

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEECTO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE EL  
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TWIST EN CÉLULAS DE  
CÁNCER**

**T E S I S**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**M. en C. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA**

**CODIRIGIDA POR**

**Dra. Guadalupe García Alcocer**

**Dra. Teresa García Gasca**

**Santiago de Querétaro, Qro, Marzo, 2015**



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas**

**“EFECTO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE EL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN TWIST EN CÉLULAS DE CÁNCER”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

M. en C. Jesica Esther Escobar Cabrera

**Codirigido por:**

Dra. Guadalupe García Alcocer  
Dra. Teresa García Gasca

**SINODALES**

Dra. Guadalupe García Alcocer

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Laura Cristina Berumen

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez

Sinodal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Marzo 2015  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas

**“EFECTO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE EL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN TWIST EN CÉLULAS DE CÁNCER”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

M. en C. Jesica Esther Escobar Cabrera

**Codirigido por:**

Dra. Guadalupe García Alcocer  
Dra. Teresa García Gasca

**SINODALES**

Dra. Guadalupe García Alcocer

Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen

Vocal

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez

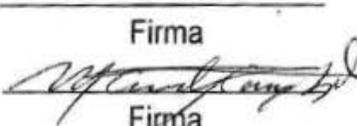
Sinodal

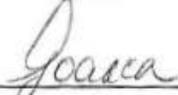
Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola

Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad

  
Firma  
  
Firma  
  
Firma

Firma  
  
Firma

  
Firma  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Marzo 2015  
México

## RESUMEN

El cáncer es un grave problema de salud a nivel mundial al ser el principal responsable de la mayoría de las muertes en el mundo, causando 8.2 millones de defunciones por año. El cáncer de mama es el tumor maligno que más afecta a las mujeres a nivel mundial y nacional. La mortalidad del cáncer mamario radica en su capacidad para realizar metástasis, es decir que puede diseminarse y colonizar órganos distantes del tumor primario como son cerebro, pulmones y hueso principalmente. Estudios previos han demostrado que el tratamiento con 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno disminuyen la proliferación de las células tumorales mediante el arresto celular y la inducción de apoptosis, sin embargo, también se ha observado que pueden interferir con cascadas de señalización como son las MAPK y modificar la expresión de proteínas asociadas con la invasión celular. En este proyecto se estudió el efecto del 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno de manera individual y combinada sobre la expresión proteica y distribución de TWIST, un factor de transcripción que favorece la invasión y metástasis en células negativas a receptor a estrógenos (MDA-MB-231) y positivas a receptor a estrógeno (MCF7). Los resultados mostraron que el 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno como tratamientos individuales y en combinación, disminuyen los niveles de TWIST y lo mantienen en citoplasma en células Receptor a Estrógenos-negativas, lo que sugiere que podrían disminuir el riesgo de invasión y metástasis. Sin embargo, el Tamoxifeno tiene un efecto distinto en células Receptor a Estrógenos-positivas, al aumentar la cantidad de proteína total TWIST e incrementar su presencia en el núcleo, esto sugiere que podría favorecer la invasión y metástasis en este tipo de células.

**(Palabras clave:** cáncer de mama, Tamoxifeno, 5-Fluorouracilo, TWIST)

## ABSTRACT

Cancer is a major health problem worldwide, is the main responsible for most deaths in the world causing 8.2 million deaths per year. Breast cancer is a malignant tumor that affects women globally and nationally. Breast cancer mortality is because of its ability to develop metastasis that means that cancer can spread and colonize distant organs from the primary tumor such as brain, lungs and bone. Previous studies have shown that treatment with 5-Fluorouracil and Tamoxifen decrease proliferation of tumor cells by cell arrest and apoptosis induction, however, has also been reported that can interfere with signaling cascades such as MAPK and modify the expression of proteins associated with cellular invasion as TWIST protein, which is a transcription factor which promotes invasion and metastasis. In this work was evaluated the effect of 5-Fluorouracil and Tamoxifen individually and in a combination, on the protein expression and distribution of TWIST in estrogen receptor negative cells (MDA-MB-231) and in estrogen receptor positive cells (MCF7). The results showed that 5-Fluorouracil and Tamoxifen, as individual treatments and in combination, decrease levels of TWIST and keep it in cytoplasm distribution in estrogen receptor negative cells, suggesting that it may decrease the risk of invasion and metastasis. On the other hand, Tamoxifen presented a different effect on estrogen receptor positive cells by increasing the total amount of TWIST protein and increased its presence in the nucleus, suggesting that could favor the invasion and metastasis in these cells.

**(Key words:** breast cancer, Tamoxifen, 5-Fluorouracil, TWIST.

# ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Estadísticas del cáncer	3
Origen del cáncer	6
Metástasis	7
Tipos de cáncer	9
Estructura de la glándula mamaria	10
Clasificación del cáncer de mama	11
TWIST	14
Papel de TWIST en la célula sana	15
TWIST y cáncer	16
TWIST y la transición epitelial-mesenquimal	17
TWIST y las células madre del cáncer	20
Fármacos antineoplásicos	21
5-Fluorouracilo	23
Tamoxifeno	25
Farmacocinética del Tamoxifeno	27
Aplicaciones clínicas del Tamoxifeno	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
Pregunta de investigación	31
Hipótesis	31

OBJETIVOS	32
General	32
Específicos	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Diseño Experimental	33
Cultivo Celular	33
Anticuerpos y reactivos	34
Curvas concentración respuesta	34
Tratamientos	34
Inmunocitoquímica	35
Extracción de proteína	36
Western Blot	36
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS	38
RESUMEN DE RESULTADOS	51
DISCUSIONES	52
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1. Morbilidad hospitalaria por tumores malignos según sexo en población menor de 20 años en México	4
2. Morbilidad hospitalaria en mujeres mayores de 20 años por tumores malignos	5
3. Tasa de mortalidad por tumores malignos en población mayor de 20 años	5
4. Tipo de tumores	6
5. Proceso de metástasis	8
6. Anatomía de la mama femenina	11
7. Características de la transición epitelial-mesenquimal	18
8. Estructura del 5-FU	23
9. Comparación de la estructura del estradiol y el Tamoxifeno	25
10. Metabolismo del Tamoxifeno	28
11. Diseño Experimental	33
12. Proliferación de las células MDA-MB-231 tratadas con 5-FU	38
13. Efecto del 5-FU en la proliferación de células RE (+) MCF7	39
14. Efecto del Tamoxifeno sobre la proliferación celular en células RE (-) MDA-MB-231	40
15. Efecto del Tamoxifeno sobre la proliferación de las células RE (+) MCF7	41
16. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM en la presencia de TWIST en células RE (-) MDA-MB-231	42
17. Efecto de los fármacos antineoplásicos sobre las células TWIST positivas en la línea MCF7.	43

18. Distribución subcelular de TWIST observada en células RE (-) MDA-MB-321.	44
19. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre TWIST citoplasmático en células MDA-MB-231	45
20. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre TWIST nuclear y citoplasmático en células MDA-MB-231.	46
21. Efectos del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre la presencia de TWIST en citoplasma en células MCF7.	47
22. Efecto de los fármacos antineoplásicos sobre la presencia de TWIST en núcleo/citoplasma en células MCF7.	48
23. Cuantificación de TWIST en células MDA-MB-231 expuestas al 5-FU, TAM y 5-FU/TAM.	49
24. Cuantificación de TWIST en los grupos expuestos al 5-FU, TAM y 5-FU/TAM en células MCF7.	50

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, siendo el cáncer de mama el tumor maligno que afecta mayormente a las mujeres a nivel mundial y nacional (OMS, 2014). La mortalidad del cáncer de mama está establecida por la capacidad que tiene la célula tumoral para invadir tejidos cercanos al tumor primario o bien para desplazarse y colonizar órganos o tejidos lejanos, iniciando la formación de un nuevo tumor secundario (Mezo-Junco *et al.*, 2006). El proceso mediante el cual la célula tumoral se vuelve invasiva, es conocido como transición epitelial-mesenquimal (TEM), donde las células con fenotipo epitelial adquieren un fenotipo mesenquimal. Durante esta transformación la célula pierde proteínas de adhesión como es la E-cadherina, lo que le permite aumentar su motilidad favoreciendo la invasión (Jiménez-Salazar *et al.*, 2012). Trabajos anteriores han reportado que el uso de ciertos fármacos antineoplásicos pueden modificar la expresión de proteínas asociadas con la TEM, entre las que se encuentra la proteína TWIST, favoreciendo la invasión y metástasis (Wu *et al.*, 2011). Investigaciones anteriores han demostrado que algunos fármacos como la adriamicina es capaz de incrementar la expresión de TWIST (Li *et al.*, 2009). Por lo anterior es de suma importancia estudiar el efecto de los fármacos utilizados en la actualidad para el tratamiento del cáncer sobre la expresión de proteínas reguladoras de la TEM como lo es TWIST.

El 5-Fluorouracilo (5-FU) y el Tamoxifeno (TAM) son utilizados ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama. El 5-FU se utiliza para cualquier tipo de cáncer de mama, pero el TAM al ser un modulador selectivo del receptor de estrógenos, es utilizado exclusivamente en el tratamiento del cáncer de mama con expresión de receptor a estrógenos (Terán y Teppa, 2005). Sin embargo, el efecto que pueda tener en células no responsivas a estrógenos, no es conocido en su totalidad, por lo que sigue siendo objeto de estudio.

En estudios previos se ha demostrado que el uso del 5-FU y el TAM reducen de manera efectiva la proliferación de células neoplásicas, a través del arresto celular y la inducción de apoptosis (Petrelli *et al.*, 1987; Gao *et al.*, 2014). Además, otros estudios han observado que estos fármacos pueden modificar vías de señalización como son las MAPK, STAT, PI3K/AKT entre otras (Zhao *et al.*, 2008). Se ha descrito en la literatura que la expresión de TWIST está regulada por la expresión de proteínas como p38, JNK (MAPK), STAT3, etc (Hong *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2008). Por lo anterior, es interesante conocer si el 5-FU y el TAM podrían afectar la expresión proteica de TWIST en células RE-negativas y RE-positivas. Este estudio fue realizado *in vitro* utilizando líneas celulares MDA-MB-231 como células RE-negativas y MCF7 como RE-positivas.

## ANTECEDENTES

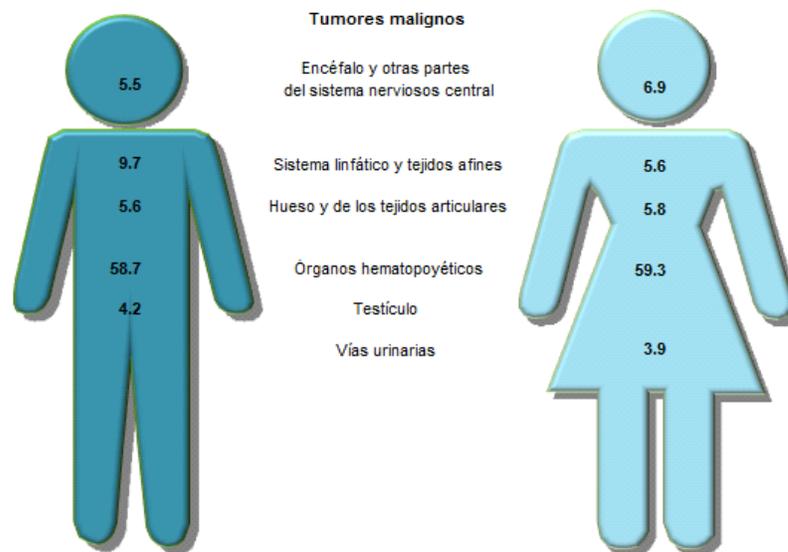
### Estadísticas del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades donde las células neoplásicas proliferan de manera autónoma y adquieren la capacidad de invadir nuevos tejidos a través del sistema sanguíneo o linfático (Meza-Junco *et al.*, 2006). El cáncer es una de las principales causas de defunción en el mundo, principalmente en países en desarrollo. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en su reporte del 2014 estimó que, en el 2012 ésta enfermedad alcanzó los 14.1 millones de nuevos casos por año y 8.2 millones de defunciones relacionadas con cáncer y que en 2 décadas más podría llegar a los 22 millones de nuevos casos anuales. Los cánceres diagnosticados más comúnmente en el mundo fueron el de pulmón (1.8 millones, 13% del total), el de mama (1.7 millones, 11.9%) y el colorectal (1.4 millones, 9.7%). Los cánceres que causaron mayores muertes fueron el de pulmón (1.6 millones, 19.4% del total), hígado (0.8 millones, 9.1%) y estómago (0.7 millones, 8.8%). El cáncer de mama es uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial. En el 2012, 1.7 millones de nuevos casos fueron diagnosticados, además de los 6.7 millones de casos ya existentes en los 5 años previos. La incidencia del cáncer de mama se ha incrementado en un 20% y la mortalidad en un 14% desde el 2008. El cáncer de seno es el tumor maligno que se diagnostica con mayor frecuencia en las mujeres y es la causa más común de muerte entre las mujeres (522,000 muertes en el 2012) a nivel mundial (OMS, 2014)

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se diagnostican 128,000 nuevos casos. En el 2011, el 55.6% de los egresos hospitalarios fueron por tumores malignos, siendo mayor la población infantil-jóvenes (menores de 20 años, 70.6%) que la población adulta (53.2%). En la infancia predominan las neoplasias como la leucemia, siendo la más frecuente la Leucemia Linfocítica Aguda (Figura 1). En la etapa adulta (mayores de 20 años) los tumores malignos difieren por sexo. En el 2011, la principal causa de

morbilidad hospitalaria por cáncer en hombres fueron las neoplasias en órganos digestivos (23.9%), tumores en órganos genitales (12.2%) siendo el de próstata el más frecuente y, por último, los de órganos hematopoyéticos (9.8%). En el caso de las mujeres, el cáncer de mama (29.6%) fue el cáncer con mayor morbilidad, siguiendo las neoplasias en órganos genitales (cuello de útero y útero, 16.7%) y por último los de órganos digestivos (14.3%) (Figura 2). En el 2012, la mayor tasa de mortalidad por tumores malignos en adultos la obtuvo el cáncer en órganos digestivos (33.1 por cada 100,000 habitantes); posteriormente las neoplasias en órganos genitales (15.08/ 100,000); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72/100,000) y de mama (8.13/100,000). La tasa de mortalidad difiere con respecto al sexo, en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte (15.3/100,000) a nivel nacional (Figura 3) (INEGI, 2014).

**Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población menor de 20 años, por principales tumores malignos según sexo 2011**

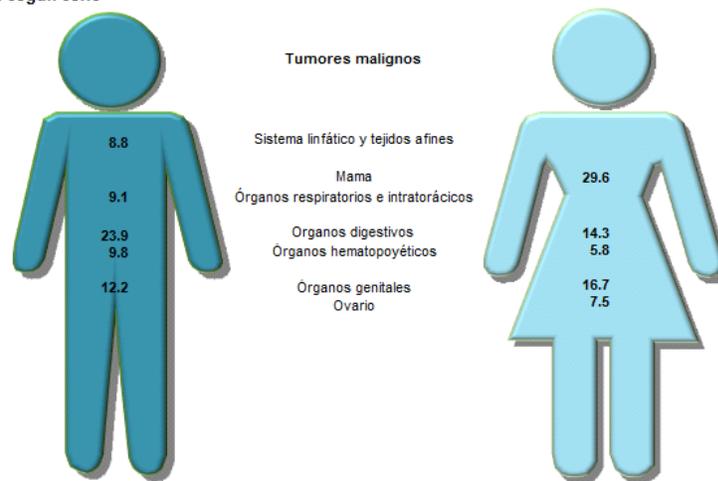


Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C00-C97.

Fuente: SSA (2012). Base de Egresos Hospitalarios 2011. Procesó INEGI.

**Figura 1. Morbilidad hospitalaria por tumores malignos según sexo en población menor de 20 años en México (INEGI, 2014).**

Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo 2011



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C00-C97.  
Fuente: SSA (2012). Base de Egresos Hospitalarios 2011. Proceso INEGI.

Figura 2. Morbilidad hospitalaria en mujeres mayores de 20 años por tumores malignos (INEGI, 2014)

Tasa de mortalidad en población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo 2012

Por 100 mil habitantes para cada sexo

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	33.18	35.04	31.49
Órganos genitales masculinos/femeninos	15.08	18.42	13.43
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.72	15.16	6.68
Mama	8.13	0.15 <sup>a</sup>	15.38
Órganos hematopoyéticos	5.79	6.29	5.34 <sup>b</sup>
Vías urinarias	4.07	5.42	2.85 <sup>b</sup>
Ovario	5.43	NA	5.43

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C15-C26, C30-C39, C50, C51-C58, C60, C61, C63, C64-C68, C88-C95.

<sup>a</sup>Para los hombres, el cáncer de mama no es una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

<sup>b</sup>Para las mujeres, el cáncer en órganos hematopoyéticos y de vías urinarias no son de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

NA No aplicable.

Fuente: INEGI (2013). Estadísticas de Mortalidad. Base de datos; y CONAPO (2013). Proyecciones de la Población de México 2010-2050. Proceso INEGI.

Figura 3. Tasa de mortalidad por tumores malignos en población mayor de 20 años (INEGI, 2014).

## Origen del cáncer

La proliferación autónoma de las células alteradas genéticamente modifica la organización normal del tejido. Esta acumulación de células origina la formación de masas de tejido llamadas tumores que, pueden ser de dos tipos: benignos y malignos. Los tumores benignos (no cancerosos) son células que tienen la capacidad de crecer solo localmente, pueden ser extirpados y generalmente no vuelven a aparecer. Los tumores malignos, son a los que se les llama “cáncer”, porque además de crecer localmente e invadir tejidos cercanos, pueden diseminarse a otros tejidos u órganos del cuerpo, conociéndose a este proceso como metástasis (Figura 4)(INC, 2011).

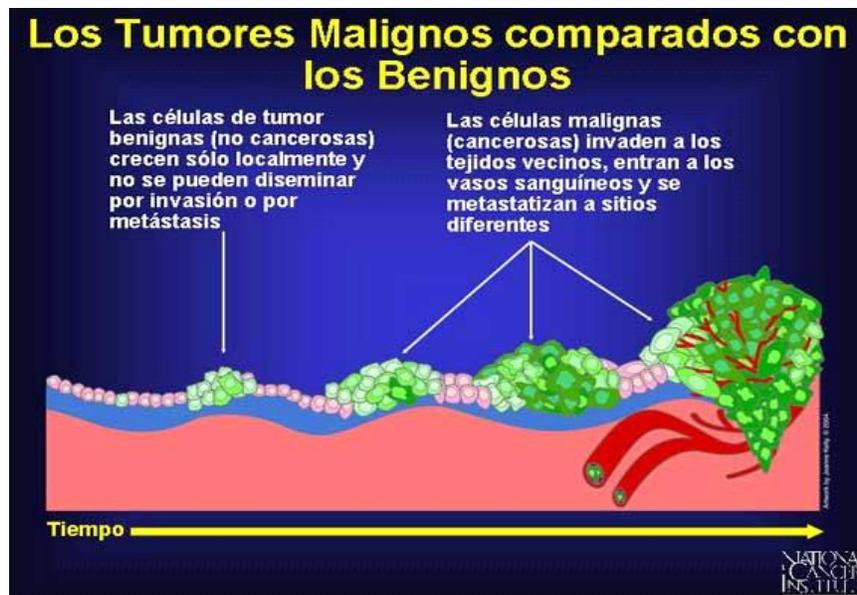
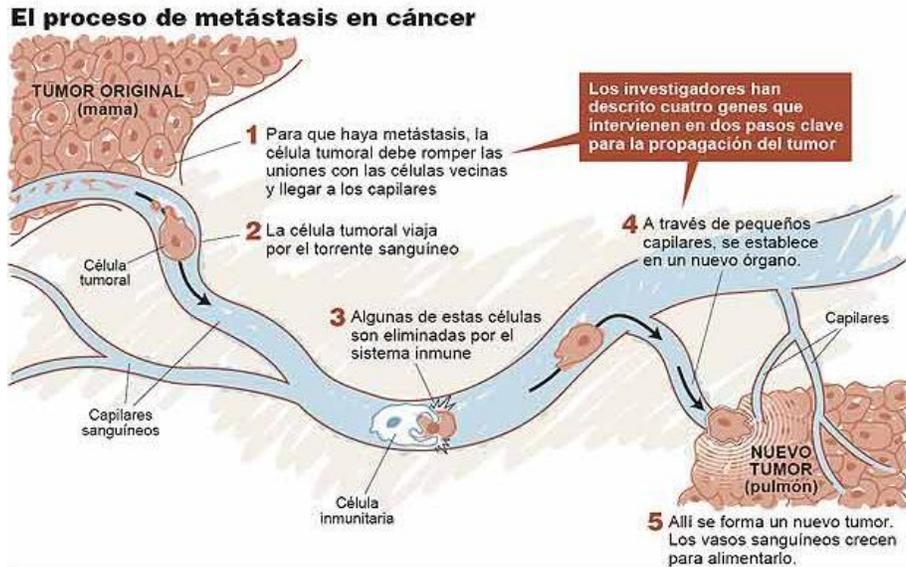


Figura 4. Tipo de tumores. Los tumores benignos crecen localmente sin extenderse a otros sitios. Los tumores malignos tienen la capacidad de invadir tejidos vecinos y los que se encuentran en otras partes del cuerpo (INC, 2014).

El cáncer se desarrolla a partir de células que han sufrido una serie de modificaciones genéticas y han ido acumulando estos daños en el DNA a través del tiempo (Davis y Lin, 2011). Estas modificaciones les permiten sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos de control celular como la apoptosis, proliferación y ciclo celular. Las mutaciones producidas en estas células pueden modificar los mecanismos que se encargan de mantener y reparar el DNA (Meza-Junco *et al.*, 2006). Los genes que se han visto asociados con el desarrollo del cáncer son genes mutados llamados oncogenes y su presencia promueve el desarrollo del cáncer al producir proteínas que estimulan la división celular en exceso sin obedecer los mecanismos de control establecidos, como factores de crecimientos, receptores, enzimas señalizadoras y factores de transcripción (INC, 2011).

### **Metástasis**

Los cánceres son capaces de diseminarse en todo el cuerpo por medio de dos vías: invasión y metástasis. La invasión es la migración y penetración de las células cancerosas en el tejido normal que lo rodea. La metástasis es el proceso por el cual las células cancerosas migran a través del sistema sanguíneo o linfático, hacia tejidos u órganos que se encuentran en una zona distante del tumor primario, donde posteriormente crecerán y proliferarán nuevamente (Flórez, 2004) (Figura 5).



**Figura 5. Proceso de metástasis. Obstáculos que la célula cancerosa debe superar para lograr la metástasis.**

Para entender las bases celulares y moleculares de un tumor metastásico hay que comprender los múltiples procesos biológicos que son controlados por distintos genes y vías de señalización en cada proceso (Cheng *et al.*, 2008).

La metástasis consiste en distintos pasos: a) la migración de las células tumorales del tumor primario a un tejido diferente, b) la invasión y penetración a un tejido vecino a través de la membrana basal y vasos sanguíneos o linfáticos, además de la capacidad migratoria, utilizando enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas que se piensa son críticas en este paso, c) sobrevivir a las condiciones de anoikis (apoptosis de interacción célula-matriz) mientras se separa de la masa tumoral y se encuentra en la circulación. Este proceso requiere el anclaje independiente para sobrevivir que es común en células de cáncer, d) deben existir vasos sanguíneos y linfáticos que lleguen a órganos distantes, e) formación de nódulos micrometastásicos, f) adaptación y reprogramación del estroma circundante, reversión de la transición epitelio-mesénquima, rescatar la naturaleza epitelial y la formación de macrometástasis (Cheng *et al.*, 2008).

La activación de genes que participan en los procesos neoplásicos (entre los que se incluyen los activados por vías de señalización, así como los cambios en la transición epitelial-mesenquimal, migración e invasión) promueven la invasión de las células cancerosas de otros tejidos dando como consecuencia la metástasis. Para los diversos pasos de la metástasis es necesario encender genes y vías de señalización específicas, incluyendo la transición epitelial-mesenquimal, migración e invasión y esto subsecuentemente puede ser inactivado o remplazado por un nuevo espectro de genes y vías de señalización para el establecimiento de la metástasis en un nuevo órgano (Geiger y Peeper, 2009).

En ensayos con sistemas funcionales y modelos adecuados se han logrado identificar genes y proteínas importantes para el desarrollo de la metástasis. Cheng *et al.*, (2007) identificó la sobreexpresión de RhoC en células cancerosas de melanoma temprano y a AKT2 en líneas celulares altamente invasivas MCF7-14 y MDA-MB-435-14, en comparación con células bajamente invasivas MCF7 y MDA-MB-435. Estudios similares reportaron en células MCF7-14 y MDA-MB-435-14, a STAT3, TWIST y AKT2 como un grupo funcional para la regulación central de propiedades oncogénicas de células cancerosas (Cheng *et al.*, 2008).

### **Tipos de cáncer**

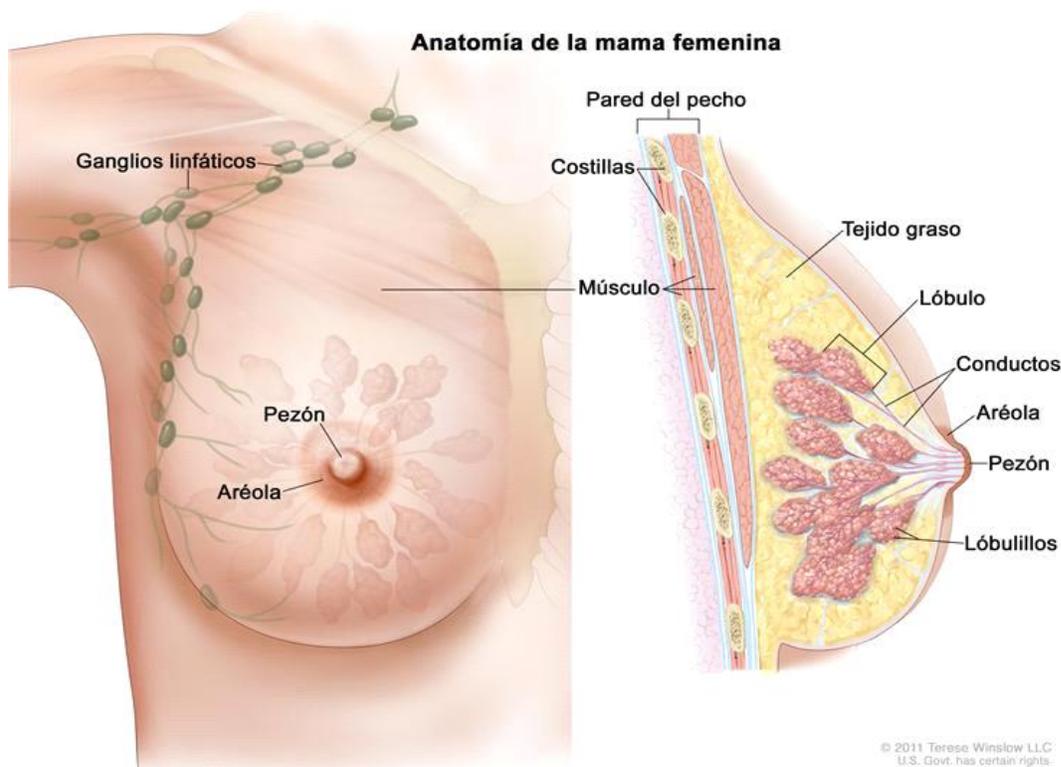
El cáncer se clasifica dependiendo del órgano en el que se origina, obteniendo más de 100 tipos distintos de cáncer en el mundo. Se han formado distintas categorías, como los carcinomas, que son los cánceres más comunes los cuales se producen en la piel o en tejidos que recubren las superficies internas y externas del cuerpo, como el cáncer de pulmón, seno y colon. Otra categoría son los sarcomas, que se inician en tejidos de soporte como en el hueso, cartílago, grasa, músculo y vasos sanguíneos. Las leucemias son cánceres que se producen en la médula ósea a partir de células inmaduras de la sangre. Los linfomas y mielomas comienzan en los ganglios linfáticos y en el

sistema inmunológico. Los cánceres del sistema nervioso central se desarrollan en el cerebro y médula espinal (INC, 2011).

### **Estructura de la glándula mamaria**

La glándula mamaria está compuesta por 15 a 20 sistemas principales de conductos llamados lóbulos glandulares, los cuales tienen funcionalidad independiente. Cada lóbulo se encuentra dividido en secciones más pequeñas llamadas lobulillos, esos terminan en forma de bulbos minúsculos que son los encargados de producir leche (Latarjet y Ruiz, 2005). Los lóbulos, los lobulillos y los bulbos se encuentran interconectados por pequeños tubos llamados conductos (Figura 6) (Guyton y Hall, 2006).

Los vasos linfáticos tienen su origen en redes cutáneas, glandulares y en los linfáticos de los conductos galactóforos. Son los encargados de transportar la linfa hacia los ganglios linfáticos, los cuales se encargan de filtrar sustancias de la linfa, ayudando a combatir infecciones y enfermedades. Los ganglios linfáticos se encuentran en todo el cuerpo, así como en las axilas y cerca de la mama (Figura 6). El conocer la estructura de la mama es importante porque los tipos de cáncer de mama más comunes tienen su origen en éstas estructuras por ejemplo, el carcinoma ductal inicia en los conductos, el cáncer lobular empieza en los lóbulos o los lobulillos y se encuentra con mayor frecuencia en ambas mamas que otros tipos de cáncer de mama (INC, 2011).



**Figura 6. Anatomía de la mama femenina. Se muestran el pezón y la aréola en el exterior de la mama. Se observan también los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes del interior de la mama (INC, 2011)**

### **Clasificación del cáncer de mama**

El cáncer de mama en una clasificación general se divide en cáncer de mama heredable y esporádico. El cáncer de mama basado en la predisposición genética, se presenta en un 5% de los casos, por mutaciones que incrementan la susceptibilidad a los defectos genéticos en proteínas que intervienen en mecanismos de respuesta al daño celular, presentándose en varios miembros de la familia a través de las generaciones. El cáncer esporádico se presenta en un 95% de los casos a una edad superior a los 55 años generalmente (Díaz- Faes y Ruibal, 2006).

Existe otro tipo de clasificación basado en su perfil de expresión genético: los cánceres que presentan expresión de receptores de estrógenos (RE+) y los que no lo expresan (RE-). Los RE+ se subdividen en luminal A, B y C. Los cánceres RE- se clasifican en HER2, similar al tipo basal y tipo normal. Los cánceres que presentan receptores de estrógeno (RE+) y/o que expresan receptores de progesterona (RP+) y pérdida de 16q, son de bajo grado, en cambio los negativos para RE y RP, y que además, tienen sobreexpresión o amplificación de HER2, son cánceres de alto grado (Zepeda- Castilla *et al.*, 2008).

Los tumores receptores estrogénicos positivos del tipo luminal presentan receptores a hormonas, a citoqueratinas luminales, a receptores a estrógenos y a genes asociados a su activación como LIV1 y CCND1. Alrededor del 20% de los cánceres luminales presentan mutaciones en p53 y generalmente son de grado 1. El subtipo luminal A presenta un alta expresión de genes asociados a receptores de estrógenos y baja expresión de genes relacionados con proliferación celular, este subtipo es el más frecuente representando el 67% de los cánceres. Los tumores luminales B se presentan en cánceres de mayor grado. Estos subtipos son tratados con hormonoterapia y se ha encontrado que la respuesta a la quimioterapia es baja (Perou *et al.*, 2000; Weigelt *et al.*, 2003).

El subtipo HER2 (RE-) muestra una baja expresión de receptores a estrógenos y genes relacionados. Entre el 40 y 80% de los tumores presentan mutaciones en p53 y generalmente son de grado 3. La sobreexpresión de HER2 en las células tumorales implica un pobre pronóstico y muestra una mayor sensibilidad a antraciclinas y taxanos. El HER2 tiene blancos moleculares, el anticuerpo monoclonal anti-HER2: trastuzumab. El subtipo basal se denomina así porque expresa proteínas similares a las presentes en las células epiteliales basales y mioepiteliales normales del tejido mamario. El basal se caracteriza por la ausencia en la expresión de RE y genes asociados, expresión disminuida de HER2, un aumento en la expresión de citoqueratinas 5, 5, y 17, y expresa genes asociados a la proliferación celular. Otro nombre de este subtipos es “triple negativo” por no expresar RE, RP ni HER2 (Zepeda-Castilla *et al.*, 2008). Este

subtipo de tumores ha sido asociado con mutaciones en BCRA 1 (Nielsen *et al.*, 2004) y suelen ser muy agresivos, presentándose en tumores de alto grado y con mutaciones en p53 con una incidencia del 20% de los casos (Carey *et al.* 2004). Los cánceres triples negativos no son susceptibles a tratamientos convencionales, pero sí muestran una alta sensibilidad a la quimioterapia (Zepeda-Castilla *et al.*, 2008).

El cáncer de mama por predisposición genética, se presenta por alteraciones genéticas que incrementan la susceptibilidad a defectos en genes como BRCA1, BRCA2 (participan en la reparación del DNA dañado), p53 (checkpoint en el ciclo celular), PTEN (bloquea la progresión del ciclo celular en G1 y participa en la reparación del DNA dañado) o algunos otros supresores de tumores (Davis y Lin, 2011). Éstos genes participan en la respuesta celular cuando hay daño al DNA e inducen la muerte celular como sistema de protección para eliminar células potencialmente peligrosas (Imyanitov *et al.*, 2004). También pueden alterarse algunos oncogenes como son ras, myc, fos y c-fms, por mutaciones puntuales donde un aminoácido específico de la proteína es cambiado. Otro grupo de oncogenes es el conformado por un subgrupo de factores de crecimiento como c-sis, que produce el factor de crecimiento derivado de plaquetas; hst/K-fgf que produce el factor de crecimiento de angiogénesis y el int-2 que produce otros factores de crecimiento. Los receptores de factores de crecimiento forman otra clase de proto-oncogenes entre los que se encuentran erb-B1 y erb-B2. Cuando el receptor está mutado lleva a su activación constitutiva en ausencia del ligando. También han sido considerados como grupos de oncogenes los que componen los transductores de señales que participan en la señalización de la membrana celular hacia el núcleo. Estos oncogenes son protein-cinasas citoplasmáticas como raf-1, mos, y proteínas unidas a GTP como N-ras. Los oncogenes unidos a GTP forman un pequeño subgrupo de proteínas que se unen a guanina (proteínas G), responsables de la transmisión de señales de ligandos de superficie celular hacia efectores como adenilato ciclasa o fosfolipasa C. Las proteínas G como los oncogenes de la misma familia son

activadas cuando la cascada de señalización se amplifica o bien cuando mutan en sitios puntuales alterando la unión GTP o la acción GTPasa, induciendo la estimulación constante de enzimas efectoras. Existe otro grupo de oncogenes que son reguladores transcripcionales, como son *erbA-1*, *erbA-2*, *fos*, *jun*, *myb*, *c-myc*, *RARa*. Estos genes tienen diferentes dominios funcionales que regulan la unión de DNA y las interacciones proteína-proteína y al expresarse, responden a las señales de proliferación/diferenciación. Los genes supresores de tumores, son genes que cuando se mutan favorecen el desarrollo del cáncer. Entre estos genes se encuentra el gen *Rb*, cuya proteína al perder su función se asocia a la aparición de varios tipos de cánceres como de próstata, mama y pulmón. El gen *Rb* es un supresor de tumores y es el blanco de inactivación de los productos proteínicos de los virus tumorales de DNA como el papiloma virus y el adenovirus E1A durante la oncogénesis. Otro gen supresor de tumores importante es el gen *p53*; la pérdida de la función se ve implicada en el desarrollo de cáncer de mama, colon, pulmón y cerebro. El gen *Bcl-2* es un gen regulador de la muerte celular programada, la proteína sintetizada a partir de este gen tiene función en la membrana celular de la mitocondria, prolongando la vida de la célula individual, evitando su apoptosis, permitiendo la activación de proto-oncogenes o la pérdida de función de genes supresores de tumores (Meza-Junco *et al.*, 2006).

## **TWIST**

El gen *TWIST* codifica a una proteína que lleva el mismo nombre y funciona como un factor de transcripción del tipo hélice-loop-hélice (bHLH) y su actividad de transactivación la lleva a cabo mediante la formación de dímeros. El gen *TWIST* fue descubierto como un gen necesario para la formación de patrones mesodérmicos durante el desarrollo temprano de *Drosophila Melanogaster*, descubriéndose posteriormente en vertebrados realizando la misma función (Stasinopoulos *et al.*, 2005).

En humanos existen 2 isoformas de la proteína: TWIST1 y TWIST2, ambas son las principales reguladoras de la embriogénesis. Estas proteínas muestran más de un 90% de identidad entre ellas en los dominios bHLH y en el carboxilo-terminal y son estructural y funcionalmente caracterizadas por tener un dominio conservado con un pequeño número de aminoácidos adyacentes a dos alfa-hélices anfipáticas separadas por un *loop* interhélice. Las alfa hélices, mediante la dimerización con un segundo factor bHLH, llevan a la formación de un dominio de unión. El DNA bipartita se une específicamente a una secuencia hexonucleótida (CANNTG) referidas como cajas E, las cuales han sido encontradas como elementos de regulación de muchos genes específicos. Consistentemente las proteínas bHLH, son factores de transcripción que actúan en varios procesos de diferenciación como reguladores positivos o negativos y juegan papeles importantes en el desarrollo de diferentes eventos como neurogénesis y miogénesis (Puisieux *et al.*, 2006).

### **Papel de TWIST en la célula sana**

Las dos isoformas de TWIST (1 y 2) tienen múltiples funciones. Estudios de sobreexpresión en cultivos de tejidos demostraron que TWIST 1 y 2 actúan como inhibidores de la diferenciación de músculo y hueso. Además, la anulación de la expresión de Twist 1 durante la embriogénesis de ratones provoca anomalías en la mesénquima de la cabeza, que resulta en la falla del cierre del tubo neural craneal, así como en la somitogénesis y crecimiento de extremidades. La inhibición de la expresión de TWIST 1 y 2 causa la muerte embrionaria y perinatal de ratones. Las proteínas TWIST también han sido asociadas con la diferenciación de múltiples líneas celulares como músculo, cartílago y células osteogénicas (Sosic y Olson, 2003).

En humanos una mutación en la secuencia de TWIST 1 en líneas germinales lleva a la haploinsuficiencia, la cual ha ido identificada en el Síndrome de Saethre-Chotzen (SCS), el cual se caracteriza por anomalías en las

extremidades, rostro, cabeza asimétrica y fusión prematura de las suturas craneales. TWIST junto a su importante papel en la diferenciación celular también participa en la apoptosis. La haploinsuficiencia de TWIST 1 en el SCS induce la apoptosis de osteoblastos y la inactivación de la homocigosis de TWIST en modelos animales, induce la apoptosis masiva durante el desarrollo mamífero (Puisieux *et al.*, 2006). Las células TWIST2 *-/-* también muestran sensibilidad a la apoptosis inducida por citocinas (Sosic y Olson, 2003). Otros estudios han mostrado que TWIST1 interfiere con la vía de señalización ARF/p53 con lo que bloquea la apoptosis inducida por c-myc (Maestro *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha observado que diferentes tipos de mutaciones en la secuencia de TWIST modifican su capacidad para formar dímeros, su capacidad para traslocarse al núcleo (donde lleva a cabo su función) y su capacidad de unirse al DNA (El Ghouzzi *et al.*, 2000)

Recientes estudios han sugerido que TWIST está involucrado en varios procesos que favorecen el desarrollo del cáncer.

## **TWIST y cáncer**

La proteína TWIST se ha encontrado elevada en distintos tipos de cánceres como son el de mama, próstata, hígado, gástrico, cervical (Rosivatz *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004; Kwok *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2009), cáncer colorrectal (Valdés *et al.*, 2009), así como en el cáncer de cuello y cabeza (Ou *et al.*, 2008).

Los altos niveles de TWIST han sido demostrados en varios estudios como en el realizado por Watson *et al.* (2007) quienes observaron con la técnica de Western blot (WB), una intensa presencia de TWIST en las micrometástasis en médula ósea de pacientes con cáncer de mama. Yang *et al.* (2004) reportaron una

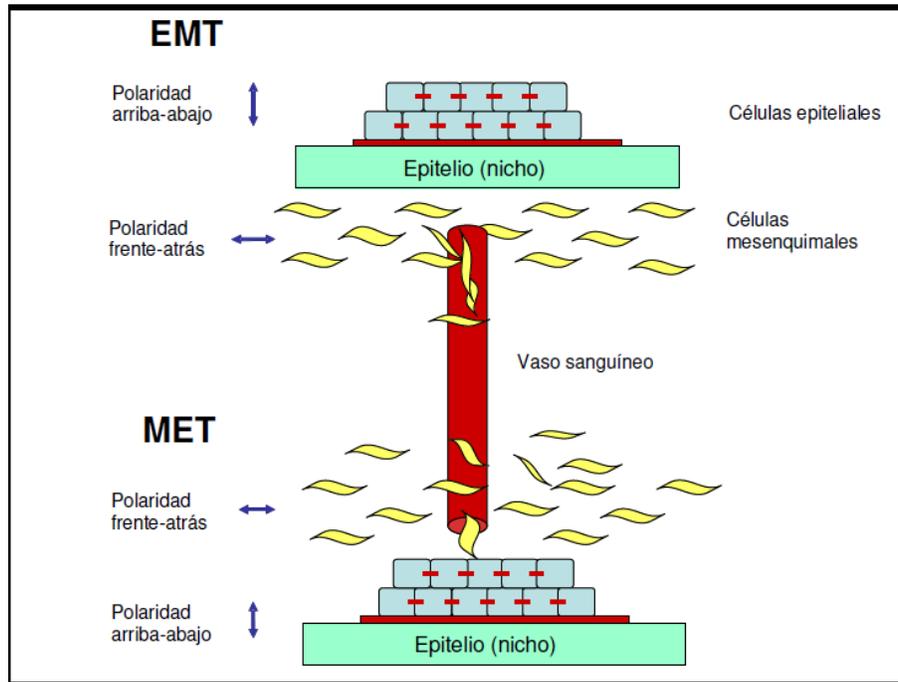
sobreexpresión de TWIST en tejidos de mujeres que padecían cáncer de mama lobular. En el estudio realizado por Gort *et al.* (2008) se demostró por ICQ y WB una elevación de la proteína en tejido canceroso en comparación con tejido no neoplásico de cáncer de mama.

En estudios realizados por Fackler *et al.* (2003) se observó por la técnica de PCR, que el gen *TWIST* se encuentra poco metilado en cánceres de mama invasivo lobular y ductal, mostrando que este gen está mayormente activo. Contrariamente, los estudios realizados por Wu *et al.* (2008) en tejidos post-mortem de pacientes que tuvieron cáncer de mama, muestran una hipermetilación del promotor de *TWIST* tanto en tumores primarios como en metástasis, mostrando una mayor actividad de esta proteína. Por otro lado, Gort *et al.* (2008) encontraron que la metilación del promotor de Twist es mayor en células de tejido maligno que en tejido normal de mama y que el número de células que presentaron TWIST fue mayor en tejido cancerosos que en el sano, sin embargo, no encontraron correlación entre la metilación del promotor con el nivel de proteínas o la expresión del RNA.

### **TWIST y la transición epitelial-mesenquimal**

La transición epitelial-mesenquimal (TEM) es un proceso mediante el cual las células adquieren características mesenquimales durante el desarrollo del embrión. Además, la TEM tiene una participación muy importante durante la carcinogénesis, metástasis y recurrencia del tumor. Esta transformación involucra la disminución de la adhesión célula-célula, pérdida de la polaridad, aumento en la movilidad e invasividad y resistencia a la apoptosis (Figura 7). Para que se lleve a cabo este proceso es necesario la represión de marcadores epiteliales como E-cadherina, placoglobina y desmoplakina, así como la activación de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina y N-cadherina (Jiménez-Salazar *et al.*, 2012). Distintos estudios han revelado la participación de

factores de transcripción como Snail, Slug, Zeb1, SIP1, E47 y TWIST1 en la regulación del TEM (Wu *et al.*, 2011).



**Figura 7. Características de la transición epitelial-mesenquimal.**

Martin *et al.* (2005) encontraron una relación de TWIST con la metástasis, ya que participa en migración celular, regulación del ciclo celular y apoptosis, así como la regulación de las E-cadherinas. Vesuna *et al.* (2008) encontraron por inmunoblot que TWIST reprime la transcripción del gen de E-cadherina favoreciendo la migración celular en células de cáncer de mama MCF-7 y Hs578.

Qin *et al.* (2009) observó en ratones con cáncer de mama, que al aumentar la expresión de TWIST disminuye la expresión de E-cadherinas

umentando la invasión celular y la metástasis. Otros estudios señalan, que la capacidad de las proteínas codificadas por TWIST1 para suprimir la expresión de E-cadherina es fundamental en los procesos que implican la migración celular (Lo *et al.*, 2007). Matsuo *et al.* (2009) encontraron una fuerte expresión de TWIST en células de cáncer de hígado relacionándolo con la motilidad celular al demostrar que al inhibir TWIST se disminuye la movilidad de la célula.

En células cancerosas se ha demostrado que TWIST induce la migración celular favoreciendo la metástasis, al darle la capacidad a las células de iniciar la transición epitelial-mesenquimal (Kang y Massagué, 2004). Además, TWIST participa en la expresión del gen y en la síntesis de la proteína Ras, que junto con ErbB2 inducen la TEM de las células epiteliales favoreciendo la metástasis. En la investigación referida a la inducción de la TEM, se reportó que dicha transición inmortaliza células epiteliales mamarias humanas por expresión de TWIST y otras proteínas, resultando en la producción de células similares a las células madre, que a su vez, fueron capaces de generar células madre para el cáncer (Sánchez-García, 2009). Li y Zhou (2011) encontraron sobreexpresión de TWIST en células HeLa y MCF-7 relacionándolo con cambios morfológicos asociados a la TEM. En células MKN28 de carcinoma gástrico la sobreexpresión de TWIST aumenta el número de nódulos cancerosos en la cavidad abdominal e hígado y al inhibirse TWIST disminuye la invasividad de las células (Luo *et al.*, 2008). Además, Smit *et al.* (2009) observaron que la inhibición de TWIST mediante RNA interferente bloqueó la transformación epitelial-mesenquimal y el crecimiento del tumor.

En la línea celular MCF-7 de cáncer de mama se ha observado sobreexpresión de TWIST al cambiar la morfología de la célula a la de un fibroblasto y promoción de la TEM, lo cual es necesario para la transformación de las células en invasivas (Mironchik *et al.*, 2005). Cheng *et al.*, (2007) demostraron que dicho factor de transcripción funciona como un regulador de la metástasis, al

encontrar en células de cáncer de mama una alta expresión de genes que participan en la invasión de células malignas.

Los elevados niveles de las proteínas implicadas en la TEM, incluyendo TWIST, han sido asociados con un estadio avanzado del tumor y un mal pronóstico en una variedad de tipos de cáncer (Cheng *et al.*, 2008). Shibata *et al.*, (2008) encontraron en tejidos malignos cervicales pacientes con cáncer cervical, un 55% de casos positivos para la expresión de TWIST, lo cual fue correlacionado con un pobre diagnóstico y baja supervivencia. La presencia de TWIST en conjunto con la proteína ZEB1 (factor de transcripción que induce la TEM) en el núcleo celular, se encontró en un 75% de los casos con cáncer de mama y la expresión nuclear de estas factores de transcripción está asociada con pobres resultados diagnósticos (Soini *et al.*, 2011).

### **TWIST y células madre del cáncer**

Las células madre del cáncer es una teoría propuesta recientemente para explicar la resistencia a la radioterapia y quimioterapia convencional que presentan las células cancerosas. Las células madre son un pequeño porcentaje de células que se encuentran localizadas en un tumor, poseen la capacidad de autorenovarse y propiedades de células madre. Algunas características de las células madre son, la formación de esferas “*in vitro*”, resistencia a la quimioterapia o a la radiación y la habilidad de iniciar tumores “*in vivo*” (Wu *et al.*, 2011).

Vesuna *et al.*, (2009) observaron que la presencia de TWIST en células de cáncer de mama promueve la generación de células con fenotipo de células madre independientemente de la forma en la que induce la TEM y al inhibir a TWIST con RNA interferente se revierte el fenotipo de células madre.

## Fármacos antineoplásicos

Entre los tratamientos antineoplásicos se encuentran los métodos quirúrgicos, radioterapias y el uso de fármacos. La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad (Flórez, 2004).

Los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer pueden interactuar con el material genético mediante interacciones covalentes y/o no covalentes. Todas estas interacciones pueden modular la funcionalidad del DNA. Algunos de los modos de interacción no covalentes se clasifican en: a) *Interacciones electrostáticas externas* las cuales se producen típicamente por iones que reconocen la forma del DNA y básicamente la atmósfera iónica generada por los fosfatos, b) *Unión a los surcos*, que es una unión mucho más específica, la cual suele suceder en el surco estrecho del DNA y en el ancho del RNA, c) *Intercalaciones*, en donde la interacción se da por la abertura del DNA y la disposición de la droga total o parcialmente entre un par de bases. Muchas de las drogas utilizadas combinan varios modos de unión por ejemplo intercalación y unión al surco menor. Los fármacos muestran una mayor especificidad por el DNA de células tumorales, las *azirinas* como la mitomicina C que requieren de biotransformarse para ser activa y así unirse covalentemente al DNA. Las antramycinas pueden actuar uniéndose al surco menor o bien perder metanol y formar aductos, las *Spyrocyclopropanos* se unen covalentemente al N3 de adeninas. Los *cleavagers* son fármacos que son capaces de romper la estructura covalente del DNA (San Miguel *et al.*, 2004).

Los fármacos provocan alteraciones en la cantidad de proteínas que intervienen en la regulación de la proliferación y ciclo celular, Balín *et al.*, (2008) observaron en líneas celulares de cáncer de colon HCT-8 y HCT-116 que el oxaliplatino forma aductos de DNA-platino lo cual fue asociado a la disminución de la enzima de reparación ERCC1 a nivel de RNAm y proteína. En otro estudio

realizado por Pang *et al.*, (2008) se mostró que el complejo dimetilcantaridina-platino regula la expresión de genes involucrados en la síntesis, reparación del DNA y regulación del ciclo celular en la línea celular HCT-116 de cáncer de colon determinado por microarreglos.

En la investigación realizada por Guichard *et al.*, (2001) se observó que el irinotecan permite la permanencia de los aductos DNA-Pt en las líneas celulares HCT-8, debido al impacto sobre las enzimas de reparación o su efecto indirecto sobre la topoisomerasa I. El oxaliplatino y la gefitiniba al combinarse tienen un efecto sinérgico ocasionando un daño mayor en el ADN al mantenerse más tiempo unido el platino al ADN. Estudios adicionales demostraron que la gefitiniba incrementa el efecto del oxaliplatino al mantener e incrementar la apoptosis inducida por éste, en líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y LoVo por medio de técnicas de WB, espectrometría de masas y ELISA (Xu *et al.*, 2003). En el estudio realizado por Pang *et al.*, (2007) se evaluó la capacidad de inducir daño al DNA en células de cáncer colorectal HCT116 por ensayo cometa alcalino de la dimetilcantaridina-platino, del oxaliplatino y del carboplatino mostrando que la dimetilcantaridina causa mayores lesiones al DNA que las otras dos sustancias. Por otro lado el oxaliplatino induce apoptosis y activa las caspasas 3, 8, y 9, incrementa la despolarización de la membrana mitocondrial y los niveles del receptor CD95 y su ligando en líneas celulares HCT15 de cáncer de colon humano evaluadas por marcaje de DNA y citometría de flujo (Marchetti *et al.*, 2004). En el estudio realizado por Wang *et al.*, (2004), se reportó una asociación entre la sobreexpresión de TWIST y la resistencia al taxol y a la vincristina en la línea celular HNE1-T3 de cáncer nasofaríngeo, llevando al arresto celular y provocando la muerte.

Entre los fármacos antineoplásicos más utilizados en la quimioterapia se encuentran las antraciclinas, doxorubicina, ciclofosfamida, 5-FU (Masuda *et al.*, 2008). Dentro de la terapia hormonal el TAM y el Raloxifeno son los más utilizados en el tratamiento del cáncer de mama (Veronesi *et al.*, 2002).

## 5-Fluorouracilo

El 5-FU es un fármaco antineoplásico del tipo antimetabolito el cual interrumpe la síntesis y la reparación del DNA y el RNA, ocasionando la muerte celular (Figura 8). Este fármaco utiliza el folato como cofactor, convirtiéndose el 5-FU en nucleótidos activos como el monofosfato de fluorodeoxiuridina, el cual inhibe la enzima timidilato sintasa con lo cual se disminuye la síntesis de timidina y su disponibilidad para la síntesis de DNA. Esto provoca rompimientos en las cadenas de DNA. Otro metabolito del 5-FU es la fluoridina trifosfato, la cual por su similitud al uracilo actúa como un falso nucleótido incorporándose al RNA durante su formación inhibiendo, de esta forma, la síntesis de proteínas. Como consecuencia, a través del tiempo, estos daños conllevan a la muerte celular y la detención de la progresión de la enfermedad (Matuo *et al.*, 2009; Hirsch y Zafar, 2011).

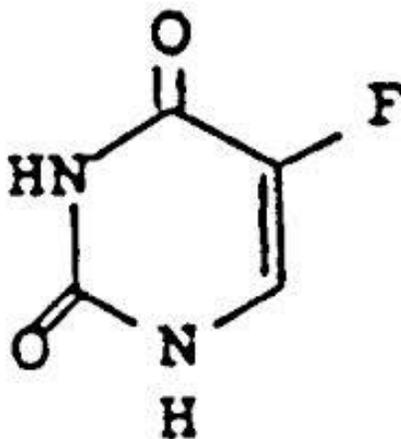


Figura 8. Estructura del 5-FU.

El 5-FU es utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer como es el de mama y colon, algunas veces en combinación con otros fármacos. La presencia de este fármaco modifica la síntesis de proteínas que intervienen en el

desarrollo del cáncer, mostrando mejorías en la supervivencia libre de enfermedad comparados con pacientes no tratados con este agente (Bertagnolli *et al.*, 2009).

Además del mecanismo de acción conocido del 5-FU, se tienen reportes que este fármaco tiene efecto sobre otras proteínas asociadas con el cáncer. En la investigación realizada por Zhao *et al.*, (2008) observaron con WB e inmunohistoquímica (IHQ), que el 5-FU incrementa la presencia del factor intrínseco antiangiogénico trombospondina-1 de forma dosis-dependiente en células KM12C de carcinoma de colon humano y en células MCF7 de cáncer de mama humano. Además, también se observó que induce la fosforilación de p38 MAPK y la proteína 27 de choque térmico. En pacientes con cáncer gástrico tratados con 5-FU-oxaliplatino y ácido folínico se observó una alteración en la expresión de la timidilato sintasa (TS) (Wei *et al.*, 2008).

La exposición de células de colon HT29 al 5-FU (50 y 100  $\mu$ M) en combinación con raltritexed (50 y 100 nM) provocó la síntesis de la proteína p53 y p21 en células con p53 nativa, pero no en células con p53 mutante (Peters *et al.*, 2000). Estudios realizados en células leucémicas Jurkat, se observó que el 5-FU es capaz de inducir PARP y a su vez disminuir la expresión de la proteína antiapoptótica MCL-1L, favoreciendo la apoptosis (Aresvick *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay datos contraversiales como son los obtenidos en el estudio realizado por Li *et al.*, (2009) donde encontraron que la adriamicina promueve la apoptosis y al mismo tiempo la TEM *in vivo e in vitro* por vía TWIST, al observar que la depleción de TWIST detiene la transformación mesenquimal, la invasión y disminuye la resistencia a fármacos.

El factor de transcripción TWIST está elevado en células cancerosas por lo que es importante conocer si se ve modificado con los tratamientos antineoplásicos.

## Tamoxifeno

El TAM es un modulador selectivo de los receptores a estrógenos (SERMs) utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama avanzado. Fue sintetizado en los años de 1960 al encontrarse un efecto antiproliferativo en el tejido mamario. El TAM es un fármaco derivado del trifeniletileno que compite con los estrógenos por la unión al receptor (Figura 9). La afinidad de este SERM por el receptor a estrógenos es de 100 a 1000 veces mayor que el propio estradiol, por lo que el TAM coexiste con el estradiol en concentraciones mucho mayores. Sus principales metabolitos son el Nesmetiltamoxifeno y el *trans*-4-hidroxitamoxifeno, que poseen una mayor afinidad por los receptores estrogénicos que el TAM sin metabolizar. Su vida media alcanza varias semanas a una dosis de 20 mg al día y permanece en los tejidos durante varios meses una vez finalizado el tratamiento. El TAM unido al Receptor de estrógenos (RE) se une al ADN, sin embargo, su acción agonista o antagonista de los estrógenos se define mediante la activación de elementos promotores que dependen del tipo celular donde se encuentren.

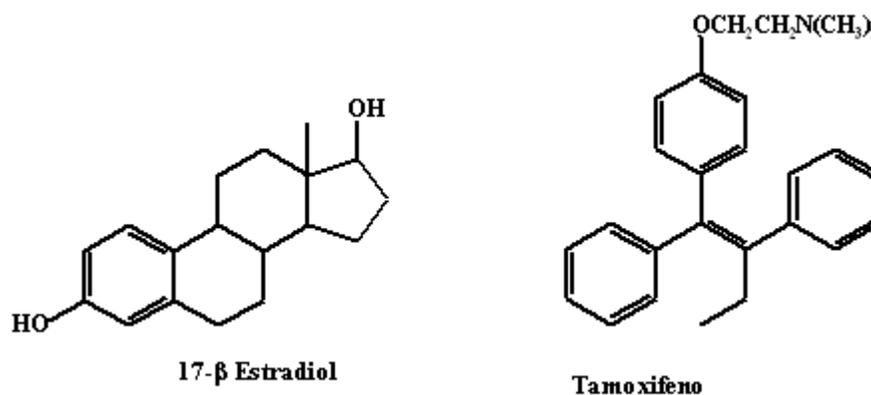


Figura 9. Comparación de la estructura del estradiol y el TAM (García y Aceves, 2005).

Específicamente, el mecanismo de acción del TAM es bloquear la actividad del dominio de activación AF-2 del RE, por lo que se manifestará como un antagonista de los estrógenos en células donde la activación de los genes requieran sólo al AF-2. No obstante, en las células donde el AF-1 sea el activador dominante, el TAM se comportará como un agonista parcial. Por lo anterior podría suponerse que el TAM tendrá una mejor respuesta en los tumores que presenten mayor cantidad de receptores estrogénicos beta (RE  $\beta$  positivos) (Terán y Teppa, 2005).

Estudios previos han mostrado que el TAM induce la unión de correpresores a los promotores génicos en las células mamarias, sin embargo, en células del endometrio estimula el reclutamiento de coactivadores (Shang y Brown, 2002). Para que la unión de proteínas coactivadoras se efectúe es necesario la acetilación de las histonas. El RE  $\beta$  carece de una porción larga del dominio F carboxilo terminal, la cual es necesaria para que se lleve a cabo el efecto agonista del TAM (Montano *et al.*, 1995). Otros estudios, mediante cristalografía han mostrado que el TAM puede actuar como antagonista estrogénico, compitiendo con el estradiol en su unión al receptor estrogénico e induciendo cambios conformacionales que bloquean la interacción del complejo E/RE con las proteínas coactivadoras (Sang y Brown, 2002), sin embargo, el TAM tiene efectos agonistas en la mayor parte de los tejidos.

El TAM es utilizado de manera frecuente en el tratamiento del cáncer de mama positivo a RE y con metástasis, en la terapia del cáncer de mama temprano, así como en la prevención en mujeres con riesgo elevado para cáncer de mama y en las mujeres con antecedentes de familiares con cáncer de mama antes de los 40 años, y cáncer *in situ* o con hiperplasia atípica. Se ha encontrado que el TAM tiene un efecto protector en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama con tumores RE-positivos a diferencia con las de bajo riesgo (Veronesi *et al.*, 2002). En otro estudio se demostró que el TAM es capaz de disminuir el

cáncer de mama invasivo y no invasivo en un 49% en mujeres con riesgo de cáncer, con una dosis de 20 mg por día durante 5 años (Fisher *et al.*, 1998)

En un estudio adicional, la administración de una dosis de 20 mg por día de TAM durante 5 años en mujeres con riesgo de cáncer de mama, mostró la capacidad de reducir en un 25% los casos de cáncer de mama invasivo en combinación con la quimioprevención (IBIS-1, 2002). Estudios posteriores, reportaron que el TAM reduce en un 38% la incidencia del cáncer de mama positivo a RE (Cuzick *et al.*, 2003).

### **Farmacocinética del Tamoxifeno**

El TAM tiene una biodisponibilidad del 100% y el sistema enzimático del citocromo P450 lo metaboliza (Figura 10). En general, todos los SERMs se unen a las proteínas plasmáticas en al menos un 95% y tienen tiempos de vida media prolongados desde 27.7 horas hasta siete días. El TAM en su mayoría, se elimina a través de la vía hepática y pueden interactuar con otros medicamentos, como warfarina, inhibidores de la aromatasa, esteroides, rifampicina y colestiramina (Terán y Teppa, 2005).

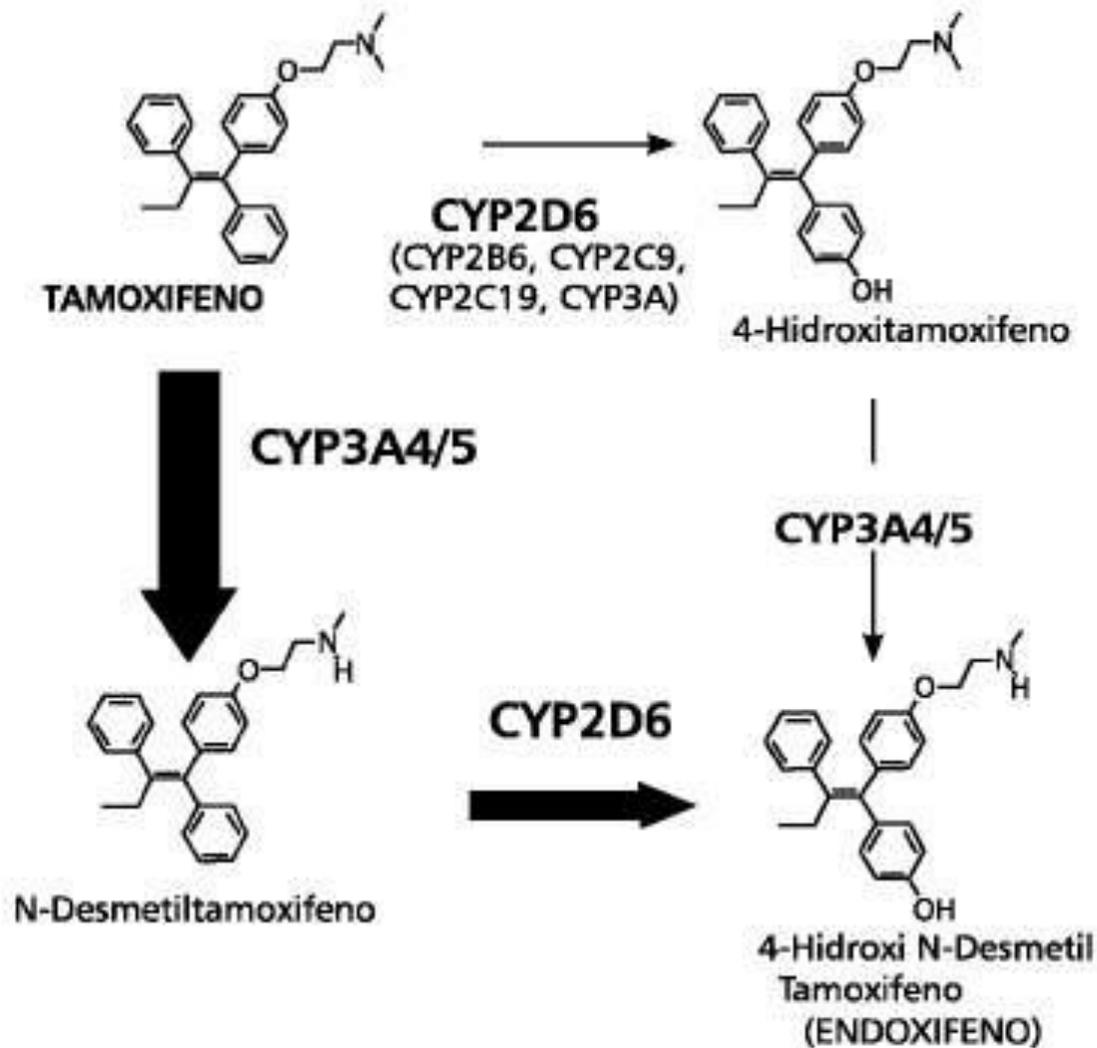


Figura 10. Metabolismo del Tamoxifeno (Kiyotani *et al.*, 2008).

### Aplicaciones clínicas del Tamoxifeno

A pesar de que algunos estudios no son concluyentes se puede considerar al TAM para prevención del cáncer de mama en mujeres. Otros estudios muestran que el TAM es eficaz en el tratamiento del cáncer de mama avanzado, al mantener la regresión tumoral y estabilizar la enfermedad en más del 30% de los casos durante tiempo largos. Muestra mayores ventajas para pacientes con tumores RE+/RP+ seguido de los RE+/RP- que para los paciente

con RE-/RP-. Por otro lado, el TAM también es utilizado como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de mama siendo efectivo en pacientes pre y postmenopáusicas, reduciendo la recurrencia y la mortalidad principalmente en tumores RE+/RP-. El TAM disminuye en un 47% la tasa de recurrencias a los 5 años y disminuye un 26% en la mortalidad a los 10 años (Terán y Tapia, 2005).

## JUSTIFICACIÓN

Debido al gran impacto social, emocional y económico del cáncer de mama en el mundo, es necesario investigar el efecto de los fármacos empleados frecuentemente en el tratamiento del cáncer mamario. Por lo anterior es importante estudiar el efecto del 5-FU y el TAM sobre la modificación en la expresión y distribución de proteínas asociadas con el desarrollo de esta patología y su evolución invasiva y metastásica en los distintos subtipos del cáncer (RE-negativo y RE-positivo). Además, es muy importante explorar el efecto combinatorio de éstos fármacos en busca de un mayor efecto inhibitorio de la transformación invasiva.

La capacidad invasiva se obtiene mediante la transformación de una célula epitelial a una mesenquimal adquiriendo motilidad al disminuir la expresión de proteínas de adhesión, encontrándose entre las principales la E-cadherina. TWIST es un importante regulador de la transformación mesenquimal al reprimir de manera directa la expresión de la E-cadherina, por lo que es de relevancia realizar estudios del efecto de los antineoplásicos en la expresión de esta proteína en células de cáncer de mama RE-negativas y RE-positivas.

## **HIPÓTESIS**

### **Pregunta de Investigación**

La expresión de la proteína TWIST en células de cáncer de mama positivas y negativas a receptor de estrógeno, ¿es modificada por el 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno?

### **Hipótesis**

El Tamoxifeno y el 5-Fluorouracilo disminuyen la expresión de la proteína TWIST en células de cáncer de mama positivas y negativas a receptor de estrógeno.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar el efecto del 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno sobre la expresión de la proteína TWIST en células de cáncer de mama positivas y negativas al receptor de estrógenos.

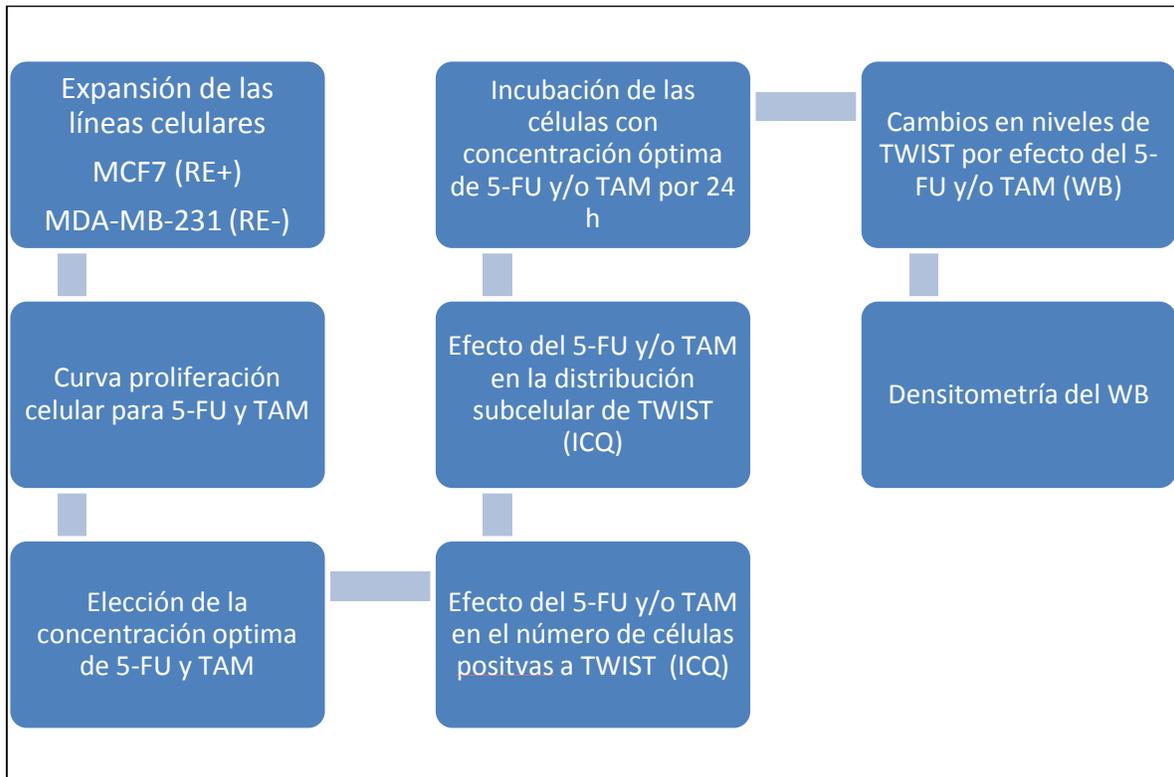
### Objetivos Específicos

#### En células positivas y negativas al receptor de estrógenos:

- Identificar por inmunocitoquímica el efecto del 5-FU y TAM en el número de células positivas a TWIST.
- Identificar por inmunocitoquímica modificaciones en la distribución subcelular de TWIST por efecto del 5-FU y TAM.
- Analizar por *Western blot* el efecto del 5-FU y el TAM en los niveles de proteína TWIST.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño Experimental



**Figura 11. Diseño del proceso experimental.**

### Cultivo Celular

Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (RE-) y las MCF7 (RE+) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las células fueron sembradas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Gibco, CA, USA), mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina-fungizona, Gibco), aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco) y L-glutamina al 1% (Gibco) en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

## **Anticuerpos y Reactivos**

El anticuerpo primario contra el factor de transcripción TWIST fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) y el anticuerpo secundario anti-conejo-peroxidasa de rábano. El 5-Fluorouracilo fue comprado de Laboratorios PiSA y el Tamoxifeno se obtuvo de Laboratorios Astra Zeneca.

## **Curvas Concentración-respuesta**

Para estudiar el efecto del 5-FU y el TAM sobre la viabilidad celular se llevó a cabo una curva concentración respuesta. Las células MDA-MB-231 y MCF7 fueron sembradas en placas p24 (50000 cel/pozo) en medio de cultivo DMEM completo, posteriormente fueron expuestas a distintas concentraciones de 5-FU y TAM: 0.1, 1, 5, 10, 50 uM para ambos fármacos, durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de tinción con azul tripano.

## **Tratamientos**

Para el estudio de los cambios en la expresión génica y proteica de TWIST en células MDA-MB-231 y MCF7 se formaron 4 grupos: a) el grupo control, el cual no fue expuesto a ningún tratamiento, b) el grupo tratado con 5-FU, c) el grupo tratado con TAM y d) el tratamiento secuencial con 5-FU y posteriormente con TAM. Para todos los grupos, las células fueron sembradas en placas con 12 pozos ( $5 \times 10^4$  células/pozo) y 500 uL de medio de cultivo completo durante 24 horas, después de este tiempo el medio de cultivo fue retirado. Para el grupo control, el medio de cultivo viejo fue sustituido por medio de cultivo nuevo completo (500 uL) y se dejó incubando durante 24 h más. Para el tratamiento con 5-FU el medio retirado fue sustituido por 500 uL de medio nuevo completo, inmediatamente después se le adicionó 5-FU 50 uM y se dejó actuar durante 24 h. Para el tratamiento con TAM, se le agregó 500 uL de medio de cultivo nuevo depletado de SFB y se dejó incubando durante 18 h; después de este tiempo, el

medio de cultivo fue reemplazado por 500 uL de medio nuevo depletado de SFB y se le agregó TAM 50 uM, dejándose actuar durante 24 h más. Para el grupo con el tratamiento secuencial de 5-FU y TAM, después de retirar el medio completo inicial, se le agregó 500 uL de medio de cultivo completo adicionado con 5-FU 50 uM y se dejó actuar por 24 h; pasado este tiempo, se retiró el medio y fue reemplazado por 500 uL de medio de cultivo nuevo depletado de SFB durante 18 h, posteriormente el medio se cambió por medio nuevo depletado de SFB y adicionado con TAM 50 uM, dejándose actuar por 24 h más.

### **Inmunocitoquímica**

Para el estudio de la localización subcelular de TWIST en las líneas celulares, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de cultivo de 12 pozos con 500 uL de medio de cultivo completo. Posteriormente se procedió a realizar los tratamientos como se describió anteriormente. Una vez finalizado el tiempo de exposición a los fármacos, las células se enjuagaron 3 veces con PBS 1X (Buffer de fosfato salino, pH: 7.4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 10 min. Después de la fijación se lavaron 3 veces con PBS 1X, 10 minutos por lavado. Posteriormente, las células se guardaron en refrigeración para ser utilizadas más adelante o bien se procede a realizar la Inmunocitoquímica (ICQ).

Para la ICQ, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, por 10 minutos cada lavado, después se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 1% en solución de PBS 1X durante 30 minutos. Las células se enjuagaron 3 veces con PBS 1X y se bloqueó la inespecificidad con leche desgrasada al 3% en PBT (buffer de fosfato salino con Tritón al 0.5%) durante 2 horas. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBT por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-TWIST (1:300) en leche al 1% en PBT toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las células se lavaron 3 veces con PBT por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo-HRP (horseradish peroxidase, 1:500) en leche al 1% en PBT durante 2 horas a temperatura ambiente. La señal inmunoreactiva se reveló con solución de

Diaminobencidina (DAB), la cual se preparó con 0.042 g de DAB, 612 uL de peróxido al 3% y 175 ml de PBS 1X.

Las células control negativo fueron incubadas con todos los reactivos excepto con el anticuerpo primario, esto fue para verificar que el anticuerpo secundario no da marca inespecífica. Fueron realizados al menos 3 experimentos con sus duplicados, de los cuales se analizaron 200 células por grupo de cada experimento, la presencia de TWIST en la célula se clasificó en 3 zonas subcelulares: a) núcleo, b) citoplasma c) núcleo y citoplasma al mismo tiempo, el resultado fue expresado en porcentaje.

### **Extracción de proteína**

Las células fueron lisadas con buffer de lisis Tris HCl (Tris-HCL, Bio-Rad) 20mM a un pH: 7.1, adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas (tabletas Complete Mini de Roche). Se utilizaron 5 mL de buffer de extracción por cada gramo de células a lisar y todo el proceso se realizó en hielo. Las células se lisaron durante 1 min a 3000 revoluciones, después se dejaron agitando durante 1 h en el vortex a una velocidad constante (nivel 7-8). Posteriormente las muestras se centrifugaron 15 min a 4000 rpm a 4° C, se recuperó sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó nuevamente el sobrenadante y se cuantificó el contenido de proteína por la técnica de Bradford.

### **Western Blot (WB)**

Para la identificación de TWIST por WB, de cada una de las muestras a estudiar, se tomó la misma cantidad de proteína y se hirvieron durante 5 min, estas proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para realizar la separación por electroforesis, el gel se corrió a 100 V por 20 min (gel concentrador al 4%) y posteriormente a 150 V por 45 min (gel separador 12%). Una vez terminada la electroforesis, las proteínas contenidas en el gel se

electrotransfirieron hacia una membrana de nitrocelulosa a 200 mA durante 1 hora. Esta membrana se bloqueó con leche al 3% en buffer de fosfatos salino (PBT) durante 2 horas con agitación, transcurrido el tiempo se lavó la membrana 3 veces con PBT 10 min cada vez y se incubó con el anticuerpo primario anti-TWIST(1:500 leche 1% en PBT) y anti-Actina (1:1000 leche 1% en PBT) durante toda la noche en agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con PBT durante 10 min cada vez, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (1:1000 leche 1%/PBT) y anti-cabra-HRP (1:1000 leche 1% en PBT) respectivamente, durante 4 h con agitación constante. La señal fue observada por quimioluminiscencia. Las bandas fueron observadas conforme al peso molecular de Actina (43kDa) y TWIST (56kDa, dímero). Todos los experimentos se realizaron conforme al diseño experimental (Cuadro 1.)

### **Análisis Estadístico**

Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes realizados al menos por triplicado y fueron analizados con ANOVA de una vía. Para la proliferación celular, los datos fueron analizados con una prueba post-hoc de Dunnet para comparar contra un control. Para el análisis de la distribución celular y la cuantificación de la proteína por Inmunoblot, se realizó una prueba post-hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos. Los valores fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar y para todas las pruebas se designó como diferencia significativa al obtener una  $P \leq 0.5$ .

## RESULTADOS

Para determinar las concentraciones a estudiar en la evaluación de la distribución de TWIST y su expresión proteica, se realizaron curvas concentración-respuesta para el 5-FU y el TAM en las dos líneas celulares, MDA-MB-231 (RE-) y MCF7 (RE+). Para el 5-FU, se estudiaron las concentraciones de 0.1, 1, 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ . En las células MDA-MB-231 se observó una disminución significativa con las concentraciones de 5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ , encontrándose una proliferación celular del 76.5, 64.5 y 49.9% respectivamente, en comparación con el control (tomado como el 100%) (Figura 12).

Para las células MCF7, se observó una disminución significativa con respecto al control a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , obteniendo una proliferación del 55.5% (Figura 13).

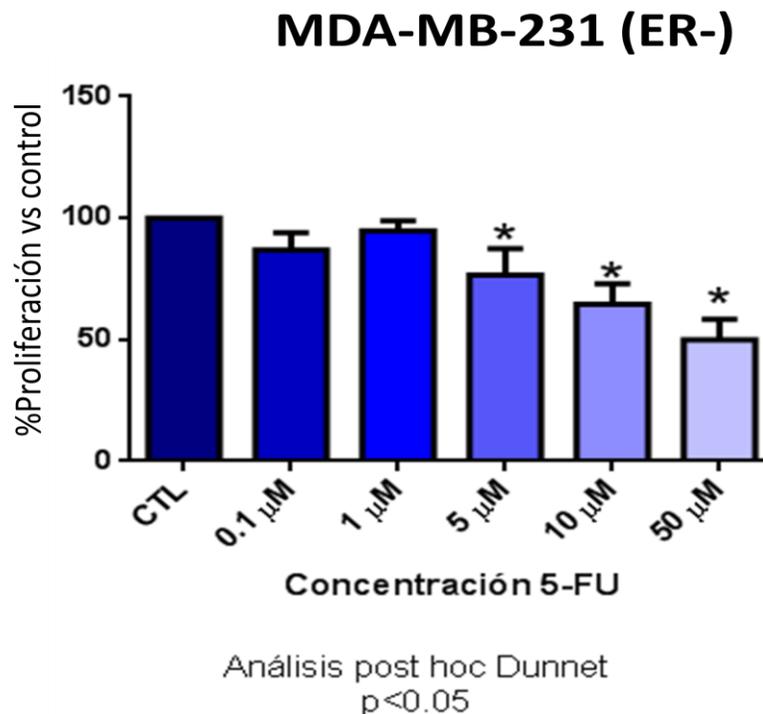


Figura 12. Proliferación de las células MDA-MB-231 tratadas con 5-FU. La proliferación celular disminuye significativamente con el tratamiento de 5, 10 y 50 uM de 5-FU a las 24 h de exposición. El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control.

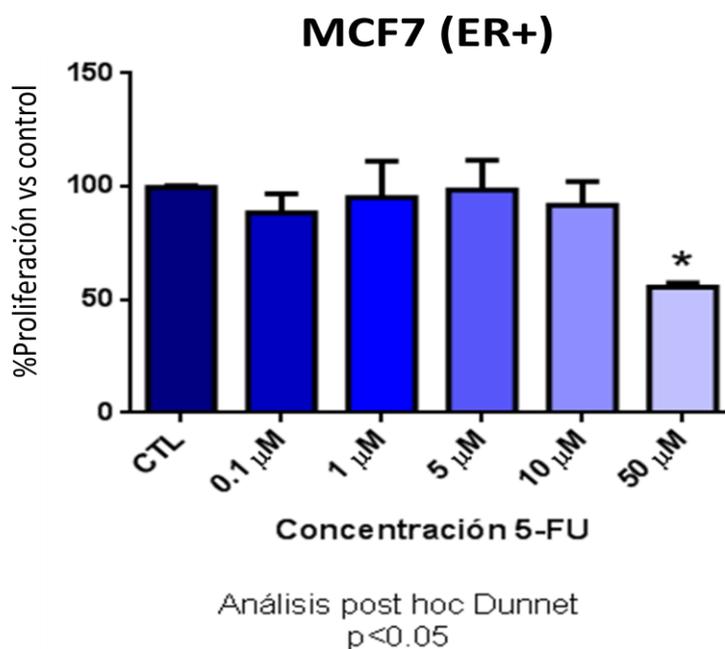
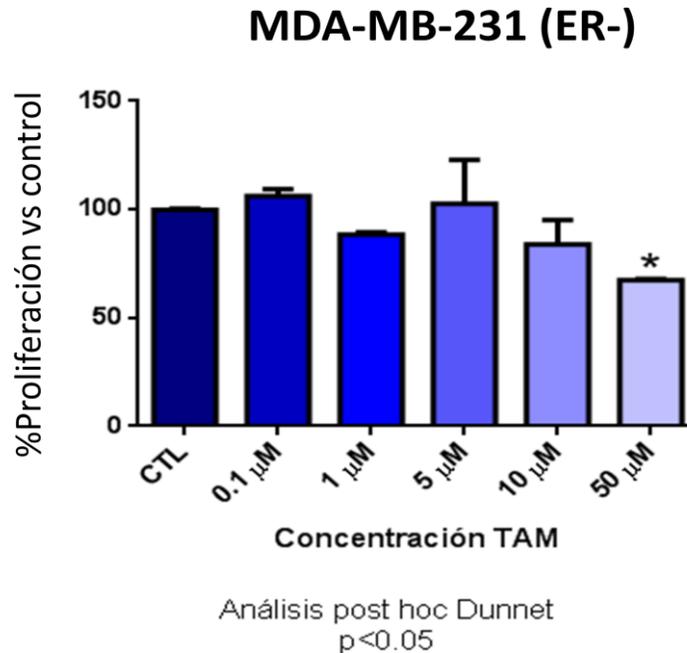


Figura 13. Efecto del 5-FU en la proliferación de células RE (+) MCF7. La proliferación celular disminuye significativamente con respecto al control a una concentración de 50 uM de 5-FU a las 24 horas de exposición. El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control.

En las células MDA-MB-231 expuestas al TAM a una concentración de 50 uM, se encontró una proliferación de 67.4%, la cual es significativamente menor en comparación con el control (100%) (Figura 14). Para las células MCF7, todas las concentraciones probadas 0.1, 1, 5 y 10 uM disminuyeron significativamente la

proliferación, encontrándose un 84.6, 75, 78.3 y 62.5% respectivamente con respecto al control (Figura 15).

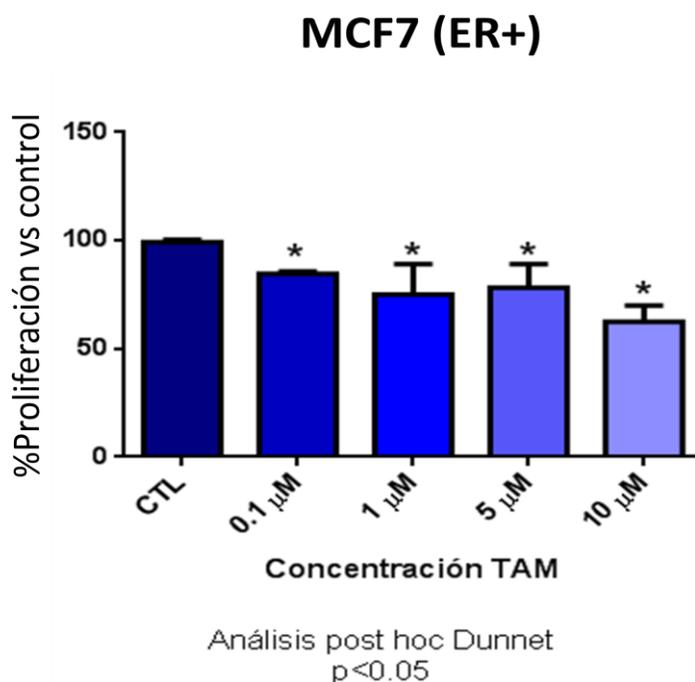


**Figura 14. Efecto del TAM sobre la proliferación celular en células RE (-) MDA-MB-231. La concentración de 50 uM disminuye significativamente la proliferación con respecto al control. El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control.**

Estudios previos, muestran que el 5-FU y TAM permiten una proliferación del 50% en concentraciones cercanas a 50uM en células RE-negativas como RE-positivas. En este estudio se encontró un comportamiento similar de las células con los mismos fármacos y a la misma concentración, por lo que se decidió utilizar la concentración de 50uM para ambos fármacos para el estudio de la distribución y la cuantificación de la proteína TWIST.

Se realizó una inmunocitoquímica con la finalidad de conocer la distribución subcelular de TWIST en las líneas MDA-MB-231 y las MCF7, para este objetivo se formaron 4 grupos de estudio: control (sin exposición a fármacos),

5-FU (50  $\mu$ M), TAM (50  $\mu$ M) y la combinación de ambos 5-FU/TAM (50  $\mu$ M cada uno). Se observó el efecto a las 24 h de exposición. Se analizaron 100 células por cada repetición y réplica del experimento en cada línea celular.

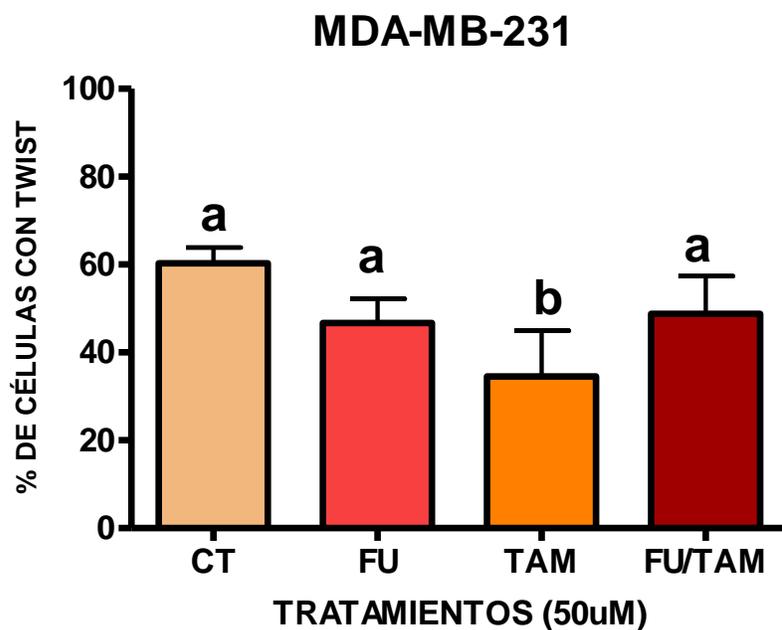


**Figura 15. Efecto del TAM sobre la proliferación de las células RE (+) MCF7.** Todas las concentraciones estudiadas disminuyen significativamente la proliferación en comparación con el control. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al control.

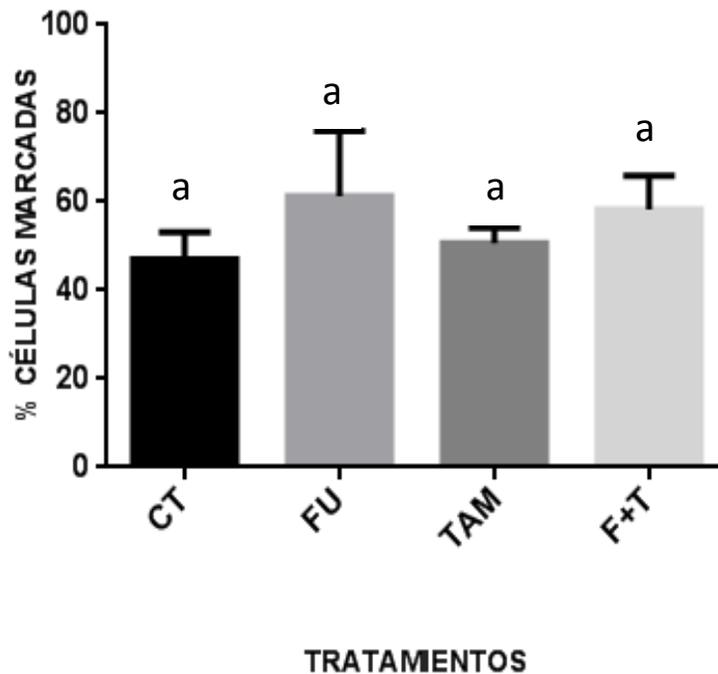
El primer análisis consistió en clasificar las células que presentaban la presencia de TWIST y las que no lo tenían. Para las células MDA-MB-231, el grupo control presentó el 60% de las células positivas para TWIST, el grupo expuesto al 5-FU el 50%, el tratado con TAM el 35% y la combinación de ambos fármacos (5-FU/TAM) el 53%. El tratamiento con TAM fue el único grupo donde se disminuyó significativamente el número de células con TWIST (Figura 16).

Para las células MCF7, se encontró un 47% de células positivas para TWIST en el grupo control, un 62% en el grupo tratado con 5-FU, un 50% en el

grupo de TAM y un 57% en la combinación de fármacos 5-FU/TAM. Los resultados no indican diferencias significativas entre los grupos (Figura 17).

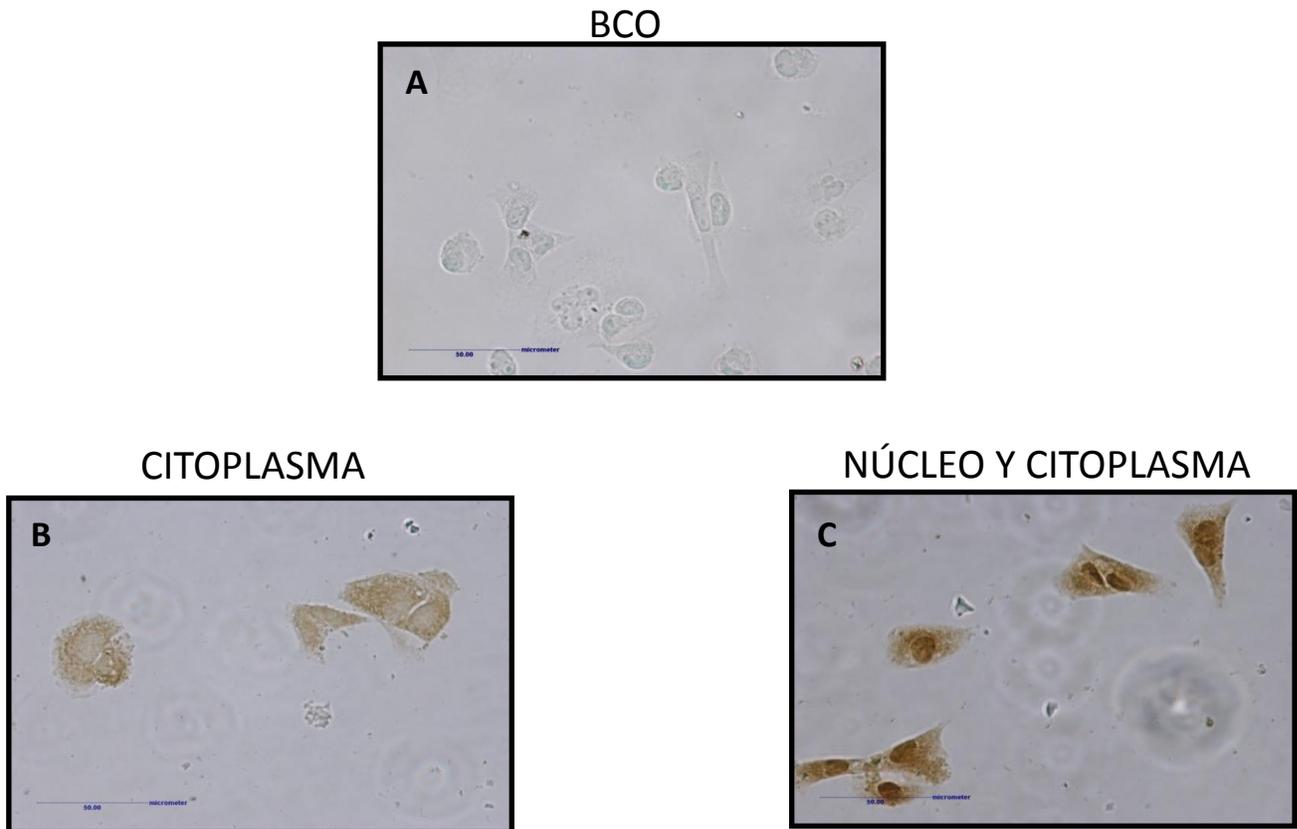


**Figura 16. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM en la presencia de TWIST en células RE (-) MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a cada uno de los fármacos a una concentración de 50 uM cada uno. El TAM disminuye significativamente el porcentaje de células TWIST positivas. Letras diferentes indican diferencia significativa.**



**Figura 17. Efecto de los fármacos antineoplásicos sobre las células TWIST positivas en la línea MCF7. El 5-FU, el TAM y el 5-FU/TAM no modifican el porcentaje de células TWIST positivas. Las letras diferentes indican diferencia significativa.**

Durante el análisis del efecto de los tratamientos sobre la localización subcelular de TWIST, en las células MDA-MB-231 y en las MCF7 se observaron 2 distribuciones, cuando TWIST se encontraba solo en citoplasma y cuando se encontraba en núcleo y citoplasma al mismo tiempo (núcleo/citoplasma). No se encontraron células que presentaran TWIST solamente en el núcleo (Figura 18).



**Figura 18. Distribución subcelular de TWIST observada en células RE (-) MDA-MB-321. A) Células negativas (no fueron expuestas a ningún anticuerpo), B) Células con TWIST en citoplasma, C) Células con TWIST en núcleo y citoplasma al mismo tiempo. No se encontraron células con presencia de TWIST sólo en el núcleo. Las fotos fueron tomadas con el objetivo de 40X. La barra equivale a 50  $\mu$ m.**

Posteriormente se realizó el análisis del efecto de los fármacos sobre la presencia de TWIST por regiones (citoplasma y núcleo/citoplasma). En las células MDA-MB-231, se observó un aumento significativo del número de células con presencia de TWIST en citoplasma, al ser tratadas con la combinación de fármacos (5-FU/TAM). Los porcentajes de células con TWIST en citoplasma para

el grupo control fue del 1.6%, 8.6% para 5-FU, 12% para TAM y 32% para la combinación de 5-FU /TAM (Figura 19). En el caso de las células que presentaron TWIST tanto en núcleo como en citoplasma, se encontró para el grupo control un 58.3% de células, para el 5-FU un 37%, para el TAM un 22.8% y para 5-FU/TAM un 16%. Para los grupos tratados con TAM y 5-FU/TAM se observó una disminución significativa del número de células en comparación con el control pero no se observa diferencia con el grupo del 5-FU solo (Figura 20).

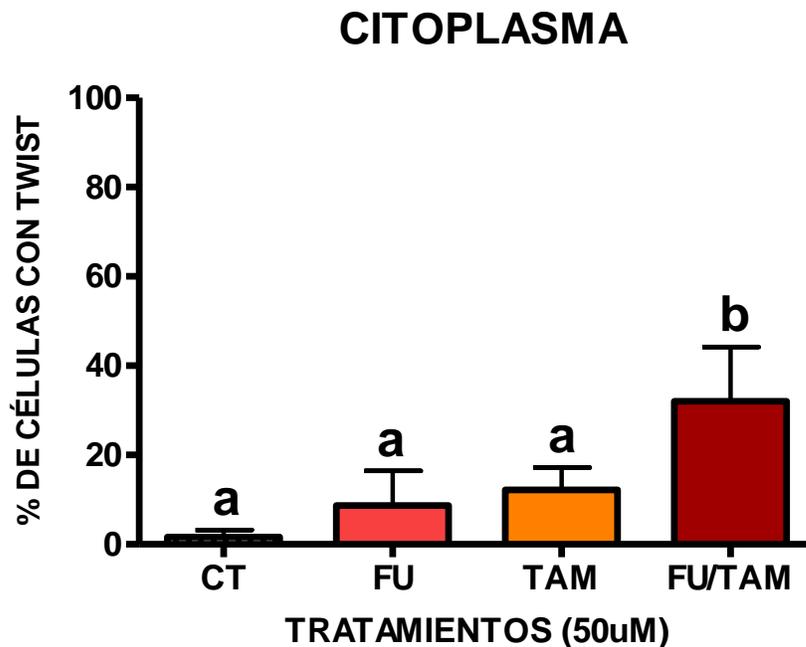
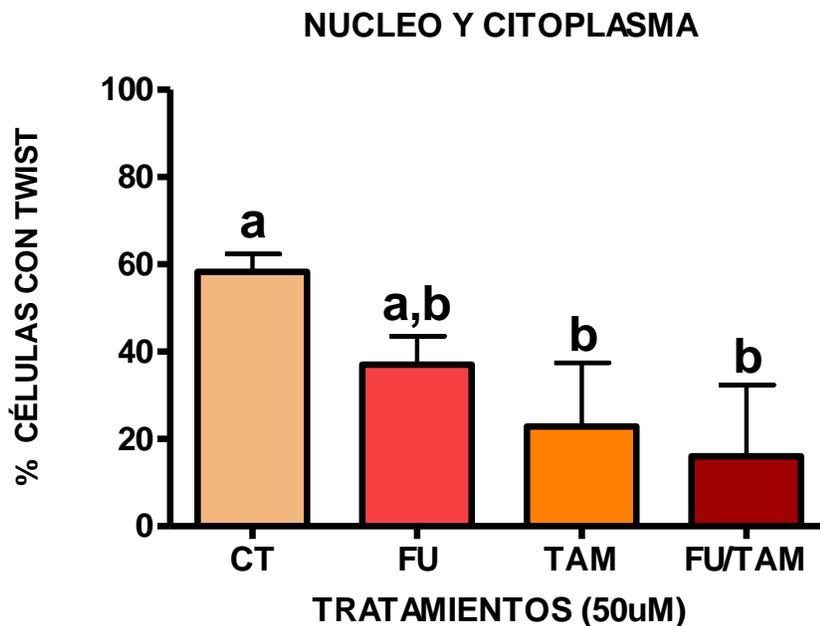


Figura 19. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre TWIST citoplasmático en células MDA-MB-231. La combinación 5-FU/TAM aumenta significativamente el número de células con TWIST en citoplasma. Las letras diferentes indican diferencia significativa.



**Figura 20. Efecto del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre TWIST nuclear y citoplasmático en células MDA-MB-231. El TAM y la combinación 5-FU/TAM disminuyen significativamente el número de células con TWIST en núcleo/citoplasma. Las letras diferentes indican diferencia significativa.**

Para las células MCF7, el porcentaje de células con la presencia de TWIST en citoplasma, disminuyó significativamente al incubar las células con 5-FU, TAM y 5-FU/TAM durante 24 horas a una concentración de 50 uM. En el grupo control se encontró un 29% de células con TWIST en citoplasma, con 5-FU un 1%, con TAM un 2% y en 5-FU/TAM 1% (Figura 21). Para las células que mostraron TWIST en núcleo y citoplasma al mismo tiempo, se observó que el 5-FU y la combinación del 5-FU/TAM indujeron el aumento significativo del número de células en comparación con el control y el grupo del TAM. En el grupo control se obtuvo un 20% de células con marca para TWIST en núcleo/citoplasma, en el grupo de 5-FU un 60%, con TAM 52% y para 5-FU/TAM un 58% (Figura 22).

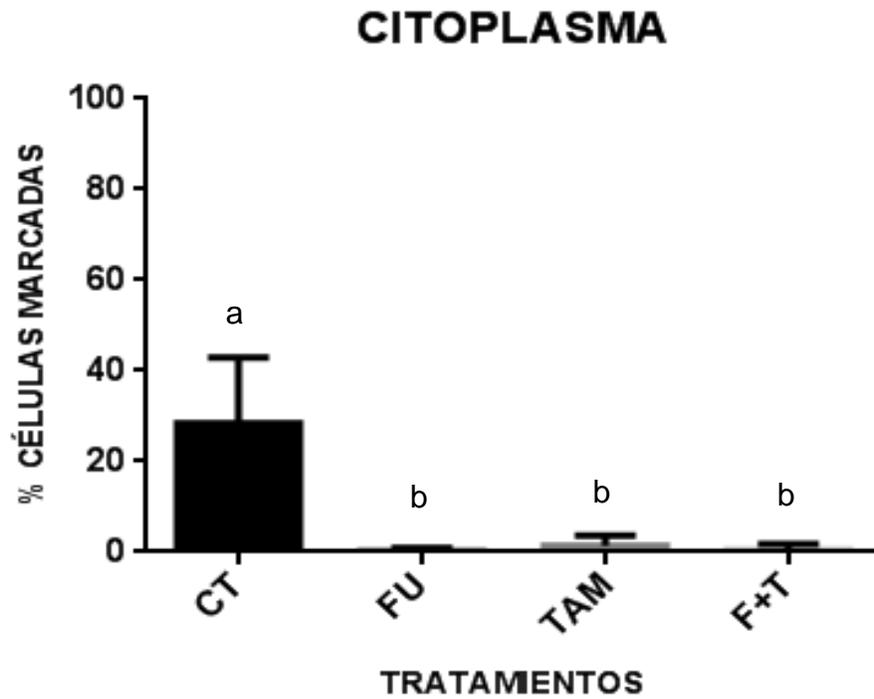
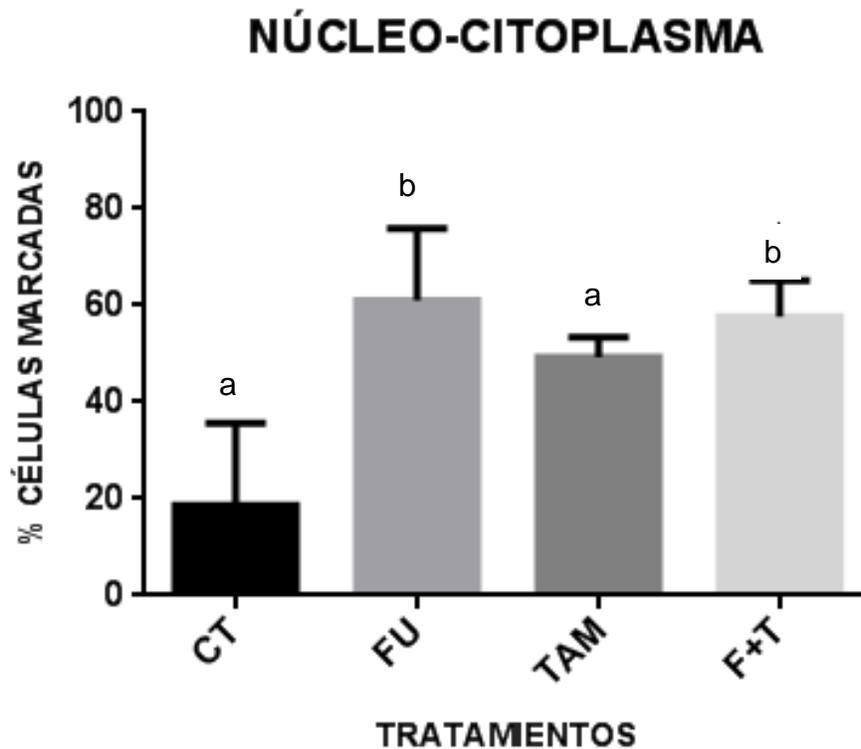


Figura 21. Efectos del 5-FU, TAM y 5-FU/TAM sobre la presencia de TWIST en citoplasma en células MCF7. El número de células con TWIST en citoplasma disminuye significativamente al exponer a las células al 5-FU, TAM y 5-FU/TAM. Las letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 22. Efecto de los fármacos antineoplásicos sobre la presencia de TWIST en núcleo/citoplasma en células MCF7. El 5-FU y la combinación de 5-FU/TAM aumentan significativamente el número de células con TWIST en núcleo y citoplasma. Las letras diferentes indican diferencia significativa.**

En las células MDA-MB-231, el análisis del *Western blot* mostró una disminución significativa de la cantidad total de TWIST en las células incubadas con 5-FU, TAM y la combinación de éstos (5-FU/TAM) obteniendo el 76% para el 5-FU, el 62% para el TAM y el 62% para el 5-FU/TAM. Tomando como 100% el control (Figura 23).

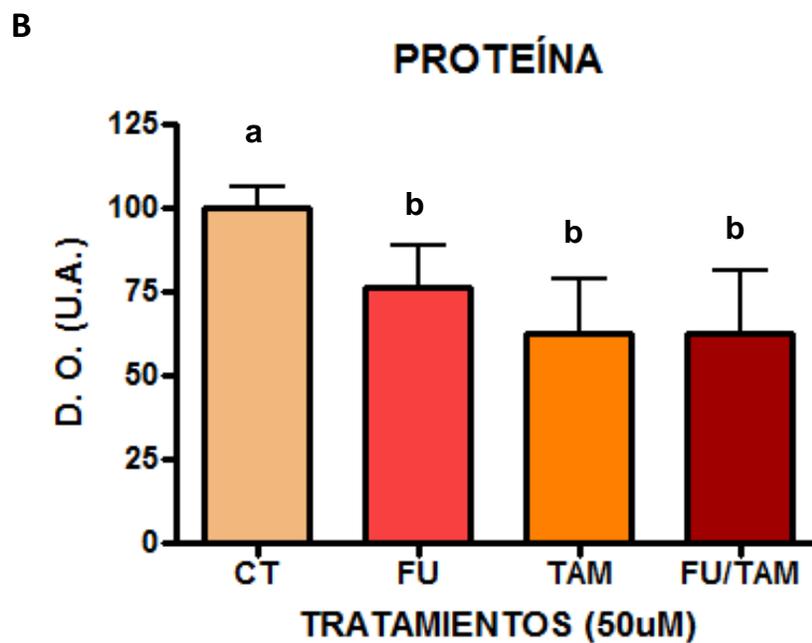
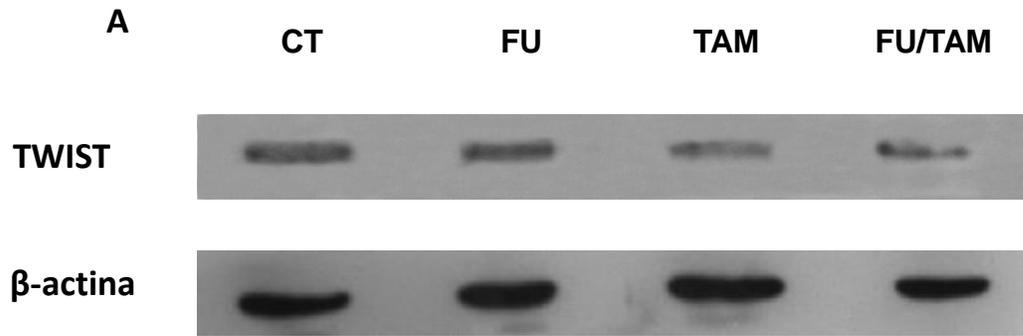
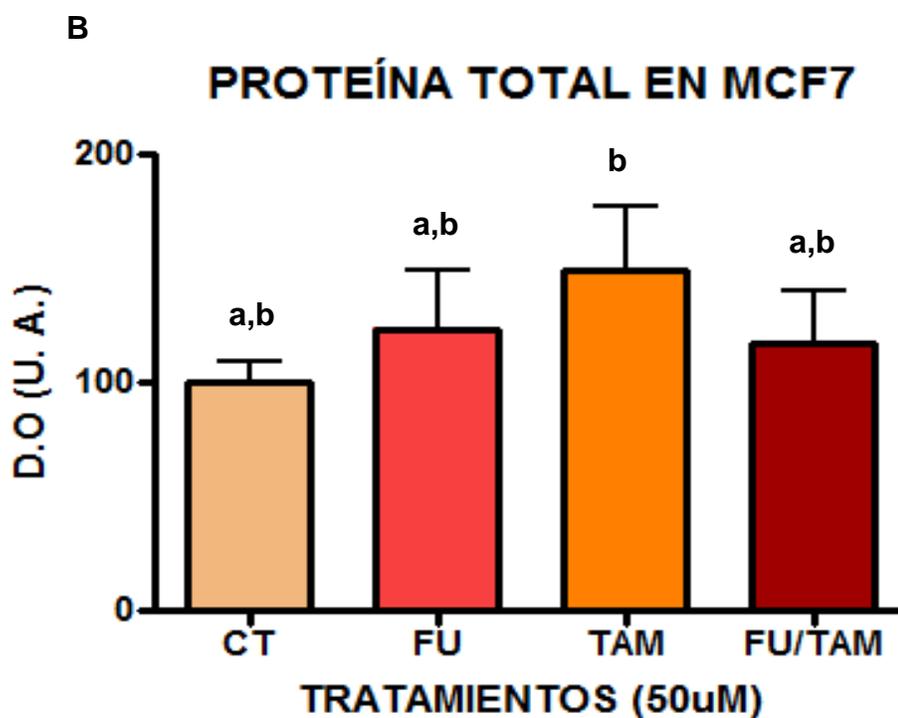
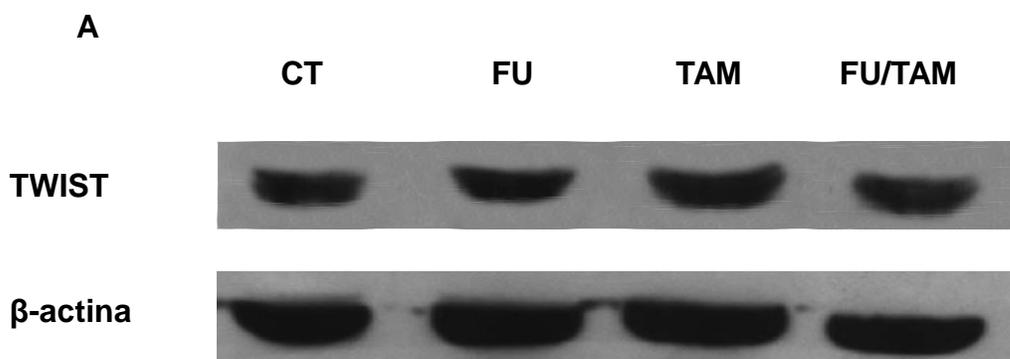


Figura 23. Cuantificación de TWIST en células MDA-MB-231 expuestas al 5-FU, TAM y 5-FU/TAM. A) Intensidad de las bandas para TWIST obtenidas por *Western blot* para cada tratamiento, también se observan las bandas de  $\beta$ -actina como control de carga. B) Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría óptica (D. O.) expresada como unidades arbitrarias (U. A.). Las letras diferentes muestran diferencia significativa.

Para las células MCF7, el *Western blot* mostró un 121% de densidad óptica expresada en unidades arbitrarias de proteína TWIST en el grupo tratado con 5-FU, con TAM 143% y con la combinación 5-FU/TAM un 117%. El grupo tratado con TAM muestra un aumento significativo en la cantidad de TWIST en comparación con el resto de los grupos estudiado (Figura 24).



**Figura 24. Cuantificación de TWIST en los grupos expuestos al 5-FU, TAM y 5-FU/TAM en células MCF7. A) Intensidad de las bandas para TWIST en cada uno de los grupos estudiados, B) Densitometría para la cuantificación de TWIST en cada tratamiento. El grupo tratado con TAM aumenta significativamente la proteína a una concentración de 50 uM a las 24 h de exposición. Letras diferentes indican diferencia significativa.**

### **RESUMEN DE RESULTADOS**

- ❖ Con los resultados obtenidos se puede concluir que 5-FU y TAM tienen distintos efectos en células RE-negativas y en RE-positivas.
- ❖ El TAM disminuye el número de células con expresión de la proteína TWIST en células RE-negativas.
- ❖ El 5-FU (50 uM) y el TAM (50 uM) de forma individual y en combinación disminuyen los niveles de TWIST en células RE-negativas.
- ❖ La combinación de 5-FU/TAM (50 uM c/u) retiene a TWIST en citoplasma en RE-negativas
- ❖ En células RE-positivas, el 5-FU ni el TAM modifican el número de células TWIST positivas.
- ❖ El TAM a 50 uM, incrementa los niveles de TWIST en células RE-positivas.
- ❖ El 5-FU, el TAM y la combinación de ambos disminuye el número de células con TWIST en el citoplasma y las aumenta en el núcleo/citoplasma en células RE-positivas.

## DISCUSIÓN

Los resultados del efecto de los antineoplásicos sobre la proliferación celular mostraron para el 5-FU en células RE-negativas (MDA-MB-231) una disminución de la proliferación dependiente de la concentración, encontrando un mayor efecto con 50 uM. En células RE-positivas (MCF7) se observó disminución de la proliferación solo con 50 uM. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Sun *et al.* (2012) y por Vinod *et al.* (2013), quienes observaron un incremento en la inhibición de la proliferación al ir aumentando la concentración del 5-FU en células MDA-MB-231 y MCF7. El efecto antiproliferativo del 5-FU se debe a sus distintos mecanismos de acción: 1) Inhibe la enzima timidilato sintasa (necesaria para la síntesis de DNA), lo que induce el arresto celular, 2) Se incorpora al RNA y al DNA ocasionando alteraciones, que en efecto conjunto provoca la apoptosis (Petrelli *et al.*, 1987), y 3) Inhibe la activación de ERK 1/2 y reduce los niveles de Bcl2, con lo que se disminuye la proliferación e induce la apoptosis (Gao *et al.*, 2014).

Para el TAM, en células RE-negativas se encontró que de las concentraciones estudiadas, únicamente la concentración más alta (50 uM) disminuye significativamente la proliferación celular. Estos datos son consistentes con lo reportado en el 2014 por Samadi *et al.*, quienes observaron que la concentración de 50 uM de TAM disminuye significativamente la proliferación de las células MDA-MB-231 a las 24 h de incubación, mientras que concentraciones menores no tienen efecto significativo en la proliferación. Los resultados del presente trabajo difieren con lo observado por Rajput *et al.* (2009), quienes a partir de 13 uM de TAM detectan una disminución en la proliferación, sin embargo, esta discrepancia es debida a que el tiempo de incubación es de 48 h, el doble del tiempo utilizado en nuestro estudio.

El mecanismo a través del cual el TAM inhibe proliferación en células que no expresan Receptores a estrógenos aún no está bien elucidado, sin embargo, se han realizado estudios donde han encontrado que el TAM induce arresto en

G0/G1 en células RE-negativas. Además, TAM es capaz de disminuir la proliferación de células HepG2 (RE-negativas) de carcinoma hepatocelular a partir de 10 uM e inducir la apoptosis en concentraciones mayores de 20 uM (Guo *et al.*, 2009). En estudios realizados por Salami y Karami-Tehrani (2003) observaron un aumento en la muerte de las células MDA-MB-438 (RE-negativas) tratadas con TAM 20 uM, pero no con concentraciones menores. Estos autores sugieren que la muerte fue llevada a cabo por apoptosis inducida por la activación de caspasas, específicamente la caspasa 3 la cual se incrementaba su expresión al aumentar la apoptosis y de manera inversa, al inhibirse la caspasa la apoptosis inducida por TAM se reducía. El mismo comportamiento fue observado en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-10 tratadas con 20uM de TAM (Mandlekar *et al.*, 2000).

Las células RE-positivas (MCF7) mostraron una mayor sensibilidad al TAM al disminuir la proliferación desde las concentraciones más bajas 0.1 hasta 10 uM. Estos datos son consistentes con los obtenidos por Lo *et al.* (2013) quienes observaron inhibición de la proliferación de células MCF7 desde 5 hasta 20 uM de TAM a las 24 h de incubación y con Salami y Karami-Tehrani (2003) que con 0.1 y 1 uM encontraron disminuida la proliferación de células MCF7.

El efecto antiproliferativo del TAM en células RE-positivas (MCF7) está asociado a su mecanismo de acción principal, en el que se une al receptor de estrógenos impidiendo la unión del estradiol, lo que inhibe la transcripción de genes asociados con proliferación (Terán y Tepa, 2005). Además, se sabe que el TAM no solo induce la apoptosis mediante la activación de las caspasas, si no que, existen vías alternas las cuales aún no han sido definidas (Salami y Karami-Tehrani, 2003). Se han propuesto distintos mecanismos. Uno de ellos es a través de la activación de proteínas no caspasas como la calpaína, la cual es una proteasa que su activación depende de calcio (Squier *et al.*, 1994). Otra forma es que el TAM induce la permeabilidad mitocondrial provocando la salida de calcio y fosfato inorgánico al mimetizar a la ciclosporina A (Custodio *et al.*, 1998). Es posible que la participación de Bcl2 y Bax estén involucradas en este proceso, sin embargo, esto

aún no es concluyente puesto que existen datos contradictorios (Zhang *et al.*, 1999; Karami-Tehrani, 2003).

Los resultados de la inmunocitoquímica sobre el efecto del 5-FU en la expresión proteica de TWIST en células RE-negativas, mostraron que el 5-FU no modifica el número de células positivas a TWIST, es decir, no inhibe la síntesis de la proteína o induce su degradación completamente.

Los resultados del análisis del WB mostraron que sí hay una disminución en los niveles de proteína total de TWIST por efecto del 5-FU. Los posibles mecanismos a través del cual el 5-FU disminuye TWIST, es mediante la reducción de los niveles de las proteínas AKT, p38, JNK y STAT3, dicho efecto ha sido observado en células RE-negativas (Vinod *et al.*, 2009; Sims *et al.*, 2003) lo que es importante porque éstas proteínas participan en la activación transcripcional de TWIST (Pham *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2011).

Con la técnica de Inmunocitoquímica no fue posible observar un cambio en los niveles de TWIST, lo que con WB sí pudo detectarse. Esto se debe a que el WB es una técnica más sensible para detectar los pequeños cambios en la cantidad de la proteína, además que las cantidades de células utilizadas en WB fue mucho mayor que en la ICQ, lo que también nos permite detectar más fácilmente un cambio.

Durante el análisis del efecto del TAM sobre las células RE-negativas, se encontró que el TAM disminuye significativamente el número de células con TWIST positivas y la cantidad de TWIST total. El TAM no es utilizado para el tratamiento de cáncer de mama negativo a Receptor de estrógenos, porque estas

células no presentan los receptores a estrógenos requeridos para responder al efecto del TAM. Sin embargo, se ha reportado que TAM en células ER-negativas es capaz de disminuir los niveles de las proteínas p-AKT, p38 y JNK (Rajput *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2007). Por lo que se sugiere que TAM disminuye la síntesis de TWIST al reducir su activación transcripcional mediante la disminución de p-AKT, p38 y JNK, las cuales forman parte de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPKs, que son responsables en parte, de la activación de la expresión de TWIST. Otro mecanismo por el que TAM reduce la cantidad de TWIST, podría ser a través de la inducción de su degradación, la cual se lleva a cabo al inhibir la fosforilación de TWIST en serina 68 por disminución de p38 y JNK, las cuales son responsables de la fosforilación. Está reportado que la fosforilación en serina 68 le da estabilidad a TWIST y evita su degradación y que ésta fosforilación es llevada a cabo por p38 y JNK (Hong *et al.*, 2011).

A pesar que el TAM tuvo un efecto positivo al disminuir TWIST en células RE-negativas MDA-MB-231, no se observó el mismo comportamiento en células RE-positivas (MCF7). En células RE-positivas, mediante análisis inmunocitoquímico, no se observó modificación en el número de células TWIST positivas, sin embargo, por *Western blot* hubo un aumento en la cantidad de proteína total TWIST en células tratadas solo con TAM. En estudios previos, se ha encontrado que el TAM en células MCF7, activa la vía de las MAPKs (Raffo *et al.*, 2014) e induce el aumento de los niveles de p38 $\gamma$  (Qi *et al.*, 2012). Además TAM sobrerregula la vía de Wnt en células MCF7 (Gilbert *et al.*, 2009), lo que explicaría el aumento de los niveles de TWIST en células tratadas con TAM, lo cual fue detectable por WB que es una técnica más sensible que la ICQ, en la cual no se alcanzaron a observar los cambios.

En el análisis de la distribución subcelular de TWIST en células ER-negativas, se encontró que el TAM y la combinación 5-FU/TAM inducen

significativamente un arresto de TWIST en citoplasma evitando su traslocación al núcleo, pero no el 5-FU por sí solo, aunque se observa una tendencia a tener el mismo efecto. Una forma por la cual el TAM evita la traslocación de TWIST al núcleo en células ER-positivas, posiblemente sea por la inhibición de la formación de dímeros de TWIST, que son esenciales para su traslocación al núcleo. La formación de dímeros depende en parte de la estabilidad de la proteína, la cual está establecida por su fosforilación en serina 68 y ésta fosforilación depende de las proteínas p38, JNK y ERK1/2, quienes a su vez son activadas por TGF-B (Hong *et al.*, 2011). Además, ha sido reportado que TAM disminuye la expresión de TGF-B (Kang *et al.*, 1999). Por lo que TAM puede estar disminuyendo la formación de dímeros y su traslocación al disminuir p38, JNK y la activación de éstos por disminución de TGF-B.

En células ER-positivas el 5-FU y la combinación 5-FU/TAM provocaron un aumento significativo en el número de células con TWIST en núcleo/citoplasma y disminuyeron el número de células TWIST positivas en citoplasma. El TAM administrado de manera individual no aumentó significativamente las células con TWIST en núcleo-citoplasma, aunque se observó una tendencia a incrementar, pero sí disminuyó el número de células con TWIST citoplasmático. Lo anterior sugiere que el 5-FU provoca la traslocación de TWIST hacia el núcleo de manera individual y en combinación con TAM. El 5-FU activa p38 (Gao *et al.*, 2014), dicha proteína participa en la fosforilación de TWIST dándole mayor estabilidad y capacidad de formar dímeros, lo cual es necesario para la traslocación (Hong *et al.*, 2011). Por lo que se sugiere que la traslocación de TWIST está favorecida por la sobreexpresión de p38 inducida por 5-FU.

## CONCLUSIONES

El 5-Fluorouracilo y el Tamoxifeno de manera individualizada o combinada mostraron citotoxicidad para ambas líneas celulares, MCF7 y MDA-MB-231. Sin embargo, estos fármacos tienen efectos diferentes en la expresión proteica y distribución de TWIST, dependiendo si las células presentan receptores a estrógenos o no. En células MCF7 (RE-positiva), los fármacos incrementan los niveles de TWIST y su traslocación al núcleo, lo que podría favorecer la migración celular y el desarrollo de metástasis. Por otro lado, en células que no expresan receptores a estrógenos (MDA-MB-231), el 5-FU y el TAM disminuyen los niveles de proteína TWIST y en combinación, muestran sinergismo para disminuir la presencia de TWIST en el núcleo, lo que es esencial para ejercer su función. Lo anterior sugiere que, 5-FU y TAM podrían disminuir la migración celular y el riesgo a metástasis de células de cáncer de mama negativo a receptores de estrógenos, sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto.

## REFERENCIAS

- Aresvik DM, Pettersen RD, Abrahamsen TG, Wright MS. 2010. 5-Fluorouracil-induced death of Jurkat T-cells--a role for caspases and MCL-1. *Anticancer Res*, 30:3879-87.
- Balin-Gauthie D., Delord J., Pillaire M., Rochaix P., Hoffman J., Bugat, R., Cazaux C., Canal P., Allal, B.C. 2008. Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br. J. Cancer*, 98:120-128.
- Bertagnolli M., Niedzwiecki D., Compton C., Hahn H., Hall M., Damas B., Jewell S.D., Mayer R.J., Goldberg R.M., Saltz L.B., Warren R.S., Redston M. 2009. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J. Clin. Oncol*, 10:1814-21.
- Brunetti I., Falcone A., Calabresi P., Goulette F., Darnowski J. 1990. 5-Fluorouracil Enhances Azidothymidine Cytotoxicity: In Vitro, in Vivo, and Biochemical Studies. *Cancer Research*, 50:4026-4031.
- Carey LA, Perou CM, Dressler LG, Livasy CA, Geradts J, Cowan D. 2004. Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *J Clin Oncol*. (Suppl):abstr 9510.
- Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, et al. 2007. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res*, 67:1979-1987.

- Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, Wang Q, Coppola D, Mansour M., Xu L., Costanzo, Cheng J., Wang L. 2008. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J Biol Chem*, 283: 4665-14673.
- Cuzick J, Powles TJ, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. 2003. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*, 361:296-300.
- Davis J. Lin S. 2011. DNA damage and breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 2:329-338.
- Díaz-Faes J., Ruibal A. 2006. Cáncer de mama avances en diagnóstico, tratamiento e investigación. Fundación de estudios mastológicos. España. pp. 319-332 [Consultado en: <http://hdl.handle.net/10481/24901>].
- El Ghouzzi V., Legeai-Mallet L., Aresta S., Benoist C., Munnich A., Gunzburg J., Bonaventure J. 2000. Saethre-chotzen mutations cause Twist protein degradation or impaired nuclear location. *Human Molecular Genetics*, 9:813-819.
- Fackler M., McVeigh M., Evron E., Garrett E., Mehrotra J., Polyak K., Sukumar S., Argani P. 2003. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 107: 970–975.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, 90:1371-88.

- Flórez, J. 2004. Cáncer. *Farmacología Humana*. Ed. Masson. Cuarta Edición. 1019-1038.
- Fu J., Zhang L., He T., Xiao X., Liu X., Wang L., Yang L., Yang M., Zhang T., Chen R., Xu J. 2012. Twist represses estrogen receptors-alpha expression by recruiting the NuRD protein complex in breast cancer cell. *International Journal of Biological Sciences*, 8:522-532.
- García-Solís P., Aceves C. 2005. Estudio de los factores nutricionales asociados a la prevención de cáncer mamario. Importancia de los modelos animales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55:3.
- Gao J., Yan Q., Liu S., Yang X. 2014. Knockdown of EpCAM enhances the chemosensitivity of breast cancer cells to 5-fluorouracil by downregulating the antiapoptotic factor Bcl-2. *Plos one*, 9:e102590.
- Geiger T., Peeper D. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*. 1796, 2:293-308.
- Gort E., Suijkerbuijk K., Roothaan S., Raman V., Vooijs M., Van der Wall E. 2008. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17:3325-30.
- Guichard S., Arnould S., Hennebelle I., Bugat R., Canal P. 2001. Combination of oxaliplatin and irinotecan on human colon cancer cell lines: activity in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs*, 12:741-51.
- Guo R., Huang Z., Shu Y., Jin S., Ge H. 2009. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63: 375-379.

Guyton AC, Hall J. 2006. Tratado de Fisiología Médica. Ed. Elsevier. Décima Edición. Pp 771. 2006.

He YJ., Wu JZ., Ji MH., MA T., QIAO EQ., MA R and TANG JH. miR-342 is associated with estrogen receptor- $\alpha$  expression and response to tamoxifen in breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5: 813-818, 2013

Hirsch, BR., Zafar SY. 2011. Capecitabine in the management of colorectal cancer. *Cancer Managt Res*. 3:79-89.

Hong J., Zhou J., Fu J., He T., Qin J., Wang L., Liao L., Xu J. 2011. Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer research*, 18: 3879-3990.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer". Boletín 297, 2014 [Consultado en: <<http://www.inegi.gob.mx>>].

INC, Instituto Nacional de Cáncer, de los institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, USA. 2014. Disponible en: <<http://www.cancer.gov/español>>.

IBIS-I. International Breast Cancer Intervention Study. 2002. First results from the IBIS-I: a randomised prevention trial. *Lancet*, 360:817-24.

Imyanitov EN., Togo AV., Hanson KP. 2004. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles. *Cancer Lett*, 204(1):3-14.

- Jiménez-Salazar J., González-Núñez L, Königsberg-Fainstein M., Gómez-Quiroz L., Zentella-Dehesa A., Damián-Matsumura P. 2012. Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano. *Revista de Educación Bioquímica* 31: 49-59.
- Kang Y., Massagué J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 117:927-39.
- Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, Kubo M., Nakamura Y., Zembutsu H. 2008. Impact of CYP2D6T0 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cáncer Sci*; 99: 995-9.
- Koay D., Zerillo C., Narayan M., Harris L., DiGiovanna M. 2010. Antitumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. *Breast Cancer Research*. 12: R62.
- Kwok W., Ling M., Lee T., Lau T., Zhou C., Zhang X., Chua CW., Chan KW., Chan, FL., Glackin, C., Wong, YC., Wang, X. 2005. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Research*, 65:5153-62.
- Latarjet M., Ruiz Liard A. 2005. Anatomía Humana. México. Editorial Médica Panamericana. 4ta edición tomo 2, pp 607.
- Li QQ., Xu JD., Wang WJ., Cao XX., Chen Q., Tang F., Chen ZQ., Liu XP., Xu ZD. 2009. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Research*, 15:2657-65.

- Li J., Zhou. 2011. Activation of  $\beta$ -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*, 11: 49-60.
- Lo, H., Hsu, S., Xia, W., Cao, X., Shih, J., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., Hung, M.C. 2007. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce Epithelial-Mesenchymal Transition in cancer cells via up-regulation of Twist gene expression. *Cancer Research*, 67: 9066–9076.
- Luo G., Li J., Wen J., Zhou Y., Hu Y., Zhou J. 2008. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World Journal Gastroenterology*, 14:2487-2493.
- Maestro R., Dei Tos AP., Hamamori Y., Krasnokutsky S., Sartorelli V., Kedes L., Doglioni C., Beach DH., Hannon GJ.1999. *Genes Dev.* 1999 .1;13 (17):2207-17.
- Marchetti P., Galla D., Russo F., Ricevuto E., Flati V., Porzio G., Ficorella C., Cifone MG. 2004. Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Research*, 24:219-26.
- Martin T., Goyal A., Watkins G., Jiang W. 2005. Expression of the transcription factors Snail, Slug, and Twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol*, 12:488-96.
- Masuda N, Taguchi T, Nakayama T, Shiba E, Watatani M, Kurebayashi J, Takatsuka Y, Sakamoto J, Noguchi S; Kinki. 2008. Capecitabine and paclitaxel combination chemotherapy for inoperable or recurrent breast cancer: a phase I dose-finding study by the Kinki Breast Cancer Study

- Group. Breast Cancer Study Group (KBCSG). *Cancer Chemother Pharmacol.* 61(6):989-95.
- Matsuo N., Shiraba H., Fujikawa T., Takaoka N. Ueda N., Tanaka S., Nishina S., Nakanishi Y., Uemura M., Takaki A. 2009. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC Cáncer*, 9:240.
- Meza-Junco J., Montaña-Loza A., Aguayo-González A. 2006. Bases moleculares del cáncer. *Rev Inv Clin*, 58:56-70.
- Mironchik Y., Winnard PT., Vesuna F., Kato Y., Wildes F., Pathak, AP., Kominsky S., Artemov D., Bhujwala Z., Van Diest P., Burger H., Glackin C., Raman V. 2005. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Research*, 65: 10801-9.
- Montano M, Muller V, Trobaugh A. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: Role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*, 9:814-25.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10:5367-5374.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2014. [Consultado en: <http://www.who.int/research/es/>]
- Onder T., Gupta P., Mani S., Yang J., Lander E., Weinberg R. 2008. Loss of the E-Cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*, 68: 3645-54.

- Ou D., Chien H., Chen C., Lin T., Lin L. 2008. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Research*, 28:1355-9.
- Pang S., Yu C., Au-Yeung S., Ho Y. 2007. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 363:235-40.
- Pang S., Yu C., Guan H., Au-Yeung S., Ho Y. 2008. Impact of oxaliplatin and a novel DACH- platinum complex in the gene expression of HCT116 colon cancer cells. *Oncology Rep*, 20:1269-76.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Christian A. Rees CA, et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747-752.
- Peters G., Triest B., Backus H., Kuiper C., Vander Wilt C., Pinedo H. 2000. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *European Journal of Cancer*, 36:916-924.
- Petrelli N., Herrera L., Rustum Y., Mittelman A. 1987. Modulación bioquímica del 5-fluorouracil utilizando dosis altas de Leucovorin en carcinoma avanzado del colon y recto. *Rev del Inc*, 33:355-359.
- Puisieux A. Valsesia-Wittmann S., Ansieau. 2006. A twist for survival and cancer progression. *British Journal of Cancer*. 94: 13–17.

- Qin L., Liu Z., Chen H., Xu J. 2009. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer research*, 69:3819-27.
- Raffo D., Pontiggia O., Bal de Kier Joffé E., Simian M. 2014. Non-genomic actions of estradiol and 4-OH-tamoxifen on murine breast cancer cells. *Oncology reports*, 33: 439-447.
- Rajput S., Kumar P., Sarakar S., Das S., Azab B., Santhekadur P., Das S. Emdad L., Sarkar D., Fisher P. 2013. Targeted apoptotic effects of thymoquinone and Tamoxifen on XIAP mediated AKT regulation in breast cancer. *Plos one*. e61342.
- Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Luber B., Busch R., Hofler H., Becker KF. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol*, 161:1881-91.
- Riggins R., Schrecengost R., Guerrero M., Bouton A. 2007. Phathways to Tamoxifen resistance. *Cancer Letters*, 256:1-24.
- Salami S., Karami-Tehrani F. 2003. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin Biochem*, 26:247-253.
- San Miguel Sámano M., Vargas E., Martínez A. 2004. Interacciones entre medicamentos. *Real Academia Nacional de Farmacología*, 70:147-179.
- Sánchez-García I. 2009. The Crossroads of Oncogenesis and Metastasis. *N Engl J Med*, 360:297-9.

- Shang Y, Brown M. 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, 295:2465-8.
- Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Terauchi M, Yamamoto E, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. 2008. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Ann Oncol*. 1:81-5.
- Smit M., Geiger T., Song J., Gitelma I., Peeper D. 2009. A Twist-snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation anoikis resistance and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29:3722-3737.
- Sosic D., Olson E., 2003. Modulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Cell cycle*, 2:76-78.
- Soini Y., Tuhkanen H., Sironen R., Virtanen I., Kataja V., Auvinen P., Mannermaa A., Kosma V. 2011. Transcription factors Zeb1, Twist and Snai1 in breast carcinoma. *BMC cancer*, 11:73.
- Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. 1994. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol*, 159:229–37.
- Stasinopoulos I., Mironchik Y., Raman A., Wildes F., Winnard P., Raman V. 2005. Hoxa5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 280, 2294–2299, 2005.
- Terán J., Teppa A. 2005. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): bioquímica, farmacología y aplicación en ginecología. *Ginecología Obstetricia México*, 73:424-435.
- Valdés-Mora F., Gómez del Pulgar T., Bandrés E., Cejas P., Ramírez de Molina A., Pérez-Palacios R., Gallego-Ortega D., García-Cabezas M.A, Casado

- E., Larrauri J., Nistal M., González-Barón M., García-Foncillas J., Lacal J.C. 2009. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol*, 16:78-87.
- Veronesi U., Maisonneuve P., Sacchini V., Rotmensz N., Boyle P. 2002. Tamoxifen for breast cancer among hysterectomised and the Italian Tamoxifen Study Group women. *Lancet*, 359:1122-4.
- Vesuna F., Diest P., Chen J., Raman 2008. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 367: 235–241.
- Vesuna F., Lisok A., Kimble B., Raman V. 2009. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, 11:1318-1328.
- Vinod B., Anthony J., Nair H., Puliappadamba V., Saikia M., Naratnan S., Bevin A., Anto J. 2013. Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death and Disease*, 4: e505.
- Watanabe O., Imamura H., Shimizu T., Kinoshita J., Okabe T., Hirano A., Yoshimatsu K., Konno S., Aiba M., Ogawa K. 2004. Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Research*, 24:3851-6.
- Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT, Wong YC. 2004. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene*. 23(2):474-82.
- Watson A., Ylagan L., Trinkaus K., Gillanders W., Naughton M., Weilbaecher K., Fleming T.P., Aft R.L. 2007. Isolation and molecular profiling of bone

marrow micrometastases identifies TWIST1 as a marker of early tumor relapse in breast cancer patients. *Clinic Cancer Research*, 5001:13-17.

Wei J., Zou Z., Qian X., Ding Y., Xie L., Sanchez JJ., Zhao Y., Feng J., Ling Y., Liu Y., Yu L., Rosell R., Liu B. 2008. ERCC1 mRNA levels and survival of advanced gastric cancer patients treated with a modified FOLFOX regimen. *British Journal of Cancer*, 98:1398-1402.

Weigelt B, Glas AM, Wessels LFA, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. 2003. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15901-15905.

Wu J., Fackler M., Halushka M., Molavi D., Taylor E., Teo W., Griffin C., Fetting J., Davidson N., De Marzo A., Hicks J., Chitale D., Ladanyi., Sukumar S., Argani P. 2011. Heterogeneity of Breast Cancer Metastases: Comparison of Therapeutic Target Expression and Promoter Methylation Between Primary Tumors and Their Multifocal Metastases. *Human Cancer Biology*, 14:1938-1946.

Xu J., Azzariti A., Colucci G., Paradiso A. 2003. The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacology*, 52:442-8.

Yang J., Mani S., Donaher J., Ramaswamy S., Itzykson R., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg RA. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cellular*, 117:927-939.

Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. 2008. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj*, 76:87-93.

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S. 1999. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of Bcl-2, but not Bax and Bcl-XL, without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res.* 10:2971-7.

Zhao H., Ooyama A., Yamamoto M., Ikeda R., Haraguchi M., Tabata S., Furukawa, T., Che XF, Zhang S., Oka T., Fukushima M., Nakagawa M., Ono M., Kuwano M., Akiyama S. 2008. Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-fluorouracil. *Cancer Research*, 68:7035-4.