



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

“Efecto combinado de ATRA y Faslodex sobre la inhibición de la metástasis de células de carcinoma mamario humano en un modelo de embrión de pollo”

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal

presenta:

MVZ. Rosa Isela Mendizabal Riveros

DIRECTOR

Dr. Pablo G. Damián Matzumura

ASESORES:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Ciudad de México a 14 de diciembre de 2016

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 Matzumura.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana, está evaluada en el Nivel de Desarrollo en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (Referencia 003797).

La alumna Rosa Isela Mendizabal Riveros fue apoyada con la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 620406.

Parte de este trabajo fue realizado con el apoyo del Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Parte de este proyecto fue apoyado por el Programa del Mejoramiento de Profesores F-PROMEP-38/Rev-03 (SEP) del cual JEJ-S es responsable.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción.
DCBS, Unidad Iztapalapa, UAM
pgdm@xanum.uam.mx

ASESORES:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa
Departamento de Ciencias Naturales
DCNI, Unidad Cuajimalpa, UAM.
cgonzalez@correo.cua.uam.mx

Dr. José Antonio Herrera Barragán
Departamento Producción Animal y Agrícola
DCBS, Unidad Xochimilco, UAM
jherrerab@correo.xoc.uam.mx

Los abajo firmantes miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobaron la tesis titulada: "Efecto combinado de ATRA y Faslodex sobre la inhibición de la metástasis de células de carcinoma mamario humano en un modelo de embrión de pollo".

El examen se realizó el día 14 del mes de Diciembre de 2016.

JURADO DE EXAMEN



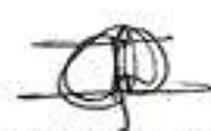
Dra. Claudia Izabel González de la Rosa

PRESIDENTE



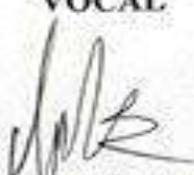
José Antonio Herrera Barragán

SECRETARIO



María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

VOCAL



Javier Estéban Jiménez Salazar

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Pablo Damián Matzumura por la oportunidad, apoyo, confianza y paciencia para la realización de este proyecto de investigación y por formar un grato grupo de trabajo en el laboratorio. Mi más profundo agradecimiento a usted.

A mi comité tutorial: A la Dra. Claudia Haydeé Gonzáles de la Rosa y al Dr. José Antonio Herrera Barragán por su apoyo, seguimiento del proyecto de investigación y en el proceso de elaboración de la tesis.

Al Dr. Axayacatl Morales Guadarrama y al Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica por los estudios realizados en RM.

A mis compañeros de laboratorio, que me apoyaron durante la realización de este proyecto, gracias por el aprendizaje, las risas, los regaños, consejos, pero sobre todo, gracias por su amistad y ser un excelente grupo de trabajo.

Finalmente, agradezco a mi familia, la cual me ha apoyado incondicionalmente en todas las aventuras de mi vida.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Epidemiología del cáncer de mama (CaM)	5
3.2 Etiología del CaM	6
3.3 Migración, invasión celular y metástasis en el CaM	7
3.4 Estrógenos y CaM	8
3.4.1 Receptores nucleares de los estrógenos	8
3.4.2 Mecanismo de acción no canónico de los estrógenos	10
3.4.3 Mecanismo de acción canónico de los estrógenos	11
3.5 Tratamientos contra el CaM	11
3.5.1 Terapia hormonal: antagonista del RE	12
3.5.2 Terapia de diferenciación	13
3.6 Retinoides y CaM	13
3.6.1 Receptores nucleares de los retinoides	14
3.6.2 Mecanismo de acción canónico de los retinoides	15
3.6.3 Mecanismo de acción no canónico de los retinoides	16
3.7 Modelos animales en el estudio de la metástasis	16
3.7.1 En ratón desnudo en estudios oncológicos	17
3.7.2 El de embrión de pollo como modelo experimental en el estudio de la metástasis	18
3.7.2.1 El desarrollo de la MCA, estructura y formación	19
3.7.2.2 Ventajas del modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis	21

4. ANTECEDENTES	22
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
7. HIPÓTESIS	27
8. OBJETIVO GENERAL	28
9. OBJETIVOS PARTICULARES	29
10. MATERIALES Y MÉTODOS	30
10.1 Línea celular de CaM	30
10.2 Cultivo de la línea celular de CaM MCF-7/GFP	30
10.3 Análisis de ATRA, ICI y su combinación sobre la migración de células MCF-7/GFP	30
10.4 Modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis	31
10.4.1 Incubación del huevo fertilizado	31
10.4.2 Técnicas de inoculación en el embrión de pollo	31
10.4.3 Análisis de ATRA, ICI y su combinación sobre la inhibición de la metástasis en el modelo de embrión de pollo	33
10.4.4 Frotis de los tumores	33
10.4.5 Evaluación de la metástasis en el embrión de pollo post-inoculación	33
10.4.6 Medidas obtenidas de los tumores encontrados post-inoculación	34
10.4.7 Evaluación de la metástasis por medio de resonancia magnética (RM) 7 teslas	35
10.5 Análisis Estadístico	35

11. RESULTADOS	36
11.1 Efectos de ATRA, ICI o su combinación sobre la migración celular	36
11.2 Efecto de la combinación de ATRA e ICI en la migración y densidad celular de la línea MCF-7/GFP a las 48 h de incubación	41
11.3 Modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis	42
11.3.1 Técnicas de inoculación en el embrión de pollo	42
11.3.2 Principales órganos blanco en donde fueron localizados tumores post-inoculación	43
11.3.3 Análisis tumoral con microscopio de fluorescencia	44
11.3.4 Efecto de ATRA, ICI o su combinación sobre la inhibición de la metástasis	44
11.3.5 Volumen tumoral post- tratamientos	46
11.4 Estudios en RM 7 teslas para evaluación de la metástasis	46
11.4.1 Análisis del embrión dentro del huevo, mediante RM	47
11.4.2 Análisis del embrión mediante RM	48
11.4.3 Análisis tumoral de corazón e hígado mediante RM	48
11.4.4 Volumen tumoral por RM	49
12. DISCUSIÓN	50
13. CONCLUSIONES	55
14. PERSPECTIVAS	56
15. BIBLIOGRAFÍA	57

ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico (ADN)

AF-1 y AF-2: Dominios de activación transcripcional denominados *Activation Function 1 y 2*

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico

AP-1: Proteína activadora 1

AR: ácido retinoico

ARaC: Citosina β -D-arabinofuranósido

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATRA: Ácido retinoico todo *trans*

CaM: Cáncer de mama

DBD: Dominio de unión al ADN

DE: Desviación estándar

DIC: Microscopia de contraste por interferencia diferencial

DMEM: Medio de Eagle, modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

E₂: Estradiol

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERE: Elementos de respuesta a estrógenos

GFP: Proteína verde fluorescente

GPR30: Proteína acoplada al receptor de estrógenos (Ahora llamada GPER)

ICI: ICI 182, 780, antiestrógeno puro también conocido como fulvestrant o Faslodex[®]

LBD: Dominio de unión a ligando

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

MCA: Membrana corioalantoidea

MCF-7: Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de MICHIGAN Cancer Foundation)

MEC: Matriz extracelular

Nu o *nude* o ratón “desnudo” o inmunosuprimido

PBS: Solución salina de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa

PKA: Proteína cinasa A

RAR: Receptor del ácido retinoico

RARE: Elementos de respuesta al ácido retinoico

RE: Receptor de estrógenos

RE α : Receptor de estrógenos, tipo alfa (α)

RE β : Receptor de estrógenos, tipo beta (β)

RM: Resonancia magnética

RNs: Receptores nucleares

RXR: Receptor de retinoides

SBF: Suero de feto bovino

SERMs: Moduladores Selectivos del RE

SPF: Organismos libres de patógenos específicos

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS.

Figura 1

Dominios del receptor de estrógenos α y β (ER α y ER β).

Figura 2

Dominios funcionales y los principales sitios de fosforilación de los receptores nucleares y del ácido retinoico.

Figura 3

Migración de células tumorales, marcadas con la proteína verde fluorescente, a través de los vasos sanguíneos de la MCA en el embrión de pollo

Figura 4

Procedimiento de inoculación en el embrión de pollo a través del cascarón

Figura 5

Procedimiento de inoculación directa en el embrión de pollo en la MCA.

Figura 6

Procedimiento de inoculación en el embrión de pollo en vena de la MCA.

Figura 7

Microscopia fluorescente para la evaluación de la metástasis en el embrión de pollo en el día 16.

Figura 8

Medición de los tumores encontrados en corazón e hígado con ayuda de un vernier.

Figura 9

Migración celular de la línea MCF-7/GFP estimulada por estradiol a las 48 h.

Figura 10

El efecto de ATRA en la migración de la línea celular MCF-7/GFP en presencia de E₂ a las 48 h.

Figura 11

Efecto de ICI en la migración de la línea celular MCF-7/GFP en presencia de E₂ a las 48 h.

Figura 12

Efecto de ATRA e ICI en la migración de la línea celular MCF-7/GFP en presencia de E₂ a las 48 h.

Figura 13

Muerte celular por efecto de la combinación de ATRA e ICI en presencia de E₂ a las 48 h.

Figura 14

Porcentaje de los principales órganos blanco en donde fueron localizados tumores en el día 16 post-inoculación.

Figura 15

Realización de frotis de los tumores analizados en un microscopio de fluorescencia.

Figura 16

Porcentaje de embriones que presentaron tumores en corazón e hígado post-tratamiento en el día 16.

Figura 17

Estudios realizados mediante RM que muestran la regeneración de la membrana del cascarón y de los vasos sanguíneos.

Figura 18

Estudio realizado mediante RM de corazón e hígado del embrión de pollo seis días después de ser inoculado.

Figura 19

Estudios realizados mediante RM del volumen tumoral encontrados en corazón e hígado post-tratamientos en el día 16.

Gráfica 1

Porcentaje de embriones que presentaron tumores en el día 16 después de ser inoculados con MCF-7/GFP.

Gráfica 2

Promedio del volumen tumoral después de cada tratamiento.

1. RESUMEN

El cáncer de mama (CaM) representa uno de los problemas de salud que más muertes oncológicas causa en mujeres de 20 años y más. Su alta mortalidad está ligada a los estadios más avanzados de esta enfermedad, donde se presenta la metástasis a otros órganos o tejidos. Es importante destacar que más del 75% de los tumores de glándula mamaria, en estadios tempranos, son positivos al receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$), blanco terapéutico de Fulvestrant (ICI 182 780 o Faslodex®), el cual inhibe proliferación celular, motilidad e invasión. Por otro lado, el ATRA es un retinoide derivado de la Vitamina A que ha sido utilizado recientemente en combinación con agentes antineoplásicos potenciando sus efectos. Basado en lo anterior el objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto de la combinación de ATRA e ICI sobre la migración *in vitro* de células MCF-7/GFP (carcinoma mamario humano) y la metástasis *in vivo* en un modelo de embrión de pollo.

La migración de células MCF-7/GFP se determinó mediante ensayos de cierre de herida (*Wound Healing*) incubando ATRA, ICI o ambos durante 48 h, en presencia de estradiol (E_2) como inductor de migración. En todos los experimentos se utilizó citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C; 10 mg/mL) 2 h antes del ensayo para inhibir la síntesis de ADN y poder distinguir la migración de la proliferación. La metástasis se determinó mediante la inoculación de 10^6 células de carcinoma mamario en embriones de pollo fértiles, tratados con ATRA, ICI o su combinación.

Los resultados muestran que en comparación con los tratamientos individuales, la combinación de ATRA e ICI inhiben significativamente la migración de las células MCF-7/GFP. Por otro lado, la formación de tumores disminuyó notablemente cuando los embriones de pollo, inoculados con las células MCF-7/GFP, se incubaron con la combinación de ATRA e ICI en las mismas concentraciones, en comparación con los tratamientos individuales. En conjunto, estos resultados nos permiten proponer que la combinación de ATRA con ICI puede ser una herramienta terapéutica muy potente cuando en los tumores de cáncer de mama se expresa el receptor de estrógenos.

Por otro lado, se estandarizó sistemáticamente el modelo de embrión de pollo para el análisis de metástasis de células de carcinoma mamario humano, lo que posibilita realizar diversos estudios tanto de tratamientos anti-neoplásicos que permitirán avanzar en la lucha contra esta enfermedad.

2. ABSTRACT.

Breast cancer (CaM) is a leading cause of death among women. Its high mortality is linked to the most advanced stages of this disease, which occurs metastasis to other organs or tissues. Importantly, over 75% of mammary gland tumors in early stages, estrogen receptor positive to alpha ($RE\alpha$), whereby a therapeutic target is attacked fulvestrant (ICI 182,780 or Faslodex®), the which inhibits cell proliferation, motility and invasion. Furthermore, ATRA, is a derivative of Vitamin A retinoid was recently used in combination with antineoplastic agents potentiating their effects. Based on the above the aim of this thesis was to determine the effect of the combination of ATRA and ICI on the *in vitro* migration of MCF-7 / GFP cells (human breast carcinoma) and metastasis *in vivo* in a model of chick embryo .

Migration of MCF-7 / GFP cells was determined by wound closure tests (Wound Healing) incubating ATRA, or both ICI for 48 h in the presence of estradiol (E2) as migration inducer. It was used in all experiments cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C 10 mg / ml) 2 h prior to assay to inhibit DNA synthesis and to distinguish migration proliferation. Metastasis was determined by inoculating 106 mammary carcinoma cells in fertile chicken embryos treated with ATRA, ICI or combination.

The results show that compared to the individual treatments, the combination of ATRA with ICI significantly inhibit migration of MCF-7 / GFP cells. Furthermore, tumor formation decreased markedly when chicken embryos inoculated with MCF-7 / GFP cells were incubated with the combination of ATRA and ICI in the same concentrations as compared to individual treatments. Together, these results allow us to propose that the combination of ATRA with ICI can be a very powerful therapeutic tool when tumors in breast cancer estrogen receptor is expressed.

On the other hand, it is systematically standardized model chick embryo for studying metastasis of cells of human breast carcinoma, allowing various studies both treatments as mechanisms of action that will advance the fight against this disease.

3. INTRODUCCIÓN

Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos (NCI, 2012), lo cual se ha descrito como la migración e invasión de las células tumorales desde el tumor primario, seguido por la intravasación, la supervivencia, la extravasación del sistema circulatorio o linfático y la colonización progresiva de un sitio distante, lo que es conocido como metástasis (Marino *et al.*, 2013).

La cascada biológica de las metástasis involucra pasos concretos como pérdida de adhesión celular, incremento en la capacidad motora e invasiva, entrada en la circulación, salida hacia el parénquima de órganos distantes y, finalmente, colonización de dichos órganos (Nguyen, 2009).

El cáncer de mama representa uno de los problemas de salud que más muertes oncológicas causan en mujeres mayores de 20 años y más (NCI, 2015; INEGI, 2015), por lo que se han dedicado muchos esfuerzos en combatir esta enfermedad, especialmente antes de que se desarrollen metástasis.

3.1 Epidemiología del cáncer de mama (CaM)

A nivel mundial, el CaM es el más común entre las mujeres, registrándose 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad y en los últimos cinco años se tiene el reporte de 4.4 millones de mujeres que viven con la enfermedad (Globocan, 2014).

En México, doce mujeres mueren diariamente a causa del cáncer mamario, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con este tumor maligno. Adicionalmente, a partir del año 2006 el CaM se considera como la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 54 años, después de los tumores malignos en órganos digestivos, desplazando al cáncer cérvico-uterino al tercer lugar (INEGI, 2015).

Uno de los problemas que enfrenta la lucha contra el CaM es que un número considerable de casos se detectan en estadios avanzados. En México, el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas, por lo que su tratamiento debe ser más agresivo y, por ende, los efectos colaterales son más severos. Por este motivo, la mortalidad por CaM está ligada a los estadios más avanzados de esta enfermedad, a partir de que se presenta la metástasis a órganos como pulmón, cerebro y hueso (Brandan y Villaseñor, 2006) y se ha considerado como una enfermedad sistémica que debe ser combatida como tal (Redig y McAllister, 2013).

3.2 Etiología del CaM.

Algunos factores asociados a la vida reproductiva de la mujer tienen un papel determinante en el origen del CaM, incluyendo la menarquia temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, la ausencia de la lactancia y la administración de hormonas en formulaciones anticonceptivas (Kelsey *et al.*, 2009).

A nivel celular, se encuentran involucrados diversos procesos como pérdida de la adhesión célula-célula, evasión de la apoptosis, desregulación de los mecanismos de proliferación y diferenciación (Cole, 2010). Por otra parte, las hormonas esteroides sexuales, particularmente los estrógenos, juegan un papel importante en el origen del CaM debido a que son mitógenos, es decir que inducen la proliferación celular ocasionando que las células blanco se dividan por mitosis y, por otro lado, permiten su migración (Li *et al.*, 2012; Bartucci, 2001). Debido a la dependencia hormonal del CaM, la caracterización inmunohistoquímica de los Receptores de Estrógenos (RE), ha sido utilizada como marcador de actividad tumoral, de diagnóstico y de respuesta a tratamiento (Chen *et al.*, 2014). Dentro de la familia de los receptores nucleares a los que pertenecen los RE se encuentran los Receptores del Ácido Retinoico (RAR) y de Retinoides (RXR) y algunos de sus miembros han sido utilizados como biomarcadores en la quimioprevención (Pavan *et al.*, 2006).

3.3 Migración, invasión y metástasis en el CaM.

La migración celular es un evento clave en funciones biológicas, como son la respuesta inmunológica, el desarrollo embrionario o la regeneración de tejidos por células madre. Contribuye a varios procesos patológicos, incluyendo enfermedades vasculares, inflamatorias y cáncer (metástasis).

La migración celular puede ser conceptualizada como un proceso cíclico, la respuesta inicial de una célula a un estímulo migratorio es la polarización y extensión de protusiones en la dirección del estímulo. Estas protusiones pueden ser amplias en forma de láminas llamadas lamelipodias, o puntiagudas en forma de espinas, mejor conocidas como filopodias; la formación de estos frentes de migración son dirigidos y mantenidos por la polimerización de actina cortical y son estabilizados mediante la unión a la matriz extracelular (MEC) o células adyacentes a través de proteínas transmembranales que unen el citoesqueleto, estas adhesiones sirven como sitios de tracción para la migración y continuamente son desensambladas en la parte posterior (Ridley *et al.*, 2003).

La invasión de células del cáncer y la metástasis están estrechamente relacionados con la migración celular, un proceso que implica la dinámica de filamentos de actina regulados por diversas proteínas de unión a actina (Li, 2012., Tanaka, 1995., Yilmaz, 2010). Las células cancerosas presentan cambios específicos en la organización del citoesqueleto, así como en la adhesión, motilidad, regulación del crecimiento y supervivencia. (Navarro, 2010).

El proceso de invasión inicia con la disrupción de la interacción local célula-célula, alterando la membrana basal, invadiendo e infiltrando tejido circunvecino, alcanzando y penetrando al interior de los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación), con la consecuente transportación de estas células neoplásicas por el torrente sanguíneo. El proceso metastático continúa con una supervivencia en la circulación, la detención en terminaciones capilares de órganos distantes y el escape de estos vasos (extravasación), para el establecimiento y ulterior desarrollo de tumores secundarios (Chávez, 2004).

3.4 Estrógenos y CaM

La evidencia epidemiológica indica que los principales factores de riesgo asociados al cáncer de mama se vinculan a la mayor exposición a ciclos ovulatorios: menarca temprana y menopausia tardía, esterilidad, nuliparidad y la lactancia escasa o nula (Hulka, 1995). Estos factores sugieren una clara relación entre el cáncer de mama y el estatus hormonal estrogénico. De igual forma los estudios en células de cáncer de mama, a nivel experimental, han comprobado que los estrógenos promueven el crecimiento de tumores mamarios en animales, incrementan la proliferación (Clemons, 2001) e induce la migración (Jiménez, 2014). Además, se ha correlacionado el desarrollo del cáncer de mama con niveles elevados de estrógenos sanguíneos (Thompson, 2002).

Los factores que se asocian al desarrollo del cáncer de mama se pueden categorizar en los que producen daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) (genotóxicos) y los que estimulan la proliferación, desarrollo y crecimiento tumoral (mitogénicos). En relación con los estrógenos, en un primer momento se aceptó el segundo mecanismo ya que estos estimulan la división celular y cuanto más se divide una célula más son las posibilidades de que se exprese una mutación oncogénica o que se desarrolle una nueva (Fhisman, 1995).

3.4.1 Receptores de estrógenos

El receptor de estrógenos pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (RNs) los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas. Estas proteínas poseen unidades estructurales y funcionales bien definidas (Aranda, 2001., Krishnan, 2001).

Se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como ER α y ER β , formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente (Kuiper, 1996). Recientemente se reportó un nuevo receptor de estrógenos intracelular transmembranal, conocido como GPR30 por convención se acordó llamar GPER (receptor de estrógenos acoplados a proteínas G), que actúa de manera independiente de ER α y ER β , pero influye

en la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGF), pudiendo así participar en la biología del cáncer de mama (Filardo, 2006). ER α y ER β son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. ER α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, sistema nervioso central y próstata (Nilsson, 2001; Anderson, 2002; Palmieri, 2002).

Estos receptores, están conformados por seis dominios denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones (Kuiper, 1998) (Fig. 1). Ambos tienen un dominio central de unión al ADN (DBD) muy conservado que mediante dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos (Klinge, 2001). La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como 17 β -estradiol (E₂) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del RE), capaces de activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor.

Adicionalmente, el dominio de unión al ligando (LBD) contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, el cual es dependiente de ligando. La interacción con E₂ activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear y muy importante, la exposición de una superficie sobre la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales (Klinge, 2000). Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor (Tzukerman, 1994). Por último, en la región N-terminal existen diversos sitios de fosforilación, los cuales son regulados por una variedad de proteínas cinasas (Kumar, 2003) (Fig. 1).

En el cáncer, los genes activados por estrógenos intervienen en procesos como proliferación, angiogénesis, pérdida de unión celular, así como inhibición de apoptosis. Particularmente, el RE α se encuentra más relacionado con inducción de la proliferación celular en CaM (Helguero, 2005).

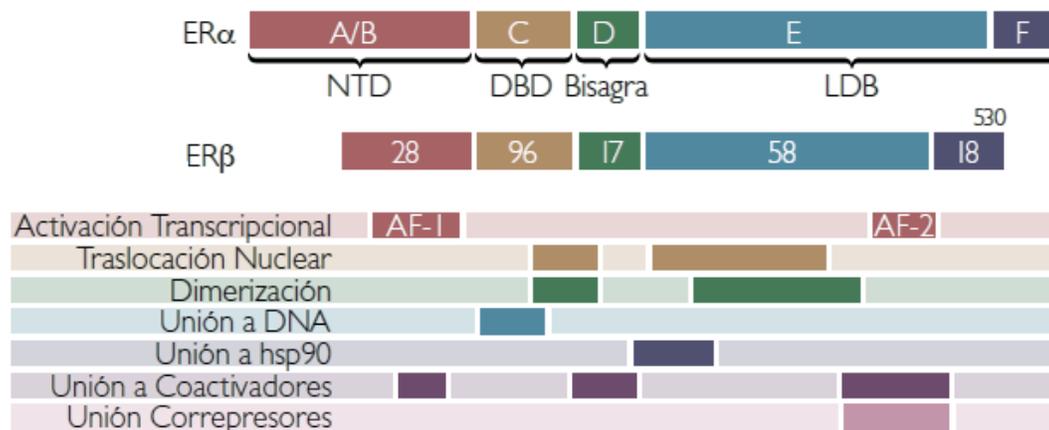


Figura 1. Representación esquemática de los dominios del receptor de estrógenos α y β (ER α y ER β). Estos receptores, están conformados por seis dominios denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones. Ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que mediante dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales y a ligandos sintéticos. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, denominado AF-2, entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal contiene una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente (Noriega y Langley, 2008).

3.4.2 Mecanismo de acción no canónico de los estrógenos

Los efectos biológicos rápidos observados del E₂ en hueso, mama, sistema vascular y sistema nervioso, sugieren que los estrógenos también pueden provocar efectos no genómicos, posiblemente a través de formas del RE en la superficie celular, vinculados a las proteínas de transducción de señales intracelulares (receptor de estrógenos de membrana y GPER). El RE y las vías de la tirosina cinasa están acopladas integralmente a la membrana celular a través de GPER, como el E₂, el cual ha demostrado que puede activar la vía de señalización MAPK en una gran variedad de células (Haynes, 2000; Simoncini, 2000). Otros estudios demuestran que el RE se encuentra vinculado a la membrana a través de un GPER y es capaz de provocar una variedad de eventos de transducción de señales, incluyendo la inducción de la proliferación celular y efectos antiapoptóticos de la hormona (Gu Q, 1999).

3.4.3 Mecanismo de acción canónico de los estrógenos

La activación del RE se inicia cuando la hormona se une a él, se disocian las proteínas de choque térmico (HSP) y ocurre la dimerización, lo que provoca un cambio conformacional del complejo estrógenos-receptores de estrógenos. Esto permite la interacción de los sitios específicos de unión al ADN del receptor con secuencias específicas del mismo, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE), que se encuentran en las regiones reguladoras de los genes diana de los estrógenos (Couse, 1999., Mckenna, 1999., Tora, 1989). Existen proteínas correguladoras intercaladas entre el RE activado y la “maquinaria” transcripcional, por lo tanto, funcionan como intermediarios de las señales del receptor y la transcripción (Webb, 1998). Éstas proteínas correguladoras modulan la capacidad transcripcional del receptor estrogénico y pueden incrementarla (coactivadores), disminuirla (correpresores) o funcionar como cointegradoras celulares para otras proteínas, que modifican, a su vez, a la transcripción (Course, 1999., Tzukerman, 1994). Los coactivadores están asociados a la relajación de la estructura de la cromatina por poseer o reclutar proteínas con actividad de acetilación de histonas, mientras que los correpresores están asociados a la compactación de la cromatina por poseer actividad de desacetilación de histonas. De esta forma, los correguladores de los RNs modulan la compactación o descompactación de la cromatina para reprimir o inducir, respectivamente, la expresión génica (Sever, 2013). Posteriormente, se inicia la transcripción a través de la enzima ARN polimerasa y la formación del ARN mensajero (ARNm), que migra al citoplasma, donde se realiza la traducción (síntesis proteínica) en los ribosomas (Mangelsdorf, 1995., Heery, 1997).

3.5 Tratamientos contra el CaM

Las terapias en cáncer se pueden dividir en quirúrgicas, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia biológica, las cuales varían en su efectividad, especificidad e indicación (Wickerham y Tan, 2002). Debido a que el CaM es una enfermedad heterogénea que presenta variaciones en la apariencia morfológica, potencial metastásico, respuesta a varios tratamientos y supervivencia de las pacientes, continuamente se desarrollan nuevas terapias y nuevas combinaciones que se encuentran dirigidas a blancos específicos con el objetivo

de incrementar su eficacia y disminuir los efectos secundarios. Las terapias más específicas son las Hormonales y las Biológicas (Bruton *et al.*, 2007).

3.5.1 Terapia hormonal: antagonista del RE

Es un tratamiento económicamente accesible y menos agresivo en comparación con la quimioterapia, indicado para pacientes que han sido diagnosticadas positivas para receptores de hormonas esteroides. Existen varias modalidades para suprimir los efectos de los estrógenos, por ejemplo, los inhibidores de la aromatasas y los antagonistas de los receptores de estrógenos (Gelber *et al.*, 2003). Estos últimos bloquean selectivamente uno o ambos receptores de estrógenos, entre ellos se encuentra el ICI 182,780 (Fulvestrant o Faslodex®, AstraZeneca) el cual es un inhibidor competitivo de los RE, uniéndose con afinidad comparable a la del estradiol. Este tipo de terapia inhibe considerablemente la proliferación de las células de CaM. No obstante su efecto específico, el tratamiento más adecuado siempre va a estar relacionado con el diagnóstico temprano del CaM (Bruton *et al.*, 2007).

Muchos agentes sintéticos como los antiestrógenos cuentan con la capacidad para inhibir la carcinogénesis en una amplia variedad de células pre-neoplásicas y en células de carcinoma, de los cuales se han identificado los antagonistas específicos de los receptores de estrógenos (ICI 182,780, Fulvestrant o Faslodex®), los cuales tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular, la motilidad, la invasión e inducir la diferenciación de las células de CaM y en pacientes que han sido diagnosticadas positivas para receptores de hormonas esteroideas (Bruton *et al.*, 2007). ICI, es un agente hormonal antiestrogénico puro con actividad antagonista, que se une de forma competitiva con el receptor de estrógenos con una mayor afinidad que el ligando natural (E₂) y que el tamoxifeno (Parker, 1993; Brzozowski 1997). Su acción antiestrogénica se efectúa al impedir la dimerización de este receptor, lo cual no le permite su unión al ERE, y por lo tanto a la transcripción de los genes. Asimismo se ha demostrado que estos compuestos pueden bloquear la translocación del RE al núcleo, lo cual incrementa su degradación citoplasmática (Gibson, 2010).

3.5.2 Terapia de diferenciación

Las primeras evidencias de las propiedades anticancerígenas del ácido retinoico (AR) surgieron a finales de los años 70, cuando se observó que los retinoides inhibían el crecimiento de células tumorales en cultivo (Lotan y Nicolson, 1977) y que inducían la diferenciación de células de teratocarcinoma *in vitro* e *in vivo* (Strickland y Mahdavi, 1978).

Más tarde, se demostró que los retinoides son agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos potenciales (Smith, 1992; Rhee, 2004). Debido a su rol en la regulación del crecimiento y diferenciación celular en modelos preclínicos, los retinoides naturales y sintéticos están siendo ampliamente evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento y prevención del cáncer. Uno de los principales mecanismos por el cual el AR es capaz de modular la progresión del ciclo celular. Esta regulación negativa en la estabilidad de una proteína no se limita solo a ciclina D1, sino que afecta a diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Además, el AR contribuye al arresto del ciclo celular mediante el aumento de la expresión y la estabilidad post-traducciona l de algunos inhibidores de ciclinas, como p21 (Seewaldt, 1996).

3.6 Retinoides y cáncer

Los retinoides naturales y sintéticos derivados de la vitamina A, regulan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de diferentes tipos de células normales y tumorales. Los retinoides se utilizan en el tratamiento de leucemia promielocítica y en la quimioprevención de varios cánceres, incluyendo el cáncer de mama. El efecto antitumoral de los retinoides se atribuye a la inducción de la diferenciación, detención del crecimiento de células tumorales por inducción de apoptosis o senescencia acelerada, a través de un arresto irreversible de la proliferación en fase G0 y G1 (Altucci, 2001; Roninson, 2003).

Recientemente se ha demostrado que los retinoides suprimen la formación de tumores en animales, han demostrado ser eficaces agentes citotóxicos en el CaM, especialmente ATRA (Garattini *et al.*, 2014) y han sido utilizados solos o en combinación con agentes

antineoplásicos o en radioterapia, tanto en el cáncer de pulmón (Arrieta *et al.*, 2010) como en el de mama (Bryan *et al.*, 2011).

3.6.1 Receptores nucleares de los retinoides

Los retinoides, entre los cuales se encuentran el ATRA, 9-cis AR y 13-cis AR, se pueden unir con diferente afinidad a los receptores del ácido retinoico (RAR alfa, beta y gamma) o los receptores X de los retinoides (RXR: alfa, beta y gamma), formando heterodímeros u homodímeros (Bastien y Rochette-Egly, 2004). Todos estos receptores nucleares constituyen una superfamilia de factores de transcripción que regulan la expresión génica de forma dependiente de su ligando, se unen a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE), actuando como factores de transcripción y regulando directamente la expresión de genes diana (Laserna, 2009).

La familia de receptores nucleares, también incluye los llamados receptores huérfanos, para los que no se ha descubierto ningún ligando aunque muchos poseen actividad fisiológica aparente. El mal funcionamiento de los receptores nucleares tiene efectos graves en la proliferación, reproducción y metabolismo, provocando cáncer, infertilidad, obesidad y diabetes (Aranda y Pascual, 2001; Gronemeyer *et al.*, 2004).

Los RARs presentan una estructura modular compuesta por 6 regiones conservadas A-F. La región C se encuentra altamente conservada y es la que porta el dominio de unión al ADN (DBD), el cual le confiere la capacidad de reconocer en forma específica a los RARE. La región E es la segunda región más conservada y es donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD). Es un dominio altamente complejo que contiene un bolsillo de unión al ligando, el principal dominio de dimerización y la función de *trans*-activación dependiente de ligando (AF-2). El extremo N-terminal o A/B contiene el sitio con la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1), susceptible a múltiples fosforilaciones que pueden regular la actividad transcripcional del receptor (Bastien, 2001) (Fig. 2).

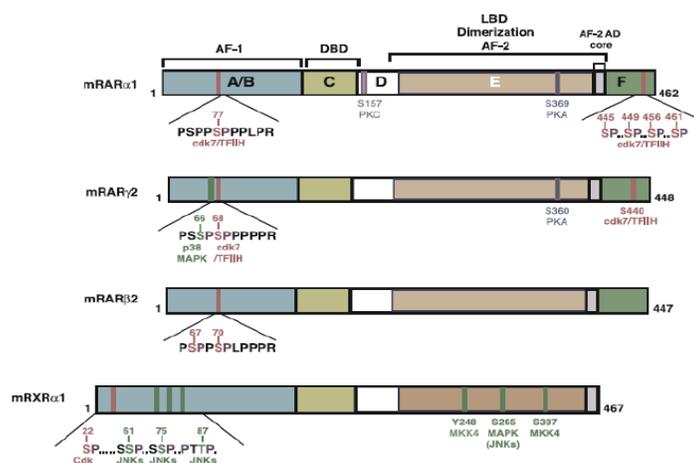


Figura 2. Representación esquemática de los dominios funcionales y los principales sitios de fosforilación de los receptores nucleares de ácido retinoico. Adaptado de Bastien, Rochette-Egly, 2004.

3.6.2 Mecanismo de acción canónico de los retinoides

Los efectos de los retinoides están mediados por los receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoides X (RXRs), que actúan como ligandos de factores de transcripción activados (Heyman, 1992; Mangelsdorf, 1994). Después de la unión con el retinoide, el complejo ligando-receptor forma dímeros, homodímeros o heterodímeros que se unen a los RARE en la región del promotor de genes implicados en la transducción de señales de los retinoides. Esta unión da una señal de liberación de co-represores y de reclutamiento de co-activadores y enzimas que modifican a las histonas para permitir los cambios conformacionales necesarios para la transcripción del ADN. Así, una vez activo, el receptor RAR es capaz de inducir la transcripción de algunos de los genes que contienen sitios RARE en su promotor (Chen, 2008).

Los retinoides no sólo regulan la transcripción a través de la activación de receptores de retinoides específicos, sino que también suprimen la actividad de otros factores de transcripción, tales como la proteína activadora-1 (AP-1), por medio de una transrepresión al unirse ATRA con su receptor RAR. Esta molécula regula la señal de factores de crecimiento, péptidos inflamatorios, oncogenes y promotores tumorales (Fanjul, 1994; Nagpal, 1995).

En conjunto, la acción de los retinoides es un mecanismo de ajuste fino dependiente del nivel de expresión de los receptores específicos, así como del tipo y la concentración del compuesto retinoide en la célula. Los retinoides pueden regular la actividad de rutas implicadas en el crecimiento celular o la diferenciación mediante el sistema de AP-1 (Klaassen, 2002).

3.6.3 Mecanismo de acción no canónico de los retinoides

En los últimos años se han reportado nuevas formas de regulación de los receptores de retinoides, así como nuevas funciones. Estudios recientes demostraron que los receptores de ácido retinoico pueden integrar múltiples cascadas de fosforilación. Por lo que además de sus clásicos efectos transcripcionales, los RARs pueden mediar acciones rápidas independientes de la transcripción, como es la activación de la vía de transducción de señales del fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) o la vía de MAPK (Laserna, 2009).

Más aún, diferentes retinoides pueden mediar vías de señalización distintas de aquellas reguladas por los receptores RARs. Un ejemplo de esto es la capacidad del ATRA para modular la vía de señalización AMPc-PKA, la cual puede conducir a la diferenciación celular independientemente de la activación de receptores RARs. El descubrimiento de estos efectos no-genómicos del ácido retinoico, muestra que no solamente las células que expresan RARs funcionales (con capacidad de reconocer sitios RAREs) son capaces de responder a los retinoides (Somenzi, 2007; Bastien, 2004), ampliando aún más el panorama de acción de estas moléculas.

3.7 Modelos animales en el estudio de metástasis

El cáncer mamario humano se caracteriza por una heterogeneidad morfológica, genética y molecular. De hecho las lesiones premalignas e invasivas que pueden ocurrir en la glándula mamaria humana presentan diferentes características bioquímicas y moleculares, por lo que se considera al cáncer mamario como un conjunto de enfermedades (Medina, 2000).

Existen modelos animales de inducción de cáncer mamario que reúnen ciertas características que los hacen de gran utilidad en el estudio de diversos aspectos de esta enfermedad. Los modelos animales son herramientas importantes para investigar la patogénesis y el desarrollo de estrategias de tratamiento contra la metástasis; sin embargo, existen pocos modelos *in vivo* para el estudio de la metástasis a pesar del hecho de que los murinos (ratas y ratones) y otros mamíferos (perros y gatos) a menudo desarrollan cáncer de forma espontánea. Por lo tanto, la mayoría de los modelos experimentales de metástasis requieren la inyección o la implantación de células neoplásicas. El estudio de la metástasis en modelos animales pequeños se ha basado a menudo en los análisis histológicos, la amplificación por PCR y la radiografía; sin embargo, los ensayos que utilizan tejidos extirpados están sujetos a limitaciones de muestreo y no pueden evaluar la extensión global de la enfermedad en el animal (Lindner, 2014; Rosol *et al.*, 2003). El bajo número de fármacos que inhiben específicamente la migración de células cancerosas es, en parte, debido a la falta de modelos 3D *in vivo*, capaces de imitar la situación compleja del comportamiento de las células transformadas en el paciente (Thibaudeau *et al.*, 2014).

3.7.1 En ratón desnudo (*nude*) en estudios oncológicos

El descubrimiento del ratón desnudo fue un punto de inflexión sumamente importante para la investigación del cáncer, debido a que permitió el estudio de los tumores humanos *in vivo*. Dentro de las investigaciones en el campo de la oncología para las cuales se han utilizado estos ratones como modelo se deben resaltar los hallazgos obtenidos en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, interferones, interleucinas y pruebas de carcinogenicidad entre otros. Por su condición de inmunodeficientes, los ratones desnudos deben obligatoriamente mantenerse en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas. La categoría microbiológica de los ratones desnudos debe ser la de animales SPF (*Specific Pathogen Free*), esto significa que tendrán su flora intestinal normal pero deberán estar libres de todos aquellos microorganismos específicos capaces de causar infecciones. En condiciones convencionales pueden sobrevivir entre 14 y 30 días. El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija, del diseño y control del ambiente, factores que son críticos para la producción y el mantenimiento del ratón

desnudo. Además, se deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones: 1. El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. 2. La estabilidad ambiental se logra mediante un buen diseño del sistema de ventilación, del control de la temperatura, de la humedad relativa, y de la velocidad y presión del aire. 3. Las áreas de servicios tienen que funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior. Estas están diseñadas específicamente para el lavado y esterilización de insumos, además se debe contar con un depósito de equipamiento, de alimento y lechos; un área de cuarentena; sala de necropsias; e instalaciones para el tratamiento y eliminación de los desechos. 4. Las cajas, rejas, comederos y bebederos que se utilicen para el alojamiento de los animales deben estar de acuerdo con las normativas internacionales en cuanto a su material, dimensiones y diseño; con el objeto de brindar el máximo confort a los ratones y de facilitar en forma eficiente su limpieza y esterilización. La instalación de barreras absolutas brindará la seguridad necesaria para evitar contaminaciones. Existe la necesidad de establecer procedimientos para el tratamiento de todos los insumos que se pondrán en contacto con los ratones desnudos. El alimento debe ser estéril (sometido a autoclave o a irradiación) al igual que el agua de bebida. El ratón desnudo requiere una temperatura más elevada que las cepas tradicionales, se recomienda $25 \pm 1^\circ \text{C}$, y se debe considerar que en caso de alojarlos bajo un flujo laminar de aire continuo necesitarán una temperatura de 28°C para compensar la pérdida de calor corporal con un fotoperíodo uniforme luz/oscuridad de 14–10 horas (Carbone, 2006).

3.7.2 El embrión de pollo como modelo experimental en el estudio de la metástasis

Como complemento de modelos murinos para la diseminación de células tumorales, el sistema del modelo de embrión de pollo ofrece una serie de ventajas únicas para estudiar los múltiples pasos de la metástasis de células tumorales. Dado que el sistema linfóide no es completamente funcional hasta fases avanzadas del desarrollo embrionario (1 a 2 días antes de la eclosión, en el día 21), éste sirve como un hospedero natural inmunodeficiente capaz de sostener tejidos injertados y células sin restricciones especies-específicas. Diferentes sistemas del modelo de embrión de pollo permiten realizar un análisis

exhaustivo de etapas y aspectos específicos de la diseminación de células cancerosas tales como: la colonización, intravasación y extravasación en la metástasis o angiogénesis inducida por células tumorales, injertos con “matrigel” o ambos. El principal componente de estos sistemas, es el uso de un tejido especializado, es decir, la membrana corioalantoidea (MCA), rica en vasos sanguíneos que proporciona un ambiente único de apoyo para la formación de un tumor primario. Además de nutrir xenoinjertos en desarrollo, la MCA proporciona conductos para la intravasación de células tumorales, diseminación, arresto vascular y finalmente la extravasación celular para formar focos micrometastásicos (Fig. 3). Debido a la facilidad experimental de manipulación antes o después del injerto de células tumorales, la MCA permite identificar los pasos individuales de la cascada metastásica donde las moléculas específicas o procesos bioquímicos manifiestan su implicación funcional (Deryugina, 2008).

3.7.2.1 El desarrollo de la MCA, estructura y formación

Durante la incubación del embrión de pollo, se forma la MCA entre los días 5 y 6 debido a la fusión parcial del corion y el alantoides (Melkonian *et al* 2002). La cámara, funciona como los pulmones del embrión, se desarrolla rápidamente y rodea a todo el embrión en día 12 de incubación. Histológicamente, la MCA contiene tres capas principales: el ectodermo, unido a la membrana de la cáscara; el mesodermo, enriquecido con vasos sanguíneos, los componentes del estroma; así como el endodermo, frente a la cavidad alantoidea. Para el día 10 de incubación, el ectodermo de la MCA se encuentra completamente desarrollado con plexos capilares, lo que representa una red de pequeños capilares, la conexión de las redes de vasos sanguíneos arteriales y venosos. La MCA es una estructura muy fina, que raramente sobrepasa los 100 μm a través de las tres capas. Ya que la MCA es tan delgada, permite una detallada visualización de diferentes planos a través de microscopía DIC, extendiéndola sobre un portaobjetos de vidrio, se pueden observar tumores, procesos metastásicos y angiogénicos, así como células tumorales fluorescentes dentro y fuera de los vasos sanguíneos.

La naturaleza altamente vascularizada de la MCA promueve considerablemente la diseminación de células tumorales (Armstrong, 1980; Murphy, 1913; Ossowski y Reich, 1980). Las células tumorales se injertan en un volumen de 20 a 30 μL en los vasos sanguíneos de la MCA a través de una pequeña ventana realizada en la cáscara del huevo. Dependiendo del número de células tumorales y su capacidad de proliferación, los tumores primarios en la MCA pueden alcanzar hasta 500-600 mg en los días 5 y 7 después de la inoculación celular. Sorprendentemente, en este plazo, no sólo las células tumorales agresivas desarrollan tumores de tamaño considerable, sino que también pueden escapar del sitio primario, invadir los alrededores, intravasarse en los vasos sanguíneos, llegar a porciones distales de la MCA y órganos internos, donde las células se difunden, extravasan y forman focos micrometastásicos. Por lo tanto, similar al modelo murino, todas las etapas de la cascada metastásica se recapitulan en el embrión de pollo en un período muy corto de tiempo (Deryugina, 2008).

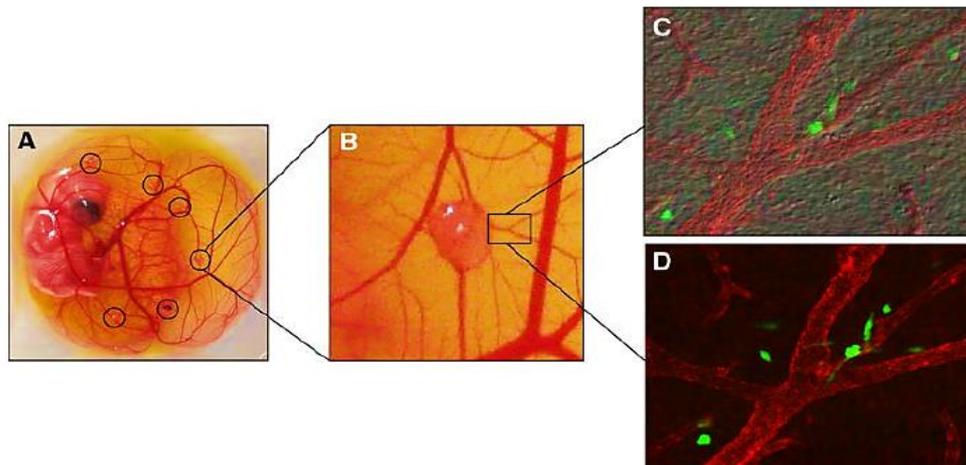


Figura 3. Diseminación de células tumorales que migraron de un tumor primario desarrollado sobre la MCA en el embrión de pollo. **A)** Embrión de pollo fuera del cascarón con microtumores (círculos) desarrollados 5 días después del injerto con células GFP dentro de una gota de matrigel. **B)** Amplificación de un microtumor. **C) y D)** Células que expresan GFP visualizadas en los vasos sanguíneos de la MCA 200x (Deryugina, 2008).

3.7.2.2 Ventajas del modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis

El embrión de pollo ha sido utilizado por mucho tiempo para estudios en el campo de la biología del desarrollo debido a su fácil manejo, rápido desarrollo y embriogénesis temprana similar a la de los humanos (Ossowski y Reich, 2014). Además, ha contribuido al conocimiento en áreas como la inmunología, genética, virología, toxicología, entre otras. Las ventajas que ofrece el embrión de pollo como modelo para el estudio de la metástasis en el CaM son: 1) Es un hospedero inmunodeficiente y, por tanto, puede aceptar el trasplante de una gran variedad de tejidos de otros organismos sin rechazarlos. 2) Su adquisición y mantenimiento son económicos. 3) Es posible estudiar los procesos de formación de los vasos sanguíneos a partir de existentes (angiogénesis) alrededor del crecimiento tumoral. 4) Por sus características transparentes, se pueden observar fácilmente tejidos y células sin tener que sacrificarlo y todas las partes del embrión son accesibles para el muestreo y la manipulación experimental. 5) Las condiciones ambientales para incubar los huevos son simples (Chambers *et al.*, 1982). Recientemente hemos implementado con éxito el modelo de embrión de pollo para el estudio de la formación de tumores a partir de células de CaM humano (Reporte de Servicio Social, Rosa Isela Mendizábal Riveros, Unidad Xochimilco, UAM, 2014).

Tanto el ratón *nude* como el embrión de pollo han sido ampliamente utilizados para el estudio de factores tanto preventivos como terapéuticos, los resultados son altamente reproducibles y reúnen las características anteriormente señaladas para un buen modelo animal de cáncer mamario (Medina 2000; Thompson, 2000). Con estos modelos animales se pueden desarrollar protocolos tanto de tipo terapéutico como preventivo. Los protocolos de tipo terapéutico se caracterizan por aplicar los carcinógenos y esperar a que los tumores se desarrollen y alcancen un tamaño determinado. Posteriormente, la eficacia del agente terapéutico se evalúa observando su impacto sobre el crecimiento y/o tamaño final de los tumores. Por otra parte, en un experimento típico de prevención, se contrastan los efectos sobre la respuesta al carcinógeno de un potencial agente preventivo con un grupo control que recibe un tratamiento placebo. La respuesta al carcinógeno se evalúa midiendo cuántos animales desarrollaron tumores (incidencia), el número de tumores, el crecimiento y el tamaño final de los mismos (Thompson, 2002; Clarke, 1997).

4. ANTECEDENTES

4.1 Terapias combinadas usando Retinoides y antiestrógenos

Los retinoides tienen efectos antimigratorios en las células de cáncer de mama humano y comparten algunas características con los antiestrógenos, aunque las dianas moleculares implicadas aún no se han identificado en cualquiera de los casos. Ambos agentes interactúan con receptores que son factores de transcripción nucleares activados por ligandos, tienen un efecto citostático en lugar de uno citotóxico (Marth, 1985; Preisler, 1992).

Otros estudios, sin embargo, indican que los retinoides y antiestrógenos tienen efectos sinérgicos en la inhibición de la proliferación y migración de células de carcinoma mamario humano tanto *in vitro* (Koga, 1991) como *in vivo* (Anzano, 194), proporcionando evidencia de diferentes vías de inhibición. Los retinoides y antiestrógenos actúan a través de mecanismos no sólo de interés biológico intrínseco, sino como agentes que pueden ser utilizados clínicamente.

Otros estudios en los que se utiliza ATRA en combinación con algunos antiestrógenos son:

- ❖ Ribeiro *et al* 2013, demostraron que la combinación de ATRA con el metabolito activo de tamoxifeno “endoxifeno” aumenta la inhibición de la proliferación y el potencial de migración de células de cáncer de melanoma. Por otra parte, las combinaciones estudiadas no son tóxicas para células endoteliales, ni para órganos como el hígado, en un modelo *in vivo* (rata). Teniendo en cuenta este panorama, las combinaciones del ATRA con endoxifeno pueden ofrecer una estrategia poderosa para el tratamiento del melanoma maligno, posiblemente con efectos menos tóxicos que los tratamientos actualmente disponibles.

- ❖ Danforth *et al* 2004, demostró que ATRA en combinación con Tamoxifeno, representan dos medios importantes para mejorar la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 e inducir su apoptosis. Ambos agentes

demuestran sinergismo por un mecanismo anti-proliferativo importante con el potencial para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama a nivel primario, local / regional, o sitios distantes.

- ❖ Un estudio fase II, con una media de seguimiento de 150 meses, reporta haber utilizado la combinación de beta interferón, ATRA y Tamoxifeno y los resultados han sido satisfactorios en pacientes con CaM metastásico, demostrándose su efectividad y moderada toxicidad, aunque los mayores efectos benéficos se obtienen a largo plazo (Recchia *et al.*, 2009). En otro estudio donde se ha utilizado ATRA con un agente quimioterapéutico (Paclitaxel) se han observado efectos más rápidos, en 3 semanas, aunque con respuestas más moderadas y con mayores efectos secundarios (Bryan *et al.*, 2011).

Distinguir los mecanismos moleculares implicados en la acción de los retinoides es de vital importancia, más aún, si actúan de manera sinérgica con los antiestrógenos. Recientemente se ha suscitado una polémica con respecto al antiestrógeno ICI, algunos autores como Bruton *et al.*, 2007, han demostrado que ICI cuenta con la capacidad para inhibir la carcinogénesis en una amplia variedad de células pre-neoplásicas y en células de carcinoma, debido a que ejercen múltiples efectos en contra de la invasión y progresión del tumor; tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular, la motilidad, la invasión e inducir la diferenciación de las células de CaM y en pacientes que han sido diagnosticadas positivas para receptores de hormonas esteroideas. Por otro lado, hay estudios en los que se demuestra un efecto totalmente diferente con este antiestrógeno.

Pandey *et al* 2009, encontraron que ICI estimula, a través de la activación de GPER, la proliferación y la migración en las células de cáncer de mama MCF-7, lo que indica una acción similar a los estrógenos.

De aquí radica la importancia de conocer los mecanismos a través de los que actúan ambos fármacos solos y en combinación, para ser utilizados de forma racional en el tratamiento del cáncer de mama.

Si bien se ha demostrado la capacidad por sí solos de regular la proliferación, migración y apoptosis de células de CaM humano, tanto del ácido retinoico (Flamini, 2014) como Faslodex (ICI 182,780), debido a su efecto antiestrogénico puro (Jiménez-Salazar *et al.*, 2014), estas observaciones nos han llevado a plantear una terapia donde se utilice un antiestrógeno, más potente y selectivo (Faslodex), en combinación con ATRA, midiendo sus efectos sobre migración en la línea celular de CaM MCF-7/GFP (transfectadas para que expresen la proteína verde fluorescente) y sobre la metástasis en un modelo de embrión de pollo inoculado con esta línea celular.

En el Laboratorio de Endocrinología Molecular, de la Unidad Iztapalapa de la UAM, hemos desarrollado un modelo de embrión de pollo en el estudio de la metástasis de células de CaM. Los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto de Servicio Social titulado “Estandarización de un modelo de embrión de pollo en el estudio del CaM”, registrado en 2014 en la Universidad Autónoma Metropolitana, demuestran que en el día 10 de desarrollo embrionario, en el cual se encuentran diferenciados los órganos, es posible inocular células MCF-7 de CaM en vasos sanguíneos de la MCA, obteniendo tumores 7 días después. El número de tumores así como su tamaño depende del número de células MCF-7 inoculadas. Este modelo es más económico que el uso de ratones *nude* y el análisis de la metástasis es más fácil con células MCF-7/GFP marcadas con la proteína verde fluorescente, ya que se visualizan de forma sencilla en los vasos sanguíneos de la MCA, descartando cualquier otro tipo celular.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene la terapia combinada de ATRA e ICI sobre la migración *in vitro* y la metástasis de células de carcinoma mamario humano, en un modelo de embrión de pollo?

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaM representa uno de los problemas de salud con más muertes oncológicas en mujeres mexicanas mayores de 20 años, por lo que se han dedicado muchos esfuerzos en combatir esta enfermedad.

A pesar de que se han desarrollado múltiples estrategias experimentales contra el CaM, todavía no se tienen terapias totalmente efectivas que puedan atacar a los diferentes tipos de CaM. Por tal razón, se han hecho innumerables esfuerzos en desarrollar terapias más específicas, con mayor potencia biológica, así como combinaciones de agentes anticancerígenos que sean más accesibles económicamente y sus efectos secundarios sean mínimos (Bruton, 2007).

Estas observaciones nos han llevado a plantear una novedosa combinación en donde se utilice una terapia biológica antiestrogénica (Faslodex), con un agente quimiopreventivo (ATRA), que pueda potenciar los efectos para inhibir la migración y la metástasis, ambos fármacos están disponibles comercialmente y se utilizan en el tratamiento del cáncer.

Además, en el presente trabajo se describe a detalle la utilización de un modelo de embrión de pollo para medir los efectos de los compuestos en la inhibición de la metástasis y que ha sido implementado en nuestro laboratorio.

7. HIPÓTESIS

El tratamiento combinado de ATRA e ICI inhibirá de manera más efectiva la migración y la metástasis de células de carcinoma mamario humano, en comparación a los tratamientos individuales.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto combinado de ATRA e ICI sobre la migración *in vitro*, así como sobre la metástasis *in vivo*, de células MCF-7/GFP de carcinoma mamario humano.

9. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de ICI o ATRA sobre la migración *in vitro* de células MCF-7/GFP.
- Analizar el efecto de ICI, en combinación con ATRA, sobre la migración *in vitro* de células MCF-7/GFP.
- Evaluar tres diferentes técnicas de inoculación en el embrión de pollo con la línea celular MCF-7/GFP.
- Evaluar el efecto de ICI, ATRA o su combinación, sobre la metástasis en un modelo de embrión de pollo.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Línea celular de CaM

Se utilizó la línea celular derivada de carcinoma mamario humano MCF-7/GFP (Cell Biolabs, Inc; número de catálogo AKR-211), las cuales fueron modificadas genéticamente para que expresen constitutivamente la proteína verde fluorescente. Estas células son estrógeno dependientes, positivas para RE α , RE β , así como para los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X de los rexinoides (RXR) (Mu *et al.*, 2000).

10.2 Cultivo celular

Las células MCF-7/GFP se cultivaron en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) sin rojo fenol (ya que se ha demostrado que presenta actividad de tipo estrogénica) y suplementado con 5% de suero de feto bovino (SBF) y 2.5% , L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (100 μ M), piruvato de sodio (100 μ M), una solución comercial de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 μ g/mL) y de antimicótico (anfotericina B 250 ng/mL). Las células se incubaron a 37° C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, para mantener un pH adecuado en el medio de cultivo. Se utilizó tripsina EDTA al 0.25% (2 mL), para sub-cultivar en cajas Petri y de 6 pozos. Una vez subcultivadas, 24 h antes de aplicar los tratamientos, las células fueron tratadas con SBF + carbón/dextrán (62.5 mg/625 mg por 100 mL de SBF; Sigma), con la finalidad de eliminar los esteroides del SBF.

10.3 Análisis de ATRA, ICI y su combinación sobre la migración de células MCF-7/GFP

Se evaluó la capacidad migratoria de las células MCF-7/GFP mediante el ensayo de “Cierre de la Herida” o “*Wound Healing*”. Para ello se subcultivaron 250,000 células en cajas de 6 pozos a 37° C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% con medio DMEM+SBF durante 48 h, posteriormente al 2.5% y finalmente con SBF+carbón/dextrán al 2.5%. Al tercer día, a la monocapa de células se les realizó una herida con una punta estéril de 200 μ L, se lavaron, se retiró el medio y se les agregó AraC (Clorhidrato de Citosina β -D-arabinofuranosido, Sigma México; inhibidor selectivo de la síntesis de ADN) en

concentración 10 mM y se incubaron durante una hora a 37° C. Posteriormente las células fueron tratadas con uno de los siguientes compuestos: DMSO [10^{-3} M], E₂ [10^{-9} M], ATRA + E₂ [10^{-9} a 10^{-6} M], ICI+ E₂ [10^{-9} a 10^{-7} M], y ATRA + ICI + E₂ [10^{-9} M] por 48 h. Al cabo de ese periodo, se les retiró el medio, se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con Cristal Violeta al 1% durante 15 min, seguido por dos lavados con PBS. Por último, se tomaron fotografías (10x) de la herida por cada tratamiento a las 48 h, se midió la distancia en cinco puntos diferentes con el programa ImageJ© y se analizaron los datos en el programa estadístico GraphPad Prism.

10.4 Modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis

10.4.1 Incubación del huevo fertilizado

Se utilizaron huevos fertilizados, viables al tratamiento y libres de patógenos de la industria farmacéutica e investigación del proveedor Aves Libres de Patógenos Específicos (México, D.F.) y fueron colocados en una incubadora a 37° C con un 50% de humedad. .

10.4.2 Técnicas de inoculación en el embrión de pollo

Con la finalidad de determinar la técnica de inoculación de células MCF-7/GFP en el embrión de pollo que sea más conveniente para estudiar la metástasis, se implementaron tres técnicas diferentes y se evaluó el número de embriones con desarrollo de tumores y con el menor índice de mortalidad. Los métodos de inoculación fueron: A) a través del cascarón (Fig 4), B) en la membrana corioalantoidea (Fig 5) y C) en vena de la MCA (Fig 6).

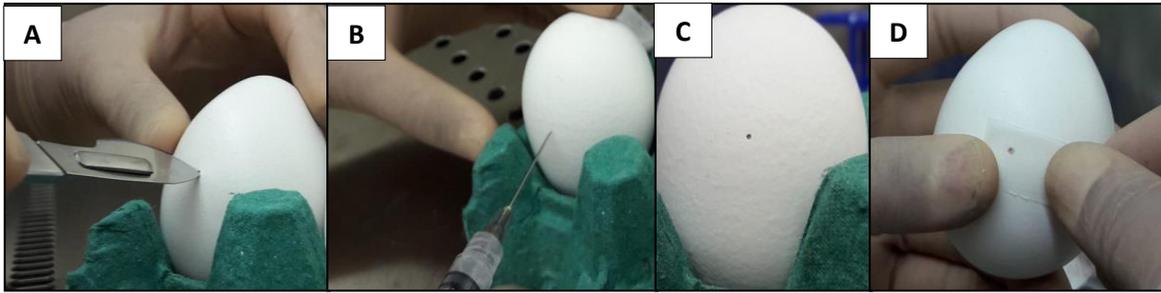


Figura 4. Procedimiento de inoculación a través del cascarón. Se seleccionaron huevos fertilizados del día 10 de desarrollo embrionario, los cuales fueron desinfectados con etanol al 70% y colocados en posición vertical. **A)** Punción con un bisturí en el cascarón a la altura de la cámara de aire. **B)** Inoculación con una jeringa de 0.5 mL cerca del saco vitelino, con 10^6 células MCF-7/GFP en un volumen de 30 μ L. **C)** y **D)** Se cubrió el orificio con Parafilm M[®], los huevos fueron incubados nuevamente y en el sexto día se analizaron los embriones en busca de tumores. Este experimento se realizó en tres experimentos independientes por triplicado, siendo el número (n) total de 9.

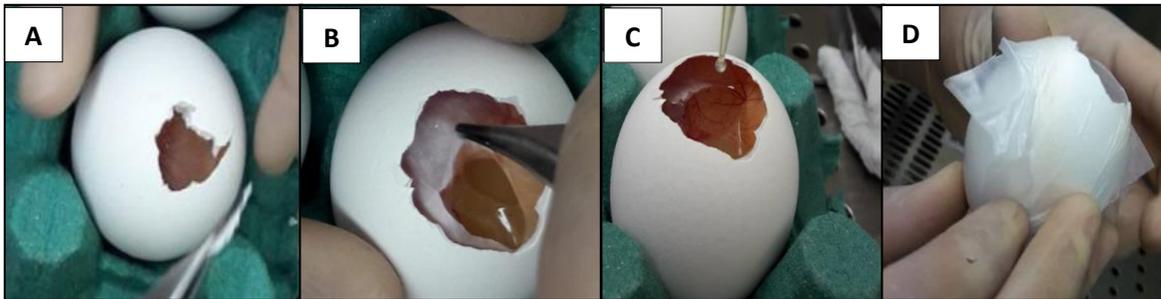


Figura 5. Procedimiento de inoculación en la MCA. La figura muestra el proceso de inoculación de los embriones de pollo en el día 10 mediante la inoculación en la MCA, de izquierda a derecha podemos observar la secuencia del proceso: **A)** Se realizó una perforación en cascarón de aproximadamente 1cm^2 a la altura de la cámara de aire, **B)** Se retiró la membrana del cascarón (testácea), **C)** Se depositaron 10^6 células MCF-7/GFP en un volumen de 30 μ L con una punta de 200 μ L y finalmente **D)** Se cubrió el orificio realizado con Parafilm M[®] e incubaron nuevamente. Este procedimiento se realizó en tres experimentos independientes por triplicado, siendo el número (n) total de 9.

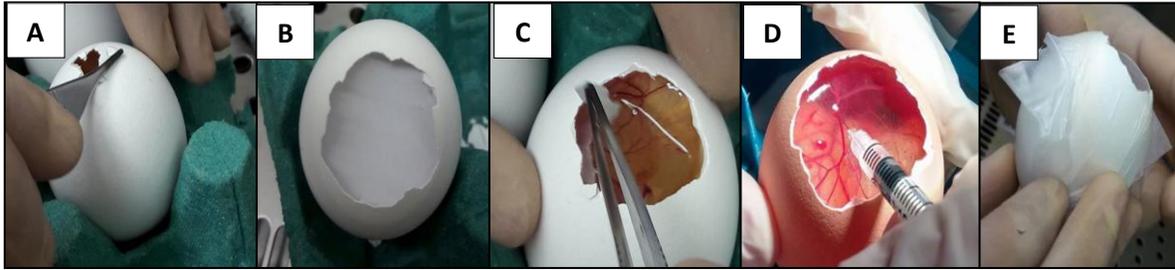


Figura 6. Procedimiento de inoculación en vena de la MCA. Esta figura muestra la inoculación en vena de la membrana corioalantoidea en el día 10 de desarrollo embrionario. Se puede observar un procedimiento muy similar al descrito anteriormente. **A)** Perforación de aproximadamente 1cm^2 a la altura de la cámara de aire, **B)** Testácea, **C)** Se retiró la membrana del cascarón (testácea), **D)** Se depositaron 10^6 células MCF-7/GFP en un volumen de $30\ \mu\text{L}$ en una vena de la MCA con una jeringa para insulina en un volumen de $30\ \mu\text{L}$, **E)** Se cubrió el orificio realizado con Parafilm M® e incubaron nuevamente. Este procedimiento se realizó en tres experimentos independientes por triplicado, siendo el número (n) total de 9.

10.4.3 Análisis de ATRA, ICI y su combinación sobre la inhibición de la metástasis en el modelo de embrión de pollo

Se utilizaron un total de 45 embriones libres de patógenos, en el día 1 fueron incubados a 37°C con un 50% de humedad, en el día 10 fueron inoculados con una jeringa para insulina de $0.5\ \text{mL}$ en una vena de la MCA y divididos en 5 grupos: DMSO [$10^{-3}\ \text{M}$], MCF-7/GFP (10^6 células), ATRA [$10^{-9}\ \text{M}$] + MCF-7/GFP (10^6 células), ICI [$10^{-9}\ \text{M}$] + MCF-7/GFP (10^6 células), ATRA + ICI [$10^{-9}\ \text{M}$] + MCF-7/GFP (10^6 células), todos ellos en un volumen final de $30\ \mu\text{L}$. Este procedimiento se realizó en tres experimentos independientes por triplicado, siendo el número (n) total de 9.

10.4.4 Frotis de los tumores

Los tumores encontrados fueron separados del órgano con pinzas y bisturí, se colocó una pequeña muestra del tumor extendida entre el porta y el cubreobjetos, posteriormente fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia.

10.4.5 Evaluación de la metástasis en el embrión de pollo post-inoculación

Para la evaluación de la metástasis en presencia y ausencia de cada uno de los tratamientos, todos los embriones fueron analizados de forma independiente seis días después de ser

inoculados. Se buscaron manchas blanquecinas o protuberancias anormales en todo el embrión, con especial énfasis en órganos tales como: corazón, hígado, cerebro e intestino con ayuda de un microscopio estereoscópico. Para corroborar si los tejidos anormales encontrados se trataban de tumores, se realizaron frotis de cada muestra y fueron analizadas bajo un microscopio de fluorescencia (ZOE™), debido a la capacidad que tienen estas células de fluorescer se confirmó la presencia de tumores en el embrión (Fig. 7). Cabe señalar que los principales hallazgos tumorales se detectaron en corazón e hígado.

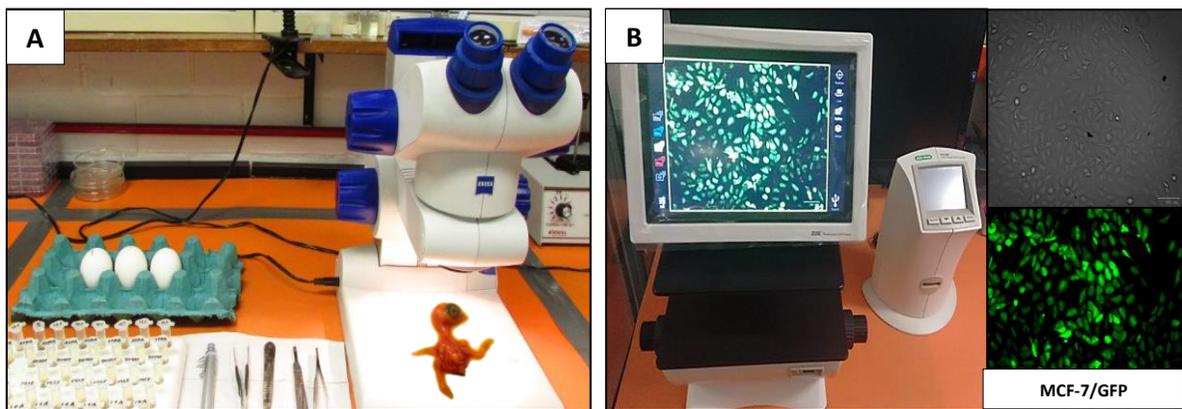


Figura 7. Microscopios utilizados para el estudio de la metástasis. A) Microscopio estereoscópico para detectar tumores en el embrión. B) Microscopio de fluorescencia (ZOE™) para detectar la presencia de la línea celular MCF-7/GFP de los frotis obtenidos de cada tumor encontrado post-inoculación.

10.4.6 Medidas obtenidas de los tumores encontrados post-inoculación

Los tumores encontrados se midieron longitudinal y verticalmente con ayuda de un vernier y se determinó su volumen con la fórmula matemática $V = 4/3 \pi r^3$ expresado en mm^3 (Fig. 8).



Figura 8. Medición de los tumores encontrados. Tumor encontrado en corazón, medido horizontal y verticalmente con ayuda de un vernier.

10.4.7 Evaluación de la metástasis por medio de resonancia magnética (RM) 7 teslas

Este estudio se dividió en tres fases: **1)** Análisis del embrión dentro del huevo, **2)** Solo el embrión y **3)** Muestra de corazón e hígado con los diferentes tratamientos (DMSO, ATRA, ICI y ATRA más ICI). Se realizó un estudio por cada fase, todos los embriones fueron analizados seis días después de ser inoculados con 1×10^6 células MCF-7/GFP en vasos sanguíneos de la CAM.

10.5 Análisis Estadístico

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

11. RESULTADOS

11.1 Efectos de ATRA, ICI o su combinación sobre la migración celular

(Wound Healing Assay)

Dado que el E_2 es capaz de inducir la migración celular en líneas celulares de cáncer de mama que expresan el $RE\alpha$, los experimentos se diseñaron de tal manera que se analizó el efecto de ATRA, ICI o su combinación sobre la inhibición de la migración de células MCF-7/GFP inducida por E_2 , en experimentos realizados a las 48 h de incubación y utilizando como testigo 10^{-3} M DMSO. Además, todos los experimentos se realizaron en presencia de 10 mM AraC, inhibidor selectivo de la replicación del ADN, con la finalidad de que el efecto a estudiar sea sobre la migración y no sobre la proliferación celular. En la Fig. 9 se observa que el cierre de la “herida” inducido por el E_2 es mayor en un 80% aproximadamente, en comparación de las células incubadas con DMSO.

La capacidad de inhibir la migración se analizó incubando ATRA (Fig. 10) en concentraciones crecientes desde 10^{-9} hasta 10^{-6} M o de ICI (Fig. 11), desde 10^{-9} hasta 10^{-7} M], en presencia de 10^{-9} M de E_2 mediante el ensayo cierre de herida durante 48 h de incubación.

Se determinó que la menor concentración estudiada (10^{-9} M) de ambos fármacos es suficiente para inhibir la migración de las células MCF-7/GFP, inducida por E_2 , ya que no hay diferencias significativas con la siguiente concentración más alta ($p > 0.05$). Estos resultados sirvieron para diseñar el experimento utilizando la combinación de ATRA e ICI.

Cuando se analizó la combinación de ambos compuestos sobre la migración de células MCF-7/GFP, se observó que existe una inhibición mayor a la observada cuando los tratamientos son aplicados de forma individual, lo que podría indicarnos un efecto de tipo sinérgico (Fig. 12).

Esto es conveniente cuando se quiera transpolar a posibles tratamientos en pacientes, ya que se espera que a menor concentración de fármacos utilizada se tenga menores efectos tóxicos.

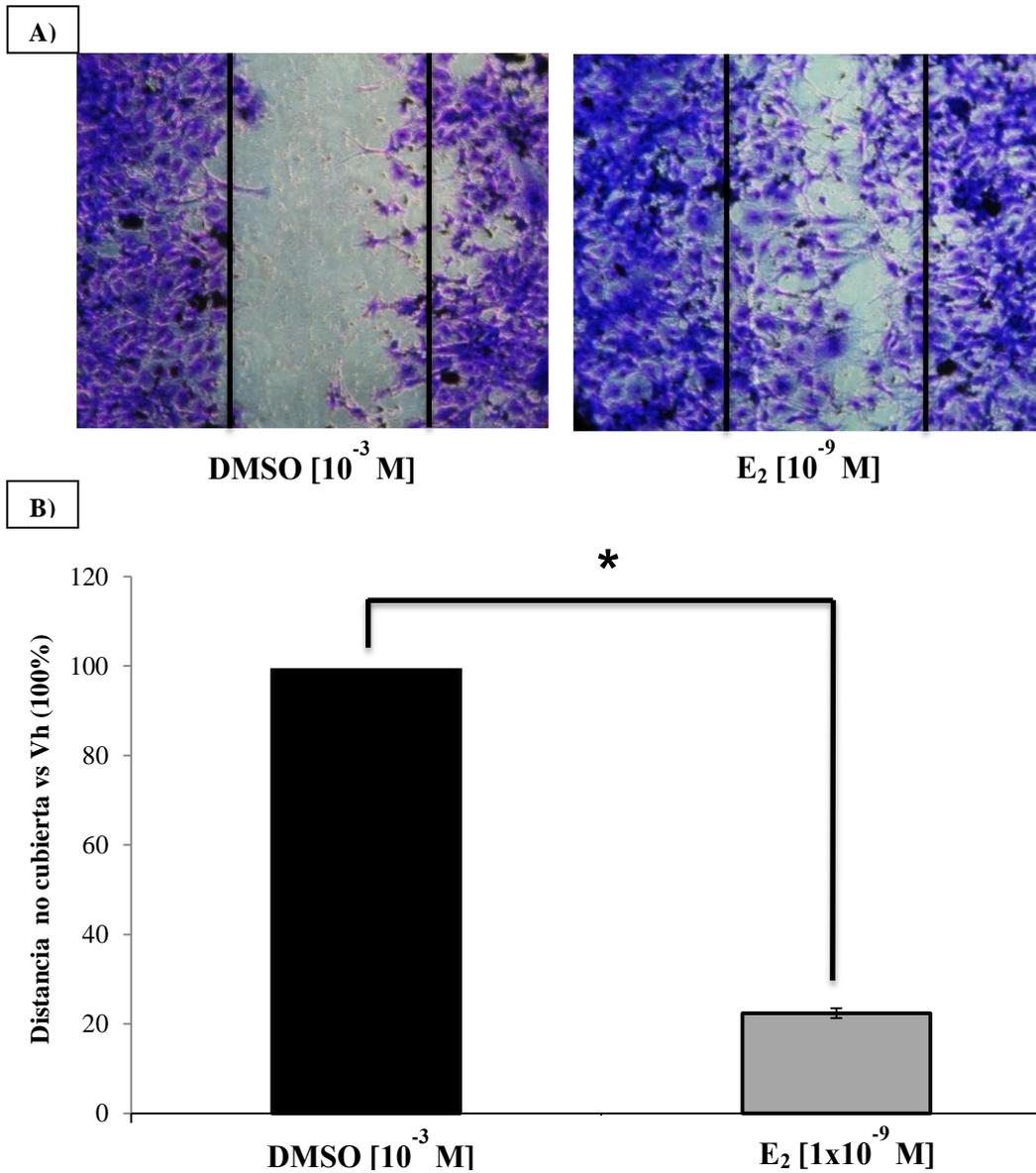


Figura 9. El estradiol induce la migración de la línea celular MCF-7/GFP, ocasionando el cierre de la “herida” en una monocapa. A) Las microfotografías muestran el efecto de la estimulación del E₂ [10^{-9} M] en la migración celular de la línea MCF-7/GFP en comparación con las células incubadas con Vh [DMSO; 10^{-3} M] durante 48 h. **B)** La gráfica evidencia el efecto del cierre de la “herida”, donde la barra negra (Vh) representa la distancia no cubierta con un 100 %, mientras que en la barra gris se graficó el área no cubierta por efecto del E₂. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco (*) indica la significancia estadística de $p < 0.001$, obtenida mediante una prueba Tukey.

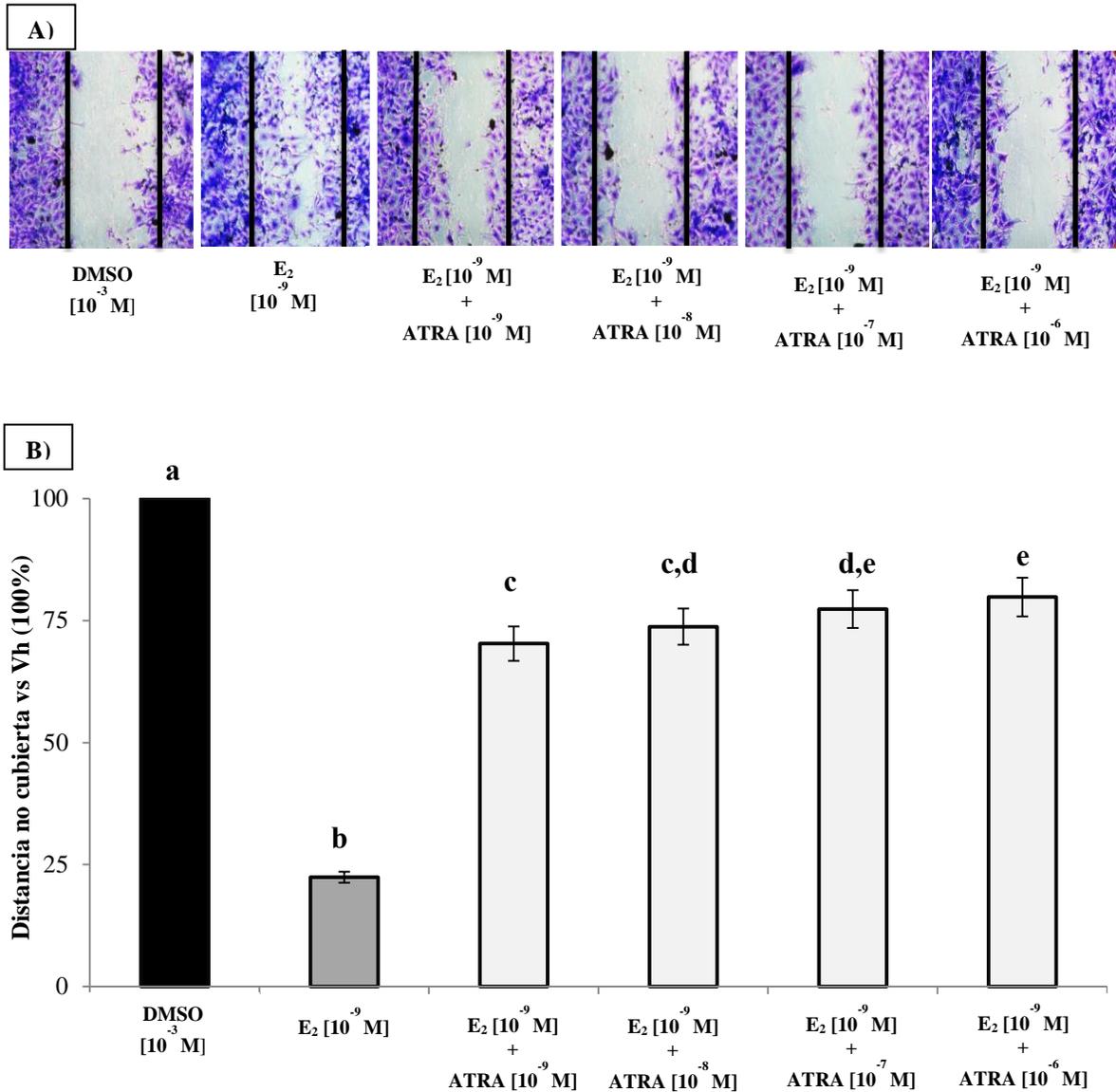


Figura 10. El efecto del ATRA sobre la inhibición de la migración, inducida por E₂, de células MCF-7/GFP. A) Las micrografías muestran el efecto de ATRA, a diferentes concentraciones, a las 48 h de incubación. **B)** La gráfica representa el efecto del ATRA [10⁻⁹ M a 10⁻⁶ M] en la inhibición de la migración en presencia de E₂ [10⁻⁹ M] a las 48 h entre 70 y 79% en relación al tratamiento con el Vh, que representa el 100% de la distancia no cubierta de la “herida”. La gráfica representa el promedio +/- DE de tres experimentos independientes por triplicado. Letras distintas entre columnas expresan significancia estadística de * p<0.001 mediante una prueba de ANOVA una vía seguida por una Tukey.

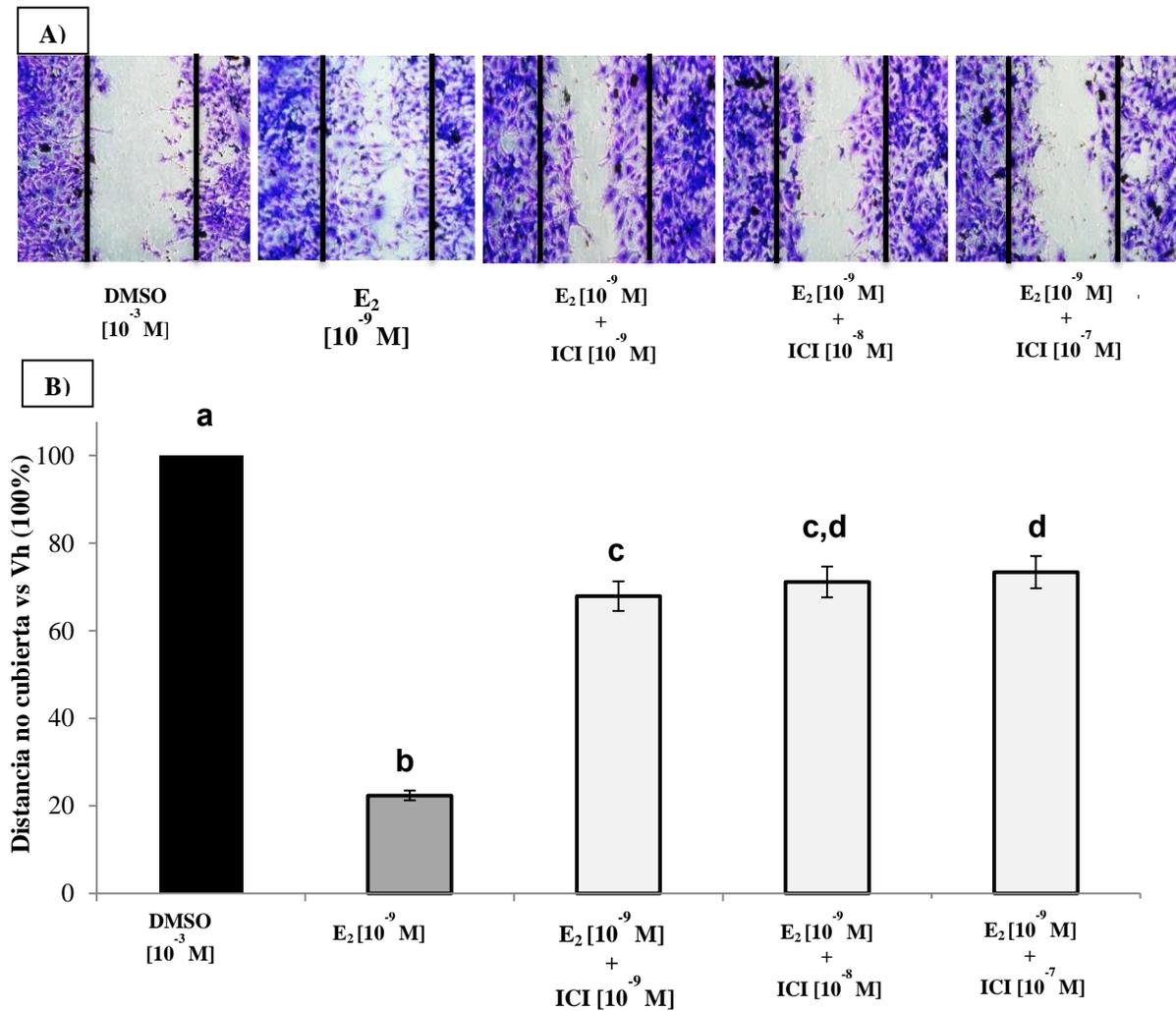


Figura 11. Efecto del ICI en la inhibición de la migración de células MCF-7/GFP, inducida por E₂. A) La figura muestra el efecto del ICI, a diferentes concentraciones [10⁻⁹ M a 10⁻⁷ M] incubadas durante 48 h. B) La gráfica representa el efecto del ICI en la inhibición de la migración inducida por E₂ [10⁻⁹ M] ocasionando que el cierre de la herida sea del 68 al 73% en relación al Vh, expresado como el 100% de la distancia no cubierta de la “herida”. La gráfica representa el promedio +/- DE de tres experimentos independientes por triplicado. Letras distintas entre columnas expresan significancia estadística de * p<0.001 mediante una prueba de ANOVA una vía seguida por una Tukey.

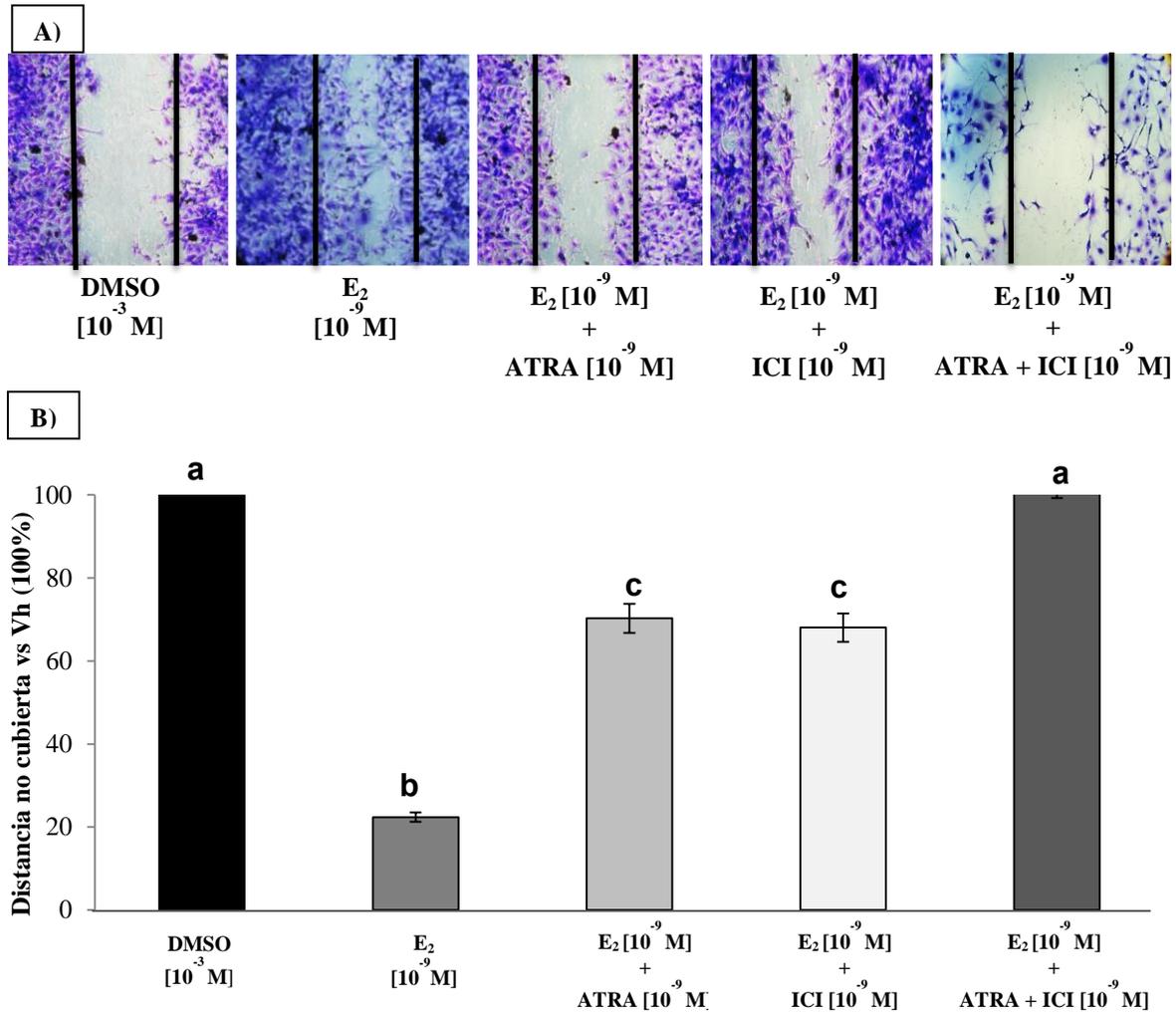


Figura 12. Efecto de la combinación de ATRA e ICI sobre la inhibición de la migración, inducida por E₂, de la línea celular MCF-7/GFP. A) La figura muestra el efecto de ATRA (10⁻⁹ M) e ICI (10⁻⁹ M) durante 48 h de incubación, en comparación con los tratamientos individuales. B) La gráfica muestra el efecto de la incubación de ATRA e ICI sobre la inhibición de la migración (cierre de la herida) en presencia de E₂ [10⁻⁹ M] a las 48 h de incubación. La gráfica representa el promedio +/- DE de tres experimentos independientes por triplicado. Letras distintas entre columnas expresan significancia estadística de * p<0.001 mediante una prueba de ANOVA una vía seguida por una Tukey.

11.2 Efecto de la combinación de ATRA e ICI en la migración y densidad celular de la línea MCF-7/GFP a las 48 h de incubación.

Después de demostrar que la combinación de ATRA e ICI, en concentraciones de 10^{-9} M de cada uno inhibe la migración de células MCF-7/GFP, inducida por E_2 , se analizaron los resultados individuales de cada experimento y se determinó que en todos se observa la disminución considerable del número de células totales (Fig. 13D), lo que ocasiona que se desprendan de las cajas de cultivo, pudiendo ser ocasionado por la muerte de las células.

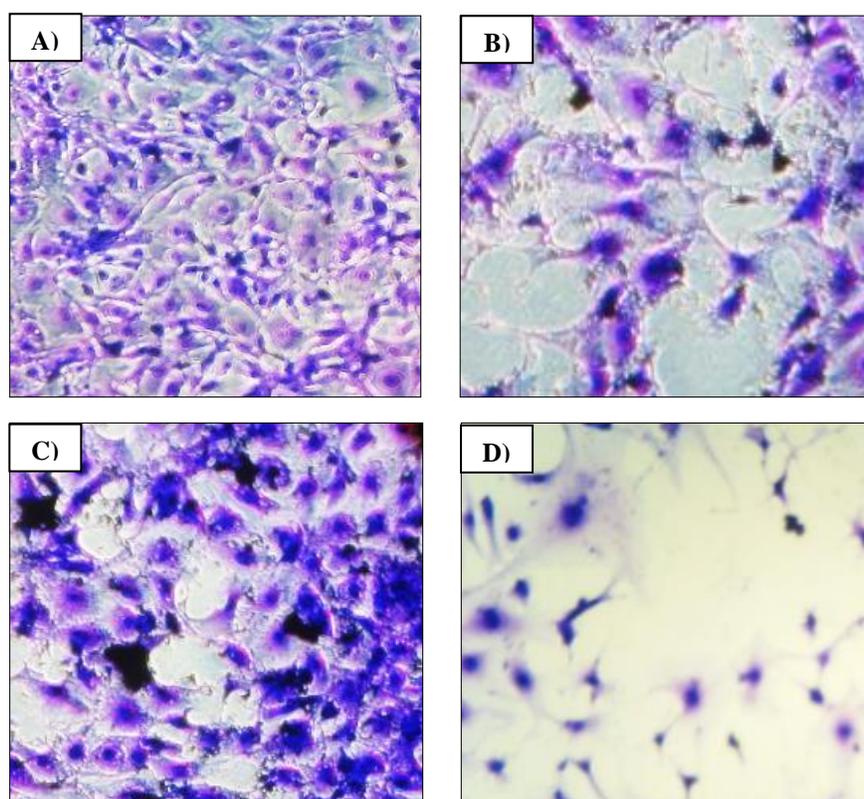


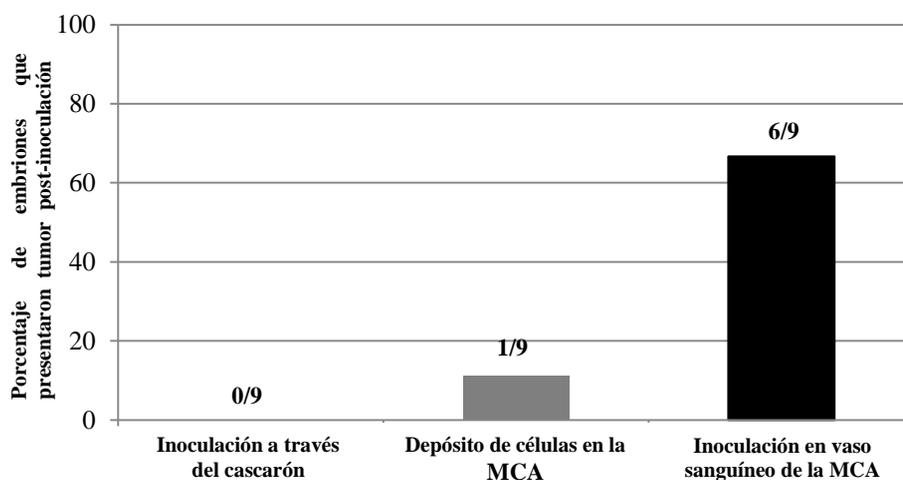
Figura 13. Efecto de la combinación de ATRA e ICI incubados durante 48 h. Las imágenes (40x) muestran el efecto de la incubación con ATRA e ICI en cultivos de células MCF-7/GFP a las 48 h. **A)** Células incubadas con vh, **B)** Células tratadas con E_2 y ATRA, **C)** Células tratadas con E_2 e ICI, **D)** Células tratadas con E_2 , ATRA e ICI, donde se observa que el número de células disminuye considerablemente y la morfología cambia, lo que podría ser indicativo de muerte celular.

11.3 Modelo de embrión de pollo para el estudio de la metástasis

11.3.1 Técnicas de inoculación en el embrión de pollo

Con la finalidad de obtener un método que proporcione embriones viables para el estudio de la metástasis y la evaluación de las terapias utilizadas en el presente estudio, con bajo porcentaje de mortalidad, se implementaron tres técnicas de inoculación: 1) inyectando las células MCF-7/GFP a través del cascarón, 2) depósito de estas células en la MCA y 3) inoculación de las células en los vasos sanguíneos de la MCA.

Los resultados obtenidos indican que la técnica con el mayor porcentaje de embriones viables para el estudio de la metástasis es la inoculación en vasos sanguíneos de la MCA, debido a que seis de nueve embriones (67%) presentaron tumores y sobrevivieron seis días después de ser inoculados con 1×10^6 células MCF-7/GFP, seguido por la técnica de depósito de células en la MCA, donde solo un embrión de nueve (11%) presentó tumores. Finalmente, en la técnica de inoculación a través del cascarón, ningún embrión presentó tumores y la supervivencia fue del 33%.



Gráfica 1. Porcentaje de embriones con tumores post-inoculación. La grafica muestra el porcentaje de embriones que presentaron tumores en el día 16, después de 6 días de haber sido inoculados con 10^6 células MCF-7/GFP. Cada técnica se realizó en tres experimentos independientes con una $n = 9$.

11.3.2 Principales órganos blanco en donde fueron localizados tumores post-inoculación

Se realizó un análisis visual en busca de tumores en todo el embrión, con ayuda de un microscopio estereoscópico, a los seis días después de que los embriones fueron inoculados en un vaso sanguíneo de la MCA con 10^6 células MCF-7/GFP. Los únicos sitios en donde fueron localizados los tumores fueron en corazón e hígado (Fig. 14).

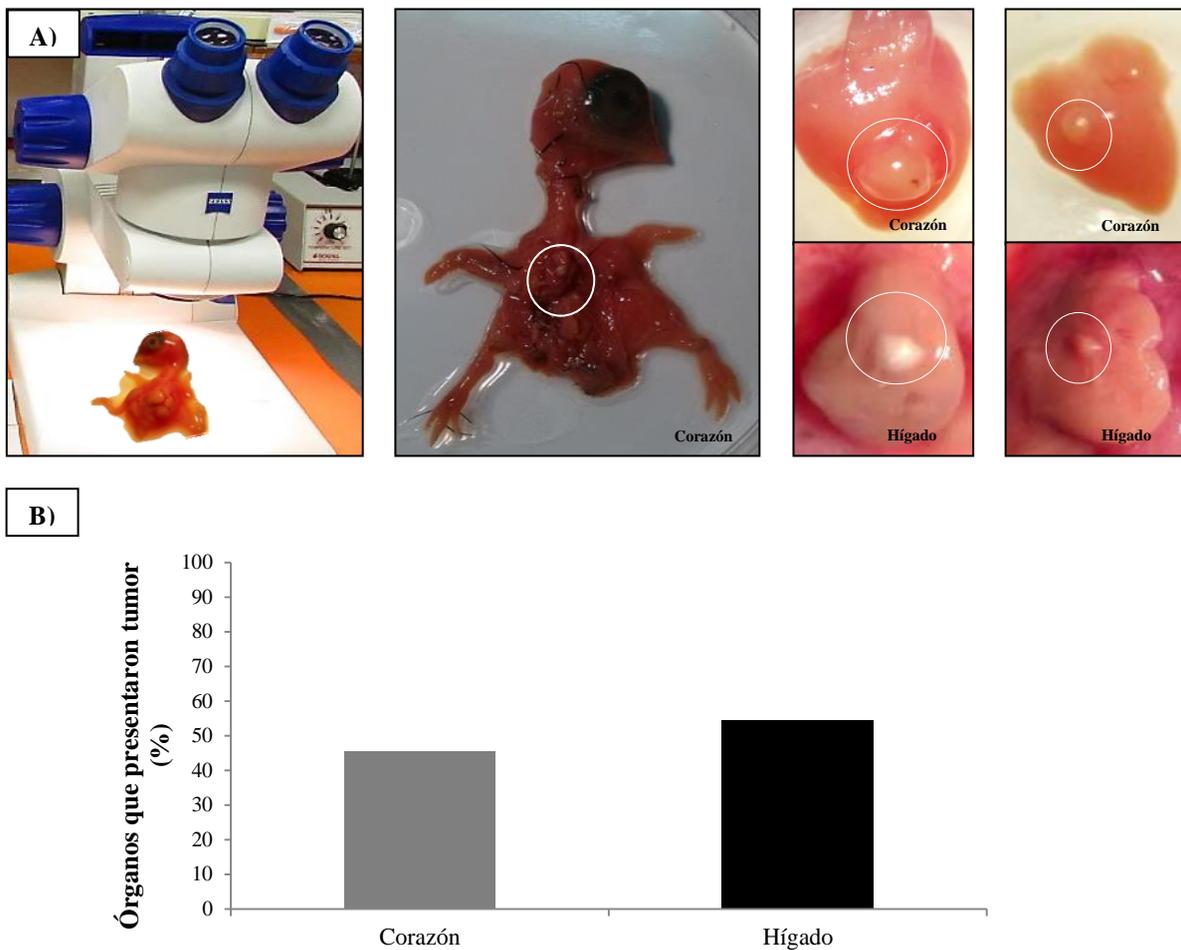


Figura 14. Porcentaje de los principales órganos blanco en donde fueron localizados tumores en el día 16 post-inoculación. A) En el embrión de pollo post-inoculación, donde podemos visualizar tumores y los principales sitios en donde fueron localizados, corazón e hígado. **B)** Tumores detectados en corazón e hígado con un 45.5 y 54.5% respectivamente en el día 16 post-inoculación con 10^6 células MCF-7/GFP. Este estudio se llevó a cabo en tres experimentos por triplicado n = 9 embriones.

11.3.3 Análisis del tumor con el microscopio de fluorescencia

Para determinar si los tejidos anormales encontrados se trataban de tumores inducidos por células MCF-7/GFP, se realizaron cortes de cada uno de ellos y las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia (ZOE™), ya que estas células se encuentran modificadas genéticamente y expresan la proteína verde fluorescente, se esperaba encontrar fluorescencia en todas las muestras obtenidas. Los resultados revelan que todos los tejidos analizados presentaban fluorescencia similar a la expresada por la línea celular MCF-7/GFP, como se muestra en la figura 15.

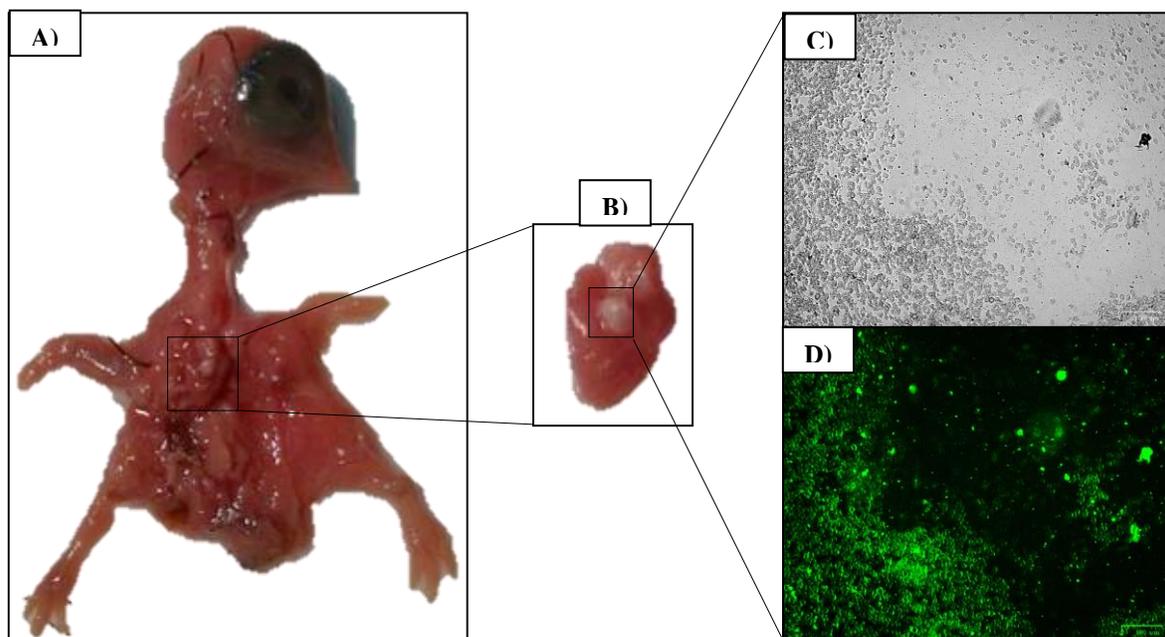


Figura 15. Análisis de tumor visualizado en un microscopio de fluorescencia. Se realizó el análisis del tumor encontrado en el corazón de un embrión en el día 16 después de ser inoculado con 10^6 células MCF-7/GFP y observado en un microscopio de fluorescencia en campo claro y fluorescente.

11.3.4 Efecto de ATRA, ICI y su combinación sobre la inhibición de la metástasis

Se examinó a cada embrión en el sexto día post-inoculación y se contabilizaron los tumores presentes en hígado y corazón de cada tratamiento. ATRA, ICI y su combinación mostraron una inhibición en el número de tumores en comparación a los que se inocularon solamente con la línea celular MCF-7/GFP (Fig. 16).

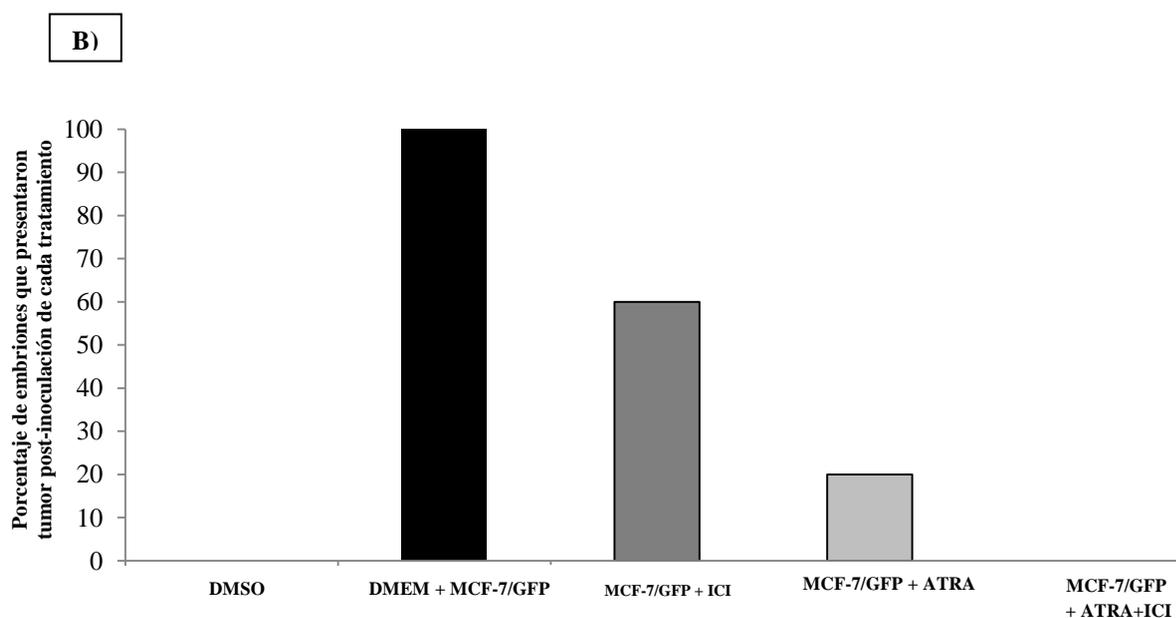
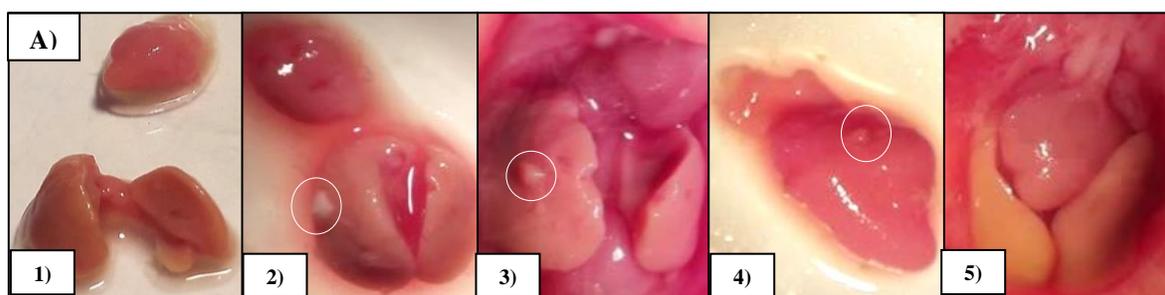
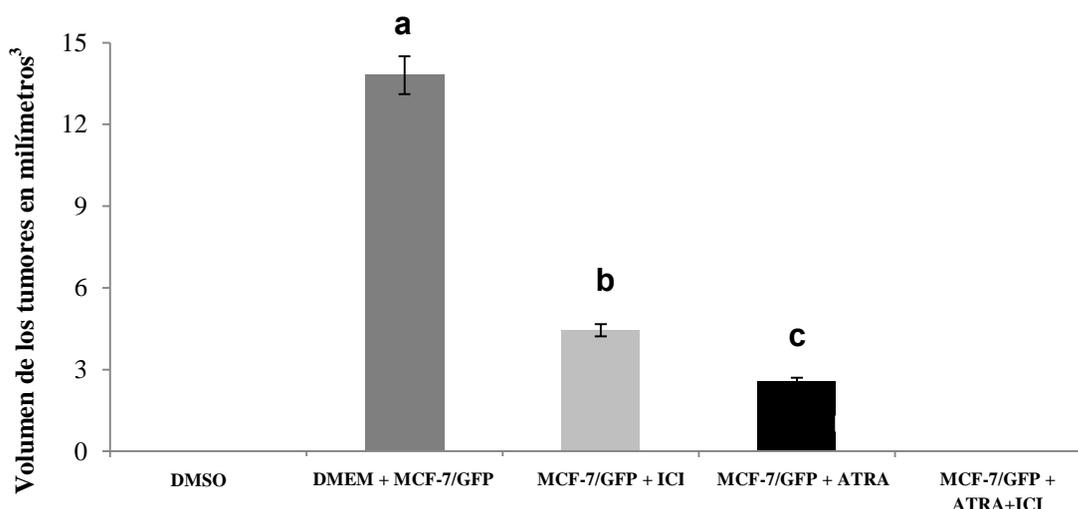


Figura 16. Porcentaje de embriones que presentaron tumores de cada tratamiento. A) Imagen representativa de corazón e hígado de un embrión por cada tratamiento, se muestran con un círculo los tumores encontrados. **1.** Vh [10^{-3} M], **2.** DMEM + MCF-7/GFP (10^6 células), **3.** MCF-7/GFP (10^6 células) + ICI [10^{-9} M], **4.** MCF-7/GFP (10^6 células) + ATRA [10^{-9} M] y **5.** MCF-7/GFP (10^6 células) + ATRA + ICI [10^{-9} M]. B) Gráfica que muestra el porcentaje de embriones que presentaron tumor en el día 16 después de la inoculación con 1×10^6 células MCF-7/GFP todos ellos en un volumen de $30 \mu\text{L}$ por cada tratamiento. Los embriones inoculados solamente con vh representan un 0% de desarrollo tumoral, con MCF-7/GFP el 100%, MCF-7/GFP + ICI el 60%, MCF-7/GFP + ATRA el 20% y con la combinación de MCF-7/GFP + ATRA + ICI el 0%. Este procedimiento se realizó en tres experimentos independientes por triplicado dando un total de 9 embriones por tratamiento.

11.3.5 Volumen tumoral post-tratamientos

Los resultados demuestran que ATRA e ICI tienen efecto tanto en la reducción del número de tumores encontrados en los embriones después de ser inoculados, como también sobre el tamaño de estos. ATRA resultó ser más efectivo que ICI sobre la reducción del número y tamaño tumoral.



Gráfica 2. Volumen de los tumores. Esta gráfica muestra el promedio del volumen de los tumores encontrados por cada tratamiento expresado en milímetros cúbicos. El mayor promedio del volumen tumoral hallado fue de 13.8 mm³, representado por los embriones a los que solamente se les inoculó 10⁶ células MCF-7/GFP, seguido por los embriones inoculados con las mismas células más el tratamiento con ICI (10⁻⁹M), en promedio de 4.44 mm³ y finalmente los embriones tratados con ATRA (10⁻⁹M), el volumen promedio tumoral fue de 2.57 mm³, finalmente, ante la combinación de ATRA e ICI (10⁻⁹M), ninguno de los embriones presentaron tumores. La gráfica muestra el promedio +/- DE de tres experimentos independientes por triplicado (n = 9 embriones por tratamiento). Letras distintas entre columnas expresan significancia estadística de p<0.001 mediante una prueba de ANOVA una vía seguida por una TUKEY.

11.4 Estudios realizados en RM (7 teslas) para evaluación de la metástasis

Imágenes obtenidas a través de resonancia magnética permiten visualizar lesiones o tumores dentro de un modelo animal.

11.4.1 Análisis del embrión dentro del huevo, mediante RM

Este estudio arrojó dos resultados:

- ❖ Por medio de los estudios realizados en RM se pudo observar claramente que la membrana del cascarón que se retiró para inocular al embrión (señalada con flechas blancas) se regeneró junto con la reconstrucción de vasos sanguíneos (señalado con flechas amarillas) (Fig. 17A).
- ❖ Además, se pudo observar al embrión dentro del cascarón, seis días después de ser inoculado (Fig. 17B). Mediante esta técnica no se pudieron observar los tumores, probablemente debido a que el cascarón, las membranas y el líquido del embrión, proporcionan barreras que impiden obtener imágenes claras del embrión y sus órganos, impidiendo la visualización de los tumores.

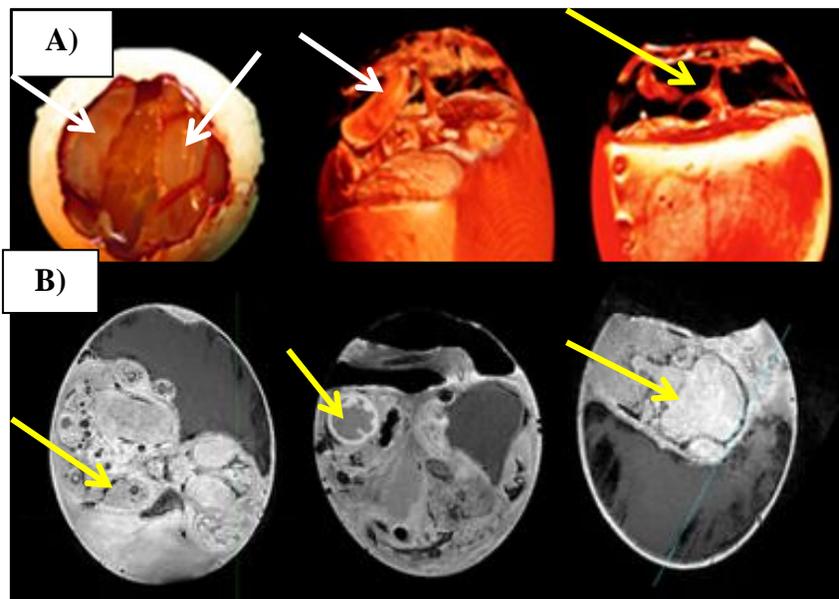


Figura 17. Estudios mediante RM realizados en el embrión dentro del huevo. A) Regeneración de la membrana del cascaron y vasos sanguíneos cuatro días después de que el embrión fue inoculado (señalado con flechas blancas y amarillas). **B)** Embrión de pollo dentro del huevo, seis días después de ser inoculado (señalado con flechas blancas). Este análisis se realizó en una sola sesión.

11.4.2 Análisis del embrión mediante RM

Mediante este estudio fue posible visualizar al embrión de forma clara, manipularlo a diferentes ángulos y separar órganos de interés, sin embargo, no fue posible detectar con exactitud la localización de los tumores.

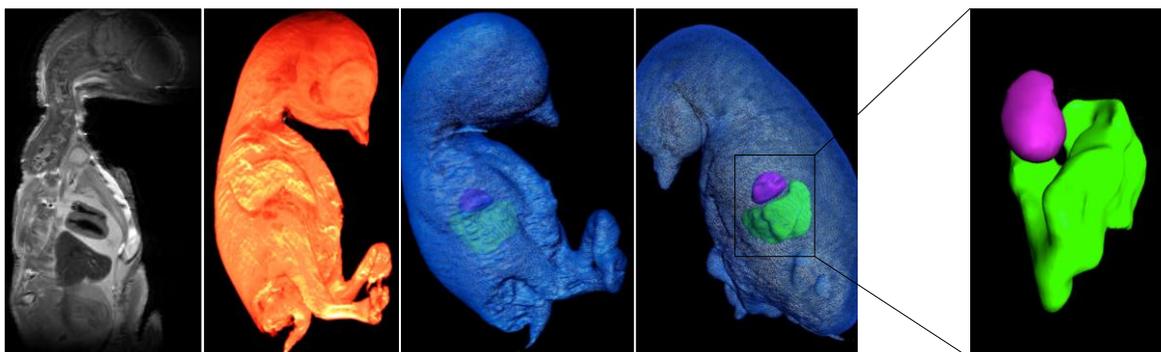


Figura 18. Imágenes del embrión de pollo mediante RM. Estudio del embrión seis días después de ser inoculado, separación *in silico* de corazón (morado) e hígado (verde). Este análisis se realizó en una sola sesión.

11.4.3 Análisis tumoral de corazón e hígado mediante RM

El estudio mediante imágenes en 3D, que facilitó la detección de tumores presentes en corazón e hígado, se realizó a los seis días después de inoculación de los embriones las células MCF-7/GFP y con los diferentes tratamientos. Los tumores hallados en los embriones a los que solamente se les inocularon las células fueron de mayor tamaño (7.5 mm^3) en comparación a los que se trataron con ICI (4.89 mm^3) y con ATRA (3.9 mm^3) (Fig. 19).

Estos datos son distintos a los obtenidos con un vernier, debido a que la fórmula utilizada calcula el volumen total de una esfera y los tumores son amorfos. También existen errores de medición, ya que los tumores se encuentran incrustados en el órgano y las medidas obtenidas se realizan sobre la superficie.

Estos resultados demuestran nuevamente que ATRA es capaz de disminuir el número y tamaño de tumores en embriones inoculados con células MCF-7/GFP. Por otro lado, en los embriones tratados con la combinación de ATRA e ICI, no se observaron tumores.

Estudios mediante RM nos permiten observar datos precisos de la localización tumoral y su tamaño.

11.4.4 Volumen tumoral por RM

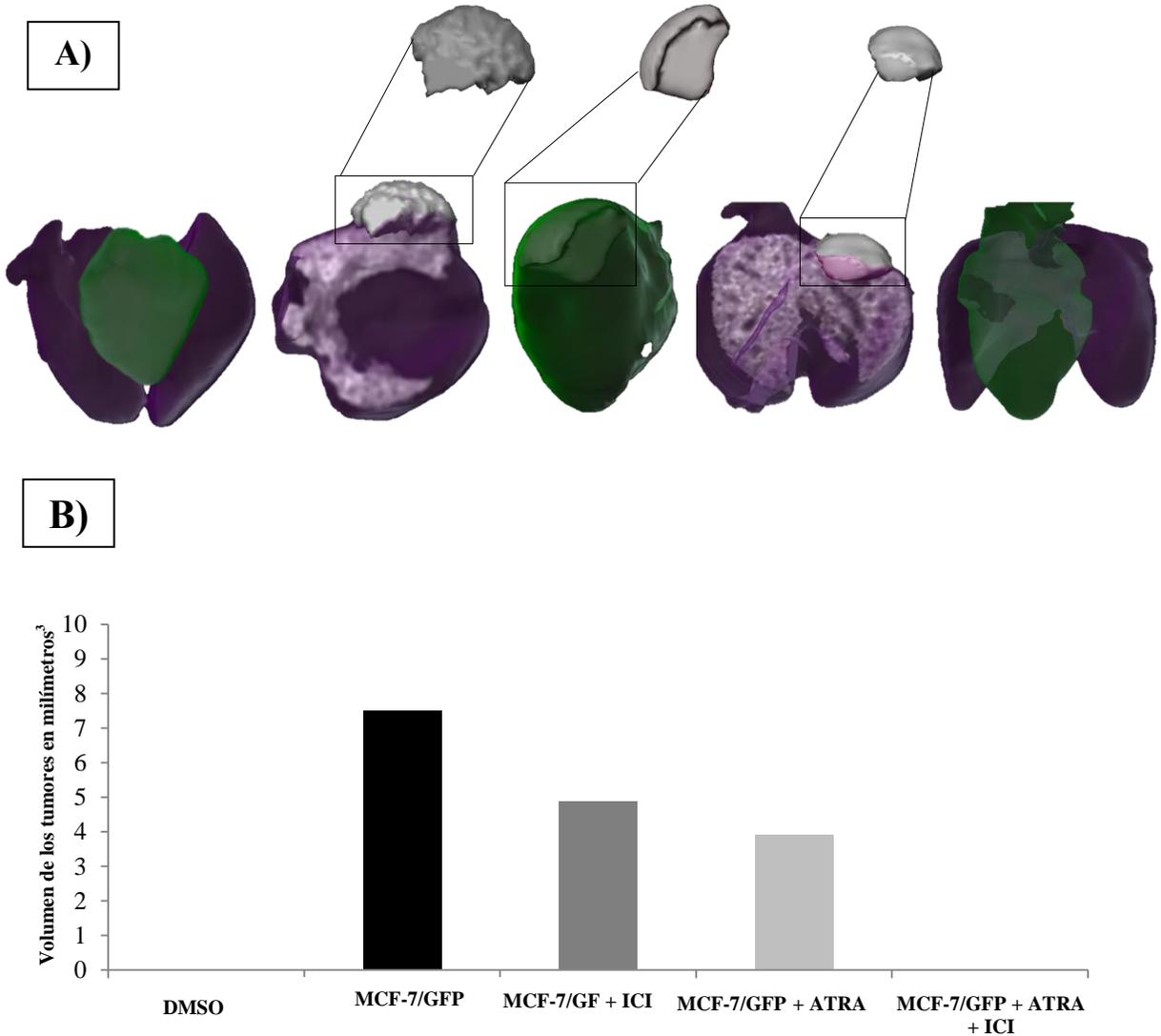


Figura 19. A) Imágenes tridimensionales mediante RM de tumores detectados en corazón e hígado del embrión de pollo. Corazón e hígado extraídos de los embriones a los que se les inoculó: DMSO [10^{-3} M], MCF-7/GFP (10^6 células), ATRA [10^{-9} M] + MCF-7/GFP (10^6 células), ICI [10^{-9} M] + MCF-7/GFP (10^6 células), ATRA + ICI [10^{-9} M] + MCF-7/GFP (10^6 células), todos ellos en un volumen final de 30 μ L. B) Volumen de los tumores expresado en mm^3 . Este análisis se realizó en una sola sesión.

12. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra por primera vez que la combinación de “ATRA” con Faslodex (ICI 182 780) en bajas concentraciones (10^{-9} M), es capaz de inhibir la migración inducida por E_2 , en la línea celular de cáncer de mama MCF-7/GFP. Es importante destacar que tanto el ATRA como el ICI se encuentran aprobados para uso clínico, con resultados satisfactorios (Bryan, 2011; Martínez, 2008).

Mediante experimentos dosis-respuesta se determinó que la menor concentración estudiada (10^{-9} M) tenía efectos semejantes a concentraciones mayores, por lo que se decidió utilizarla en los tratamientos combinados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son congruentes con lo reportado en la literatura. Ha sido ampliamente reportado que el E_2 induce la migración de células de carcinoma mamario humano de la línea MCF-7/GFP en concentración 1×10^{-9} M a las 48 h (figura 11), inclusive en un estudio previo de nuestro laboratorio se señala que el posible mecanismo mediante el cual el E_2 induce la migración en células de carcinoma mamario humano positiva al RE es mediante la activación de la cinasa cSrc (Jiménez-Salazar *et al.*, 2014). Este efecto es revertido por acción de ATRA o ICI, de forma individual en todas sus concentraciones estudiadas, inhibiendo la migración celular entre 70 y 80 %, de manera dosis-dependiente, siendo ATRA ligeramente más efectivo que ICI (figura 12, 13). Además, cuando se combinan los fármacos en la concentración más baja estudiada (10^{-9} M) (figura 14) el efecto observado es mucho mayor que los efectos individuales; sin embargo, se necesitan realizar más estudios para demostrar que el efecto es sinérgico, utilizando menores concentraciones y más tiempos de incubación.

El hecho de que en el presente estudio ATRA presenta mayor capacidad de inhibir la migración que el ICI en la línea celular MCF-7/GFP puede explicarse debido a que se ha demostrado que los retinoides pueden modular la síntesis de numerosas proteínas constituyentes del citoesqueleto y de la matriz extracelular (Sporn, 1983), así como la fosfatasa alcalina y el activador del plasminógeno; proteínas involucradas con la migración celular (Jetten, 1980), mientras que el ICI ha demostrado que su mecanismo de acción radica principalmente en inhibir la proliferación celular de células de cáncer de mama

positivas al RE (Parker, 1993). Sin embargo, nuestros resultados indican que ICI también es capaz de inhibir la migración celular en todas sus concentraciones, de manera dosis dependiente.

Datos obtenidos en el presente estudio proponen la existencia de posibles efectos citotóxicos cuando el tratamiento es combinado con ATRA e ICI, en concentraciones de 10^{-9} M (figura 15). Si bien se requieren de otras pruebas bioquímicas para determinar si hay citotoxicidad, incluyendo estudios con sales del formazán (MTT o XTT), observada por el hecho de que muchas células se desprendieron de las cajas de cultivo cuando se incubaron con la combinación de ambos fármacos, esto puede ser apoyado debido a que se ha demostrado que la combinación de ATRA en concentración de .5 a 1 nM, con un antiestrógeno (Tamoxifeno o su metabolito activo endoxifeno) a 5 nM es más eficaz en la reducción de las células de melanoma de ratón K1735-M2, que los compuestos utilizados individualmente a las 72 h. Este estudio demostró que ATRA disminuyó la biomasa celular aproximadamente en un 54%, mientras que tamoxifeno y endoxifeno proporcionan una disminución significativa en la biomasa celular aproximada del 26%. La combinación de endoxifeno con ATRA disminuyó la biomasa celular en aproximadamente un 62%, lo que indica que la combinación de fármacos aumenta los efectos inducidos por los compuestos de forma individual. La combinación de tamoxifeno con ATRA disminuyó la biomasa celular a aproximadamente 41%, lo que es significativo con relación al tamoxifeno solo, pero no en comparación con ATRA de manera individual. Cabe destacar que el tratamiento con 1 mM de ATRA no aumenta el efecto tóxico en comparación con las combinaciones que incluyen ATRA en 0.5 mM, esto se determinó mediante un ensayo de Sulfordamina B (Ribeiro, 2013).

Por otro lado, un estudio en pacientes fase I / II con cáncer de mama avanzado, ha informado que Tamoxifeno (20 mg/día) en combinación con ATRA 190 mg /m²/día presenta toxicidad aceptable (Budd *et al.*, 1998), lo que sugiere, que estas combinaciones de ATRA con un antiestrógeno pueden aumentar el beneficio en pacientes con cáncer de mama.

Otro estudio demuestra un efecto sinérgico por parte de la combinación de ATRA más Trastuzumab, para inducir la apoptosis en células de cáncer de mama de la línea BT474 y SKBR3, las cuales son positivas para HER-2 (Koay, 2010). El mecanismo por el cual la

combinación de estos fármacos induce efectos citotóxicos no está claramente descrito; sin embargo, se ha demostrado la capacidad que tiene ATRA para llevar a la apoptosis en la mayoría de líneas celulares de cáncer de mama humano (Seewaldt, 1995). Una posible ventaja de una terapia combinada de medicamentos contra el cáncer de mama es una reducción en los efectos adversos de la quimioterapia, debido a una disminución de la dosis de los fármacos, lo que permite una menor toxicidad para las células no cancerosas.

Un estudio reciente mostró la inhibición de la metástasis en hígado de murinos por efecto de ATRA (Chansri, 2006). Otro estudio demuestra que ATRA causa una reducción muy significativa en la formación de nódulos tumorales en pulmón (estudios realizados en ratas). No se sabe con precisión si dicho efecto es causado por la eliminación de la mayoría de las células tumorales o al efecto inhibitorio en el crecimiento de células de cáncer (Siddikuzzaman, 2012).

Sin embargo, hay pocos estudios que exploran el papel de ATRA como un inductor de la diferenciación en tumores sólidos. En un estudio, demostraron que el ATRA puede inducir eficazmente la diferenciación de cáncer de hígado, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de su función pro-apoptótica. Resultados demuestran que el tratamiento combinado de ATRA y cisplatino reduce significativamente la capacidad migratoria e inhibe eficazmente la metástasis de células HCC, debido a la disminución de la población celular que posee un alto potencial metastásico. En concordancia con otros estudios, estos resultados sugieren que la inhibición de la migración celular puede facilitar la supresión de la metástasis de células de cáncer de hígado. Sin embargo, se requiere más investigación clínica para evaluar la eficacia del tratamiento combinado de ATRA y cisplatino en células HCC (Zhang, 2013). Este estudio demuestra el fuerte efecto que tiene ATRA en combinación con otros compuestos, sobre la inhibición de la metástasis y la reducción tumoral en modelos *in vivo*.

Por otro lado, el modelo de embrión de pollo ofrece una serie de ventajas únicas para estudiar los múltiples pasos de la metástasis de células tumorales, funciona como un hospedero natural inmunodeficiente capaz de sostener tejidos injertados y células sin restricciones especies-específicas, permite realizar un análisis exhaustivo de etapas y aspectos específicos de la diseminación de células cancerosas tales como: la colonización,

intravasación, extravasación, angiogénesis y la metástasis inducidos por células tumorales (Deryugina, 2008).

Datos obtenidos en la presente investigación, demuestran que la técnica más óptima para el estudio de la metástasis en el embrión de pollo es a través de la inoculación de células cancerosas en vasos sanguíneos de la MCA (gráfica 1), debido a que las células pasan directamente a la sangre del embrión, con lo cual ya no se requiere que se lleve a cabo el proceso de la intravasación de las células tumorales, por lo que ya se realiza la dispersión sistémica a todos los tejidos del cuerpo.

Uno de los hallazgos importantes en este estudio fue la localización de tumores, principalmente en corazón e hígado seis días después de que los embriones fueron inoculados con un millón células tumorales de la línea MCF-7/GFP en vasos sanguíneos de la MCA (figura 16). Kim *et al.* 1998 demostró el trayecto que siguen las células tumorales después de ser inoculadas en los vasos sanguíneos de la MCA por medio de un ensayo de intravasación y por la aparición de células tumorales en tejidos distantes del sitio de inoculación conectados por el sistema linfático y vascular. El camino tomado por las células tumorales que han intravasado en los capilares de la MCA llegan a la cámara posterior del corazón, donde la sangre cardiaca, con su carga de células tumorales se distribuye en todo el cuerpo del embrión. Además del corazón, se detectó un segundo sitio importante para la detención de células tumorales en el hígado.

Finalmente, utilizando la tecnología de imagen de resonancia magnética de 7 Teslas (RM), en el Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, se realizó un estudio del corazón e hígado de cada tratamiento aplicado en los embriones de pollo. Estos resultados muestran la forma, localización y tamaño preciso de cada tumor, debido a que es posible crear una imagen transparente del órgano, visualizando fácilmente los tumores. Este estudio reveló que los tumores se encontraban incrustados dentro de los órganos, los tumores de los embriones a los que solamente se les inoculó la línea celular MCF-7/GFP fueron de mayor tamaño en comparación a los tratados con ICI o con ATRA. En contraste, los embriones tratados con la combinación de ATRA e ICI no presentaron tumores, probablemente debido a que no se formaron; esto se base en los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, en

donde se observa una menor densidad celular después de la incubación con la combinación de dichos fármacos.

Estudios futuros, en donde se puedan estudiar terapias combinadas, posterior a la inoculación de los embriones con las células MCF-7/GFP, podrían ser útiles para distinguir si estas combinaciones son capaces de inhibir la metástasis *in vivo*.

Cabe señalar que estos resultados obtenidos mediante la RM difieren de los obtenidos con la medición utilizando el vernier, debido a que hay variación en los valores del volumen, esto puede ser debido a que la fórmula utilizada fue el de una esfera, por lo que los datos del volumen de los tumores son aproximados. La RM permite obtener volúmenes con mayor exactitud, lo que nos brinda la posibilidad de obtener resultados más certeros.

Los resultados del presente estudio pueden servir de base para ser utilizados en pacientes con cáncer de mama, proponiendo una nueva combinación de fármacos que pueden aumentar el beneficio terapéutico y al mismo tiempo lograr una reducción de los efectos secundarios.

13. CONCLUSIONES

La combinación de ATRA e ICI es más efectiva que su aplicación por separado en ensayos *in vitro* e *in vivo*, reduciendo la migración celular y la formación de tumores. Por lo tanto, nuestra propuesta podría acceder más rápidamente al campo clínico en pacientes con cáncer de mama positivas al RE.

El embrión de pollo resulta ser un buen modelo animal para el estudio de tumores a partir de células cancerosas, así como de distintas terapias para disminuirlos.

14. PERSPECTIVAS

1. Los resultados obtenidos muestran un posible efecto de tipo sinérgico de la combinación de ATRA más ICI en la línea celular MCF-7/GFP, sin embargo, es necesario realizar pruebas para determinar los efectos citotóxicos. Por otro lado, explorar la posibilidad de un mayor número de concentraciones de ambos fármacos al ser combinados para encontrar efectos en menores concentraciones.
2. Proponer alguna vía de transducción de señales por la cual estén actuando ambos fármacos a nivel celular, para inhibir la migración celular y el desarrollo tumoral, que permita entender cómo se potencializa su efecto al ser combinados.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Altucci, L., Gronemeyer, H., 2001. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 181–193. doi:10.1038/35106036.
2. Anderson, E., 2002. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: the role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 4, 197. doi:10.1186/bcr452.
3. Anzano, M.A., Byers, S.W., Smith, J.M., Peer, C.W., Mullen, L.T., Brown, C.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., 1994. Prevention of Breast Cancer in the Rat with 9-cis-Retinoic Acid as a Single Agent and in Combination with Tamoxifen. *Cancer Res* 54, 4614–4617.
4. Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269–1304.
5. Arce-Salinas, C., Lara-Medina, F.U., Alvarado-Miranda, A., Castaneda-Soto, N., Bargallo-Rocha, E., Ramírez-Ugalde, M.T., Pérez-Sánchez, V., Rivera, L., Gambo-Vignole, C., Santamaria-Galicia, J., others, 2011. Evaluation of breast cancer treatment at a tertiary-level institution with Popular Health Insurance in Mexico. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 64, 9–16.
6. Armstrong, P.B., Quigley, J.P., Sidebottom, E., 1982. Transepithelial Invasion and Intramesenchymal Infiltration of the Chick Embryo Chorioallantois by Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 42, 1826–1837.
7. Arrieta, O., Michel Ortega, R.M., Villanueva-Rodríguez, G., Serna-Thomé, M.G., Flores-Estrada, D., Diaz-Romero, C., Rodríguez, C.M., Martínez, L., Sánchez-Lara, K., 2010. Association of nutritional status and serum albumin levels with development of toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with paclitaxel-cisplatin chemotherapy: a prospective study. *BMC Cancer* 10, 50. doi:10.1186/1471-2407-10-50.
8. Bastien, J., Rochette-Egly, C., 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1–16. doi:10.1016/j.gene.2003.12.005.

9. Braams, J.W., Pruijm, J., Freling, N.J., Nikkels, P.G., Roodenburg, J.L., Boering, G., Vaalburg, W., Vermey, A., 1995. Detection of lymph node metastases of squamous-cell cancer of the head and neck with FDG-PET and MRI. *J. Nucl. Med.* 36, 211–216.
10. Brandan, M.E., Villaseñor, Y. Detección del CaM. Universidad Nacional Autónoma de México. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología.* México. 148-152. 2006.
11. Bryan, M., Pulte, E.D., Toomey, K.C., Pliner, L., Pavlick, A.C., Saunders, T., Wieder, R., 2011. A pilot phase II trial of *all-trans* retinoic acid (Vesanoid) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs* 29, 1482–1487. doi:10.1007/s10637-010-9478-3.
12. Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-Å., Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758. doi:10.1038/39645.
13. Budd, G.T., Adamson, P.C., Gupta, M., Homayoun, P., Sandstrom, S.K., Murphy, R.F., McLain, D., Tuason, L., Peereboom, D., Bukowski, R.M., Ganapathi, R., 1998. Phase I/II trial of *all-trans* retinoic acid and tamoxifen in patients with advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 635–642.
14. Carbone, C., Maschi, F. 2006. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva.* 1, 19-23.
15. Chambers, A.F., Shafir, R., Ling, V. 1982. A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res.* 42, 4018–4025.
16. Chansri, N., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M., 2006. Inhibition of liver metastasis by *all-trans* retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. *Int J Pharm* 321, 42–49. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.008.
17. Chávez, M., Angel, M., Zenteno Galindo, E., Espinosa Mancilla, B., Martínez Cairo, S., Guevara Fonseca, J., 2004. Enfoques moleculares de la metástasis tumoral. *REB. Revista de educación bioquímica* 23, 117–122.
18. Chen, C., Yuan, J.-P., Wei, W., Tu, Y., Yao, F., Yang, X.-Q., Sun, J.-Z., Sun, S.-R., Li, Y., 2014. Subtype classification for prediction of prognosis of breast cancer from a biomarker panel: correlations and indications. *Int J Nanomedicine* 9, 1039–1048. doi:10.2147/IJN.S58270.

19. Clarke, R., 1997. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. *Breast Cancer Res. Treat.* 46, 117–133.
20. Clemons, M., Goss, P., 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 344, 276–285. doi:10.1056/NEJM200101253440407.
21. Cole, K., Tabemero, M., Anderson, K.S., 2010. Biologic characteristics of premalignant breast disease. *Cancer Biomark* 9, 177–192. doi:10.3233/CBM-2011-0187.
22. Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J., Korach, K.S., 1999. Postnatal Sex Reversal of the Ovaries in Mice Lacking Estrogen Receptors α and β . *Science* 286, 2328–2331. doi:10.1126/science.286.5448.2328.
23. Danforth, D.N., 2004. All trans-retinoic acid acts synergistically with hydroxytamoxifen and transforming-growth factor beta to stimulate apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 183, 395–404. doi:10.1677/joe.1.05497.
24. Deryugina, E.I., Quigley, J.P., 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119–1130. doi:10.1007/s00418-008-0536-2.
25. Fanjul, A.N., Bouterfa, H., Dawson, M., Pfahl, M., 1996. Potential Role for Retinoic Acid Receptor- γ in the Inhibition of Breast Cancer Cells by Selective Retinoids and Interferous. *Cancer Res* 56, 1571–1577.
26. Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.
27. Filardo, E.J., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Resnick, M.B., Giri, D., DeLellis, R.A., Steinhoff, M.M., Sabo, E., 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 12, 6359–6366. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0860.
28. Fishman, J., Bradlow, H.L., Schneider, J., Anderson, K.E., Kappas, A., 1980. Radiometric analysis of biological oxidations in man: sex differences in estradiol metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4957–4960.
29. Flamini, M.I., Gauna, G.V., Sottile, M.L., Nadin, B.S., Sanchez, A.M., Vargas-Roig, L.M., 2014. Retinoic acid reduces migration of human breast cancer cells:

- role of retinoic acid receptor beta. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 1113–1123. doi:10.1111/jcmm.12256.
30. Garattini, E., Bolis, M., Garattini, S.K., Fratelli, M., Centritto, F., Paroni, G., Gianni', M., Zanetti, A., Pagani, A., Fisher, J.N., Zambelli, A., Terao, M., 2014. Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again. *Cancer Treat. Rev.* 40, 739–749. doi:10.1016/j.ctrv.2014.01.001.
31. Gibson, M.K., Nemmers, L.A., Beckman, W.C., Davis, V.L., Curtis, S.W., Korach, K.S., 1991. The Mechanism of ICI 164,384 Antiestrogenicity Involves Rapid Loss of Estrogen Receptor in Uterine Tissue. *Endocrinology* 129, 2000–2010. doi:10.1210/endo-129-4-2000.
32. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A., Laudet, V., 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950–964. doi:10.1038/nrd1551.
33. Gu, Q., Korach, K.S., Moss, R.L., 1999. Rapid Action of 17 β -Estradiol on Kainate-Induced Currents in Hippocampal Neurons Lacking Intracellular Estrogen Receptors. *Endocrinology* 140, 660–666. doi:10.1210/endo.140.2.6500.
34. Gu, Q., Korach, K.S., Moss, R.L., 1999. Rapid Action of 17 β -Estradiol on Kainate-Induced Currents in Hippocampal Neurons Lacking Intracellular Estrogen Receptors. *Endocrinology* 140, 660–666. doi:10.1210/endo.140.2.6500.
35. Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S., 2001a. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869–36872. doi:10.1074/jbc.R100029200.
36. Hanf, V., Hanf, D., 2014. Reproduction and breast cancer risk. *Breast Care (Basel)* 9, 398–405. doi:10.1159/000369570.
37. Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Bender, J.R., 2000. Membrane Estrogen Receptor Engagement Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase via the PI3-Kinase–Akt Pathway in Human Endothelial Cells. *Circulation Research* 87, 677–682. doi:10.1161/01.RES.87.8.677
38. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M.G., others, 1997a. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736.

39. Helguero, L.A., Faulds, M.H., Gustafsson, J.-A., Haldosén, L.-A., 2005. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24, 6605–6616. doi:10.1038/sj.onc.1208807.
40. Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., Thaller, C., 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397–406.
41. Hulka, B.S., Stark, A.T., 1995. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 346, 883–887.
42. INEGI. 2015. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática. Estadísticas o pronóstico del día mundial contra el Cáncer. México, DF. (<http://www.inegi.org.mx/>). Actualizado el 31 de enero de 2015, consultado el 05 de Mayo de 2015.
43. Jetten, A.M., 1980. Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors. *Nature* 284, 626–629. doi:10.1038/284626a0.
44. Jiménez-Salazar, J.E., Posadas-Rodríguez, P., Lazzarini-Lechuga, R.C., Luna-López, A., Zentella-Dehesa, A., Gómez-Quiroz, L.E., Königsberg, M., Domínguez-Gómez, G., Damián-Matsumura, P., 2014. Membrane-Initiated Estradiol Signaling of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Mechanisms Through Regulation of Tight Junctions in Human Breast Cancer Cells. *HORM CANC* 5, 161–173. doi:10.1007/s12672-014-0180-3.
45. Kelsey, J.L., Gammon, M.D., John, E.M., 1993. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15, 36–47.
46. Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., Ossowski, L., 1998. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell* 94, 353–362. doi:10.1016/S0092-8674(00)81478-6.
47. Klaassen, I., Braakhuis, B.J., 2002. Anticancer activity and mechanism of action of retinoids in oral and pharyngeal cancer. *Oral Oncology* 38, 532–542. doi:10.1016/S1368-8375(01)00118-X.
48. Klinge, C.M., 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227–251.

49. Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919.
50. Koay, D.C., Zerillo, C., Narayan, M., Harris, L.N., DiGiovanna, M.P., 2010a. Antitumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. *Breast Cancer Research* 12, R62. doi:10.1186/bcr2625.
51. Koga, M., Sutherland, R.L., 1991. Retinoic acid acts synergistically with 1,25-dihydroxyvitamin D3 or antioestrogen to inhibit T-47D human breast cancer cell proliferation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 39, 455–460. doi:10.1016/0960-0760(91)90238-Z.
52. Krishnan, V., Heath, H., Bryant, H.U., 2000. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators, in: *Hormones*, B.-V.& (Ed.), . Academic Press, pp. 123–147.
53. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925–5930.
54. Kuiper, G.G., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Gustafsson, J.A., 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19, 253–286. doi:10.1006/frne.1998.0170.
55. Kumar, R., Thompson, E.B., 2003. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 17, 1–10. doi:10.1210/me.2002-0258.
56. Kwiatkowski, D.J., 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 103–108. doi:10.1016/S0955-0674(99)80012-X.
57. L, B., Laurence, 2012. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12a. ed.). McGraw Hill Mexico.
58. Laserna Mendieta, E.J., Baretino, D., 2009. Cambios en la fosforilación de proteínas nucleares y cascadas de señalización inducidos por el ácido retinoico.

59. Li, G.H., Arora, P.D., Chen, Y., McCulloch, C.A., Liu, P., 2012. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Med Res Rev* 32, 999–1025. doi:10.1002/med.20231.
60. Li, Q., Holford, T.R., Zhang, Y., Boyle, P., Mayne, S.T., Dai, M., Zheng, T., 2012. Dietary fiber intake and risk of breast cancer by menopausal and estrogen receptor status. *Eur J Nutr* 52, 217–223. doi:10.1007/s00394-012-0305-9
61. Lindner, D., 2014. Animal Models and the Tumor Microenvironment: Studies of Tumor–Host Symbiosis. *Semin Oncol* 41, 146–155. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.02.004.
62. Liu, J., Liu, J., Chen, J., Wu, Y., Yan, P., Ji, C., Wang, Y., Xiang, D., Zhang, X., Zhang, P., Cui, Y., Wang, J.M., Bian, X., Qian, F., 2016. Scinderin promotes the invasion and metastasis of gastric cancer cells and predicts the outcome of patients. *Cancer Letters* 376, 110–117. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.035.
63. Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835–839. doi:10.1016/0092-8674(95)90199-X.
64. Brandan, M., Navarro, Y.V., 2006. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*. 1(3), 14-162.
65. Marino, N., Woditschka, S., Reed, L.T., Nakayama, J., Mayer, M., Wetzel, M., Steeg, P.S., 2013. Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment. *Am. J. Pathol.* 183, 1084–1095. doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.012.
66. Marth, C., Böck, G., Daxenbichler, G., 1985. Effect of 4-Hydroxyphenylretinamide and Retinoic Acid on Proliferation and Cell Cycle of Cultured Human Breast Cancer Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst* 75, 871–875. doi:10.1093/jnci/75.5.871.
67. Martínez Marín, V., Muñoz Martín, A.J., Viñuela Benéitez, M.C., García Alfonso, P., Alonso Muñoz, A., Pérez Manga, G., 2009a. Tratamiento con fulvestrant en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama avanzado tras tratamiento hormonal previo. *Medicina Clínica* 133, 371–374. doi:10.1016/j.medcli.2008.11.029.

68. McKenna, N.J., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., 1999. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocrine Reviews* 20, 321–344. doi:10.1210/edrv.20.3.0366.
69. Medina, D., Thompson, H.J., 2000. A Comparison of the Salient Features of Mouse, Rat, and Human Mammary Tumorigenesis, in: Ip, M.M., Asch, B.B. (Eds.), *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*. Springer US, pp. 31–36.
70. Melkonian, G., Munoz, N., Chung, J., Tong, C., Marr, R., Talbot, P., 2002. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J. Exp. Zool.* 292, 241–254.
71. Mu, Y.M., Yanase, T., Nishi, Y., Hirase, N., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H., 2000. A nuclear receptor system constituted by RAR and RXR induces aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 166, 137–145.
72. Murphy, J.B., 1913. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species : its bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 17, 482–493.
73. Nagpal, S., Athanikar, J., Chandraratna, R.A., 1995. Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 270, 923–927.
74. Navarro-Tito, N., Soto-Guzman, A., Castro-Sanchez, L., Martinez-Orozco, R., Salazar, E.P., 2010. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 306–317. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.010.
75. NCI. 2012. National Cancer Institute, Institutos Nacionales de Salud de los EEUU. (<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>). Actualizado el 9 de febrero de 2015; Consultado el 29 de noviembre de 2016.
76. NCI. 2015. National Cancer Institute, Institutos Nacionales de Salud de los EEUU. (<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>). Actualizado el 9 de febrero de 2015; Consultado el 29 de noviembre de 2016.
77. Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284. doi:10.1038/nrc2622.

78. Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535–1565.
79. Noriega, Y., Langley, E., 2008. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología.* 3, 29-40.
80. Ossowski, L., Reich, E., 1980. Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res.* 40, 2300–2309.
81. Palmieri, C., Cheng, G.J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Warri, A., Weihua, Z., Van Noorden, S., Wahlstrom, T., Coombes, R.C., Warner, M., Gustafsson, J.-A., 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 9, 1–13.
82. Pandey, D.P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., Picard, D., 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO Journal* 28, 523–532. doi:10.1038/emboj.2008.304.
83. Parker, M.G., 1993. Action of “pure” antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Tr* 26, 131–137. doi:10.1007/BF00689686.
84. Pavan, B., Biondi, C., Dalpiaz, A., 2006. Nuclear retinoic acid receptor beta as a tool in chemoprevention trials. *Curr. Med. Chem.* 13, 3553–3563.
85. Preisler, H.D., Gopal, V., Banavali, S.D., Finke, D., Bokari, S.A., 1992. Multiparameter assessment of the cell cycle effects of bioactive and cytotoxic agents. *Cancer Res.* 52, 4090–4095.
86. Quigley, J.P., Armstrong, P.B., 1998. Tumor cell intravasation elucidated: the chick embryo opens the window. *Cell* 94, 281–284.
87. Recchia, F., Sica, G., Candeloro, G., Necozone, S., Bisegna, R., Bratta, M., Rea, S., 2009. Beta-interferon, retinoids and tamoxifen in metastatic breast cancer: long-term follow-up of a phase II study. *Oncol. Rep.* 21, 1011–1016.
88. Redig, A.J., McAllister, S.S., 2013. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J. Intern. Med.* 274, 113–126. doi:10.1111/joim.12084.
89. Rhee, J.C., Khuri, F.R., Shin, D.M., 2004. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist* 9, 302–311.
90. Ribeiro, M.P.C., Silva, F.S.G., Paixão, J., Santos, A.E., Custódio, J.B.A., 2013. The combination of the antiestrogen endoxifen with *all-trans*-retinoic acid has anti-

- proliferative and anti-migration effects on melanoma cells without inducing significant toxicity in non-neoplastic cells. *Eur. J. Pharmacol.* 715, 354–362. doi:10.1016/j.ejphar.2013.04.038.
91. Ridley, A.J., 2003. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704–1709. doi:10.1126/science.1092053.
 92. Rodríguez Del Castillo, A., Vitale, M.L., Tchakarov, L., Trifaró, J.M., 1992. Human platelets contain scinderin, a Ca(2+)-dependent actin filament-severing protein. *Thromb. Haemost.* 67, 248–251.
 93. Roninson, I.B., Dokmanovic, M., 2003. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J. Cell. Biochem.* 88, 83–94. doi:10.1002/jcb.10320.
 94. Scott, S.A., Selvy, P.E., Buck, J.R., Cho, H.P., Criswell, T.L., Thomas, A.L., Armstrong, M.D., Arteaga, C.L., Lindsley, C.W., Brown, H.A., 2009. Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat. Chem. Biol.* 5, 108–117. doi:10.1038/nchembio.
 95. Seewaldt, V.L., Johnson, B.S., Parker, M.B., Collins, S.J., Swisshelm, K., 1995. Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 6, 1077–1088.
 96. Seewaldt, V.L., Kim, J.H., Parker, M.B., Dietze, E.C., Srinivasan, K.V., Caldwell, L.E., 1999. Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits *all-trans*-retinoic acid-mediated G0/G1-phase arrest and differentiation *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 249, 70–85. doi:10.1006/excr.1999.4462.
 97. Sever, R., Glass, C.K., 2013. Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a016709. doi:10.1101/cshperspect.a016709.
 98. Siddikuzzaman, Grace, V.M.B., 2012. Inhibition of metastatic lung cancer in C57BL/6 mice by liposome encapsulated all trans retinoic acid (ATRA). *International Immunopharmacology* 14, 570–579. doi:10.1016/j.intimp.2012.09.008.
 99. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., Liao, J.K., 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538–541. doi:10.1038/35035131.

100. Smith, M.A., Parkinson, D.R., Cheson, B.D., Friedman, M.A., 1992. Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 10, 839–864.
101. Somenzi, G., Sala, G., Rossetti, S., Ren, M., Ghidoni, R., Sacchi, N., 2007. Disruption of Retinoic Acid Receptor Alpha Reveals the Growth Promoter Face of Retinoic Acid. *PLoS ONE* 2. doi:10.1371/journal.pone.0000836.
102. Sporn, M.B., Roberts, A.B., 1983. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.* 43, 3034–3040.
103. Tanaka, M., Müllauer, L., Ogiso, Y., Fujita, H., Moriya, S., Furuuchi, K., Harabayashi, T., Shinohara, N., Koyanagi, T., Kuzumaki, N., 1995. Gelsolin: a candidate for suppressor of human bladder cancer. *Cancer Res.* 55, 3228–3232.
104. Thibaudeau, L., Quent, V.M., Holzapfel, B.M., Taubenberger, A.V., Straub, M., Huttmacher, D.W., 2014a. Mimicking breast cancer-induced bone metastasis *in vivo*: current transplantation models and advanced humanized strategies. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 721–735. doi:10.1007/s10555-014-9499-z.
105. Thompson, H.J., Sporn, M.B., 2002. Mammary Cancer in Rats, in: Teicher, B.A. (Ed.), *Tumor Models in Cancer Research, Cancer Drug Discovery and Development*. Humana Press, pp. 173–181.
106. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., Chambon, P., 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477–487. doi:10.1016/0092-8674(89)90031-7.
107. Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W., McDonnell, D.P., 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* 8, 21–30. doi:10.1210/mend.8.1.8152428.
108. Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.-M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., 1998. Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins. *Molecular Endocrinology* 12, 1605–1618. doi:10.1210/mend.12.10.0185.

109. Yilmaz, M., Christofori, G., 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 629–642. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0139.
110. Zhang, Y., Guan, D., Shi, J., Gao, H., Li, J., Zhao, J., Qiu, L., Liu, J., Li, N., Guo, W., Xue, J., Zhou, F., Wu, M., Wang, H., Xie, D., Cheng, S., 2013. *All-trans* retinoic acid potentiates the chemotherapeutic effect of cisplatin by inducing differentiation of tumor initiating cells in liver cancer. *J. Hepatol.* 59, 1255–1263. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.009.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0044
Módulo 2016/17A

Efecto combinado de ATRA y Faslodex sobre la inhibición de la metástasis de células de carcinoma mamario humano en un modelo de embrión de pollo

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CLAUDIA HAYDEE GONZALEZ DE LA ROSA
DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ
DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ROSA ISELA MENDIZABAL RIVEROS

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

Aprobar

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



ROSA ISELA MENDIZABAL RIVEROS
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISSASI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. CLAUDIA HAYDEE GONZALEZ DE LA ROSA

VOCAL

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ

SECRETARIO

DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN