



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana



EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES SOBRE EL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TWIST EN CÉLULAS DE CÁNCER TRATADAS
CON 5-FLUOROURACILO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Q.F.B. Jesica Esther Escobar Cabrera

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe García Alcocer

SINODALES

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Sinodal

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Sinodal

Dra. Laura Cristina Berúmen Segura
Sinodal

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola
Sinodal

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Biol. Jaime Ángeles Ángeles
Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio, 2011
México

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por el incremento en la proliferación celular, en la que los pacientes frecuentemente presentan malnutrición. Entre los tratamientos para el cáncer se encuentra la quimioterapia, la cual induce desnutrición, que ocasiona una menor respuesta y tolerancia al tratamiento. Entre los métodos para eliminar el cáncer de mama se encuentra la quimioterapia con 5-Fluorouracilo (5-Fu), que inhibe la síntesis proteica y la duplicación del DNA. Se ha reportado que en el cáncer de mama aumenta el factor de transcripción Twist, el cual participa en la regulación de la migración celular, y ha sido asociado con el desarrollo de metástasis. Con base en lo anterior, en este trabajo se estudió en cultivos de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, el efecto de la desnutrición y el tratamiento con 5-Fluorouracilo, en la presencia y distribución de la proteína Twist por inmunocitoquímica y Western blot. Los resultados indicaron que la deficiencia de aminoácidos no esenciales y el tratamiento con 5-Fu inhiben la movilidad de Twist del citoplasma hacia el núcleo. El estado de desnutrición, específicamente por falta de aminoácidos no esenciales y el tratamiento con 5-Fu podrían afectar la función de Twist en las células cancerosas, al modificar su distribución celular.

(Palabras clave: Twist, desnutrición, 5-Fluorouracilo, cáncer)

SUMMARY

Breast cancer is caused by proliferation of cells without control on its mechanisms in these cases the patients had malnutrition signs. There are several treatments to cancer eliminate, one of this is chemotherapy which cause malnutrition and cause less response and intolerance to the treatment. The treatment with 5-Fluorouracil (5-Fu) drug inhibits the protein and DNA synthesis. There are reports about the increase of transcription factor Twist in breast cancer, this protein participate in cell migration regulation and is associated with metastasis. In this work we studied in MDA-MB-231 cells cultures, the effect of malnutrition and 5-Fu treatment on distribution and presence of Twist by immunocytochemistry and Western blot methods. These results showed the inhibition of mobility of Twist of cytoplasm to nucleus by effect of depletion of non essential amino acids and 5- fluorouracil. Those showed the sensibility of Twist to depletion nonessential amino acids and drugs like 5-Fu, which suggest the possibility of cancer decrease associated to this transcription factor.

(Key words: Twist, malnutrition, 5-Fluoruracil, cancer)

DEDICATORIAS

A mi hija SAMANTHA, el tesoro más preciado de mi vida, que ha sido mi luz desde el primer día de su existencia.

A mi esposo RICARDO, mi compañero y cómplice en este fascinante viaje.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme existir y cruzar en mi camino a cada una de las personas que marcaron una diferencia en mi vida.

A Ricardo, por el amor, comprensión y apoyo incondicional durante tantos años.

A Sami, por regalarme una sonrisa y un “Te amo mamá”, aún cuando robé tantos minutos de su tiempo.

A mi padre Juan, por su apoyo, disciplina y enseñanzas de la vida.

A mi madre Esther, por su ejemplo de fortaleza y actitud de lucha ante la vida, sin dejar de apreciar lo más valioso “la familia”.

A mis hermanos Diana, Alberto, David y Abigail: por compartir los momentos más significativos de nuestra vida.

A toda mi familia, por su presencia y compañía.

A la Dra. Guadalupe García Alcocer por ser una gran guía en mi vida personal y profesional, a quien agradezco profunda e infinitamente el haber entrado a mi vida.

A la Dra. Laura Berúmen y la Dra. Angelina Rodríguez por todos sus consejos personales y profesionales, por formar parte de las personas que me inspiran superación y amor a la vocación.

A la Dra. Teresa García Gasca y la Dra. Araceli Anaya por sus valiosas aportaciones para la realización del presente trabajo y por ser ejemplos a seguir.

A mis compañeras de laboratorio, Karla y Sarai, por su atención y palabras de aliento en momentos difíciles.

A todos mis compañeros y amigos, que con sus acciones y palabras hicieron más interesante y placentero el trayecto.

CRÉDITOS

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de la Unidad de Investigación Genética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe García Alcocer.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	lii
Agradecimientos	lv
Créditos	v
Índice	vi
Indice de cuadros	viii
Indice de figuras	lx
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
Desnutrición y cáncer	2
Twist en el cáncer y la metástasis	7
Fármacos antineoplásicos	11
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos Específicos	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	16
Reactivo	16
Materiales	16
Equipo	16
Métodos	17
Descontaminación del cuarto de cultivo	17
Expansión de la línea celular	17
Evaluación de los Aminoácidos No Esenciales	18
Evaluación del 5-Fu	19
Inmunocitoquímica	19
Western blot	20
Análisis Estadístico: ANOVA y Prueba de Tukey	21

	Diseño Experimental	22
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
VII.	CONCLUSIONES	40
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	41

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño Experimental	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto de la disminución del SFB y ASB en la viabilidad celular.	25
2	Evaluación de la viabilidad celular por efecto de la disminución de aminoácidos no esenciales.	27
3	Efecto del 5-Fluorouracilo en la viabilidad celular.	30
4	Efecto de la disminución de los Aminoácidos No Esenciales y el 5-Fu en la viabilidad celular.	31
5	Células negativas y positivas en la inmunocitoquímica.	33
6	Distribución de Twist en la célula.	33
7	Porcentaje de células con presencia de Twist por tratamiento.	34
8	Distribución celular de Twist por tratamiento.	36
9	Cantidad de Twist en cada tratamiento.	39

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por el incremento en la proliferación celular, los pacientes con esta enfermedad frecuentemente presentan malnutrición por distintos factores, uno de ellos es el tratamiento antineoplásico. Entre los tratamientos para el cáncer se encuentra la quimioterapia, la cual induce desnutrición, lo que ocasiona una menor respuesta y tolerancia al tratamiento (García-Luna *et al.*, 2006). En las células cancerosas se presentan cambios en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación celular, provocando la invasión de estas células en tejidos adyacentes, así como su desplazamiento a otros que se encuentran a distancia, proceso conocido como metástasis (Flórez, 2004). Durante la metástasis la célula activa genes como los que codifican para el factor de transcripción Twist, el cual participa en la regulación de la síntesis de proteínas que intervienen en la migración celular favoreciendo la metástasis (Meza-Junco *et al.*, 2006). La producción de proteínas en células cancerosas, puede estar alterada por la acción de los fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento del cáncer, entre los cuales se encuentra el 5-Fluorouracilo. Este fármaco por su similitud con la base nitrogenada uracilo se introduce en la cadena de RNA inhibiendo la síntesis de proteínas, además de impedir la síntesis de nucleótidos de timina al bloquear la timidilato sintasa, evitando consecuentemente la duplicación de DNA (Matuo *et al.*, 2009). En este trabajo se estudió en cultivos celulares de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, el efecto de la disminución en los aminoácidos no esenciales y el tratamiento con 5-Fluorouracilo, tanto en la viabilidad celular, como en la presencia y distribución del factor de transcripción Twist por inmunocitoquímica y Western blot, con objeto de conocer la influencia de la desnutrición sobre esta línea celular y su efecto sobre la disminución de riesgo de metástasis. Lo anterior permitiría considerar su aplicación a futuro para mejorar los tratamientos existentes o crear nuevas combinaciones farmacológicas modificando el estado nutricional del paciente con cáncer que aumente la esperanza de vida.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Desnutrición y Cáncer

La desnutrición, generalmente observada por una disminución de peso, es caracterizada por el deterioro de la composición corporal, consecutivo al balance energético/proteico negativo relacionado con cambios fisiológicos, bioquímicos e inmunitarios (Hernández *et al.*, 2008). En la desnutrición se presenta una depleción de los nutrientes, la cual puede ser ocasionada por una ingesta inadecuada en una situación de aumento de los requerimientos (Gómez *et al.*, 2004). La desnutrición es una complicación muy frecuente en los pacientes oncológicos (Conde *et al.*, 2008) y está relacionada con el tumor, con el tratamiento y con el mismo paciente. Algunas de las causas de la desnutrición son el escaso aporte de nutrientes y el aumento de las necesidades, así como alteraciones en su digestión, absorción y metabolismo. Existe una doble relación entre la nutrición y el cáncer, ya que por un lado una inadecuada alimentación aumenta la incidencia de cánceres específicos (aproximadamente el 30-40% de los cánceres en hombres tiene relación con la alimentación, y hasta el 60% en el caso de las mujeres) (García- Luna *et al.*, 2006). Por otra parte el propio cáncer y sus tratamientos pueden inducir la aparición de la malnutrición, que se ha reportado hasta en el 40-80% de los pacientes neoplásicos en el curso de la enfermedad, lo cual aumenta la morbi-mortalidad y disminución en la calidad de vida (Conde *et al.*, 2008).

El tratamiento antineoplásico como la cirugía, la radioterapia y principalmente quimioterapia provocan la desnutrición, que induce la disminución de la masa muscular y conlleva a la pérdida de fuerza asociada a una menor respuesta a la radio y quimioterapia o a una peor tolerancia de éstas, e incluso con una menor sobrevivencia a la enfermedad. La aparición de los síntomas de la enfermedad está dada por diversos factores, como el tipo de fármaco empleado, el esquema del tratamiento ya sea mono o

poliquimioterapia, la dosis, la duración y las terapias adicionales, además de la susceptibilidad individual de cada paciente en la que influye el estado clínico y nutricional previo. Los efectos adversos de la quimioterapia como las náuseas, vómitos, alteraciones del gusto, mucositis, producen una disminución de la ingesta oral, desequilibrios electrolíticos, debilidad general y pérdida de peso. La malnutrición energético/proteica en estos pacientes afecta su inmunocompetencia, principalmente la inmunidad celular y aumenta el riesgo de complicaciones infecciosas, que es una importante fuente de morbilidad en este grupo de pacientes. En el estudio NUPAC sobre el estado nutricional de pacientes con cáncer avanzado o metastásico realizado en 781 pacientes hospitalizados o ambulatorios durante el 2000-2001, se utilizó la Valoración Global Subjetiva, la cual mostró que el 42.25 % de los pacientes sufrían anorexia, el 52% malnutrición severa o riesgo de padecerla y que el 83.6% necesitó una intervención nutricional (García- Luna *et al.*, 2006). En los estudios del análisis de 3047 pacientes enrolados en 12 protocolos diferentes de quimioterapias del Grupo Oncológico de la Cooperativa de Oriente para correlacionar la pérdida de peso con la respuesta a la quimioterapia, se observó una disminución en la tasa de respuesta a la quimioterapia, así como al índice de supervivencia, al aumentar el número de metástasis (Dewys *et al.*, 1980).

Las células cancerosas incrementan la vía anabólica para satisfacer sus requerimientos metabólicos asociados con su alta tasa de crecimiento. Las células transformadas captan y metabolizan nutrientes como la glucosa y algunos aminoácidos como la glutamina, para soportar la síntesis de nucleótidos de *novo* durante su proliferación (Tong *et al.*, 2009), esto trae como consecuencia la alteración de procesos relacionados con vías de transducción de señales. Estos estudios fueron confirmados por Chotechuan *et al.*, en el 2009, cuando observó que una alta concentración de aminoácidos, intervenía en la regulación de vías de transducción de señales, en un cultivo primario de hepatocitos, con el método de Western blot.

La restricción de aminoácidos como tirosina y fenilalanina tiene un impacto positivo en las terapias antineoplásicas (Norris *et al.*, 1990), al inhibir la metástasis del melanoma de leucemia, hepatocarcinoma y carcinoma de pulmón en roedores (Pine, 1981; Abdallah *et al.*, 1987; Elstad *et al.*, 1990), además de suprimir la expresión del fenotipo metastático del melanoma e inhibir la invasión de células de melanoma a través de la matriz extracelular reconstituida (Elstad *et al.*, 1990; Uhlenkott *et al.*, 1996; Pelayo *et al.*, 1999; Pelayo *et al.*, 2001). Esta inhibición puede estar dada por el control en la expresión de genes y su función, ya que algunos genes contienen elementos de respuesta a aminoácidos en su región promotora (Bruhat *et al.*, 2000; Fafournoux *et al.*, 2000) como lo son el gen de la colagenasa y el gen de la metaloproteinasa que responden a la deprivación de aminoácidos, disminuyendo la invasión del tumor y la metástasis (Varga *et al.*, 1994). También se ha observado que la restricción de estos aminoácidos incrementa la respuesta del melanoma murino hacia los agentes quimioterapéuticos y previene el desarrollo de resistencia al fármaco (Meadows *et al.*, 1986; Elstad *et al.*, 1996).

Por lo anterior, es importante considerar la complementariedad entre el tratamiento nutricional y el tratamiento quimioterapéutico ya que el estado nutricional influye en la tolerancia al tratamientos antineoplásico (García- Luna *et al.*, 2006).

Los cambios nutricionales pueden modificar la respuesta de los tratamientos antineoplásicos, lo cual es importante debido a que el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial, al cual se le han atribuido 7.9 millones de defunciones por año. En el 2008 los tipos de cáncer que mostraron mayor prevalencia de mortalidad en el mundo fueron el cáncer de pulmón, seguido por el de estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011). En México en el 2008 el cáncer fue la segunda causa de muerte en mujeres y la tercera en hombres. Particularmente en el 2008 el cáncer de mama ocupa el primer lugar

con un 7.6% del total de defunciones de mujeres a nivel nacional, seguido por tumores malignos de ovario (INEGI, 2011).

El cáncer se desarrolla a partir de células que han sufrido una serie de modificaciones genéticas, que 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).

En el cáncer las células sufren cambios en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación. La rápida proliferación provoca la invasión de éstas células a tejidos adyacentes y conducen a la compresión de estructuras vecinas como nervios o vasos sanguíneos, que dan como consecuencia la migración celular a otros órganos donde posteriormente crecerán y proliferarán nuevamente, a este proceso se le llama metástasis (Flórez, 2004). El tumor secundario producido por la metástasis es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario. Existen 3 formas en las que el cáncer se disemina en el cuerpo, una es invadiendo el tejido normal que lo rodea, otra por invasión del sistema linfático circulando a través de sus vasos hasta llegar a otros lugares en el cuerpo y por último mediante la circulación sanguínea por venas y capilares (INC, 2009).

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. 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-mesenquimal, rescatar la naturaleza epitelial y la formación de macrometástasis (Cheng *et al.*, 2008b).

Cuando la célula tiene mutaciones en su DNA puede tener alterados genes específicos que predisponen a las células a ser cánceres más agresivos como BRCA1, BRCA2 y p53. Éstos participan en la respuesta celular cuando hay daño al DNA, y cuando existe este daño el organismo induce 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 que por mutaciones puntuales pueden cambiar un aminoácido específico de la proteína con lo cual puede inhibir su función. 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 considerado 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 *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. Estos genes se expresan para responder a las señales de proliferación/diferenciación. Existen otros genes como el gen *Rb*, cuya pérdida de función se asocia a la aparición de varios tipos de cánceres como de próstata, mama y pulmón. El gen que codifica para la proteína *Rb* es un factor de transcripción y es el blanco de inactivación de los productos proteínicos de los virus tumorales DNA como el papiloma virus, adenovirus E1A, durante la oncogénesis. Otro gen importante es el gen *p53* que es un supresor de tumores y la pérdida de su 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 en el cáncer y la metástasis

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 epitelio-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 epitelio- 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 a la proteína RhoC en células cancerosas de melanoma temprano y a la proteína AKT2 en líneas celulares altamente invasivas MCF7-14 y MDA-MB-435-14, en las que estaba la proteína al compararlas con las líneas celulares bajamente invasivas MCF7 y MDA-MB-435. Estudios similares han reportado a STAT3, Twist y AKT2 en líneas celulares MCF7-14 y MDA-MB-435-14 como un grupo funcional para la regulación central de propiedades oncogénicas de células cancerosas (Cheng *et al.*, 2008a).

El gen Twist codifica a un factor de transcripción del tipo hélice-loop-hélice (bHLH). Existen 2 isoformas el Twist 1 y el Twist 2 que son los principales reguladores de la embriogénesis. Las proteínas bHLH 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 que específicamente se une a una secuencia hexonucleótida (CANNTG) referidas como cajas E, las cuales han sido encontradas como elementos de regulación de muchos genes específicos. Consistentemente las 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).

La proteína Twist se ha encontrado elevada en distintos cánceres como el de mama, próstata y gástrico (Rosivatz *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004; Kwok *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005). También se ha encontrado presente en otros tejidos como en cáncer de cuello y cabeza (Ou *et al.*, 2008) e incluso en cáncer colorrectal (Valdés *et al.*, 2009) y se ha visto implicada en la

diferenciación de múltiples líneas celulares como músculo, cartílago y células osteogénicas (Socic y Olson, 2003).

En células cancerosas se ha demostrado que Twist 1 favorece la migración celular induciendo la metástasis, al darle la capacidad a las células de realizar la transición epitelio-mesenquimal (Kang y Massagué, 2004). También se ha observado que Twist 1 y/o Twist 2 se encuentran sobre-expresados en varios tumores humanos inhibiendo las vías de p53 y Rb (reguladores de la división celular normal) provocando la anulación de la senescencia prematura inducida por éstos. Además Twist participa en la expresión del gen y en la síntesis de la proteína Ras transformando los fibroblastos embrionarios de ratón y que junto con ErbB2 inducen la transición epitelio-mesenquimal de las células epiteliales favoreciendo la metástasis (Sánchez-García, 2009).

Otros estudios señalan que la capacidad de las proteínas codificadas por Twist 1 para suprimir la expresión de E-cadherina (molécula de adhesión intercelular) es fundamental en los procesos que implican la migración celular (Lo *et al.*, 2007).

En la investigación referida a la inducción de la transición epitelio-mesenquimal, se reportó que dicha transición inmortaliza células epiteliales mamarias humanas por expresión de Twist y otras proteínas, que fueron capaces de generar células de cáncer (Sánchez-García, 2009).

En células de cáncer de mama se han realizado estudios como el de Fackler *et al.*, 2003 quienes demostraron por el método 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. En la investigación realizada por Watson *et al.*, 2007 observaron una intensa presencia de Twist en las micrometástasis en médula ósea de pacientes con cáncer de mama por

Western blot. Yang *et al.*, en el 2004 reportaron una sobreexpresión de Twist en mujeres que padecían cáncer de mama lobular. Cheng *et al.*, en el 2007 demostraron que dicho factor de transcripción funciona como un regulador de la metástasis cancerosa, al encontrar en células de cáncer de mama, una alta expresión de genes que participan en la invasión de células cancerosas.

En el estudio realizado en tejido de cáncer de mama utilizando inmunocitoquímica y Western blot, se observó que la proteína Twist estaba elevada en tejido canceroso al compararlo con el tejido no neoplásico (Gort *et al.*, 2008). Estos estudios son consistentes con los reportados por Martin *et al.*, 2005 quienes encontraron una relación de Twist con metástasis, ya que participa en migración celular, regulación del ciclo celular y apoptosis, así como la regulación de las E-cadherinas. Así mismo Vesuna *et al.*, en el 2008 encontraron que Twist reprime la transcripción del gen de las E-cadherinas en células de cáncer de mama MCF-7 y Hs578, favoreciendo la migración celular por análisis de inmunoblot. Al aumentar la expresión de Twist disminuye la expresión de E-cadherinas aumentando la invasión celular y la metástasis, en ratones con cáncer de mama (Qin *et al.*, 2009).

En la línea celular MCF-7 de cáncer de mama se ha observado una sobreexpresión de Twist alterando su morfología a la de un fibroblasto, además mostró una inducción de angiogénesis y promoción de la transición del epitelio mesenquimal, lo cual es necesario para la transformación de las células en invasivas (Mironchik *et al.*, 2005).

En la prueba de resistencia al fármaco antineoplásico paclitaxel en la línea celular humana NOS2-PR, se observó que Twist se encuentra elevado y que es un factor de transcripción que regula la transición epitelio-mesenquimal (Kajiyama *et al.*, 2007). Los elevados niveles de las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesenquimal, incluyendo Twist, ha sido asociado con un estadio avanzado del tumor y un mal pronóstico en una variedad de tipos de

cáncer (Cheng *et al.*, 2008b). Por lo tanto, es posible que la detección y disminución de la expresión de este tipo de proteínas como Twist, sea capaz de identificar a los pacientes que puedan beneficiarse de una quimioterapia más agresiva o de otros esquemas terapéuticos (Sánchez-García, 2009).

Fármacos antineoplásicos

El factor de transcripción Twist está elevado en células cancerosas y es importante conocer si se ve modificado con los tratamientos 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 de la cantidad de proteínas que intervienen en la regulación de la proliferación y ciclo celular. Balín *et al.*, 2008 observaron en líneas celulares HCT-8 y HCT-116 de cáncer de colon que el fármaco oxaliplatino forma aductos de DNA-platino lo cual fue asociado a la disminución de la presencia 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.

En la investigación realizada por Guichard *et al.*, en el 2001 se observó que el agente quimioterapéutico 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 DNA. 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 Western blot, espectrometría de masas y ELISA (Xu *et al.*, 2003). En el estudio realizado por Pang *et al.*, en el 2007 se evaluó la capacidad de la dimetilcantaridina-platino, del oxaliplatino y del carboplatino, para inducir daño al DNA de células de cáncer colorectal HCT116, 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.*, en el 2004 se reportó una

asociación entre la sobrerregulación 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.

El fármaco antineoplásico 5-Fluorouracilo (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. Se observó que los pacientes tratados con irinotecan-5-Fluorouracilo-leucovorina, con deficiencia en la reparación de emparejamiento del DNA en los tumores, mostraron una mejoría de 5 años en la supervivencia libre de enfermedad comparados con los tumores de pacientes no tratados (Bertagnolli *et al.*, 2009). El efecto citotóxico del 5-Fluoracilo se le atribuye principalmente a la incorporación de fluoronucleótidos dentro del DNA y el RNA durante su síntesis y a la inhibición de la timidilato sintasa, induciendo un arresto celular en G1/S y en G2/M, presentado un efecto clastogénico (Matuo *et al.*, 2009). En la investigación realizada por Zhao *et al.*, en el 2008 observaron con Western blot e inmunohistoquímica, 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 de inducir la fosforilación de la MAPK p38 y la proteína 27 de choque térmico.

En pacientes con cáncer gástrico tratados con 5-Fluorouracilo-oxaliplatino y ácido folínico se observó una alteración en la expresión de la timidilato sintasa (TS) (Wei *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado una disminución de Twist 1 en células de cáncer de mama tratadas con adriamicina, promoviendo p21 dependiente de p53 y provocando la disociación de p53 con Mdm2 *in vivo* (Li *et al.*, 2009). La exposición de células de colon HT29 al 5-FU (50 y 100uM) en combinación con raltritexed (50 y 100nM) 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).

Al utilizar fármacos antineoplásicos se logra alterar la síntesis de proteínas que participan en el cáncer, entre las cuales se encuentra Twist, lo

que posiblemente podría disminuir su síntesis por la acción del tratamiento con 5- Fluorouracilo; este efecto podría potencializarse al depletar los aminoácidos no esenciales los cuales conforman en un 68% a esta proteína, la disminución de este factor de transcripción en un modelo *in vivo* podría reducir el riesgo de metástasis asociada a esta proteína.

III. HIPÓTESIS

La deficiencia de aminoácidos no esenciales y el 5-Fluorouracilo disminuyen la proteína Twist en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en la presencia y distribución de la proteína Twist inducidos por deficiencia de aminoácidos no esenciales y por efecto del 5-fluorouracilo en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la deficiencia de aminoácidos no esenciales en la viabilidad celular.
- Determinar el efecto del 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231.
- Explorar por inmunocitoquímica la distribución de Twist en la línea celular MDA-MB-231, por efecto de la deficiencia de aminoácidos no esenciales y el tratamiento con 5-Fluorouracilo.
- Determinar por Western blot el efecto de la restricción de aminoácidos no esenciales y la acción del 5-Fu sobre la presencia de Twist en células de cáncer de mama.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Cultivo Celular: Línea Celular MDA-MB-231, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Aminoácidos no esenciales 100X (AANE), Suero Fetal Bovino (SFB), L-Glutamina 100X, Penicilina-Estreptomicina, Tripsina con EDTA al 0.05%, todos obtenidos de GIBCO.

Inmunocitoquímica y Western Blot: Buffer de fosfatos salino (PBS, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, KHPO₄, pH.7.2) 1X, Buffer de fosfatos salino con tritón al 0.5% (PBT; NaCl, KCl, NaH₂PO₄, KHPO₄, Tritón 0.5%, pH.7.2), leche al 3% (BIO-RAD), peróxido de hidrógeno al 1% (J.T. BAKER), diaminobencidina (SIGMA), glicerol (USB), solución de acrilamida-N'N'-bisacrilamida (30%;0.8%), amortiguador 1.5 M Tris-HCl pH:8.8, amortiguador 0.5M Tris-HCl, pH. 6.8, SDS 10%, amortiguador Tris pH:8.3, Tris-Hcl 0.5M pH. 6.8, persulfato de amonio 10%, amortiguador Tris 25mM-glicina 192 mM-metanol 20% pH. 8.3. (Todos obtenidos de BIO-RAD), anticuerpo primario hecho en conejo anti-Twist (Sta. Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-conejo-peroxidasa (Sta. Cruz Biotechnology).

Material

Microplacas p12 para cultivo celular, cajas petri p100 (NUNC), pipetas estériles desechables 10 ml, puntas estériles de 10, 200 y 1000 ul (RAININ), filtros para jeringa 0.22 um, cubreobjetos.

Equipo

Ultracongelador -70°C (REVCO, Alemania), Refrigerador 4/-20°C (MAYTAG, Canadá), Campana de flujo laminar (Labconco Delta, USA), Incubador de CO₂ (Labline, USA), Centrífuga refrigerada Allegra 64-R (Beckman Coulter, USA), Microscopio invertido (Zeiss, Alemania), microscopio óptico (Zeiss, Alemania),

Cámara de electroforesis (BIO-RAD, USA), cámara de revelado Hypercassette (Amersham, Reino Unido), Micropipetas 2, 20, 200 y 1000 ul (Gilson, USA).

Métodos

Descontaminación del cuarto de cultivo

Se encendió la campana de flujo laminar durante 15 minutos, se desinfectó con una gasa impregnada con etanol al 70% limpiando las paredes internas de arriba hacia abajo, posteriormente se limpió la base de la campana de atrás hacia delante. Todos los materiales que estuvieron dentro de la cabina se limpiaron con alcohol al 70% y al terminar se encendió la lámpara Ultravioleta dejándola actuar durante 15 minutos. Al trabajar dentro de la campana se evitó realizar movimientos bruscos para evitar corrientes de aire que pudieran contaminar el cultivo.

La incubadora se descontaminó con etanol al 70%, posteriormente se colocó una charola con agua estéril en el fondo de la incubadora creándose una humedad del 95-97%, adicionándose una mezcla de soluciones antimicóticas y antibacterianas para evitar contaminaciones. La incubadora se calibró a una temperatura de 37°C y un 5 % de CO₂.

La centrífuga, el baño de agua, el microscopio invertido y otros materiales fueron desinfectados con alcohol al 70% para evitar contaminaciones.

Expansión de la línea celular

La línea celular utilizada fue la MDA-MB-231 de cáncer de mama metastásico, obtenida de pleura, fue adquirida de la ATCC. El tubo eppendorf que contuvo las células se descongeló rápidamente en baño María (37°C). Una

vez descongeladas se tomó una alícuota y se sembró en una caja petri que contenía 10 ml de Medio Eagles Modificado por Dulbecco's (D-MEM), 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de L-glutamina 200mM, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina 10 000 UI/ml-estreptomomicina 10 000ug/ml). Se incubaron a 37° C con CO₂ al 5% y una humedad de 95%, se dejaron crecer hasta el 80-90% de confluencia (48 horas), posteriormente se lavaron con buffer de fosfatos salino (NaCl, KCl, NaH₂PO₄, KHPO₄) y se disgregaron con tripsina al 0.05% en EDTA, se alicuotó en tubos de 1 ml de capacidad con 10% de DMSO y 20% de SFB, congelándose a -70° C.

Para evitar el efecto de los componentes del suero sobre el crecimiento celular se evaluó el Suero Fetal Bovino (SFB) al 2% y la utilización de Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 0.5%, y se seleccionó el que indujo menor modificación en el crecimiento celular, al compararse con el control (SFB al 10%). El tiempo de cultivo para todos los experimentos fue de 48 horas, que es el tiempo que toma en llegar al 90% de confluencia un cultivo control con 10% de SFB.

Evaluación de los Aminoácidos No Esenciales (AANE)

Para determinar la concentración de aminoácidos no esenciales a utilizar en el medio de cultivo, se evaluó la viabilidad celular con la concentración óptima de AANE (1%, grupo control), con la mitad de la concentración óptima (0.5%) y la depleción de éstos aminoácidos (0%). Para este análisis se sembraron 30 000 células por pozo en placas P12 para cada tratamiento por triplicado, dejándose crecer hasta que el grupo control alcanzara el 90% de confluencia (48 horas). Posteriormente las células fueron tripsinizadas y contadas en una cámara de Neubauer. Se determinó la viabilidad con azul tripán al 0.4%.

Evaluación del 5-Fluorouracilo (5-Fu)

A partir del subcultivo se tomó una alícuota de 30,000 células y se sembró en cada pozo de las placas (P12) con medio de cultivo D-MEM, AANE, L-Glutamina, penicilina-estreptomocina, SFB, agregándose la concentración correspondiente del 5-Fu, se creció hasta llegar al 90% de confluencia (48 horas). Se evaluaron diferentes concentraciones de 5-Fluorouracilo (5, 50, 100 y 200uM) para determinar la concentración a utilizar durante el estudio. Se determinó crecimiento y viabilidad celular en cada concentración.

Inmunocitoquímica (ICQ)

La presencia de la proteína Twist en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se identificó mediante el uso de anticuerpos específicos para la proteína. Para esto se sembraron células en un portaobjetos dentro de una caja petri dejándolas crecer hasta un 90% de confluencia, posteriormente se lavó el portaobjetos con las células y se fijó con paraformaldehído al 4% y se realizó la inmunocitoquímica. Las células se lavaron 3 veces con un buffer de fosfatos salino (PBS) con un pH de 7.4 durante 10 minutos cada lavado, se inactivó la peroxidasa endógena utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 1 hora. El exceso de de peróxido se eliminó con PBS y posteriormente se bloqueó la señal inespecífica con leche al 3% en un buffer de fosfatos salino con tritón (PBT). Por último se incubó con el anticuerpo primario anti-Twist a una dilución 1:200, dejándolo actuar toda la noche.

Al siguiente día las células se lavaron con PBT para quitar el anticuerpo primario restante y se realizó una segunda incubación con el anticuerpo secundario anticonejo-peroxidasa, posteriormente se lavaron con PBT, se reveló la marca inmunoreactiva con el cromógeno diaminobencidina, se montó la laminilla en glicerol y se observó al microscopio para identificar la presencia de Twist, y su distribución subcelular. Se analizaron 250 células de cada grupo,

clasificándose por localización de la marca reactiva en: núcleo, citoplasma, núcleo-citoplasma y células sin marca. Cada grupo de experimentos se reprodujo al menos tres veces.

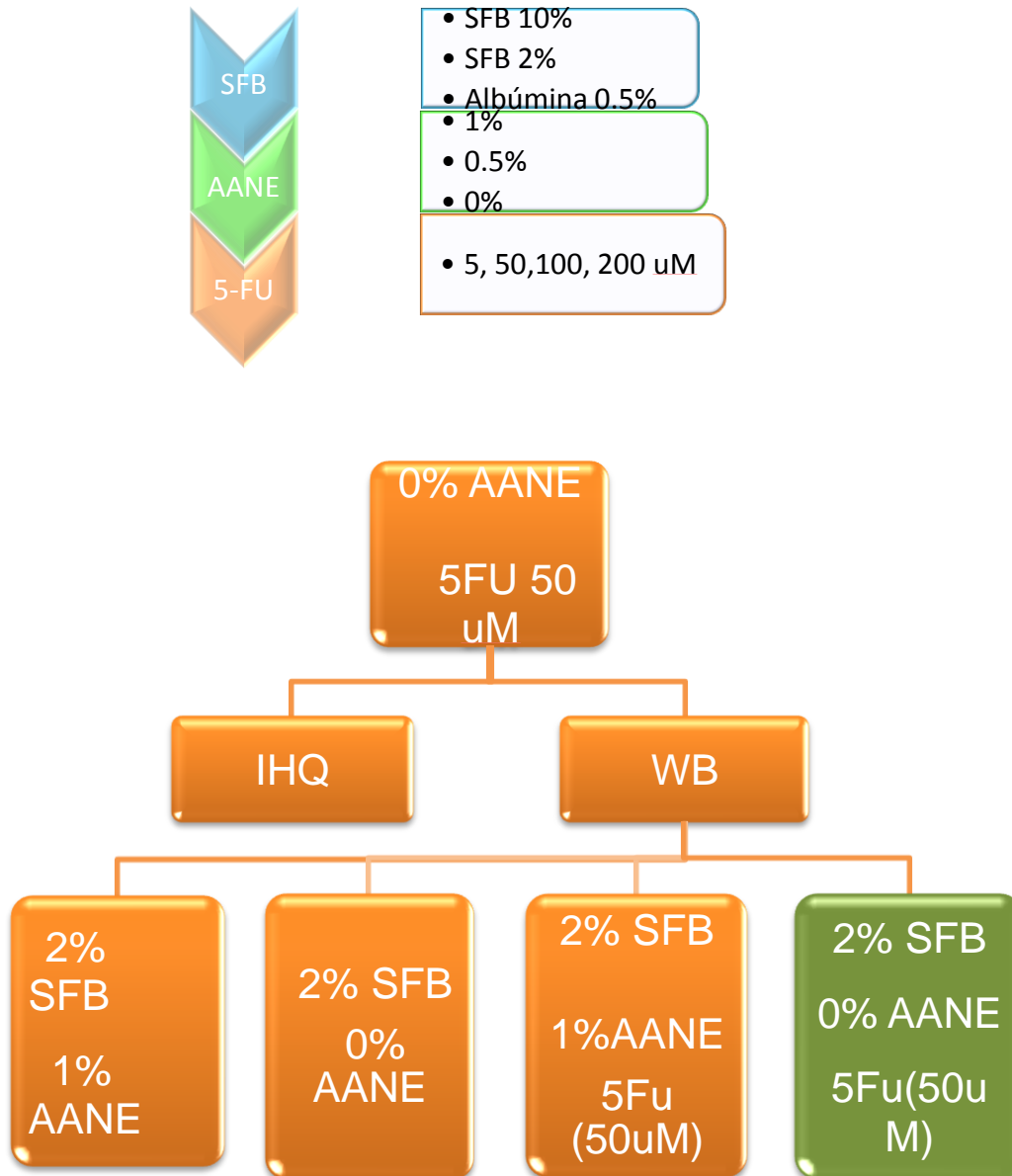
Western blot (WB)

Para esta técnica se realizó un cultivo celular con los grupos experimentales en las mismas condiciones que la inmunocitoquímica. Una vez obtenidas las células, se centrifugaron y se obtuvo un pellet el cual fue pesado y posteriormente se le agregó buffer de lisis (Tris-HCl, BIO-RAD) y un cocktail de inhibidores de proteasas comercial (tabletas complete mini de Roche) para evitar la desintegración de la proteína de interés. Posteriormente de cada grupo, se realizó un homogenizado celular en un homogenizador ultra turrax (IKA, USA) a una velocidad de 22 000 rpm durante 10 segundos. En seguida se extrajo la proteína de cada grupo, dejando las muestras en agitación constante durante 2 horas en hielo, después de la extracción se centrifugaron las muestras, se obtuvo el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas. De cada muestra se tomó la misma cantidad de proteína y se depositó en un gel de poliacrilamida para la realizar la electroforesis. Una vez terminada la electroforesis las proteínas contenidas en el gel se electrotransfirieron hacia una membrana de celulosa. Esta membrana se bloqueó con leche en buffer de fosfatos salino (PBS) durante 2 horas con agitación, transcurrido el tiempo la membrana se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo primario anti-Twist durante toda la noche. Al día siguiente se lavó 3 veces con PBS, se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario marcado con peróxidasa de rábano, para finalmente ser revelada por quimioluminiscencia. Todos los experimentos se realizaron conforme al diseño experimental (Cuadro 1.)

Análisis Estadístico: ANOVA y prueba de Tukey

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de medias de grupos y la prueba de Tukey para la comparación entre grupos, ambas con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Diseño Experimental



Cuadro 1. Diseño Experimental. Se evaluó el efecto del SFB al 10 y 2% de y la albúmina al 0.5%, se eligió el 2% de SFB que mostró similar viabilidad que el control. Posteriormente se evaluaron 3 concentraciones de AANE (1%, 0.5% y 0%) eligiéndose la depleción de AANE que permitió similar viabilidad con el control (1%). En seguida se estudió las concentraciones de 5, 50, 100 y 200 μ M de 5-Fu sobre la viabilidad, escogiendo la de 50 μ M para los siguientes experimentos. Se estudiaron los 3 grupos tratados (depleción de AANE, 5-Fu y su acción conjunta) y un grupo control (concentraciones óptimas). Se evaluó

tanto la viabilidad como la distribución (ICQ) y la presencia (WB) de Twist en las células.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los cultivos suplementados con el 10% de SFB se les asignó una viabilidad del 100% por ser las condiciones óptimas de cultivo de las células MDA-MB-231. Cuando se suplementaron los medios con el 2% de SFB se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular del 82.66 ± 10.74 ee en comparación con el control, sin diferencia estadística significativa. En los experimentos suplementados con albúmina sérica bovina al 0.5%, se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular del 16.5 ± 5.32 ee ($p < 0.05$), mostrando diferencia estadística significativa con los otros grupos (Figura 1).

Los resultados de los experimentos de viabilidad son consistentes con lo descrito por Ganguly *et al.* (2008) quienes al disminuir el SFB en cultivos de las líneas celulares 7F2 y UMR-106 de osteoclastos, observaron la misma viabilidad en todos los grupos y con lo reportado por Lui *et al.* (2009) quienes al sembrar células madre obtenidas de fluido amniótico humano en medio de cultivo con 10% y 20% de SFB obtuvieron la misma viabilidad celular. Por otro lado hay quien reporta lo contrario como Zanghi *et al.* (1999) quienes observaron una disminución al 65% en la viabilidad de las células de ovario de hámster chino al sembrarlas en un medio de cultivo con 5% de SFB, en comparación con las suplementadas con SFB al 10%. También Sawada *et al.* (2010) reportaron aumento en la viabilidad de las células sin SFB en comparación con la que tenían SFB al 10% en células madre mesenquimales y De Castro *et al.* (2006) en líneas celulares C2C12 y HBK de riñón de hámster tratadas con albúmina sérica humana al 1%, observaron mayor viabilidad que aquellas que fueron cultivadas con SFB. La diferencia observada entre los distintos reportes, posiblemente se debió a los requerimientos específicos y sensibilidad a los nutrientes de cada tipo celular estudiados en los distintos proyectos.

En las células cancerosas de tejidos humanos se ha observado un buen desarrollo celular aún en condiciones de restricción de nutrientes, posiblemente porque son capaces de cambiar su expresión genética para sintetizar proteínas necesarias en su proliferación, como son los factores de crecimiento IGF-1, FGF, TGF-B, EGF (Sawada *et al.*, 2005). Algunos otros factores como TGF-B1 incrementan significativamente su actividad mitogénica cuando hay deficiencia de nutrientes (Zhang *et al.*, 2006), con lo cual podría sugerirse que las células poseen eficaces sistemas de adaptación a las condiciones ambientales. Existen otros factores que pudieron influir en la viabilidad celular, como el tiempo de incubación y el medio de cultivo.

Al obtener la misma viabilidad en los cultivos con 10 % y 2% de SFB se decidió suplementar todos los siguientes experimentos con el 2% de SFB. Para conocer el efecto de la modificación de los aminoácidos no esenciales (AANE) sobre la viabilidad celular y se evaluaron las siguientes condiciones: a) el crecimiento celular con 1% de AANE, el cual fue tomado como el control con el 100% de viabilidad celular por representar las condiciones óptimas de cultivo, b) la disminución de los aminoácidos al 0.5% en el cual se obtuvo la viabilidad del $109.27\% \pm 19.8$ ee y c) el grupo con depleción de los AANE en el cual hubo un crecimiento del $90.72\% \pm 5.3$ ee, en ninguno de los grupos anteriores se encontró diferencia significativa con respecto al control ni entre tratamientos (Figura 2).

Los grupos en los que se modificaron los aminoácidos no esenciales sugieren que la viabilidad celular es independiente de la concentración de éstos. Actualmente no existen reportes del efecto de los AANE sobre la viabilidad celular, solo se ha reportado el efecto de la disminución de los aminoácidos esenciales. Los resultados de este trabajo muestran la misma tendencia que lo observado con aminoácidos esenciales por Kamath *et al.* (1998) quienes observaron que las células tumorales de ratones alimentados

con una dieta deficiente de triptófano, tuvieron el mismo desarrollo del tumor que con una dieta balanceada en aminoácidos. Estudios realizados por Theuer (1971) y Worthington *et al.* (1978) observaron que al disminuir los aminoácidos esenciales en la dieta de ratones con cáncer no había diferencia significativa en el desarrollo del tumor en comparación con los que consumieron cantidades adecuadas de aminoácidos.

Por otro lado, los resultados difieren de lo descrito en células de adenocarcinoma colorectal humano, en donde al incrementar el aminoácido no esencial glutamina, se estimuló el crecimiento celular. Han sido reportados efectos contrarios a este trabajo realizado aminoácidos no esenciales, con los aminoácidos esenciales, por ejemplo Yen *et al.* (2002) observaron disminución de la viabilidad en la línea celular PC12 y en neuronas postmitóticas de cerebro de rata fetal, al depletarlas de triptófano, isoleucina, metionina y colina. La diferencia entre los resultados de este proyecto y lo descrito por Dupertuis *et al.* Fue la utilización de glutamina en el cultivo y la depleción de aminoácidos esenciales en lugar de los no esenciales, dando diferentes viabilidades. Es conocido que los aminoácidos esenciales como la leucina, isoleucina y valina son precursores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la proteólisis y promueven la síntesis de glutamina y alanina (Choudry *et al.*, 2006) por lo cual la falta de estos aminoácidos es crítica para las células. La alta viabilidad celular obtenida en este proyecto, probablemente fue inducida por los factores de crecimiento contenidos en el suero animal, que promueven la utilización de péptidos como fuente de aminoácidos en condiciones de deficiencia de nutrientes (Pan *et al.*, 1998) favoreciendo el desarrollo celular, o bien porque los aminoácidos no esenciales contenidos en el medio con 2% de SFB, fueron suficientes para la elaboración de proteínas necesarias para el desarrollo de esta línea celular. Al observar una viabilidad celular sin diferencia significativa al depletar los AANE, se decidió no adicionar los AANE para los siguientes experimentos y evaluar su efecto combinado con 5-Fu, tanto en la viabilidad celular como en la producción de Twist.

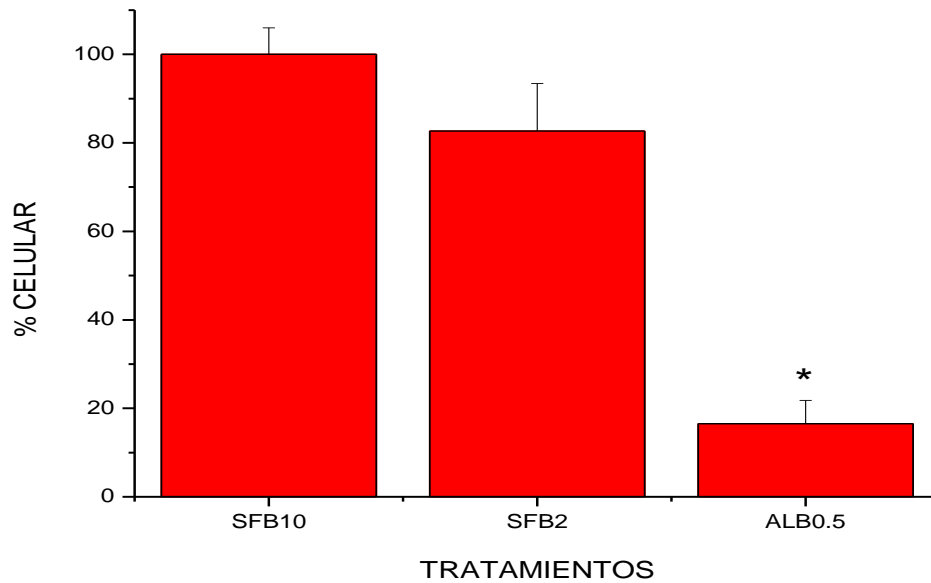


Figura 1. Efecto del Suero Fetal Bovino y la Albúmina Sérica Bovina en la viabilidad celular. En el eje de las abscisas se presentan los tratamientos con SFB (10%, 2%) y ASB (0.5%). En el eje de las ordenadas, el número de células expresado en porcentaje, tomando al grupo control (SFB 10%) como el 100%. La viabilidad celular fue la misma con SFB 10% y con 2%. La albúmina al 0.5% disminuyó significativamente el crecimiento celular. Los resultados fueron analizados con un ANOVA y prueba de Tukey, están expresados como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

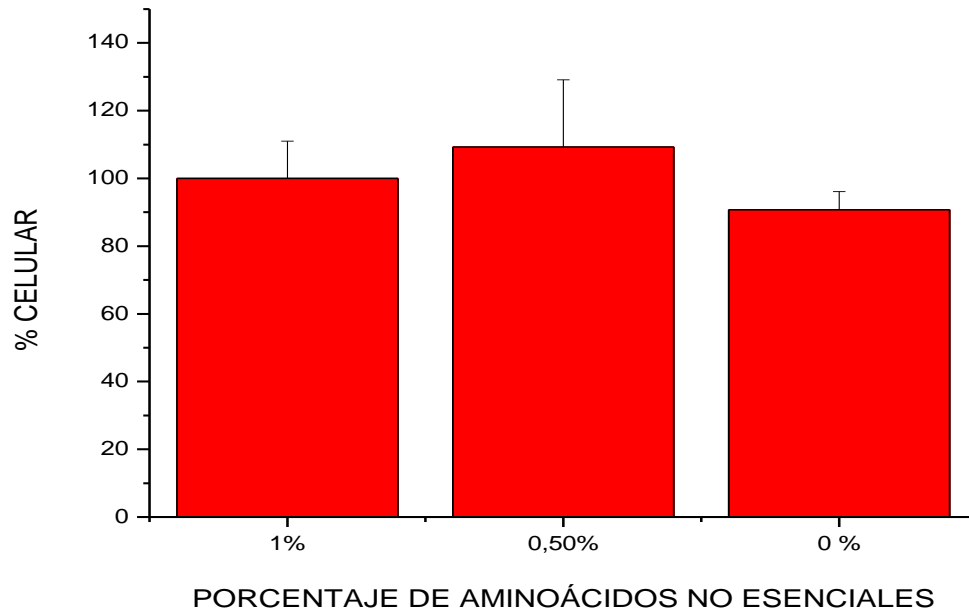


Figura 2. Evaluación de la viabilidad celular por efecto de la disminución de aminoácidos no esenciales. En el eje de las abscisas se encuentran los porcentajes de aminoácidos no esenciales evaluados (0.5%, y sin aminoácidos) y el grupo control (1%). En el eje de las ordenas se encuentra el porcentaje de células viables obtenidas en cada tratamiento. Los resultados indicaron la misma viabilidad celular en todos los grupos. Los resultados fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey, están expresados como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

Para conocer el efecto del 5-Fluorouracilo (5-Fu) por sí solo sobre la viabilidad celular, se evaluaron diferentes concentraciones del fármaco: 5, 50, 100 y 200 uM. Se encontró que la concentración de 5 uM permitió el crecimiento celular del $33.1\% \pm 13.8$ ee, el grupo con 50uM de 5-Fu el crecimiento fue de $39.01\% \pm 8.75$ ee, con 100 uM de 5-Fu el crecimiento fue del $34.54\% \pm 6.08$ ee, y por último la de 200 uM la cual permitió el desarrollo del $19.6\% \pm 9.58$ ee de las células. En la concentración de 200 uM, se observó el mayor efecto del fármaco, sin ser significativamente diferente de los demás grupos. En todas las concentraciones, evaluadas el 5-Fu disminuyó significativamente la viabilidad celular al compararse con las células control sembradas en ausencia de 5-Fu, sin embargo entre tratamientos no hubo diferencia significativa (Figura 3).

El efecto citotóxico del 5-Fu observado en este trabajo, es consistente con lo reportado por Sawada *et al.* (2005) al describir una disminución significativa en el crecimiento de la línea celular N0005 de cáncer linfoblástico en concentraciones de 10 y 100 uM de 5-Fu y con Misaki *et al.* (2002) reportaron disminución significativa del crecimiento de células de cáncer de tiroides tratadas con 3 ug/ml de 5-Fu durante 48 horas con respecto al crecimiento de las células control. También, es consistente con el reporte de Brunneti *et al.* (1990) quienes encontraron que el 5-Fu en combinación con AZT (85mg/kg de 5-Fu y 600 mg/ kg de AZT) disminuyó *in vivo* el crecimiento del tumor en un 70% en ratones con cáncer de colon y que el aumento en la concentración del 5-Fu no resultó más efectivo contra el crecimiento del tumor. La razón por la cual el 5-Fu ocasiona el mismo daño en todas las concentraciones se debió posiblemente a que el sistema de reparación celular, puede trabajar eficazmente hasta cierto nivel de deterioro, rescatando timidina para subsistir y evitando que el efecto del fluorouracilo fuera letal. Sin embargo, el sistema llega a un límite en el cual ya no puede soportar el daño y las células comienzan a morir, disminuyendo la viabilidad como se observa en el grupo de 200uM, donde disminuye aún más, la sobrevivencia celular que en los otros

grupos sin ser significativamente diferentes (Brunneti *et al.*, 1990). Podría pensarse que al evaluar dosis más altas de 5-Fu, posiblemente se observaría un aumento en la muerte celular hasta llegar al 100%.

La muerte celular inducida por 5-Fu, se lleva a cabo por su acción en la inhibición de la timidilato sintasa (TS), o bien por la acumulación del metabolito del 5-Fu (FdUMP) el cual provoca citotoxicidad. Al observar que la viabilidad es la misma en todos los grupos tratados se decidió utilizar la concentración 50 μ M para los restantes experimentos.

Para determinar el efecto combinado de la disminución de AANE y del 5-Fu a la concentración de 50 μ M sobre el crecimiento celular, se analizó el cultivo con 1% de AANE y 5-Fu, lo que se consideró como el 100% de viabilidad, otro grupo evaluado fue con disminución de AANE al 0.5% y 5-Fu el cual provocó el crecimiento del $118.8\% \pm 26.7$ ee, que no fue significativo al compararlo con el control. Las células depletadas de AANE, mostraron un crecimiento del $93\% \pm 33$ ee, sin diferencia significativas ni con el control ni los tratamientos (Figura 4), con lo cual se puede decir que la disminución de los aminoácidos en conjunto con el 5-Fu, permite el mismo crecimiento celular que el 5-Fu por sí solo. Con éste análisis se tomó la decisión de utilizar la depleción de los AANE y el 5-Fu (50 μ M) para estudiar su efecto sobre Twist en las células.

La disminución en la viabilidad celular durante la combinación del 5-Fu y la disminución de AANE se debieron exclusivamente al efecto del 5-Fu, asociados a los mecanismos anteriormente discutidos, ya que los aminoácidos no ejercen ninguna modificación en la viabilidad por sí solos, ni en combinación con el 5-Fu.

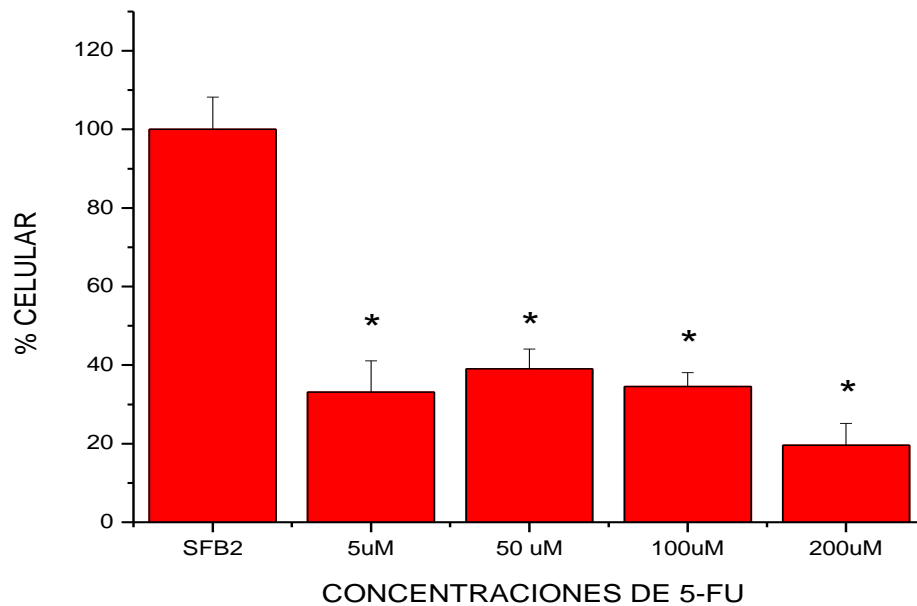


Figura 3. Efecto del 5-Fluorouracilo en la viabilidad celular. En el eje de las abscisas se encuentran: el grupo control (sin 5-Fu), y las concentraciones de 5-Fu evaluadas (5, 50, 100 y 200 uM). En el eje de las ordenas se muestra el porcentaje de células viables obtenidas en cada tratamiento. Los resultados indicaron que todas las células tratadas con las diferentes concentraciones del 5-Fu, presentaron una disminución significativa sobre la viabilidad celular con respecto al control y entre los tratamientos no hubo diferencias. Los resultados fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey, se expresan como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

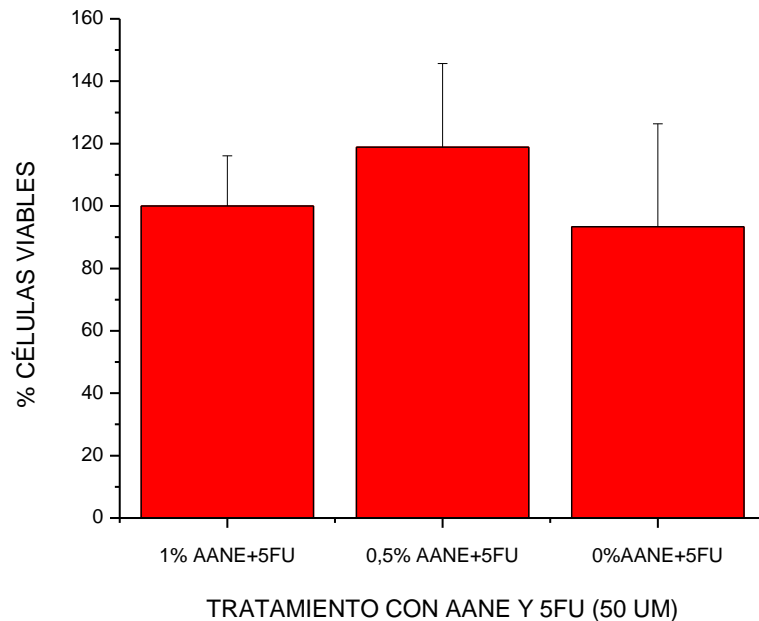


Figura 4. Efecto de la disminución de los AANE y el 5-Fu en la viabilidad celular. En el eje de las abscisas se encuentran los grupos con aminoácidos no esenciales al 1%, 0.5% y sin aminoácidos, adicionados con 5-Fu (50uM). En el eje de las ordenadas el porcentaje de células viables obtenidas en cada grupo. Los resultados indican que la viabilidad celular es la misma en todos los tratamientos. Los resultados fueron analizados con un ANOVA y prueba de Tukey, están dados como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

Para explorar la distribución de Twist en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se realizó la inmunocitoquímica en la cual se trabajó con distintos controles y tratamientos. Se procesó un control negativo, en el cual las células fueron expuestas a todos los reactivos con excepción de los anticuerpos primario y secundario, con objeto de demostrar que ninguno de los reactivos utilizados, inducía coloración que pudiera confundirse con la tinción de la proteína en cuestión (Figura 5A). El siguiente control fue el blanco, el cual se incubó con los reactivos y el anticuerpo secundario, con la intención de mostrar que no existió reconocimiento inespecífico de este anticuerpo (Figura 5B). Una vez incubadas las células problema (tratamientos) con anticuerpo primario y secundario, se encontraron células sin marca, que se observaron como células blanco (Figura 5B), y células positivas en las cuales se presentaron puntos marrones que indicaban la presencia de Twist (Figura 5C). La marca inmunoreactiva de Twist se clasificó en las zonas celulares: núcleo, citoplasma y núcleo-citoplasma (Figura 6).

El análisis inmunocitoquímico en el grupo control (1% de AANE) se encontró tinción inmunoreactiva para Twist en el $96.3\% \pm 1.3$ ee de las 250 células totales analizadas para cada experimento. En el grupo con depleción de los AANE se observó marca en el $88.6\% \pm 5.3$ ee de las células, en el tratamiento con 1% de AANE y 5-Fu (50 μ M) hubo marca en el $80.6\% \pm 13.3$ ee y en las células con depleción de AANE y exposición al 5-Fu se observó en el $87\% \pm 3.8$ ee. El análisis ICQ demostró que los tratamientos evaluados anteriormente no eliminaron Twist de las células al no encontrarse diferencia significativa con el control (Figura 7).

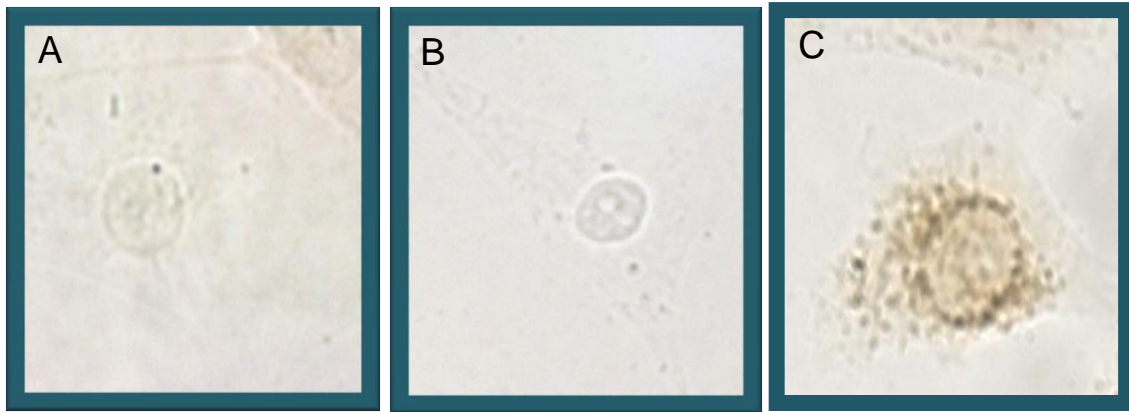


Figura 5. Células negativas y positivas en la inmunocitoquímica. A) **Célula negativa:** Sin coloración por reacción cruzada de los reactivos. B) **Célula blanco:** Sin marca inespecífica por el anticuerpo secundario. C) **Célula positiva:** Puntos marrones que indican la presencia de Twist. Las imágenes corresponden a 400 aumentos.

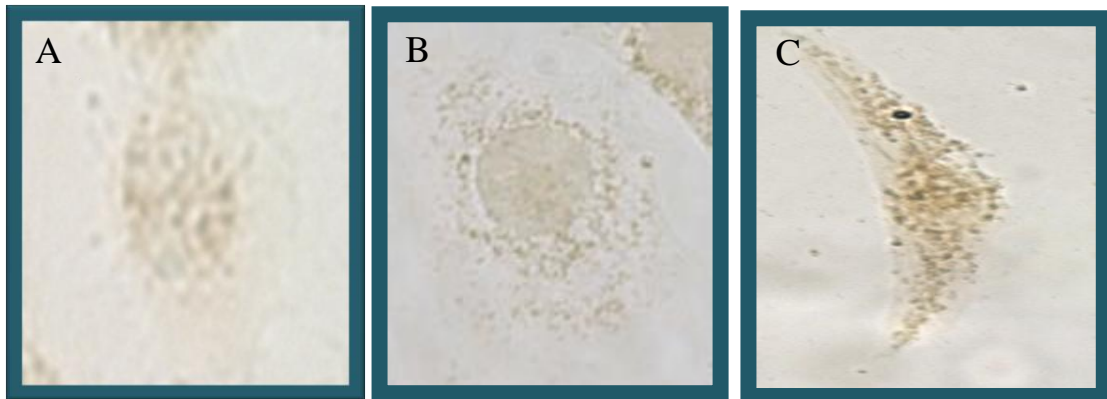


Figura 6. Distribución de Twist en la célula. A) Célula donde se observa la marca inmunoreactiva solamente en el núcleo. B) Célula con tinción solo en citoplasma, C) Twist se observa tanto en núcleo como en citoplasma. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X.

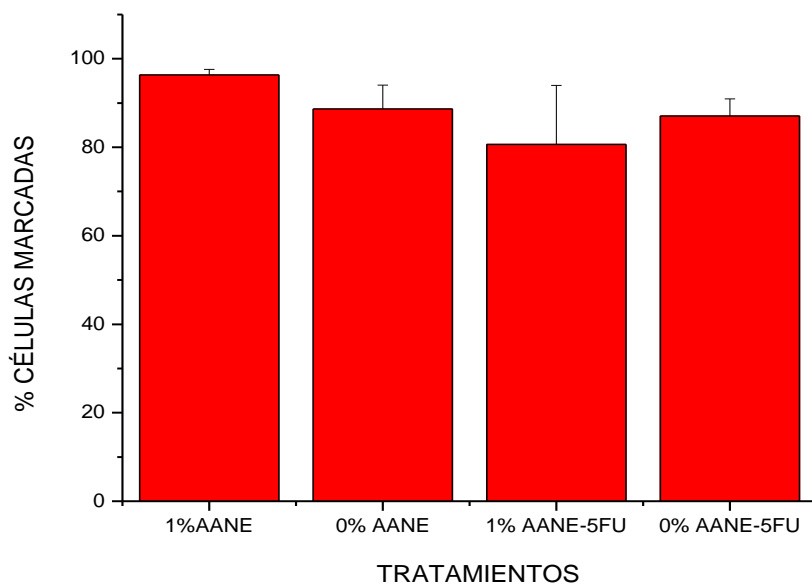


Figura 7. Porcentaje de células con presencia de Twist por tratamiento. En el eje de las abscisas se encuentran los tratamientos con AANE y 5-Fu, en el eje de las ordenadas el porcentaje de células con marca para Twist. Los resultados indican que hay un menor número de células marcadas en todos los tratamientos sin ser estadísticamente diferentes. Los resultados fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey, están expresados como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

El análisis estadístico realizado para la marca total por zona subcelular con respecto al tratamiento, mostró que Twist se encuentra tanto en el núcleo como en citoplasma. Los resultados mostraron que las células del grupo con depleción de AANE, expuesto al 5-Fu y con ambos tratamientos, presentaron diferencia significativa en el número de células con tinción en citoplasma con respecto a las células teñidas en núcleo-citoplasma en el mismo tratamiento. En el grupo control (1% AANE), no se encontró diferencia significativa en el número de células con marca en núcleo contra las que presentaron marca en citoplasma. La depleción de AANE mostró un aumento en el número de células con tinción en citoplasma y una disminución en núcleo-citoplasma significativamente diferente al control y a los demás tratamientos (Figura 8).

Durante el análisis del efecto de los tratamientos sobre la presencia y distribución de Twist, se encontró que la falta de aminoácidos no esenciales y la exposición al 5-Fu, no fue suficiente para eliminar la proteína. Los resultados de la distribución celular de Twist son muy interesantes porque sugieren la permanencia de Twist en el citoplasma, en todos los tratamientos. La marca permaneció sin diferencia significativa entre las dos regiones cuando las células se trataron con la cantidad óptima de aminoácidos no esenciales (grupo control). En el núcleo aislado no se encontró diferencia entre los tratamientos porque la fracción de células marcadas exclusivamente en esta región, fue prácticamente nula.

Se ha reportado, que la depleción de aminoácidos modifica la expresión genética y promueve eventos moleculares que llevan a la activación y traducción de genes transportadores de aminoácidos, o bien, provoca modificaciones post-trasduccionales como la glucosilación o fosforilación de las proteínas (Maruvada y Srivastava, 2004).

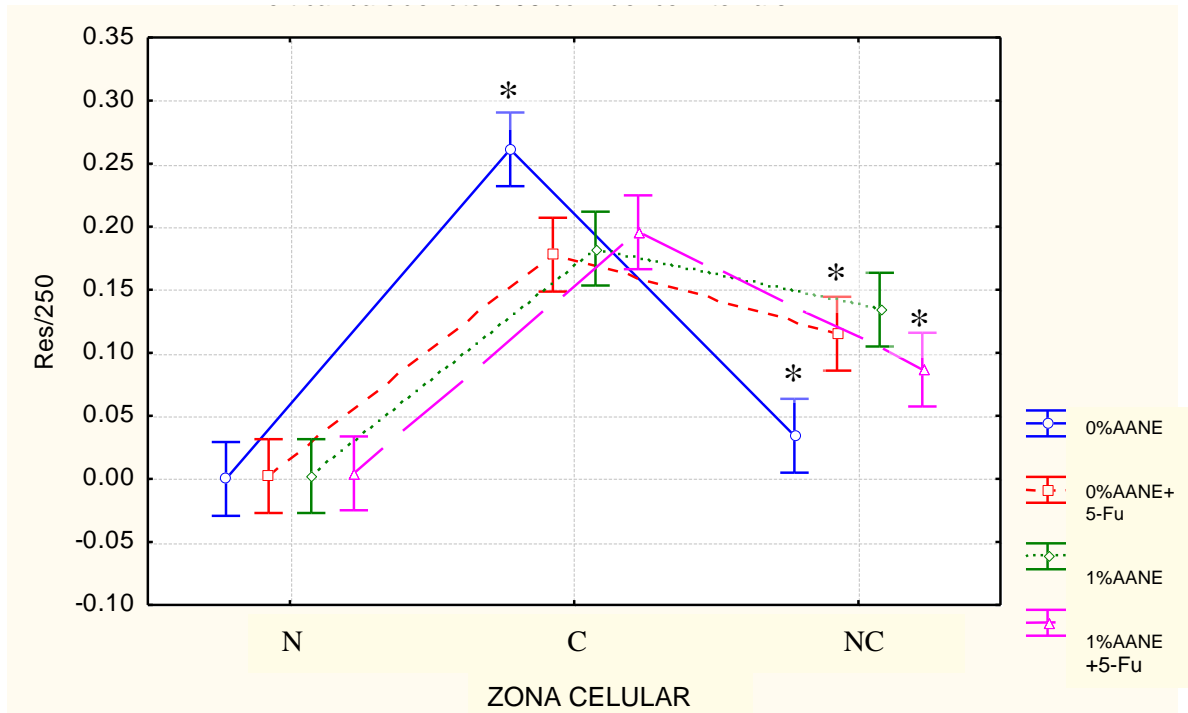


Figura 8. Distribución celular de Twist por tratamiento. En el eje de las abscisas se encuentran las zonas celulares N: núcleo, C: citoplasma, NC: núcleo-citoplasma y en el de las ordenadas la fracción de células marcadas con respecto a cada tratamiento. Se observa que la depleción de los AANE y la exposición al 5-Fu adicionados por separado y en conjunto, aumentan significativamente con las células con marca en el C con respecto a las del NC en el mismo tratamiento y con respecto al control. En el grupo control no hay diferencia significativa entre las zonas subcelulares. La depleción de AANE aumentó el número de células con tinción en citoplasma y disminuyó en núcleo-citoplasma significativamente con respecto al control y tratamientos. El análisis de los resultados fue realizado con ANOVA y prueba de Tukey, expresados como la media \pm ee, * $p < 0.05$.

Una posible explicación para la permanencia de Twist en el citoplasma, es que al crecer las células con deficiencia de aminoácidos no esenciales, la proteína pudo sufrir modificaciones postraduccionales, lo que impide una correcta interacción dimérica y unión al DNA como lo expresa Hao *et al.* (2011), quienes establecen que es necesaria la existencia de un grupo de aminoácidos específicos en el dominio N-terminal de la proteína para realizar la correcta interacción. La posible mutación en dicha región afecta la dimerización con otras proteínas bHLH, disminuyendo así su función. Si este fuera el caso y no interaccionara con el DNA, puede transportarse al citoplasma para su posible degradación.

Con respecto al grupo tratado con 5-Fu se observó la permanencia de Twist presente en el citoplasma, lo que puede ser asociado a una posible mutación genética causada por el 5-Fu en la secuencia CANNTG (caja E de Twist) que contiene Timina, que evitaría la unión de los dímeros de Twist reduciendo la síntesis de este factor de transcripción (Puisiux *et al.*, 2006). Otra posibilidad es que la mutación haya ocasionado un reemplazo de residuos aminoacídicos en el dominio de Twist inhibiendo la unión a otras proteínas (Hamamori *et al.*, 1997) trasladándose al núcleo y una vez ahí, al no ser funcional, regresa al citoplasma a degradarse.

Para determinar la cantidad total de Twist en las células por efecto de cada tratamiento se realizó un análisis por Western blot, en el cual se observó la mayor cantidad de Twist en el grupo con AANE óptimos (1%), posteriormente la siguiente marca más fuerte fue para el grupo sin AANE y expuesto al 5-Fu (50uM). En los grupos con AANE al 0.5%, sin AANE (0%), y 1%aa-5Fu, la proteína disminuyó en la misma proporción para los 3 grupos, finalmente el grupo que presentó menor producción de proteína, fue el tratado con AANE al 0.5% y expuesto al 5-Fu (Figura 9).

Los resultados observados en el Western blot indicaron la disminución de Twist con todos los tratamientos presentándose mayor disminución en todos los tratamientos con depleción de AANE y expuestos al 5-Fu individualmente y en conjunto, las posibles razones de este comportamiento fueron discutidas con anterioridad.

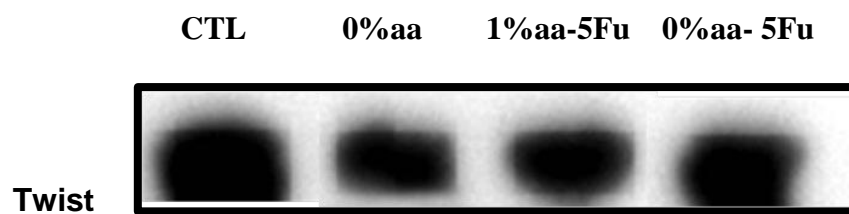


Figura 9. Cantidad de Twist presente en cada tratamiento. El Western blot mostró la disminución de la cantidad de Twist en todos los grupos tratados.

VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la viabilidad de las células MDA-MB-231 no se modifica por efecto de la desnutrición provocada por la disminución de SFB y la depleción de aminoácidos no esenciales. El tratamiento farmacológico con 5-Fu disminuye significativamente la viabilidad a concentraciones de 5, 50, 100 y 200 μ M. La desnutrición y el 5-Fu (50 μ M) de forma individual y conjunta, inhibe la movilidad de Twist del citoplasma hacia el núcleo y provoca la disminución de su síntesis. Finalmente, se puede sugerir que el tratamiento antineoplásico con 5-Fu (50 μ M) asociado a un estado de desnutrición de aminoácidos no esenciales podría disminuir el riesgo a desarrollar metástasis asociada a el factor de transcripción Twist.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdallah, R., Starkey, J., Meadows, G. 1987. Dietary restriction of tyrosine and Phenylalanine: inhibition of metastasis of three rodent tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 759-766.

Balin-Gauthier, 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.

Ban, K., Kozar, R. A. 2010 Glutamine protects against apoptosis via downregulation of Sp3 in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299(6); G1344-53.

Bertagnoli, 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; 27(11):1814-21.

Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A., Fafournoux, P. 2000. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the *CHOP* promoter. *Mol. Cell Biol.* 20: 7192–7204.

Brunetti, I., Falcone, A., Calabresi, P., Goulette, F., Darnowski, J. 1990. 5-Fluorouracil Enhances Azidothymidine Cytotoxicity: In Vitro, in Vivo, and Biochemical Studies. *Cancer Res.* 50; 4026-4031.

Cheng, G., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, D., Wang, L. 2007. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* 67:5.

Cheng, G., Zhang, W., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., Wang, L.H. 2008. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *The J. Biol. Chem.* 283 (21): 14665–14673(b).

Cheng, G., Zhang, W., Wang, L. 2008. Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res.* 12:2-3 (a).

Chotechuan, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gausserès, N., Steiler, T., Gaudichon, C., Tomé, D. 2009. mTOR, AMPK and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrino Metab.* 297(6): 1313-23.

Choudry, H., Pan, M., Karinch, A., Souba, W. 2006. Branched-Chain Amino Acid-Enriched Nutritional Support in Surgical and Cancer Patients. *J. Nutr.* 136; 314S–318S.

Conde, L., Fernández, T., Neira, P., Arias, J., Varela, J., Gómez, F. 2008. Prevalencia de desnutrición en pacientes con neoplasia digestiva previa cirugía. *Nutr. Hosp.* 23(1): 46-53.

De Castro, M., Orive, G., Gascón, A.R., Hernández, R.M., Pedraz, J.L. 2006. Evaluation of human serum albumin as a substitute of fetal bovine serum for cell culture. *Int J Pharm.* 310(1-2); 8-14.

Dewys, W.D., Begg, C., Lavin, P.T., Band, P.R., Bennett, J.M., Bertino, J.R., Cohen, M.H., Douglass, H.O. Jr., Engstrom, P.F., Ezdinli, E.Z., Horton, J., Johnson, G.J., Moertel, C.G., Oken, M.M., Perlia, C., Rosenbaum, C., Silverstein, M.N., Skeel, R.T., Sponzo, R.W., Tormey, D.C. 1980. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med.* 69(4):491-7.

Dupertuis, Y.M., Benais-Pont, G., Buchegger, F., Pichard, C. 2007. Effect of an immunonutrient mix on human colorectal adenocarcinoma cell growth and viability. *Nutrition*. 23(9); 672-80.

Elstad, C., Meadows, G., Abdallah, R. 1990. Specificity of the suppression of metastatic phenotype by tyrosine and phenylalanine restriction. *Clin. Exp. Metastasis*. 8: 393–416.

Elstad, C., Thrall, B., Meadows, G. 1996. Tyrosine and phenylalanine restriction sensitizes adriamycin-resistant P388 leukemia cells to Adriamycin. *Nutr. Cancer*. 25: 47–60.

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.

Fafournoux, P., Bruhat, A., Jousse, C. 2000. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J*. 351: 1–12.

Flórez, J. 2004. Cáncer. *Farmacología Humana*. Ed. Masson. Cuarta Edición. 1019-1038.

Ganguly, S., Ashley, L.A., Pendleton, C.M., Grey, R.D., Howard, G.C., Castle, L.D., Peyton, D.K., Fultz, M.E., DeMoss, D.L. 2008. Characterization of osteoblastic properties of 7F2 and UMR-106 cultures after acclimation to reduced levels of fetal bovine serum. *Can J Physiol Pharmacol*. 86(7); 403-15.

García-Luna, P., Parejo, J., Pereira, J. 2006. Causas e impacto clínico de la desnutrición y caquexia en el paciente oncológico. *Nutr Hosp*. 21:10-6.

Geiger, T., Peeper, D. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*. 1796: 2: 293-308.

Gómez, F., Silva, C., Payeras, F. 2004. Desnutrición: hipovitaminosis. *Nutr. Hosp.* 9(19): 1186-1195.

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(12):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(9):741-51.

Hamamori, Y., Wu, H., Sartorelli, V., Kedes, L. 1997. The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, twist. *Molecular and Cellular Biology.* 17 (11); 6563–6573.

Hao, N., Whitelaw, M., Shearwin, K., Dodd, I., Chapman-Smith, A. 2011. Identification of residues in the N-terminal PAS domains important for dimerization of Arnt and AhR. *Nucleic Acids Research.* 1–15.

Hernández, D., Lima-Gómez, V., Hernández-Juárez, G., Quezada-García, A. 2008. Subregistro de desnutrición en la consulta externa pediátrica de un hospital general. *Salud pública Méx.* 50(1): 3-4.

Imyanitov, E.N., Togo, A.V., Hanson, K.P. 2004. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles. *Cancer Lett.* 10; 204(1):3-14.

(INC) Instituto Nacional del Cáncer. 2009. www.cancer.gov/español.

(INEGI) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2011. www.inegi.gob.mx.

Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., Kikkawa, F. 2007. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol.* 31(2):277-83.

Kamath, S., Conrad, N., Olson, R., Bess, M., Mid, O., Ghosh, L. 1988. Amino Acid-restricted Diets in the Treatment of Mammary Adenocarcinoma in Mice¹2. *J. Nutr.* 118; 1137-1142.

Kang, Y., Massagué, J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 25; 117(7):927-39.

Kwok, W., Ling, M., Lee, T., Lau, T., Zhou, C., Zhang, X., Chua, C.W., Chan, K.W., Chan, F.L., Glackin, C., Wong, Y.C., Wang, X. 2005. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* 15; 65(12):5153-62.

Li, Q.Q., Xu, J.D., Wang, W.J., Cao, X.X., Chen, Q., Tang, F., Chen, Z.Q., Liu, X.P., Xu, Z.D. 2009. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 15(8):2657-65.

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 Res.* 1; 67(19): 9066–9076.

Lui, K.O., Waldmann, H., Fairchild, P.J. 2009. Embryonic stem cells: overcoming the immunological barriers to cell replacement therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 4(1); 70-80.

Marchetti, P., Galla, D., Russo, F., Ricevuto, E., Flati, V., Porzio, G., Ficarella, C., Cifone, M.G. 2004. Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Res.* 24(1):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(6):488-96.

Maruvada, P. y Srivastava, S. 2004. Biomarkers for Cancer Diagnosis: Implications for Nutritional Research. *J. Nutr.* 134; 1640S–1645S.

Matuo, R., Sousa, F., Escargueil, A., Grivicich, I., García-Santos, D., Chies, J., Saffi, J., Larsen, .AK., Henriques, J.A. 2009. 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J.appl. toxicol.* 29(4):308-16.

Meadows, G., Abdallah, R., Starkey, J. 1986. Interaction between specific dietary factors and experimental chemotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 16: 229–236. 6.

Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., Aguayo-González, A. 2006. Bases moleculares del cáncer. *Rev Inv Clin.* 58: 56-70.

Mironchik, Y., Winnard, P.T., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwalla, 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 Res.* 65(23): 10801-9.

Misaki, T., Iwata, M., Iida, Y., Kasagi, K., Konishi, J. 2002. Chemo-radionuclide therapy for thyroid cancer: initial experimental study with cultured cells. *Ann Nucl Med.* 16(6):403-8.

Norris, J., Meadows, G., Massey, L., Starkey, J., Sylvester, D., Liu, S. 1990. Tyrosine- and phenylalanine-restricted formula diet augments immunocompetence in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 188–196.

(OMS) Organización Mundial de la salud. Nota descriptiva No. 297. Febrero 2011.

Ou, D., Chien, H., Chen, C., Lin, T., Lin, L. 2008. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 28(2B):1355-9.

Pan, Y., Bender, P., Akers, R., Webb, K. 1998. One or More Serum Factors Promote Peptide Utilization in Cultured Animal Cells. *J. Nutr.* 128; 744–750.

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(1):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(5):1269-76.

Pelayo, B., Fu, Y., Meadows, G. 2001. Decreased tissue plasminogen activator and increased plasminogen activator inhibitors and increased activator protein-1 and specific promoter 1 are associated with inhibition of invasion in human A375 melanoma deprived of tyrosine and phenylalanine. *Int. J. Oncol.* 8: 877–883.

Pelayo, B., Fu, Y., Meadows, G. 1999. Inhibition of B16BL6 melanoma invasion by tyrosine and phenylalanine deprivation is associated with decreased secretion of plasminogen activators and increased plasminogen activator inhibitors. *Clin. Exp. Metastasis.* 17: 841–848.

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(7): 916-924.

Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., Ansieau, S. 2006. A twist for survival and cancer progression. *British Journal of Cancer*. 94: 13 – 17.

Pine, M. 1981. Improved host defense against L1210 leukemia by deprivation of dietary phenylalanine. *Nutr. Cancer*. 3: 94–102.

Qin, L., Liu, Z., Chen, H., Xu, J. 2009. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer res*. 69(9): 3819-27.

Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Lubert, B., Busch, R., Hofler, H., Becker, K.F. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol*. 161(5):1881-91.

San Miguel Sámano, M., Vargas, E., y 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(3): 297-9.

Sawada, K., Noda, K., Nakajima, H., Shimbara, N., Furuichi, Y., Sugimoto, M. 2005. Differential Cytotoxicity of Anticancer Agents in Pre- and Post-Immortal Lymphoblastoid Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull*. 28(7) 1202—1207.

Sawada, R., Yamada, T., Tsuchiya, T., Matsuoka, A. 2010. Microarray analysis of the effects of serum-free medium on gene expression changes in human mesenchymal stem cells during the in vitro culture. *Yakugaku Zasshi*. 130(10); 1387-93.

Sosic, D., Olson, E. 2003. A new twist on twist, modulation of the NF-KB pathway. *Cell Cycle*. 2: 76-78.

Theuer, R. 1971. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implant BW1023 adenocarcinomas. *J. Nutr.* 101; 223-232.

Tong, X., Zhao, F., Thompson, C.B. 2009. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev.* 19(1):32-7.

Uhlenkott, C., Huijzer, J., Carneiro, D., Elstad, C., Meadows, G. 1996. Attachment, invasion, chemotaxis, and proteinase expression of B16-BL6 melanoma cells exhibiting a low metastatic phenotype after exposure to dietary restriction of tyrosine and phenylalanine. *Clin. Exp. Metastasis.* 14: 125–137.

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(1):78-87.

Varga, J., Li, L., Mauviel, A., Jeffrey, J., Jimenez, S. 1994. L-Tryptophan in supraphysiologic concentrations stimulates collagenase gene expression in human skin fibroblasts. *Lab. Investig.* 70: 183–191.

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(2): 235–241.

Wang, X., Ling, M.T., Guan, X.Y., Tsao, S.W., Cheung, H.W., Lee, D.T., Wong, Y.C. 2004. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene.* 15; 23(2): 474-82.

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 Res.* 24(6):3851-6.

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. *Clin. Cancer Res.* 5001:13-17.

Wei, J., Zou, Z., Qian, X., Ding, Y., Xie, L., Sanchez, J.J., 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.

Worthington, B., Yrotuck, J., Ahmed, S. 1978. Effects of Essential Amino Acid Deficiencies on Syngeneic Tumor Immunity and Carcinogenesis in Mice. *J. Nutr.* 108; 1402-1411.

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. Pharmacol.* 52(6):442-8.

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

Yen, C., Mar, M., Craciunescu, C., Edwards, L., Zeisel, S. 2002. Deficiency in Methionine, Tryptophan, Isoleucine, or Choline Induces Apoptosis in Cultured Cells. *J. Nutr.* 132: 1840–1847.

Zanghi, J.A., Fussenegger, M., Bailey, J.E. 1999. Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnol Bioeng.* 64(1); 108-19.

Zhang, W.L., Huitorel, P., Genevriere, A.M., Chiri, S., Ciapa, B. 2006. Inactivation of MAPK in mature oocytes triggers progression into mitosis via a Ca²⁺ -

dependent pathway but without completion of S phase. *J Cell Sci.* 119 (Pt 17); 3491-501.

Zhao, H., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., Furukawa, T., Che, X.F., 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 Res.* 1; 68(17): 7035-4.