

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

Posgrado en Biología Experimental

“Cambios en la expresión y localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol a través de la activación de c-Src, en células de carcinoma mamario humano: efectos sobre la activación de HER-2 y la migración”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

M en B.E. JAVIER ESTEBEN JIMÉNEZ SALAZAR

DIRECTOR

Dr. Pablo G. Damián Matsumura

ASESORES:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

México D.F.14, marzo 2014

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Pablo G. Damián Matsumura

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (C/PFPN-2002-35-32).

El alumno Javier Esteban Jiménez Salazar fue apoyado con la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 212870 y al Programa de Posgrado en Biología Experimental, UAM, MEXICO

Parte de este trabajo fue realizado con el apoyo del Laboratorio Divisional de Microscopia Confocal y Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Fue apoyado por el proyecto de nanotecnología DCBS-UAM y el ICYTDF-UAM.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Departamento de Biología de la Reproducción.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORES:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y
Departamento de Bioquímica,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán
azentell@biomedicas.unam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: ***“Cambios en la expresión y localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol a través de la activación de c-Src, en células de carcinoma mamario humano: efectos sobre la activación de HER-2 y la migración”***.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

***Dra. María. de los Ángeles Aguilar Santamaría
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa***

SECRETARIO

***Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa***

VOCAL

***Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa***

VOCAL

***Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIB, UNAM y
Departamento de Bioquímica, INCMN SZ. azentell@biomedicas.unam.mx***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad que me brindo para crecer como persona y en conocimiento sobre las enfermedades neoplásicas en especial el cáncer de mama, mismos que me permitieron obtener el grado de Doctor .

Así mismo al Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura, por su confianza, apoyo y sobre todo por su amistad, a la Dra. Mina Königsberg Fainstein y a los Doctores. Luis Enrique Gómez Quiroz y Alejandro Zentella Dehesa por su enseñanza y conocimientos aportados a la realización de este trabajo y a la Dra. María. de los Ángeles Aguilar Santamaría como sinodal, por su apoyo en la revisión, orientación y consejos en la presente tesis.

Con mucho amor y respeto a mis padres que siempre han sido y serán un ejemplo a seguir y una luz en mi camino.

A mi familia por todo el cariño y apoyo incondicional que me han dado durante la vida.

A mis amigos que siempre han estado ahí para escucharme y orientarme.

ÍNDICE

RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. CANCER DE MAMA	18
1.1 TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMA (EMT)	19
1.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS	21
1.3 METÁSTASIS	23
2. ANTECEDENTES	25
2.1 UNIONES ESTRECHAS Y REGULACIÓN HORMONAL	25
2.2 UNIONES ESTRECHAS EN REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.	26
2.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLECULAS DEL COMPLEJO OCLUYENTE	28
3. JUSTIFICACIÓN.	29
4. OBJETIVO GENERAL	30
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
5. HIPÓTESIS	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
6.1 REACTIVOS	31
6.2 CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES	31
6.3 TRATAMIENTOS	31
6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2	31
6.5 ENSAYO DE WESTERN BLOT	32
6.6 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZO-1 y ZONAB.	32
6.7 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA.	32
6.8 INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT	33
6.9 ENSAYO DE PERMEABILIDAD CON FITC-DEXTRAN	33
6.1.0 ENSAYO DE CIERRE DE LA HERIDA	33
6.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	34

7. RESULTADOS	35
7.1 E2 INDUCE LA FOSFORILACIÓN EN Tyr-416 DE c-Src	35
7.1.2 INTERACCIÓN DE p-Src CON ZO-1	35
7.1.3 COLOCALIZACIÓN DE p-Src CON ZO-1	35
7.2 ZO-1 Y ZONAB SON TRANSLOCADAS AL NÚCLEO POR EFECTO DE E2	37
7.2.1 ZO-1 Y ZONAB COLOCALIZAN EN EL NÚCLEO	37
7.2.2 E2 INDUCE LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE ZO-1 A BAJA CONFLUENCIA	37
7.2.3 COLOCALIZACIÓN NUCLEAR DE ZO-1 Y ZONAB POR Z-STACK	38
7.2.4 LA PERMEABILIDAD PARACELULAR ES INCREMENTADA POR E2	38
7.3 LA EXPRESIÓN DE HER-2 ES ESTIMULADA POR E2	40
7.4 E2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR EPITELIAL CRB3	42
7.5 E2 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE ZO-1	43
7.5.1 E2 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE ZONAB	44
7.5.2 E2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA	44
7.6 E2 INCREMENTA LA MIGRACIÓN DE LAS CELULAS MCF-7	46
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIÓN	53
10. PERSPECTIVAS	54
11. BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS.

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario (del ARNm)
AJ:	Uniones Adherentes (del idioma inglés adherens junctions)
AKT:	Proteína cinasa en serina/treonina
AMPc:	Adenosina monofosfato cíclico
AMV:	Enzima retrotranscriptasa del virus del mosaico de la alfalfa
ANOVA	Análisis de Varianza
AP- 1	Proteína Activadora
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATF:	Factores de transcripción de activación inducible (del idioma inglés Activating transcription factors)
BRCA1:	Cáncer de mama de inicio temprano 1 (del idioma inglés breast cancer 1, early onset)
CDIS:	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDK4/6:	Cinasas dependientes de ciclinas, tipo 4 y 6 OJO
CHX:	Cicloheximida
CLIS:	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CO ₂ :	Dióxido de carbono
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
CRB3	Crumbs homóloga 3
DBD:	Dominio de unión al ADN (del idioma inglés ADN Binding Domain)
DMEM:	Medio de cultivo propuesto por Eagle y modificado por Dubelcco
dNTP's:	desoxirribonucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOR:	Densidad óptica relativa
DTT:	Ditiotreitol
E ₂ :	Estradiol

ECM:	Matriz Extracelular (del idioma inglés ExtraCellular Matrix)
EDTA:	Ácido etilen diamino tetracético
EGF:	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo I, también HER1
EGTA:	Ácido etilen glicol tetracético
EMT:	Transición epitelio-mesénquima (Del idioma inglés epithelial-mesenchima transition)
ERBB1, 2, 3, 4:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipos 1, 2, 3, 4 (Del idioma inglés epidermal growth factor receptor)
ERE:	Elemento de respuesta a estrógenos
EREG:	Epiregulina
ERK:	Cinasa de señalización extracelular
EtOH:	Etanol
FMF:	Solución desnaturalizante para ARN (formamida 50%, MOPS 1X y formaldehído 7%)
FSP-1:	Proteína específica de fibroblasto, tipo 1
G1:	Fase G1 del ciclo celular (del idioma inglés Gap 1) OJO
G3PDH:	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenada (gen de expresión constitutiva)
GPCR:	Receptor acoplado a proteínas G (Del idioma G protein-coupled receptors)
H ₂ O-DEPC:	Agua con dietilpirocarbonato (inhibidor de ribonucleasas)
HECV:	Células del endotelio vascular humano
HEPES:	4 - (2-hidroxietil)-1-ácido piperazin etano sulfónico
HER-2:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2
HuR:	Proteína de unión a ARN
IGF-IR:	Receptor del Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
IP3:	Inositol trifosfato
KCl:	Cloruro de potasio
KDa:	Kilodaltones
LBD:	Dominio de unión a ligando (del idioma inglés Ligand Binding Domain)

MAGUK:	Cinasa de guanilato asociada a la membrana (del idioma inglés membrane-associated guanylate kinase)
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCF-7:	Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de Michigan Cancer Foundation)
MDCK:	Línea celular epitelial de riñón canino (acrónimo de Madin-Darby Canine Kidney)
MMP-1:	Metaloproteasas de matriz (del idioma inglés matrix metalloproteinase-1)
MOPS:	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
mTOR:	Blanco de la rapamicina en mamíferos (acrónimo de mammalian Target of Rapamycin)
NaCl:	Cloruro de sodio
NR:	Receptores nucleares
NRG:	Neuregulina
OMS:	Organización Mundial de la Salud
P107:	Proteínas supresora de tumores de 107 KDa
P53:	Proteínas supresoras de tumores de 53 KDa
pb:	Pares de bases
PCNA:	Antígeno nuclear de células en proliferación (acrónimo del idioma inglés de Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ:	Dominio de Interacción a la Zona Occludens
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PROMSA:	Programa de Acción Mujer y Salud
PVDF:	Fluoruro de Polivinilideno (del idioma inglés Polyvinylidene fluoride)
RA:	Receptor de andrógenos
Ras:	Proteína G oncogénica
RE:	Receptores de estrógenos
RE α :	Receptor de estrógenos, tipo alfa
RE β :	Receptor de estrógenos, tipo beta
RFC 40:	Factor de replicación C 40

RFX1:	Factor de transcripción X1
RNasa H:	Enzima endonucleasa que degrada todo tipo de ARN
RNasaOUT®:	Inhibidor de ribonucleasas
RP:	Receptor de progesterona
RTK:	Receptor con actividad de tirosina cinasa
RT-PCR:	Transcripción reversa, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
SBF:	Suero de bovino fetal
SBF-C:	SFB tratado con carbón activado y dextran T-70
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (del idioma inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SH3:	Domínio de homología 3 a Src (del idioma inglés Src homologue 3)
SHC:	Proteína adaptadora que contiene dominios de homología con SRC
Sp3:	Factor de Transcripción (del idioma inglés Specificity Protein 3)
Src:	Proteínacinasa de tirosinas (forma corta de sarcoma)
STAT:	Transductor de señales y activador de la transcripción (del idioma inglés Signal Transducers and Activator of Transcription)
TA:	Temperatura de alineamiento
TBE:	Solución para electroforesis (Tris Base 10 mM, ácido bórico 10 mM y EDTA 10 mM)
Tfl:	ADN polimerasa extraída de la bacteria <i>Thermas flavus</i>
TJ:	Uniones Estrechas (del idioma inglés tight junctions)
T _M :	Temperatura de fusión (Tempartaure of melting)
TMR:	Receptor de estrógenos transmembranal (GPR30)
TRH:	Terapia de Reemplazo Hormonal
UTR:	Regiones que no se traducen (del idioma inglés Untranslated Regions)
Vh:	Vehículo
YY1:	Factor de Transcripción de unión a cajas Y
ZO-1, 2, 3:	Isoformas 1, 2 y 3 del gen Zonula Occludens 1

ZONAB: Factor de transcripción asociado a ZO-1 (del idioma inglés ZO-1-associated nucleic acid binding protein)

Z-Stack Reconstrucción en 3D de eje Z.

LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS.

Figura 1.

Efecto del estradiol sobre la fosforilación de Src-Tyr 416 y la formación del complejo p-Src/ZO-1 en las células MCF7.

Figura 2.

Efecto del estradiol sobre la translocación nuclear de ZO-1 y ZONAB, tanto en alta como en baja confluencia, y sobre la permeabilidad paracelular en las células MCF7.

Figura 3.

Efecto del estradiol sobre la expresión del mRNA que codifica para HER-2 en las células MCF7.

Figura 4.

Efecto del estradiol sobre la expresión y localización del marcador epitelial CRB3 y del marcador mesénquimal N-cadherina en las células MCF7.

Figura 5.

Efecto del estradiol sobre la expresión de los mRNA y proteínas que codifican para ZO-1, ZONAB y Ocudina en las células MCF7.

Figura 6.

Efecto del estradiol sobre la migración de las células MCF-7 medido por el ensayo de cierre de la herida (wound closure) y sobre la remodelación del citoesqueleto (faloidina) en las células MCF7.

Figura 7.

Representación del posible mecanismo por el cual estradiol regula el desensamblaje del complejo ocluyente, induciendo la translocación al núcleo de ZO-1 y ZONAB para estimular la expresión de HER-2 en las células de cáncer de mama.

Gráfica 1.

Niveles de fosforilación en Tyr⁴¹⁶ de la proteína c-Src inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 2.

Cambios en la localización de la proteína ZO-1 inducidos por E₂ (1nM) en las fracciones citoplasmáticas y nucleares a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 3.

Cambios en la localización de la proteína ZONAB inducidos por E₂ (1nM) en las fracciones **citoplasmáticas y nucleares** a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 4.

Cambios en la expresión del gen HER-2 inducidos por los tratamientos con E₂ en concentraciones de 1nM y 100 nM, en ausencia y presencia de Cicloheximida (CHX) por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 5.

Cambios en la expresión de la proteína CRB3 inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 6.

Cambios en la expresión de la proteína N-cadherina inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 7.

Cambios en la expresión del mRNA y la proteína ZO-1 inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 8.

Cambios en la expresión del mRNA y la proteína ZONAB inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 9.

Cambios en la expresión del mRNA y la proteína ocludina inducidos por los tratamientos con E₂ a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

Gráfica 10.

Efecto del estradiol sobre migración de las células MCF-7.

RESUMEN

Los estrógenos han sido descritos como un factor que promueve proliferación celular en el cáncer de mama, pero poco se sabe sobre su papel en la migración y la metástasis. En muchos tipos de cáncer epiteliales, la capacidad de sufrir metástasis ha sido asociada con la pérdida de características epiteliales y la adquisición de propiedades mesenquimales que conducen a la migración de las células, en un proceso conocido como transición epitelio-mesenquima (TEM). La TEM es un proceso previo a la metástasis controlado por complejos multiproteínicos como *Zonula Occludens1* (ZO-1), el factor de transcripción asociado a ZO-1 (ZONAB) y la proteína cinasa del Virus del Sarcoma de Rous (Src). En este trabajo demostramos que el estradiol (E2) es capaz de inducir la rápida fosforilación de Src en la Tyr-⁴¹⁶ y la consecuente formación del complejo p-Src-ZO-1, lo cual conlleva al desensamblaje de las proteínas ZO-1 y ZONAB de las uniones ocluyentes y su translocación al núcleo, esto se asocia con los cambios en la expresión de HER-2, ya que se ha demostrado que ZO-1 y ZONAB tienen la capacidad de regular transcripcionalmente su expresión y correlacionan con la disminución en la expresión de los marcadores epiteliales CRB3, ocludina y el incremento del marcador mesenquimal N-cadherina. Lo anterior conlleva a el incremento en la permeabilidad y en la migración inducidos por E2 . Cuando se utiliza un antagonista del receptor de estrógenos (ICI 182780), se inhibe la fosforilación de Src en la Tyr-416, la formación del complejo p-Src-ZO-1, la translocación nuclear de ZO-1 y ZONAB, la permeabilidad y la migración, en las células de carcinoma mamario MCF-7. Así, durante la progresión del tumor, E2 puede promover la deslocalización, perdida de las uniones estrechas, incrementar la permeabilidad y la invasión del cáncer de mama ER-positivos, por lo cual nuestros resultados han identificado un nuevo mecanismo en el que los estrógenos promueven la TEM como un proceso previo a la metástasis. La inhibición de la vía p-Src-ZO-1 además de ER α puede ser considerado como una terapia adyuvante en el cáncer de mama.

ABSTRACT.

It is known that tumor cells inappropriately utilize Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) mechanisms as key elements in the invasive process. Moreover, it is becoming clear that estradiol (E2) induces breast cancer cell progression and enhances EMT; however, the detailed mechanisms remain unclear. Here we investigated E2 role on the expression and intracellular localization of tight junction (TJ)-associated proteins Zonula Occluden-1 (ZO-1), ZONAB (ZO-1-associated associated nucleic-acid-binding protein) and occludin, and their activation effect on c-Src, the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) expression and cell migration, using human breast cancer cells (MCF-7) as a model; key experiments were performed in T47D, another estrogen receptor (ER)-positive breast cancer cell line. We demonstrated that E2 (1 nM) elicits c-Src activation after 15 min incubation. Subsequently, the p-Src/ZO-1 complex led to ZO-1 and ZONAB disruption at the TJ and HER2-mRNA expression increased; these results agree with previously published data by other authors that showed that ZO-1 and ZONAB regulate HER2 expression. These changes correlated with epithelial markers occludin (adhesion) and CRB3 (polarity) decreased expression and increased the mesenchymal marker N-cadherin synthesis. These effects led to increased MCF-7 cell migration induced by E2, even in the presence of a cell proliferation inhibitor. The incubation with an estrogen receptor (ER) antagonist (ICI 182,780) precluded E2 effects on c-Src phosphorylation, p-Src/ZO-1 complex formation, ZO-1/ZONAB nuclear translocation and MCF-7 cells cell migration. These results strongly suggest that during tumor progression, E2 promotes TJ disruption and increases cell motility; therefore our results propose a novel pathway by which estrogens promotes EMT-associated mechanisms that could lead to metastasis.

1.1 CANCER DE MAMA

Con base en el reporte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 de febrero), el Cáncer de Mama (CaM) fue reconocido como el tipo de cáncer que en 2012 presentó mayor tasa de mortalidad de México (15.38 por cada 100,000 personas) en mujeres mayores de 20 años de edad (INEGI, 2014).

“Cáncer” es un término que se usa para referirse a un conjunto de enfermedades en las que células anormales se dividen y proliferan sin control (INC, 2011). Cuando esto sucede, se forma una masa de tejido que se denomina tumor, el cual puede ser en benigno o maligno. Los tumores malignos se distinguen por adquirir la capacidad de desprenderse del tejido que los originó y pueden viajar por la sangre o linfa para invadir otros tejidos y posteriormente formar nuevos tumores, en un proceso al cual se le denomina metástasis y es la causa más común de muerte en pacientes con cáncer (Wittekind y Neid, 2005).

La incidencia del CaM ha aumentado constantemente durante las últimas décadas, pero la mortalidad por CaM parece estar disminuyendo, lo que sugiere un avance en la detección precoz y un tratamiento más eficaz de la enfermedad. El desarrollo y progresión del CaM se asocia a factores de riesgo inherentes a la vida reproductiva de la mujer, incluyendo la menarquía temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, así como la edad tardía del nacimiento del primer hijo/a (American Cancer Society, 2013). Además de otros factores hormonales externos como la administración de terapias de reemplazo hormonal y anticonceptivos orales (Nelson, *et al.*, 2012). Esto se debe a la gran actividad mitogénica de los estrógenos que inducen el recambio de las células que forman los epitelios de los ductos que transportan la leche desde los lóbulos lácticos hasta el pezón en la glándula mamaria. Frecuentemente el CaM se percibe como una enfermedad que aparece sin razón alguna y aunque los científicos aún no conocen todas las razones de ello, muchas de las causas del cáncer ya han sido identificadas y es considerada una neoplasia maligna de origen multifactorial (Berardo *et al.*, 1996). Además de los factores intrínsecos, tales como la herencia, dieta y hormonas, los estudios científicos señalan la existencia de factores extrínsecos clave que contribuyen al desarrollo del cáncer: las sustancias químicas contenidas en la combustión del tabaco al fumar, la radiación o sustancias contenidas en los mismos alimentos que ingerimos (INC, 2011).

Los estrógenos son hormonas necesarias para la reproducción, así como para el desarrollo y crecimiento normal de del tejido mamario; sin embargo, el riesgo de que una mujer presente cáncer de mama está asociado al tiempo durante el cual ha estado expuesta a los estrógenos (Lønning *et al.*, 2011). Por este motivo es muy importante entender los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales los estrógenos favorecen el establecimiento del cáncer de mama, lo cual puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias experimentales para atacarlo.

1.2 TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA (TEM)

Con la finalidad de entender mejor el proceso que origina la metástasis en las células de carcinoma mamario se analiza el mecanismo mediante el cual las células epiteliales se mantienen unidas y que es lo que ocasiona cambios en las estructuras de adhesión.

La adhesión entre las células es necesaria para el ensamblaje de cada una de ellas formando una barrera de células epiteliales que recubran los conductos y los lobulillos de la mama. Estos contactos entre células se someten a remodelaciones que se modifican en función de la etapa de desarrollo de la mama, ya sea en respuesta a las crecientes demandas de proliferación en la pubertad y el embarazo, a la diferenciación durante la lactancia o bien su degradación por apoptosis cuando han terminado con su función productora de leche. Los contactos célula-célula constan de tres estructuras de unión principales: las uniones estrechas (TJ por sus siglas en idioma inglés “tight junctions”), uniones adherentes y desmosomas. Las proteínas que forman a las TJ se han agrupado según su función como proteínas integrales de membrana, proteínas de andamiaje y proteínas de señalización. En células epiteliales polarizadas las TJ y las uniones adherentes se encuentran distribuidas asimétricamente en la región apical de la membrana lateral formando el complejo de unión apical, que rodea el ápice de las células y marca la frontera entre los dominios de la membrana apical y la basolateral (Brennan Kieran, *et al.*, 2010).

Las uniones estrechas son complejos especializados en la unión que sirven para formar un sello hermético entre las células epiteliales adyacentes; funcionan como una barrera selectiva para evitar la difusión de diversos compuestos a través del espacio intercelular. Las uniones estrechas también sirven para restringir la difusión de las proteínas y los lípidos de membrana entre los dominios apical y basolateral, por lo tanto son esenciales para el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales (Fogg, *et al.* 2005).

Se observó que las proteínas que participan en las TJ ejercen una influencia fundamental sobre los procesos celulares que regulan la polaridad, la diferenciación y la migración, que son procesos fundamentales para la progresión del cáncer. Por lo tanto, las TJ y otras proteínas de adhesión célula-célula están ganando cada vez más atención en la investigación del cáncer de mama (Brennan Kieran, *et al.*, 2010). Las TJ pueden regular la polaridad epitelial mediante el control del ensamblaje de los tres principales complejos de polaridad: el complejo CRB3, el complejo Par, y el complejo Scrib. CRB3 es una proteína de membrana de un dominio transmembranal ubicado en la región apical de células epiteliales, con una pequeña fracción en la parte superior de las uniones estrechas de las células epiteliales. Se relaciona con el establecimiento de la polaridad celular en las células epiteliales de mamíferos y regula la morfogénesis de las uniones estrechas. CRB3 interactúa con PAR6, PALS1 y PATJ. Estas estructuras de unión se componen de proteínas integrales de membrana que unen a las células vecinas a través de interacciones homofílicas y heterofílicas, y a la presencia de proteínas citoplasmáticas de andamiaje que organizan complejos de señalización (Brennan Kieran *et al.*, 2010).

Alteraciones en las proteínas de TJ pueden dar lugar a células con características mesenquimales, ya que pueden favorecer la disminución de la apoptosis (disminución en la expresión de la proteína Scribble) y aumentar la proliferación celular (sobreexpresión de la proteína Par 6) que conduce al crecimiento descontrolado en lesiones del carcinoma ductal *in situ*, así como también la disminución en la polaridad de éstas células (disminución de la expresión de ZO-1, CRB3, entre otras). En segundo lugar, las alteraciones TJ pueden disminuir la adhesión celular (asociada con la expresión Cldn 16) y aumento de motilidad, lo que facilita la migración de las células cancerosas, como se ha visto durante la invasión y la ruptura de la membrana basal en los primeros estadios del carcinoma mamario (Brennan Kieran *et al.*, 2010).

La EMT es un proceso que resulta en la pérdida de propiedades epiteliales, tales como la adhesión célula a célula y la pérdida de polaridad baso apical, así como la ganancia de propiedades de tejidos mesenquimales, tales como una mayor capacidad para migrar e invadir a través de proteínas de la matriz extracelular (Thiery y Sleeman, 2006). La EMT es un elemento esencial y altamente regulado durante etapas tempranas del desarrollo embrionario (Locascio y Nieto, 2001). Sin embargo, la desregulación de la EMT se asocia con muchos tipos de fibrosis y con procesos de progresión oncogénica (Thiery y Sleeman, 2006).

La EMT se asocia con la pérdida de expresión, localización o ambas, de las proteínas implicadas en la formación de las uniones celulares, tales como E cadherina, ZO-1, ocludina y claudina, y el aumento en la expresión de proteínas del mesénquima como la proteína específica de fibroblasto1 (FSP-1), actina de músculo liso y la fibronectina, así como las integrinas. La EMT también se asocia con un cambio en la expresión de filamentos intermedios, queratinas y de vimentina (Thiery y Sleeman, 2006). La pérdida de expresión de E cadherina es un acontecimiento frecuente durante la progresión del cáncer (Thiery, 2002), y muchos de los cánceres como el de próstata, páncreas, renal, gástrico y ciertos tipos de cáncer de mama (por ejemplo, el carcinoma lobulillar) se han asociado con la pérdida o la disminución de la expresión de E cadherina, la cual se puede atribuir a mutaciones de ciertos genes, la regulación negativa de la transcripción de estos genes debido a la metilación o a la inhibición de la transcripción del gen estimulada por la activación de ciertas vías de señalización, resultan en la activación de represores de la transcripción de E cadherina, tales como Snail 1, Snail2 y Twist.

La EMT ha sido implicada como un evento importante durante la metástasis (Thiery, 2002, Thompson *et al.*, 2006), la recurrencia del tumor (Moody *et al.*, 2005), así como la resistencia a los inhibidores de los receptores de diversos factores de crecimiento, principalmente el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), (Thompson *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2005). La EMT es considerada como un interruptor que permite a las células benignas, no invasivas y no metastásicas adquirir la capacidad invasiva e infiltrante en el tejido circundante para genera metástasis (Thiery, 2002). Múltiples EMT pueden amplificar la progresión del tumor y la metástasis en modelos experimentales.

1.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Las interacciones célula-célula son indispensables para la arquitectura normal de los tejidos. En tejidos epiteliales las interacciones célula-célula son mediadas por varios complejos: las uniones estrechas, las uniones adherentes, desmosomas y las uniones gap, de las cuales cada una posee características de composición morfológica y de función únicas (Dejana *et al.*, 2008).

Las uniones estrechas son microdominios de la membrana plasmática que rodean el polo apical de cada célula epitelial separando el lado apical del basolateral. Ellas forman una barrera de difusión intercelular (o puerta) regulando el paso de iones, agua, y varias macromoléculas a través de espacios para celulares o una barrera de restricción de difusión apical/basolateral de proteínas de membrana y lípidos. Las TJ se han descrito como una serie de puntos fusionados entre las caras

exteriores de las membranas de células adyacentes también llamados “kissing” points (González-Mariscal, 2002). La barrera intercelular formada por las TJ tiene selectividad en cuanto al tamaño molecular y tipos de iones, por lo que las diferencias en permeabilidad dependen del tipo celular y las condiciones de éstas. Algunos reportes describen a las TJ en la glándula mamaria como estructuras dinámicas en procesos como lactogénesis, en donde se demuestra que son reguladas por hormonas tales como la prolactina, los glucocorticoides y la progesterona. La integridad de las TJ es crucial para secreción de la leche durante la lactancia, en donde las TJ en el epitelio de los alvéolos son impermeables para evitar la fuga de leche del lumen a pesar de ser sujeto a filtraciones en epitelios de glándula mamaria en animales preñados. La función de barrera que cumplen las TJ es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis en otros tejidos, tal como sucede en el tejido intestinal en donde las TJ generan una barrera que regula el transporte en el interfaz de la mucosa con el ambiente externo (Chen Jie *et al.*, 2008).

Actualmente han sido identificadas un gran número de proteínas que se han establecido como componentes de las TJ. La proteína ocludina es una proteína integral de membrana con un peso aproximado de 60 Kda, y se localiza en las uniones estrechas. Ocludina presenta cuatro dominios transmembranales, un dominio carboxilo terminal citoplasmático largo y un dominio corto amino terminal citoplasmático. Dos asas extracelulares que son similares en tamaño y son ricas en residuos de tirosina. El nivel de expresión de ocludina se correlaciona con el número de uniones estrechas en varios tejidos, confirmando el que ocludina participa como un componente esencial de las TJ.

Zonula Occludens es un complejo compuesto por ZO-1, ZO-2, y ZO-3 que son proteínas de la periferia de la membrana, ZO-1 fue el primer componente de la TJ en ser identificado con una masa molecular de 220 kDa. Cuando ZO-1 se inmunoprecipita por lisis de células epiteliales, coprecipitan con ella otras dos proteínas con masas moleculares de 160 y 130 kDa, y muestran una localización específica en las TJ, por lo que fueron designadas como ZO-2, y ZO-3. ZO-1 existe en dos variantes de “splicing” alternativas, caracterizadas por la presencia de 80 aminoácidos en un dominio denominado dominio α . La isoforma α^+ está presente en las células epiteliales, mientras que la isoforma α^- se limita a las células endoteliales y células de Sertoli (Balda y Anderson, 1993).

Diversos experimentos han mostrado que ZO-1 puede tener una potencial función como supresor de tumores en epitelio de mamíferos. Se ha observado que ZO-1 disminuye en diversas líneas celulares invasivas de cáncer de mama, donde la reducción en su señalización se correlaciona con

la pérdida en la diferenciación del tumor, en muestras de cáncer de mama humano, específicamente durante la diferenciación glandular del tumor (Hoover *et al.*, 1998). Un estudio en el cual se usó la línea celular tumorigénica MCF-7 mostró que la activación del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-IR), lleva a un incremento en la expresión de ZO-1. El mismo estudio también mostró que la activación de IGF-IR amplifica la expresión de la E-cadherina, que es una proteína que media la adhesión célula-célula y reduce la habilidad invasiva de las células tumorigénicas, (Mauro *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que ZO-1 puede reducir la habilidad metastásica de cierto tipo de células de cáncer de mama en respuesta a la señalización de un factor de crecimiento. El análisis de la expresión ZO-1 en diversos tipos de cáncer humano han revelado que la expresión de ZO-2 está alterada en la mayoría de los adenocarcinomas de mama (Chlenski *et al.*, 2000). La reducción significativa de la expresión de ZO-2 fue detectada también en algunas líneas celulares de cáncer de mama. Estos estudios proveen evidencia de que las proteínas de andamiaje localizadas en las uniones estrechas tienen potencial como supresor de tumores en células epiteliales de mama.

El tercer componente del grupo de proteínas que conforman a las TJ son las proteínas de señalización que pueden estar envueltas en el ensamble de las uniones, además funcionan como una barrera de regulación y de transcripción de diferentes genes como es el caso de β -catenina y ZONAB, este es un componente clave en las TJ ya que se le ha relacionado con la organización de la transducción de señales de genes relacionados con procesos cancerosos (Tracey *et al.*, 2004).

1.4 METÁSTASIS

La metástasis es un proceso muy complejo que implica la desregulación de la interacción entre proteínas y genes que son responsables de la invasión, la angiogénesis, la circulación de las células tumorales en los vasos sanguíneos y la linfa, la colonización a sitios secundarios de otro órgano, y finalmente, la evasión de los sistemas de defensa. La diseminación metastásica a través de los sistemas vascular y linfático es la culminación, y la etapa final, de esta enfermedad que se desarrolla en un lapso de entre 5 y 20 años. Actualmente se sabe que para la mayoría de los tipos de neoplasias sólidas en humanos, los carcinomas microinvasivos surgen de una lesión precursora al carcinoma in situ (Arpino, *et al.*, 2005). Por tal motivo la prevención de la transición de células premalignas a carcinoma invasivo y metastásico es un objetivo importante para la quimioprevención

del cáncer. Con el fin de alcanzar este objetivo es necesario identificar nuevos blancos moleculares que estén asociados con la adquisición de la propiedad invasiva del cáncer.

El tumor maligno es un estado en el que las células presentan una estructura neoplásicas más agresivas (Hanahan y Weinberg, 2000). La proliferación sostenida no es la única característica de las células cancerosas. De hecho, el crecimiento tumoral por sí solo no causa que una neoplasia pueda llegar a ser maligna. Las células tumorales malignas migran a través de los bordes de los tejidos y tienen la capacidad de sobrevivir y crecer entre una población de células diferentes al tejido donde se han originado. La verdadera amenaza del tumor maligno es el comportamiento de las células, su propensión a infiltrar y usurpar la estabilidad de las células del órgano o tejido al cual invade.

La fisiología celular normal es un proceso estrictamente regulado, con ciclos de retroalimentación positiva y negativa, que deciden si una célula debe diferenciarse, dividirse, adaptarse, o llevar a cabo la apoptosis. Los cambios genéticos, como la activación de oncogenes, incremento en la producción de factores de crecimiento, la pérdida de citocinas inhibitorias del crecimiento, o pérdida de la función de los genes supresores de tumores, pueden resultar en un desequilibrio en la regulación del crecimiento, llevando a la proliferación incontrolada. Sin embargo, sin restricciones el crecimiento tumoral por sí mismo no causa metástasis, se necesita adicionalmente que existan mutaciones genéticas para que generen proliferación descontrolada. Los defectos genéticos durante el cáncer se traducen en alteraciones proteómicas en las vías de transducción de señales. El resultado de estos trastornos es un persistente estado patológico de comunicación entre las células tumorales. Las células tumorales que exitosamente invaden y generan metástasis son seleccionadas debido a la progresión genética somática, lo que resulta en un circuito de comunicación alterada que conlleva a una fuerte inducción de la invasión y la supervivencia. (Pierobon *et al.*, 2007)

Los genes que son necesarios para ciertas funciones, como la remodelación vascular, pueden participar en la generación del tumor primario y en propiciar el ambiente metastásico; estos son genes de progresión de la metástasis los cuales pueden ser sobre expresados en tumores primarios. Se han descrito cerca de 18 genes derivados de una selección *in vivo* de células de cáncer de mama, los cuales se diseminan de manera eficiente hacia los pulmones, entre los que se incluyen EREG (Epiregulina), COX-2 (Ciclooxigenasa 2), BRCA1 (Cáncer de mama de inicio temprano 1), HER2, y MMP-1 (Metaloproteínasa de matriz-1). Estos genes cooperan en la

remodelación de la vasculatura en sitios donde se establece un tumor mamario y de metástasis en pulmón. En la mama estos genes permiten neoangiogénesis e intravasación de células cancerosas, en el pulmón median la extravasación de células cancerosas circulantes a los capilares del parénquima (Chiang y Massagué., 2008).

Cuando un tumor primario crece, necesita un suministro de sangre para desarrollarse y apoyar a sus necesidades metabólicas, esto sucede mediante un proceso llamado angiogénesis. Estos nuevos vasos sanguíneos también pueden proporcionar una ruta de escape por la cual las células pueden dejar el tumor y entrar en el sistema circulatorio, este proceso es conocido como intravasación. Las células tumorales también pueden pasar al sistema circulatorio indirectamente a través del sistema linfático. Las células necesitan sobrevivir en la circulación sanguínea hasta que puedan establecerse en un nuevo órgano o tejido, aquí las células tumorales pueden extravasarse de la circulación a los tejidos circundantes. Una vez en el nuevo sitio, las células deben iniciar y mantener el crecimiento para formar micrometástasis pre angiogénicas, este crecimiento deberá mantenerse mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para formar un tumor macroscópico (MacDonald y Chambers., 2002).

2. ANTECEDENTES.

2.1 UNIONES ESTRECHAS Y REGULACIÓN HORMONAL

Estudios recientes han mostrado diversos efectos del estradiol en la regulación de las uniones estrechas y en la expresión de moléculas que conforman el complejo ocluyente, así como el efecto en la permeabilidad paracelular de células de endotelio vascular (HECV). Esta línea celular expresa la isoforma del RE α pero no expresa la isoforma β . Estos resultados mostraron efectos bifásicos en la permeabilidad paracelular y cambios en la expresión de diferentes proteínas componentes del complejo ocluyente. El estradiol induce efectos bifásicos sobre las uniones estrechas de manera dependiente de la concentración y del tiempo, a una concentración de 1nM y 100nM, se observa una clara disminución de los niveles de expresión de ocludina y un incremento de la permeabilidad paracelular de las células HECV, pero a una concentración 1×10^{-12} M este efecto es revertido, disminuye la permeabilidad paracelular e incrementan los niveles de expresión de ocludina (Lin; 2003).

El estradiol puede inducir una amplia gama de efectos dependiendo del tipo celular y del tejido. Este puede actuar a través de dos posibles mecanismos, el primero es la tradicional vía genómica, por la cual el estradiol actúa como un ligando que se une a su respectivo receptor y funciona como un factor de transcripción que regula la expresión de algunos genes. El efecto de esta vía usualmente toma horas o días para ser efectiva. El segundo mecanismo, la vía no genómica, ocurre rápidamente y a través de una serie de pasos envueltos en procesos de señalización: i) activación del receptor de estrógenos, ii) fosforilación en residuo de tirosina por una tirosina cinasa en ocludina y ZO-1 que resulta en la disociación del citoesqueleto y redistribución del complejo de proteínas (Radhakrishna y Akshas., 2002).

2.2 UNIONES ESTRECHAS EN REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.

Las TJ juegan un papel un papel fundamental en la organización de diversos procesos como la morfogénesis, la polaridad de la célula, la proliferación y la diferenciación, para lo cual se requieren la coordinación de las señales que se generan desde la membrana plasmática. Diversas evidencias sugieren que las TJ son una plataforma para el inicio de la señalización intracelular coordinada (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003); sin embargo, no se sabe con precisión como es que la activación de las vías de señalización por las TJ puede influir en la morfogénesis en algunos procesos cancerosos.

Algunos factores de transcripción son reguladores multifuncionales de la expresión génica y se les ha propuesto como promotores de proliferación, tal es el caso del factor de transcripción ZO-1-proteína asociada con ácidos nucleicos (ZONAB), el cual ha mostrado la capacidad de modular la densidad celular de la línea MDCK (células de riñón de perro). Uno de los mecanismos propuestos es la unión de ZONAB con el inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa-4 (CDK4), lo cual genera el secuestro de CDK4 en el citoplasma y la consecuente reducción de la misma en el núcleo, la regulación de la localización de CDK4 es una de las vías por las cuales ZO-1 y ZONAB regulan la transición entre la fase G1/S del ciclo celular. Se han mostrado evidencias de que el complejo ZO-1/ZONAB regula la progresión del ciclo celular, especialmente en la transición G1/S en células epiteliales por dos mecanismos: regulación transcripcional del ciclo celular y por factores de replicación del ADN. Algunos experimentos sugieren que la sobreexpresión de ZONAB induce la

regulación positiva de varios componentes que participan en la replicación (RFC 40 y los factores que permiten la replicación) o en la remodelación de la cromatina (histona H4 y grupo de proteínas de alto peso molecular HMG-I). El antígeno nuclear de proliferación (PCNA) es un factor esencial de replicación en eucariontes, que es de suma importancia para llevar a cabo los procesos de reparación del ADN. Además, su promotor puede ser transcripcionalmente regulado por diferentes oncoproteínas y factores de transcripción, tal como la oncoproteína del adenovirus E1A, adenosina cíclica monofosfato (AMPC), el factor de transcripción RFX1, las proteínas supresoras de tumores p107, p53 y E2F. ZONAB se une al promotor de PCNA en una región identificada entre los sitios de unión de p53, E2F y ATF con lo que ZONAB unido al promotor puede regular de manera positiva o negativa la expresión de PCNA (Sourisseau y Balda., 2006).

La ciclina D1 activa a CDK4 y CDK6, y por lo tanto promueve la transición de la fase G1/S y ZONAB también se une a CDK4, lo que sugiere que la translocación nuclear del complejo ZONAB/CDK4 resulta en la regulación positiva de la expresión de ciclina D1 y por tanto, una mayor estimulación de la cinasa. Adicionalmente a esto, actualmente se ha identificado un nuevo sitio regulatorio (Y-box) en el promotor del gen que codifica para la ciclina D1 en el cual la interacción de ZONAB conlleva a la regulación transcripcional de dicho gen. La expresión inducida por ZONAB sugiere que las TJ pueden generar un entrecruzamiento de señales ("cross talk") con la matriz extracelular y las vías de adhesión célula a célula para regular la proliferación de la célula (Sourisseau y Balda., 2006).

Otro ejemplo de la forma en que actúan ZONAB y ZO-1 para regular la expresión del proto oncogén HER-2, establece que la proteína ZO-1, al no contar con dominios de unión al ADN, tiene la capacidad de interaccionar con la proteína ZONAB, la cual se une directamente al ADN por medio de motivos de zinc presentes en esta proteína. Esta unión conlleva a la inducción de la transcripción del gen HER-2, el cual está relacionado con actividades de proliferación y diferenciación (Balda y Matter; 2000). HER-2 tiene un papel determinante en algunos tipos de cáncer en cuanto a la expresión o activación particular de algunos factores de crecimiento y de proliferación celular, además de que su expresión está alterada en algunos tipos de tumores epidérmicos. Estudios clínicos han demostrado su importancia en la progresión del tumor activando diferentes vías de señalización que inducen la expresión de ciertas proteínas reguladoras de proliferación celular. Este receptor ha sido intensamente estudiado por su importancia en el cáncer

y como blanco terapéutico. Algunos inhibidores de receptor HER-2 han sido probados generando buenos resultados, pero con ciertas limitantes (Hynes y Lane., 2005).

2.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLECULAS DEL COMPLEJO OCLUYENTE

Los componentes de las TJ interactúan con diferentes moléculas de transducción de señales como las proteínas G (Bazzoni y Dejana 2004; González-Mariscal *et al.* 2008), y en general con moléculas que regulan el crecimiento celular y la supervivencia. La proteína ZO-1, junto con sus proteínas homólogas ZO-2 y ZO-3, son miembros de las cinasa homólogas al guanilato asociado a la membrana (MAGUK)(Bazzoni y Dejana 2004; Katsuno *et al.*, 2008), las cuales presentan un dominio de unión a Zona Occludens (PDZ) en el C terminal y la región 3 de homología a src (SH3). Los dominios PDZ son conocidos para mediar el anclaje de proteínas transmembranales con actinas corticales del citoesqueleto (Balda y Anderson 1993).

ZO-1 se localiza en el núcleo de células en migración en ausencia de TJ o cuando las TJ no están completamente desarrolladas (Gottardi *et al.*, 1996). Del mismo modo, ZO-2 es capaz de trasladarse desde el citoplasma al núcleo, donde puede influir en la transcripción genética y el comportamiento de la célula (Traweger *et al.*, 2008).

En otros sistemas, la pérdida de la función por mutación de las proteínas MAGUK en *Drosophila* conlleva a un fenotipo de crecimiento excesivo, lo que sugiere que estas proteínas participan en la señalización de las uniones célula a célula para regular la inhibición de crecimiento por contacto (Woods y Bryant, 1991).

La localización de ZO-1 en las TJ se encuentra alterada en células tumorales, y la expresión en mutantes que carecen de esta proteína en células epiteliales, genera la transición epitelio mesénquima. Recientemente, se ha demostrado que cuando las células están en confluencia, ZONAB interactúan directamente con un miembro de la familia Ras, RalA, lo cual conlleva la des-represión de promotores de genes blanco que normalmente eran reprimidos por ZONAB en células no confluentes (Frankel *et al.*, 2005). La interacción de ZONAB con ZO-1 también ha sido propuesta para eliminar la represión transcripcional por minimizar la localización nuclear de ZONAB. Curiosamente, la proteína oncogénica Ras revierte la represión transcripcional de ZONAB (Frankel *et al.* 2005) a través del entrecruzamiento multilateral de las proteínas de las TJ con otras vías de señalización.

Diversas proteínas de las TJ están relacionadas con la organización de la transducción de señales. Por ejemplo, el mecanismo en el cual la interacción de la proteína ZO-1 de las TJ con el factor de transcripción ZONAB regula la expresión del proto oncogén HER-2. El mecanismo establece que la proteína ZO-1 al no contar con dominios de unión al ADN tiene la capacidad de interactuar con la proteína ZONAB, la cual se une directamente al ADN por medio de motivos de zinc presentes en esta proteína, lo cual conlleva a la inducción de la transcripción del gen HER-2 (Itoh y Bissell; 2003).

3. JUSTIFICACIÓN.

El papel del estradiol en la regulación de la progresión del cáncer de mama ha sido estudiado ampliamente; sin embargo, no se ha demostrado su participación en la regulación de la expresión y la localización de los componentes de las uniones estrechas. Estos hallazgos, en conjunto, nos llevaron a plantear el presente trabajo de investigación que busca entender los mecanismos mediante los cuales el estradiol promueve la motilidad y la subsecuente metástasis de las células de cáncer de mama. Los resultados permitirán entender los procesos moleculares y con base en ellos se podrán plantear nuevos blancos terapéuticos para contrarrestar esta enfermedad en etapas tempranas, cuando las células cancerosas pierden las interacciones célula a célula. Por lo que entender la participación del estradiol en la transición epitelio-mesénquima de las células de carcinoma mamario humano permitirá utilizar mejor las terapias antineoplásicas existentes y diseñar otras con mayor especificidad.

4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del Estradiol sobre los cambios en la expresión y localización de las proteínas asociadas a TJ, activación e interacción de c-Src/ZO-1, así como cambios en la migración en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar el efecto del estradiol en la expresión de las proteínas del complejo ocluyente (ZO-1, ZONAB y ocludina) a diferentes tiempos y concentraciones, en las células de carcinoma mamario humano MCF-7.
- Determinar el efecto del estradiol en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB a diferentes tiempos y concentraciones, en las células de carcinoma mamario humano MCF-7.
- Analizar el efecto del estradiol en la activación de c-Src y asociarla con cambios en la localización de ZO-1 y ZONAB en células MCF-7.
- Analizar el efecto del estradiol sobre la activación de c-Src (Tyr⁴¹⁶) en células MCF-7.
- Analizar el efecto del estradiol sobre la activación de c-Src-Tyr⁴¹⁶, la formación del complejo ZO-1/p-Src Tyr⁴¹⁶ y la migración en cultivos de células MCF-7 de cáncer mama humano.
- Analizar el efecto del estradiol sobre los cambios en la migración de células MCF-7.

5. HIPÓTESIS

- Si el estradiol induce cambios en la expresión y localización de ZO-1 y ZONAB, mediados por la activación de c-Src y la consecuente formación del complejo Src-Tyr⁴¹⁶/ZO-1, entonces la migración de las células de cáncer de mama humano MCF-7 se incrementarán.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Reactivos. Las células de carcinoma mamario humano MCF7 (positivas a los receptores ER α , ER β y HER-2) se obtuvieron de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) se adquirió de Life Technologies, (Gaithersburg, MD). El suero de feto bovino (SFB) se adquirió de Gibco BRL, (Gaithersburg, MD). El kit de extracción de RNA RNeasy® fue adquirido de QIAGEN (GE LifeSciences). Los reactivos de la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se adquirieron de Promega, (Madison, WI). El reactivo de Bradford se adquirió de BioRad, (Hercules CA). El antibiótico antimicótico y se adquirió de Life Technologies, (Gaithersburg, MD). 17 β -estradiol y cytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride (inhibidor selectivo de la síntesis de ADN que no inhibe la de RNA) fueron comprados en Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Las fuentes de otros reactivos están enumerados a continuación son de la más alta pureza. Los anticuerpos fueron adquiridos de Santa Cruz de Biotecnología (Santa Cruz, CA) y CellSignal Technology (Beverly, MA).

6.2 Cultivo de células. Las células MCF-7 se cultivaron en DMEM que contenía SFB al 10 % hasta generar una monocapa. 24 horas antes de los tratamientos las células se incubaron con DMEM, sin rojo fenol, con SFB al 2.5% tratado con carbón-dextran (SBFC), L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (100 mM), piruvato de sodio (100 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y antimicótico anfotericina B (250 ng/ml). Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. En todos los experimentos las células se cultivaron en alta confluencia.

6.3 Tratamientos - Las células se incubaron con los siguientes tratamientos: E2 1 nM, se utilizó etanol como vehículo, la cicloheximida (CHX) se utilizó a una concentración de 12.5 μ g/mL; el antagonista ICI del RE fue utilizado a una concentración de 100 nM. Las incubaciones se realizaron en diferentes periodos de tiempo: 0, 15, 30, 60 minutos y 3, 6, 9 y 24 horas.

6.4 Análisis de expresión por RT-PCR. Para analizar la expresión de ZO-1, ZONAB, ocludina y HER-2, se sembraron (6×10^6 células por caja de cultivo) (Corning) hasta alcanzar alta confluencia, para después ser incubadas con E2 en las concentraciones y periodos de tiempo descritos anteriormente. La extracción de ARNm se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante

(QUIAGEN). La transcripción reversa se realizó con el fin de obtener el ADNc para ocludina, ZO-1, ZONAB y HER-2. Los cebadores fueron diseñados mediante el software (Primer Quest) para ZO-1 (NM_175610.2) sentido 5' ATGGTGGCGCTGAAAGAAGCA 3', antisentido 5' AATTGGTTGTGGCTGCGCTT 3', ZONAB (NM_003651.3) sentido 5' TGCAGAAGCTGCCAATGTGA 3' antisentido 5' ATGAACCGGTCCCTGAAGTT 3', Ocludina (NM_002538.2) sentido 5' TTTTCATTGCCGCGTTGGTGA 3' antisentido 5' TACAATGGCAATGGCCTCCT 3' y HER-2 (NM_001005862.1) sentido 5' GTG GGG CGC CCC A GG CAC CA 3' antisentido 5' CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'.

6.5 Ensayo de Western blot. Las células tratadas se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 100 mM NaF, 0,2 mM NaVO₃, 1 ug / ml de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 g / ml de leupeptina). Los homogeneizados celulares se incubaron a 4 ° C durante 5 a 10 min y se centrifugaron a 22.000 xg, 4 ° C, durante 20 min. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó usando el reactivo comercial de Bradford (27). Los lisados celulares se separaron en geles al 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Invitrogen) y se probaron con anticuerpos anti-ZO-1, anti-ZONAB, anti-Ocludin, anti-p-HER (Tyr 877), anti -pc-Src (Tyr 216), anti-c-Src (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o anti-HER-2 (Cell Signaling, Beverly, MA). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano anti-ratón y anti-cabra IgG (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Después de tres lavados consecutivos, las membranas fueron reveladas utilizando un reactivo comercial quimiolumincente (Supersignal; Pierce).

6.6 Localización subcelular de ZO-1 y ZONAB. Las células MCF-7 fueron tratadas con E2 1 nM (durante 15, 30 y 60 minutos). Después del tratamiento, se aislaron las proteínas nucleares y citoplasmáticas con los buffers de extracción (Thermo Scientific Pierce, Rockford IL), que contienen 1% del inhibidor de proteasa (Pierce), fluoruro de sodio a una concentración de 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 1 mM (PMSF), y 50 mM ortovanadato de sodio de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se cuantificó la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford y 25 µg de proteína nuclear y citoplasmática se separaron en geles de poli(acrilamida)-SDS al 10 % (Invitrogen, Grand Island, NY), se transfirió a membranas de PVDF (Invitrogen), y se probaron con anticuerpos anti-ZO-1 y anti-ZONAB, se utilizó anti-actina en las fracciones citoplasmáticas y anti-histona H1 en las fracciones nucleares por su expresión constitutiva. Las membranas se incubaron

con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra en función del origen del anticuerpo primario. Las bandas inmunorreactivas se identificaron con los reactivos de detección ECL-Plus Western Blot (GE Healthcare). La igualdad de carga fue demostrada al incubar las mismas membranas con anticuerpos anti-actina, como control de normalización (NeoMarker, Fremont CA).

6.7 Ensayo de Inmunofluorescencia. Después de los tratamientos las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, y permeabilizadas con 0.01% de Triton X-100 durante 30 minutos, posteriormente se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos anti-ZO-1, anti-ZONAB, anti-CRB-3, anti N-cadherina y anti-p-Src (1: 500), seguido por otra incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario (FITC-anti-conejo, dilución 1:200), (Rodamina-anti-cabra dilución 1:200), (Rojo Texas-anti-ratón dilución 1:150) para teñir el ADN y marcar el núcleo se utilizó DAPI (10 ng / ml) o yoduro de propidio (10ng/mL). Las células se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (LSM-780, Carl Zeiss).

6.8 Inmunoprecipitación y Western Blot. Las células MCF-7 se cultivaron en monocapas una vez tratadas se cosecharon con gendarme y resuspendidas en buffer de lisis (100 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 10 mM de HEPES, pH 7,5, 1 mM de NaVO₄, 25 mM de NaF, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1% de Triton X- 100, desoxicolato sódico al 0,5%, 0,1% SDS e inhibidor de proteasas (Roche, Indianapolis, IN)), se trituró y se centrifugó. La inmunoprecipitación de ZO-1 y p-Src se realizaron por incubación con perlas de proteína-A unida a Sefarosa durante toda la noche a 4°C. Las perlas fueron centrifugadas y lavadas tres veces, después se eluyeron en buffer de carga para geles de SDS-PAGE. Las muestras fueron transferidas en un Western Blot y reveladas como se ha descrito con anterioridad.

6.9 Ensayo de permeabilidad con FITC-Dextran. Las células MCF-7 se crecieron hasta generar una monocapa. Se preparó la solución de FITC-Dextran (1:40) en Medio (DMEM al 5% de SBFC) con los tratamientos E2-1nM y E21nM + ICI 100nM y se incubó durante 1 hora. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñó el ADN con DAPI como marcador nuclear, la muestra se montó en portaobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (LSM-780, Carl Zeiss)

6.1.0 Ensayo de cierre de la herida. Las células MCF-7 de cáncer de mama se incubaron hasta generar una monocapa, se utilizó una punta de 10 μ L para generar una herida en la monocapa, después las células se lavaron con medio para retirar las células desprendidas y posteriormente los cultivos se trataron con E2-1nM. Se utilizó un microscopio de contraste de fase para obtener las imágenes en el inicio del ensayo así como a las 24 y 48 horas.

6.1.1 Análisis estadístico-Todos los ensayos se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes, se presentan como medias $\pm$ DE. La estadística se realizó en GraphPad Prism (San Diego, CA). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 El estradiol induce la fosforilación de Src en la Tyr-416. En recientes trabajos se ha propuesto que c-Src es uno de los principales inductores de la TEM, por lo cual el primer paso fue demostrar que el E₂ puede incrementar significativamente (60%; $p < 0.05$) la fosforilación de Src en la Tirosina 416 (⁴¹⁶Tyr) a los 15 minutos de incubación, efecto que disminuye a los 30 y 60 minutos de incubación. Con el fin de determinar si el efecto sobre la activación de p-Src estaba mediado por el RE α , las células MCF-7 se incubaron con un antagonista de este receptor (ICI), con lo cual la fosforilación de Tyr-416-Src se revirtió desde los 15 hasta los 60 minutos (Fig. 1A).

7.2 Interacción de p-Src con ZO-1. Para demostrar la interacción de p-Src con ZO-1 después del tratamiento de las células MCF-7 con E₂, se inmunoprecipitó la proteína p-Src y posteriormente se incubó con anticuerpos anti-ZO-1 mediante hibridación tipo Western blot. La Figura 1B muestra que p-Src inmunoprecipita con ZO-1 cuando las células se tratan con E₂. Por otra parte, cuando las células fueron tratadas con el antagonista de RE (E₂+ICI) la inmunoprecipitación se vio atenuada. En los controles sin tratamiento (NT) no se observó la banda que se forma con la co-inmunoprecipitación de p-Src con ZO-1. Estos resultados sugieren que, una vez activado p-Src (⁴¹⁶Tyr), se genera el complejo p-Src/ZO-1 y esto favorece la fosforilación de ZO-1, lo que podría ocasionar, al menos parcialmente, la disrupción de las TJ.

7.3 p-Src colocaliza con ZO-1. Con el objetivo de sustentar los resultados anteriores, las proteínas ZO-1 y p-Src fueron colocalizadas mediante microscopia confocal en las células MCF-7 tratadas con E₂. Los paneles de la Figura 1C, muestran la tinción del ADN con DAPI como marcador nuclear (azul), ZO-1 asociado a FIT-C (verde), p-Src-⁴¹⁶Tyr asociado a Rodamina (rojo). Para determinar si las proteínas colocalizan se generó la superposición de las imágenes ("merge" amarillo) en donde se observa que la distribución de ZO-1 y p-Src se presenta en la periferia de la membrana, pero mostrando un claro efecto de deslocalización en un tono amarillo más intenso en la región citoplasmática, lo cual demuestra el inicio de la pérdida de las uniones. Esto sugiere que el E₂ genera cambios en la localización de ZO-1 y la formación del complejo p-Src/ZO-1 en la membrana plasmática, probablemente inducido por la activación de p-Src.

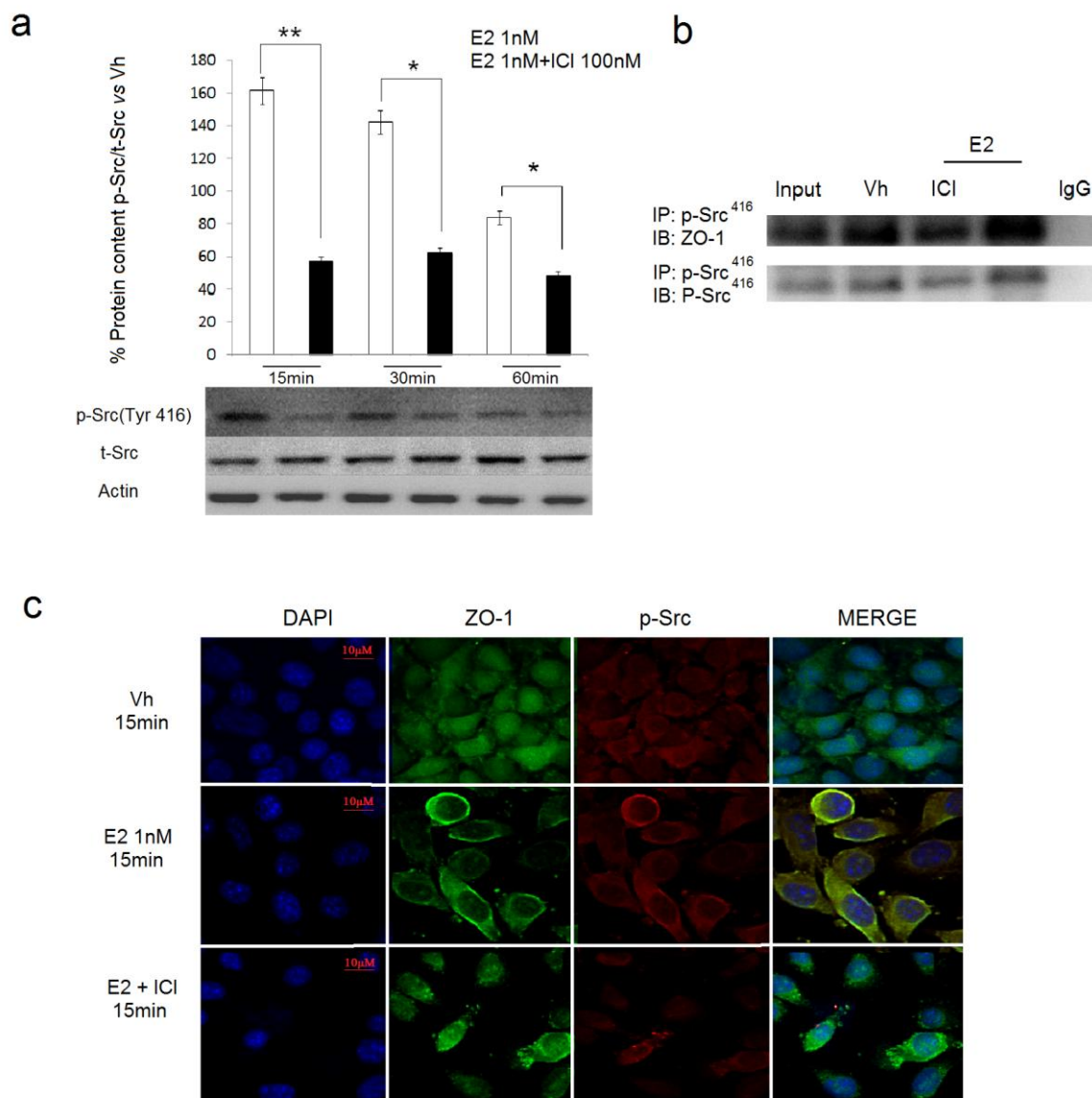


Figura 1. – El estradiol induce la fosforilación de Src-⁴¹⁶Tyr y la formación del complejo p-Src/ZO-1 en las células MCF7. El E₂ estimula de manera significativa la fosforilación de Src-Tyr-416 (barras blancas), el tratamiento con ICI, antagonista del receptor de estrógenos, (barras negras) revierte de manera significativa el efecto del E₂ (Panel A). Una vez activada la cinasa p-Src interactúa con ZO-1 formando un complejo p-Src/ZO-1 como lo demuestra el panel B la cual muestra la coimmunoprecipitación de ambas proteínas a partir de los 5 hasta los 15 minutos de incubación con E₂ en la imagen también se muestra ZO-1 y p-Src con vehículo (Vh) como testigo. Para corroborar la formación del complejo p-Src/ZO-1 se determinó la colocalización de ambas proteínas mediante estudios de Inmunofluorescencia (Panel C) mostrando la colocalización de p-Src/ZO-1 a los 15 minutos de incubación. Las micrografías muestran el marcaje del núcleo con DAPI (Azul), ZO-1 acoplado a FITC (Verde), p-Src acoplado con Rojo Texas (Rojo) y la superposición de imágenes

(MERGE) en amarillo. * $p < 0.05$ comparado con $E_2 + ICI$, ** $p < 0.01$ comparado con el efecto a 60 minutos

7.2 Las proteínas ZO-1 y ZONAB se translocan al núcleo por efecto del E_2 . Para demostrar que el tratamiento con E_2 genera la deslocalización ZO-1 y ZONAB de la periferia de la membrana e induce su relocalización al núcleo, se realizó la extracción diferencial de las fracciones nuclear y citoplasmática de las células MCF-7, en ausencia o presencia del E_2 , en donde se observó un aumento significativo (47%; $p < 0.05$) en la localización nuclear de ZO-1 después de 15 minutos (Fig. 2A) con un efecto máximo a los 60 minutos (87%; $p < 0.05$). Por otra parte su localización citoplasmática disminuyó a partir de los 15 minutos, teniendo efecto máximo a los 60 minutos (23%). La proteína ZONAB también cambió su localización de la periferia de la membrana hacia al núcleo (Fig. 2B) desde los 15 minutos (95%; $p < 0.05$) con efectos máximos a los 30 minutos de (105%; $p < 0.05$) y disminuyendo a los 60 minutos (61%), en contraparte en la fracción citoplasmática disminuyó de manera significativa a partir de los 30 minutos teniendo el máximo efecto (45%; $p < 0.05$) a los 60 minutos.

7.2.1 Las proteínas ZO-1 y ZONAB se localizan en el núcleo. Con el objeto de corroborar los datos de translocación nuclear obtenidos por la técnica de Western blot, se procedió a analizar su localización mediante microscopia confocal. La figura 2C muestra una serie de micrografías en donde se observa el marcaje nuclear con DAPI (azul), ZO-1 asociado a FITC (verde), ZONAB asociado a rodamina (rojo) y la colocalización analizada mediante superposición de las tres imágenes con el MERGE (blanco). En la imagen muestra la localización de dichas proteínas cuando éstas son tratadas con Vehículo (EtOH), E_2 (1nM) y $E_2 + ICI$ (100nM). La imagen muestra claramente la pérdida en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB de la periferia de la membrana y su localización principalmente nuclear después del tratamiento con E_2 . En contraparte, cuando son tratadas con $E_2 + ICI$ la inducción de la translocación se revierte. Cuando las células se incuban con vehículo (Vh) no se observan cambios en la distribución celular de las proteínas ZO-1 y ZONAB.

7.2.2 El estradiol induce la translocación nuclear de ZO-1 cuando las células MCF7 se cultivan en baja confluencia. Evidencias recientes sugieren que la localización de ZO-1 depende de la densidad celular (Yanfang Guan, 2011), por lo cual se realizaron estudios para determinar que

la translocación de la proteína ZO-1 es inducida por E₂, en cultivos de células MCF7, tanto en alta como en baja confluencia (Fig. 2D). Los paneles de la figura 2E muestran el marcaje del ADN con ioduro de propidio (PI) (rojo) como marcador nuclear, ZO-1 asociado a FITC (verde) y la superposición de las imágenes (“merge”, amarillo). En las imágenes en superposición se observa la presencia de ZO-1 nuclear cuando las células son tratadas con E₂ a baja confluencia, en contraste con el testigo, en donde se observa claramente la localización citoplasmática de ZO-1 con nula presencia nuclear. Cuando se incuban las células con E₂+ICI, se revierte el efecto inducido por el E₂.

7.2.3 Análisis de la localización de ZO-1 y ZONAB en el núcleo mediante reconstrucción tridimensional “Z-stack”. Con la finalidad de corroborar la colocalización nuclear de ZO-1 y ZONAB se generó la reconstrucción tridimensional (Z-stack) mediante el software del microscopio confocal (LSM-780, Carl Zeiss). En el video 1 (material suplementario 1) se muestra la reconstrucción tridimensional de la localización de ZO-1 (verde), ZONAB (rojo) y el marcaje nuclear con DAPI (azul), donde se corrobora la presencia de ambas proteínas dentro del núcleo en células MCF-7 tratadas con E₂. En el video 2 (material suplementario 2) se observa que la incubación con etanol (vehículo) no induce la translocación de ZO-1 y ZONAB al núcleo.

7.2.4 La permeabilidad paracelular es incrementada por E₂. Una de las consecuencias de la deslocalización de las proteínas componentes del complejo ocluyente es la pérdida de las interacciones células-célula y el incremento en la permeabilidad paracelular. Con el objeto de determinar el efecto del E₂ sobre la permeabilidad de las células MCF-7 se obtuvieron las imágenes de microscopia confocal marcando el núcleo con DAPI (azul) y la solución FITC-Dextran (verde) en ausencia o presencia del E₂ y en combinación con ICI. La figura 2E sugiere que el E₂ incrementa la permeabilidad del reactivo FITC-Dextran en comparación con el testigo, mientras que el tratamiento con ICI revierte el efecto del E₂.

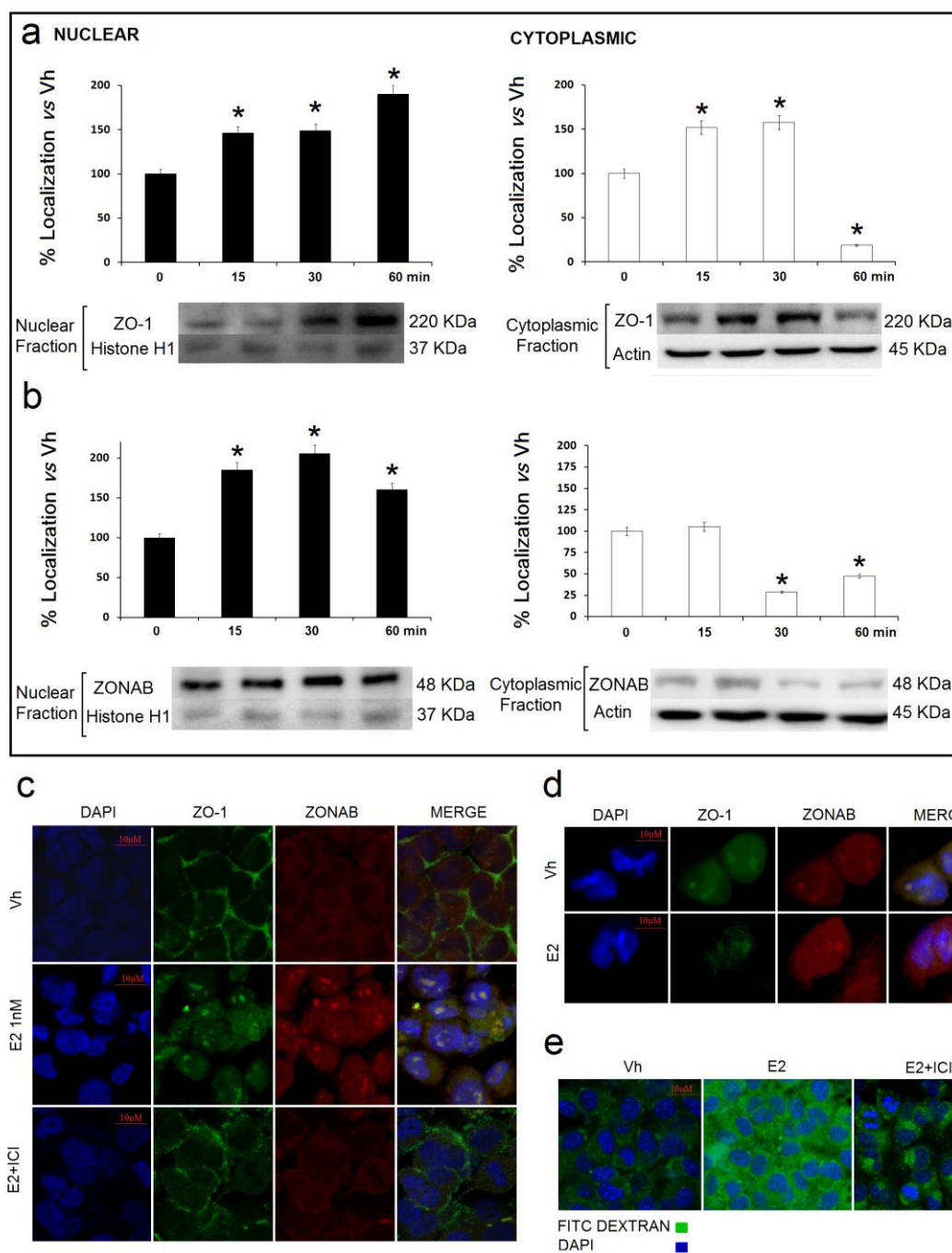


Figura 2. El E2 induce la translocación nuclear de ZO-1 y ZONAB. La figura muestra el cambio en la localización nuclear (barras negras) y citoplasmática (barras blancas) de las proteínas ZO-1 (Panel A) y ZONAB (Panel B). Las concentraciones de proteína se normalizaron con respecto a la proteína actina en las fracciones citoplasmáticas e histona H1 en las fracciones nucleares. Las barras representan tres experimentos separados, SD. * $P < 0,05$ con respecto al vehículo (etanol). La localización de ZO-1 y ZONAB se analizó mediante la técnica de inmunofluorescencia donde el

núcleo se tiñó con DAPI (azul), ZO-1 (verde) y ZONAB (rojo) (Panel C). Las células MCF-7 fueron cultivadas en alta confluencia (Panel C) y baja confluencia (Panel D). Se generó la reconstrucción en 3D con cortes en el plano z (Z-stack), mediante el software del microscopio confocal (LSM-780, Carl Zeiss). La incubación de las células MCF7 con FITC-Dextran en presencia del E₂ incrementó la permeabilidad en una monocapa de células (Panel E), efecto revertido con el antiestrógeno ICI.

7.3 E₂ incrementa la expresión de HER-2 vía ZO-1 y ZONAB. Debido a los antecedentes de Balda y colaboradores; 2000, en donde demuestran que ZO-1 y ZONAB tienen la capacidad de regular la expresión de HER-2, decidimos evaluar si la pérdida de la unión de ZO-1 y ZONAB en las uniones estrechas y su translocación nuclear, inducida por E₂, tiene efecto sobre la síntesis del mRNA que codifica para HER-2. La figura 3A muestra que la incubación de las células MCF7 con E₂ incrementa de manera significativa (65%) la expresión del RNAm de HER-2 en un periodo corto (3 horas), disminuyendo posteriormente (6 horas); sin embargo, quedaba la duda que el E₂ pudiera inducir la síntesis del mRNA de HER-2 induciendo la síntesis *de novo* de factores de transcripción incluyendo ZO-1 y ZONAB. Por tal motivo, se determinaron los cambios en la expresión de HER-2 en células MCF-7 en ausencia y presencia de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas, con lo que el efecto sería de las proteínas ZO-1 y ZONAB pre-sintetizadas y desensambladas de la membrana. La incubación con E₂ + CHX presenta resultados similares en la expresión de HER-2 con respecto al tratamiento con E₂, pero solamente en periodos cortos de incubación (Fig. 3B), ya que la expresión de HER-2 incrementa de manera significativa (250%; $p < 0.05$) la expresión de HER-2 a las 24 horas.

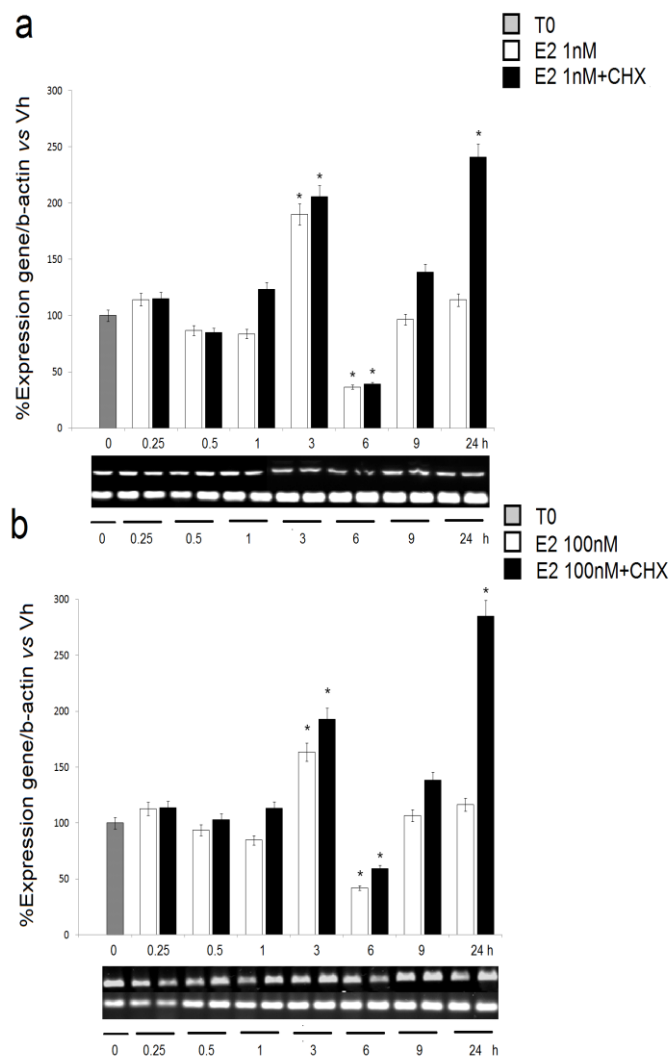


Figura 3. La translocación de ZO-1 y ZONAB se asocia con la síntesis del mRNA de HER-2 inducido por E₂. La figura muestra que E₂ 1nM incrementó de manera significativa la expresión del mRNA de HER-2 a las 3 horas de incubación (Panel A). El incremento en la expresión de HER-2 en periodos cortos de tiempo no depende de la síntesis *de novo* de proteínas debido a que en presencia de cicloheximida (CHX) no hay diferencias significativas (Panel B). La expresión de HER-2 disminuye a las 6 horas, efecto que tampoco depende de la síntesis *de novo* de proteínas. A las 24 horas de incubación el uso de la combinación E₂ + CHX incrementó significativamente la expresión de HER-2. Tiempo cero (barras grises). Las gráficas representan el promedio de los resultados de tres experimentos independientes $\pm$ DE. * $p < 0,05$ con respecto al vehículo

7.4 El E₂ induce disminución en la expresión del marcador epitelial CRB3. Como parte del proceso de TEM, la pérdida de los marcadores epiteliales fue uno de los fenómenos a analizar. Contrario a lo observado, en células MCF-7 se observó que el E₂ incrementó de manera significativa (99%) la expresión de CRB3 a las 24 horas de incubación (Fig. 4A) y posteriormente disminuyó gradualmente hasta las 96 horas, en donde se observó el efecto máximo de inhibición (59%) con respecto al vehículo. Con el objeto de corroborar la pérdida del marcador epitelial y el incremento en el mesenquimal, se analizó la expresión de N-cadherina, la cual aumenta gradualmente hasta las 72 horas de incubación (Figura 4B). Estos resultados se corroboraron mediante microscopia confocal y en la figura 4C se muestra que en el estado inicial (T0) CRB3 está distribuido en la periferia de la membrana, mientras que la presencia de N-cadherina es muy baja, con distribución irregular. Cuando las células MCF-7 fueron con E₂ durante 96 horas, la expresión de CRB-3 disminuyó drásticamente en la membrana plasmática, mientras que la expresión de N-cadherina se incrementó y su localización fue más definida.

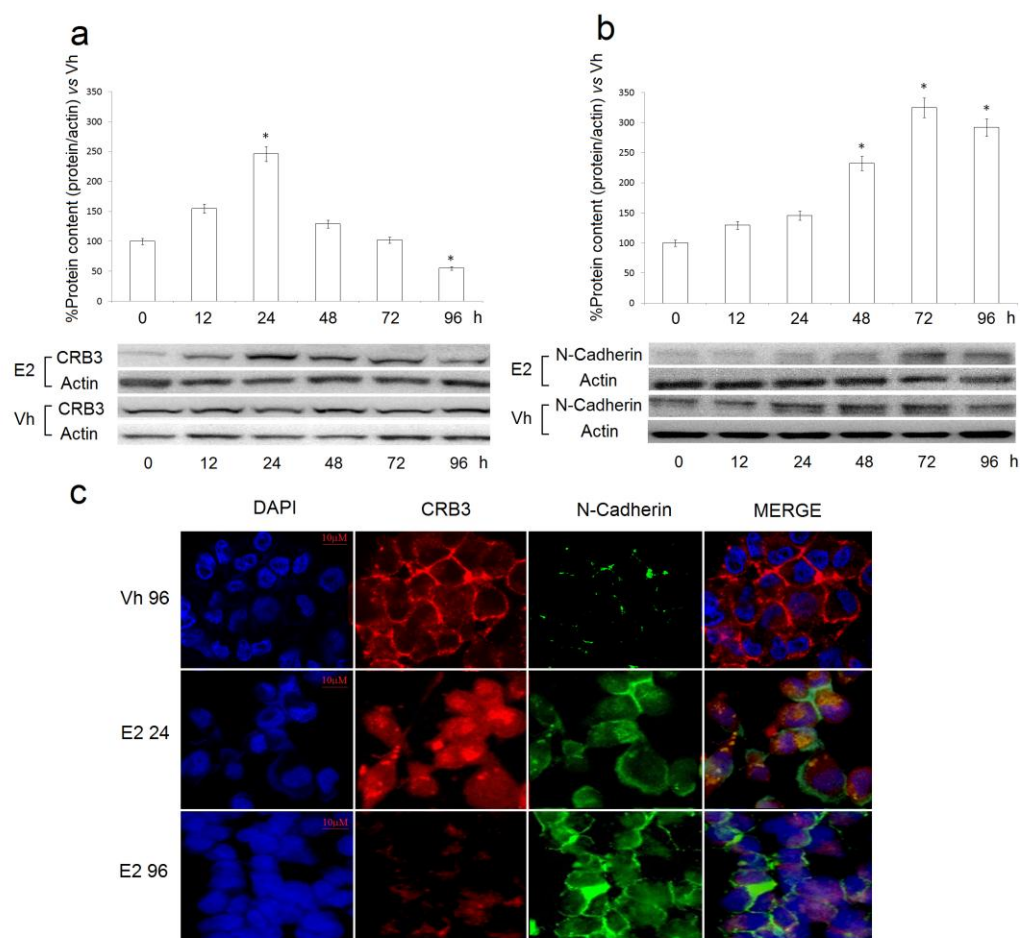


Figura 4. El E₂ induce disminuye el marcador epitelial (CRB3) e incrementa el marcador mesenquimal (N-cadherina). Las gráficas muestran el cambio (porcentaje) de expresión de la proteína CRB3 (Panel A) y de N-cadherina (Panel B). Las concentraciones de proteínas se normalizaron con respecto a la proteína actina. Las barras representan tres experimentos independientes, y se graficó el promedio $\pm$ DE. * $p < 0,05$ con respecto al vehículo (etanol). Estos resultados fueron corroborados mediante inmunolocalizaciones por microscopia confocal (Panel C) donde se observa el marcaje nuclear con DAPI (azul), CRB-3 asociado a rodamina (rojo), N-cadherina asociado a FITC (verde) y la superposición de imágenes “merge”.

7.5 El E₂ incrementa la expresión de ZO-1. Con el fin de determinar si E2 inducía cambios en la expresión de ZO-1 y ZONAB analizamos su efecto sobre el mRNA y la proteína. La figura 5A muestra que el E₂ duplica la síntesis del mRNA que codifica para ZO-1 a los 15 minutos de incubación, mientras que en la expresión de la proteína no se afectó (Fig. 5B), en periodos de 3 a

24 horas el mRNA de ZO-1 se incrementa (200%) a partir de las 6 horas y en esta ocasión la proteína también aumentó (180%) hasta las 24 horas.

7.5.1 El E₂ incrementa la expresión de ZONAB. Al igual que ZO-1, el E₂ también incrementa la expresión de ZONAB tanto en el mRNA como en proteína. En la figura 5C se observa que el E₂ estimuló la síntesis del mRNA que codifica para ZONAB en 90%, a los 30 minutos de incubación, por otra parte la concentración de la proteína no se modificó. En periodos mayores (3-24 horas) el mRNA de ZONAB se incrementó (180%) a partir de las 6 horas y también la proteína, teniendo el máximo aumento (60%) a las 9 horas de incubación con E₂ (Fig. 5D).

7.5.2 El E₂ disminuye la expresión de ocludina. Con el objetivo de determinar si el E₂ genera cambios en la expresión de ocludina, como un efecto de la pérdida del ensamblaje del complejo ocluyente y como marcador de la pérdida de las uniones intercelulares, analizamos la síntesis de su mRNA y proteína. En la figura 5E se observa que la incubación de las células MCF7 con E₂ por 15 a 60 minutos no generó cambios ni en el mRNA ni en la proteína, mientras que la incubación con 1 nM de E₂ por 24 horas ocasionó que la expresión de ocludina disminuya significativamente tanto en el mRNA (50%) como en la proteína (80%) con respecto al testigo (Fig. 5F).

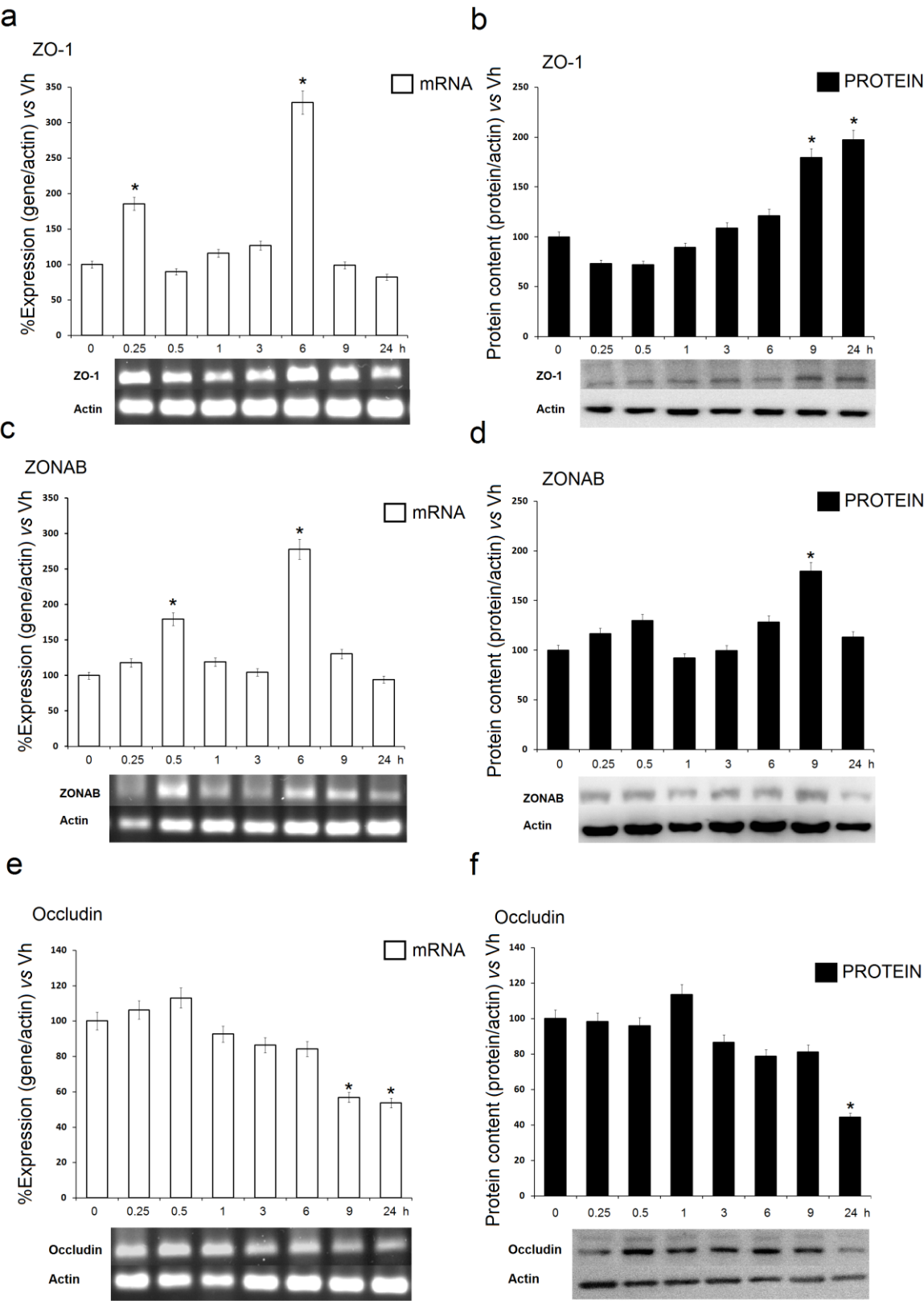


Figura 5. El E₂ regula la expresión de ZO-1, ZONAB y Ocudina. En las gráficas se muestran el efecto de E₂ sobre síntesis del ARNm y la proteína de ZO-1 (Paneles A y B), ZONAB (Paneles C y D) y ocludina (Paneles E y F), en periodos cortos (15 a 60 minutos) o largos (3 a 24 horas) de incubación con 1 nM de E₂. La abundancia relativa del ARNm y de la proteína se normalizó con respecto al ARNm de β -actina y a la proteína actina. Las columnas, representan los promedios de tres experimentos por separados $\pm$ DE. * p <0.05 comparado con el vehículo.

7.6 El E₂ incrementa la migración de las células MCF-7. La deslocalización de las proteínas del complejo ocluyente, la pérdida de las uniones célula-célula y el incremento en la permeabilidad facilitan la migración de las células cancerosas, lo cual se observó mediante un ensayo de “cerrado de la herida” (término en idioma inglés wound healing assay) (Fig. 6A). El tratamiento con 1 nM de E₂ durante 48 horas indujo un efecto estadísticamente significativo en donde la herida se observa completamente cerrada por la migración de las células, comparado con el vehículo en el mismo periodo, mientras que con el uso de un inhibidor de la proliferación (cytosina β -D-arabinofuranosido hidroclicídrico), los resultados son semejantes a los observados con E₂ (Fig. 6B). El efecto del E₂ es revertido con el uso del ICI. Con el objeto de demostrar que el E₂ estimula la motilidad de las células MCF-7 también se analizó la dinámica del citoesqueleto. La figura 6C muestra las células MCF-7 formando los filopodios (amplificación 3X) para llevar a cabo el proceso de migración, donde el marcaje del núcleo se realizó con DAPI (azul) y las unidades de F-actina con faloidina (verde).

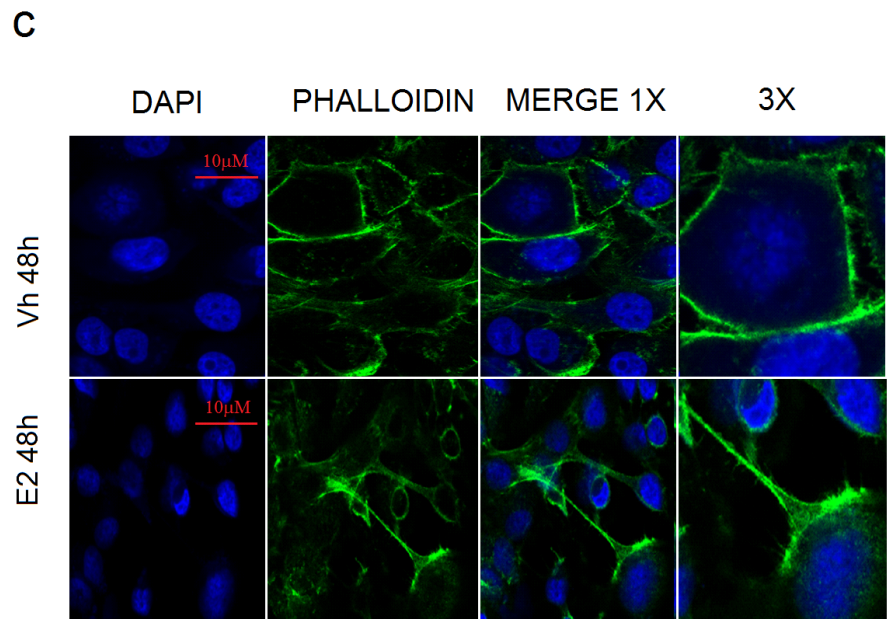
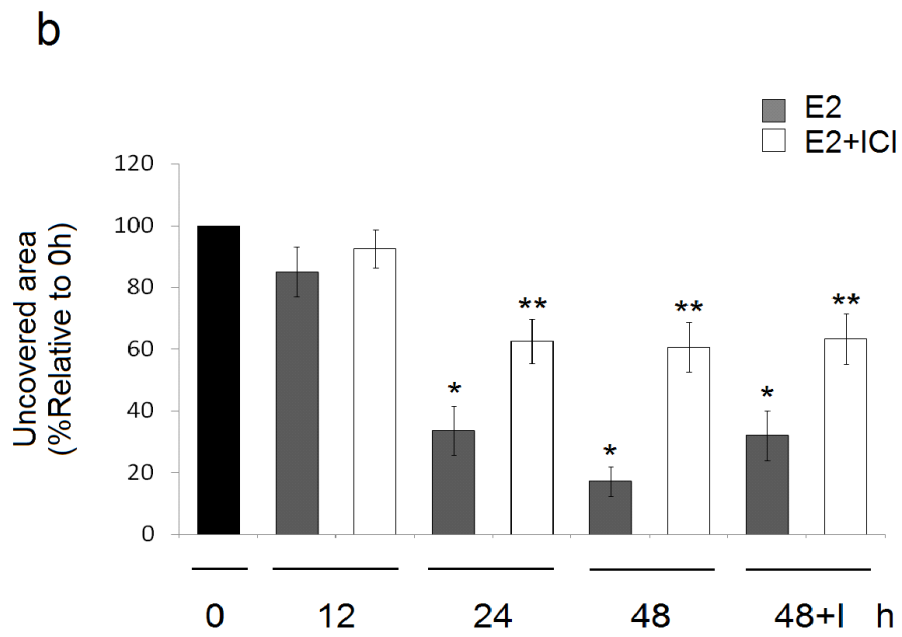
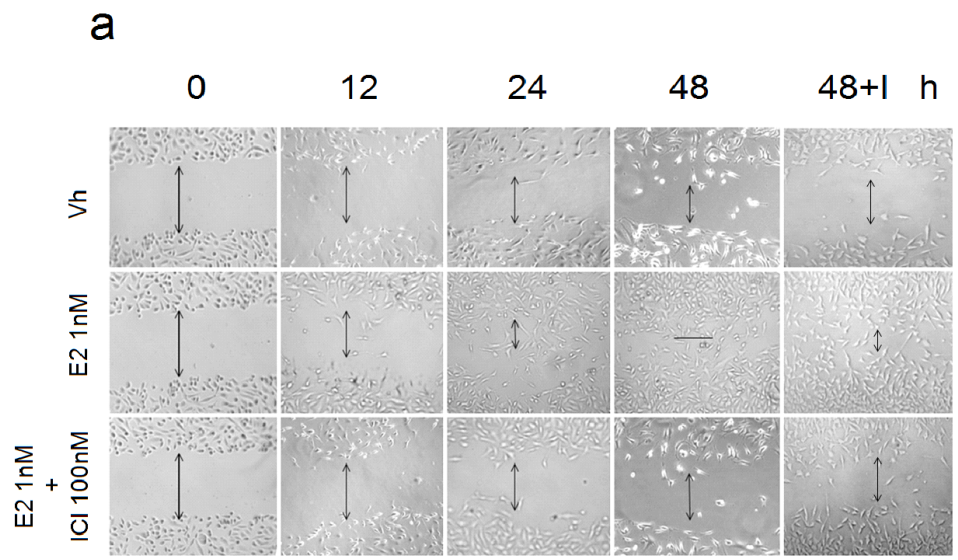


Figura 6. El E_2 induce la migración de las células MCF-7. La figura muestra el efecto de las incubaciones con vehículo (Vh), E_2 y E_2 + ICI en los tiempos cero (T_0), 12, 24 y 48 horas de incubación en un ensayo de cierre de la herida ("wound healing") en donde se puede observar el cambio de la forma y la migración de las células MCF7 hasta cerrar casi por completo la herida ocasionada por una punta sobre la monocapa de células sembradas (Panel A). La migración celular se asocia directamente con la motilidad celular y la dinámica del citoesqueleto por lo cual en el Panel B se observa el marcaje nuclear con DAPI (azul) y la formación de filopodios mediante el marcaje de los filamentos de actina con faloidina (verde).

8. DISCUSIÓN

Los estrógenos son un factor que induce la TEM (Planas-Silva, 2007). Esta acción es particularmente relevante en los tumores de cáncer de mama que son positivos al receptor de estrógenos (RE+) en los cuales este estímulo induce la invasión y la metástasis (Se-Hyung, 2008). Por esta razón, el entender las bases moleculares a través del cual los estrógenos conducen a las células cancerosas a invadir y migrar es uno de los principales blancos por sus implicaciones biológicas y médicas. La pérdida de la adhesión célula-célula es uno de los factores que inducen la TEM, la motilidad celular y en consecuencia la metástasis del tumor. En la actualidad la regulación de este proceso por los estrógenos no es entendida en su totalidad, por lo que en este estudio se revela que el E₂, el estrógeno natural más potente, puede inducir cambios en la expresión y en la localización de las proteínas ZO1 y ZONAB de las TJ, lo cual se asocia con el incremento en la permeabilidad y la invasión de las células MCF-7. Este proceso es mediado por RE, que induce la rápida fosforilación de Src en la Tyr-⁴¹⁶ y la posterior formación del complejo p-Src/ZO-1 y la consecuente deslocalización y translocación nuclear de ZO-1 y ZONAB en donde estos tienen la capacidad de modular la expresión de HER-2 un gen blanco de sutil importancia en el proceso canceroso. Por otra parte se observó que E₂ disminuye la expresión de los marcadores epiteliales CRB3 y ocludina e incrementa el marcador mesenquimal N-Cadherina lo cual sugiere la estimulación de la TEM y concuerda con el incremento en la permeabilidad, y en la migración en el proceso de metástasis del cáncer.

En este trabajo demostramos una nueva vía de señalización en la cual E₂ induce la rápida fosforilación de Src en Tyr ⁴¹⁶ residuo regulador esencial para activar la función tirosina cinasa, efecto revertido por el antagonista ICI lo cual demuestra que E₂ actúa a través de RE activando la vía ER-Src (Migliaccio, 2000, Migliaccio, 2008, Binoj, 2011), evidencias sugieren que la activación de Src y la posterior formación del complejo p-Src/ZO-1 (Fig. 1) altera la integridad de las TJ esto a través de la fosforilación de ZO-1 por p-Src (Sabath, 2008), numerosas investigaciones aseguran que la fosforilación de ocludina y ZO-1 induce su disociación del citoesqueleto en células de cáncer de colon (35, 36) además de que la inhibición de la actividad de Src disminuye la fosforilación de ocludina y ZO-1 en capilares cerebrales (Takeo S y Takenaga, 2009), lo cual coincide con la deslocalización ZO-1 y ZONAB de las fracciones citoplasmáticas y su incremento en las fracciones

nucleares después de la activación de p-Src (Fig.2). Publicaciones recientes describen que la distribución de las TJ puede ser alterada bajo ciertos estímulos (Radhakrishna, 2002, Kurihara, 2005), aquí demostramos que los estrógenos tienen la capacidad de inducir su translocación nuclear mediante la colocalización por inmunofluorescencia y confirmado mediante la reconstrucción en 3D tanto en baja como en alta confluencia debido a que la densidad celular es un factor importante en este proceso (Sarbani Giri, 2010, Balda, 2003). La translocación nuclear de ZO-1 y ZONAB es un hecho importante debido a que estas proteínas participan como reguladores transcripcionales del oncogén HER-2 (Hsueh; 2000, Wärr; 1991). Estudios recientes sugieren que HER-2 juega un papel importante en la respuesta a la terapia hormonal ya que a pesar de los efectos positivos de dicha terapia, la resistencia inicial o adquirida a las terapias endocrinas se produce con frecuencia además de su implicación en la progresión del cáncer de mama. Con el objeto de determinar si la deslocalización de las TJ y su translocación al núcleo inducida por E₂ tiene un efecto a nivel transcripcional analizamos la síntesis del mRNA de HER-2 (Fig. 3) en donde encontramos que la síntesis del mRNA de HER-2 es estimulada dos horas después de la translocación de ZO-1 y ZONAB. Para determinar si este incremento en la expresión de HER-2 dependía de la pérdida del ensamblaje y la translocación de ZO-1 y ZONAB o de la síntesis *de novo* de algún activador transcripcional, bloqueamos la síntesis de proteínas con CHX y descubrimos que la incubación con el inhibidor no indujo cambios en la síntesis del mRNA de HER-2 (Fig. 3) lo cual sugiere la evidencia de que ZO-1 y ZONAB desensambladas y translocadas en el núcleo regulan la síntesis de HER-2. En periodos posteriores (6 horas) la expresión de HER-2 es disminuida de manera significativa (Fig. 3C) mientras que el tratamiento con E₂+CHX no induce cambios con respecto al tratamiento de solo E₂ a las 6 horas (Fig. 3), por otra parte esta combinación incrementa de manera significativa la expresión de HER-2 a las 24 horas lo cual indica la posible participación de un co-represor que regule la síntesis de este gen. Diversas evidencias sugieren la posibilidad de una regulación directa de los estrógenos sobre la expresión de HER-2 (Umekita Y, Souda; 2006, Tal; 1986, Wärr AM; 1991) lo cual genera nuevas preguntas sobre la regulación de este gen y una amplia variedad de rutas de investigación en el tema.

La deslocalización de las TJ, la pérdida de los marcadores epiteliales y el incremento de los marcadores mesénquimales son indicadores del inicio de la TEM (Thiery; 2002, Lee; 2006) estas características coinciden con los resultados obtenidos en donde se demuestra que E₂ genera la pérdida del marcador epitelial CRB3 e incrementa la expresión del marcador mesénquima N-

caderina lo cual indica que E₂ podría ser un estímulo que inicia el proceso de TEM en las células MCF-7 (Fig. 4). Además analizamos los efectos del E₂ sobre la expresión del mRNA y la proteína de ZO-1 y ZONAB, demostrando que el E₂ puede estimular la expresión de ambas proteínas, induciendo la síntesis del mRNA de ZO-1 a los 15 minutos y a las 6 horas, efecto que correlaciona con la posterior traducción de la proteína a partir de las 9 hasta las 24 horas, en lo que respecta a ZONAB su mRNA se incrementa a los 30 minutos y a las 6 horas y en este caso la síntesis de la proteína se da a los 30 minutos y a las 9 horas. Evidencias muestran el hecho de que los estrógenos tienen la capacidad de regular la expresión de las proteínas de las TJ (Lin Ye; 2003, Braniste; 2009) y algunas coinciden con una posible regulación a nivel transcripcional por parte de esta hormona, ya que en la actualidad no han sido descritos elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora de los genes de ZO-1 y ZONAB se ha propuesto que la regulación sobre estos genes es mediada por un sitio CREB en una región cercana al promotor de ZO-1, donde AP-1 (formado por JunD y C-Fos) se une y puede regular la expresión de este gen (Chen Jie, 2009), esto sugiere la posibilidad de que E₂ unido a su receptor estén transactivando la expresión de dichos genes.

Por otra parte observamos que E₂ disminuye de manera significativa de la expresión de la proteína transmembranal ocludina a nivel mRNA y proteína después de 24 horas de incubación, esto asociado con el incremento en la permeabilidad destacando que el efecto en la permeabilidad es mediado directamente por el RE ya que al incubar a las células con el antagonista del RE el efecto es drásticamente revertido (Fig.5). Finalmente demostramos que E₂ incrementa la migración de las células MCF-7 y corroboramos que el proceso es mediado por REa por la incubación con ICI (Fig. 6). Investigaciones recientes demuestran el potencial metastasico de los estrógenos en cáncer de ovario basándose en los mecanismos de regulación canónicos (Se-Hyung; 2008) mientras que los resultados de nuestra investigación sustentan una nueva vía de regulación por la cual E₂ induce una serie de efectos moleculares como la activación de la cinasa p-Src, la interacción y el desensamblaje de ZO-1 y ZONAB del complejo ocluyente, su translocación nuclear, la activación transcripcional de genes blanco como el caso de HER-2, la disminución del marcador epitelial CRB3, el incremento de marcador mesénquimal N-cadherina, pérdida de la proteína transmembranal ocludina y el consecuente incremento en la permeabilidad y en la migración (Fig.8) demostrando la clara participación de E₂ como un factor inductor del proceso de TEM y de la

consecuente metástasis y provee una posible explicación del proceso canceroso y sus implicaciones clínicas para selección de blancos terapéuticos y de prevención.

9. CONCLUSIÓN

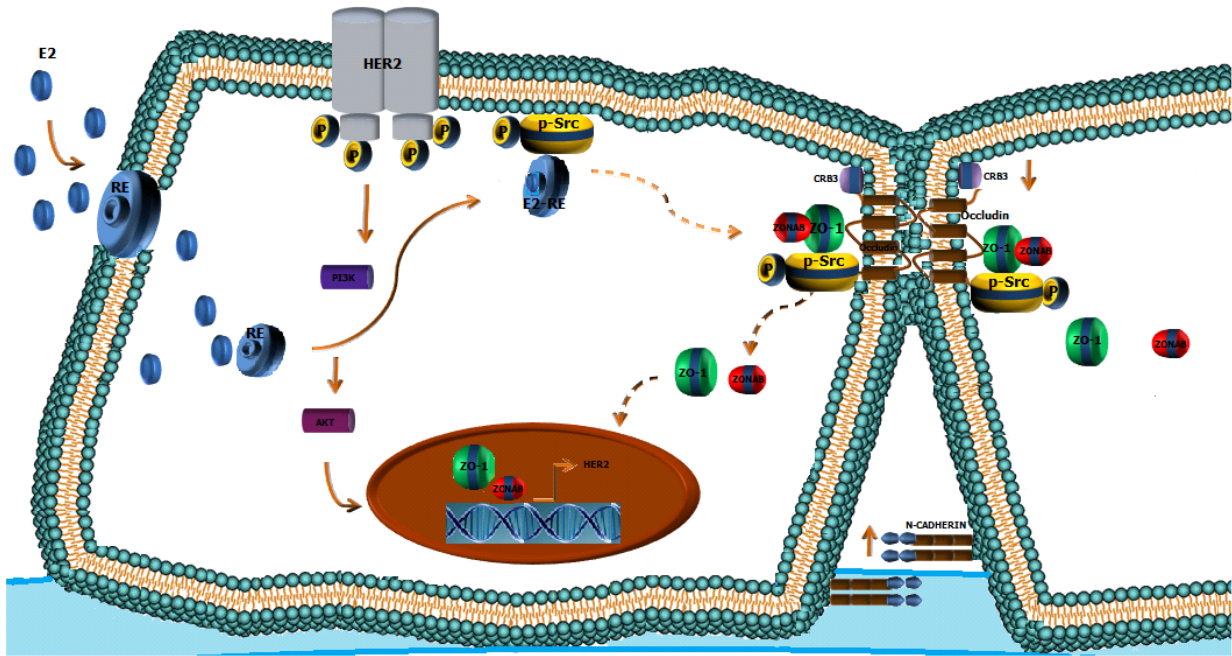


Figura 7. Modelo representativo del efecto inducido por los estrógenos en una vía mediada por las proteínas componentes de las TJ. La vía inicia cuando E2 interacciona con el receptor de estrógenos α ($ER\alpha$) e induce la cascada de señalización (1), $ER\alpha$ tiene la capacidad de interactuar con Src e inducir su activación por autofosforilación en Tyr-⁴¹⁶ (2). P-Src-Tyr-⁴¹⁶ activo interacciona y fosforila a ZO-1 forma el complejo p-Src⁴¹⁶/ ZO-1 (3) e induce el desensamblaje de ZO-1 y ZONAB de la membrana y estimula su translocación nuclear (4) en donde estas tienen la capacidad de estimular la síntesis de HER-2 (5). La deslocalización de ZO-1 y ZONAB y la pérdida de la proteína transmembranal ocludina genera que la permeabilidad se incremente (6). Estos efectos asociados con la disminución del marcador epitelial CRB3 y el incremento en el marcador mesénquima N-cadherina sugieren claramente que E2 es un factor que induce a las células a entrar en el proceso de transición epitelio-mesénquima que facilita la migración de las células MCF-7 para generar metástasis.

10. PERSPECTIVAS

Actualmente, se llevan a cabo experimentos con RNAi dirigidos contra la cinasa c-Src⁴¹⁶ para demostrar si la translocación de las proteínas ZO-1 y ZONAB es debido a la acción de esta oncoproteína. Además se realizan experimentos a diferentes dosis de E2 para tratar de demostrar si el efecto depende de la dosis. También sería prudente analizar la expresión y la activación de HER-2 para tratar de correlacionar la translocación de ZO-1 Y ZONAB con la expresión y la activación de dicho receptor. Un punto importante para continuar con esta línea de investigación es estudiar el efecto en la activación de cinasas importantes en procesos como la proliferación y la supervivencia celular tal es el caso de la proteína cinasa C, ERK, la fosfatidil inositol 3 cinasa, AKT entre otras.

11. BIBLIOGRAFÍA

- OMS 2012 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>)
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. (2000). Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5930–5935.
- Verkooijen HM, Bouchardy C, Vinh-Hung V, Rapiti E, Hartman M (2009) The incidence of breast cancer and changes in the use of hormone replacement therapy: a review of the evidence. *Maturitas* 64: 80–85.
- Margaret C. Frame. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1602: 114– 130.
- Foroni C, Broggini M, Generali D, Damia G. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev* Nov 25; doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.001
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:285–293.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. (1993). Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*: 123:1777–1788.
- Brennan K, Offiah G, McSherry EA, Hopkins AM. (2010) Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer? *J Biomed Biotechnol.*: 10.1155/2010/460607.
- Liangliang Xu • Fanbiao Meng • Ming Ni Yukwai Lee • Gang Li. (2012) N-cadherin regulates osteogenesis and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11033-012-2334-0
- Itoh M. y Bissell MJ. (2003) The Organization of Tight Junctions in Epithelia: Implications for Mammary Gland Biology and Breast Tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.4: 449-62.
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3460–3464.
- Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR, Simoncini T. (2008). Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS One*. 3:e2238

- . Maria S. Balda and Karl Matter. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulated ErbB-2 expression. *The EMBO Journal*. (9): 2024-2033
- Hynes N. E. y. Lane H. A., (2005). ERBB Receptors and cáncer: The complexity of targeted inhibitors, *NATURE REVIEWS*. 05:341-354.
- Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, Elledge RM. (2004). HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin Cancer Res*. 117: 5670-5676.
- Stevenson, B.R., and B.H. Keon. (1998). The tight junction: morphology to molecules. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 14:89–109.
- Benais-Pont, G., K. Matter, and M.S. Balda. (2001). Intracellular signaling in classical and new tight junction functions. In *Tight Junctions*. J.M. CRC Press, Boca Raton, FL. 367–394.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. (1999). Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol*. 11:628–633
- Maricarmen D. Planas-Silva , Paul K. Waltz. (2007). Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 104:11–21
- - Takeo S y Takenaga Y. (2009) Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab*. (6):1099-108
- Radhakrishna K., Shyamali B., Vijay U., KARNAKY J. and GUPTA Akshay. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J*. 368: 471-481.
- Kurihara, H., Anderson, J. M. and Farquhar, M. G. (1995) Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modification of tight junctions between glomerular foot processes. *Am. J. Physiol*. 268, F514-F524
- Lin Ye, Tracey A. Martin, Christian Parr, Gregory M. Harrison, Robert e. Mansel, and Wen G. Jiang. (2003). Biphasic Effects of 17-b-Estradiol on Expression of Occludin and Transendothelial Resistance and Paracellular Permeability in Human Vascular Endothelial Cells. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 196:362–369.
- Ernesto Sabath, Hideyuki Negoro, Sarah Beaudry, Manuel Paniagua, Susanne Angelow, Jagesh Shah, Nicholas Grammatikakis, Alan S. L. Yu and Bradley M. Denker¹. (2007). G₁₂ regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *Journal of Cell Science* 121, 814-824

- Binoj C. Nair, Valerie Cortez, Rambabu Challa, Dimple Chakravarty, Rajeshwar Rao Tekmal, Ratna K. Vadlamudi (2011) Significance of ER–Src axis in hormonal therapy resistance Sreeram Vallabhaneni. *Breast Cancer Res Treat* 130:377–385
- James M. Staddon*, Kurt Herrenknecht, Caroline Smales and Lee L. Rubin. (1995). Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *Journal of Cell Science*. 108, 609-619
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Maria S. Balda, Michelle D. Garrett and Karl Matter. (2003). The ZO-1–associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of Cell Biology*. 160.3, 423–432.
- Se-Hyung Park, Lydia W. T. Cheung, Alice S. T. Wong, and Peter C. K. Leung. (2008). Estrogen Regulates Snail and Slug in the Down-Regulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor. *Molecular Endocrinology* 22(9):2085–2098.
- Yager JD, Davidson NE (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354:270–282
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*. 19(20):5406-17.
- Binoj C. Nair, Valerie Cortez, Rambabu Challa, Dimple Chakravarty, Rajeshwar Rao Tekmal, Ratna K. Vadlamudi (2011) Significance of ER–Src axis in hormonal therapy resistance Sreeram Vallabhaneni. *Breast Cancer Res Treat* 130:377–385
- Antimo Migliaccio*, Gabriella Castoria, Pia Giovannelli, Ferdinando Auricchio (2010). Cross talk between epidermal growth factor (EGF) receptor and extra nuclear steroid receptors in cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 327 (2010) 19–24
- Ernesto Sabath, Hideyuki Negoro, Sarah Beaudry, Manuel Paniagua, Susanne Angelow, Jagesh Shah, Nicholas Grammatikakis, Alan S. L. Yu and Bradley M. Denker. (2008). Ga12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight junction assembly. *Journal of Cell Science* 121, 814-824
- Radhakrishna K., Shyamali B., Vijay U., KARNAKY J. and GUPTA Akshay. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J*. 368: 471-481.

- Kurihara, H., Anderson, J. M. and Farquhar, M. G. (1995) Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modulation of tight junctions between glomerular foot processes. *Am. J. Physiol.* 268, F514-F524
- Takeo S y Takenaga Y. (2009) Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab.* (6):1099-108
- Yanfang Guan, Alastair J. M. Watson, Amanda M. Marchiando, Emily Bradford, Le Shen, Jerrold R. Turner, and Marshall H. Montrose. (2011). Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C1404–C1414.
- Sarbani Giri, Kevin M Poindexter, Shyam N Sundar and Gary L Firestone. (2010). Arecoline induced disruption of expression and localization of the tight junctional protein ZO-1 is dependent on the HER 2 expression in human endometrial Ishikawa cells. *BMC Cell Biology.* 11:53
- Maria S. Balda, Michelle D. Garrett, and Karl Matter. (2003). The ZO-1 associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of Cell Biology.* 160 (3); 423–432
- Hsueh, Y.-P., Wang, T.-F., Yang, F.-C. and Sheng, M. (2000). MAGI-1 interacts with Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404, 298-302.
- Giri S, Poindexter KM, Sundar SN, Firestone GL. (2010). Arecoline induced disruption of expression and localization of the tight junctional protein ZO-1 is dependent on the HER 2 expression in human endometrial Ishikawa cells. *BMC Cell Biol.* 10.1186/1471-2121-11-53.
- Wärrä AM, Laine AM, Majasuo KE, Alitalo KK, Härkönen PL. (1991). Estrogen suppression of erbB2 expression is associated with increased growth rate of ZR-75-1 human breast cancer cells in vitro and in nude mice. *Int J Cancer.* 49(4):616-23.
- Umekita Y, Souda M, Ohi Y, et al. (2006). Expression of wild-type estrogen receptor beta protein in human breast cancer: specific correlation with HER2/neu overexpression. *Pathol Int* 56: 423-427.
- Tal M., IOnig C. R., Kraus M. H., Ullrich A., Schlessinger J. and Givol D. (1987). Human HER2 (neu) promoter: evidence for multiple mechanisms for transcriptional initiation. *Molec. Cell. Biol.* 7 2597-2601.

- Jean Paul Thiery. (2002) Epithelial Mesenchymal Transitions in Tumor Progression. NATURE REVIEWS. 10.1038/nrc822
- Jonathan M. Lee, Shoukat Dedhar, Raghu Kalluri, and Erik W. Thompson. (2006). The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease The Journal of Cell Biology. 172; 7: 973–981.
- Lin Ye; Tracey A. and Wen G. Jiang. (2003). Biphasic Effects of 17- β -Estradiol on Expression of Occludin and Transendothelial Resistance and Paracellular Permeability in Human Vascular Endothelial Cells. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 196: 362–369.
- Braniste Viorica, Leveque Mathilde, Buisson-Brenac Claire, Bueno Lionel, Fioramonti Jean and Houdeau Eric. (2009). Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occluding and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. Journal of Physiol.13: 3317–3328.
- Chen Jie, Xiao Lan, Rao Jaladanki N., Zou Tongtong, Liu Lan, Bellavance Emily, Gorospe Myriam, and Wang Jian-Ying. (2008). JunD Represses Transcription and Translation of the Tight Junction Protein Zona Occludens-1 Modulating Intestinal Epithelial Barrier Function. Mol Biol Cell. 9: 3701-12.
- Se-Hyung Park, Lydia W. T. Cheung, Alice S. T. Wong, and Peter C. K. Leung. (2008). Estrogen Regulates Snail and Slug in the Down-Regulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor. Molecular Endocrinology. 22(9):2085–2098
- American Cancer Society, 2013. Breast cancer: ealy detection. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003165-pdf.pdf>
- Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, Buist DS, Kerlikowske K, van Ravesteyn NT, Trentham-Dietz A, Mandelblatt JS, Miglioretti DL. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 2012 May 1;156(9):635-48
- Lønning PE, Haynes BP, Straume AH, Dunbier A, Helle H, Knappskog S, Dowsett M. Recent data on intratumor estrogens in breast cancer. Steroids. 2011; 76(8):786-91



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00051

Matricula: 207381865

CAMBIOS EN LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE LAS PROTEINAS ZO-1 Y ZONAB INDUCIDOS POR ESTRADIOL A TRAVES DE LA ACTIVACION DE c-Src, EN CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO: EFECTOS SOBRE LA ACTIVACION DE HER-2 Y LA MIGRACION.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de mayo del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA
DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR
SANTAMARIA

VOCAL

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

SECRETARIO

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Fecha : 14/05/2014

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR, matrícula 207381865, quien cumplió con los 315 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha catorce de mayo del 2014 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

CAMBIOS EN LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE LAS PROTEINAS ZO-1 Y ZONAB INDUCIDOS POR ESTRADIOL A TRAVES DE LA ACTIVACION DE c-Src, EN CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO: EFECTOS SOBRE LA ACTIVACION DE HER-2 Y LA MIGRACION.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 450 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidenta

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

Vocal

DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR
SANTAMARIA

Secretario

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Vocal

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO