

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**Posgrado en Biología Experimental**

***“Efecto sobre la expresión de los genes ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y cambios en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol en células de carcinoma mamario humano MCF-7”.***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA**

**BIOL. EXP. JAVIER ESTEBEN JIMÉNEZ SALAZAR**

**DIRECTOR**

**Dr. Pablo G. Damián Matsumura**

**ASESORES:**

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

**México D.F., septiembre 2010**

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

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

**El alumno Javier Esteban Jiménez Salazar fue apoyado con la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 212870**

**Parte de este trabajo fue realizado en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa**

# COMITÉ TUTORAL

## DIRECTOR

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura**

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

## ASESORES:

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y  
Departamento de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Efecto sobre la expresión de los genes ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y cambios en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol en células de carcinoma mamario humano MCF-7”**. El examen se realizó el día 09 del mes de septiembre de 2010.

## JURADO DE EXAMEN

---

### PRESIDENTE

**M. en BE. Leticia González Núñez**

Profesora Titular “A”. Tiempo completo. Departamento de Biología de la Reproducción. UAM-I. gnleti@yahoo.es

---

### SECRETARIO

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIB, UNAM y Departamento de Bioquímica, INCMN SZ. azentell@biomedicas.unam.mx

---

### VOCAL

**Dra. Rebeca López Marure**

Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. rlmarure@yahoo.com.mx

---

### VOCAL

**Dr. Armando Luna López**

Departamento de Investigación Básica, Instituto de Geriátría, allbioexp@yahoo.com

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Así mismo al Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura, por su confianza, apoyo y sobre todo por su amistad, a la Dra. Mina Königsberg Fainstein y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su enseñanza y conocimientos aportados a la realización de este trabajo y a los Drs. Rebeca López Marure, Armando Luna López y la M. en BE. Leticia González Núñez como sinodales, por su apoyo en la revisión, orientación y consejos en la presente tesis.

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

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

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

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	4
1.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR CONTACTO	6
1.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS	8
1.3 TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMA (EMT)	10
1.4 METÁSTASIS	12
<b>II. ANTECEDENTES</b>	15
2.1 UNIONES ESTRECHAS Y REGULACIÓN HORMONAL	15
2.2.1 UNIONES ESTRECHAS EN REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y PROLIFERACIÓN CELULAR	15
2.2.2 RECEPTORES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO.	17
2.3 ENTRECruzAMIENTO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (RE) CON EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL TIPO 2 (HER-2)	19
2.4 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLECULAS DEL COMPLEJO OCLUYENTE	21
<b>III. JUSTIFICACIÓN.</b>	23
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	24
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
<b>V. HIPÓTESIS</b>	24
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	25
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	25
6.2 MEDIO DE CULTIVO CELULAR	25
6.3 CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES	25
6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2	26
6.5.1 ANÁLISIS DE LOS ARN EN ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.	26
6.5.2 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2 POR RT-PCR.	27
6.5.3 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.	29

6.6 ENSAYO DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS NUCLEARES Y CITOPLASMATICAS PARA ZO-1 y ZONAB	29
6.6.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZO-1 y ZONAB.	30
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	31
<b>VII. RESULTADOS</b>	32
7.1 EFECTO DEL E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2 EN LAS CÉLULAS DE CANCER DE MAMA MCF-7	32
7.1.1 EFECTO DE 1nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZO-1.	33
7.1.2 EFECTO DE 100nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZO-1.	34
7.1.3 EFECTO DE 1nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZONAB.	35
7.1.4 EFECTO DE 100nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZONAB.	36
7.1.5 EFECTO DE 1nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA.	37
7.1.6 EFECTO DE 100nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA.	38
7.1.7 EFECTO DE 1nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE HER-2.	39
7.1.8 EFECTO DE 100nM E <sub>2</sub> SOBRE LA EXPRESIÓN DE HER-2.	39
7.2 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ZO-1 EN LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICA.	41
7.2.1 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE ZO-1.	42
7.2.2 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ZONAB EN LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICA.	43
7.2.3 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE ZONAB	44
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	47
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	54
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	55
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	56

## ABREVIATURAS.

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario (del ARNm)
ANOVA	Análisis de Varianza
AP- 1	Proteína Activadora
AKT:	Proteína cinasa en serina/treonina
AMPc:	Adenosina monofosfato cíclico
AMV:	Enzima retrotranscriptasa del virus del mosaico de la alfalfa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATF:	Factores de transcripción de activación inducible (del idioma inglés Activating transcription factors)
AJ:	Uniones Adherentes (del idioma inglés adherens junctions)
BRCA1:	Cáncer de mama de inicio temprano 1 (del idioma inglés breast cancer 1, early onset)
CDK4/6:	Cinasas dependientes de ciclinas, tipo 4 y 6
CHX:	Cicloheximida
CDIS:	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLIS:	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
DMEM:	Medio de cultivo propuesto por Eagle y modificado por Dubelcco
DTT:	Ditiotreitol
DBD:	Dominio de unión al ADN (del idioma inglés DNA Binding Domain)
dNTP's:	desoxirribonucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOR:	Densidad óptica relativa
E <sub>2</sub> :	Estradiol
EDTA:	Ácido etilen diamino tetracético
ECM:	Matriz Extracelular (del idioma inglés ExtraCellular Matrix)
EGF:	Factor de Crecimiento Epidermal
EGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal tipo I, también HER1
EGTA:	Ácido etilen glicol tetracético

EMT:	Transición epitelio-mesénquima (Del idioma inglés epithelial-mesenchima transition)
ERBB1, 2, 3, 4:	Receptor del factor de crecimiento epidermal tipos 1, 2, 3, 4 (Del idioma inglés epidermal growth factor receptor)
ERE:	Elemento de respuesta a estrógenos
EREG:	Epiregulina
ERK:	Cinasa de señalización extracelular
EtOH:	Etanol
FMF:	Solución desnaturizante para ARN (formamida 50%, MOPS 1X y formaldehído 7%)
FSP-1:	Proteína específica de fibroblasto, tipo 1
G3PDH:	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada (gen de expresión constitutiva)
G1:	Fase G1 del ciclo celular (del idioma inglés Gap 1)
GPCR:	Receptor acoplado a proteínas G (Del idioma G protein-coupled receptors)
H <sub>2</sub> O-DEPC:	Agua con dietilpírocarbonato (inhibidor de ribonucleasas)
HER-2:	Receptor del factor de crecimiento epidermal tipo 2
HEPES:	4 - (2-hidroxietil)-1-ácido piperazin etano sulfónico
HECV:	Células del endotelio vascular humano
TMR	Receptor de estrógenos transmembranal
HMG-1:	Grupo de proteínas de alta movilidad (del idioma inglés high mobility group protein)
HuR:	Proteína de unión a ARN
IGF-IR:	Receptor del Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1
IP3:	inositol trifosfato
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
KCl:	Cloruro de potasio
KDa:	Kilodaltones
LBD:	Dominio de unión a ligando (del idioma inglés Ligand Binding Domain)
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAGUK:	Cinasa de guanilato asociada a la membrana (del idioma inglés membrane-associated guanylate kinase)
MCF-7:	Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de Michigan Cancer Foundation)

MDCK:	Línea celular epitelial de riñón canino (acrónimo de Madin-Darby Canine Kidney)
mTOR:	Blanco de la rapamicina en mamíferos (acrónimo de mammalian Target Of Rapamycin)
MOPS:	Ácido 3-[N-morfolino] propranosulfónico
MMP-1:	Metaloproteasas de matriz (del idioma inglés matrix metalloproteinase-1)
NaCl:	Cloruro de sodio
NR:	Receptores nucleares
NRG:	Neuregulina
OMS:	Organización Mundial de la Salud
P107:	Proteínas supresora de tumores de 107 KDa
P53:	Proteínas supresoras de tumores de 53 KDa
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCNA:	Antígeno nuclear de células en proliferación (acrónimo del idioma inglés de Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PDZ:	Dominio de Interacción a la Zona Occludens
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PROMSA:	Programa de Acción Mujer y Salud
PVDF:	Fluoruro de Polivinilideno (del idioma inglés Polyvinylidene fluoride)
Ras:	Proteína G oncogénica
RA:	Receptor de andrógenos
RE:	Receptores de estrógenos
RE $\alpha$ :	Receptor de estrógenos, tipo alfa
RE $\beta$ :	Receptor de estrógenos, tipo beta
RFC 40:	Factor de replicación C 40
RNasa H:	Enzima endonucleasa que degrada todo tipo de ARN
RNasaOUT <sup>®</sup> :	Inhibidor de ribonucleasas
RFX1:	Factor de transcripción X1
RTK:	Receptor con actividad de tirosina cinasa
RP:	Receptor de progesterona
RT-PCR:	Transcripción reversa, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
S:	Fase S del ciclo celular (del idioma inglés Synthesis)

SBF:	Suero de bovino fetal
SBF-C:	SFB tratado con carbón activado y dextran T-70
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (del idioma inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SH3:	Domínio de homología 3 a Src (del idioma inglés Src homologue 3)
SHC:	Proteína adaptadora que contiene dominios de homología con SRC
Sp3:	Factor de Transcripción (del idioma inglés Specificity Protein 3)
Src:	Proteínacinasas de tirosinas (forma corta de sarcoma)
STAT:	Transductor de señales y activador de la transcripción (del idioma inglés Signal Transducers and Activator of Transcription)
TA:	Temperatura de alineamiento
TBE:	Solución para electroforesis (Tris Base 10 mM, ácido bórico 10 mM y EDTA 10 mM)
TM:	Temperatura de fusión (Tempartaure of melting)
Tfl:	ADN polimerasa extraída de la bacteria <i>Thermas flavus</i>
TJ:	Uniones Estrechadas (del idioma inglés tight junctions)
TRH:	Terapia de Reemplazo Hormonal
UTR:	Regiones que no se traducen (del idioma inglés Untranslated Regions)
Vh:	Vehículo
YY1:	Factor de Transcripción de unión a cajas Y
ZO-1, 2, 3:	Isoformas 1, 2 y 3 del gen Zonula Occludens 1
ZONAB:	Factor de transcripción asociado a ZO-1 (del idioma inglés ZO-1-associated nucleic acid binding protein)

## **LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS.**

### **Figura 1.**

Las formas más frecuentes y la distribución del cáncer de mama.

### **Figura 2.**

Composición molecular de las uniones de oclusión formadas por componentes transmembranales y citoplasmáticos. En cada unión las proteínas de adhesión forman dímeros para poder unirse a otro dímero idéntico en la célula adyacente.

### **Figura 3.**

Estructura y función molecular de las uniones de oclusión. La figura describe los tres principales grupos de proteínas que las constituyen: proteínas integrales de membrana, proteínas citoplasmáticas y proteínas de señalización.

### **Figura 4.**

Entrecruzamiento de señales entre el RE y HER-2 que genera la activación de la vía ERK1, 2, la activación de las MAPK y que tiene como blanco final la activación de efectores transcripcionales para inducir la expresión de genes específicos.

### **Figura 5.**

Muestra la secuencia de bases obtenidas a través del software BioEdit v7.0.5 copyright (c) 1997-2005, que se obtuvieron al secuenciar los amplicones de cada gen, corroborando la secuencia exacta de los genes estudiados.

### **Figura 6.**

Expresión de los genes: ZO-1, ZONAB, ocludina, HER-2 y  $\beta$ -actina, amplificados por PCR en donde se muestran los productos separados con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa.

### **Figura 7.**

Localización de la proteína ZO-1 extraída de las fracciones nucleares y citoplasmáticas utilizando histona H1 y  $\beta$ -actina como controles de normalización (por su expresión constitutiva) también extraídas de las fracciones nucleares y citoplasmáticas respectivamente, las cuales fueron separadas en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida por Western blot

### **Figura 8.**

Localización de la proteína ZONAB extraída de las fracciones nucleares y citoplasmáticas utilizando histona H1 y  $\beta$ -actina como controles de normalización (por su expresión constitutiva) también extraídas de las fracciones nucleares y citoplasmáticas respectivamente, las cuales fueron separadas en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida por Western blot

### **Figura 9.**

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

### **Gráfica 1.**

Niveles de expresión del gen ZO-1 inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 2.**

Niveles de expresión del gen ZO-1 inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 100nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 3.**

Niveles de expresión del gen ZONAB inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 4.**

Niveles de expresión del gen ZONAB inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 100nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 5.**

Niveles de expresión del gen OCLUDINA inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 6.**

Niveles de expresión del gen OCLUDINA inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 100nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 7.**

Niveles de expresión del gen HER-2 inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 1nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 8.**

Niveles de expresión del gen HER-2 inducidos por los tratamientos con el E<sub>2</sub> a una concentración de 100nM por diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

### **Gráfica 9.**

Localización de la proteína ZO-1 inducidos por el E<sub>2</sub> (1nM) en las fracciones nucleares y citoplasmáticas a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

**Gráfica 10.**

Localización de la proteína ZONAB inducidos por el E<sub>2</sub> (1nM) en las fracciones nucleares y citoplasmáticas a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

**Gráfica 11.**

Localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por el E<sub>2</sub> (1nM) en las fracciones citoplasmáticas a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

**Gráfica 12.**

Localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por el E<sub>2</sub> (1nM) en las fracciones nucleares a diferentes periodos de incubación en las células MCF-7.

**Tabla 1.**

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el ARNm que codifica para las proteínas componentes del complejo ocluyente ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, además de HER-2.  $\beta$ -actina que fue utilizado como gen de normalización.

## RESUMEN

En el cáncer la pérdida de inhibición por contacto refleja el desorden en las vías de transducción de señales activando receptores membranales como el receptor del factor de crecimiento epidermal tipo 2 (HER-2) el cual está relacionado con actividades de proliferación y diferenciación.

En este estudio se trató de determinar el papel del estradiol ( $E_2$ ) en la regulación de la expresión de los genes que codifican a las proteínas del complejo ocluyente ZO-1 (Zonula Occludens 1), ZONAB, ocludina, incluyendo HER-2 además de analizar su efecto en la localización de ZO-1 y ZONAB en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Los resultados revelaron que el estradiol estimula la expresión de ZO-1 y ZONAB tanto el ARN como su proteína después de las 3 y 6 horas de incubación y de forma dependiente a la concentración, además se demostró que la expresión de ZO-1 no depende de la síntesis *de novo* de proteínas, lo que se mostró con el uso de cicloheximida (CHX) un inhibidor de la traducción. En cuanto a ZONAB y el efecto de CHX se observa que la expresión de ZONAB si depende de la síntesis *de novo*. Los efectos máximos del  $E_2$  se observan a una concentración de 100nM y se correlaciona con el incremento en los niveles de expresión de HER-2 (de 2.5 a 3 veces con respecto al control) observados después de las 24 horas de incubación, este efecto se explica por el hecho que ZO-1 y ZONAB tienen la capacidad de funcionar como co-activador y factor de transcripción, respectivamente en el promotor del gen HER-2. Las proteínas ZO-1 y ZONAB se localizaron en las fracciones nucleares y citoplasmáticas de las células de cáncer de mama incubadas con estradiol a diferentes periodos de tiempo. En donde se observa la translocación de ZO-1 al núcleo después de los 30 minutos de incubación con el  $E_2$ , y una disminución tanto de ZO-1 y ZONAB en las fracciones citoplasmáticas después de los 30 minutos de incubación con estradiol.

Por otra parte, las diferentes dosis del  $E_2$  disminuyeron significativamente los niveles de ocludina después de las 9h de incubación, efecto que puede ser asociado al incremento en la permeabilidad paracelular como ha sido reportado en células del endotelio vascular humano.

Nosotros proponemos que  $E_2$  puede inducir cambios en la expresión génica de los componentes del complejo ocluyente que concuerdan con la transición de epitelio mesénquima caracterizado por la reducción del marcador epitelial ocludina durante la tumorigénesis de la glándula mamaria. Se observó incremento concomitante en los niveles de expresión de ZONAB y ZO-1,

además de los cambios observados en su translocación al núcleo que condujeron a una expresión elevada de HER-2. La inhibición de la formación de las uniones estrechas disminuye la adhesión célula a célula, lo cual induce la pérdida de inhibición por contacto que desregula el crecimiento, tumorigénesis y la metástasis en el cáncer de mama.

Los resultados obtenidos describen por primera vez un mecanismo mediante el cual el E<sub>2</sub> desestabiliza la formación de las uniones estrechas, disminuye la adhesión célula a célula y estimula la síntesis del HER-2 en células de carcinoma mamario humano.

## **ABSTRACT.**

Breast cancer is the first cause of death by cancer in Mexican women from 25 years old and above. In normal breast ductal epithelium, junction complexes comprise tight junctions (TJ) and adherent junctions (AJ), both establish and maintain cell-to-cell adhesion; aberrations in this complex induce epithelial-mesenchymal transition, a key developmental program that is often activated during invasion and metastasis of breast cancer cells. This study sought to determine the role of 17-beta-estradiol ( $E_2$ ) in the regulation of expression and localization of TJ-associated proteins in the human breast cancer cell line MCF-7, including Zonula Occluden-1 (ZO-1), occludin, the ZO-1-associated transcription factor (ZONAB), and in the expression of the epidermal growth factor receptor-2 (HER-2).

We found that in estrogen receptor-positive MCF-7 cells,  $E_2$  at 100nM induces multiple effects on both ZO-1 and ZONAB mRNA expression, increasing their expression after 15 minutes, decreasing 15 minutes later and increasing again at 6 hours of incubation. It is important to notice that ZO-1 expression, but not ZONAB, is independent of *de novo* protein synthesis, blocked by cycloheximide. These results were correlated with the increase of HER-2 expression levels (up to 3-fold) observed after 24 hours of incubation. Our results showed that maximal ZO-1 translocation to nucleus was after 30 minutes of incubation, with concomitant decreased of both ZO-1 and ZONAB in cytoplasmic fractions.

We also demonstrated that different doses of  $E_2$  ( $10^{-9}M$  to  $10^{-7}M$ ) decreased dramatically occludin mRNA levels after 9 hours and up to 24 hours of incubation; this effect can be associated with an increase in paracellular permeability.

We suggest that  $E_2$  can induce changes in TJ proteins that starts epithelial-mesenchymal transition and an increase in HER-2 gene expression. The results describe for the first time a mechanism by which  $E_2$  destabilizes the tight junctions formation, decreases cell-cell adhesion and stimulates the HER-2 synthesis in human breast carcinoma cells.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es el crecimiento y proliferación desordenada de células que adquieren la capacidad de invadir otros tejidos. Cuando una célula pierde la capacidad de regular su proliferación se convierte en neoplásica. La acumulación de células malignizadas constituyen un tumor, de los cuales, los malignos se distinguen porque adquieren la capacidad de desprenderse del tejido que los originó y pueden viajar por la sangre o linfa para invadir otros tejidos y posteriormente formar nuevos tumores, a lo cual se le denomina metástasis y es la causa más común de muerte en pacientes con cáncer (Wittekind y Neid, 2005; Mareel y Leroy, 2003). Es importante resaltar que la diferencia entre tumores malignos y benignos es que el primero es invasivo, es decir metastático, por lo que a partir de este estadio se le considera como cáncer, mientras que a los tumores benignos no se les considera como tales (Sabiston, 1995).

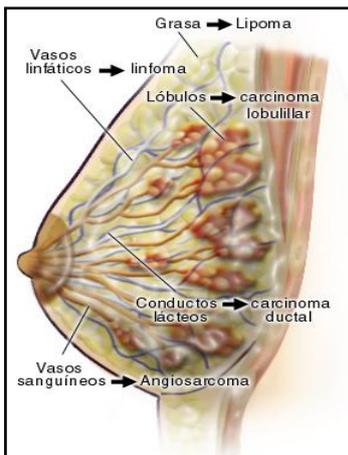
El cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública en muchos países alrededor del mundo. A nivel mundial, cada año se tiene un registro de 22 millones de casos. En ese mismo periodo se diagnostican 10 millones de nuevos casos, mientras que 6.2 millones de personas pierden la vida a causa de esta enfermedad (OMS, 2010). En México, en el 2007 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte entre las mujeres, con 35,303 defunciones lo que representa el 15.4% del total de las defunciones registradas en ese año. De los tipos de cáncer, el de mama es la primera causa de muerte en México en mujeres mayores de 25 años, siendo los tres principales que causaron fallecimientos durante 2007 el de mama (13.8%), el del cuello del útero (12.1%) y el de hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por cáncer de mama, en comparación con el año 2006, se mantiene en el primer lugar (INEGI, 2010).

Los especialistas han señalado que el principal obstáculo en la lucha contra el cáncer es el diagnóstico tardío. La mayoría de las pacientes llegan a los servicios de salud en las etapas más avanzadas de la enfermedad, es por todo esto que es importante reforzar las acciones que se han realizado hasta la fecha con respecto a los programas de prevención oportuna del cáncer, así como con los programas multidisciplinarios que estudian esta terrible enfermedad. No todos los datos son desalentadores, desde el sexenio 1994-2000, con la creación del Programa Nacional de la Mujer, se han intensificado las campañas de detección y tratamiento del cáncer de mamá, realizando un número importante de mastografías, dando la atención médica y hospitalaria a los casos que así lo requirieron, teniendo como objetivo prevenir la enfermedad; sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes para controlar esta enfermedad y es

imperativo realizar investigaciones que permitan detectar oportunamente el cáncer de mama (PROMSA, 2006; SS, 2006).

El incremento tan notable observado en los últimos veinte años en la incidencia del cáncer mamario en la población mexicana se ha asociado al impacto de diversos factores de riesgo, relacionados entre ellos con los estilos de vida contemporáneos. Es indudable que algunos factores asociados a la vida reproductiva de la mujer tienen un papel determinante en el origen del cáncer de mama (Kelsey *et al.*, 1993), incluyendo la menarquía temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, la edad tardía del nacimiento del primer hijo (a) e incluso la ausencia de lactancia materna, las cuales se suman a factores externos como la administración de estrógenos y progestinas sintéticas en formulaciones anticonceptivas o en terapia de reemplazo hormonal (TRH) en el climaterio y durante la postmenopausia (López-Ríos *et al.*, 1997).

El cáncer de mama es una enfermedad que se desarrolla en las células de los lóbulos y conductos formadores de leche. Cada mama normal tiene de 15 a 20 secciones llamadas lóbulos, las cuales comprenden secciones más pequeñas denominadas lobulillos, los cuales terminan en docenas de bulbos minúsculos que pueden producir leche. Los lóbulos, los lobulillos y los bulbos están conectados por tubos delgados denominados conductos (Aranda-Gallegos, 1998). Las formas más frecuentes de cáncer de mama son el lobulillar (lóbulos y lobulillos), y el ductal, que es el tipo más común de cáncer de mama; (Solej, 2005).



**Figura 1.** Tipos de neoplasias y su distribución en el cáncer de mama. En donde destacan las formas mas frecuentes: Carcinoma ductal y carcinoma lobular.

El carcinoma ductal in situ (CDIS) es un cáncer de mama muy precoz que puede desarrollarse en un tipo invasivo de cáncer mamario, es decir, cáncer que se ha esparcido desde el conducto a los tejidos circundantes.

El carcinoma lobular in situ (CLIS) es un marcador o indicador en una mujer con un riesgo incrementado de padecer cáncer de mama invasivo, es decir, cáncer que se ha esparcido a los tejidos circundantes. Es común que ambas mamas estén afectadas (Sanders, 2005).

El cáncer mamario, como otras neoplasias malignas, tiene un origen multifactorial (Berardo *et al.*, 1996). A pesar de que los mecanismos celulares y moleculares involucrados en su inicio y

progresión, no han sido completamente elucidados, existe evidencia de que las mutaciones de genes específicos incrementan la susceptibilidad para su desarrollo, entre los cuales se encuentran diversos oncogenes y/o factores de crecimiento (Rajkulmar y Yallick, 1994) que son activados o expresados inadecuadamente en el cáncer mamario. Por otra parte, existen diversas evidencias que indican que las hormonas esteroides sexuales, particularmente los estrógenos, juegan un papel determinante en la génesis del cáncer de mama (Pike *et al.*, 1991). Un número importante de estudios clínicos y experimentales han demostrado que los estrógenos pueden promover el cáncer mamario por lo que la ooforectomía, la administración de antiestrógenos o de inhibidores de la enzima aromatasas puede evitar este efecto (Demers, 1994., Gompel, 2000). Por tal motivo y debido a la dependencia hormonal del cáncer de mama, la caracterización inmunohistoquímica de los receptores intracelulares de estrógenos, progesterona y de factores de crecimiento han sido utilizados como marcadores de actividad tumoral y de diagnóstico, sin embargo su expresión en cáncer mamario pareciera ser la misma en tumores asociados o no con procesos de invasión (Fugua *et al.*, 1993).

La mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo el cáncer mama, son originados a partir de tejido epitelial y son caracterizados por un control aberrante de su crecimiento y la pérdida de diferenciación y arquitectura del tejido de donde son originados. Esta es una de las propiedades fundamentales de las células cancerosas. La reducción de las interacciones célula a célula permite a las células cancerosas perder el orden, resultando en la destrucción de toda la arquitectura del tejido. La pérdida de inhibición por contacto, la cual refleja desorden en las vías de transducción de señales que está conectada con las interacciones célula a célula, es típica de los dos estados de progresión del tumor: el temprano, donde se presenta pérdida de la polaridad celular y del control de crecimiento; y el tardío, caracterizado por la invasión a otro órgano o tejido y la metástasis (Mareel y Leroy., 2003; Itoh y Bissell., 2003).

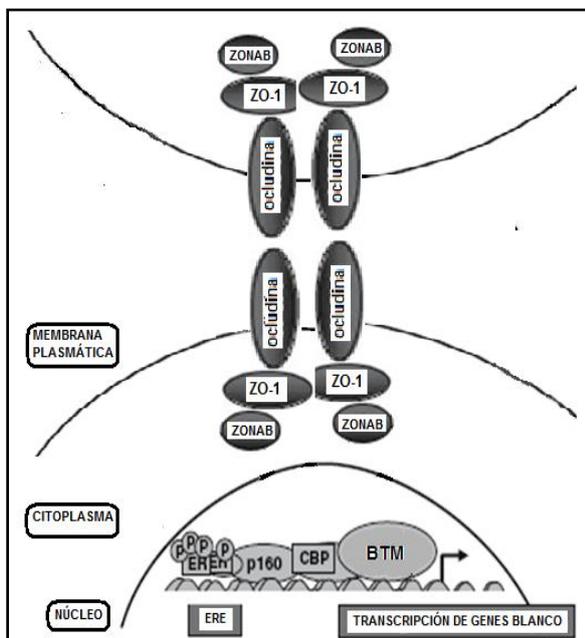
## **I.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR CONTACTO**

El concepto de inhibición de crecimiento celular por contacto se basa en la observación de que las células en crecimiento se adhieren al sustrato donde son crecidas, en procesos *in vitro* y detienen su proliferación al llegar a la confluencia y al entrar en contacto entre sí; en esta fase, las células pueden mantenerse relativamente en un estado estacionario durante varias semanas. La inhibición por contacto, es un fenómeno que se considera como uno de los principales mecanismos de regulación del desarrollo embrionario y del crecimiento del tejido (Cheng *et al.*, 2006).

Las uniones intercelulares adherentes entre células epiteliales y endoteliales están formadas por las uniones estrechas y las uniones adherentes, además de promover la adhesión célula-célula, estas estructuras también regulan la permeabilidad paracelular, la inhibición de crecimiento por contacto y el crecimiento endotelial. Los contactos célula-célula son una forma de control crítica para las funciones endoteliales y epiteliales en condiciones de quiescencia y en situaciones de actividad tal como inflamación y angiogénesis. Las proteínas de unión restringen la migración celular, inhiben la proliferación, apoptosis y contribuyen al mantenimiento de la polaridad celular. En los endotelios, los complejos de unión comprenden las uniones estrechas, (TJ), las uniones adherentes (AJ), y las uniones gap, en donde los primeros dos tipos de unión establecen y mantienen la adhesión célula-célula. Estas estructuras de unión están formadas por distintas proteínas transmembranales que promueven las interacciones célula-célula homofílicas y la transferencia de señales intracelulares (Dejana *et al*; 2008).

Las uniones intracelulares de adhesión transmembranal varían en su estructura proteínica durante la maduración y la estabilización de la unión endotelial. Lo más importante, después de que se han formado los contactos en el epitelio es el equilibrio dinámico en las proteínas de adhesión y no sólo un ciclo continuo entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares. (Shen *et al*. 2008).

Aunque la composición molecular de los diferentes tipos de uniones varía, generalmente



**Figura 2.** Composición molecular de las uniones de oclusión, formadas por componentes transmembranales y citoplasmáticos, en cada unión las proteínas de adhesión forman dímeros para poder unirse a otro dímerno idéntico en la célula adyacente.

formadas por dos componentes, uno transmembranal y otro citoplasmáticos. En cada unión las proteínas de adhesión forman dímeros y se unen a otro dímerno idéntico presente en la célula adyacente. El reconocimiento/adhesión es información que se envía dentro de la célula por señales citoplasmáticas y transmembranales. Por lo que las uniones se comportan como verdaderos complejos de señalización, ya que una carencia de señales externas positivas causa que las células paren su división (Dejana *et al*; 2008)

Las células también son capaces de detectar su ambiente y responder a los cambios en éste, por ejemplo si una célula siente que está rodeada en

todos sus lados por otras células, ésta parará su división. De esta forma, las células crecen cuando se necesita pero paran cuando el espacio ha sido ocupado. Las células cancerosas parecen no tener inhibición por contacto, crecen aún cuando se encuentran rodeadas por otras células haciendo que se forme una masa de células (Polette *et al*; 2005).

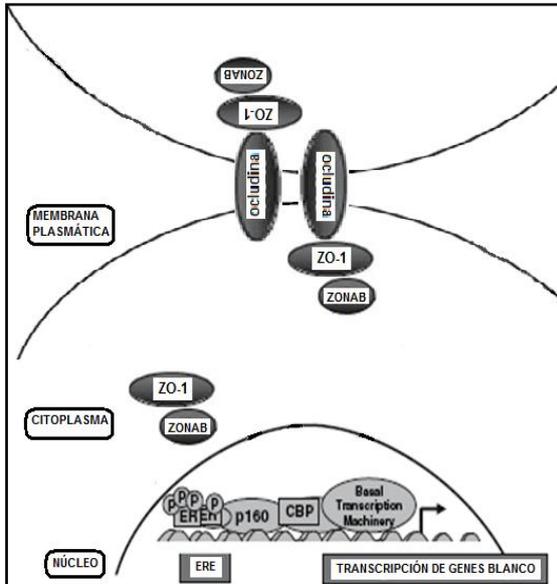
La inhibición por contacto es una capacidad que poseen las células normales de interrumpir cualquier movimiento de membrana y cualquier mitosis cuando, en un cultivo están en contacto unas con otras. En cultivo, las células cancerosas permanecen independientes unas de otras y continúan multiplicándose y migrando, sin poseer esta propiedad de inhibición por contacto. La autonomía de las células tumorales se relaciona con la ausencia de intercambio de información intercelular. Así, las células transformadas carecen de las restricciones y los controles que rigen el crecimiento de las “células normales”, En este sentido, estas células crecen más rápidamente que las normales al no depender de suero ni de factores de crecimiento para crecer, han perdido su capacidad de crecer en monocapas sin necesidad de una superficie sólida a la cual adherirse. Además, las células transformadas son inmortales y no alcanzan la senescencia cuando están en cultivo (Evans *et al.*, 1991).

## **I.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS**

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

Las uniones estrechas son microdominios de la membrana plasmática que rodean el polo apical de cada célula epitelial separando el lado apical del basolateral. Ellas forman una barrera de difusión intercelular (o puerta) regulando el pasaje de iones, agua, y varias macromoléculas a través de espacios para-celulares o una barrera de restricción de difusión apical/basolateral de proteínas de membrana y lípidos. Las TJ son descritas como una serie de puntos fusionados entre las caras exteriores de las membranas de células adyacentes también llamados “kissing” points (González-Mariscal., 2002). La barrera intercelular formada por las TJ tiene selectividad en tamaño molecular y tipos de iones, las diferencias en permeabilidad dependen del tipo celular y las condiciones de éstas. Algunos estudios describen a las TJ en la glándula mamaria como estructuras dinámicas en procesos como lactogénesis, en donde se demuestra que son

reguladas por hormonas tales como la prolactina, los glucocorticoides y la progesterona. La integridad de las TJ es crucial para la secreción de la leche durante la lactancia, en donde las TJ en el epitelio de los alvéolos son impermeables para evitar la fuga de leche del lumen a pesar de ser sujeto a filtraciones en epitelios de glándula mamaria en animales preñados. La función de barrera que cumplen las TJ es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis en varios tejidos, tal como sucede en el tejido intestinal en donde las TJ generan una barrera que regula el transporte en el interfaz de la mucosa con el ambiente externo (Chen Jie *et al*; 2008).



**Figura 3.** Estructura y función de las uniones de oclusión. La figura describe los tres principales grupos de proteínas que las constituyen: proteínas integrales de membrana, proteínas citoplasmáticas y proteínas de señalización.

Actualmente han sido identificadas un gran número de proteínas que se han establecido como componentes de las TJ. Estas pueden ser categorizadas dentro de tres grupos: 1) proteínas integrales de membrana, 2) proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia que organizan a las proteínas integrales de membrana y las conectan a los filamentos de actina o a otra proteína citoplasmática, y 3) proteínas de señalización que pueden estar

envueltas en el ensamble de las uniones, además funcionan como una barrera de regulación y de transcripción de diferentes genes (Itoh y Bissell., 2003).

La proteína ocludina es la primera molécula identificada como una proteína integral de membrana con un peso aproximado de 60 KDa localizada en las uniones estrechas. La ocludina presenta cuatro dominios transmembranales, un largo dominio carboxilo terminal citoplasmático y un dominio corto amino terminal citoplasmático. Dos asas extracelulares que son similares en tamaño y son ricas en residuos de tirosina. El nivel de expresión de ocludina se correlaciona con el número de uniones estrechas en varios tejidos, estos estudios indican que ocludina es un componente esencial de las TJ.

*Zonula Occludens* compuesta por las proteínas ZO-1, ZO-2, y ZO-3 que son proteínas de la periferia de la membrana. ZO-1 fue el primer componente de la TJ en ser identificado con una masa molecular de 220 kDa. Cuando ZO-1 es inmunoprecipitado dos proteínas con masas moleculares de 160 y 130 kDa son coprecipitadas y muestran una localización específica en las

TJ estas proteínas fueron designadas ZO-2, y ZO-3. ZO-1 ya que existen dos variantes de “splicing” caracterizado por la presencia de 80 aminoácidos denominado dominio  $\alpha$ . La isoforma  $\alpha+$  está presente en las células epiteliales, mientras que la isoforma  $\alpha$  se limita a las células endoteliales y células de Sertoli (Balda y Anderson 1993).

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

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

### **1.3 TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA (EMT)**

El carcinoma es el tipo más frecuente de cáncer en los seres humanos, y la metástasis se presenta en la mayoría de las defunciones por cáncer. La invasión es la primera de la cascada de eventos que conducen al desarrollo de la metástasis, pero es en la actualidad el menos

conocido y estudiado. Esto ocurre por la transferencia de células malignas del cumulo de células donde se origino el tumor hacia los tejidos circundantes, esto implica la adquisición de la capacidad de migrar (Christofori, 2006). Los carcinomas se componen de células epiteliales cohesivas unidas entre sí por E-cadherina y son inicialmente separadas del estroma de la membrana basal, una matriz extracelular (ECM) especializada, proporcionando la estructura y la información correcta para las funciones y la estabilidad del epitelio. Así, para poder acceder en el compartimiento del estroma y convertirse en invasivas, el carcinoma de células estacionarias tienen que superar la restricción física, generada por la adhesión célula a célula y la barrera de la membrana basal. A pesar de la importancia clínica de la progresión metastásica, aún no es claro cómo las células del carcinoma realizan la invasión, como el primero de los eventos responsables del subsecuente desarrollo de la metástasis a distancia.

Hay una creciente aceptación de que el desprendimiento de células carcinomatosas conlleva su transferencia al estroma esto resume el proceso de desarrollo conocido como la transición epitelio-mesénquima (EMT), el cual permite a las células epiteliales fijas convertirse en células móviles. Las células epiteliales están polarizadas y firmemente conectadas una a otra a través de las uniones intercelulares que impiden la motilidad.

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

La EMT se asocia con la pérdida de expresión y / o localización de las proteínas implicadas en la formación de las uniones celulares, tales como E cadherina, ZO-1, ocludina lo y claudina, y el aumento en la expresión de proteínas del mesénquima como la proteína específica de fibroblasto1 (FSP-1), actina de músculo liso y la fibronectina, así como las integrinas. La EMT también se asocia con un cambio en la expresión de filamentos intermedios, queratinas y de vimentina (Thiery y Sleeman, 2006). La pérdida de expresión de E cadherina es un acontecimiento frecuente durante la progresión del cáncer (Thiery, 2002), y muchos de los cánceres como el cáncer de próstata, de páncreas, renal, gástrico y ciertos tipos de cáncer de mama (por ejemplo, el carcinoma lobulillar) son asociados con la pérdida o la disminución de la

expresión de E cadherina. La pérdida de E cadherina se puede atribuir a mutaciones de ciertos genes o regulación negativa de la transcripción debido a la metilación de estos genes, o a la inhibición de la transcripción del gen estimulada por la activación de ciertas vías de señalización que resultan en la activación de represores de la transcripción de E cadherina, tales como Snail 1, Snail2 y Twist.

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

#### **I.4 METÁSTASIS**

La metástasis del cáncer es un proceso muy complejo que implica la desregulación de la interacción entre proteínas y genes que son responsables de la invasión, la angiogénesis, y la circulación de las células tumorales en los vasos sanguíneos, la colonización a sitios secundarios de otro órgano, y finalmente, la evasión de los sistemas de defensa. La diseminación metastásica a través de los sistemas vascular y linfático es la culminación, y la etapa final, de esta enfermedad que se desarrolla en un lapso de entre 5 y 20 años. Durante la mayor parte de ese período, lesiones microscópicas se desarrollan a través de una serie de estadios hiperproliferativos y premalignos de un carcinoma *in situ* que se presenta en un período extraordinariamente largo para un examen y tratamiento inicial del cáncer. Actualmente es conocido que para la mayoría de los tipos de neoplasias sólidas en humanos, los carcinomas microinvasivos surgen de una lesión precursora al carcinoma *in situ* (Arpino, *et al.*, 2005). Por tal motivo la prevención de la transición de células premalignas a carcinoma invasivo/metastásico es un objetivo importante para la quimioprevención del cáncer. Con el fin de alcanzar este objetivo, es necesario identificar nuevos blancos moleculares que estén asociados con la adquisición de la propiedad invasiva del cáncer.

El tumor maligno es un estado en el que las células presentan una estructura neoplásica más agresiva (Hanahan y Weinberg, 2000) La proliferación sostenida no es la única característica de

las células cancerosas. De hecho, el crecimiento por sí solo no causa que una neoplasia pueda llegar a ser maligna. Las células tumorales malignas migran a través de los bordes de los tejidos y tienen la capacidad de sobrevivir y crecer entre una población de células diferentes al tejido donde se han originado. La verdadera amenaza del tumor maligno es el comportamiento de las células, su propensión a infiltrar y usurpar la estabilidad de las células del órgano o tejido al cual invade.

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

Los genes que son necesarios para ciertas funciones como la remodelación vascular pueden participar en la generación del tumor primario y en propiciar el ambiente metastásico; estos son genes de progresión de la metástasis los cuales pueden ser sobre-expresados en tumores primarios. Cerca de 18 genes derivados de una selección *in vivo* de células de cáncer de mama que de manera eficiente se diseminan hacia los pulmones incluye EREG (Epiregulina), COX-2 (Ciclooxigenasa 2), BRCA1 (Cáncer de mama de inicio temprano 1, HER2), y MMP-1 (Metaloproteinasa de matriz-1). Estos genes cooperan en la remodelación de la vasculatura en sitios donde se establece un tumor mamario y de metástasis en pulmón. En la mama estos genes permiten neoangiogénesis e intravasación de células cancerosas, en el pulmón median la extravasación de células cancerosas circulantes a los capilares del parénquima (Chiang y Massagué., 2008).

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

## **II. ANTECEDENTES.**

### **2.1 UNIONES ESTRECHAS Y REGULACIÓN HORMONAL**

Estudios recientes han mostrado diversos efectos del estradiol en la regulación de las uniones estrechas y en la expresión de moléculas que conforman el complejo ocluyente así como el efecto en la permeabilidad paracelular de células de endotelio vascular (HECV), esta línea celular expresa la isoforma del receptor de estrógenos  $\alpha$  pero no expresa la isoforma  $\beta$ . Estos resultados mostraron efectos bifásicos en la permeabilidad paracelular y cambios en la expresión de diferentes proteínas componentes del complejo ocluyente. El estradiol induce efectos bifásicos sobre las uniones estrechas de manera dependiente de la concentración y del tiempo, a una concentración de 1nM y 100nM, se observa una clara disminución de los niveles de expresión de ocludina y un incremento de la permeabilidad paracelular de las células HECV, pero a una concentración 1pM este efecto se revierte, disminuye la permeabilidad paracelular e incrementan los niveles de expresión de ocludina (Lin; 2003).

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

#### **2.2.1 UNIONES ESTRECHAS EN REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y PROLIFERACIÓN CELULAR**

Las TJ juegan un papel fundamental en la organización de diversos procesos como la morfogénesis, la polaridad de la célula, proliferación, y la diferenciación lo cual requieren la coordinación de las señales que se generan desde la membrana plasmática. Diversas evidencias sugieren que las TJ son una plataforma para el inicio de la señalización intracelular coordinada

(Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003). Sin embargo, no se sabe con precisión como es que la activación de las vías de señalización por las TJ pueda influir en la morfogénesis en algunos procesos cancerosos.

Algunos factores de transcripción son reguladores multifuncionales de la expresión génica y se les ha propuesto como promotores de proliferación, tal es el caso del factor de transcripción ZO-1 proteína asociada con ácidos nucleicos (ZONAB), el cual ha mostrado la capacidad de modular la densidad celular de la línea MDCK (células de riñón de perro), uno de los mecanismos propuestos es la unión de ZONAB con el inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa 4 (CDK4), lo cual genera el secuestro de CDK4 en el citoplasma y la consecuente reducción de la misma en el núcleo. La regulación de la localización de CDK4 es una de las vías por las cuales ZO-1 y ZONAB regulan la transición entre la fase G1/S del ciclo celular. Se han mostrado evidencias de que ZO-1/ZONAB regula la progresión del ciclo celular especialmente en la transición G1/S en células epiteliales por dos mecanismos: regulación transcripcional del ciclo celular y por factores de duplicación del ADN. Algunos experimentos sugieren que la sobreexpresión de ZONAB induce la regulación positiva de algunos componentes que participan en la replicación (RFC 40 y los factores que permiten la replicación) o en la remodelación de la cromatina (histona H4 y grupo de proteínas de alto peso molecular HMG-I). El antígeno nuclear de proliferación (PCNA) es un factor esencial de replicación en eucariontes que es de suma importancia para los procesos de reparación del ADN, además de que su promotor puede ser transcripcionalmente regulado por diferentes oncoproteínas y factores de transcripción tal como la oncoproteína del adenovirus E1A, Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el factor de transcripción RFX1, las proteínas supresoras de tumores p107 y p53 y E<sub>2</sub>F. ZONAB se une al promotor de PCNA en una región identificada entre los sitios de unión de p53, E<sub>2</sub>F y ATF con lo que ZONAB unido al promotor puede regular de manera positiva o negativa la expresión de PCNA (Sourisseau y Balda., 2006).

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

talk” con la matriz extracelular y las vías de adhesión célula a célula para regular la proliferación de la célula (Sourisseau y Balda., 2006).

Otro ejemplo de la forma en que actúa ZONAB y ZO-1 para regular la expresión del proto oncogén HER-2, establece que la proteína ZO-1 al no contar con dominios de unión la ADN tiene la capacidad de interactuar con la proteína ZONAB, la cual se une directamente al ADN por medio de motivos de zinc presentes en esta proteína, lo cual conlleva a la inducción de la transcripción del gen HER-2, el cual está relacionado con actividades de proliferación y diferenciación (Balda y Matter; 2000). Mientras que HER-2 tiene un papel determinante en algunos tipos de cáncer en cuanto a la expresión o activación particular de algunos factores de crecimiento y de proliferación celular, además de que su expresión está alterada en algunos tipos de tumores epidermales y en algunos estudios clínicos se demuestra su importancia en la progresión del tumor activando diferentes vías de señalización que inducen la expresión de ciertas proteínas reguladoras de proliferación celular. Este receptor ha sido intensamente estudiado por su importancia en el cáncer y como blanco terapéutico. Algunos inhibidores del receptor HER-2 han sido probados generando buenos resultados pero con ciertas limitantes (Hynes y Lane., 2005).

### **2.2.2 RECEPTORES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO.**

Receptores a hormonas esteroides. El receptor de estrógenos pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (NR) 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. Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como RE $\alpha$  y RE $\beta$ , formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente. Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos intracelular transmembranal (TMR), conocido como GPR30, que actúa de manera independiente de RE $\alpha$  y RE $\beta$ , pero influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF). RE $\alpha$  y RE $\beta$  son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. 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 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. La

región carboxilo terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del RE), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor (Noriega-Reyes y McCarron., 2008).

Adicionalmente, el 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  $E_2$  activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear y muy importantemente una superficie sobre la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales. 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. Por último, en la región N terminal existen diversos sitios de fosforilación, los cuales son regulados por una variedad de proteínas cinasas. El papel que tiene la fosforilación en la actividad de los receptores nucleares no está completamente definida, pero probablemente está involucrada en la modulación de la actividad de AF-1 y su interacción con correguladores, así como en la intercomunicación con otras vías de transducción de señales. Se ha visto que la fosforilación del ER puede relacionarse con su unión a sus elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Todos los receptores de esteroides, incluyendo el RE $\alpha$ , son fosforilados después de la unión a sus ligandos respectivos (Noriega-Reyes y McCarron., 2008, Razandi *et al*; 2002).

Receptor del factor de crecimiento epidermal tipo 2 (HER-2).- Es un receptor con actividad de tirosina cinasa (RTK), pertenece a una súper familia que consta de cuatro miembros: EGFR/ERBB1 (HER-1), ERBB2 (HER-2), ERBB3 (HER-3) y ERBB4 (HER-4), todos los miembros tienen una región extracelular de unión al ligando, una región de unión a la membrana y una región citoplasmática tirosina cinasa (Arpino. *et al*; 2004). Para que este receptor pueda ser activado se deben formar homodímeros o heterodímeros entre los cuatro miembros de la familia y esta dimerización induce la activación del dominio de cinasa, resultando en la fosforilación en un residuo de tirosina específico en la parte citoplásmica. Este residuo fosforilado sirve como sitio de reclutamiento para un grupo de proteínas, que conlleva a la activación intracelular de diferentes vías de señalización como la vía de fosforilación de inositol

trifosfato (IP3) o la vía de la proteína cinasa en serina/treonina (AKT). Con respecto a los ligandos del receptor HER-2, la familia de ligandos, puede ser dividida en tres grupos: el primero incluye EGF, factor  $\alpha$  de crecimiento transformante, el cual se une específicamente a EGFR; y el segundo incluye  $\beta$ -celulina, la unión de heparina a EGF (HB-EGF). El tercer grupo está compuesto de neuregulinas (NRGs) y dos subgrupos basados en la capacidad de unión ERBB3 y ERBB4 (NRG1 y NRG2) o solo ERBB4 (NRG3 y NRG4). HER-2 presenta en su estructura una región extracelular y una región transmembranal, la región extracelular de cada receptor HER presentan cuatro dominios denotados del I al IV. El dominio I y III están relacionados en la unión con la neuregulina (NRG) y la consecuente formación del dímero a través de la exposición del dominio II. Mientras que el dominio IV presenta relación con la unión a otros ligandos (Hynes y Lane A., 2005).

### **2.3 ENTRECruzamiento DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (RE) CON EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL TIPO 2 (HER-2) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

Tradicionalmente la acción de las hormonas esteroides fue exclusivamente atribuida a la unión del estradiol al receptor de estrógenos (RE) con la subsecuente fosforilación del receptor, alterando su conformación e induciendo su dimerización para transactivar genes blanco, que generan efectos biológicos en la célula. Recientemente se ha demostrado que las hormonas esteroides pueden actuar en las células en tiempos desde segundos hasta minutos, efectos que se han clasificado como efectos no genómicos. En el caso particular del estradiol, se le ha atribuido en la mayoría las células estudiadas la capacidad de unirse a los receptores que existen dentro de las balsas caveolares y a otros dominios en la membrana plasmática, el RE físicamente se asocia con otras proteínas de andamiaje, como caveolina 1 y una amplia variedad de moléculas proximales de señalización, incluyendo las proteínas G, Src, Ras y B-Raf. Esto resulta en la activación de cascadas de señalización que principalmente inicia por la activación de las proteínas G. Esto conlleva a la activación de la fosfolipasa C, proteína cinasa C, ERK, la fosfatidil inositol 3 cinasa y la óxido nítrico sintasa. Estos efectos de señalización positiva dependen del contexto celular. En algunas células, los estrógenos inhiben algunas citocinas relacionadas con la transducción de ciertas señales de diferenciación celular, proliferación, migración o muerte celular (Razandi y Levin., 2002).

El RE puede generar un entrecruzamiento de señales (“cross-talk”) con HER-2 en dos direcciones una es vía ERK1, 2 que es activado por las proteínas cinasas de activación mitogénica (MAPK) que son activadas por la señalización de HER-2 que es fosforilado por RE.

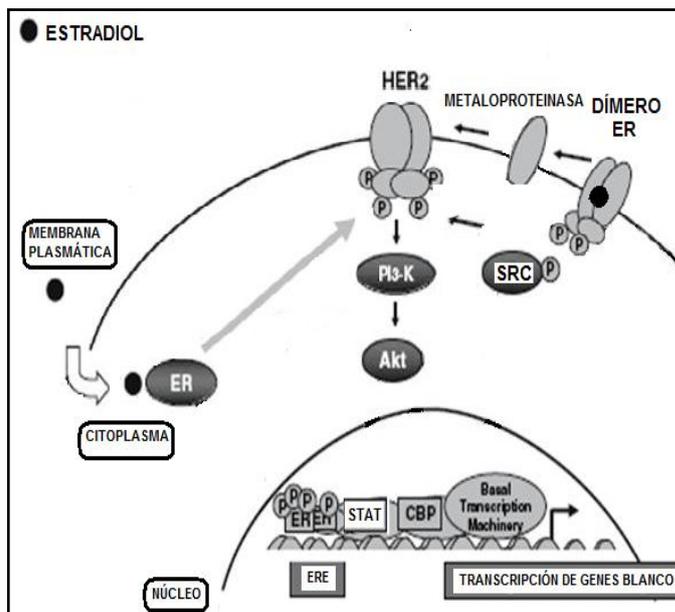
El entrecruzamiento de señales entre RE/HER-2 inicia cuando el estradiol se une a su respectivo receptor y activa la vía no genómica activando a HER-2 y este a su vez encendiendo las diferentes vías de señalización río abajo activando cinasas como ERK1,2, MAPK, y AKT (Ellis., 2007). La activación del receptor HER-2 se puede dar por diversos mecanismos incluyendo la mutación, sobreexpresión y la producción autocrina o paracrina del factor de

crecimiento epidermal (EGF) o alguno de los miembros de la familia

de ligandos. La activación autocrina se puede generar a través del RE y su interacción con su respectivo ligando (E<sub>2</sub>) el cual genera que las metaloproteinasas de la membrana

plasmática liberen un pro-EGF (proceso conocido como liberación del ectodominio). La activación del receptor HER-2 estimula numerosas vías de señalización a través del reclutamiento de proteínas y la

fosforilación de residuos específicos. La vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)-AKT es estimulada a través



**Figura 4.** Entrecruzamiento de señales entre el RE y HER-2 que genera la activación de la vía ERK1, 2 conlleva la activación de las MAPK y que tiene como blanco final la activación de efectores transcripcionales para inducir la expresión de genes específicos.

del reclutamiento de la subunidad adaptadora p85 de PI3K a el receptor. En consecuencia el blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) actúa como un sensor central de nutrientes y energía, además de ser también modulado por PI3k-AKT. Por otra parte la activación de la vía de las MAPK depende del reclutamiento del receptor del factor de crecimiento y su unión con la proteína 2 (GRB2) o la interacción de SHC (proteína adaptadora que contiene dominios de homología con SRC) con el receptor. La cinasa SRC es activada por el receptor HER-2, Receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) y por ER. Para la activación final río abajo de la cascada de señalización de efectores nucleares de HER-2 en células del tumor como el caso de p27 un inhibidor de las cíclicas dependientes de cinasas (CDK), el cual es importante para el control de la proliferación y la progresión del ciclo celular. Otro de los principales efectores

nucleares activados por HER-2 es el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) un activador transcripcional de diferentes genes, que al ser fosforilado tiene la capacidad de llegar al núcleo de la célula e interactuar directamente con ADN en las regiones promotoras de genes blanco para activar funciones de supervivencia celular.

ER puede indirectamente activar a HER-2 a través de coactivadores como es el caso de SRC, una vez activado el receptor se dimeriza con otros miembros de la familia de receptores, en particular HER-2 activa ciertas vías de señalización intracelulares las cuales pueden amplificar la señalización nuclear de ER, esto completa un círculo vicioso de eventos de inducción de cáncer. El entrecruzamiento de señales entre las vías de RE y HER-2 han sido implicadas en la resistencia clínica al tamoxifeno (Ellis., 2007).

## **2.4 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLECULAS DEL COMPLEJO OCLUYENTE**

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

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

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

La localización de ZO-1 en las TJ se ha observado alterada en células tumorales, y la expresión en mutantes que carecen de esta proteína en células epiteliales genera la transición epitelio mesénquima. Recientemente, se ha demostrado que cuando las células están en confluencia

ZONAB interactúan directamente con un miembro de la familia Ras, RalA, lo cual conlleva la activación transcripcional de promotores de genes blanco que normalmente eran reprimidos por ZONAB en células no confluentes (Frankel *et al.* 2005). La interacción de ZONAB con ZO-1 también ha sido sugerida a disminuir la represión transcripcional por reducción de la localización nuclear de ZONAB. Curiosamente, la proteína oncogénica Ras revierte la represión transcripcional de ZONAB (Frankel *et al.* 2005), a través del entrecruzamiento multilateral de las proteínas de las TJ con otras vías de señalización.

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

### **III. JUSTIFICACIÓN.**

A partir del año 2006, el cáncer de mama es la primera causa de muerte oncológica en mujeres mexicanas mayores de 25 años. Se ha demostrado ampliamente el papel de los estrógenos en los mecanismos de inicio y progresión del carcinoma mamario humano; sin embargo, poco se conoce con respecto a su efecto en los mecanismos de pérdida de la adhesión celular que anteceden a la transición epitelio mesénquima indispensable para que se realice la metástasis.

Recientemente se han demostrado los efectos del estradiol sobre la regulación en la expresión de algunas proteínas componentes del complejo ocluyente (ZO-1, ZONAB y OCLUDINA) en células epiteliales normales, lo que ocasiona que aumente la permeabilidad transepitelial. También se sabe que las proteínas ZONAB y ZO-1 actúan como activador y co-activador transcripcional respectivamente, sobre la expresión de HER-2, ocasionando que las células que se desprenden del epitelio mamario activen mecanismos de supervivencia.

Estos hallazgos en conjunto nos llevaron a plantear el presente trabajo de investigación, que busca entender los mecanismos mediante los cuales el estradiol promueve la metástasis de las células de cáncer de mama. Los resultados permitirán entender el proceso metastático y permitirá plantear nuevos blancos terapéuticos para contrarrestar esta enfermedad en etapas tempranas, cuando las células cancerosas pierden las interacciones célula a célula.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del estradiol sobre la expresión de ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y en la translocación nuclear de las proteínas ZO-1 y ZONAB en la línea celular de carcinoma mamario humano MCF-7.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar las condiciones experimentales en las cuales el estradiol puede regular la expresión de los ARNm que codifican a los genes ZO-1, ZONAB, ocludina, y HER-2 en las células MCF-7.
- Discriminar el papel de la síntesis *de novo* de proteínas en la regulación de la expresión de los ARNm que codifican a los componentes del complejo ocluyente inducidos por estradiol.
- Analizar la expresión y la translocación nuclear de las proteínas ZO-1 y ZONAB en las células MCF-7 incubadas con diferentes concentraciones de estradiol y por diferentes tiempos.

#### **V. HIPÓTESIS**

Si el estradiol incrementa la expresión de las proteínas ZO-1, ZONAB, disminuye la de ocludina y promueve la translocación de ZO-1 y ZONAB al núcleo, entonces ocasiona que aumente la síntesis del receptor HER-2 y que se debiliten las uniones adherentes en la línea celular de carcinoma mamario humano MCF-7.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.**

Se utilizó la línea celular derivada de carcinoma mamario humano MCF-7, estrógeno dependientes originalmente obtenidas por efusión pleural de una metástasis derivadas de un adenocarcinoma mamario humano *in vitro*, son tumorigénicas, con débil actividad metastática, presentan fenotipo característico de células luminales del epitelio ductal de la mama, son positivas para RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RA y RP así como HER-2. La línea celular MCF-7 fue amablemente proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México).

### **6.2 MEDIO DE CULTIVO CELULAR.**

El medio de cultivo utilizado para las células fue el de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), libre de rojo de fenol, pH de 7.4, esterilizado por filtración a través de membranas de nylon con poro de 0.22  $\mu$ m (Corning, NY, EUA). En el momento de realizar el experimento se agregó suero de bovino fetal (SBF; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) al 10% (v/v), aminoácidos no esenciales a una concentración final de 100  $\mu$ M, piruvato de sodio 100  $\mu$ M, L glutamina 2 mM, una solución comercial de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100  $\mu$ g/mL) y de antimicótico (anfotericina B 250 ng/mL) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

### **6.3 CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES**

Se sembraron  $6 \times 10^6$  células en botellas de cultivo con una superficie de 75 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en el incubador a 37° C, con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, hasta alcanzar el 100% de confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon con tripsina al 0.25% y 1 mM de ácido etilén diamino tetraacético (EDTA). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 286 g durante cinco min., se desechó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en medio de cultivo y se resembraron en cajas T-45 con medio DMEM libre de rojo fenol, suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 2.5 %, además de las condiciones experimentales requeridas para realizar los estudios de análisis de expresión de los ARNm y de localización de las proteínas.

Las células fueron incubadas con los siguientes tratamientos: SFBC tratado con carbón y dextran para eliminar la fuente externa de estrógenos, estradiol (E<sub>2</sub>) a concentraciones de 1nM ó 100nM,

con Cicloheximida (CHX) a una concentración de 12.5µg/mL. Los tiempos de incubación fueron: 0,15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas.

#### **6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2.**

La extracción del ARN total se llevó a cabo por medio del método de columnas, utilizando el kit de RNeasy® de QUIAGEN EUA. Se utilizaron cultivos con una densidad de  $6 \times 10^6$  células por experimento se adicionaron 500 µL del buffer de lisis (buffer RTL plus) a cada caja de cultivo, las células fueron recuperadas en tubos de polipropileno de 2 mL, nuevos y estériles para homogeneizar completamente por agitación vigorosa en un Vortex®. Para permitir la remoción completa de ADN genómico se transfirió el homogenizado a la columna (ADNg eliminator) se centrifugó a 8,000 g por 30 segundos, se retiró y desechó la columna, se agregaron 500 µL de etanol al 70% al sobrenadante para posteriormente transferir 700 µL de la muestra a la columna (RNeasy spin) y centrifugar a 8,000 g durante 15 segundos, se desechó el sobrenadante e inmediatamente se adicionó 700 µL del buffer RW1 para ser centrifugado a 8,000 g durante 15 segundos, se desechó el sobrenadante y se adicionó a la columna 500 µL de buffer RPE, se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos, este paso se repitió en una ocasión más pero centrifugando por un lapso de 2 minutos, para remover los restos de etanol de la muestra se centrifugó la muestra a toda velocidad (11200 g) y al final fueron adicionados a la columna 50 µL de agua libre nucleasas para resuspender la muestra centrifugando por 1 minuto a 8,000 g.

Se procedió a la cuantificación de la concentración del ARN obtenido, por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y se determinó la presencia de contaminantes proteicos por el cociente de absorbancias a 260 nm entre 280 nm, la cual debió ser mayor de 1.8 para ser utilizado (Chomczynski y Sacchi, 1987; Ausbel, 1992). Las muestras de ARN se alicuotaron (10 µg) y se almacenaron a -70° C hasta el momento de realizar los análisis de expresión.

#### **6.5.1 ANÁLISIS DE LOS ARN EN ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.**

Para observar la integridad del ARN obtenido, se separó con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (Gibco BRL, grado Biología Molecular) conteniendo la solución amortiguadora de ácido 3-[N-morpholino] propanosulfónico (MOPS) 10X y formaldehído al 7% como agente desnaturalizante.

A cada muestra se les adicionó 2.0 µl de la solución de carga para ARN (30% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% xilencianol) y 0.2 µl de la solución de bromuro de etidio 10 µg/ml. Una vez depositadas las muestras en los pozos del gel, éste se cubrió totalmente con MOPS 1X y se llevó a cabo el corrimiento electroforético a 75 mV por 1.5 horas (Davis *et al.*, 1986; Chomcynski y Sacci, 1987; Ausbel, 1992).

Trascurrido el tiempo de la electroforesis, cuando el colorante de bajo peso molecular alcanzó las 2/3 partes de la longitud total del gel, se fotografió en un transiluminador de luz ultra violeta Gel Logic 200® (Kodak, EUA). Las imágenes de cada una de las bandas se analizaron por densitometría en el software de análisis de imágenes Kodak Gel Logic 200® (Kodak, EUA).

### **6.5.2 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2 POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR 1 SOLO PASO)**

Para realizar el análisis de la expresión de los genes que codifican a las proteínas ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y β-ACTINA (utilizada como gen de normalización por su expresión constitutiva en esta línea celular) se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos (primers) descritos en la tabla 1, los cuales fueron diseñados por medio del programa PRIMER QUEST®, con base en las secuencias reportadas en el banco de genes (Gene bank) de los Institutos Nacionales de Salud de EUA., se tomaron en cuenta la temperatura de hibridación óptima, la relación adecuada de bases GC/AT y se evitó la formación de enlaces inter e intracatenarios entre los mismos oligonucleótidos

La síntesis y amplificación del ADNc se realizó mediante las técnicas de retro transcripción seguidas de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de 50 ng de cada ARNm obtenido de las células de carcinoma (MCF-7), se empleo el estuche de amplificación RT/PCR ONE STEP® (Promega, EUA).

En un tubo estéril de 0.2 ml se colocaron los siguientes componentes para reacciones de 20 µl: 10.1 µl de H<sub>2</sub>O – DEPC, 5 µl de Buffer de reacción AMV/TFL, 0.5 µl de la Mezcla de dNTP's (10mM), 0.4 µl del primer UP (20 mM), 0.4 µl del primer LOW (20 mM), 0.6 µl de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 0.4 µl de la enzima AMV transcriptasa Reversa, 0.4 µl de la enzima TFL ADNpol, y 50 µg/µl de la muestra de ARN total. Después de haber adicionado todos los componentes de la reacción se procedió a colocar las muestras en el termociclador Palm Cicler 2000. Las reacciones se realizaron para los genes ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 Y β-ACTINA, las condiciones que se utilizaron para los PCR fueron las siguientes: una fase de retrotranscripción

de ARN a ADNc de 45°C por 22.30 seg seguida de la fase de desnaturalización del ADNc a 94° C, por 1 min., seguida por 40 procesos cíclicos, donde cada uno constó de una fase a 94° C por 15 seg (desnaturalización del ADN), una fase a la temperatura señalada en la figura 6 para cada gen, por 30 seg (alineamiento de los oligonucleótidos) y una a 68° C por 60 seg (extensión de la cadena de ADN). Por último, se realizó una fase de extensión final a 68° C por 3.30 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) y como buffer de corrimiento fue TBE al 1X (Tris Base 10 mM, ácido bórico 10 mM y EDTA 10 mM) a 75 volts por 45 min. Al final del desarrollo electroforético, los productos de PCR se visualizaron mediante el colorante fluorescente bromuro de etidio (1 µg/mL), el cual se intercala entre al ADN y fluoresce al ser estimulado con luz ultravioleta. Las imágenes de cada una de las bandas se analizaron por densitometría en el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 200® (Kodak, EUA). Los resultados se expresan en número de pixeles (densidad óptica relativa; DOR) del gen de interés con respecto al gen de normalización β-actina. Cada experimento se realizó por triplicado y cada repetición se amplificó al menos dos veces.

**TABLA 1. SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS QUE SE UTILIZARON PARA AMPLIFICAR EL ARNm QUE CODIFICA PARA ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 Y B-ACTINA.**

OLIGONUCLEÓTIPO (código Gene Bank)	SECUENCIA	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
ZO-1 SENTIDO ZO-1 ANTISENTIDO NM_175610.2	5' ATGGTGCCTGAAAGAAGCA 3' 5' AATTGGTTGTGGCTGCGCTT 3'	384 pb
ZONAB SENTIDO ZONAB ANTISENTIDO NM_003651.3	5' TGCAGAAGCTGCCAATGTGA 3' 5' ATGAACCGGTCCCTGAAGTT 3'	394 pb
Ocludina SENTIDO Ocludina ANTISENTIDO NM_002538.2	5' TTTCATTGCCGCGTTGGTGA 3' 5' TACAATGGCAATGGCCTCCT 3'	301 pb
HER-2 SENTIDO HER-2 ANTISENTIDO NM_001005862.1	5' AGCCTTGCCCATCAACTG 3' 5' AATGCCAACCACCGCAGA 3'	113 pb
β-ACTINA. SENTIDO β-ACTINA. ANTISENTIDO	5' GTG GGG CGC CCC A GG CAC CA 3' 5' CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'	170 pb

Tabla 1. Muestran las secuencias de los oligonucleótidos de cada uno de los genes que fueron estudiados, los productos de PCR (amplicones) y sus respectivos pesos moleculares en pares de bases (pb).

### 6.5.3 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de exclusión molecular (Glenn y Glenn, 1994) posteriormente se secuenciaron para corroborar que se está amplificando la isoforma adecuada del gen a estudiar.



Figura 5. Muestra la secuencia de bases obtenidas a través del software BioEdit v7.0.5 copyright (c) 1997-2005, que se obtuvieron al secuenciar los amplicones de cada gen, corroborando la secuencia exacta de los genes estudiados.

### 6.6 ENSAYO DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS NUCLEARES Y CITOPLASMATICAS PARA ZO-1 y ZONAB

Para el aislamiento de proteínas de las fracciones nucleares y citoplasmáticas se sembraron  $6 \times 10^6$  de células las cuales fueron tratadas con  $E_2$  a una concentración de  $1 \times 10^{-9}$  M, y a los periodos de tiempo de: 0,15, 30 y 60 minutos. Después de transcurridos dichos periodos de tiempo se adicionaron 500  $\mu$ l del buffer de A de baja fuerza iónica (Hepes 10mM pH 7.9, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1mM, ditiotreitil 1mM, y PMSF 0.5 mM a 4°C), posteriormente las células fueron recuperadas en tubos de polipropileno de 2 mL, nuevos y estériles estas fueron homogeneizadas completamente por agitación vigorosa en un Vortex®, se incubaron en hielo durante 15 minutos, para después adicionar 50  $\mu$ l de la solución de Igepal (0.58%) CA-630 en buffer A, después de esto las células fueron homogeneizadas con pulsos de agitación vigorosa

en un Vortex® durante 15 segundos e inmediatamente fueron centrifugadas a 11 ,200 g, durante 2 minutos, los sobrenadantes (fracción citoplasmática) fueron alicuotados y almacenados a -80 °C. El *pellet* (fracción nuclear) obtenido fue resuspendido en 50 µl de buffer C (Hepes 20mM pH 7.9, NaCl 0.4mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, PMSF 1 mM.) Después los *pellets* fueron homogeneizados completamente por agitación vigorosa en un Vortex®, e incubados en hielo durante 15 minutos, finalmente las muestras fueron centrifugadas a 11 ,200 g, por 10 minutos, y el sobrenadante obtenido fue recuperado y almacenado a -80 °C. La concentración de proteína fue determinada en el sobrenadante por el método descrito por Bradford (1976) usando un reactivo comercial (BioRad, Hercules CA, USA).

### **6.6.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZO-1 y ZONAB.**

Las proteínas citoplasmáticas y nucleares fueron separadas independientemente en geles de SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Invitrogen®) nitrocelulosa (BioRad, Hercules CA, USA), con el objeto de evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (TBS Tween 0.1% conteniendo 8% de leche sin grasa) por 1 hora, después del bloqueo las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti ZO-1 y ZONAB (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche (12 horas). Después de transcurrido este lapso de tiempo las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (TBS Tween 0.1% conteniendo 8% de leche sin grasa) durante 1 hora, posteriormente las membranas fueron lavadas en dos ocasiones con TBS Tween 0.1 % e incubadas durante una hora con anticuerpo secundario anti conejo para ZO-1 y anti cabra para ZONAB acoplados a una peroxidasa de rábano (Pierce, Rockford IL, USA). Finalmente las membranas fueron lavadas nuevamente en dos ocasiones con TBS Tween 0.1 % y reveladas con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico Substrate (Pierce) por 15 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se retiró el excedente de sustrato de la membrana y se colocó en una bolsa de plástico y se fotografió en el sistema de análisis de imágenes Gel Logic 1500®. Las imágenes se cuantificarán por densitometria mediante el mismo equipo. Los resultados se expresan en número de pixeles (DOR) del gen de interés con respecto al gen de normalización  $\beta$ -actina para las fracciones citoplasmáticas e histona H1 para las fracciones nucleares. Cada experimento se realizó por triplicado y cada repetición se amplificó al menos dos veces.

### **6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los análisis estadísticos aplicados a los datos obtenidos fueron análisis de varianza de una vía (ANOVA) para observar las diferencias entre los grupos de diferentes tratamientos y tiempos de incubación y la prueba de "t" de Student no pareada para comparar las diferencias entre dos grupos. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió en al menos tres ocasiones, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ZO-1, ZONAB, OCLUDINA Y HER-2 EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MCF-7.

Para demostrar que el estradiol regula la expresión de los genes que codifican para las proteínas ZO-1, ZONAB, ocludina y HER-2 en las células MCF-7, se estandarizaron las condiciones para amplificar cada uno de los genes, utilizándose como gen de normalización a  $\beta$ -actina por su expresión constitutiva.

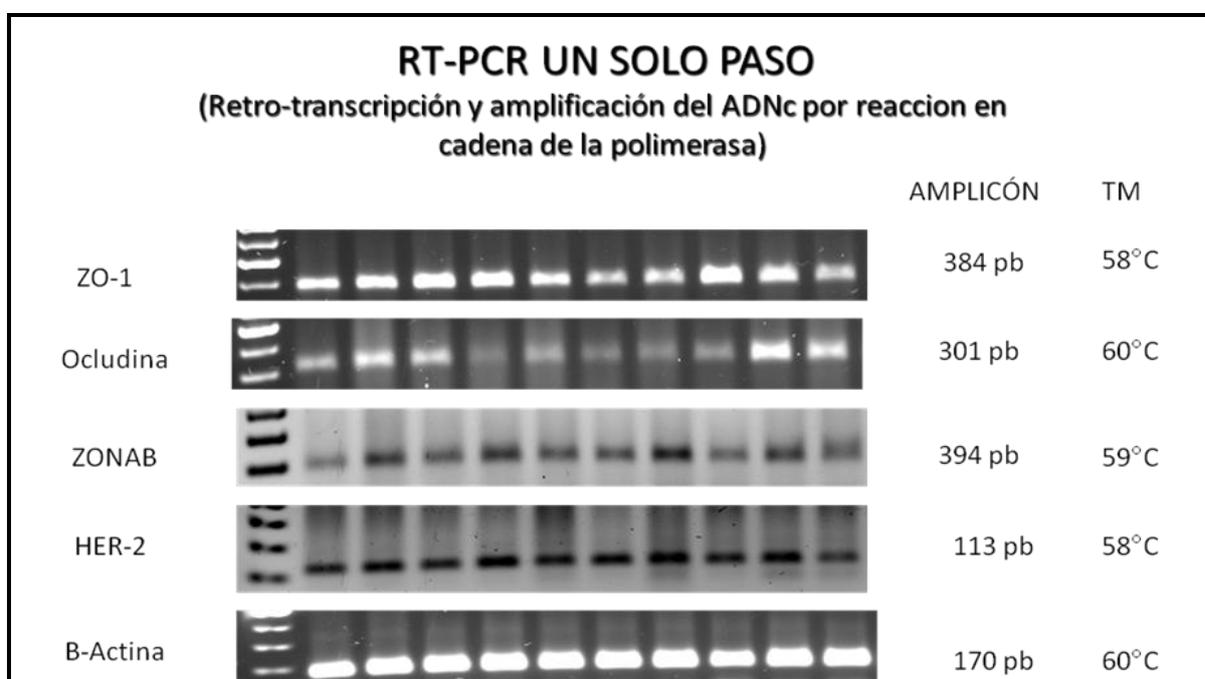
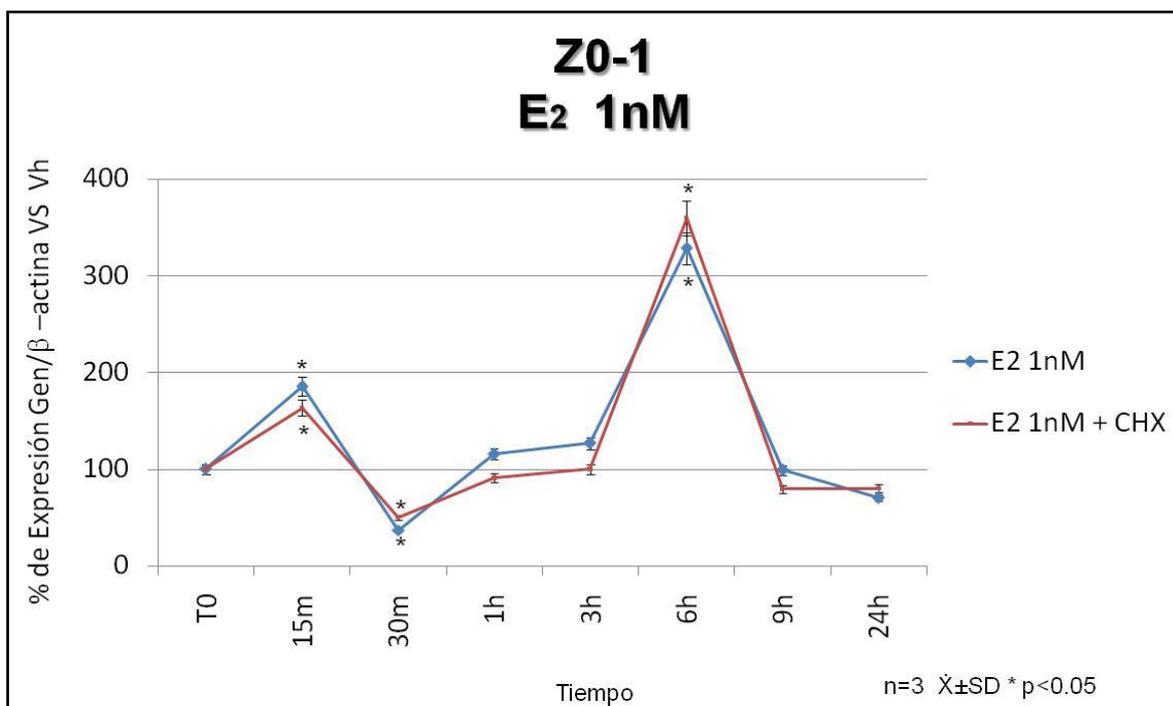


Figura 6. Expresión de los genes amplificados: ZO-1, ZONAB, ocludina, HER-2 y  $\beta$ -actina, los productos amplificados fueron separados con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La figura muestra las bandas de cada uno los genes de interés en donde ZO-1 presenta un peso molecular aparente de 384 pares de bases (pb) y temperatura de alineamiento (TA) de 58°C, Ocludina presenta un peso molecular aparente de 301 pb y una TA de 60°, ZONAB 394 pb y una TA de 59°C, HER-2 113 pb y una TA de 58°C, en el caso del gen de normalización  $\beta$ -actina presenta un producto de 170 pb y una TA de 60°C. Todas las muestras se amplificaron a partir de la misma cantidad de ARN (50 ng).

### 7.1.1 EFECTO DE E<sub>2</sub> (1nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZO-1.

Con la finalidad de determinar si E<sub>2</sub> regula la expresión de la proteína ZO-1 en las líneas celulares de carcinoma mamario MCF-7, se procedió a analizar la síntesis de los ARNm que codifican a esta proteína, mediante la técnica de RT-PCR en un solo paso.

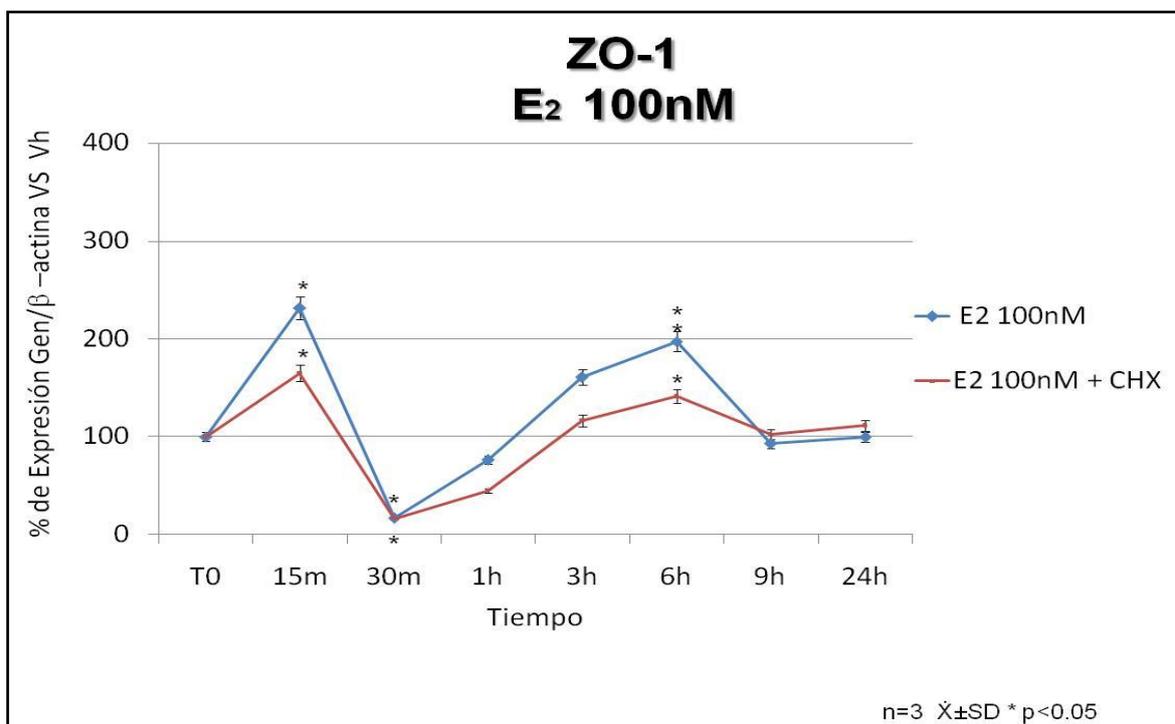


Grafica1. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ZO-1, normalizado con β-actina con respecto al vehículo, en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1nM) y estradiol 1nM + cicloheximida (CHX) en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

La gráfica 1 muestra el efecto en la expresión del ARNm de ZO-1 cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 1nM + CHX (línea roja) en donde se observa que E<sub>2</sub> induce efectos bifásicos en la expresión de ZO-1, los efectos estadísticamente significativos se observan marcados con un asterisco (n=3±SD; \* p<0.05) el primer efecto se observa a los 15 minutos donde la expresión de ZO-1 se incrementó en aproximadamente 90% con respecto al vehículo y disminuyó su expresión a los 30 minutos por debajo del control. Después de 6 horas de exposición al E<sub>2</sub> la expresión de ZO-1 tiene su máximo incremento (≈ 2.2 X) para después disminuir de las 9 a las 24 horas de incubación,

Con respecto a la utilización de la CHX podemos observar que la incubación concomitante de E<sub>2</sub> con CHX induce efectos similares al de la incubación con solo estradiol, con esto se demuestra que la expresión de ZO-1 inducida por estradiol es independiente de la síntesis de nuevas proteínas.

### 7.1.2 EFECTO DE E<sub>2</sub> (100nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZO-1.



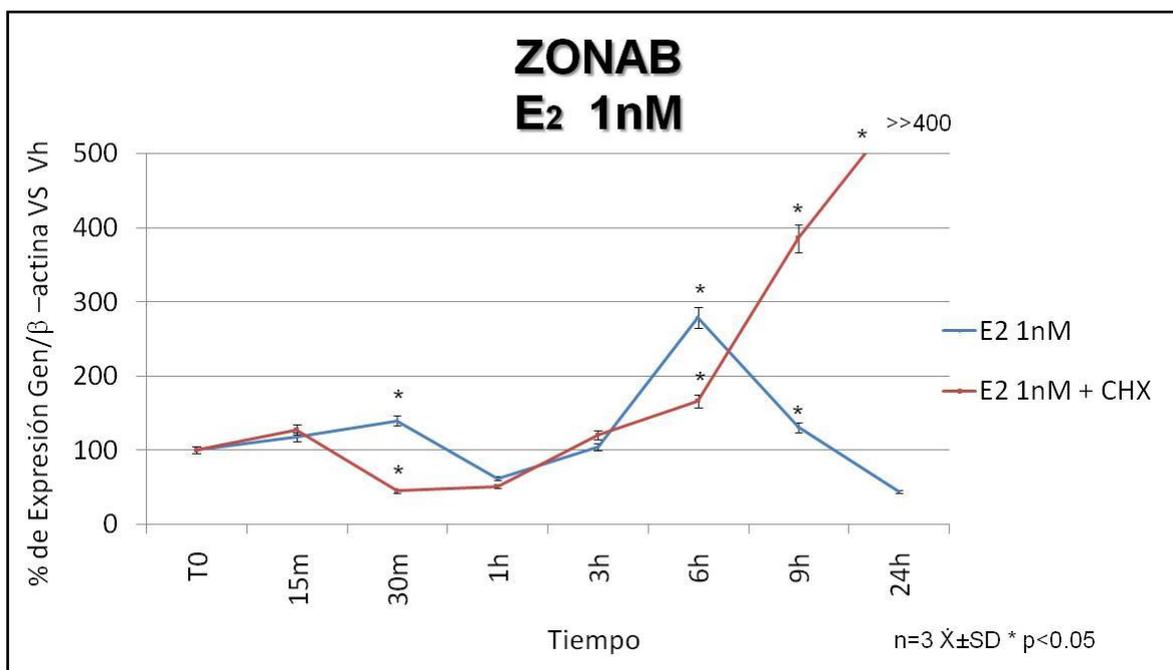
Gráfica 2. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ZO-1, normalizado con β-actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (100 nM) y estradiol 100 nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

La gráfica 2 muestra el efecto en la expresión del ARNm de ZO-1 cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 100 nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 100 nM + CHX (línea roja) en donde podemos observar los puntos estadísticamente significativos con respecto al vehículo marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05). El primer efecto se observó a los 15 minutos de incubación, donde la expresión de ZO-1 se incrementó en 135% con respecto al vehículo, posteriormente la expresión disminuyó significativamente a los 30 minutos por debajo del vehículo en 84%. Después de 3 horas de incubación con E<sub>2</sub>, la expresión de ZO-1 vuelve a incrementarse hasta alcanzar incrementos estadísticamente significativos a las 6 horas, para posteriormente disminuir después de las 9 horas de incubación,

La incubación concomitante de E<sub>2</sub> y CHX tiene efectos similares a la incubación con solo estradiol, aunque la expresión de ZO-1 es ligeramente menor sin ser estadísticamente diferentes. De esta manera se demostró que la expresión de ZO-1, inducida por E<sub>2</sub>, no depende de la síntesis de proteínas *de novo*. Además, se observó que el incremento en la expresión de ZO-1 a las 6 horas es mayor al incubar a las células MCF-7 con la concentración 1nM de E<sub>2</sub> con

respecto a la de 100nM. Con respecto a la utilización de CHX se concluye que la expresión de ZO-1 inducida por estradiol no depende de la síntesis proteica *de novo*.

### 7.1.3 EFECTO DE E<sub>2</sub> (1nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZONAB.

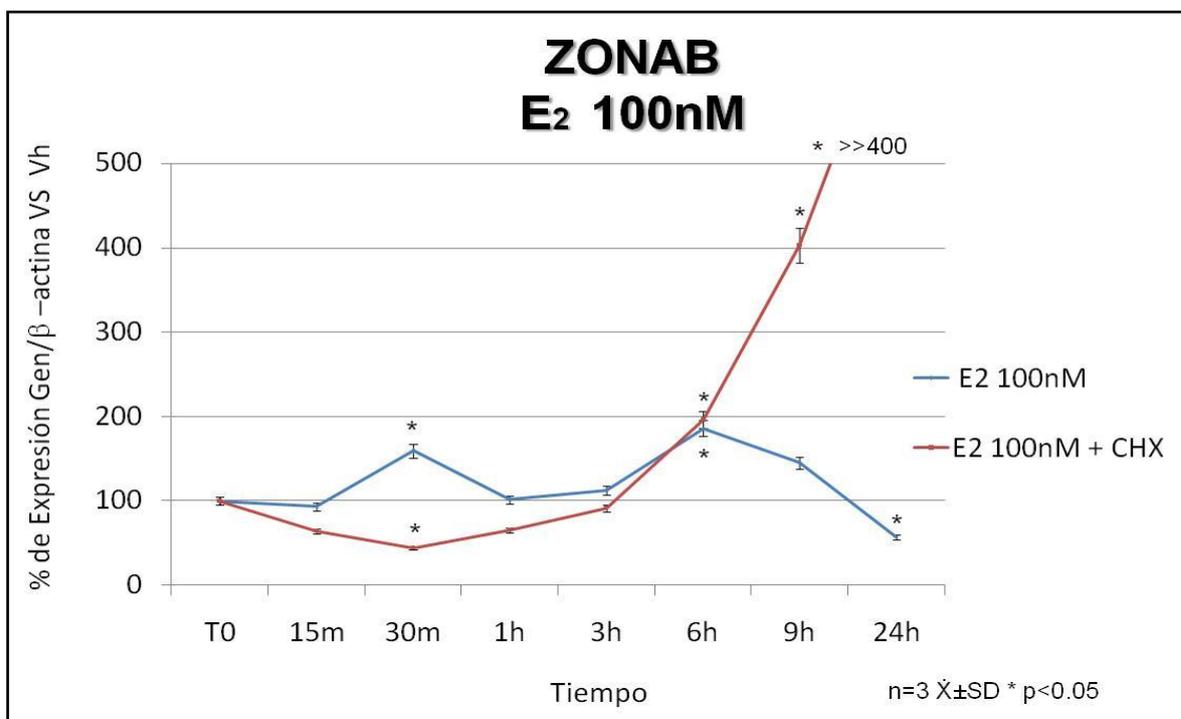


Grafica3. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ZONAB, normalizado con  $\beta$ -actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1 nM) y estradiol 1 nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

En la gráfica 3 se muestra el efecto en la expresión del ARNm de ZONAB cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 1nM + CHX (línea roja), en donde se observa que E<sub>2</sub> regula la expresión de ZONAB, en donde los efectos estadísticamente significativos se observan marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05), el primer efecto se observó a los 30 minutos en donde E<sub>2</sub> estimula ligeramente la expresión de ZONAB con respecto al vehículo, pero a las 6 horas de incubación con E<sub>2</sub>, se incrementa notablemente la expresión de ZONAB para después disminuir a hacia las 24 horas. La expresión de ZONAB inducida por E<sub>2</sub> sí depende de la síntesis *de novo* de proteínas, ya que cuando las células son incubadas con CHX y E<sub>2</sub>, la expresión de ZONAB no se incrementa a los 30 minutos y evita que la expresión de ZONAB alcance el máximo incremento generado por la incubación con solo E<sub>2</sub>. La expresión de ZONAB de las 9 a las 24 horas de incubación con E<sub>2</sub> + CHX se incrementó drásticamente. Con esto se demostró

que el E<sub>2</sub> induce la síntesis de proteínas que regulan la expresión de ZONAB tanto en forma estimuladora como en su inhibición.

#### 7.1.4 EFECTO DE E<sub>2</sub> (100nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ZONAB.

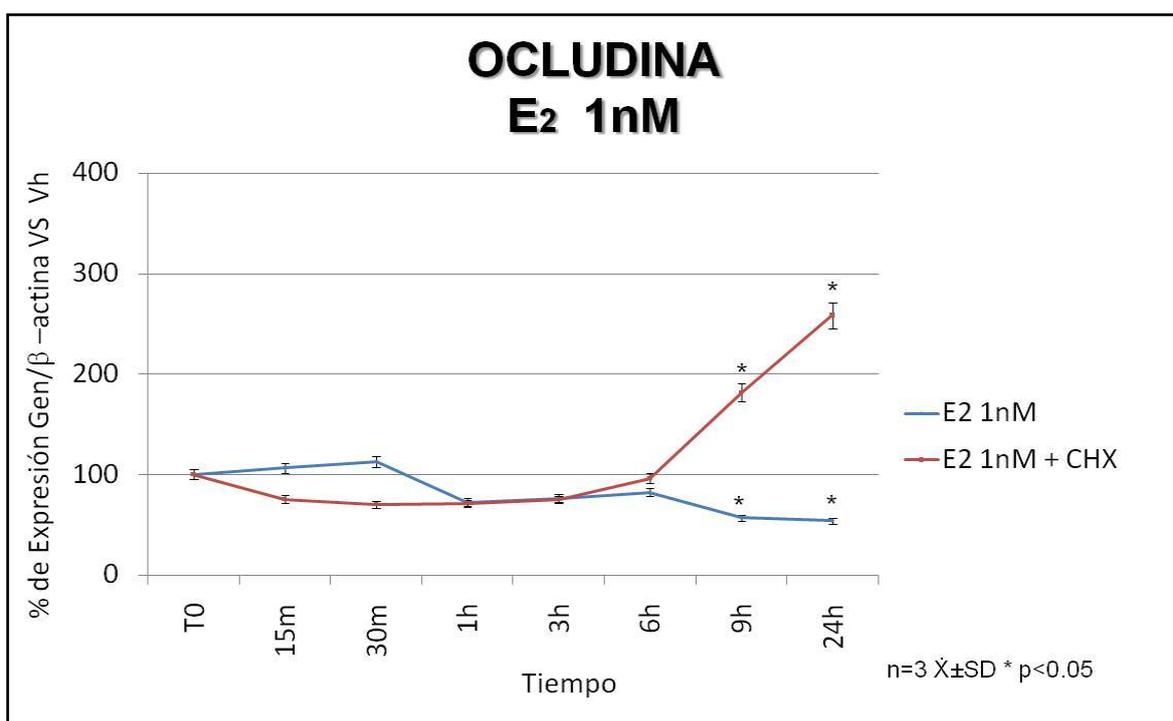


Gráfica 4. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ZONAB, normalizado con β-actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (100 nM) y estradiol 100 nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

La gráfica 4 muestra el efecto en la expresión del ARNm de ZONAB cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 100 nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 100 nM + CHX (línea roja) en donde podemos observar los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05) en donde se observa que E<sub>2</sub> estimula la expresión de ZONAB a los 30 minutos incrementado en aproximadamente 60% con respecto al vehículo, posteriormente se incrementó de manera similar a las 6 horas para después disminuir a las 24 horas. De igual manera que los experimentos con 1 nM de E<sub>2</sub>, cuando las células son incubadas con CHX y E<sub>2</sub>, se bloquea el incremento a los 30 minutos y posteriormente la combinación E<sub>2</sub>+CHX revierte el efecto inhibitorio del E<sub>2</sub> después de las 9 horas de incubación, hasta alcanzar un incremento del 600%. Esto demuestra que la expresión de ZONAB, inducida por E<sub>2</sub>, depende de la síntesis proteica *de novo*. Además hay que destacar que las dos concentraciones de E<sub>2</sub> (1 y 100 nM) generaron

efectos similares en cuanto a los tiempos de incubación sobre la expresión de ZONAB, pero la concentración de 1nM generó un mayor efecto que al incubar a las células MCF-7 con la concentración 100 nM de E<sub>2</sub>. Se demuestra que el E<sub>2</sub> puede regular la expresión de ZONAB pero además la expresión de este gen es regulada por proteínas presintetizadas y por proteínas sintetizadas *de novo*.

### 7.1.5 EFECTO DE E<sub>2</sub> (1nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA.

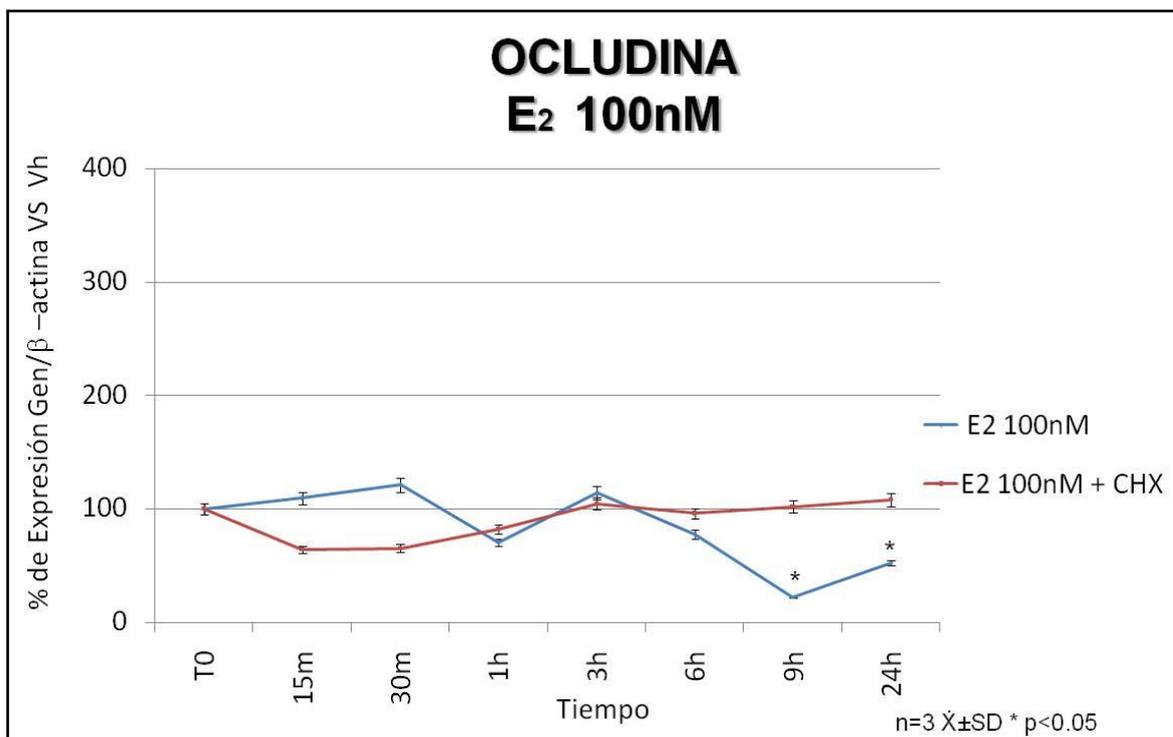


Gráfica 5. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ocludina, normalizado con  $\beta$ -actina con respecto al-vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1 nM) y estradiol 1nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

En la gráfica 5 se muestran el efecto en la expresión del ARNm de ocludina, cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 1nM + CHX (línea roja), los efectos estadísticamente significativos se observan marcados con un asterisco ( $n=3 \pm SD$  \*  $p < 0.05$ ), se observa que E<sub>2</sub> inhibe la expresión de ocludina, en donde el primer efecto en el cual E<sub>2</sub> induce disminución en la expresión de ocludina se observó después de las 9 horas en 48%, este efecto se incrementó a 55% a las 24 horas de incubación. Cuando las células fueron incubadas con el inhibidor CHX, pudimos observar que la combinación E<sub>2</sub> + CHX indujo que la expresión de ocludina se incrementara a las 9 horas en 80%, mientras que ésta combinación produce su mayor efecto sobre la expresión de ocludina a las 24 horas donde su expresión se incrementa hasta 170 %.

Con esto se demostró que la disminución de la expresión de ocludina inducida por E<sub>2</sub> depende de proteínas sintetizadas *de novo* solamente después de las 6 horas de incubación.

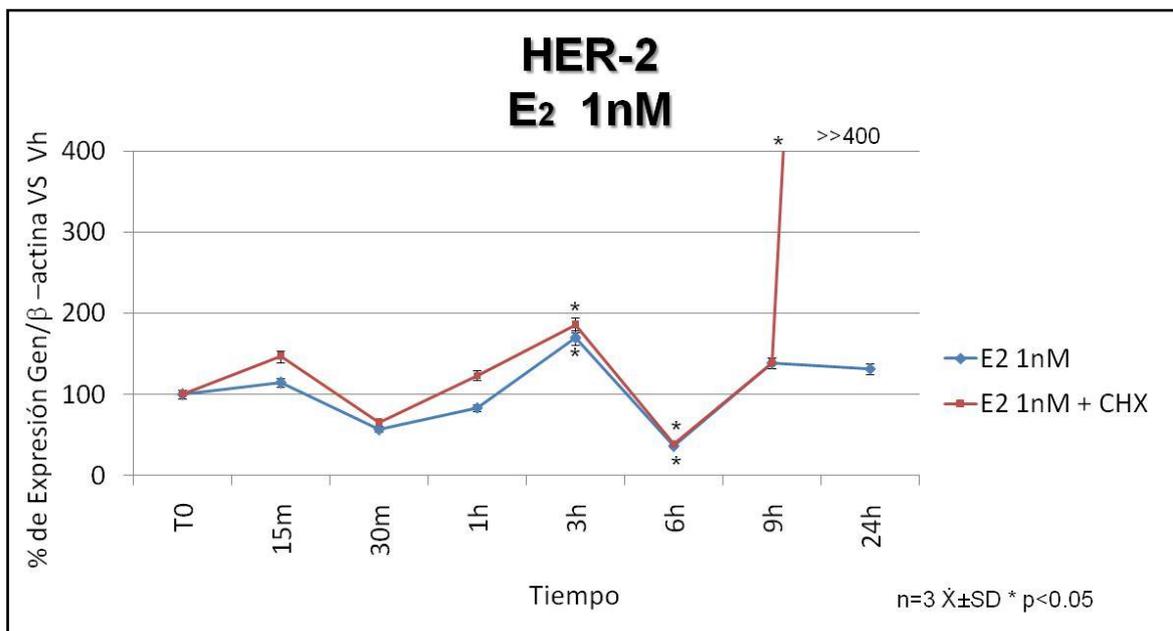
### 7.1.6 EFECTO DE E<sub>2</sub> (100nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE OCLUDINA.



Gráfica 6. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína ocludina, normalizado con  $\beta$ -actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (100 nM) y estradiol 100 nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

La gráfica 6 muestra el efecto en la expresión del ARNm de ocludina cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 100 nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 100 nM + CHX (línea roja) en donde podemos observar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco ( $n=3 \pm SD$  \*  $p < 0.05$ ) en donde se observan efectos semejantes a los observados con una concentración menor de E<sub>2</sub> (1nM), ya que E<sub>2</sub> 100nM también inhibe la expresión de ocludina a las 9 horas, efecto que se mantuvo hasta las 24 horas pero en menor intensidad. En cuanto al efecto de la incubación con el inhibidor CHX, se observó que la combinación E<sub>2</sub> 100nM + CHX evitó que el E<sub>2</sub> inhibiera la expresión de ocludina.

### 7.1.7 EFECTO DE E<sub>2</sub> (1nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE HER-2.

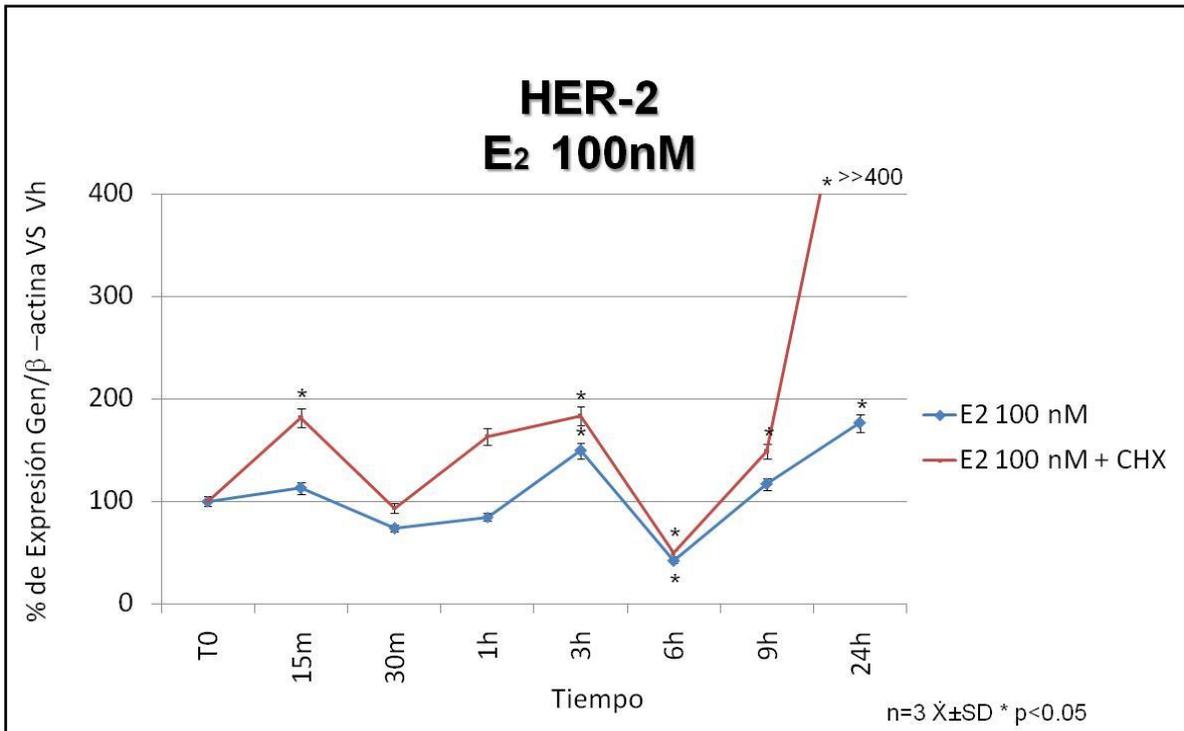


Gráfica 7. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína HER-2, normalizado con  $\beta$ -actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol 1 nM y estradiol 1nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

En la gráfica 7 se muestra el efecto en la expresión del ARNm de HER-2 cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 1nM + CHX (línea roja), en donde se demuestra que E<sub>2</sub> induce cambios en la expresión de HER-2, en donde los efectos estadísticamente significativos se observan marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05). El primer efecto se observó a las 3 horas de incubación, en donde E<sub>2</sub> incrementó 70% la expresión de HER-2 a los 30 minutos, este efecto es revertido y su expresión es menor al vehículo a las 6 horas de incubación, en donde la expresión de HER-2 disminuye en aproximadamente 65%.

Al incubar a las células con el inhibidor CHX no hay cambios con respecto al E<sub>2</sub> solo, excepto a las 24 de incubación con E<sub>2</sub>, en donde la combinación indujo que la expresión de HER-2 se incrementara en más de 400% con respecto al vehículo.

### 7.1.8 EFECTO DE E<sub>2</sub> (100nM) SOBRE LA EXPRESIÓN DE HER-2.



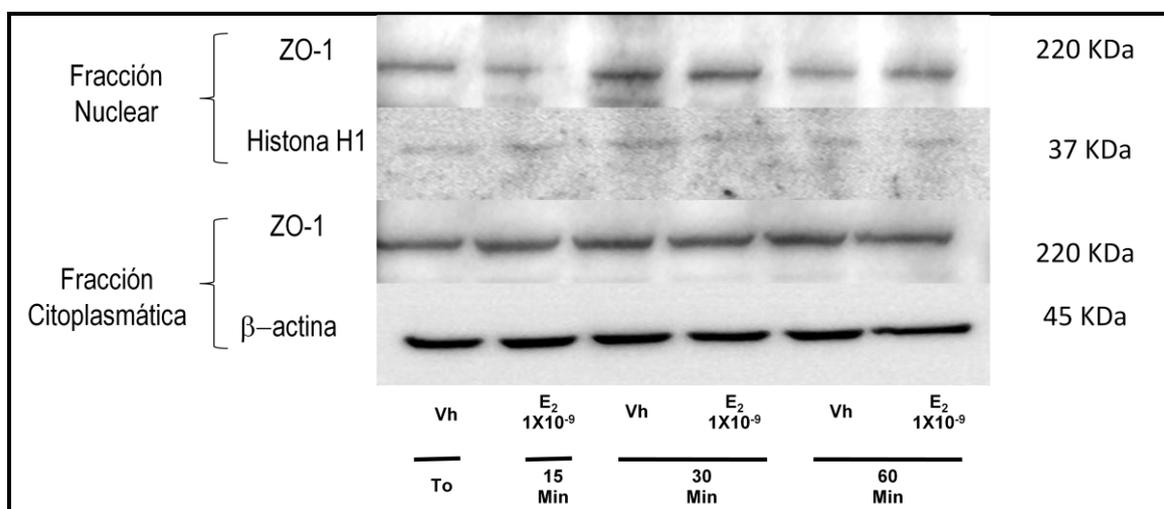
Gráfica 8. Porcentaje de expresión del ARNm que codifica para la proteína HER-2, normalizado con  $\beta$ -actina con respecto al vehículo en la cual se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (100 nM) y estradiol 100 nM+ CHX en células MCF-7. Tratamientos a tiempos: 0, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

La gráfica 8 muestra el efecto en la expresión del ARNm de HER-2 cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 100 nM (línea azul) y E<sub>2</sub> 100 nM + CHX (línea roja). Los resultados demostraron que el E<sub>2</sub> induce cambios en la expresión de HER-2, en donde podemos apreciar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05), E<sub>2</sub> induce que la expresión de HER-2 se incremente 50% a las 3 horas de incubación, este efecto se invierte a las 6 horas de incubación induciendo que la expresión de HER-2 disminuya en casi 60 % con respecto al vehículo, posteriormente se observó otro. Cuando las células son incubadas con CHX podemos observar que la combinación (E<sub>2</sub> + CHX) induce que la expresión de HER-2 se incremente a los 30 minutos en aproximadamente 75%, y posteriormente la combinación (E<sub>2</sub>+CHX) invierte dicho efecto a las 6 horas de incubación e induce que la expresión de HER-2 disminuya en 50 %. El efecto máximo de inducción de la expresión sobre HER-2 se produjo a las 24 horas de incubación, en donde la expresión de este gen se incrementó en más de 400 %. Esto demuestra que la expresión de HER-2 no depende de la síntesis proteica *de novo*. Por otra parte, se demuestra que las concentraciones de 1 y 100 nM de E<sub>2</sub> generaron efectos similares en cuanto a los tiempos de incubación sobre la expresión de

HER-2, y la utilización de CHX induce un incremento considerable en la expresión de este gen a las 24 horas de incubación.

## 7.2 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ZO-1 EN LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA.

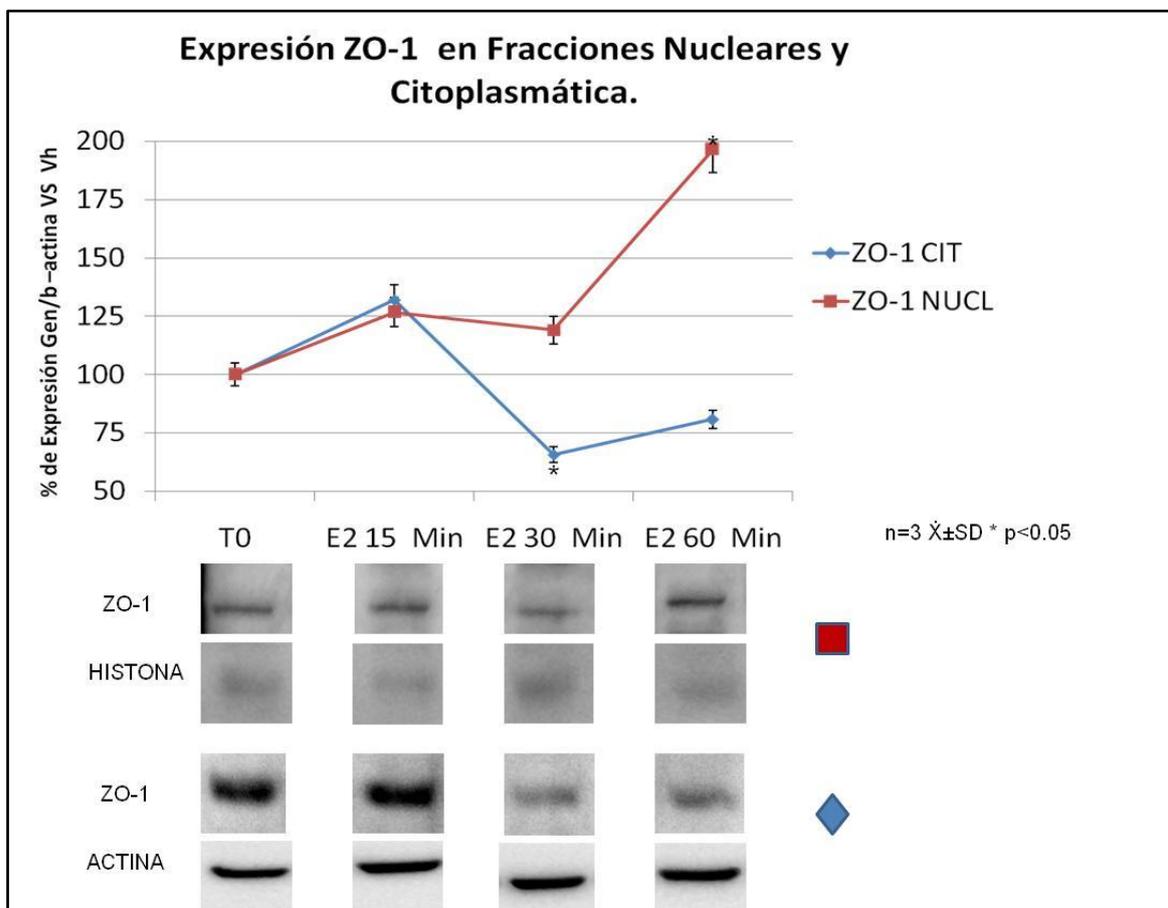
Para demostrar que el estradiol, además de regular la expresión de ZO-1 y ZONAB, también induce su translocación al núcleo en las células MCF-7 se estandarizaron las condiciones para localizar dichas proteínas aisladas de las fracciones nucleares y citoplasmáticas. Para inmunolocalizar estas proteínas se utilizaron como control de normalización a la proteína  $\beta$ -actina para las fracciones citoplasmáticas e Histona H1 para las fracciones nucleares por su expresión constitutiva.



**Figura 7.** Análisis de la presencia de las proteínas ZO-1, histona H1 y  $\beta$ -actina por la técnica de Western blot. Las proteínas extraídas de las fracciones nuclear y citoplasmática de fueron separadas en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida al 10 % y fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF. La figura muestra las bandas reveladas de cada una de las proteína de interés donde ZO-1 presenta un peso molecular aparente de 220 KDa, y los controles de normalización para las dos fracciones, en la fracción nuclear se utilizó a la proteína Histona H1 con un peso molecular de 37 KDa, mientras que en la fracción citoplasmática se utilizó a la proteína  $\beta$ -actina con un peso molecular de 45 KDa. Todas las muestras se cargaron con la misma cantidad de proteína (50  $\mu$ g). En la parte inferior se muestran los tratamientos y tiempos de incubación a los que fueron sometidas cada una de las muestras.

### 7.2.1 EFECTO DE E<sub>2</sub> SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE ZO-1.

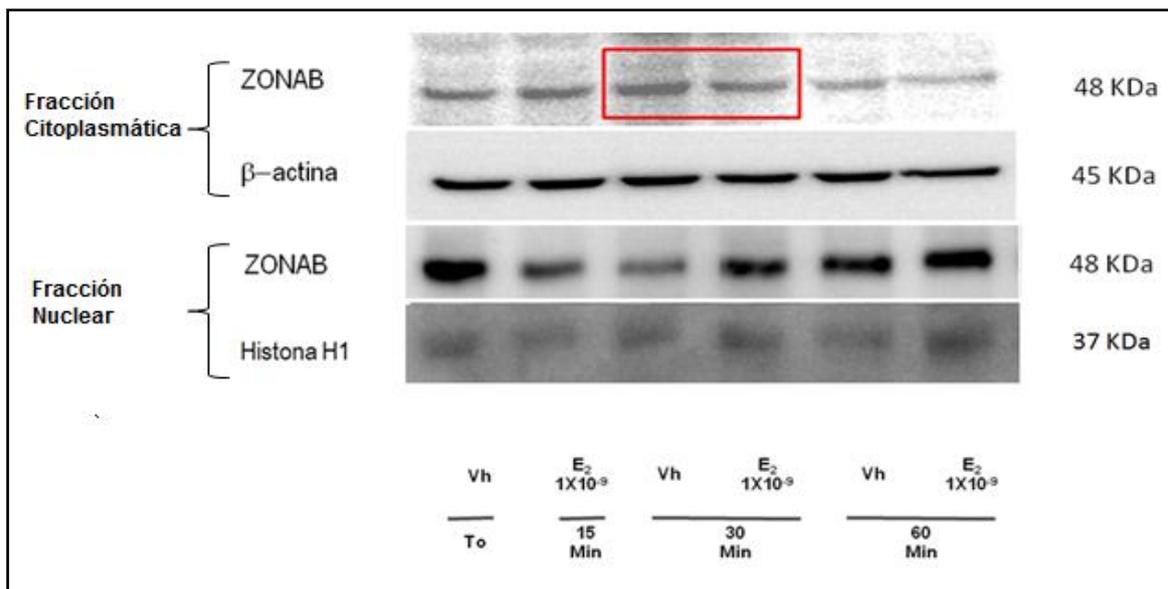
Con la finalidad de determinar si E<sub>2</sub> induce cambios en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB, se procedió a inmunolocalizar a dichas proteínas en las fracciones nucleares y citoplasmáticas mediante la técnica de Western blot en la línea celular MCF-7.



Gráfica 9. Porcentaje de localización de la proteína ZO-1, en las fracciones nuclear (línea roja) y citoplasmática (línea azul) normalizado con  $\beta$ -actina en las fracciones citoplasmática e Histona H1 en las fracciones nucleares con respecto al vehículo en donde se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1nM) a los 0, 15, 30, 60 minutos de incubación en células de cáncer de mama MCF-7.

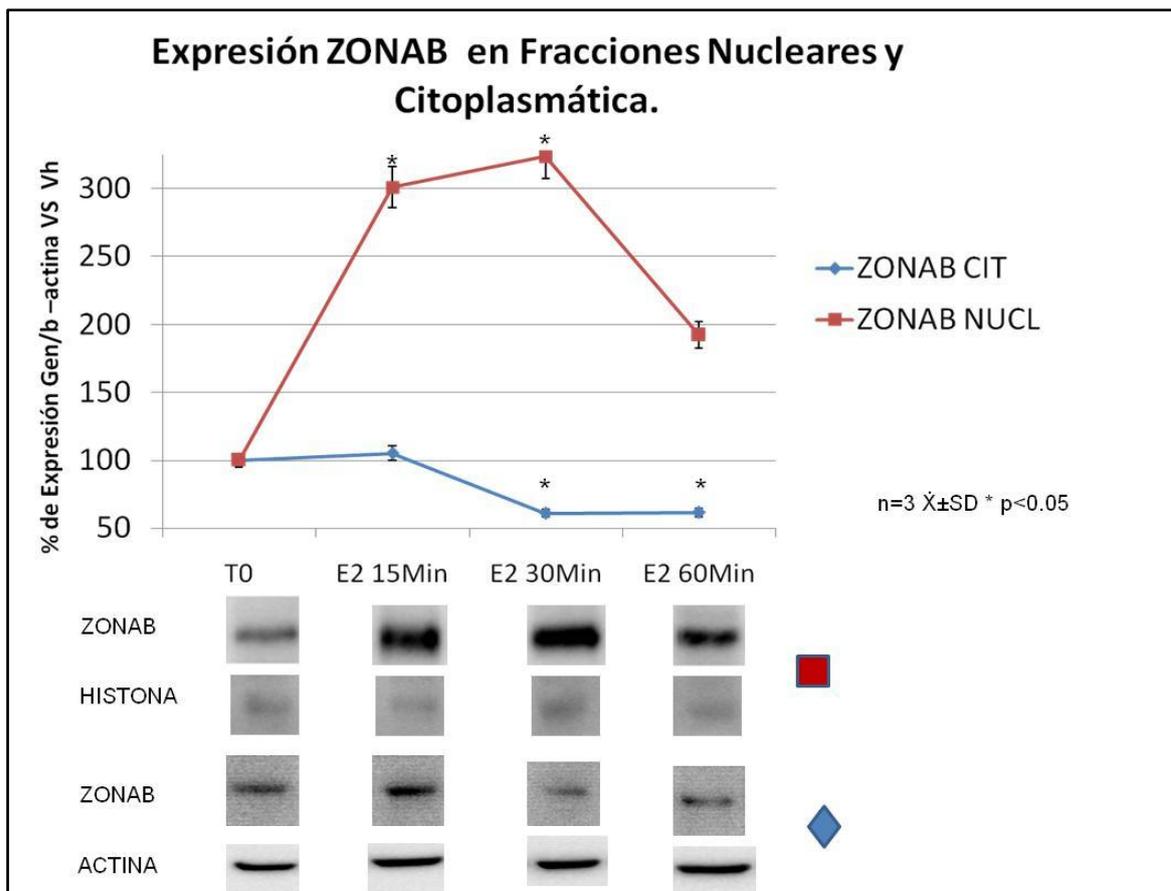
La gráfica 9 muestra el efecto en la localización de la proteína ZO-1 en las fracciones nuclear (línea roja) y citoplasmática (línea azul) cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM. Los resultados demostraron que E<sub>2</sub> (1 nM) induce cambios en la localización de la proteína ZO-1, en donde podemos apreciar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05), E<sub>2</sub> induce que la proteína ZO-1 disminuya significativamente 47 % de la fracción citoplasmática a los 30 minutos de incubación, mientras que a los 60 minutos induce que se incremente su localización en las fracciones nucleares en aproximadamente 96% con respecto al vehículo.

## 7.2.2 EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ZONAB EN LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA.



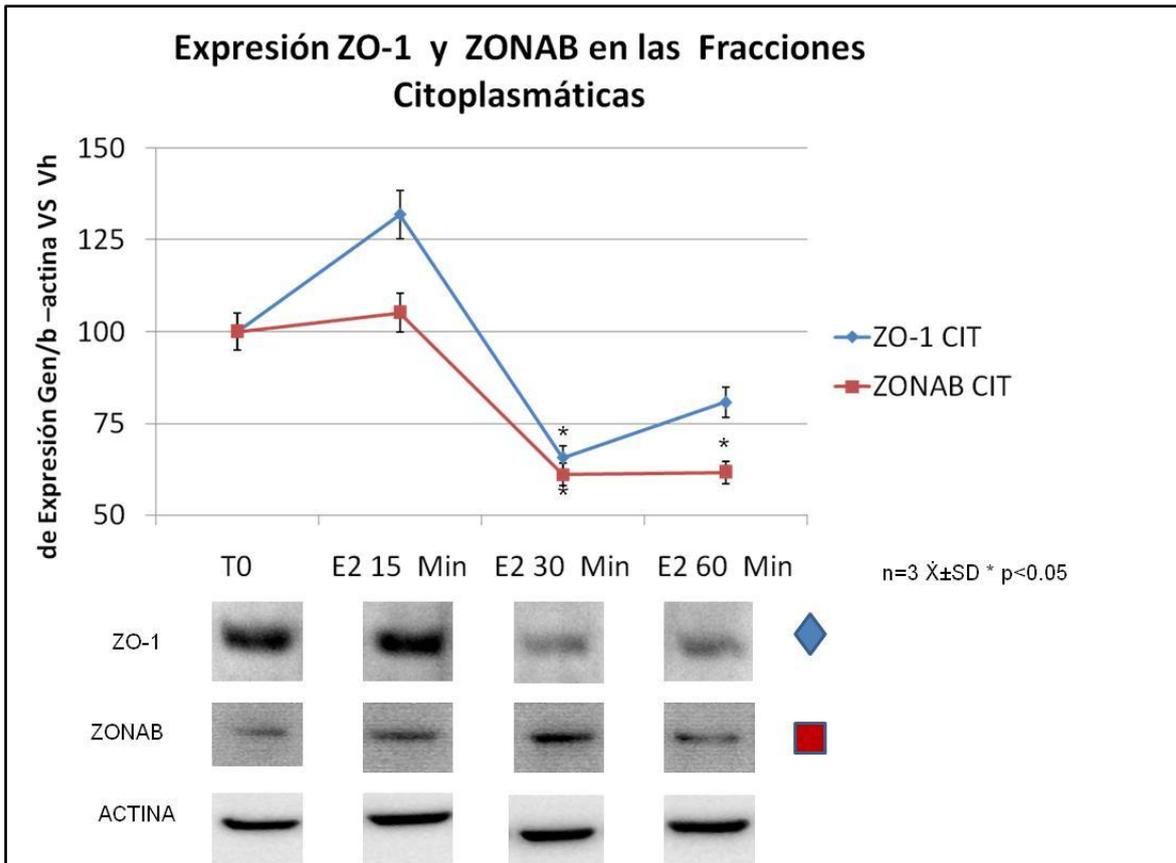
**Figura 8.** Análisis de la presencia de la proteína ZONAB en las fracciones nucleares y citoplasmáticas por la técnica de Western blot. Las proteínas fueron separadas en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida al 10 % y fueron transferidas a una membrana de PVDF. La figura muestra las bandas reveladas de cada una de las proteínas de interés donde ZONAB presenta un peso molecular de 48 KDa, y los controles de normalización para las dos fracciones, en la fracción nuclear se utilizó a la proteína Histona H1 con un peso molecular de 37 KDa, mientras que la fracción citoplasmática se utilizó a la proteína β-actina con un peso molecular de 45 KDa. Todas las muestras se cargaron con la misma cantidad de proteína (50 µg). En la parte inferior se muestran los tratamientos y tiempos de incubación a los que fueron sometidas cada una de las muestras.

### 7.2.3 EFECTO DE E<sub>2</sub> SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE ZONAB.



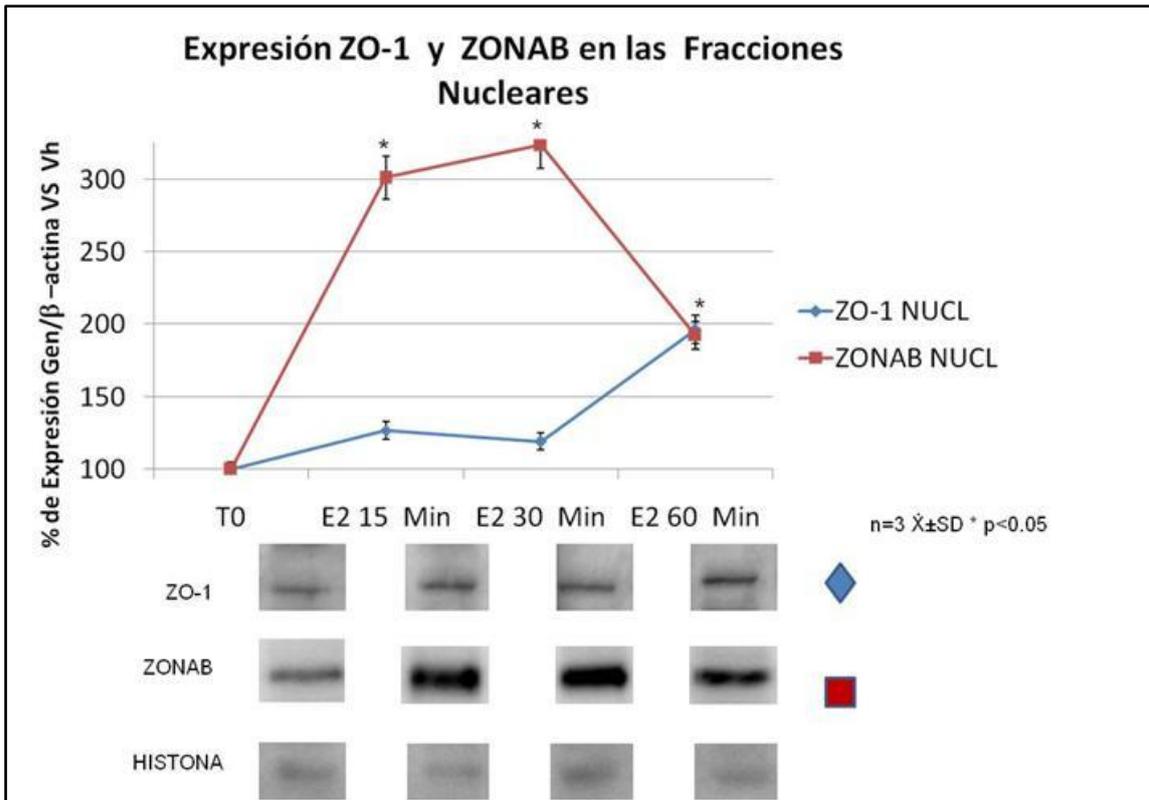
Gráfica 10. Porcentaje de localización de la proteína ZONAB, en las fracciones nuclear (línea roja) y citoplasmática (línea azul) normalizado con  $\beta$ -actina en las fracciones citoplasmáticas e Histona H1 en las fracciones nucleares con respecto al vehículo en donde se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1nM) a los 0, 15, 30, 60 minutos de incubación en células MCF-7.

La gráfica 10 muestra el efecto en la localización de la proteína ZONAB en las fracciones nuclear (línea roja) y citoplasmática (línea azul) cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM. Los resultados demostraron que E<sub>2</sub> (1 nM) induce cambios en la localización de la proteína ZONAB, en donde podemos apreciar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3 $\pm$ SD \* p<0.05), E<sub>2</sub> induce que la proteína ZONAB disminuya significativamente 40 % de la fracción citoplasmática a partir de los 30 minutos y manteniéndose este efecto hasta los 60 minutos de incubación, mientras que en las fracciones nucleares se incrementa su localización desde los 15 minutos en 300 %, teniendo un efecto máximo a los 30 minutos incrementándose en la fracción nuclear en 320 % efecto que disminuye a los 60 minutos en 92 % con respecto al vehículo.



Gráfica 11. Porcentaje de localización de las proteínas ZO-1 (línea azul) y ZONAB (línea roja), en las fracciones citoplasmáticas normalizado con  $\beta$ -actina respecto al vehículo en donde se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1nM) a los 0, 15, 30, 60 minutos de incubación en células MCF-7.

La gráfica 11 muestra el efecto en la localización de las proteínas ZO-1 (línea azul) y ZONAB (línea roja) en las fracciones citoplasmáticas cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM. Los resultados demostraron que E<sub>2</sub> (1 nM) induce cambios en la localización de las proteínas en donde podemos apreciar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3±SD \* p<0.05), E<sub>2</sub> indujo que las dos proteínas disminuyeran significativamente su localización de las fracciones citoplasmáticas ZO-1 47 % y ZONAB 40 % a los 30 minutos de incubación.



Gráfica 12. Porcentaje de localización de las proteínas ZO-1 (línea azul) y ZONAB (línea roja), en las fracciones nucleares (normalizado con Histona H1 con respecto al vehículo (% de localización proteína ZO-1/Histona vs Vehículo) en donde se muestra el efecto del tratamiento: Estradiol (1nM) a los 0, 15, 30, 60 minutos de incubación en células de cáncer de mama MCF-7.

La gráfica 12 muestra el efecto en la localización de las proteínas ZO-1 (línea azul) y ZONAB (línea roja) en las fracciones nucleares cuando las células son incubadas con E<sub>2</sub> 1nM. Los resultados demostraron que E<sub>2</sub> (1 nM) induce cambios en la localización de las proteínas en donde podemos apreciar que los puntos estadísticamente significativos son marcados con un asterisco (n=3  $\bar{X} \pm SD$  \* p<0.05), E<sub>2</sub> indujo que las dos proteínas incrementaran significativamente su localización de las fracciones nucleares ZO-1 se incrementa hasta los 60 minutos en 92 % y ZONAB se incrementa desde los 15 minutos en 300 %, efecto que denota la función que pueden presentar estas dos proteínas.

## VIII. DISCUSIÓN

El mecanismo de adhesión celular es un sistema de regulación clave en diferentes procesos biológicos tales como el crecimiento y la diferenciación celular. Las interacciones entre células vecinas y la matriz extracelular tienen la capacidad de regular la expresión génica, la proliferación celular, la polaridad, la apoptosis y actualmente se han identificado varios complejos de señalización asociados con ellas (Dejana; *et al*; 2008). De manera general, la expresión de los componentes de las uniones estrechas suprime la proliferación para permitir la diferenciación de manera coordinada con las uniones adherentes y la adhesión de la matriz extracelular; sin embargo, se ha observado que en procesos cancerosos la expresión de las proteínas componentes del complejo ocluyente se ven alterados (Balda y Matter; 2008), por lo que determinar los mecanismos a través de los cuales generan estos cambios en la expresión o la influencia de ciertas hormonas sobre la expresión de estas proteínas es aún desconocido, ya que actualmente se ha demostrado que los componentes de las uniones estrechas afectan a varias vías de señalización y activación de la transcripción.

Los andrógenos y los estrógenos pueden inducir una amplia variedad de efectos biológicos, estos pueden funcionar como agonistas o antagonistas dependiendo el tipo de tejido y el origen de las células, además tienen la capacidad de generar efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos los cuales conllevan a la activación de diversas vías de señalización, estas pueden ocurrir en minutos o pueden requerir incluso horas (Jensen *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se demostró el efecto de E<sub>2</sub> sobre la expresión de los componentes del complejo ocluyente (ZO-1, ZONAB y ocludina) además de HER-2 en la línea celular MCF-7. Los resultados obtenidos sugieren que la regulación de la expresión del ARNm que codifica para la proteína ZO-1 pudiera ser inducido a través de un mecanismo clásico a través de la vía genómica en el caso de las 6 horas de incubación. Actualmente no han sido reportados elementos de respuesta a estrógenos en la secuencia del gen de ZO-1, pero se han descrito diferentes mecanismos de regulación de la expresión de este gen, entre los que destacan el propuesto por Chen Jie y colaboradores (2008) en donde demuestra la regulación transcripcional de ZO-1 a través de Jun D, un miembro de la familia de proteínas Jun, la cual es un componente principal de la proteína activadora-1 (AP-1) (Hirai *et al.*, 1989; Ryder *et al.*, 1989). El complejo AP-1 está compuesto de las proteínas Jun (c-Jun, JunB y JunD) que pueden generar homodímeros entre sí o heterodímeros con los miembros de la familia Fos (C-Fos, FosB, Fra1 y

Fra2) para unirse directamente a sus promotores diana en elementos específicos de ADN como secuencias TGAGTCA (sitio AP-1 clásico) y TGACGTCAT (Chen Jie *et al*; 2008); Para el caso particular de ZO-1 se ha demostrado que JunD puede regular no solo su expresión sino también regula la traducción de esta proteína. El mecanismo descrito en este reporte indica que existe un sitio CREB dentro de la región proximal del promotor de ZO-1, en donde se une AP-1 y en este punto se puede generar la interacción entre el dímero de receptores de estrógenos y transactivar la expresión de ZO-1.

En cuanto al efecto potenciado con la concentración más baja ( $E_2$  1nM) con respecto a la más alta (100 nM), es una evidencia más de que la regulación de la expresión de este gen en periodos largos de tiempos puede ser generada por la vía genómica. Para que el RE activado pueda regular la expresión de un determinado ARNm se debe formar un homo ó heterodímero del RE's, este dímero puede ser formado por cualquiera de las isoformas del RE ( $RE\alpha$  ó  $RE\beta$ ), la expresión del gen a regular va a depender del dímero que se forme entre las isoformas del RE, además de que la constante de afinidad del  $E_2$  por  $RE\alpha$  es mayor que la presentada por cualquiera de las otras isoformas del RE (Aranda y Pascual; 2001), con lo cual con una concentración baja (1nM) de  $E_2$  se estaría favoreciendo la activación y la dimerización ( $RE\alpha$ - $RE\alpha$ ), y al incrementar la concentración de  $E_2$  se favorecería la activación de un mayor número de RE y la consecuente formación de distintos heterodímeros de RE y la inducción de la expresión de otros genes regulados por estrógenos, por lo que los efectos en la expresión del gen ZO-1 son potenciados a concentración menores de  $E_2$  (1nM).

Por otra parte, los efectos observados en los tiempos cortos 15 y 30 minutos pueden ser explicados con base en algunos escritos publicados recientemente en esta misma línea celular MCF-7 en los cuales se plantean diversos mecanismos por los cuales numerosos ARNm tienen la capacidad de unirse a ciertas proteínas, lo cual conlleva a una modulación de la estabilidad de ARNm. El mecanismo implica la proteína chaperona HuR la cual está envuelta en el transporte de los ARNm entre los compartimentos del núcleo y el citoplasma, tiene la capacidad de incrementar la estabilidad de los ARNm de algunos genes como Ciclina E1, p21, Cox2, entre otros. El mecanismo por el cual esta proteína podría regular la estabilidad de los ARNm de ZO-1 en los periodos cortos de tiempo (15 y 30 minutos) relaciona la interacción de la proteína de unión HuR a un extremo 3'UTR del ARN evitando su degradación e incrementando su estabilidad como lo describe Pryzbylkowski y colaboradores (2008), en la regulación de algunos ARNm regulados por estrógenos.

Con respecto a la utilización de CHX, inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas, actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. El objetivo de utilizar CHX fue el de determinar si los efectos inducidos por E<sub>2</sub> dependían de la síntesis *de novo* de proteínas. Al incubar a las células con E<sub>2</sub> y CHX los efectos fueron similares en la expresión de ZO-1 con respecto a la incubación de solo E<sub>2</sub>, lo cual demuestra que la expresión de ZO-1 no depende de la síntesis proteica *de novo*.

El efecto inducido en la expresión del ARNm que codifica para la proteína ZONAB demostró que E<sub>2</sub> 1nM estimula la expresión de ZONAB a los 30 minutos 50%, y a las 6 horas 180% con respecto al vehículo, este efecto es similar al efecto inducido con una concentración mayor de E<sub>2</sub> (100nM) incrementando la expresión de ZONAB a los 30 minutos 85% y a las 6 horas 100% los efectos son semejantes con las dos concentraciones de E<sub>2</sub>, pero se observa un efecto potenciado con la concentración 1nM de E<sub>2</sub>, esto sugiere que de manera similar a la expresión de ZO-1, la expresión de ZONAB pudiera ser regulada a través del mecanismo de acción clásico de los estrógenos, la vía genómica ya mencionada previamente a las 6 horas.

Debido a que actualmente no existen reportes que describan algún elemento que responde a estrógenos (ERE) en la región promotora del gen de ZONAB podría atribuirse a la presencia de algún elemento *trans* que promueva la transcripción de dicho gen. Una secuencia consenso ERE, es una repetición palindrómica invertida (IR): 5'-GGTCAnnnTGACC-3', donde n es cualquier nucleótido (Klein-Hitpass; 1988). La secuencia palindrómica de los ERE tiene un tamaño aproximado de 17pb, sin embargo, las secuencias que flanquean son importantes para determinar la afinidad con la cual ER se une a éstas. La mayoría de los genes que responden a estrógenos presentan secuencias imperfectas no palindrómicas. Al analizar la secuencia completa del gen de ZONAB no se encontraron secuencias ERE reportadas en la región promotora de dicho gene lo cual confirma la presencia de algún elemento *trans* que induzca la activación transcripcional de dicho gen.

El efecto observado a los 30 minutos de incubación puede ser descrito como un efecto no genómico en donde la proteína HuR este interactuando en el extremo 3'UTR del ARN de ZONAB evitando su degradación e incrementando su estabilidad. En el caso de la incubación con (E<sub>2</sub> + CHX) indujo efectos opuestos a los de solo E<sub>2</sub> a los 30 minutos y después de las 6 horas de incubación en la expresión de ZONAB, estos resultados indican que la expresión de

ZONAB depende de la síntesis proteica *de novo* con la participación de un posible coactivador a los 30 minutos y un posible correpresor después de las 6 horas.

Después de observar el efecto del E<sub>2</sub> (1nM) en la expresión de ZO-1 y ZONAB analizamos el efecto en la localización de estas proteínas en las fracciones nucleares y citoplasmáticas, en donde observamos que la localización de ZO-1 disminuyó significativamente (47%) después de los 30 minutos en las fracciones citoplasmáticas y después de este mismo periodo de tiempo incrementó su localización en las fracciones nucleares, teniendo el efecto máximo a los 60 minutos en aproximadamente 96% con respecto al vehículo.

En cuanto a la localización de ZONAB se observó un patrón de translocación nuclear semejante al de ZO-1, pero en un tiempo menor, la localización de ZONAB en las fracciones citoplasmáticas disminuyó a los 30 minutos 40 % mientras que en las fracciones nucleares se incrementan su localización desde los 15 minutos en 300 %. Este efecto de inducción de la translocación sugiere la participación del E<sub>2</sub> como activador de ciertas vías de señalización que conlleva efectos sobre las moléculas de adhesión en particular sobre el complejo ocluyente (ZO-1 Y ZONAB ), recientes reportes han descrito mecanismos por los cuales los estrógenos puede llevar acabo dichos efectos a través de la vía no genómica generando una serie de pasos envueltos en el proceso de señalización: i) activación del receptor de estrógenos, ii) fosforilación en residuo de tirosina por una tirosina cinasa que resulta en la disociación del citoesqueleto y redistribución de complejos de proteínas asociadas a la membrana (Radhakrishna y Akshas., 2002).

Este proceso podría describir el efecto observado en los cambios de localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB el proceso conllevaría la activación del receptor de estrógenos, la fosforilación por una tirosina cinasa en ZO-1, existen evidencias en las cuales se plantea que el incremento en la fosforilación de tirosinas en ZO-1 a través de Src induce una hiperfosforilación de ZO-1 modulando su localización subcelular, resultando en la disociación de los componentes del complejo ocluyente (ZO-1, ZONAB y ocludina) favoreciendo la translocación al núcleo de ZO-1 y ZONAB. Esto denota la pérdida de uniones célula-célula y marca el inicio de la transición epitelio-mesénquima que conlleva el desarrollo del proceso metastásico.

Estos efectos de regulación transcripcional y de inducción de la translocación nos llevó a analizar la expresión del oncogén HER-2 ésto con base en algunos experimentos descritos

recientemente en los que se relacionan a las proteínas del complejo ocluyente con procesos de regulación transcripcional e inducción de la proliferación celular, estos experimentos demuestran la forma en que actúan las proteínas ZO-1 y ZONAB como coactivador y factor de transcripción respectivamente, para regular la expresión del proto oncogén HER-2, el mecanismo establece que la proteína ZO-1 al no contar con dominios de unión la ADN tiene la capacidad de interactuar a través de su dominio SH3 (homólogo 3 a Src) con la proteína ZONAB, el dímero (ZO-1, ZONAB) interactúan mediante motivos de zinc presentes en ZONAB directamente en el ADN en una caja Y invertida (CCAAT) justo en la región promotora del proto oncogén HER-2 lo cual conlleva a la inducción de la transcripción del gen HER-2, (Balda y Matter; 2000).

Tomando en cuenta lo anterior se determinó el efecto en la expresión de HER-2 al incubar a las células con las dos concentraciones de  $E_2$  (1 y 100nM), esto demostró que  $E_2$  regula la expresión de HER-2 induciendo un incremento del 70% a las 3 horas de incubación, y mostrando el efecto máximo a las 24 horas con una concentración de 100nM. Por otra parte al incubar a las células con el inhibidor de la traducción CHX, se observó que la combinación ( $E_2$  + CHX) indujo efectos similares a la incubación de solo  $E_2$ , en donde la combinación indujo que la expresión de HER-2 se incrementara 85% a las 3 horas, efecto revertido a las 6 horas disminuyendo la expresión de HER-2 en 63% al incubar con 100nM de  $E_2$ , el máximo efecto observado con las dos concentraciones fue observado después de las 9 horas incrementando la expresión de HER-2 en más de 400% con ambas concentraciones de  $E_2$ .

La utilización de CHX en este tipo de experimentos permite discriminar si el efecto en la expresión de estos genes depende de proteínas presintetizadas o proteínas sintetizadas *de novo*. En el caso de la expresión de HER-2 este efecto denota que la expresión de HER-2 no depende de proteínas sintetizadas *de novo*, lo cual indica que las proteínas (ZO-1 y ZONAB) componentes del complejo ocluyente situadas en las regiones periféricas a la membrana plasmática son desensambladas del complejo ocluyente por la acción del  $E_2$  unido al receptor de estrógenos, esto induce la activación del receptor de estrógenos, con la consecuente fosforilación en residuo de tirosina por una tirosina cinasa en ZO-1 que resulta en la disociación del complejo ocluyente (ZO-1, ZONAB, ocludina).

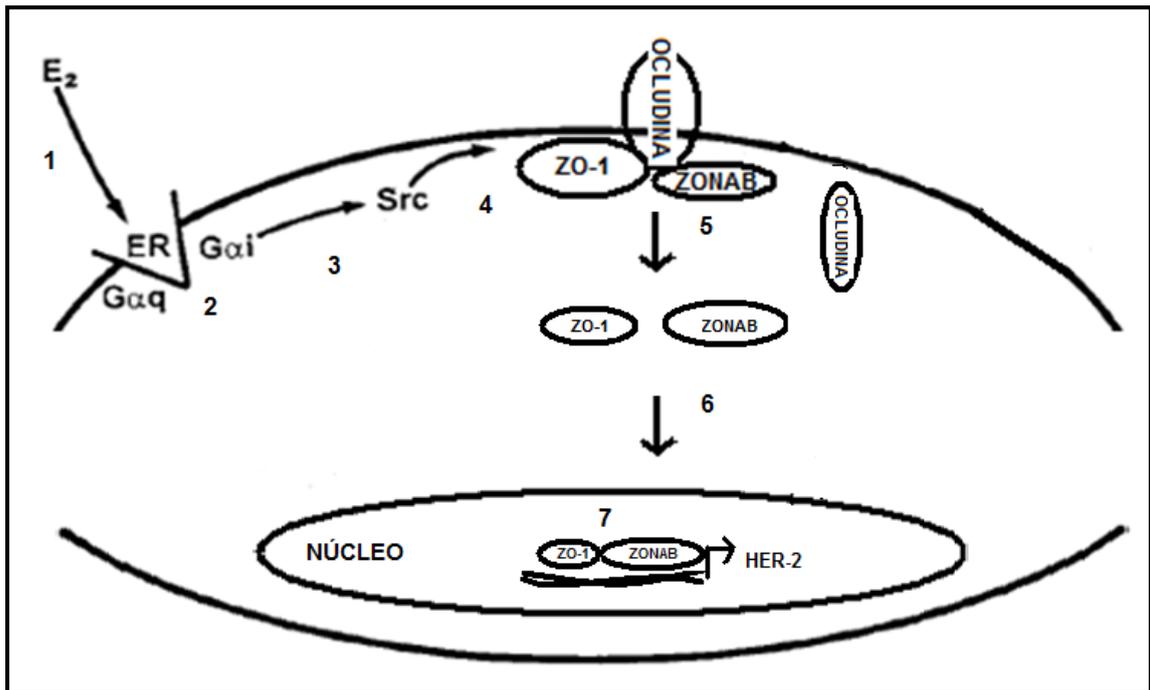
Una vez desensambladas las proteínas ZO-1 y ZONAB tienen la capacidad de ser translocadas al núcleo en periodos muy cortos de tiempo (15 y 30 minutos) ya una vez localizadas en el núcleo funcionan como coactivador y factor de transcripción respectivamente al inducir la activación transcripcional de HER-2 en lapsos mayores de tiempo entre 3 y 9 horas.

Otro dato a resaltar es la posible participación de un posible corepresor en la expresión de HER-2 a las 24 horas de incubación ya que la expresión del mismo se incrementa de manera considerable (> 400%) con la combinación E<sub>2</sub> +CHX a las dos concentraciones (1 y 100nM).

Para finalizar se analizó el efecto del E<sub>2</sub> (1 y 100nM) sobre la expresión del último componente del complejo ocluyente ocludina. Los resultados demostraron que E<sub>2</sub> inhibe la expresión de ocludina con ambas concentraciones. Su expresión disminuye (48%) después de las 9 horas, este efecto fue potenciado a las 24 horas (55%). Actualmente existen diversos reportes donde demuestran que los estrógenos tienen la capacidad de regular la expresión de ocludina a través de la isoforma β del receptor de estrógenos en células epiteliales del intestino (Braniste; 2009). Por otra parte el trabajo publicado por Sade y colaboradores (2009), describe específicamente que el promotor de la proteína ocludina exhibe actividad dependiendo del tipo de tejido. En el trabajo se identificó un grupo de factores de transcripción SP3 y YY1, que diferencialmente interactúan con la región promotora del gen de ocludina para inducir su expresión en endotelio cerebral, pero en otros endotelios la interacción de estos pueden reprimir la expresión de ocludina. Esto indicaría la vía por la cual E<sub>2</sub> unido al receptor de estrógenos pudiera funcionar como un posible co-represor al interactuar con SP3 o YY1 e inducir la disminución de la expresión del ARNm que codifica para el gen de ocludina.

En cuando al efecto inducido por el inhibidor de la traducción CHX, pudimos observar que esta combinación (E<sub>2</sub> + CHX) incrementó la expresión de ocludina (80%) después de las 9 horas y produce mayor efecto sobre la expresión de ocludina a las 24 horas donde su expresión se incrementa hasta 170 %. Esto señala la posible participación de un co-represor en la expresión de ocludina después de las 9 horas.

La invasión por carcinomas presenta una implicación potencial de producir metástasis distantes, pero a pesar de su importancia clínica, el proceso aun no ha sido entendido completamente. Cada vez hay más pruebas que señalan el papel de la transición epitelio mesénquima como un marcador temprano en procesos de invasión, la EMT implica una complicada red de eventos de señalización y que se caracterizan por la pérdida de marcadores epiteliales como las proteínas que generan las uniones intercelulares en las células tumorales que se debilitan aumentando su motilidad, para de esa forma ser capaz de generar metástasis en otro órgano o tejido.



**Figura 9.** Representación del posible mecanismo por el cual E<sub>2</sub> regula el desensamblaje del complejo ocluyente, induciendo la translocación al núcleo de ZO-1 y ZONAB para estimular la expresión de HER-2 en las células de cáncer de mama.

La figura 9 resume en una serie de pasos el posible mecanismo a través del cual podemos explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo. El mecanismo inicia cuando E<sub>2</sub> se une a RE (1) la unión del ligando con el RE genera su activación. El RE tiene capacidad de reclutar e inducir la actividad de ciertas proteínas G (2) e incluso tiene la capacidad de interactuar directamente con ciertas proteínas cinasas fundamentales para iniciar procesos de señalización, como es el caso de SRC (3) que al ser activada interacciona con ZO-1 y/o ZONAB (4), y cumple su función de proteína cinasa. La fosforilación de ZO-1 y ZONAB conlleva un cambio en su conformación estructural que resulta en el desensamblaje del complejo ocluyente (5). Una vez que las proteínas del complejo ocluyente específicamente ZO-1 y ZONAB han sido solubilizadas estas pueden ser translocadas al núcleo (6), ya localizadas en el núcleo estas interactúan en una caja Y invertida en la región promotora del gen HER-2 (7) funcionando como coactivador y factor de transcripción respectivamente para estimular la expresión de dicho gen.

## **IX. CONCLUSIÓN.**

El estradiol induce en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 cambios en la expresión de los genes que codifican para las proteínas que componen el complejo ocluyente. Incrementa la expresión de ZO-1 a los 15 minutos y a las 6 horas y de ZONAB a los 30 minutos y a las 6 horas, además induce la translocación al núcleo de estas dos proteínas, la translocación de ZONAB es más rápida iniciando a los 15 minutos y la de ZO-1 se inicia a los 30 minutos. Los experimentos con CHX demuestran que la expresión de HER-2 no depende de la síntesis *de novo* proteínas, lo cual indica que el incremento en su expresión podría ser regulado por las proteínas ZO-1 y ZONAB que son desensambladas del complejo ocluyente. Estradiol inhibe la expresión de ocludina, lo cual podría plantearse como un marcador de transición de epitelio mesénquima y el inicio de metástasis.

Debemos resaltar que el mecanismo aquí descrito describe el proceso mediante el cual una célula cancerosa con una baja amplificación de ciertos genes importantes en los procesos cancerosos, puede incrementar la amplificación estos genes por efectos de ciertas hormonas. Esto además confirma que la exposición a estrógenos por periodos prolongados, es uno de los factores de alto riesgo para la generación de cáncer de mama.

## **X. PERSPECTIVAS**

Actualmente, se llevan a cabo experimentos para demostrar si la translocación de las proteínas ZO-1 y ZONAB es dosis dependiente. Además se realizan experimentos para determinar el estado de fosforilación de la proteína Src y correlacionar este estado de fosforilación con la translocación de ZO-1 y ZONAB, como resultado del desensamble del complejo ocluyente, además se realizan experimentos para corroborar los resultados obtenidos en la translocación de estas proteínas por inmunofluorescencia con microscopia confocal. También sería prudente analizar la expresión y la activación de HER-2 para tratar de correlacionar la translocación de ZO-1 Y ZONAB con la expresión y la activación de dicho receptor. Además sería interesante realizar experimentos relacionados con el efecto del E<sub>2</sub> en la permeabilidad paracelular.

Un punto importante para continuar con esta línea de investigación es el efecto en la activación de cinasas importantes en procesos como la proliferación y la supervivencia celular tal es el caso de la proteína cinasa C, ERK, la fosfatidil inositol 3 cinasa, AKT entre otras.

## XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 3:1269-304.
2. Aranda-Gallegos JE, Barrón-Vallejo J, Ortega-Díaz R, Pereyra-Quiñones R, Kably-Ambe A. 1998. A physiopathological overview of climacteric and menopause. *Ginecol Obstet Mex.* 66:253-8.
3. Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, Elledge RM. 2004. HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin Cancer Res.* 11: 5670-5676.
4. Arpino G, Laucirica R, Elledge RM. 2005. Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Ann Intern Med.* 6:446-57.
5. Balda MS, Anderson JM. 1993. Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol.* 264: C918-24.
6. Balda MS, Matter K. 2008. Tight junctions at a glance *J Cell Sci.* 22: 3677-82
7. Balda S, Matter K. 2000. The tight junctions protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO Journal.* 9: 2024-2033.
8. Balda S., Garrett D. and Matter K. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol.* 3: 423-32.
9. Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 3: 869-901.
10. Berardo MD, O'Connell P, Allred DC. 1996. Biological characteristics of premalignant and preinvasive breast disease. *Hormone-Dependent Cancer.* 8: 1-17.
11. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
12. Braniste Viorica, Leveque Mathilde, Buisson-Brenac Claire, Bueno Lionel, Fioramonti Jean and Houdeau Eric. 2009. Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor  $\beta$ -mediated up-regulation of occluding and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells *Journal of Physiol.* 13: 3317–3328.
13. Chen Jie, Xiao Lan, Rao Jaladanki N., Zou Tongtong, Liu Lan, Bellavance Emily, Gorospe Myriam, and Wang Jian-Ying. 2008. JunD Represses Transcription and Translation of the

- Tight Junction Protein Zona Occludens-1 Modulating Intestinal Epithelial Barrier Function. *Mol Biol Cell*. 9: 3701-12.
14. Cheng G., Youssef B.B., Markenscoff P. and Zygourakis K. 2008. Cell population dynamics modulate the rates of tissue growth processes. *Biophysics Journal*. 90: 713–724.
  15. Chiang AC, Massagué J. 2008. Molecular basis of metastasis. *Engl J Med*. Dec 26: 2814–2823
  16. Chlenski A., Ketels K. V., Korovaitseva G. I., Talamonti M. S, Oyasu R., Scarpelli D. G. 2000. Organization and expression of the human zo-2 gene (*tjp-2*) in normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta*. 1493:319–324.
  17. Christofori G. 2006. New signals from the invasive front. *Nature*. 7092: 444-50.
  18. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. 2005. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 30: 7721-35.
  19. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121:2115–2122
  20. Dejana Elisabetta, Orsenigo Fabrizio, Molendini Cinzia, Baluk Peter, McDonald Donald M. 2009. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res*.335:17–25
  21. -Demers LM. 1994. Effects of Fadrozole (CGS 16949A) and Letrozole (CGS20267) on the inhibition of aromatase in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 30:95-102.
  22. Ellis MJ, Ma C. 2007. Letrozole in the neoadjuvant setting: the P024 trial. *Breast Cancer Res Treat*. 1:33-43.
  23. Evans CW. 1991. A genetic basis for metastasis. *Cell Biol Int Rep*.12: 1175-81.
  24. Frankel P, Aronheim A, Kavanagh E, Balda MS, Matter K, Bunney TD, Marshall CJ. 2005. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J*. 1: 54-62.
  25. Fugua SAW, Chamness GC, McGuire WL. 1993. Estrogen receptor mutations in breast cancer. *J. Cell Biochem*. 51:135-143.
  26. Gayosso V, Montano LF, López-Marure R. 2006. DHEA-induced antiproliferative effect in MCF-7 cells is androgen- and estrogen receptor-independent. *Cancer J*. 2: 160-5.
  27. Girón RA, Montañó LF, Escobar ML, López-Marure R. 2009. Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation and induces the death of HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells through an androgen- and estrogen-receptor independent mechanism. *FEBS J*. 19: 5598-609.

28. Gompel A. 2000. Hormone replacement therapy in menopause in question? *Med Interne*. May; 5: 405-7.
29. González-Mariscal L, Betanzos A., Nava P., y Jaramillo B. E. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1:1-44.
30. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 3: 729-56.
31. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20: 10779-84.
32. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 1: 57-70.
33. Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mehta, F., Bravo, K., and Yaniv, M. 1989. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J*. 8: 1433–1439.
34. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. 1998. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol*. 6: 1767-73
35. Hynes N. E. y. Lane H. A., 2005. ERBB Receptors and cáncer: The complexity of targeted inhibitors, *NATURE REVIEWS*. 05:341-354.
36. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el Cáncer 2010. México, DF: INEGI. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). [http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world\\_cancer\\_day/es/index.html](http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_cancer_day/es/index.html)
37. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. XII Censo General de Población y Vivienda 2008. México, DF: INEGI; 2008. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
38. Itoh M. y Bissell MJ. 2003. The Organization of Tight Junctions in Epithelia: Implications for Mammary Gland Biology and Breast Tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.4: 449-62.
39. Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA. 2010. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav*. 2: 151-62
40. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*. 6: 2465-75.
41. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. 1993. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 15: 36-47.

42. -Kirschner MA. 1979. The role of hormones in the development of human breast cancer. En: Breast Cancer Advances in Research and Treatment, Current Topics. Plenum Press, New York. 3: 199-226.
43. Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC. 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. Nucleic Acids Res. 2: 647-63.
44. Kuale G, Heuch I. 1987. Lactation and cancer risk: is there a relation specific to the breast cancer. J. Epidemiol. Comm. Health. 42:3037.
45. Kurihara, H., Anderson, J. M. and Farquhar, M. G. 1995. Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modification of tight junctions between glomerular foot processes. Am. J. Physiol. 268: 514-524.
46. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol. 7: 973-81.
47. Lin Ye; Tracey A., y WEN G. JIANG 2003. Biphasic Effects of 17-b-Estradiol on Expression of Occludin and Transendothelial Resistance and Paracellular Permeability in Human Vascular Endothelial Cells. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 196: 362–369.
48. Locascio A, Nieto MA. 2001. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. Curr Opin Genet Dev.; 4: 464-9.
49. López-Ríos O, Lazcano-Ponce S, Tovar-Guzmán, Hernández-Avila M. 1997. La epidemia de cáncer mamario en México ¿Consecuencia de la transición demográfica? Salud Pública Méx. 39:259-265.
50. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. 2002. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. Bioessays.10: 885-93.
51. Mahnaz Razandi, Ali Pedram, Steven T. Park, and Ellis R. Levin. 2003. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Proximal Events in Signaling by Plasma Membrane Estrogen Receptors.4: 2701–2712.
52. Mareel M. and Leroy A. 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. Physiol. Rev. 83: 337–376.
53. Matthew Ellis Æ Cynthia Ma. 2007.. Femara1 and the future: tailoring treatment and combination therapies with Femara. Springer Science+Business Media 105:105–115
54. Mauro L., Bartucci M., Morelli C., Ando S., and Surmacz E. 2001. IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. J. Biol. Chem. 276: 39892–39897.

55. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*. 3: 197-209.
56. N E. Hynes\* and. Lane HA. 2005. ERBB Receptors and cáncer: the complexity of targeted inhibitors; Nature Publishing Group. 5: 341-354.
57. National Cancer Institute; <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno>. Fecha de consulta: 31 de enero de 2006.
58. Noriega-Reyes Yamilet y McCarron Langley. 2008. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología* 3: 29-40.
59. Organización Mundial de la Salud 2009. Estadísticas de enfermedades neoplásicas 2010. <http://www.OMS/estadisticas.com>.
60. Pierobon Mariaelena, Geho David, Belluco Claudio y Liotta Lance A. 2007. Invasion and Metastasis. *The Cancer Handbook*. 2: 2-10.
61. Pike MC, Spicer DV. 1991. Endogenous estrogen and progesterone as the major determinants of breast cancer risk: Prospects for control by "natural" and "technological" means. *Spring-Verlag*. 209-216.
62. Polette Myriam, Gilles Christine, Nawrocki-Raby Be´atrice, Lohi Jouko, Hunzike Walter, Foidart Jean-Michel y Birembaut Philippe. 2005. Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression Is Regulated by Zonula Occludens-1 in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 17: 7691-8)
63. Programa de Acción: Mujer y Salud (PROMSA) 2002-2006, Secretaría de Salud; Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud, México 2006. ([www.generoy saludreproductiva.gob.mx/Mujer\\_y\\_Salud-CNEGSR.pdf](http://www.generoy saludreproductiva.gob.mx/Mujer_y_Salud-CNEGSR.pdf)).
64. Pryzbylkowski P, Obajimi O, Keen JC. 2008. Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. *Breast Cancer Res Treat*. 1: 15-25.
65. Radhakrishna K., Shyamali B., Vijay U., KARNAKY J. and GUPTA Akshay. 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J*. 368: 471-481.
66. Rajkulmar T, Gullick J. 1994. The type 1 growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 29: 3-9.
67. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. 2002.. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol*.1: 100-15.

68. Rhodes A, Burckhardt E and Kappeler A. 2006. HER2 testing in breast cancer. *THE BIOMEDICAL SCIENTIST*. 37: 515-520.
69. Sabiston DC Jr, Harpole DH Jr, Herndon JE, Young WG Jr and Wolfe WG. 1995. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Tumori*. 5: 787-96.
70. Sade H, Holloway K, Romero IA, Male D. 2009. Transcriptional control of occludin expression in vascular endothelia: regulation by Sp3 and YY1. *Biochim Biophys Acta*. 3: 175-84.
71. Sanders ME, Schuyler PA, Dupont WD, Page DL. 2005. The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer*. 12: 2481-4
72. Shen L, Weber CR, Turner JR. 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol* 181: 683–695
73. Solej M, Ferronato M, Nano M. 2005. Locally advanced breast cancer in the elderly: curettage mastectomy. *Tumori*. 4: 321-4.
74. Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS. 2006. Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol*. 6: 2387-98.
75. Stevenson B. R., Siliciano J. D., Mooseker M. S., and Goodenough D. A. 1986. Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103: 755–766.
76. Thiery JP, Sleeman JP. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 131-42.
77. Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 6: 442-54.
78. Tracey A, Martin, Tapas Das, Robert E. Mansel, and Wen G. Jiang. 2007. Enhanced Tight Junction Function in Human Breast Cancer Cells by Antioxidant, Selenium and Polyunsaturated Lipid. *Journal of Cellular Biochemistry* 101:155–166
79. Traweger A, Lehner C, Farkas A, Krizbai IA, Tempfer H, Klement E, Guenther B, Bauer HC, Bauer H 2008. Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. *Differentiation*. 1: 99-106.
80. Wittekind C, Neid M. 2005. Cancer invasion and metastasis. *International journal for Cancer Research and Treatment*. 1: 14-16

81. Woods DF, Bryant PJ. 1991. The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell*. 3: 451-64.
82. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, Pham TQ, Soriano R, Stinson J, Seshagiri S, Modrusan Z, Lin CY, O'Neill V, Amler LC. 2005. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 24: 8686-98.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Efecto sobre la expresión de los genes ZO-1, ZONAB, OCLUDINA, HER-2 y cambios en la localización de las proteínas ZO-1 y ZONAB inducidos por estradiol en células de carcinoma mamario humano MCF-7". El examen se realizó el día 09 del mes de septiembre de 2010.

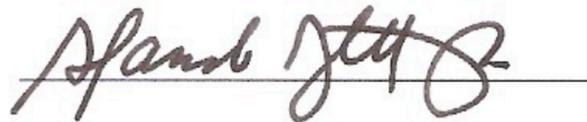
### JURADO DE EXAMEN



**PRESIDENTE**

**M. en BE. Leticia González Núñez**

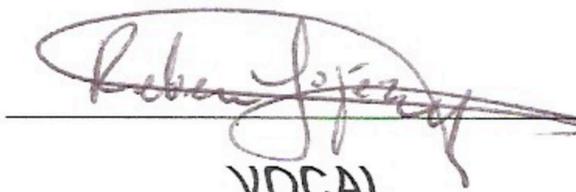
Profesora Titular "A". Tiempo completo. Departamento de Biología de la Reproducción. UAM-I. gnleti@yahoo.es



**SECRETARIO**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

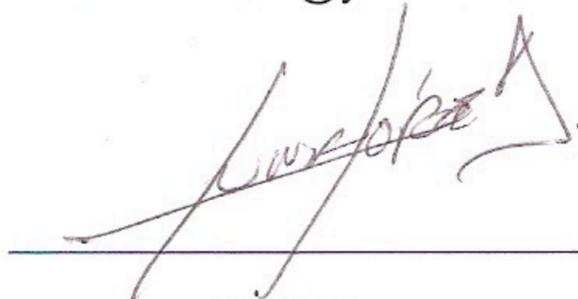
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIB, UNAM y Departamento de Bioquímica, INCMN SZ. azentell@biomedicas.unam.mx



**VOCAL**

**Dra. Rebeca López Marure**

Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. rlmarure@yahoo.com.mx



**VOCAL**

**Dr. Armando Luna López**

Departamento de Investigación Básica, Instituto de Geriatria, allbioexp@yahoo.com