764	136.370083
136.075676	136.762414	125.323289	137.373971
X=135.8	X=136.2	X=128.2	X=138.1
ó=0.7499	ó=0.5104	ó=2.291	ó=1.255

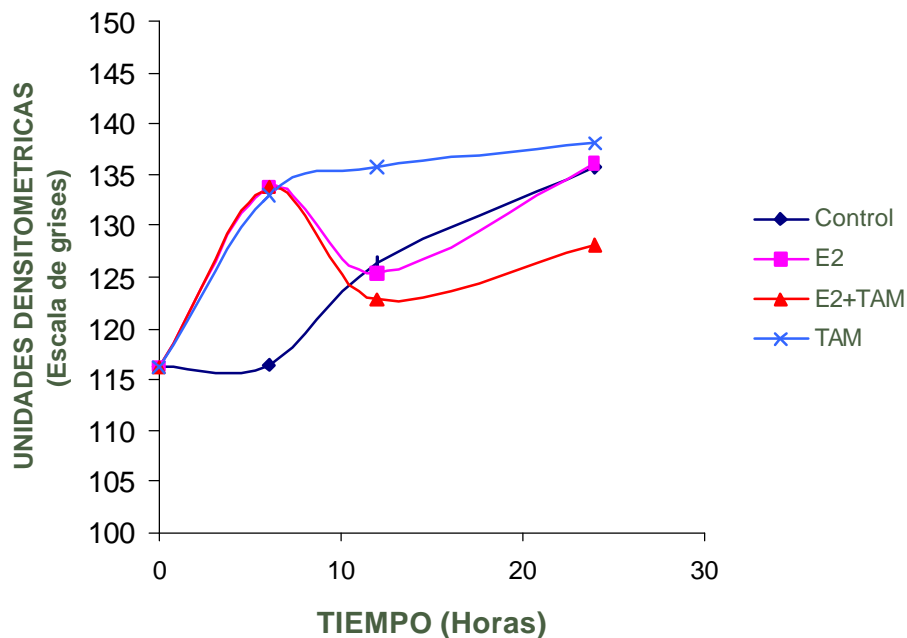
\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 7. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 a 24 horas.** El análisis densitométrico se realizó en el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio ± DE. \*=diferencia significativa con respecto al control 24 horas. # =diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

La gráfica 8 muestra el efecto de los diferentes tratamientos en la expresión de E-caderina en la línea celular C-33 en función del tiempo.

La gráfica 8 muestra incremento en la expresión de E-caderina dependiente del tiempo, en las células control. El tratamiento con E<sub>2</sub> aumentó la expresión de E-caderina a 6 y 24 horas; mientras que a 12 horas disminuyó la expresión de dicha proteína. El tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM produjo un aumento en la expresión de E-caderina a 6 horas mientras que a 12 y 24 horas disminuyó la expresión de esta proteína. En las células tratadas con TAM, existió un incremento en la expresión de E-caderina en función del tiempo.



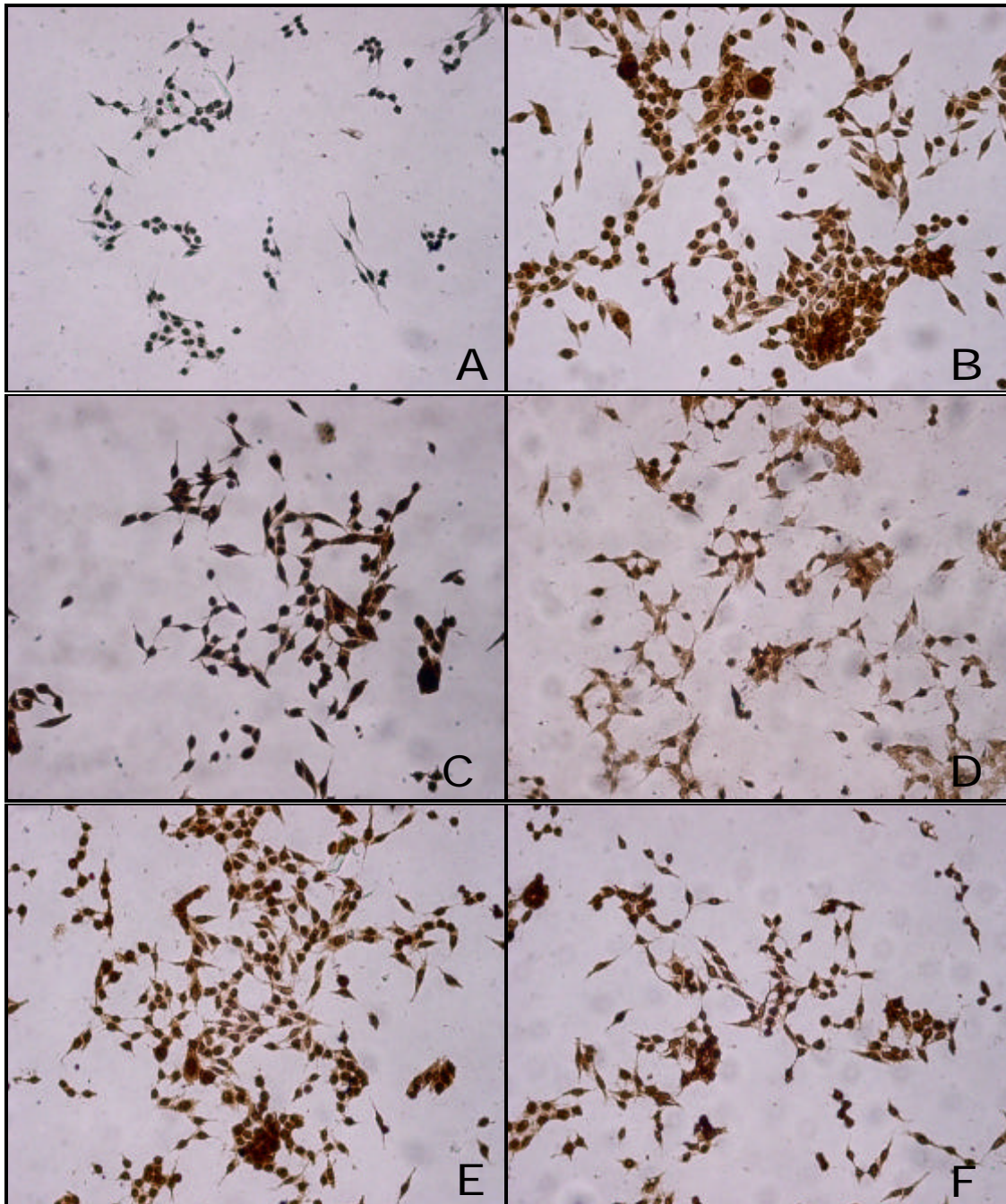
**Grafica 8. Expresión de la proteína de adhesión E-caderina en la línea celular C-33 en función del tiempo.** . El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.

El efecto del E<sub>2</sub> y TAM también se determinó en la línea celular SW620 (adenocarcinoma colon).

Las células SW620 son células pequeñas, esféricas que suelen crecer semejando racimos de uvas. A 0 y 6 horas las células SW620 se observaron pequeñas y alargadas (Figura 18B y 18C, respectivamente). A las 6 horas existió disminución en la proliferación celular, sin embargo, se observó mayor expresión de E-caderina a las 6 horas de tratamiento (Figura 18C). La inmunoreactividad para esta proteína se observó en mayor proporción en el contacto célula-célula cuando las células crecen en grupo, mientras que se observó una tinción predominante en citoplasma cuando las células se encontraban aisladas. Los tratamientos con E<sub>2</sub> (Figura 18D), E<sub>2</sub>+TAM (Figura 18E) y TAM (Figura 18F) provocaron un efecto negativo en esta línea celular. Las células SW620 se observaron pequeñas y alargadas con pérdida de la adhesión celular.

El análisis cuantitativo de la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 6 horas se muestra en la tabla 11 y gráfica 9.

El análisis estadístico realizado a los datos generados de la cuantificación de E-caderina en las células SW620 confirmó los resultados observados en la IHQ. Los tratamientos con E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>+TAM y TAM disminuyeron la expresión de E-caderina con respecto al control 6 horas ( $p=0.0001$ ,  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ; respectivamente). Con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>+TAM y TAM disminuyeron la expresión de E-caderina ( $p<0.0001$ ).

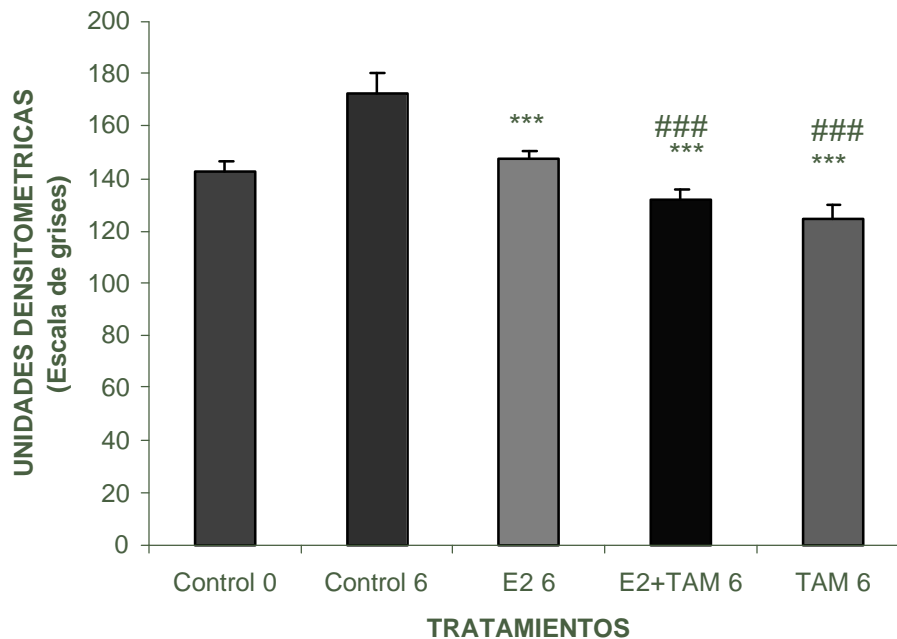


**FIGURA 18.** Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular SW620 a 6 Hrs. A) Control negativo; B) Control 0Hrs; C) Control 6Hrs; D) E<sub>2</sub>; E) E<sub>2</sub>+TAM; F) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

**Tabla 11. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 6 horas\*.**

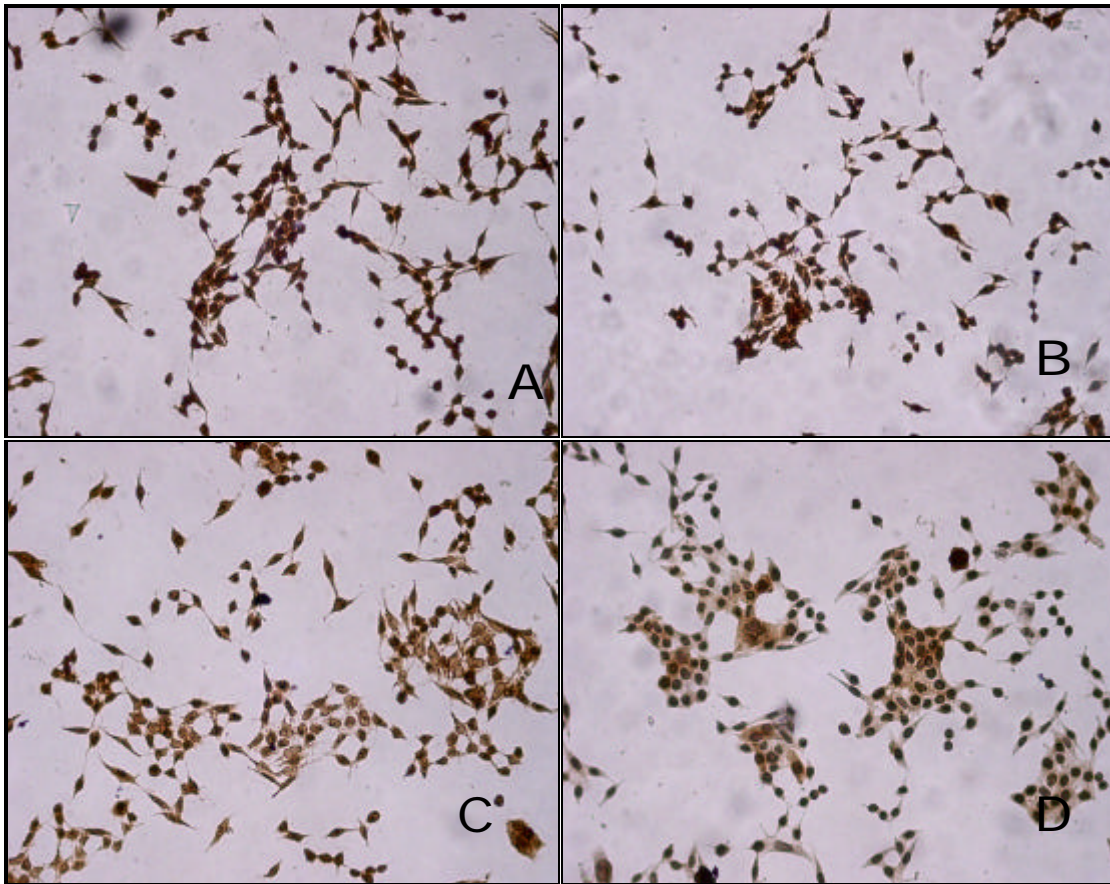
TRATAMIENTOS (6Hrs)				
Control 0	Control 6	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
148.974631	163.205172	151.116366	129.562364	131.080555
143.363538	174.853786	144.226838	138.036374	125.090897
140.073525	166.947333	144.7329	130.162199	126.86793
139.143206	172.656055	146.218484	130.912676	119.254923
142.592823	183.078095	149.776318	132.921471	118.5791
X=142.8	X=172.1	X=147.2	X=132.3	X=124.2
ó=3.8500	ó=7.650	ó=3.077	ó=3.438	ó=5.275

\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 9. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 6 horas.** El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio ± DE. \*=diferencia significativa con respecto al control 6 horas. #=diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

En la figura 19 se muestra el efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina a 12 horas en la línea celular SW620. A 12 horas existió disminución en la proliferación celular de las células control, las células se observaron pequeñas y alargadas con disminución en la adhesión celular. La expresión de E-caderina disminuyó en el contacto célula-célula y en citoplasma (Figura 19A). Las células SW620 tratadas con E<sub>2</sub> se observaron alargadas y pequeñas, disminuyó la proliferación celular y existió disminución en la expresión de E-caderina nivel citoplasmático y en el contacto célula-célula, observándose espacios intracelulares ensanchados entre ellas (Figura 19B). El tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM de esta línea celular coincidió con lo observado a 6 horas, este tratamiento provocó daño a las células SW620 y pérdida de la adhesión célula-célula. La expresión de E-caderina disminuyó en citoplasma y en el contacto célula-célula (Figura 19C). El tratamiento con TAM a 12 horas produjo un efecto contrario al que se observó a las 6 horas de tratamiento; las células presentaron una mejor condición; recuperaron su morfología, se observaron esféricas y hubo aumento en la proliferación celular. Además, se observó una red de adhesión celular mejor estructurada, sin embargo, el patrón de expresión de E-caderina fue débil en citoplasma y en el contacto célula-célula, (Figura 19D).



**FIGURA 19. Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular SW620 a 12Hrs. A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub>+TAM D) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.**

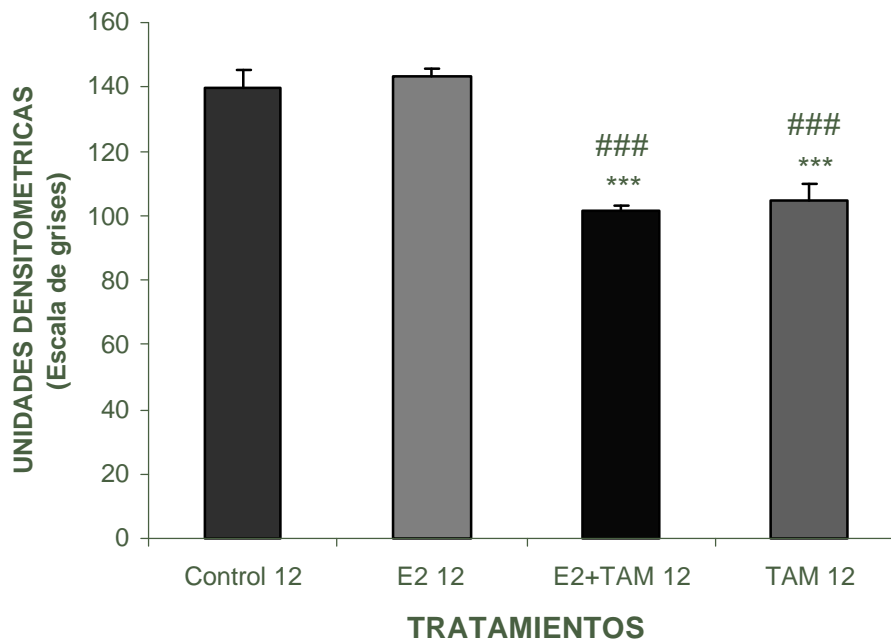
Los datos generados de la cuantificación de E-caderina en la línea celular SW620 a 12 horas se muestran recopilados en la tabla 12 y gráfica 10.

El análisis estadístico realizado a los datos generados en la cuantificación mostró que con respecto al control 12 horas el tratamiento con E<sub>2</sub> tendió a incrementar la expresión de E-caderina, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p=0.1889$ ). Por otra parte, el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM y TAM disminuyeron la expresión de E-caderina ( $p<0.0001$ , en ambos tratamientos). Con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub>; E<sub>2</sub>+TAM y TAM disminuyeron la expresión de E-caderina ( $p<0.0001$ , en ambos tratamientos).

**Tabla 12. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 12 horas\*.**

TRATAMIENTOS (12Hrs)			
Control	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
143.055506	143.856111	103.975722	111.762353
136.112676	142.689699	101.051332	105.109612
134.960737	141.273437	101.011323	101.688912
135.075797	147.470019	101.089711	99.071538
147.202465	140.876823	102.126211	105.892386
X=139.3	X=143.2	X=101.8	X=104.7
ó=5.554	ó=2.647	ó=1.276	ó=4.801

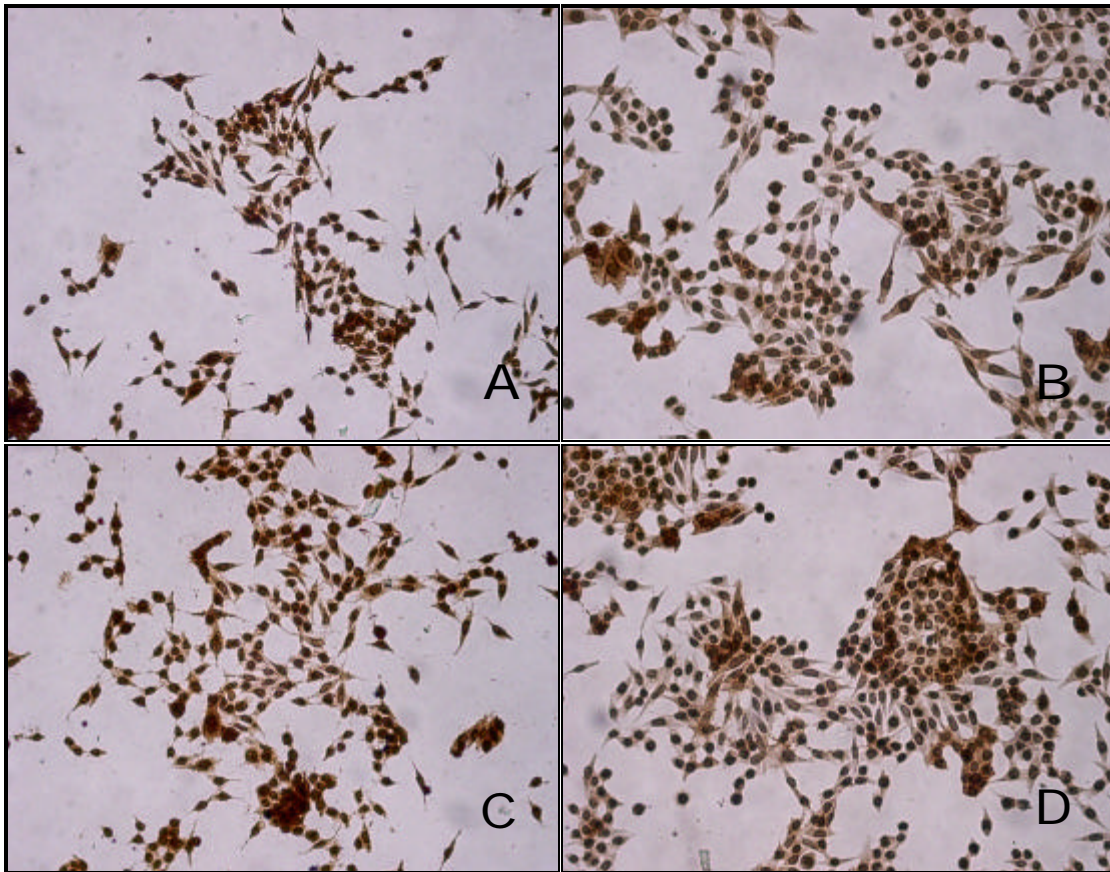
\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 10. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 12 horas.** . El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \* =diferencia significativa con respecto al control 12 horas. # =diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.



A las 24 horas de tratamiento, se observaron efectos muy interesantes en la línea celular SW620. Se observó que en las células control existió disminución en la proliferación celular, pérdida de la morfología, daño a la célula y disminución en la adhesión celular. La expresión de E-caderina disminuyó considerablemente en el contacto célula-célula, observándose células aisladas y espacios intracelulares ensanchados entre ellas (Figura 20A). El tratamiento de la línea celular SW620 con E<sub>2</sub> a 24 horas mostró un efecto protector en esta línea celular, es decir, este tratamiento produjo un aumento en la proliferación celular, recuperación de la morfología; sin embargo, el patrón de expresión de E-caderina fue débil en el contacto célula-célula y en citoplasma (Figura 20B). El tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM reafirmó los resultados observados a los tiempos anteriores. Este tratamiento provocó un efecto negativo en las células SW620, disminuyó la proliferación celular, produjo la pérdida de la morfología celular y de la adhesión celular. La expresión de E-caderina se observó disminuida en el contacto célula-célula y en citoplasma, observándose espacios intracelulares ensanchados entre ellas (Figura 20C). El tratamiento de las células SW620 con TAM indujo un aumento evidente en la proliferación celular, recuperación de la morfología y de la adhesión celular. La expresión de E-caderina se observó incrementada en mayor proporción en el contacto célula-célula con respecto a la expresión en citoplasma. Además se confirmó que la expresión de E-caderina aumentó en el contacto célula-célula en grupos confluentes de células; mientras que la expresión de E-caderina solo se observó en citoplasma en células aisladas (Figura 20D).



**FIGURA 20.** Expresión de E-caderina a través de la técnica de inmunohistoquímica en la línea celular SW620 a 24Hrs. A) Control; B) E<sub>2</sub>; C) E<sub>2</sub>+TAM; D) TAM. Los tratamientos se realizaron como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-E-caderina (1:100). Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Compuesto a 20X.

El análisis cuantitativo de la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 24 horas se muestra en la tabla 13 y gráfica 11.

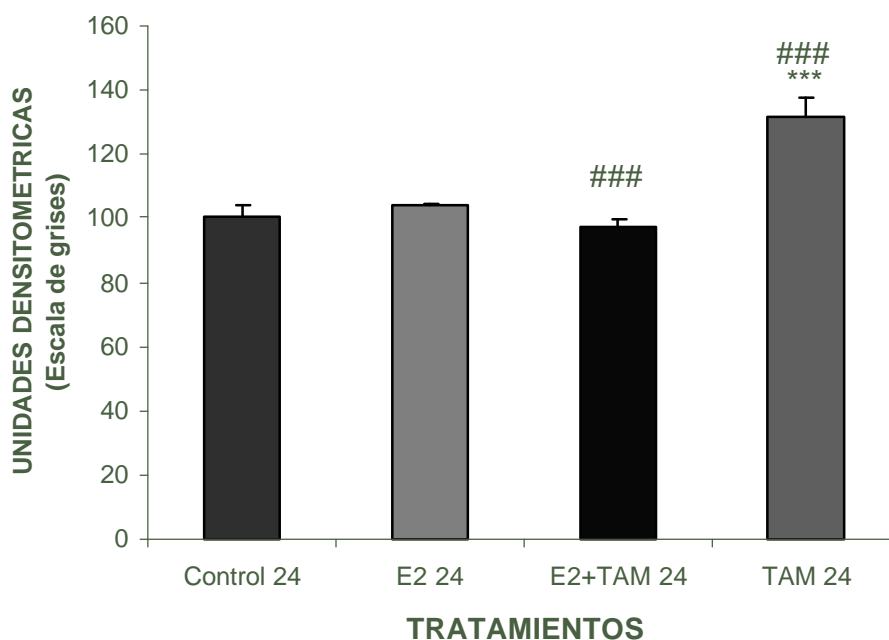
La prueba estadística realizada a los datos generados de la cuantificación de E-caderina en la línea celular SW620 a 24 horas, mostró que con respecto al control 24 horas el tratamiento con E<sub>2</sub> tendió a incrementar la expresión de E-caderina, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p=0.0601$ ). Mientras que, el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM tendió a disminuir la expresión de E-caderina pero no fue estadísticamente significativo ( $p=0.1656$ ). Por otra parte, las células SW620 que fueron tratadas con TAM incrementaron la expresión de E-caderina con respecto al control 24 horas ( $p<0.0001$ ). Con respecto al tratamiento con E<sub>2</sub>; el tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM disminuyó la expresión

de E-caderina ( $p=0.0006$ ) mientras que el tratamiento con TAM incremento la expresión de dicha proteína ( $p<0.0001$ ).

**Tabla 13. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 24 horas\*.**

TRATAMIENTOS (24Hrs)			
Control	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> +TAM	TAM
98.645275	103.416291	100.762657	126.770139
97.460055	104.402006	98.693051	136.485588
96.320764	104.315231	95.509747	135.518169
105.427822	104.578031	94.686934	134.868276
102.427822	102.541934	94.738494	121.735426
X=100.1	X=103.8	X=96.88	X=131.1
ó=3.780	ó=0.8588	ó=2.272	ó=6.503

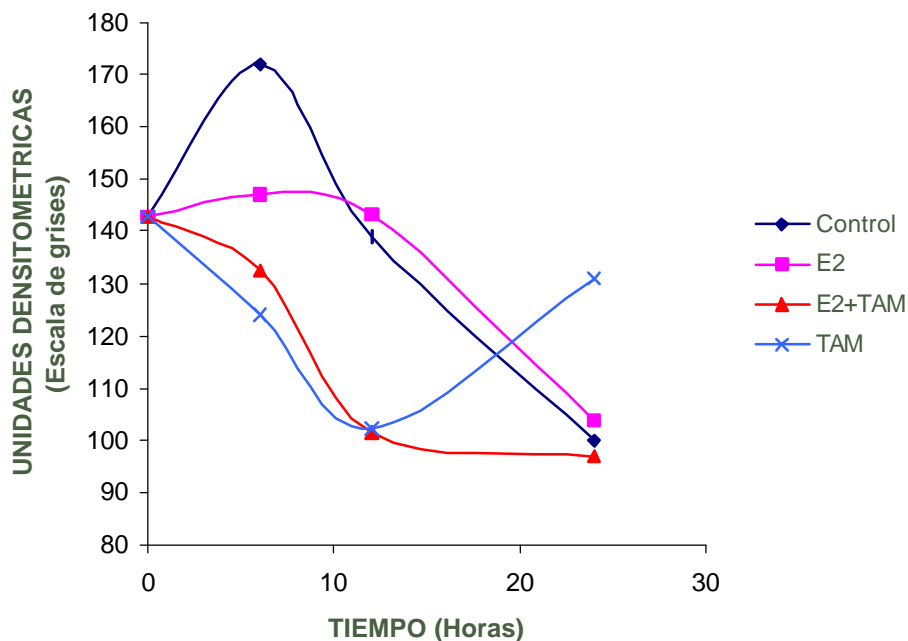
\*El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.



**Grafica 11. Efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en la línea celular SW620 a 24 horas.** . El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE. \* =diferencia significativa con respecto al control 24 horas. # =diferencia significativa con respecto al E<sub>2</sub>.

En la gráfica 12 se muestran el efecto de los diferentes tratamientos en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina en la línea celular SW620 en función del tiempo.

En la gráfica 12 se observa que en las células control SW620 existió un incremento en la expresión de E-caderina a 6 horas, mientras que a 12 y 24 horas disminuyó la expresión de dicha proteína. Los tratamientos con E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>+TAM disminuyeron la expresión de E-caderina en función del tiempo. El tratamiento de las células SW620 con TAM disminuyó la expresión de E-caderina a 6 y 12 horas, pero a 24 horas incremento la expresión de E-caderina.



**Grafica 12. Expresión de la proteína de adhesión E-caderina en la línea celular SW620 en función del tiempo.** El análisis densitométrico se realizó con el programa Zeiss, KS300. Las lecturas son reportadas en escala de grises asignadas por el programa.

## 7. DISCUSIÓN.

Las proteínas de adhesión tienen una función importante durante el desarrollo del cáncer y en la formación de metástasis. Durante la transición de células normales a células tumorales, la expresión de algunas de estas moléculas de adhesión se inhiben, mientras que otras se inducen, en el caso particular de la pérdida de la expresión de E-caderina da lugar a la metástasis.

La E-caderina es el componente clave para la función adherente de células epiteliales y ha sido considerada como un gen supresor del tumor. La pérdida de la adhesión celular mediada por la E-caderina tiene una función importante durante la transición de tumores epiteliales de un estado benigno a un estado invasivo. Además, la función adhesiva de E-caderina puede ser regulada por factores de crecimiento y hormonas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de E-caderina en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620 que expresan o no los receptores de estrógenos alfa o beta, con el objeto de conocer la relación entre la proliferación y adhesión celular en estas líneas celulares, y su regulación por la expresión de los receptores de estrógenos.

El primer objetivo planteado para este trabajo, fue determinar la expresión de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.

El patrón de expresión de los receptores de estrógenos es diferente. La expresión del RE $\alpha$  se observa principalmente en mama, útero y vagina, mientras que la expresión del RE $\beta$  se observa en el sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, pulmón y riñón<sup>86</sup>. Además, varios estudios sugieren que el desequilibrio en la expresión de ambos receptores puede representar un paso crítico en la progresión del tumor<sup>6</sup>.

La expresión de los receptores de estrógenos se realizó a través de la técnica de inmunohistoquímica como se indica en materiales y métodos. Los resultados mostraron que en la línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7, solamente se observó la expresión del RE $\alpha$ . La función de este receptor en el desarrollo del cáncer de mama no está claro, sin embargo, algunos estudios indican que este receptor participa en el

desarrollo y progresión del cáncer de mama. Se ha demostrado que el estradiol estimula la proliferación de las células MCF-7, que solamente expresan el RE $\alpha$ <sup>119</sup>.

La ausencia del RE $\beta$  en las células MCF-7 concuerdan con los resultados obtenidos por Paruthiyil et al 2004<sup>119</sup>. En este estudio se demostró que la transfección por adenovirus del RE $\beta$  en la línea celular MCF-7 inhibe la proliferación celular in vitro y previene la formación del tumor in vivo en respuesta a E<sub>2</sub><sup>119</sup>.

Por otro lado, existe evidencia de que el RE $\alpha$  predomina en el útero<sup>86</sup>. Los resultados mostraron que la línea celular de cáncer de cerviz, C-33, expresó el RE $\alpha$  pero ausencia del RE $\beta$ .

En cáncer de colon, se ha reportado a través de diversos estudios que los estrógenos tienen un efecto protector y se ha sugerido que la expresión del RE $\beta$  protege contra la carcinogénesis de colon<sup>6</sup>. En la línea celular de adenocarcinoma de colon SW620, se observó la expresión de ambos receptores. Sin embargo, la expresión del RE $\alpha$  fue mayor con respecto a la expresión del RE $\beta$ . Se ha reportado una mínima expresión del RE $\alpha$  en mucosa de colon normal<sup>20, 168</sup>. Por este motivo se ha sugerido que el efecto de los estrógenos en cáncer de colon puede ser llevado a cabo por el RE $\beta$ . Usando la técnica de RT-PCR semicuantitativa Campbell-Thompson et al, 2001<sup>20</sup> mostraron que el RE $\beta$  es el subtipo predominante del RE en el colon humano y que la disminución de los niveles del ARNm del RE $\beta$  está asociado con tumorigénesis en colon. Por otra parte, Konstantinopoulos et al, 2003<sup>79</sup> observaron que la expresión del RE $\beta$  es significativamente más baja en células de cáncer de colon que en epitelio de colon normal.

Una vez que se determinó la expresión de los receptores de estrógenos en las líneas celulares humanas se evaluó el efecto del estradiol y tamoxifeno en la expresión de la proteína de adhesión E-caderina. Las líneas celulares humanas fueron sometidas a diferentes tratamientos con estradiol y tamoxifeno como se indica en materiales y métodos.

Los resultados mostraron que en las células MCF-7, provenientes de adenocarcinoma de mama, el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo una regulación negativa de la expresión de E-caderina y dicho efecto fue revertido por el tratamiento con TAM. Estos

resultados concuerdan con lo reportado por Oesterreich et al, 2003<sup>110</sup>; quienes demostraron una regulación negativa de la proteína y del RNAm de E-caderina por estrógenos, a través de un mecanismo que involucra al receptor de estrógenos y la presencia de correpresores; los cuales, al unirse al promotor de E-caderina producen un aumento en la represión de la proteína<sup>110</sup>. La regulación a la baja en la expresión de E-caderina provocada por el E<sub>2</sub> también fue observada en las líneas celulares de cáncer de mama T47D y ZR75, RE positivo; pero no en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 y MDA-MA-435, RE negativo<sup>110</sup>.

Los resultados observados después del tratamiento con TAM en la línea celular MCF-7, sugieren que TAM posiblemente puede actuar como antagonista parcial en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$ . Existe evidencia de que la actividad de los SERMs es selectiva del tejido; en mama pueden funcionar como antagonistas<sup>86</sup>. Además, se ha demostrado que en células MCF-7, el estradiol puede degradar las proteínas de los receptores de estrógenos a través de la vía del proteosoma, mientras que, el tamoxifeno estabiliza ambos receptores<sup>105, 110</sup>.

Por otra parte, se observó disminución en la proliferación de las células MCF-7 después del tratamiento con E<sub>2</sub>. Previamente se ha reportado un mecanismo no genómico por el cual el E<sub>2</sub> puede suprimir la apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7, RE positivo, a través de la fosforilación e inactivación de la proteína pro-apoptótica BAD<sup>134</sup>. También, el estradiol puede inhibir la apoptosis en las células de cáncer de mama MCF-7 al inducir la expresión de la proteína anti-apoptótica, Bcl-2<sup>121</sup>.

La expresión de Bcl-2 es importante para determinar la resistencia de células tumorales hacia la quimioterapia, sin embargo, no es claro si la interacción célula-célula regula la expresión de Bcl-2, experimentos hechos en células de carcinoma de mama de rata seleccionada por la pérdida de respuesta a hormonas, demostraron que, células que expresaban caderinas fueron más sensibles a experimentar apoptosis por el agente quimioterapéutico, etoposido, que células que no respondían a hormonas y además no expresan caderinas. En este trabajo se concluye que E-caderina puede regular negativamente la expresión de Bcl-2 alterando la disponibilidad de  $\beta$ -catenina nuclear. Además, la pérdida de E-caderina en tumores invasivos puede aumentar la expresión de Bcl-2 y la resistencia a la quimioterapia. La relación inversa inducida por el

antiestrógeno induce la adhesión y aumenta la proliferación y la posibilidad de que estos procesos estén funcionalmente relacionados<sup>59, 141</sup>.

La línea celular C-33 proveniente de cáncer de cerviz, se caracteriza por tener una morfología en forma de hexágono. En ausencia de hormonas las células perdieron dicha morfología y fueron poco viables, sin embargo, a 24 horas las células presentaron una adaptación al medio carente de hormonas y esto se observó reflejado en un incremento en la expresión de E-caderina.

La expresión de E-caderina por medio de la técnica de inmunohistoquímica ha sido reportada en lesiones intraepiteliales escamosas y carcinomas invasivos de cerviz<sup>41</sup>. Durante el desarrollo de lesiones cervicales ocurren alteraciones en la expresión de E-caderina, la expresión de esta proteína disminuye en membrana y se observa incrementada en citoplasma como consecuencia de la transformación neoplásica<sup>41</sup>. Sin embargo, no existe evidencia sobre la regulación de E-caderina por estrógenos y SERMs.

En presencia de hormonas, las células C-33 experimentaron una recuperación evidente, las células recobraron su morfología y se observó un incremento en la proliferación celular. Además, el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo una regulación positiva de la expresión de E-caderina, observándose el mayor efecto a las 6 horas de tratamiento. Hareesh, 2005<sup>54</sup> reportó un aumento en la proliferación de las células C-33 en respuesta a E<sub>2</sub>, y dicho efecto era revertido por el tratamiento con ICI 182,780. Por otra parte, Shiozawa et al, 2004<sup>149</sup> reportó que el E<sub>2</sub> induce la proliferación de células de endometrio normal por inducir la activación transcripcional de ciclina D1. Además, demostró un incremento en la proliferación de células Ishikawa (carcinoma endometrial)<sup>149</sup>.

El tratamiento de la línea celular de cáncer de cerviz C-33, con E<sub>2</sub>+TAM tuvo un efecto peculiar en la expresión de E-caderina, ya que este tratamiento estimuló la expresión de E-caderina a 6 horas pero inhibió la expresión de la proteína a 12 y 24 horas. Por otro lado, TAM incrementó la expresión de E-caderina en función del tiempo y estimuló la proliferación celular. Los resultados sugieren que TAM posiblemente puede actuar como agonista en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$  en la línea



celular de cáncer de cerviz C-33. En útero, los SERMs puede actuar como agonistas y/o antagonistas<sup>86</sup>.

El efecto del tamoxifeno en el crecimiento de diferentes líneas celulares ha sido investigado; en la línea celular Ishikawa el tratamiento con *trans*-OH-TAM produjo un incremento significativo en el número de células y era dependiente de la concentración del OH-TAM. En una variante de células Ishikawa, el efecto estimulador del TAM era observado, mientras que éste no era observado con el tratamiento de E<sub>2</sub><sup>4</sup>. En otro estudio se encontraron efectos contrarios; TAM inducía la inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de endometrio HEC-1 y KLE, RL95-2, y este efecto era reversible cuando TAM y E<sub>2</sub> eran simultáneamente adicionados al medio de cultivo<sup>48</sup>.

En la línea celular SW620 proveniente de adenocarcinoma de colon se observaron resultados muy interesantes. Las células SW620 cultivadas en ausencia de hormonas se observaron no viables, existió disminución de la proliferación celular y pérdida de la adhesión celular, este hecho se reflejó en la pérdida de la expresión de E-caderina.

La expresión de E-caderina ha sido reportada en tumores y en líneas celulares de cáncer de colon. El-Bahrawy et al 2001<sup>37</sup>, reportaron un incremento en el RNAm y en la expresión de E-caderina y cateninas en carcinomas de colon. En líneas celulares de carcinoma de colon, E-caderina y cateninas son ampliamente expresadas; con el predominante complejo E-caderina/ $\beta$ -catenina/ $\alpha$ -catenina. Además, el complejo de expresión no es afectado por la presencia de mutaciones en APC o  $\beta$ -catenina<sup>38</sup>. Sin embargo, la regulación de E-caderina por estrógenos en líneas celulares de cáncer de colon no ha sido reportada.

Los resultados observados en las células SW620 después del tratamiento con E<sub>2</sub> mostraron que el E<sub>2</sub> tuvo un efecto negativo en esta línea celular, las células SW620 se observaron dañadas y con pérdida de la adhesión celular a 6 y 12 horas, pero a 24 horas se observó incremento en la proliferación celular y una red de adhesión celular mejor estructurada, sin embargo, la expresión de E-caderina disminuyó en función del tiempo.

El crecimiento de líneas celulares de carcinoma de colon humano se ha mostrado a través del RE<sup>35</sup>. Di Domenico et al, 1996<sup>35</sup> demostraron un pequeño pero

significativo incremento en la proliferación de células Caco-2 después del tratamiento con E<sub>2</sub>. En la línea celular SW620 English et al 1999<sup>40</sup>, mostraron inhibición en la proliferación celular después del tratamiento con E<sub>1</sub>, el cual no era observado por el tratamiento con E<sub>2</sub>.

Weyant et al 2001<sup>169</sup>, trabajaron con ratones que desarrollaban tumores intestinales que mostraban pérdida de la proteína APC. En este modelo el E<sub>2</sub> previene la formación del tumor asociada a APC y esta relacionada con un incremento en la expresión de la proteína del RE $\beta$  y disminución en la expresión de la proteína del RE $\alpha$ . Estos resultados ampliamente sugieren el efecto protector del RE $\beta$ <sup>169</sup>.

El tratamiento con E<sub>2</sub>+TAM en la línea celular SW620, disminuyó la expresión de E-caderina en función del tiempo. Por otro lado, TAM tuvo un efecto dual en la expresión de E-caderina ya que a 6 y 12 horas disminuyó la expresión de E-caderina pero a 24 horas aumentó la expresión de dicha proteína. Estos resultados sugieren que posiblemente el TAM puede actuar como agonista y/o antagonista en la expresión de E-caderina a través del RE $\alpha$  y/o RE $\beta$  en la línea celular de adenocarcinoma de colon SW620. Existe evidencia de que tamoxifeno puede funcionar como antagonista a través del RE $\beta$  en genes que contienen EREs pero pueden actuar como agonista parcial a través del RE $\alpha$ <sup>52</sup>.

En conjunto, los resultados revelaron que existe una regulación diferente de E-caderina por estrógenos y SERMs en las líneas celulares MCF-7, C-33 y SW620.

Por otro lado se observó que el patrón de inmunoreactividad para E-caderina fue diferente en células confluentes y en células aisladas. En las células que se encontraban confluentes existió mayor expresión de E-caderina en el contacto célula, mientras que en células aisladas la expresión de E-caderina era predominante en citoplasma. Estos resultados sugieren que el contacto célula-célula puede ser indispensable para el reclutamiento de E-caderina en la membrana celular.

## 8. CONCLUSIONES.

- Las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 y de cáncer de cerviz C-33, únicamente expresaron el RE $\alpha$ .
- La línea celular humana de adenocarcinoma de colon SW620, expresó ambos receptores de estrógenos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ). La expresión del RE $\alpha$  se observó incrementada con respecto a la expresión del RE $\beta$ .
- Los resultados revelaron que existe una regulación diferente de E-caderina por estrógenos en las líneas celulares humanas MCF-7, C-33 y SW620.
- El estradiol indujo una regulación negativa de la expresión de E-caderina en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 y en la línea celular de adenocarcinoma de colon SW620, mientras que, en la línea celular de cáncer de cerviz C-33, el estradiol reguló positivamente la expresión de E-caderina.
- Los resultados sugieren que tamoxifeno posiblemente puede actuar como antagonista parcial en la expresión de E-caderina en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 y como agonista en la línea celular de cáncer de cerviz C-33, a través del RE $\alpha$ . En la línea celular de adenocarcinoma de colon, SW620, tamoxifeno desempeñó una actividad agonista y/o antagonista en la expresión de E-caderina posiblemente a través del RE $\alpha$  y/o RE $\beta$ .
- El contacto célula-célula puede ser importante para el reclutamiento de E-caderina en la membrana celular.
- El restablecimiento de la expresión de E-caderina en el contacto célula-célula podría ser un mecanismo importante en la terapia de reemplazo hormonal, por lo que resulta interesante evaluar el efecto de varios moduladores selectivos del receptor de estrógenos en la expresión de E-caderina en diferentes tipos de tumores.

## 9. REFERENCIAS.

1. Aberle, H et al.  $\beta$ -catenina is a target for the ubiquitin-proteosoma pathway. *EMBO J.* 1997; 16:3797-3804.
2. Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter. *Molecular Biology of the Cell.* 4th Ed. New York. Garland Publishing. 2002.
3. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The E-cadherin/catenin complex: An important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.* 2000; 3:289-293.
4. Anzai Y, Holinka CF, Kuramoto H, Gurside E. Stimulatory effects of 4-hidroxitamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *Cancer Res.* 1989; 49:2362-2365.
5. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacology. Rev.* 1998; 50:197-263.
6. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F and Pujol P. Loss of ER $\beta$  as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *End. Relat. Cancer.* 2004; 11:537-551.
7. Baserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell.* 1994; 79:927-930.
8. Beavon IRG. Regulation on E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade? *J Clin Pathol.* 1999; 52: 179-188.
9. Behrens J, Mareel MM, and Van Roy FM, et al. Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin. Mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1989; 108:2435-2447.
10. Behrens J. Cadherins and catenins: Role in signal transduction and tumor progression. *Cancer and Metastasis Rev.* 1999; 18, 15-30.
11. Behrens J. et al. Functional interaction of  $\beta$ -catenina with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996; 382:638-642.
12. Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* 1994; 6:106-113.

13. Bischoff J. Cell Adhesion and Angiogenesis. *J. Clin. Inv.* 1997; 99:373-376.
14. Blaschuk OW, Pouliot Y, Holland PC. Identification of a conserved region common to cadherins and influenza strain A hemagglutinins. *J. Mol. Biol.* 1990; 211:679-682.
15. Bohm M, Totzeck B, Birchmeier W, et al. Differences of E-cadherin expression levels and patterns of primary human lung cancer. *Clin. Exp. Metastasis.* 1994; 12:55-62.
16. Bongiorno PF, al-Kasspooles M, Lee SW; et al. E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barret's oesophagus. *Br. J. Cancer.* 1995; 71:166-172.
17. Bracke ME, Charlier C, Bruyneel EA, Labit C, Mareel MM, Castronovo V Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. *Cancer Res.* 1994; 54:4607-4609.
18. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/ catenin complex in invasion and metastasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 213:123-161.
19. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer.* 2002; 36:115-124.
20. Campbell-Thompson M; Lynch J & Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes ER beta isoforms in colon cancer. *Cancer Research.* 2001; 61:632-640.
21. Chen JD & Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 1995; 377:454-457.
22. Cheskis, BJ, Karanthanasis S and Lyttle CR. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 11384-11391.
23. Chin D, Boyle GM, Kane A, Theile D, Hayward N, Parson P, Coman W. Invasion and metastasis markers in cancers. *Bri. J. Plast. Surg.* 2005; 58:466-474.
24. Christofori G and Semb Henrik. The role of cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Elsevier Science. 1999; 98: 01343-01347.
25. Cohen MB, Griebelin TL, Ahaghotu CA, Rokhlin OW, Ross JS. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Amer. J. Clin. Path.* 1997; 107:56.
26. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J and Ben-Ze'ev. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:987-991.

27. Coradini D, Cappelletti V, Granata G and Di Fronzo G. Activity of tamoxifen and its metabolites on endocrine-dependent and endocrine-independent breast cancer cells. *Tumor Biol.* 1991; 12:149-158.
28. Couse JF and Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 1999; 20:358-417.
29. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S & Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet.* 2003; 361:296-300.
30. Danette L, Daniels, Katharine Eklof Spink and William I. Weis.  $\beta$ -catenin: molecular plasticity and drug design. *Bioch. Sci.* 2001; 26:672-678.
31. De Leeuw WJF, Berx G, Vos CBJ, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J. Pathol.* 1997; 183:404-411.
32. De Nardo D, Kim H, Thorn C, Wu K, Lee AV & Brown PH. Estrogen's ability to stimulate breast cancer growth does not require ER DNA binding. *San Ant Breast Cancer Symposium.* 2003; Symposium 82, abstract 1002.
33. Denijn M, Ruiter DJ. The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma: clinicopathological aspects. *Melanoma Res.* 1993; 3:5-14.
34. DePasquale JA, Samsonoff WA, Gierthy JF.  $17\beta$ -Estradiol induced alterations of cell-matrix and intercellular adhesions in a human mammary carcinoma cell line. *J. Cell Sci.* 1994; 107:1241-1254.
35. Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.* 1996; 56:4516-4521.
36. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, et al. E-cadherin in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am. J. Pathol.* 1993; 142:981-986.
37. El-Bahrawy M, Poulson R, Jeffery R; Talbot I, MD, FRCP<sub>ATH</sub>, and Malcolm R. Alison, DSc. The expression of E-cadherin and catenins in Sporadic Colorectal Carcinoma. *Hum Path.* 2001; 32:1216-1223.
38. El-Bahrawy M, Poulson R, Rowan A, Tomlinson I, Alison M. Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Exp. Path.* 2004; 85:65-74.

39. Ellis V, Pike C, Erikson J, et al: The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992; 667:13-31.
40. English MA, Kane KF, Cruickshank N, Langman MJS, Stewart PM and Hewison M. Loss of estrogen inactivation in colonic cancer. *J. Cli. End.* 1999; 84:2080-2085.
41. Faleiro-Rodrigues C. and Lopes C. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: An immunohistochemical Study. *Pathobiology.* 2004; 71: 329-336.
42. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995; 1:27-31.
43. Gamallo C, Palacios J, Suarez A, et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological subtype in breast carcinoma. *J Pathol.* 1993; 142:987-993.
44. Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W and Schlag PM. Immunohistological Analysis of E-cadherin,  $\alpha$ - $\beta$ -, and  $\gamma$ -catenin Expression in Colorectal Cancer: Implications for Cell Adhesion and Signaling. *Eur. J. of Cancer.* 1999; 35:60-65.
45. Goodman and Gilman. *The Pharmacological Basis of therapeutics.* Mc Graw Hill. 2001, Edition 10, Cap. 58: 1597-1634.
46. Goodwin Marita, Yap Alpha S. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoeskeleton. *J. Molec. Hist.* 2004; 35:839-844.
47. Gottardis MM, Wagner RJ, Borden EC and Jordan VC. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res.* 1988; 48:812-815.
48. Grenman SE, Roberts JA, England BG, Grönroos M and Carey TE. In vitro growth regulation of endometrial carcinoma cells by tamoxifen and medroxioprogesterone acetate. *Gynecol. Oncol.* 1988; 30:239-250.
49. Guilford Parry, E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Molecular Medicine Today.* 1999; 5: 172-177.
50. Günthert U, Birchmeier W, Schlag PM, eds. Attempts to understand metastasis formation. Regulatory factors. Introduction. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 213:5-7.

51. Habermann H, Chang WY, Birch L, Mehta P y Prins GS. Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate- *Endocrinology*. 2001; 142:359-369.
52. Hall JM and McDonnell DP. The estrogen receptor  $\beta$ -isoform (ER-beta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140:5566-5578.
53. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
54. Hareesh B. Induction of aromatase. Expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res*. 2005; 23:11164-11173.
55. Hart M. J. et al. Downregulation of  $\beta$ -catenina by human axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenina and GSK3 $\beta$ . *Curr. Biol*. 1998; 8:573-581.
56. Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. B-catenin and tefs in mammary development and cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasis*. 2003; 8:145-158.
57. Hazan RB, Qiao R. Keren R. Bandano I. and Suyama K. Cadherin Switch in Tumor Progression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1014:155-163.
58. Hazan RB, Philips GR, Fang Qiao R, Norton Larry and Aaronson SA. Exogenous Expression of N-cadherin in Breast Cancer Cells induces Cell Migration, Invasion and Metastasis. *The Journal of Cell Biology*. 2000; 148: 779-790.
59. Heinrich CA, Lail-Trecker MR, Peluso JJ, White. Negative regulation of N-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the estrogen receptor signaling pathway in rat pituitary GH3 cells. *Endocrine*; 10: 67-76, 1999.
60. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003; 94: 575-581.
61. Huber O. Bierkamp C. Kemler R. Cadherin and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1996; 8:685-91.
62. Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, and Keivens VM, et al. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 1997; 88:521-30.
63. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenina and the cytoskeleton. *J. Cell. Biol*. 1994; 127: 2061-2069.



64. Humphries MJ, Newham P. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 1998;8:78–83
65. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 1999; 9:M33–37.
66. Imbert A, Eelkema R, Jordan S, Feiner H, Cowin P. Delta N89 beta-catenin induces precocious development differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J. Cell Biol.* 2001; 153:555-568.
67. INEGI. Estadísticas vitales 2006. Bases de datos y estadísticas Demográficas 2004.
68. Ito M & Roeder RG. The TRAP/SMCC/. Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trend in End and Met.* 2001; 12:127-134.
69. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N & Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor- $\beta$  mRNA and its variants in human breast cancer. *Int. J. Cancer.* 2000; 88:733-736.
70. Jockush BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, et al. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995; 11:379–416.
71. Jones P and Laird P. Cancer-epigenetics come of age. *Nat Genet.* 1999; 21:163-167.
72. Jordan VC. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer cell.* 2004; 5:207-213.
73. Juliano RL, Varber JA. Adhesion molecules in cancer: el role of integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5:812-818.
74. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42:283-323.
75. Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocelular carcinomas. *Int. J Cancer.* 1997; 71:355-359.
76. Keely P, Parise L, Juliano R. Integrins and GTPases: role in tumor cell growth control, motility, and invasion. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:101–106.
77. Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A, van Roy F. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics.* 1998; 50:129–146.

78. Knudsen Karen A y Wheelock Margaret J. Cadherins and the Mammary Gland. *J. Cell Bioch.* 2005; 95:488-496.
79. Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G & Papavassiliou AG. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumor's dedifferentiation. *Eur. J. Cancer.* 2003; 39:1251-1258.
80. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand and binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and betha. *Endocrinology.* 1997; 138:863-870.
81. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM & Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Ster. Bioch and Mol. Bio.* 2000; 74:311-317.
82. Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64:113-39.
83. Le Bivic A, Sambuy Y, Mostov K, et al. Vectorial targeting of an endogenous apical membrana sialoglycoprotein and uvomorulin MDCK cells. *J. Cell Biol.* 1990; 110:1533-1539.
84. Leo C & Chen JD. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene.* 2000; 245:1-11.
85. Lewis JE, Jensen PJ, Johnson KR, et al. E-cadherin mediates adherent junction organization through protein kinase C. *J. Cell Sci.* 1995; 108:3615-3621.
86. Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mut. Res.* 2005; 30:1-17.
87. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 1991; 51 (Suppl.1): 5054-5059.
88. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am.* 1992; 266:34-41.
89. Liotta LA. Steeg PS. Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991; 14:151-156.
90. Loftus JC, Liddington RC. New insights into integrin-ligand interaction. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:2302-6.

91. MacCalman CD, Farookhi R y Blaschuk OW. Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin. Exp. Metastasis*. 1994; 12:276-282.
92. MacCalman CD, Farookhi R y Blaschuk OW. Estradiol regulates N-cadherin mRNA levels in the mouse ovary. *Dev Genet*. 1995; 16:20-24.
93. Maione TE, Sharpe RJ. Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications. *Trends Pharmacol. Sci*. 1990; 11:475-461.
94. Mandlekar S and Kong T. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2001; 6:469-477.
95. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 1992; 14:455-463.
96. Matthews J and Gustafsson JA. Estrogen signaling: A subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Interventions*. 2003; 3:281-292.
97. Mayer B, Johnson JP, Leitl F, et al. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res*. 1993; 53:1690-1695.
98. McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME & Pike JW, Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular Endocrinology*. 1995; 9:659-669.
99. McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Rew*. 1999; 20:321-344.
100. Molenaar, M. et al. XTcf-3 transcription factor mediates  $\beta$ -catenina-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996; 86:391-399.
101. Moll R, Mitze M, Frixen UH, et al. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular carcinomas. *Am. J. Pathol*. 1993; 143:1731-1742.
102. Morton RA, Ewing CM, Nagafuchi A, et al. Reduction of E-cadherin levels and deletion of the alpha-catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 1993; 53:3585-3590.
103. Murase S, Schuman EM. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1999; 11:549-53.
104. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. 1996; 380:360-364.

105. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL and O'Malley BW. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:1858-1862.
106. Nelson W and Nusse R. Convergence of Wnt, B-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004; 303:1483-1487.
107. Nicolson GL. Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumor and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes. *Curr. Opin. Oncol.* 1991; 3:75-79.
108. Nose A, Tsuji K, Takeichi M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.* 1990; 61:147–155.
109. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994; 79:315-328.
110. Oesterreich S, Deng W, Jiang S, Cui X, Ivanova M, Schiff R, Kang K, Hadsell DL, Behrens J, Lee AV. Estrogen-mediated Down-Regulation of E-cadherin in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2003; 63:5203-5208.
111. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 1993; 53:1696-1701.
112. Okenawa T, Pong RCh, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Act. Biochim. Pol.* 2004; 51: 445-457.
113. Otto T, Rembrink K, Goepel M, et al. E-cadherin: a marker for differentiation and invasiveness in prostatic carcinoma. *Urol Res.* 1993; 21:359-362.
114. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 1989; 8:1711–1717.
115. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 4246-4250.
116. Palacios J, Benito N, Pizarro A, et al. Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am. J. Pathol.* 1995; 146:605-612.

117. Palmer HG et al. Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of  $\beta$ -catenin signaling. *J Cell Biol.* 2001; 154:369-387.
118. Parise LV, Lee JW, Juliano RL. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10:407–14.
119. Paruthiyil S, Parmar Hema, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL and Leitman DC. Estrogen receptor  $\beta$  inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G<sub>2</sub> cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2004; 64:423-428.
120. Peifer, M. et al. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* 1994; 76:789-791.
121. Perillo B, Sasso A, Abbondanza C and Palumbo G. 17- $\beta$ -Estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Bio.* 2000; 20:2890-2901.
122. Perl A, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H and Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998; 392:190-193.
123. Pettersson K, Gustafsson J. A role of estrogen receptor  $\beta$  in estrogen action. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63:165-192.
124. Peyrieras N, Louvard D, Jacob F. Characterization of antigens recognized by monoclonal and polyclonal antibodies directed against uvomorulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82:8067–8071.
125. Pignatelli M. Vessey CJ. Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum. Pathol.* 1994; 25:849-56.
126. Pokutta, S. and Weis, W.I. Structure of the dimerization and  $\beta$ -catenina-binding region of  $\alpha$ -catenina. *Mol. Cell.* 2000; 5:533-543.
127. Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The Cadherin-Catenin System: Implications for Growth and Differentiation of Endocrine Tissues. *Endocrine.* 2005; 20: 201-239.
128. Prinsac GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O and Bieberich C. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001; 13:241-252.

129. Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, et al. Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J. Pathol.* 1993; 169:245-250.
130. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, and Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 8333–8342.
131. Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene.* 1992; 7: 2439-2445.
132. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *End-Rel. Cancer.* 2004; 11:643-658.
133. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, Dolz R, Jahnig F, Epplen J, Mayer S, Muller C, Kemler R. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion. *EMBO J.* 1987; 6:3647–3653.
134. Romaine I and Wimalasena J. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Bio.* 2004; 15:3266-3284.
135. Rosouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM & Ockene J. Writing Group Women’s Health Institute Investigators 2002 Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women’s Health Initiative Randomized Controlled Trial. *J. Ame. Med. Ass.* 2002; 288:321-333.
136. Rubenstein E y Federmann D. Editores Scientific American, Medicina, 1997, Vol.5 sección 13, pp.11-17.
137. Rubinfeld, B. et al. Association of the APC gene product with  $\beta$ -catenina. *Science.* 1993; 262:1731-1734.
138. Russo J, Laref H, Balogh G, Guo S, Russo HI. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* 2003; 87:1-25.
139. Sakuragi N, Nishiya M, Ikeda K, et al. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecol. Oncol.* 1994; 53:183-189.

140. Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.* 1993; 12:2249–2256.
141. Sasaki C, Lin H, Passaniti A. Expression of E-cadherin reduces Bcl-2 expression and increases sensitivity to etoposide-induced apoptosis. *Int. J. Cancer.* 2000; 86: 660-666.
142. Schiff R, Massarweh S, Shou J & Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9:447S-454S.
143. Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell.* 1993; 75:753-758.
144. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand J-F, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* 1995; 374:327-337.
145. Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, Jones JL & Walker RA. Estrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Path.* 2002; 198:450-457.
146. Shibata T, Shimoyama Y, Gotoh M, Hirohashi S. Identification of human cadherin-14, a novel neurally specific type II cadherin, by protein interaction cloning. *J Biol Chem.* 1997; 272:5236–5240.
147. Shino Y, Watanabe A, Yamada Y, et al. Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer.* 1995; 76:2193-2201.
148. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer.* 1996; 77 (Suppl.8):1605-1613.
149. Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Nakayama K, Nikaido T and Konishi I. Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene.* 2004; 23:8603-8610.
150. Slagle BL, Zhou YZ, Birchmeier W, et al. Deletion of the E-cadherin gene in hepatitis B virus-positive Chinese hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 1993; 18:757-762.
151. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57:827–72.

152. Stoker M and Gherardi E. Regulation of cell movement the motogenic cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1072:81-102.
153. Sudarsanam P & Winston F. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends in Genetics*. 2000; 16:345-351.
154. Suzuki S, Sano K, Tanihara H. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul*. 1991; 2: 261–270.
155. Suzuki ST. Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem*. 1996; 61:531–542.
156. Takamaya T, Shiozaki H, Inoue M, et al. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in human breast cancer tissues and association with clinicopathological features. *Int. J. Oncol*. 1994; 5:775-780.
157. Takeichi M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1994; 390:145–153.
158. Toms SA, Casey G, Hercbergs A, Zhoe P, Barnett GH and Barna BP. Tamoxifen-induced p53 independent apoptosis in a human glioblastoma cell line. *Proc AACR*. 1995; 36-38
159. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem*. 1994; 63:451-486.
160. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW & McDonnell DP. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. End*. 1994; 8:21-30.
161. Umbas R, Issacs WB, Bringuier PP, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with a poor prognosis in patients with prostate cancer: *Cancer Res*. 1994; 54:3929-3933.
162. Van Aken J, Cuvelier CA, de Wever N et al. Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. *Pathol. Res. Pract*. 1993; 189:975-978.
163. Van Roy F, Mareel M, Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol*. 1992; 2:163-169.
164. Vaughn DE, Bjorkman PJ. The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 1996; 16:261–273.



165. Veatch AL, Carson LF, Ramakrishnan S. Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells. *Int J Cancer*. 1994; 58:393-399.
166. Vestweber D, Kemler R. Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ*. 1984; 15:269-273.
167. Vo N & Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001; 276:13505-13508.
168. Waliszewski P, Blaszczyk M, Wolinska-Witort E, Drews M, Snochowski M & Hurst RE. Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas. *J. Surg. Onc*. 1997; 64:3-11.
169. Weyant MJ, Carothers AM, Mahmoud NN, Bradlow L, Remoti H, Bilinski RT & Bertagnolli MM. Reciprocal expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001; 61:2547-2551.
170. Wijayarathne AL, Nagel SC, Paige LA, Christensen DJ, Norris JD, Fowlkes DM and McDonnell DP. Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140:5828-5840.
171. Woodhouse E, Chuaqui R, Liotta L. General Mechanisms of Metastasis. *Amer. Cancer Soc*. 1997; 80:1529-1537.
172. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner B. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120<sup>ctn</sup>. 1998; 141: 779-789.
173. Yasui W, Kuniyasu H, Akama Y, et al. Expression of E-cadherin, alpha-, and beta-catenins in human gastric carcinomas: correlation with histology and tumor progression. *Oncology Reports*. 1995; 2:111-117.
174. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 7416-7419.
175. Yost, C. et al. The axis inducing activity, stability, and subcellular distribution of  $\beta$ -catenina is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*. 1996; 10:1443-1454.
176. Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan P, Todorovic R, Rogan EG and Cavalieri. EL. Genotoxic

metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003; 86:477-486.