



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

EFFECTO DEL RALOXIFENO Y EL TRANILAST SOBRE LA
EXPRESIÓN PROTEICA DE E-CADHERINA EN CÉLULAS
DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. JESSICA TRINIDAD PÉREZ PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

QUERÉTARO
CENTRO UNIVERSITARIO
NOVIEMBRE DE 2016
MÉXICO



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**EFFECTO DEL RALOXIFENO Y EL TRANILAST SOBRE LA
EXPRESIÓN PROTEICA DE E-CADHERINA EN CÉLULAS DE
CÁNCER DE MAMA**

TESIS

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

Presenta:

Q.F.B. Jessica Trinidad Pérez Pérez

Dirigido por:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

SINODALES

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Presidente

Dr. Efraín Chavarría Ávila
Secretario

Dr. Roberto Ferriz Martínez
Vocal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Suplente

Dra. Guadalupe García Alcocer
Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

M.S.P. Sergio Páchecho Hernández
Director de la Facultad de Química

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2016

RESUMEN

La metástasis del cáncer de mama es la principal causa de muerte de las mujeres con cáncer en México. Dicha metástasis de las células cancerosas, implica la disminución de la expresión proteica de la proteína de adhesión celular E-cadherina y el aumento de factores de transcripción tales como snail. Entre los medicamentos ampliamente utilizados para el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormona se encuentra el raloxifeno (RAL), el cual ha demostrado reducir el crecimiento del tumor; sin embargo, también se le ha relacionado con efectos secundarios como lo son los eventos tromboembólicos. Es por eso que es necesario el desarrollo de nuevas terapias con la finalidad de reducir la proliferación y migración de las células del cáncer sin efectos secundarios. Por lo anterior se decidió evaluar la combinación de raloxifeno y tranilast. El tranilast (TRA) es un fármaco antialérgico con efectos en la proliferación celular y la migración de las células neoplásicas. No obstante, se desconocen los efectos de la combinación de ambos fármacos en la expresión de E-cadherina o su represor snail. Este estudio se llevó a cabo mediante el cultivo celular de células con características migratorias y no migratorias, realizándose una curva de concentración-respuesta con diferentes concentraciones de los fármacos RAL y TRA para después analizar por *western blot* los efectos de los fármacos en la expresión proteica de E-cadherina y snail. Los cambios en la localización celular de snail se identificaron por inmunocitoquímica mientras que los cambios en la migración celular se observaron por medio del ensayo herida. Concluyendo que la combinación de estos medicamentos podría favorecer el pronóstico en los casos con células RE positivas y RE negativas a través de la disminución de la migración celular por efecto de ambos fármacos, también la reducción de la presencia de snail en el núcleo y por lo tanto la agresividad de este tipo de cáncer de mama.

Palabras clave: cáncer de mama, E-cadherina, raloxifeno, tranilast, snail, migración, terapia combinada.

ABSTRACT

Metastasis in breast cancer is the leading cause of death among women with cancer in Mexico. Cancer cells metastasis involves the decrease the protein cell adhesion E-cadherin and increase of protein expression of transcription factors such as snail. A drug widely used for the treatment of hormone dependent breast cancer is Raloxifene (RAL), which has been shown to reduce tumor growth; however, RAL is associated with side effects. That's why the development of new therapies is necessary in order to reduce the proliferation and migration of cancer cells without side effects. Therefore, it was decided to evaluate the combination of Raloxifene and Tranilast. Tranilast (TRA) is an antiallergic drug with effects on cell proliferation and migration of neoplastic cells. However, the effects of both drugs on the of E-cadherin expression or its repressor snail are unknown. This study was carried out by cell culture, performing of concentration-response curve and then by western blot analysis it was verified the effect of the drugs on protein expression of E-cadherin and snail. Changes in cell location of snail were identified by immunocytochemistry while changes in cell migration were observed by the wound assay. Concluding that the combination of these drugs could favor the prognosis in patients with ER positive and negative cells through decreased cell migration effect of both drugs and also reducing the presence of snail in the nucleus and thus the aggressiveness of this type of breast cancer.

Keywords: breast cancer, E-cadherin, raloxifene, tranilast, snail, migration, combined therapy.

DEDICATORIA

A mi esposo, gracias por todo tu apoyo, ud es mi fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico para la realización de este proyecto, con número de FOMIX M0016-2014-03 250289.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Estadísticas del cáncer	3
2.1.1 Nivel mundial	3
2.1.2 Nivel nacional	4
2.2 Generalidades del cáncer	5
2.3 Tipos de cáncer más comunes	8
2.4 Estadísticas del cáncer de mama	8
2.4.1 Nivel mundial	8
2.4.2 Nivel nacional	8
2.5 Anatomía de la mama humana	9
2.6 Generalidades del cáncer de mama	10
2.7 Factores de riesgo del cáncer de mama	11
2.8 Tipos de cáncer de mama	12
2.8.1 Clasificación referente a la localización celular	13
2.8.2 Clasificación referente a las proteínas de superficie que presentan las células	16
2.8.3 Tipos de cáncer de mama menos comunes	17
2.10.1 Transición epitelial-mesenquimal (TEM)	20
2.11 E-cadherina	23
2.12 Snail	26
2.13 Tratamientos para combatir el cáncer de mama	27

2.14 Terapia Hormonal	30
2.14.1 Receptor de estrógeno	32
2.14.2 Moduladores selectivos del receptor de estrógeno	34
2.15 Raloxifeno	36
2.16 Tranilast	38
3.0 JUSTIFICACIÓN	40
4.0 HIPÓTESIS	41
4.1 Pregunta de investigación	41
5.0 OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo general	41
5.2 Objetivos específicos	41
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Estrategia experimental	42
6.2 Cultivo celular	43
6.2.1 Línea celular MCF-7	43
6.2.2 Línea celular MDA-MB-231	43
6.3 Curva de concentración-respuesta	43
6.8 Western blot	44
6.8.2 Cuantificación de proteínas	45
6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE	46
6.8.4 Electrotransferencia	46
6.8.5 Blotting	46
6.8.6 Detección y revelado	47
6.4 Inmunocitoquímica	47
6.10 Análisis estadísticos	47
7.0 RESULTADOS	48
7.1 Células positivas al RE	48
7.1.1 Curva de concentración-respuesta	48
7.1.2 Tratamientos combinados	50
7.1.3 Cuantificación de proteínas	51
7.1.4 Evaluación de la migración celular	52
7.2 Células negativas al RE	53

7.2.1 Curva de concentración-respuesta	53
7.2.2 Tratamientos combinados	55
7.2.3 Cuantificación de proteínas	55
7.2.4 Cambios en la localización subcelular de snail	58
7.2.5 Evaluación de la migración celular	59
8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
8.1 Células positivas al RE	60
8.1.1 Curvas concentración-respuesta	60
8.1.2 Cuantificación de proteínas	61
8.1.3 Migración celular	63
8.2 Células negativas al RE	63
8.2.1 Curvas concentración-respuesta	63
8.2.2 Cuantificación de proteínas, cambios en la localización subcelular de snail	64
8.2.3 Migración celular	65
9.0 CONCLUSIONES	67
10.0 REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipos de cáncer más comunes registrados a nivel mundial en el año 2012	3
Tabla 2	Tasa de mortalidad en población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo por cada 100 mil habitantes en el año 2012	4
Tabla 3	Alteraciones esenciales para el desarrollo del cáncer	7
Tabla 4	Tasa de mortalidad en población de 20 años y más, por tumor maligno de mama, serie anual 2007-2013	9
Tabla 5	Fármacos de la terapia hormonal	43
Tabla 6	Concentraciones utilizadas en la curva de concentración-respuesta	49
Tabla 7	Curva de calibración de proteínas	57
Tabla 8	Preparación del kit ECL	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de la pérdida del control en el crecimiento celular	6
Figura 2	Diagrama de la anatomía de la mama humana sana	10
Figura 3	Diagrama de la anatomía de la mama humana con carcinoma ductal <i>in situ</i>	13
Figura 4	Diagrama de la anatomía de la mama humana con carcinoma lobulillar <i>in situ</i>	14
Figura 5	Diagrama de la anatomía de la mama humana con carcinoma ductal invasivo	15
Figura 6	Diagrama de la anatomía de la mama humana con cáncer inflamatorio	18
Figura 7	Diagrama de la metástasis de un tumor mamario	19
Figura 8	Diagrama de las vías de señalización que activa a los factores de transcripción que reprimen a la proteína E-cadherina	21
Figura 9	Diagrama de la conformación de las cadherinas tipo E	24
Figura 10	Diagrama de la unión intercelular que realiza E-cadherina en células del epitelio	25
Figura 11	Diagrama de los dominios de la familia snail	26
Figura 12	Diagrama de los dominios del receptor de estrógeno	32
Figura 13	Diagrama de la homología entre Reαy el REβ	33
Figura 14	Diagrama de las estructuras bidimensionales del tamoxifeno y raloxifeno	34
Figura 15	Diagrama general de la estrategia experimental del proyecto	42
Figura 16	Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 24 horas de tratamiento	48
Figura 17	Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento	49
Figura 18	Efecto del tranilast en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento	49

Figura 19	Comparación de los efectos individuales y combinados de raloxifeno y tranilast en células receptor de estrógeno positivas	50
Figura 20	Expresión proteica de E-cadherina en células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast	51
Figura 21	Efecto en la migración de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast	52
Figura 22	Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 24 horas de tratamiento	53
Figura 23	Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento	54
Figura 24	Efecto del tranilast en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento	54
Figura 25	Comparación de los efectos individuales y combinados de raloxifeno y tranilast en células receptor de estrógeno negativas.	55
Figura 26	Expresión proteica de E-cadherina en células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.	56
Figura 27	Expresión proteica de snail en células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.	57
Figura 28	Expresión proteica de snail en el núcleo de las células receptor de estrógeno negativas.	58
Figura 29	Efecto en la migración de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.	59
Figura 30	Mecanismo de acción propuesto para el efecto del raloxifeno en la expresión proteica de MTA3, E-cadherina y snail en células RE positivas	62

Figura 31	Mecanismo de acción propuesto para el efecto del tranilast en la expresión proteica snail en células RE negativas	65
------------------	---	----

1.0 INTRODUCCIÓN

La metástasis es la principal causa de muerte en mujeres con cáncer de mama (Darakhshan y col., 2014), pues este proceso les permite a las células realizar invasión y proliferación en órganos distantes como hueso, pulmón, hígado y cerebro (May, 2014). Lo anterior, es derivado de la transición del fenotipo epitelial al mesenquimal (TEM) que les otorga a las células cancerígenas propiedades migratorias (Kotiyal y Bhattacharya, 2014). Dicha transición es consecuencia del descontrol en vías de señalización como son TGF- β , Wnt, Notch, NF- κ B y ERK/MAPK (Kotiyal y Bhattacharya, 2014), las cuales favorecen la expresión proteica de factores de transcripción como snail, slug y twist, siendo éstos responsables de la represión de la expresión de E-cadherina (Takai y col., 2014), la cual es considerada un componente central de las uniones de adhesión entre células y pauta vital para mantener la homeóstasis epitelial (Kaufhold y Bonavida, 2014). Es por ello que la regulación a la baja de esta proteína se ha tomado como sello característico del fenotipo mesenquimal, encontrándose íntimamente relacionada con la habilidad invasiva de diversas variedades de cáncer (Takai y col., 2014). De los factores de transcripción que reprimen la expresión de E-cadherina, el más relacionado a la misma es snail, que presenta un motivo consenso de 6 nucleótidos (CAGGTC) (Nieto, 2002), que reconoce y se acopla perfectamente a la caja E-box (CACCTG) presente en la región promotora del gen de E-cadherina (Lin y col., 2014). Además, se sabe que snail forma parte de 4 complejos con función de silenciamiento, de los cuales dos de ellos operan directamente en el promotor de la glicoproteína E-cadherina, mientras que los otros dos actúan directamente en las histonas suprimiendo de esta manera la expresión de E-cadherina (Kaufhold y Bonavida, 2014). Es por ello que las células asociadas a la sobreexpresión de snail se encuentran categorizadas como agresivas y muy invasivas.

Una de las terapias para el tratamiento de cáncer de mama más versátil y eficaz es la nombrada terapia hormonal (Hemachandra y col., 2014), los fármacos por excelencia de esta clasificación son los denominados Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno (MSRE), los cuales han mostrado resultados favorables. El

fármaco raloxifeno pertenece a la segunda generación de esta clasificación. El raloxifeno ha sido aprobado para la prevención de osteoporosis y la disminución de cáncer en mujeres en etapa de post menopausia (Taurin y col., 2013), sin embargo, su acción no se limita a esta etapa, ya que ensayos clínicos como MORE (*Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*) (Martinkovich y col., 2014) y CORE (*Continuing Outcomes Relevant to Evista*) han hecho evidente su efectividad contra el cáncer de mama, puesto que mostro 59% de reducción (Lee y col., 2008). Este efecto es debido a su unión competitiva al receptor de estrógeno, lo cual bloquea la acción mitógena del estradiol (Taurin y col., 2013). No obstante, se le ha vinculado a efectos secundarios que generan patologías alternas como eventos tromboembólicos leves, por lo que considera necesario disminuir la dosis de exposición sin afectar los efectos primarios del fármaco.

Es por ello que en este proyecto se propone el uso de combinaciones farmacéuticas que pudieran asegurar una reducción del carácter invasivo y proliferativo de las células de cáncer de mama, así como una disminución de los efectos secundarios relacionados a los tratamientos.

Tranilast, un fármaco utilizado en el tratamiento para alergias, asma bronquiales, cicatrices hipertróficas y dermatitis atópica (Li y col., 2014) ha mostrado su eficacia como antiproliferativo y antimetastásico en células tanto negativas (MDA-MB231) como positivas (BT-474) al receptor de estrógeno (Subramaniam y col., 2011). Con base en lo anterior y puesto que Tranilast ejerce su acción a través de la disminución de la activación de la vía TGF- β 1, que influye directamente en la transformación del epitelio normal o sano a invasivo (Kaneyama y col., 2010), se piensa que podría disminuir el carácter invasivo de las células.

Con base en lo anterior se propone el uso de raloxifeno en combinación con el Tranilast, con el fin de estudiar el efecto de dichos fármacos en las proteínas clave de la TEM como lo son E-cadherina y snail.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estadísticas del cáncer

2.1.1 Nivel mundial

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en el 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de defunciones (Tabla 1), un aumento considerable a los 7,6 millones de defunciones reportadas en el año 2008. Este aumento en la tasa de mortalidad se debe al incremento en los casos de cáncer, los cuales se prevé aumenten hasta 70 % en los próximos 20 años (OMS, 2016a).

Cabe destacar que el cáncer es la enfermedad de mayor incidencia en adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó una diferencia en los tipos de cáncer que afectan al género masculino y femenino, ya que para los hombres los tipos más comunes son los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado, mientras que en las mujeres son los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (OMS, 2016a).

Tabla 1. Tipos de cáncer más comunes registrados a nivel mundial en el año 2012 (OMS, 2016a).

Tipo de cáncer	Defunciones originadas en el año
Pulmonar	1,59 millones
Hepático	745,000
Gástrico	723,000
Colorrectal	694,000
Mamario	522,000
De esófago	400,00

2.1.2 Nivel nacional

En México en el 2013, del total de defunciones registradas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en la población de 20 años y más, 13.6% se debieron a un tumor maligno y de éstas 48.8% pertenecían al sexo masculino y 51.2% al sexo femenino (INEGI, 2016a).

De los tumores malignos registrados en esta población los más comunes fueron los de órganos digestivos, seguidos por los de órganos respiratorios e intratorácicos. Cabe destacar que este comportamiento difiere notablemente dependiendo del género, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte, con 14 defunciones por cada 100 mil (Tabla 2) (INEGI, 2016a).

Tabla 2. Tasa de mortalidad en población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo (INEGI, 2016a).

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	32.52	33.98	31.20
Órganos digestivos e intratorácicos	10.58	14.71	6.83
Sistema reproductor masculino	8.44	17.75	NA
Mama	7.59	0.14	14.36
Órganos genitales femeninos	6.78	NA	12.93
Órganos hematopoyéticos	5.68	6.28	5.14
Vías urinarias	4.12	5.51	2.85
Células germinales (testículo u ovario)	3.48	1.30	5.46
Por cada 100 mil habitantes en el año 2013.			

2.2 Generalidades del cáncer

El funcionamiento y crecimiento de una célula sana depende del control ejercido por los receptores, los factores de crecimiento, las hormonas, las proteínas de señalización, las de adhesión célula-célula y las de regulación del ciclo celular, entre otras (Wren, 2007). Sin embargo, estos controles pueden ser afectados por mutaciones espontáneas que ocurren durante la división celular (Wren, 2007), así como por fenómenos que lesionan el ADN, como pueden ser los carcinógenos físicos (radiaciones ultravioletas o ionizantes), químicos (asbestos, componentes del humo del tabaco, etc.) y biológicos (infecciones causadas por determinados virus, bacterias y parásitos) (OMS, 2016a). Dicho daño perturba los sistemas de proliferación y homeóstasis celular (Hanahan y Weinberg, 2000), dando como resultado autonomía celular, es decir, la capacidad de crecer sin control, además de alteraciones en los sistemas de señalización y activación de apoptosis (muerte celular) (Wren, 2007), volviendo carentes a las células de la capacidad de morir al envejecer o dañarse (INC, 2016a). Esta multiplicación celular no regulada acompañada de la falta de muerte da lugar a una colonia anormal denominada nódulo o tumor (Figura 1).

Cuando las células que constituyen el tumor presentan además alteraciones en las proteínas reguladoras de la adhesión celular, se clasifica al tumor como maligno, de no ser así se clasifica como benigno (aecc, 2016a).

Un tumor maligno, también llamado cáncer, presenta propiedades migratorias, es decir, que las células que lo conforman son capaces de dispersarse del origen (tumor primario) (Weinberg, 2014), llegando a invadir tejido cercano como hueso y músculo, además de los sistemas sanguíneo y linfático (INC, 2016a) los cuales les otorga la posibilidad de trasladarse y proliferar en órganos y tejidos distantes, lo que se conoce como metástasis (aecc, 2016a).

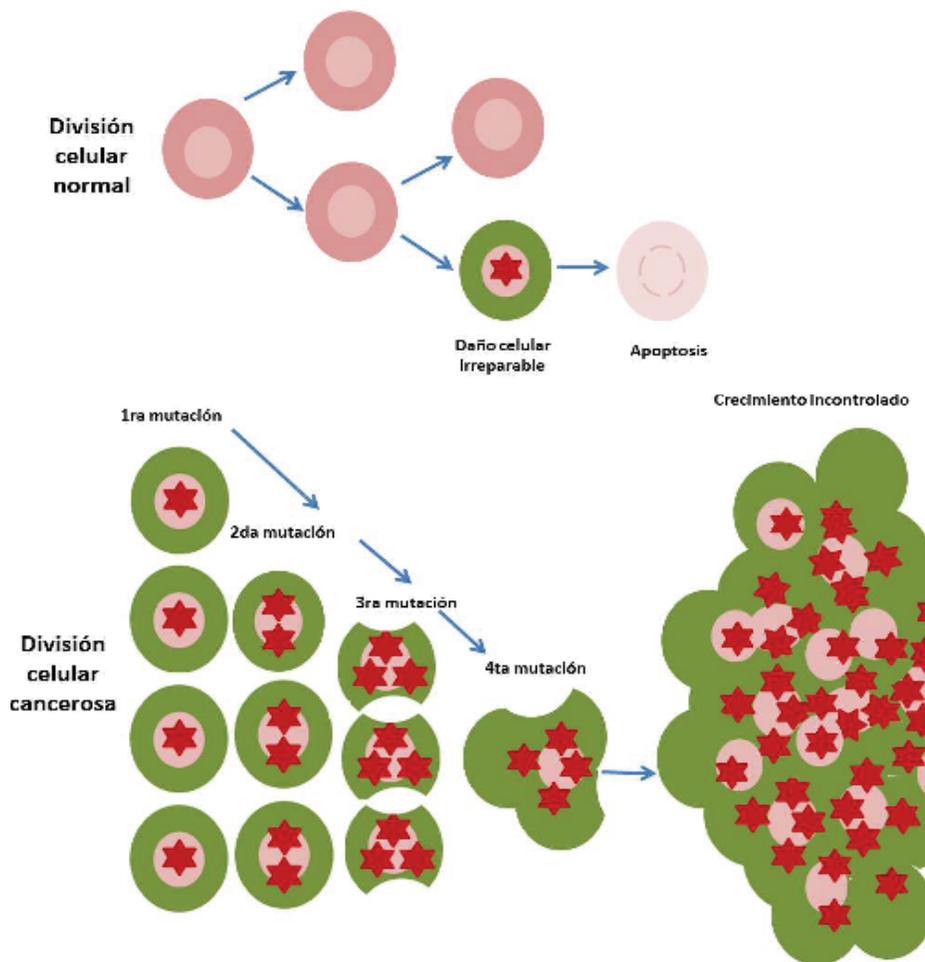


Figura 1. Diagrama de la pérdida del control en el crecimiento celular (Modificado de INC, 2016a).

El cáncer se relaciona con alteraciones (mutaciones) en todos los niveles de regulación, no obstante, no es necesario gran número de modificaciones para dar lugar al desarrollo del cáncer, ya que únicamente con 6 se consigue alterar los circuitos regulatorios de la célula, así como las directrices de proliferación y homeóstasis (Wren, 2007). Lo que da como resultado: 1) mitosis autónoma, 2) insensibilidad a las señales de antitumorales, 3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogénesis prolongada y 6) invasión de tejidos adyacentes y metástasis, lo anterior mediante la inhibición o sobreexpresión de genes específicos (Tabla 3) (Hanahan y Weinberg, 2000).

Tabla 3. Alteraciones esenciales para el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000).

Alteración	Proteína involucrada	Mecanismo de acción	Efecto
Capacidad para realizar mitosis autónoma	Ras	Modificaciones en la proteína Ras	Promoción de la supervivencia celular, mediante la interacción con la vía de señalización R13K
Insensibilidad a las señales de anticrecimiento	Rb (retinoblastoma)	Alteraciones en el control del ciclo celular	Pérdida del efecto de los factores de anticrecimiento que presionan acción en la transición G1/S
Evasión de la apoptosis	p53 (proteína de 53 kDa)	Pérdida de la expresión de p53 Estimulación continua de la vía de supervivencia R13K	Supervivencia de la célula alterada
Potencial replicativo ilimitado	Telomerasa	Aumento de la actividad de la proteína telomerasa	Replicación ilimitada y omisión de la senescencia
Angiogénesis sostenida	Factores de transcripción Trombospondin-1 y/o β -interferón	Aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por efecto de la baja presencia de los factores que lo regulan	Abastecimiento de oxígeno y nutrientes para el crecimiento celular
Invasión de tejidos y metástasis	Γ cadherina	Supresión de la expresión de Γ cadherina	Pérdida de la adhesión célula-célula, que permite la invasión y migración celular

Debido a lo anterior, el cáncer es calificado como una patología de alta pluralidad, es decir, no se considera una sola enfermedad sino numerosas enfermedades, teniéndose hasta el momento registro de más de 100 tipos diferentes de cáncer, de los cuales la mayoría son nombrados según la zona del cuerpo en la que se originan y la estirpe celular que involucran (INC, 2016a).

2.3 Tipos de cáncer más comunes

Los tipos más comunes a nivel mundial son cáncer de pulmón, órganos del aparato digestivo (hígado, estómago, colon y recto, esófago) y mama (Tabla 1), siendo este último el más frecuente en las mujeres del todo el mundo (OMS, 2016a).

2.4 Estadísticas del cáncer de mama

2.4.1 Nivel mundial

Con respecto al género femenino el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial, representando aproximadamente 16% de todos los casos relacionados a este género (OMS, 2016b). Datos de la OMS señalan que cada año se presentan 1,38 millones de nuevos casos y 458 000 muertes por esta patología.

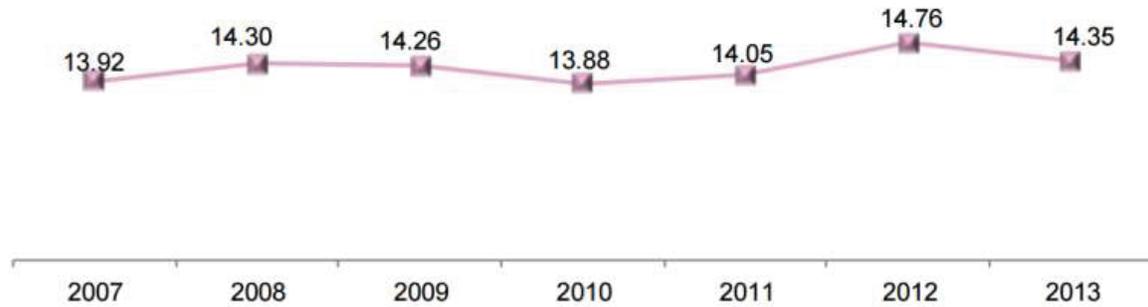
De las cifras de incidencia aproximadamente 10% de los nuevos casos reportados cada día a nivel mundial corresponden a Latinoamérica y el Caribe, observándose la tasa más alta en Uruguay y Argentina con 110.9 y 88.1 por cada 100,000 habitantes respectivamente. Con base en estas cifras, la predicción de crecimiento de esta patología se considera como alta, llegando a estimar que para el año 2025 países de Latinoamérica y el Caribe incrementarán sus costos de salud en aproximadamente 47% (Cazap y col., 2008).

2.4.2 Nivel nacional

Particularmente en los Estados Unidos Mexicanos, el cáncer de mama ha presentado un incremento constante desde 1998, de tal manera que en el año 2006 este tipo de cáncer se posicionó en el primer lugar como causa de muerte en mujeres (Infocáncer, 2016).

Sin embargo, en el periodo 2007-2013 la tasa de mortalidad del cáncer de mama se ha mantenido relativamente estable, con una tasa de 14 por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, ocupando de esta manera la segunda causa de muerte (Tabla 4) (INEGI, 2016b).

Tabla 4. Tasa de mortalidad en población de 20 años y más, por tumor maligno de mama, serie anual 2007-2013 (INEGI, 2016b).



2.5 Anatomía de la mama humana

La mama está conformada por diversos tejidos con múltiples funciones, siendo el tejido adiposo el que proporciona consistencia y volumen (aecc, 2016b). El tejido adiposo se encuentra sobrepuesto a los músculos pectorales. Dentro del tejido graso se encuentra una red de 15 a 20 secciones de tejido glandular denominadas lóbulos (SAC, 2016a). Cada lóbulo se conforma de un grupo de glándulas sudoríparas con posible capacidad productora de leche (en caso de lactancia) llamadas lobulillos. Los lóbulos y los lobulillos se conectan a través de los conductos galactóforos, los cuales son una serie de ductos ramificados que convergen hacia el pezón, permitiendo de esta manera la secreción de la leche (Figura 2) (aecc, 2016b).

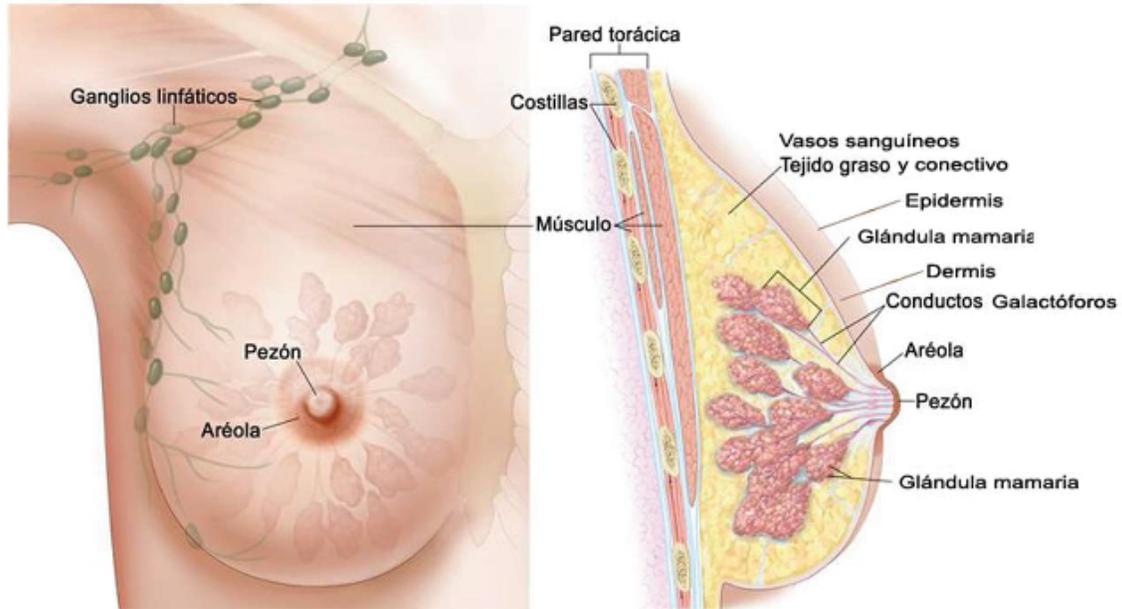


Figura 2. Diagrama de la anatomía de la mama humana sana (INC, 2016b).

La mama también contiene vasos sanguíneos y linfáticos cuya función es proporcionar sangre a la glándula y recoger la linfa respectivamente. Específicamente los vasos linfáticos de la mama confluyen en pequeñas formaciones redondeadas denominadas ganglios linfáticos, las cuales se encuentran situadas a ambos lados del esternón, así como en la axila (aecc, 2016b).

2.6 Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama se define como un tumor maligno que se origina en el tejido glandular mamario (aecc, 2016b). Este proceso habitualmente se inicia en las células de los lobulillos y/o en las de los conductos galactóforos, sin embargo, también puede desarrollarse en tejidos estromales como los conjuntivos grasos y los fibrosos (OCM, 2016a).

Las células del cáncer mamario presentan tres tipos diferentes de invasión, donde la primera se refiere al crecimiento local, es decir, infiltración en estructuras vecinas (músculos, huesos y piel), la segunda a la diseminación linfática, la cual puede ser

axilar, torácica o clavicular y la tercera a la diseminación hematógica, la cual comprende intravasación al sistema circulatorio y finalmente proliferación en huesos, pulmón, hígado y piel (aecc, 2016b).

2.7 Factores de riesgo del cáncer de mama

El cáncer de mama es el resultado de diversos factores de riesgo, los cuales al presentarse aumentan la probabilidad de desarrollar esta patología. Estos factores, aunque son bastante diversos se encuentran muy bien definidos y divididos en dos vertientes, los factores incontrolables y los controlables (OCM, 2016b).

Los factores incontrolables enmarcan características como el género, la raza, la edad, la exposición a estrógenos y los antecedentes familiares. Donde el género es de gran significancia, aunque el hombre también puede padecer esta patología, la mujer presenta mayor susceptibilidad debido a que sus células cambian y se desarrollan constantemente. Respecto a la raza, se ha encontrado que las mujeres de tez blanca son más propensas que las afroamericanas, asiáticas y latinas. La edad por su parte marca una diferencia significativa establecida por 0.44% de probabilidad en mujeres de 30 a 39 años contra 4% en mujeres de más de 60 años (OCM, 2016b).

La exposición a estrógenos es otro elemento de alto riesgo. En esta categoría se enmarcan causas como menarquia temprana, menopausia retrasada, ausencia de lactancia y la terapia de remplazo hormonal (OCM, 2016b).

Por último, la categoría de los antecedentes familiares enmarca alrededor del 5% de los casos de cáncer de mama y se refieren a mutaciones heredables que pudieran propiciar la aparición de esta enfermedad, como lo son las afecciones en genes como BRCA1, BRCA2, CHEK2, p53, ATM (May, 2014), HER2 (Davis y col., 2014).

Particularmente, la inestabilidad genética en BRCA1/2 se encuentra vinculada con un alto índice de desarrollo de cáncer de mama y de ovario, mostrando una probabilidad de 60-80% y de 20-40% respectivamente. Lo anterior debido a la función que desarrollan estos genes en la reparación del ADN mediante el proceso

de recombinación homóloga. De manera singular, la proteína BRCA1 interactúa con la RNA polimerasa II y con la histona desacetilasa, jugando un papel clave en la transcripción y reparación de daños en el ADN de doble cadena, además de que también se combina con otras proteínas, formando el complejo de múltiples subunidades llamado BASC asociado a la vigilancia. Por otro lado, BRCA2 presenta función de reparación de la cadena de ADN doble y sencilla, a través de la interacción con RAD51, esta unión estimula la acción de respuesta en el mecanismo de recombinación homóloga (Davis y col., 2014).

Los factores controlables enmarcan elementos como el peso, la dieta, el sedentarismo, el consumo de sustancias nocivas como el alcohol y el tabaco, el uso de anticonceptivos orales y la presencia constante de estrés y ansiedad (OCM, 2016b).

Se ha identificado una relación del cáncer de mama con la obesidad mediante estudios que revelan expresión de aromatasa por parte de los adipocitos, la cual convierte a los andrógenos en estrógenos y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, donde esta última convierte la estrona en una forma más activa del 17β -estradiol, es decir, al tener altas reservas de tejido adiposo aumenta las concentraciones de estrona y 17β -estradiol, los cuales podrían influir en un aumento significativo del riesgo de padecimiento (May, 2014).

De igual forma la exposición a estrógenos y a anticonceptivos orales durante periodos prolongados, puede aumentar la probabilidad de presentar este tipo de cáncer, ya que estas sustancias estimulan el crecimiento de las células mamarias (OCM, 2016b).

2.8 Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se clasifica en función a su localización, la morfología que presentan sus células en el microscopio y mediante la expresión de proteínas específicas de la superficie y del interior de la célula (SAC, 2016b).

2.8.1 Clasificación referente a la localización celular

- Carcinoma ductal *in situ* (DCIS)

El carcinoma ductal *in situ*, también nombrado carcinoma intraductal, es considerado de carácter no invasivo o preinvasivo ya que su origen es localizado puntualmente en las células internas del conducto (Figura 3). No obstante, puede llegar a invadir el tejido que rodea al seno (SAC, 2016b).

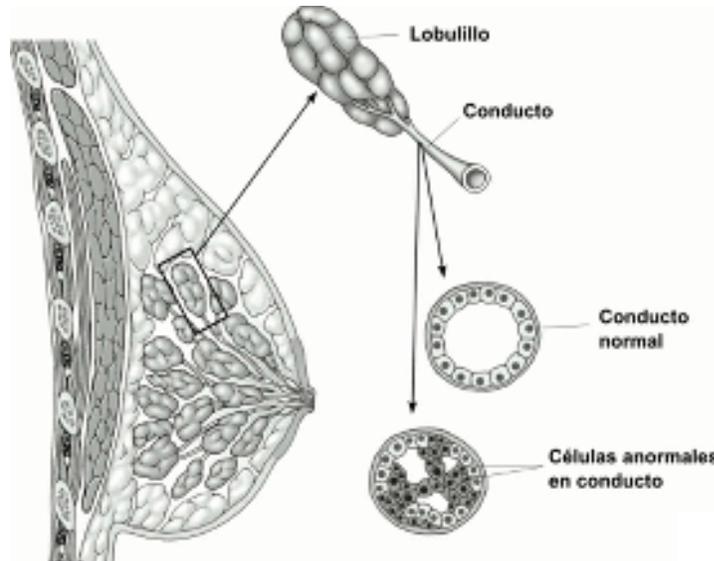


Figura 3. Diagrama de la anatomía de la mama humana con carcinoma ductal *in situ* (SAC, 2016b).

- Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS)

El carcinoma lobulillar *in situ* se desarrolla en las células de los lobulillos, no obstante, a pesar de permanecer dentro del lobulillo, los pacientes diagnosticados con CLIS suelen tener más de un lobulillo afectado (OCM, 2016c).

Particularmente, este tipo de cáncer en la actualidad se considera una lesión premaligna, por ello se clasifica como marcador, permitiendo identificar a las mujeres con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo (aecc, 2016c).

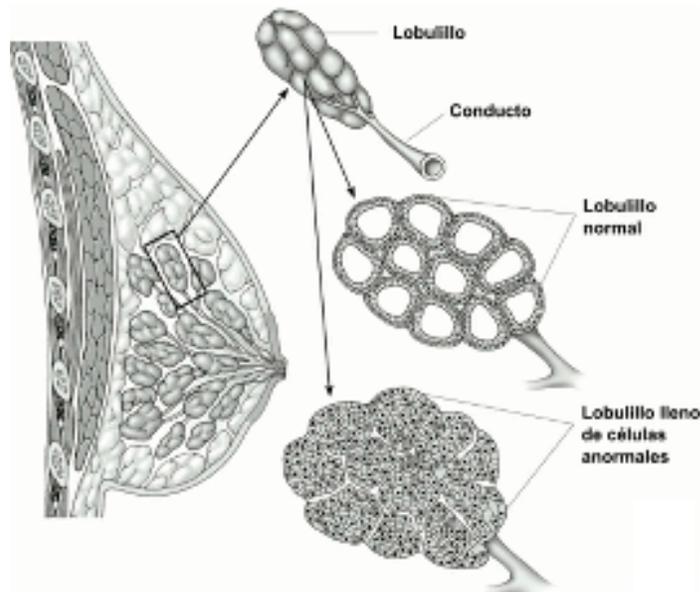


Figura 4. Diagrama de la anatomía de mama humana con carcinoma lobulillar *in situ* (SAC, 2016b).

- Carcinoma ductal invasivo (CDI)

El carcinoma ductal invasivo es considerado el tipo más común de cáncer de mama, al presentarse en 8 de cada 10 casos de cáncer invasivo de mama. Se sabe que es infiltrante ya que rebasa su origen en el conducto galactóforo (Figura 5), atravesando la pared hasta alcanzar tejido adiposo del seno o incluso otras partes del organismo a través del sistema linfático y/o torrente sanguíneo (SAC, 2016b).

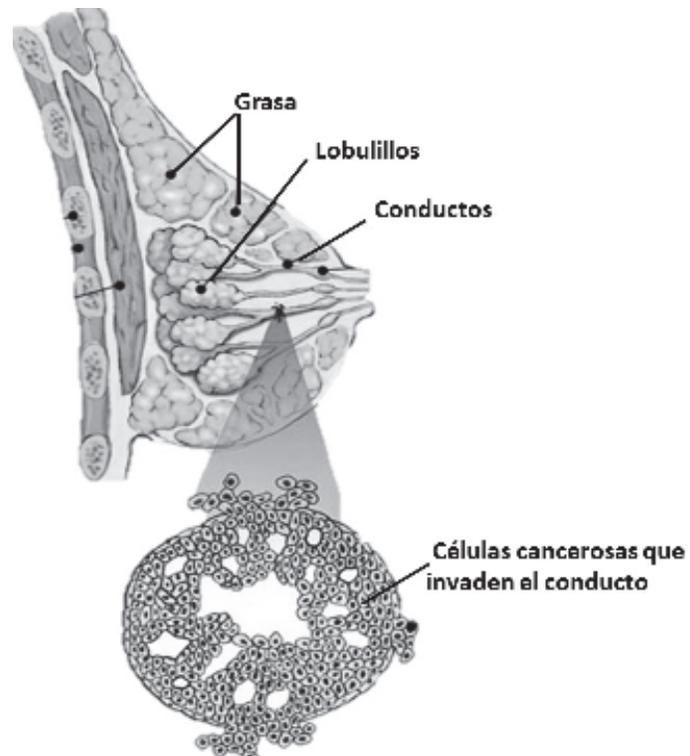


Figura 5. Diagrama de la anatomía de mama humana con carcinoma ductal invasivo (OCM, 2016c).

- Carcinoma lobulillar invasivo (CLI)

Conocido como el segundo más común, el carcinoma lobulillar invasivo tiene su inicio en las glándulas productoras de leche. Éste al igual que el CDI invade tejido mamario, además de que con el paso del tiempo puede llegar hasta nódulos linfáticos y posiblemente otras zonas del organismo (SAC, 2016b).

2.8.2 Clasificación referente a las proteínas de superficie que presentan las células

Las células también se pueden clasificar de acuerdo a la presencia o carencia de proteínas receptoras de estrógeno, progesterona y HER2, hormonas y proteínas relacionadas con la inducción del crecimiento tumoral (SAC, 2016b).

- Receptor hormonal positivo

Se dice del tipo de cáncer mamario que en sus células presentan los receptores de estrógeno y/o progesterona, este tipo particular se puede tratar con hormonoterapia, la cual ayuda a disminuir el crecimiento tumoral y evitar su reaparición una vez efectuada la cirugía (SAC, 2016b).

- Receptor hormonal negativo

En este caso las células no presentan la expresión de receptores estrógeno y/o progesterona, asociándose a un tipo de cáncer de crecimiento rápido y un bajo pronóstico de supervivencia (SAC, 2016b).

- Positivo a proteína HER2

Este tipo de cáncer mamario se encuentra asociado a la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el cual es una proteína tirosina cinasa. HER2 entre las cuatro proteínas de la familia HER es la que presenta la mayor actividad cinasa catalítica, por lo que un aumento en su expresión conduce a un incremento en la homodimerización y heterodimerización de esta proteína y los miembros de su familia, convergiendo de esta manera en una fuerte cascada de señalización protumorigénica (Yan y col., 2015).

Debido a lo anterior, su presencia se encuentra asociada con la invasión tumoral, la metástasis distante y el pronóstico adverso. Este gen se ve afectado en el 25% de los casos de cáncer de mama (OCM, 2016c).

- Triple positivo

Este tipo de cáncer presenta positividad tanto para el receptor de estrógeno como para el de progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (SAC, 2016b).

- Triple negativo

Esta clasificación se refiere a las células cancerosas que carecen del receptor de estrógeno (RE) y el receptor de progesterona (PR), además de la casi nula presencia de la proteína HER2 en sus superficies. Este tipo de cáncer se encuentra asociado a una rápida propagación por lo que se presenta con mayor frecuencia en carcinomas ductales invasivos (SAC, 2016b).

2.8.3 Tipos de cáncer de mama menos comunes

- Cáncer inflamatorio de mama

Específicamente este tipo representa tan solo del 1 al 3% de todos los cánceres de mama (SAC, 2016b); éste inicia con enrojecimiento e inflamación del seno (OCM, 2016c), además de que puede ocasionarle un aspecto grueso con hoyuelos similar al de una cascara de naranja (Figura 6), volviéndolo más grande, firme y sensible. Este se origina a causa de un bloqueo de los ganglios linfáticos de la piel por las células cancerosas (SAC, 2016b).



Figura 6. Diagrama de la anatomía de mama humana con cáncer inflamatorio (Seno izquierdo con piel de naranja y pezón invertido), (SAC, 2016b).

- Enfermedad de Paget

Se caracteriza por otorgarle al pezón y a la areola un aspecto escamoso y enrojecido que provoca comezón, irritación (OCM, 2016c) e incluso sangrado y supuración. Se origina en los conductos del seno y se propaga hacia la piel del pezón. Por lo regular, se encuentra asociada al carcinoma ductal in situ, aunque también puede llegar a presentarse en casos de cáncer infiltrante (SAC, 2016b).

2.10 Carácter invasivo del cáncer de mama

Usualmente los pacientes no fallecen a causa de un tumor primario en la mama, ello debido a que este no es un órgano esencial. El 90% de las muertes se debe al carácter invasivo de las células cancerosas (metástasis) presentes en tumores sólidos (Li y Li, 2014), el cual permite se disgreguen del tumor primario (Jiménez-Salazar y col.,2012), entren a circulación sanguínea y/o linfática viajando de esta forma a través de las cavidades del cuerpo y evadiendo al sistema inmune hasta adherirse a los revestimientos de la pared endotelial. Posteriormente, llevarán a cabo la extravasación y finalmente la proliferación (Liu y col., 2014) formando

tumores secundarios en órganos vitales como hueso, pulmón, hígado y cerebro (Figura 7) (May, 2014).

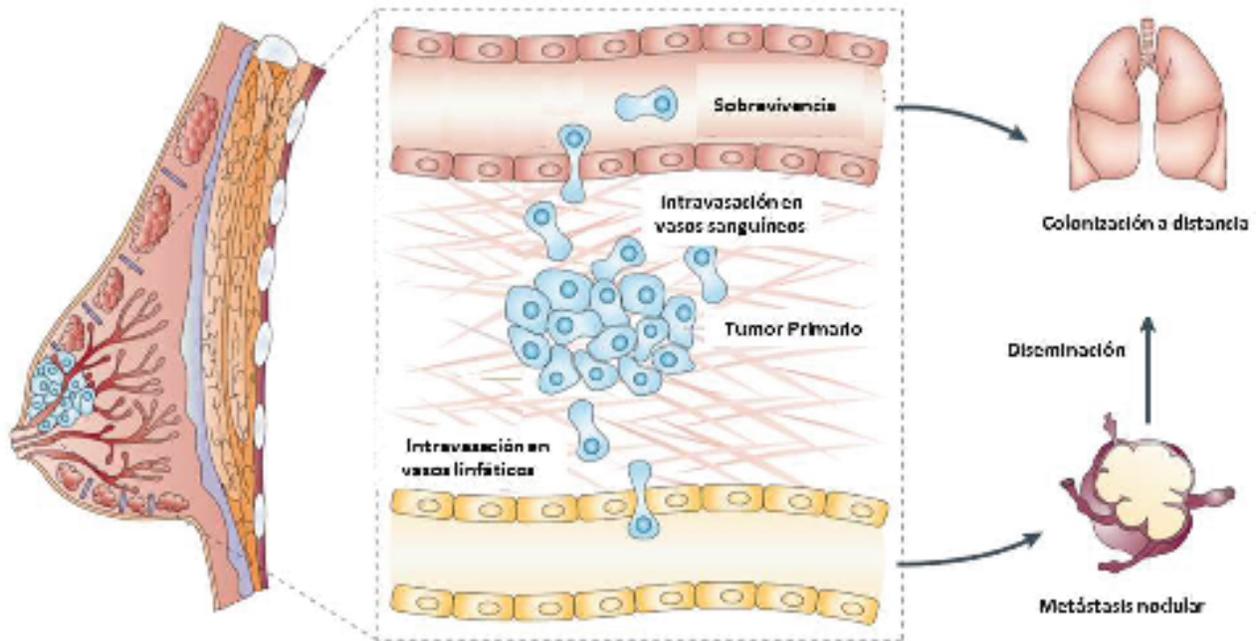


Figura 7. Diagrama de la metástasis de un tumor mamario (Modificado de Smith y Theodorescu, 2009)

Una vez iniciado este comportamiento migratorio e invasivo conocido como metástasis (Wang y Zhou, 2013), la media de supervivencia de pacientes se encuentra alrededor de los 2 o 3 años (Espinós y col., 2008).

Las células metastásicas logran lo anterior debido a que sufren la conversión al fenotipo mesenquimal, en la cual experimentan cambios genéticos y epigenéticos generados en respuesta a los estímulos descontrolados de diversas vías de señalización (factores intrínsecos), así como a las modificaciones en el microambiente celular (factores extrínsecos). Como consecuencia se obtiene la pérdida de polaridad celular, reducción de la adhesión célula-célula, aumento de la movilidad, remodelación del citoesqueleto, incremento de la supervivencia celular, así como la capacidad para atravesar la membrana basal (Wang y Zhou, 2013).

2.10.1 Transición epitelial-mesenquimal (TEM)

El concepto fue desarrollado por los expertos en biología, que observaron que la conversión morfológica ocurrida durante la metástasis presentaba las mismas características del fenotipo mesenquimal experimentado durante el desarrollo embrionario (Wang y Zhou, 2013).

Este tipo de TEM se considera entonces como un proceso dinámico propiciado por el descontrol en múltiples vías de señalización como son TGF- β , Wnt, Notch, NF- κ B y ERK/MAPK (Figura 8) (Kotiyal y Bhattacharya, 2014), las cuales repercuten a su vez en factores de transcripción que tienen como blanco moléculas diana asociadas a las capacidades ganadas características del cáncer (Takai y col., 2014).

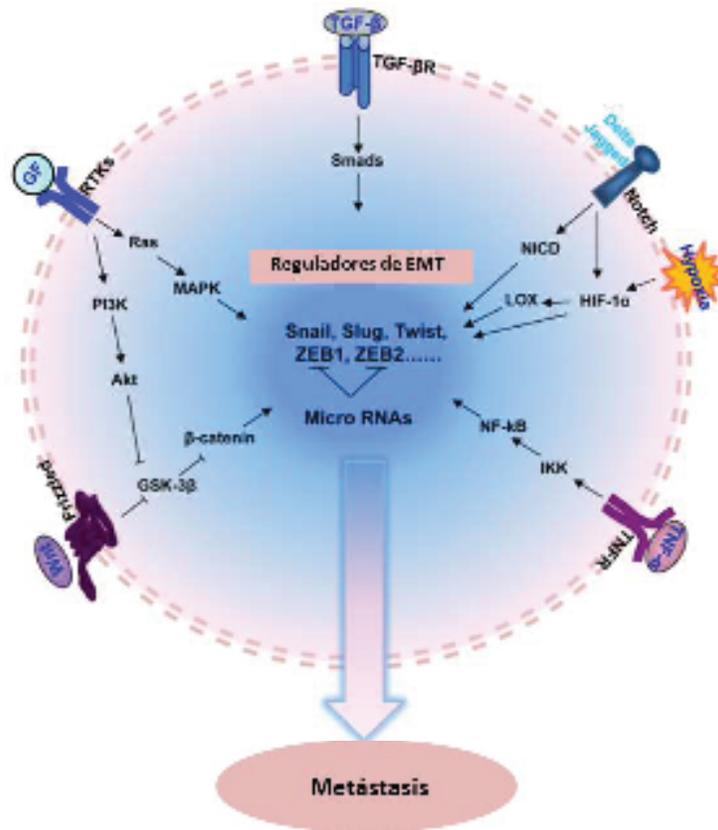


Figura 8. Diagrama de las vías de señalización que activan los factores de transcripción que reprimen a la proteína E-cadherina (Modificado de Wang y Zhou, 2013).

- La vía Wnt tiene como molécula señal a la β -catenina, la cual al unirse a E-cadherina refuerza las uniones entre células. β -catenina se transloca al núcleo con el fin de interactuar con el complejo TCF/LEF, regulando de esta manera, genes blanco como c-myc y ciclina D. La translocación de β -catenina al núcleo, se lleva a cabo por la inactivación de GSK- β al unirse las moléculas ligando Wnt al dominio del receptor Frizzled. GSK-3 β es una proteína de suma importancia en esta vía, ya que ella no solamente regula negativamente la estabilización y activación de β -catenina, sino que además media la fosforilación de snail a través de su unión a dos motivos de este factor de transcripción. En la primera unión regula la ubiquitinación de snail a través de la activación de β -Trcp, mientras que en la segunda regula su ubicación intracelular; lo cual quiere decir que existe un sinergismo entre snail y β -catenina, ya que al sobreexpresarse snail, E-cadherina manifiesta una

disminución, lo que impacta en la translocación de β -catenina, generando de esta manera una alimentación continua al sistema (Wang y Zhou, 2013).

- En el caso de la vía de $\text{TNF}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ además de inducir la inflamación, la inmunidad y la homeostasis celular (Wang y Zhou, 2013), también influye en la transcripción de los factores asociados a TEM (snail, slug, twist, ZEB1 y ZEB2) (Kotiyal y Bhattacharya, 2014), esto lo realiza en consecuencia al reclutamiento de IKK, el cual se une a $\text{NF-}\kappa\text{B}$ resultando en la translocación del mismo al núcleo para unirse a κB y activar la transcripción de genes (Wang y Zhou, 2013). En el caso específico de snail la vía $\text{TNF}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ promueve su estabilización y el incremento de su transcripción (Kotiyal y Bhattacharya, 2014).
- La vía de señalización Notch en el proceso dinámico de TEM resulta estimulada por $\text{TGF-}\beta$ mediante la activación de la proteína Smad3, lo cual promueve la expresión del factor de transcripción Slug reprimiendo directamente la expresión de E-cadherina.
- La señalización de los receptores tirosina quinasa (RTK), mediante sus efectores MAPK y PI3K, y en comunicación cruzada con $\text{TGF-}\beta$, Wnt y EGFR, incrementa la tasa de proliferación y la invasión celular del tumor (Kotiyal y Bhattacharya, 2014).
- $\text{TGF-}\beta$, se encuentra regulada mediante su interacción con los receptores serina-treonina, teniendo como moléculas señalizadoras a smad2 y 3 las cuales forman complejos con smad4, influyendo directamente en la transcripción de genes diana mediante su unión con los activadores y coactivadores de los mismos. Esta vía de señalización muestra un doble rol en el proceso de TEM, ya que en las etapas tempranas suprime la transición, causando arresto celular e inducción de la apoptosis; mientras que en las etapas avanzadas promueve la transición del epitelio al fenotipo mesenquimal mediante la sobreexpresión del complejo de señalización smad2/3/4, el cual estimula la traducción de diversos represores de E-cadherina (Wang y Zhou, 2013) como son: snail, slug y twist (Kotiyal y Bhattacharya, 2014). Lo anterior quiere decir que un incremento en la

expresión de smad2 o 3 se traduce en un incremento del fenotipo EMT, es decir, de la progresión tumoral. Agregado a lo anterior, TGF- β puede tener acción mediante una vía independiente a smad, activando PI3K, Akt, MAPK y la familia Rho de las pequeñas GTPasas (Wang y Zhou, 2013).

Los factores de transcripción participantes en esta transición al fenotipo epitelial-mesenquimal son la familia snail/slug, twist, δ EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 y E12/E47, los cuales en su mayoría coinciden en un blanco proteico E-cadherina (Boticario y Cascales, 2012). Estos factores de transcripción pueden unirse al promotor del gen de esta glicoproteína y silenciarlo mediante histonas deacetilasas y represores (Wang y Zhou, 2013). Es por ello que la regulación a la baja de esta proteína se ha tomado como sello característico de este fenotipo mesenquimal, encontrándose íntimamente relacionada con el crecimiento infiltrante de diversas variedades de cáncer (Takai y col., 2014) incluyendo el cáncer de mama.

2.11 E-cadherina

E-cadherina se describe como una glicoproteína transmembranal de 120 kDa (Wijnhoven y col., 2000) (Figura 9) codificada por el gen humano *CDH1*, localizado en el cromosoma 16q22.1 (Kaufhold y Bonavida, 2014).

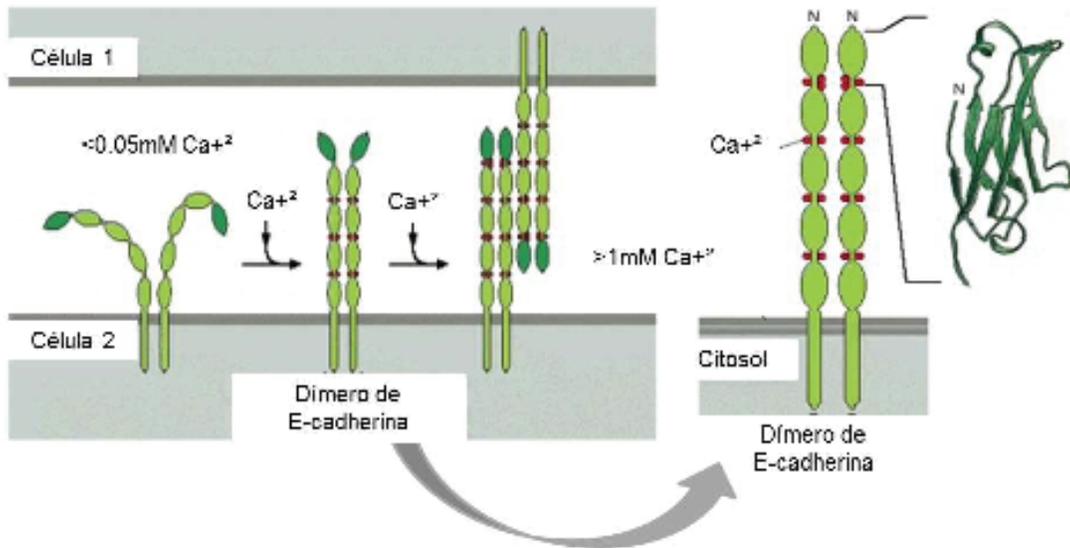


Figura 9. Diagrama de la conformación de las cadherinas tipo E (Modificado de Alberts y col., 2002)

Pertenece a la familia cadherina, la cual se encuentra dividida en 10 subclases de acuerdo a su distribución en el organismo siendo las principales clases: a) la epitelial (E-cadherina), b) la neuronal (N-cadherina) y c) la placentar (P-cadherina). Este grupo de proteínas ejerce su labor de unión mediante el estímulo de calcio⁺² y con el sostén de proteínas adyacentes a la membrana celular llamadas cateninas, las cuales se vinculan con los filamentos de actina presentes en el citoplasma, estableciendo lazos que resultan en una fuerte y consolidada unión célula-célula (Figura 10) (Wijnhoven y col., 2000).

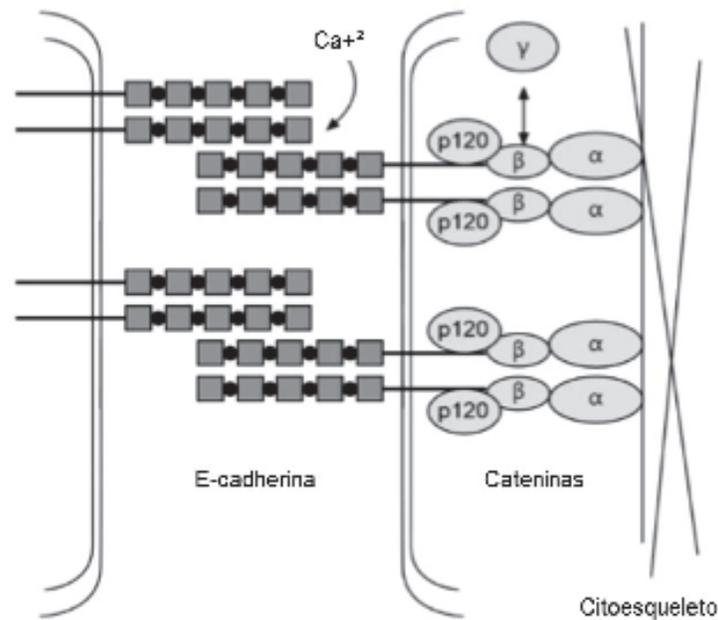


Figura 10. Diagrama de la unión intercelular que realiza E-cadherina en células del epitelio, (Modificado de Wijnhoven y col., 2000).

E-cadherina es considerada un componente central de las uniones de adhesión entre células y pauta vital para mantener la homeostasis epitelial (Boticario y Cascales, 2012). Esta glicoproteína está íntimamente relacionada con la regulación de la invasión en carcinomas, basándose en que su disminución o pérdida de expresión es característica de la adopción del fenotipo mesenquimal, así como el grado de diferenciación del tumor, permeancia venosa e invasión de nódulos linfáticos (Wijnhoven y col., 2000).

Lo anterior se ha comprobado en diversos ensayos con modelos celulares y animales, en los que se varía el tipo de cáncer y grado de tumor, obteniendo resultados que muestran a E-cadherina como clave para mantener la adhesividad celular (Wijnhoven y col., 2000); por lo que su pérdida se traduce en una metástasis inminente y por ende una baja tasa de supervivencia del paciente (Kaufhold y Bonavida, 2014).

Como resultado, E-cadherina es establecida como un blanco para la terapia anticáncer, buscando mediante diversas terapias inducir el incremento de su

expresión, lo que a su vez se traduce en reducción del carácter invasivo (Wijnhoven y col., 2000). Esta alza se pretende lograr a través de la regulación de sus múltiples factores de transcripción (familia snail/slug, twist, δ EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 y E12/E47), que responden a estímulos del microambiente uniéndose al promotor de E-cadherina y reclutando correpresores e histonas deacetilasas para el silenciamiento del gen de la glicoproteína (Wang y Zhou, 2013).

2.12 Snail

Snail es un factor de transcripción de 264 aminoácidos (Muqbil y col., 2014), expresado de manera normal en riñón, tiroides, glándula suprarrenal, pulmones, placenta, ganglios linfáticos, corazón, cerebro, hígado y tejidos del músculo esquelético (Kaufhold y Bonavida, 2014). Se conforma por un grupo amino terminal de aminoácido básico (Dominio SNAG) y un dominio carboxilo terminal de unión al ADN del tipo dedos de zinc C2H2 (residuos Cys-His conservados).

Pertenciente a la súper familia de factores de transcripción snail, comparte el dominio SNAG y al menos cuatro dedos de zinc (Figura 11) con los demás miembros: slug y scratch (Kaufhold y Bonavida, 2014).

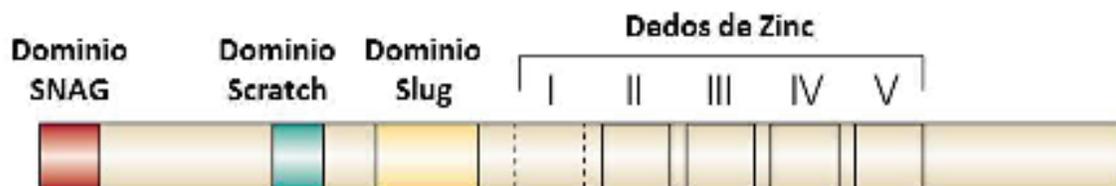


Figura 11. Diagrama de los dominios de la familia snail (Modificado de Nieto, 2002).

Esta nucleoproteína se encuentra íntimamente relacionada con la represión de la glicoproteína E-cadherina durante la metástasis, ya que además reconoce un motivo consenso de 6 nucleótidos (CAGGTC) que encaja perfectamente en el promotor de la proteína (E-box) (Nieto, 2002), también se conocen 4 complejos vinculados a snail con función de silenciamiento. Los complejos relacionados a G9a y a Ajuba-PRMT5, operan directamente en el promotor de la glicoproteína, mientras que los otros dos actúan en las histonas. Específicamente el formado con Sin3A-

HDAC1/2, desacetila las H3 y H4 para suprimir la expresión proteica y por último el formado con LSD1-CoREST resulta en la dimetilación de H3K4me2, el cual es reclutado hacia el promotor de E-cadherina (Kaufhold y Bonavida, 2014). Esta represión se traduce en ganancia de capacidad migratoria e invasiva, es decir, inducción al fenotipo mesenquimal y la progresión tumoral (Cai y col., 2014). Sin embargo, la variedad de blancos para esta proteína es singularmente amplia involucrando no solo a E-cadherina, sino también a otras proteínas marcadoras del fenotipo mesenquimal como lo son ZEB-1, Mucin-1, entre otras (Kaufhold y Bonavida, 2014).

La expresión proteica de snail es inducida por una amplia gama de vías de señalización como son: Wnt, TGF β , Notch y el factor de inducción de hipoxia (HIF). Mientras que su estabilización y translocación al núcleo es inducida por la fosforilación de GSK3 β y PAK1 (Cai y col., 2014). snail es considerado uno de los inductores más importantes del carácter invasivo de las células cancerosas (Muqbil y col., 2014), sin embargo, es uno de los blancos de tratamiento menos estudiado.

2.13 Tratamientos para combatir el cáncer de mama

Dado que el cáncer de mama metastásico se considera en gran medida una enfermedad incurable (Wang y Zhou, 2013) la intención terapéutica no es curativa, sino reguladora y paliativa, manejando como objetivo la optimización de la calidad de vida mediante cuidados atenuantes del dolor. Los tratamientos administrados pueden ser individuales, combinados o como complemento de alguno principal, ello depende directamente de las características que manifieste el tumor mamario. Para ello se debe tener en cuenta la duración de la respuesta, tiempo necesario para alcanzar la máxima respuesta y la calidad de la misma (Espinós y col., 2008).

Para estandarizar los tratamientos se han establecido cinco fases en las que se enlistan la prevención, detección temprana, corrección, manejo de la patología crónica y cuidados paliativos (May, 2014), que apoyan al establecimiento del tratamiento dependiendo del estadio y el tipo de cáncer que se presente.

- Prevención o etapa 0

Dentro de la prevención se busca informar a la población mediante campañas, folletos e incluso libros sobre los factores de riesgo y las estrategias que podrían adoptar para evitar la presencia de esta patología. Aunque, por otro lado, se plantea la opción de la remoción temprana del tejido mamario susceptible, esto basándose en una clara predisposición a la patología debida a deficiencia génica (May, 2014).

- Detección temprana o etapa 1

Según GLOBOCAN en los 5 años previos al 2012, la detección temprana y sus tratamientos resultó en 6,250,000 sobrevivientes del cáncer de mama a nivel mundial (May, 2014).

El cáncer en esta etapa se encuentra presente en una cantidad relativamente pequeña, por lo que no se ha propagado a ganglios linfáticos o de ser así, sería una propagación diminuta (N0 o N1mi). Por lo que en la terapia establecida en la mayoría de los casos será local estableciendo como tratamiento una mastectomía parcial (cirugía con conservación de seno) complementada regularmente por sesiones de radioterapia (SAC, 2016c).

En el caso de algunas mujeres se puede obviar la radioterapia pero esto depende del tamaño del tumor (2 cm o menos), de la extracción (debe ser completa), de las características que presenta el tumor (presencia de receptores de estrógenos) y de la nula existencia de cáncer en los ganglios linfáticos extraídos. Como un segundo complemento en los casos en los que el tumor presenta un tamaño menor a 1cm se indica terapia hormonal adyuvante, la cual puede ser con MSRE, inhibidores de la aromatasas u otro medicamento (SAC, 2016c).

- Corrección o etapa 2

En esta etapa el cáncer se diagnostica como un poco más grave que el de la etapa 1, puesto que se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes.

El tratamiento para estos casos puede ser de dos tipos: local o sistémico, donde el local establece mastectomía (parcial o completa) y en el caso de encontrarse tumores mayores a 5 cm, la cirugía se complementa con quimioterapia y/o radioterapia. En cuanto a la terapia sistémica, ésta se caracteriza por las combinaciones de diversos tratamientos como son terapia hormonal, quimioterapia y medicamentos dirigidos a HER2 (trastuzumab, pertuzumab). Estas combinaciones dependerán del estado de salud y edad de la paciente, así como del estado de HER2 y del receptor hormonal del tumor. La terapia sistémica puede ser administrada antes (neoadyuvante) o después (adyuvante) de la cirugía. El tratamiento neoadyuvante se considera una excelente opción para las mujeres con tumores grandes, ya que con él pueden llegar a reducir el tamaño del mismo de manera significativa, hasta el grado de considerar la cirugía con conservación de seno como una opción. La evaluación de la respuesta a tratamientos sistémicos en cáncer de mama, se basa en los criterios de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) en conjunto a la recomendación del British Breast Group, la cual deberá tener una duración mínima de 6 meses (SAC, 2016c).

- Manejo de la patología crónica o etapa 3

El tumor canceroso en esta etapa manifiesta un tamaño mayor a los 5 cm y posiblemente invasión a tejidos cercanos (piel, musculo y ganglios linfáticos). Usualmente en esta etapa el cáncer se trata primeramente con quimioterapia, para después dar paso a la cirugía (parcial o completa) de seno, así como de ganglios linfáticos axilares. En algunos casos también se administra quimioterapia después de la cirugía, esto dependerá de las características del tumor, ya que si es HER2 positivo se administra trastuzumab por un año y si es receptor hormonal positivo podría durar incluso más de un año. Otra opción de tratamiento en esta etapa es realizar en primera instancia la cirugía, seguida por radiación y tratamiento hormonal o dirigido a HER2 (SAC, 2016c).

Para los casos de tipo cáncer inflamatorio, el tratamiento consiste en quimioterapia neoadyuvante, si el cáncer no llegara a reducir su tamaño se debe optar por la radiación e incluso la mastectomía y la disección del ganglio linfático axilar. Después

de lo anterior algunas mujeres podrían aun recibir quimioterapia adicional (SAC, 2016c).

- Cuidados paliativos o etapa 4

En esta etapa el cáncer ha realizado metástasis propagándose más allá del seno y los ganglios linfáticos. Debido a lo anterior, el tratamiento administrado por excelencia es el sistémico, compuesto por terapia hormonal, quimioterapia, terapias dirigidas o en algunos casos combinaciones de ellos. Con el objetivo de reducir el tamaño de los tumores, aliviar los síntomas y prolongar la vida del paciente (SAC, 2016c).

Aunque usualmente la quimioterapia es la primera terapia en administrarse, si el tumor llegara a presentar positividad al receptor de hormona el tratamiento se combinaría con terapia hormonal (SAC, 2016c), la cual ha demostrado un incremento significativo en la supervivencia y el descenso de recaídas (Espinós y col., 2008); si por otro lado el cáncer es positivo a HER2 u otra característica específica se optaría por un tratamiento dirigido adyuvante (SAC, 2016c).

2.14 Terapia Hormonal

Una de las terapias contra el cáncer de mama que ha resultado más efectiva y versátil es la basada en la dependencia hormonal del tumor (Hemachandra y col., 2014), aunque es de acción más lenta que la quimioterapia, presenta menores efectos secundarios y una respuesta más sostenida (Espinós y col., 2008).

Entre el 50% y el 60% de los tumores mamarios con presencia del receptor hormonal responden de manera eficaz a la terapia hormonal, implementándose de esta manera como parte de los tratamientos preestablecidos para diversos estadios del cáncer de mama. Entre estos tratamientos se pueden mencionar el sistémico el cual está dirigido al cáncer metastásico; el inicial, otorgado a pacientes de edad avanzada o inoperables; y el preventivo, administrado a estadios precoces (Espinós y col., 2008).

La terapia hormonal consiste en la administración de fármacos por vía oral que modifican el comportamiento de las hormonas sobre la célula mamaria, o bien, bloquean la capacidad de producción hormonal del organismo (aecc, 2016d).

El blanco de la terapia hormonal son los receptores de estrógenos (ER) y/o los receptores de progesterona (PR). Los tumores que se muestran positivos a ambos tipos (ER+/PR+) han demostrado responder de manera más efectiva en un 40%, alcanzado estabilizaciones prolongadas del efecto en comparación con los que los que presentan solo el tipo ER+/PR- o ninguno ER-/PR- (Espinós y col., 2008).

La hormonoterapia cuenta con diversas vertientes de fármacos que actúan de manera singular. Estos fármacos se clasifican en la familia de los Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno (MSRE), de los Inhibidores de la Aromatasa (IA), de los Antagonistas del Receptor de Estrógenos (ARE) y de los Agentes Liberadores de Hormonas Luliberina (LHRH) (Tabla 9). Sin embargo, los más utilizados son los MSRE (Tabla 5) (OCM, 2016d).

Tabla 5. Fármacos de la terapia hormonal (OCM, 2016d).

Principales tipos de hormonoterapia	Acción
Moduladores selectivos de estrógeno	Suprimen los efectos del estrógeno por acción de su unión al receptor de estrógeno.
Inhibidores de aromatasa	Suprimen la producción de estrógeno en mujeres postmenopáusicas.
Antagonistas del receptor de estrógeno	Suprimen los efectos del estrógeno uniéndose al receptor de estrógeno y modificando su conformación.
Agentes liberadores de hormonas luliberina	Suprimen la función de los ovarios impidiendo que produzcan estrógeno.

2.14.1 Receptor de estrógeno

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína formada por 595 aminoácidos, con un peso molecular de 66 kDa (May, 2014), perteneciente a la súper familia de los receptores hormonales nucleares (Espinós y col., 2008). En su estado inactivo se encuentra en forma de complejo asociado a las proteínas de choque térmico 70 y 90, así como a la ciclofilina 40, FKBP51 y la FKBP52 (May, 2014).

El receptor de estrógeno es categorizado como factor de transcripción dependiente de ligando, localizado en células blanco de esteroides y su activación concreta la formación de complejos proteínicos activadores o correpresores de genes blanco (May, 2014).

El RE se compone de cinco dominios (Figura 12), desde el extremo amino-terminal, se enlistan el dominio de activación de la transcripción independiente de hormona (AF-1), el cual incluye una señal de localización nuclear, el dominio de unión a ADN (DBD) que contiene una segunda señal de localización nuclear, el dominio de unión al ligando (LBD), el cual contiene un dominio de dimerización (DD), el dominio de represión de la transcripción (AR) y el dominio activador de la transcripción dependiente de ligando (AF-2). El dominio de unión al ADN se encuentra separado del dominio de unión al ligando por una región bisagra (HR) corta (May, 2014).

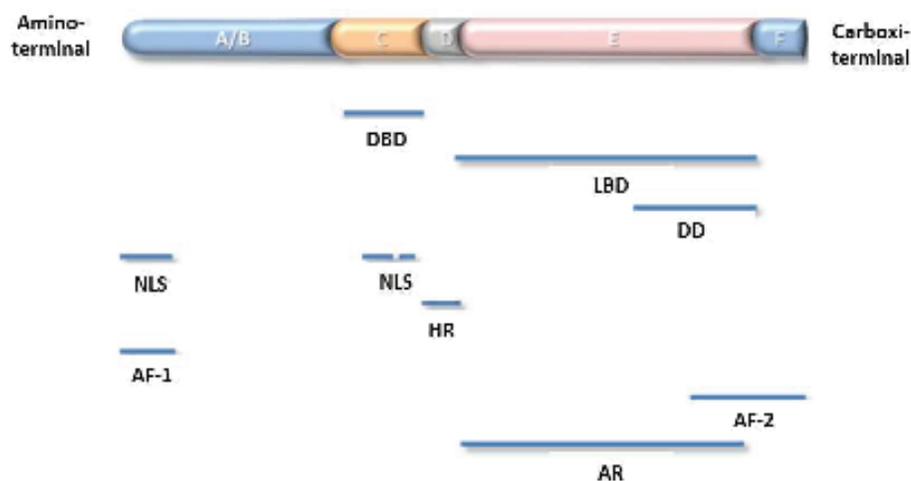


Figura 12. Diagrama de los dominios del receptor de estrógeno (Modificado de May, 2014).

Existen dos formas del receptor de estrógenos, el subtipo RE α y el RE β . RE α fue el primero en describirse, encontrándose expresado en útero, endometrio, ovario y mama; mientras que RE β se presenta en útero, mama, ovario, próstata, epidídimo, testículo, hipófisis, riñón, timo, hueso y SNC (Espinós y col., 2008). Generalmente la mayoría de ellos, ya sea el alfa o el beta, se encuentran en el citoplasma y en el núcleo, sin embargo, pequeñas cantidades (2%) pueden asociarse a la membrana celular (Qiagen, 2016).

Ambas formas exhiben estructuras modulares características de la super familia de receptores nucleares, además de regiones de reconocimiento a hormona (Cirillo y col., 2013).

La homología entre los dominios de los subtipos RE α y el RE β es variable ya que se muestra baja en las zonas de la transcripción y la región bisagra (25-30%); intermedia en LBD (60%) y alta en el dominio de unión al ADN (Figura 13), lo que quiere decir que se conserva el reconocimiento y la interacción con genes específicos en toda la familia RE (May, 2014).

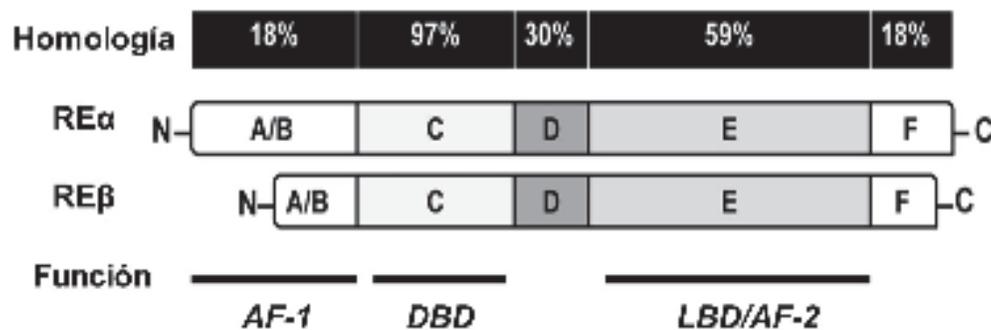


Figura 13. Diagrama de la homología entre RE α y el RE β . (Modificado de Cui y col., 2013)

Los receptores de estrógeno cuentan con la capacidad de integrar múltiples señales, tanto de ligandos como de vías de señalización intracelular para llevar a cabo sus funciones en el núcleo y citoplasma, que convergen en respuestas distintas de acuerdo a las exigencias del ambiente celular (Cirillo y col., 2013).

Estudios recientes sugieren que los estrógenos y sus receptores intracelulares (REs alfa y beta) influyen en la fisiopatología de los estados cancerosos del tipo mamario, endometrial, prostático y colorectal (Martinkovich y col., 2014). Por ello se han convertido en una diana relevante de los tratamientos contra el cáncer de mama. Específicamente de la terapia hormonal, la cual puede actuar sobre tumores con expresión positiva del receptor de estrógenos mediante dos formas: a través de una acción directa sobre el receptor o compitiendo por la unión al mismo con los estrógenos circulantes (Espinós y col., 2008).

2.14.2 Moduladores selectivos del receptor de estrógeno

Los Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógeno (MSRE) son moléculas sintéticas que se unen al receptor de estrógeno modulando sus funciones de transcripción en diferentes tejidos diana de estrógenos (Fan y Jordan, 2014).

Dentro de esta categoría de fármacos se encuentran el tamoxifeno (TAM) y el raloxifeno (RAL) (Figura 14), siendo el tamoxifeno el medicamento pionero (primera generación) (Fan y Jordan, 2014).

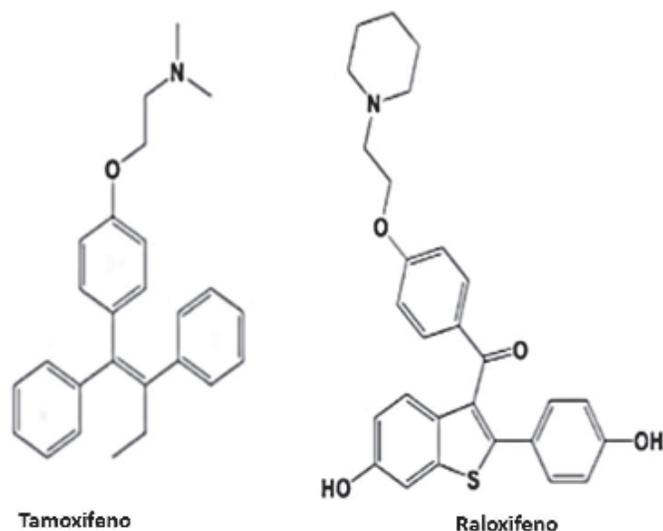


Figura 14. Diagrama de las estructuras bidimensionales del tamoxifeno y el raloxifeno (Modificado de Fan y Jordan, 2014).

Estas moléculas tienen la característica única de actuar como agonistas o antagonistas, es decir, en unos tejidos se comportan como estrógenos y en otros actúan como bloqueadores de la acción estrogénica (Martinkovich y col., 2014), dicha acción depende del reclutamiento de los coactivadores SRC p160, ya que son estos los que regulan las funciones de transcripción de los receptores nucleares. Específicamente el TAM recluta al tipo SCR1, de esta manera SCR1 es responsable de la actividad antagonista de TAM en las células de cáncer mamario, así como de la actividad agonista en el útero. Por su parte RAL no recluta SCR1, por lo que se comporta como antagonista en ambos casos.

El efecto antitumoral de estos fármacos se acredita a la inhibición competitiva que realizan entre el receptor de estrógeno y el estrógeno (Fan y Jordan, 2014), por lo que el uso de mayor relevancia de los MSRE es en el tratamiento del cáncer de mama donde bloquean el efecto mitógeno del estradiol, con lo que disminuye la proliferación de células malignas e inducen la apoptosis al inhibir la vía de señalización del receptor de estrógeno (Taurin y col., 2013).

No obstante, no todos sus efectos se deben a la interacción competitiva con el RE, estudios experimentales han comprobado que TAM y RAL provocan inhibición del crecimiento en líneas celulares que no expresan el RE; por lo que se cree que los efectos citotóxicos de los MSRE no solo están mediados por la vía genómica del RE, sino también por la modulación de vías de señalización independientes al RE como lo son PKC, calmodulina, TGF- β , caspasas, MAPK y el protooncogen c-myc, así como el stress oxidativo, entre otros (Todorova y col., 2011).

Ambos fármacos han mostrado la misma eficacia y versatilidad, lo cual ha sido comprobado mediante el estudio STAR (*The Study of Tamoxifen y Raloxifene*), (Reimers y Crew, 2012). Sin embargo, el 50% de los casos de cáncer metastásico de mama tratados con tamoxifeno eventualmente adquieren resistencia al mismo (Darakshan y col., 2013). Por otro lado, el raloxifeno presenta un perfil de efectos secundarios más favorable, ya que su tasa de riesgo de cáncer de útero es menor que la comparada con el tamoxifeno (Reimers y Crew, 2012). Lo que nos lleva hacia el creciente interés por el raloxifeno.

2.15 Raloxifeno

El raloxifeno conocido formalmente como Keoxifene (Martinkovich y col., 2014) es una molécula ampliamente utilizada para el control y la prevención de la osteoporosis en mujeres en etapa de postmenopausia (Pubchem, 2016), así como para el tratamiento y la prevención del cáncer de mama (OCM, 2016e).

Pertenciente a la familia de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (MSRE) segunda generación (Martinkovich y col., 2014) el RAL se diferencia de su antecesor el tamoxifeno debido a que no requiere metabolizarse por ninguna enzima para llevar a cabo su efecto farmacológico (OCM, 2016e), ventaja otorgada por su serie química distinta (Martinkovich y col., 2014). Debido a ello es capaz de comportarse de manera dual, es decir, como antiestrogénico en tejido del seno y endometrio, y como estrogénico en hueso, metabolismo de lípidos y coagulación sanguínea (Pubchem, 2016). Son estas características las que lo posicionan en equidad de eficacia con el TAM y además lo deslindan de efectos adversos como el cáncer de endometrio, eventos tromboembólicos graves y cataratas (Martinkovich y col., 2014).

Lo anterior fue comprobado en año 2006 (Lee y col., 2008) mediante el ensayo STAR (*Study of Tamoxifen y Raloxifene*) donde se evidenció la equidad del RAL con la acción del TAM. Además, se observó que el RAL presenta una menor incidencia de eventos tromboembólicos, así como de aparición de cáncer endometrial en 75% de los casos (Martinkovich y col., 2014).

Así mismo en los ensayos clínicos CORE (*Continuing Outcomes Relevant to Evista*) (Lee y col., 2008) y MORE (*Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*) (Martinkovich y col., 2014), se evidenció la eficacia del RAL reduciendo la aparición del cáncer de mama de tipo invasivo en 59% (Lee y col., 2008).

Dichas propiedades antineoplásicas del RAL en el cáncer de mama se atribuyen principalmente a disminución de la proliferación de las células tumorales, lo que finalmente induce la apoptosis en las células cancerosas (Todorova y col., 2011).

Sin embargo, investigaciones recientes realizadas en células de cáncer de mama triple negativo proponen la existencia de otras vías de señalización efectoras de la acción del RAL, lo que sugiere que su acción no depende únicamente de su interacción con el receptor de estrógeno.

En el 2011, Todorova y colaboradores encontraron que el RAL induce apoptosis y regulación a la baja de la síntesis de glutamina en células de cáncer de mama RE negativas MDA-MB-231, en condiciones libres de suero y con un tratamiento de 25 μ M de RAL durante 48 horas. Además, observaron que dicho efecto era revertido por la adición de NAC (N-acetil-cisteína), lo que sugiere que la regulación a la baja de la síntesis de glutamina quizás depende de la disponibilidad de la glutamina. Por lo que concluyeron que uno de los posibles mecanismos de acción de los MSRE está involucrado con la inhibición del empleo de la glutamina, lo que lleva a la célula a un estado de estrés oxidativo y por ende inducción de la apoptosis.

Por otro lado, el grupo de Taurin y colaboradores en el 2013 observaron que el RAL disminuye significativamente el tamaño tumoral en modelos animales ER negativas de MDA-MB-231 y MDA-MB-468 sometidos a una dosis diaria de 0,85 mg/kg por 4 y 8 semanas respectivamente. Por otra parte, el análisis de *western blot* mostró que el RAL (0,85 mg/kg) disminuyó significativamente la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (RFCE), lo cual se confirmó en el modelo *in vitro* de células MDA-MB-468 (debido a que estas sobreexpresan esta proteína), las cuales al ser tratadas con 10 μ M de RAL durante 24 horas disminuyeron en aproximadamente un 30% la expresión de RFCE. De la misma manera el análisis de co-inmunofluorescencia de las células MDA-MB-468 células tratadas con 10 μ M de RAL durante 48 horas mostró cambios en la localización RFCE, así como la promoción de su tránsito hacia las pequeñas vesículas citoplasmáticas. En general estos experimentos sugieren que la disminución en la proliferación de las células cancerosas provocada por el RAL puede estar mediada a través de la endocitosis del RFCE, lo que disminuye en consecuencia vías de señalización proliferativas.

2.16 Tranilast

Tranilast (ácido antranílico) (TRA) es un fármaco utilizado como tratamiento para alergias, asma bronquiales, cicatrices hipertróficas y dermatitis atópica (Li y col., 2014). Fue el primero de su tipo en emplearse para la inhibición de los efectos de la fibrosis en el riñón, debido que su acción se ejerce a través de la su disminución de la vía TGF- β 1, la cual influye directamente en la transformación de la célula epitelial a una mesenquimal (Kaneyama y col., 2010). Debido a lo anterior diversos grupos de investigadores se dieron a la tarea de comprobar si este fármaco presentaba algún efecto en células cancerosas.

Subramaniam y colaboradores en el 2011 encontraron en células de cáncer de mama tanto positivas (BT-474) como negativas (MDA-MB-231) a los receptores de estrógeno, que el TRA ejercía una reducción significativa de la proliferación celular, como de la migración. Dichos datos fueron obtenidos mediante el ensayo MTT de proliferación celular y el ensayo herida de migración celular, en un modelo celular *in vitro* sometido a un tratamiento de 200 μ M de TRA por 72 horas. Por lo que Subramaniam y colaboradores concluyeron que TRA ejerce un efecto antiproliferativo y antimetastásico en células de cáncer de mama.

Por su parte, Darakhshan y colaboradores en el 2013 observaron que el TRA en combinación con el TAM provoca una disminución significativa de los niveles de proteína CXCR4 y CXCL12 así como del ARNm correspondiente, ello en líneas celulares de cáncer de mama tanto positivas (MCF-7) como negativas al receptor de estrógeno (MDA-MB-231). Así mismo, se observó una disminución significativa de la migración celular de ambas líneas. Dichos resultados se obtuvieron mediante el tratamiento a las células con la combinación 2 μ M de TAM y 200 μ M de TRA por 48 hrs y a través del ensayo de proliferación celular MTT, el ensayo de migración celular herida, RT-PCR y ELISA. Por lo cual concluyeron que el TRA y TAM en combinación pueden suprimir la metástasis de ambos tipos celulares y que dicha supresión no está en función de los receptores de estrógenos, sino mediante la regulación a la baja de los niveles proteicos de CXCR4, CXCL12 y ARNm

correspondientes, las cuales se encuentran asociadas a vías de señalización que promueven la migración, invasión, adhesión y proliferación de diversas células cancerosas (Darakhshan y col., 2013).

3.0 JUSTIFICACIÓN

En vista de la relevancia que ha manifestado el cáncer de mama como patología, es de suma importancia el desarrollo de nuevos tratamientos para su control y supresión, ya que los tratamientos actuales son relativamente limitados, además de que se asocian a patologías secundarias como, cáncer cervico uterino, eventos vasculares y otros.

La terapia combinada podría mejorar la eficacia de los fármacos anticancerígenos ya utilizados, al potenciar el efecto de los mismos con otros como el tranilast. Asimismo, se cree que la terapia combinada podría reducir las patologías adversas relacionadas a fármacos como los moduladores selectivos del receptor de estrógeno, como lo es el raloxifeno.

Una combinación innovadora y que demanda ser estudiada, es la constituida por el raloxifeno y el tranilast, ya que ambos fármacos de manera individual han manifestado tener efectos antiproliferativos y antimetastásicos sobre células de cáncer de mama positivas y negativas al receptor de estrógeno.

Debido a lo anterior, es necesario estudiar el efecto que podrían mostrar el raloxifeno y el tranilast en la proliferación celular, así como en la proteína marcadora de la transición epitelio-mesénquima, E-cadherina y su principal represor de expresión proteica, snail.

4.0 HIPÓTESIS

4.1 Pregunta de investigación

¿Qué efecto tendrán el raloxifeno y el tranilast administrados en combinación sobre la expresión de la proteína E-cadherina en células de cáncer de mama positivas y negativas al receptor de estrógeno?

4.2 Hipótesis

El raloxifeno y tranilast utilizados en combinación aumentan los niveles de E-cadherina en células del cáncer de mama responsivas y no responsivas al receptor de estrógeno.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del raloxifeno y el tranilast en la expresión de la proteína E-cadherina en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

5.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de raloxifeno y tranilast sobre la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231.
- Analizar mediante *western blot* la expresión de las proteínas E-cadherina y snail en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Estudiar mediante *western blot* el cambio en la expresión de las proteínas E-cadherina y snail por efecto del tratamiento con raloxifeno y tranilast en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Evaluar mediante inmunocitoquímica los cambios en la localización celular de la proteína snail por efecto del tratamiento con raloxifeno y tranilast en la línea celular MDA-MB-231.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental

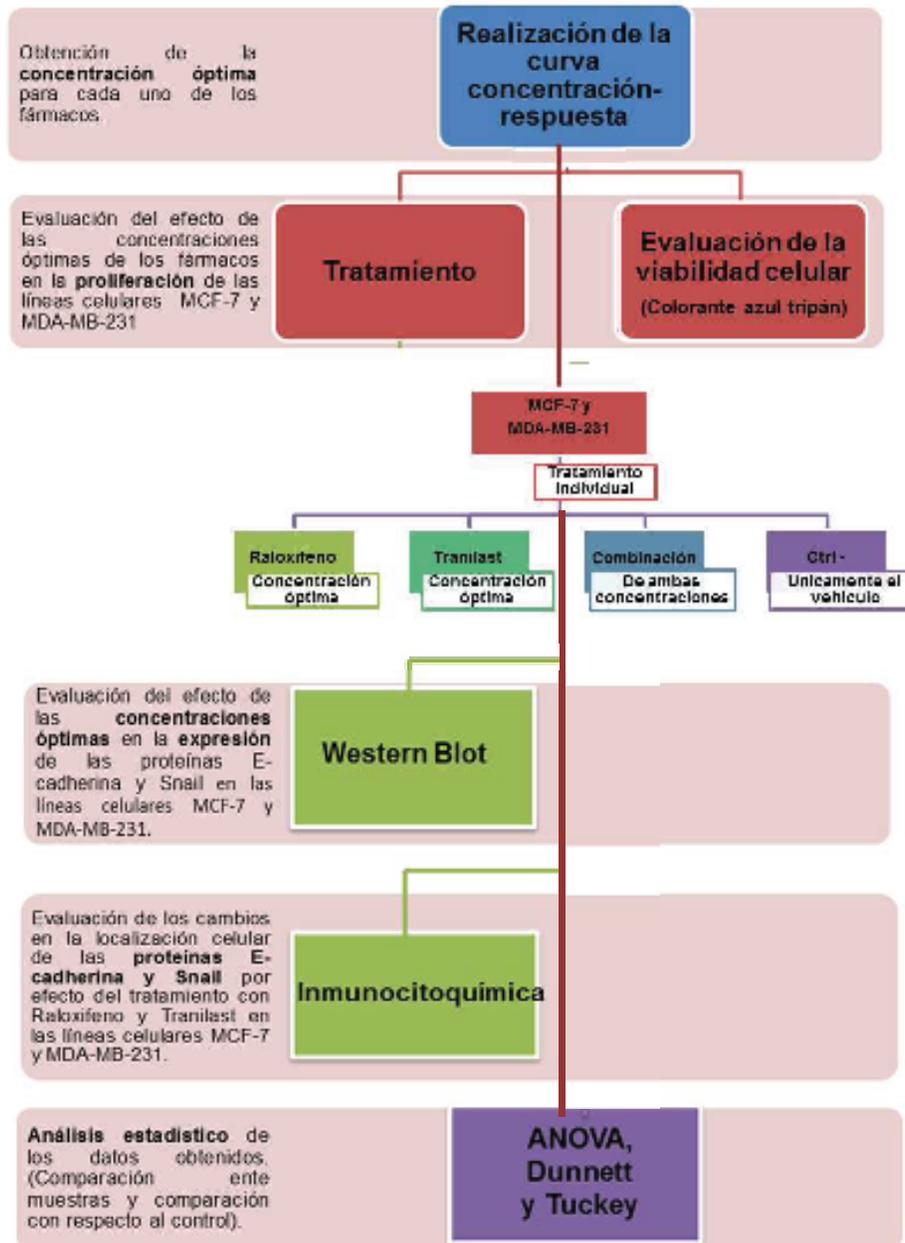


Figura 15. Diagrama general de la estrategia experimental del proyecto.

6.2 Cultivo celular

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 provenientes de ATCC fueron cultivadas en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de FBS (Suero fetal bovino, Gibco) y antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina-fungizona, Gibco). El cultivo fue mantenido en incubación a 37 °C y 5% de CO₂.

6.2.1 Línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 fue utilizada como modelo de cáncer de mama hormona-responsivo, ya que estas células expresan RE de manera natural, lo que las hace menos invasivas (ATCC, 2016a).

6.2.2 Línea celular MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 fue utilizada como modelo de cáncer de mama metastásico ya que es RE-negativa, invasiva y escasamente diferenciada (ATCC, 2016b).

6.3 Curva de concentración-respuesta

El efecto de los fármacos raloxifeno y tranilast en la disminución del número de células vivas fue determinado mediante una curva de concentración-respuesta en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

Los cultivos se realizaron en placas P-24, en las cuales se sembraron 5×10^4 células en cada pozo con medio DMEM completo. Cumplidas las 24 h las células fueron expuestas a las concentraciones determinadas previamente (Tabla 6) durante 48 h.

Para evaluar el efecto de los fármacos RAL y TRA en el número de células vivas se realizaron curvas de concentración-respuesta a las 24 h y a las 48 h para el RAL, y únicamente a las 48 h para el TRA basado en los múltiples reportes del grupo canadiense liderado por Prud'homme y Jothy.

Estas curvas se realizaron bajo las mismas condiciones en ambas líneas celulares (positivas al RE y negativas al RE) de cáncer de mama. El número de células vivas

post tratamiento fue evaluado mediante conteo con tinción azul de tripano (azul vital), ya que éste puede penetrar y teñir a las células muertas (membranas no íntegras).

Tabla 6. Concentraciones utilizadas en la curva concentración-respuesta.

Fármaco	Concentraciones (µM)						Duración (h)
RAL	0	5	10	15	20	30	24
RAL	0	10	20	30	50	100	48
TRA	0	25	50	100	200	300	48

Las concentraciones y la disolución de los fármacos fueron determinadas con en base a los trabajos de Todorova y col., 2011 y Subramaniam y col., 2011.
 Los fármacos RAL y TRA fueron disueltos en agua destilada estéril y DMSO 0.8% respectivamente.
 *Micromolar (µM)
 *Horas (h)
 *Dimetilsulfóxido (DMSO)

Para las curvas de tratamientos combinados se utilizaron las mismas condiciones. Cada experimento se realizó de manera independiente y por triplicado.

6.8 Western blot

6.8.1 Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares

Para la evaluación de los cambios en la expresión proteica de E-cadherina y snail se utilizaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, ambas se sembraron en cajas P-100 con medio DMEM completo hasta llegar a confluencia del 80%, posterior a esto se lavaron 2 veces con 3 ml de PBS 1X y se les agregó 6ml de DMEM completo junto con los fármacos raloxifeno y tranilast de manera individual y en combinación. A las 48 h cumplidas de exposición al tratamiento se lavaron 1

vez con PBS 1 X para posteriormente ser despegadas con una espátula plástica y lisadas con amortiguador (50nM de Tris pH 7.6, 150nM de NaCl) adicionado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). La extracción de las proteínas se llevó a cabo mediante acción mecánica por 3 minutos, seguida por una agitación constante durante 1 h a 4 °C y 800 rpm. Para la separación de los restos celulares de las proteínas extraídas, se procedió a centrifugar por 15 minutos a 3000 rpm y 4 °C, recuperándose el sobrenadante, al cual se realizó una segunda centrifugación por 15 minutos a 4 °C y 12000 rpm, obteniéndose un segundo sobrenadante (proteínas) que se conservó a -70 °C.

6.8.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas celulares contenidas en los homogenizados se determinó por triplicado con el método de Bradford, utilizando una curva de solución estándar de BSA (Tabla 7) a concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20 µg/ml.

Tabla 7. Curva de calibración para cuantificación de proteínas

Concentración de BSA	Volumen Sol'n stock 1mg/ml	Agua destilada	Reactivo Bradford
Blanco	-----	1000 µl	-----
0	-----	800 µl	200 µl
1 µg/ml	10 µl	790 µl	200 µl
5 µg/ml	50 µl	750 µl	200 µl
10 µg/ml	100 µl	700 µl	200 µl
15 µg/ml	150 µl	650 µl	200 µl
20 µg/ml	200 µl	600 µl	200 µl
Los puntos de la curva se prepararon directamente en las celdas de lectura y se dejaron incubar por 5 min. *Microgramos (µg) *Mililitros (ml) *Microlitros (µl)			

6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis SDS-PAGE se utilizaron geles al 12 % de poliacrilamida que fueron cargados con la misma cantidad de proteína en cada pozo del gel, mezclada en relación 1:1 con el amortiguador de carga (H₂O destilada, Tris-HCl 0.125 M, glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 200 mM), las muestras se hirvieron por 10 minutos a 100 °C y agitación constante de 300 rpm. Posterior a esto el gel se corrió por 15 minutos a 100 V para concentrar la muestra y 45 minutos más a 150 V para separar las proteínas.

6.8.4 Electrotransferencia

Al concluir la separación de las proteínas en función de su peso molecular, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) durante 1 h a 200 mA, bajo las siguientes condiciones: los materiales se humedecieron previamente por 15 minutos con el amortiguador de transferencia (3.03 g Tris-base, 14.4 g glicina; 200 ml metanol; H₂O destilada a 1 L), cumplido este tiempo se armó el cassette de transferencia. La transferencia comenzó por el Cátodo (lado claro), esponja, papel Whatman, gel (con inicio a la derecha), membrana, papel Whatman, esponja, ánodo (lado oscuro) y se realizó la transferencia.

6.8.5 Blotting

Una vez que se realizó la transferencia, la membrana se lavó durante 10 minutos en PBS 1X para eliminar restos de poliacrilamida y se bloqueó con leche baja en grasa al 3% por 1 h, ello para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie la membrana. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS 1X y se incubó toda la noche en frío y agitación constante con los anticuerpos primarios diluidos en leche baja en grasa al 1%, tanto para β -actina como para las proteínas de estudio (E-cadherina y snail). Una vez realizada la incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente a cada caso por 4 h en frío y agitación constante. Por último, se lavó la membrana tres veces en PBS 1 X y se realizó el revelado.

6.8.6 Detección y revelado

Para la detección de la marca se utilizó el ensayo de quimioluminiscencia potenciada (ECL, Enhanced Chemiluminescence Kit), el cual fue elaborado en el laboratorio (solicitud de patente IMPI 085985, Alfredo Rodríguez, en trámite).

La membrana se sumergió 1 minutos en el reactivo de detección; preparado 1:1 con las soluciones 1 y 2 (luminol y peróxido de hidrógeno) del kit ECL. Esto provocó una oxidación catalizada por la peroxidasa, que resultó en quimioluminiscencia del luminol. La luz obtenida se detectó en la película de autoradiografía (Amersham Biosciences) por exposición durante 1 minuto.

6.4 Inmunocitoquímica

Las células tratadas con los fármacos se sembraron en portaobjetos dentro de cajas p12 hasta obtener 90% de confluencia. Consecutivamente se lavaron 3 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se lavaron 3 veces más con PBS 1X y se les agregó 300 µl de peróxido de hidrogeno al 1 % a cada portaobjetos por 30 minuto y se mantuvieron protegidas de la luz. Cada portaobjetos se bloqueó por 30 minuto con leche baja en grasa al 3 % y se lavó 3 veces con PBS 1X. Posteriormente, se le agregó el anticuerpo primario para snail (1:100) y se conservó a 4 °C durante toda la noche. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se agregó el anticuerpo secundario HRP (1:500) correspondiente por 2 h.

6.10 Análisis estadísticos

El análisis estadístico de este proyecto se realizó con el programa estadístico *GraphPad Prism 6* utilizando análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas post-hoc Dunnett y Tukey. Por el análisis de varianza se determinó la diferencia significativa de los tratamientos, mientras que la significancia con respecto al control y entre tratamientos se estableció por los métodos Dunnet y Tukey respectivamente.

7.0 RESULTADOS

7.1 Células positivas al RE

7.1.1 Curva de concentración-respuesta

En el caso de las células positivas al RE (MCF-7) se observó una disminución en la cantidad de células vivas dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al fármaco RAL, registrando diferencia significativa con respecto al control únicamente en la concentración de 30 μM a las 24 h (Figura 16) mientras que en el caso de las 48 h se registró una disminución significativa en todas las concentraciones estudiadas (Figura 17).

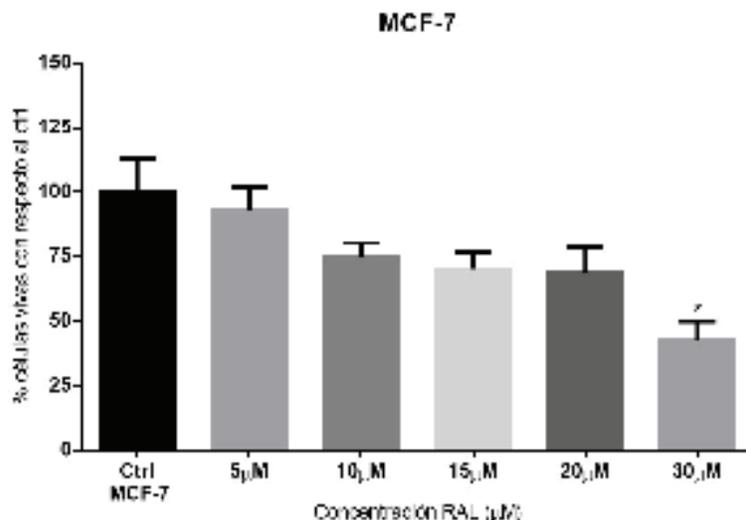


Figura 16. Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 24 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

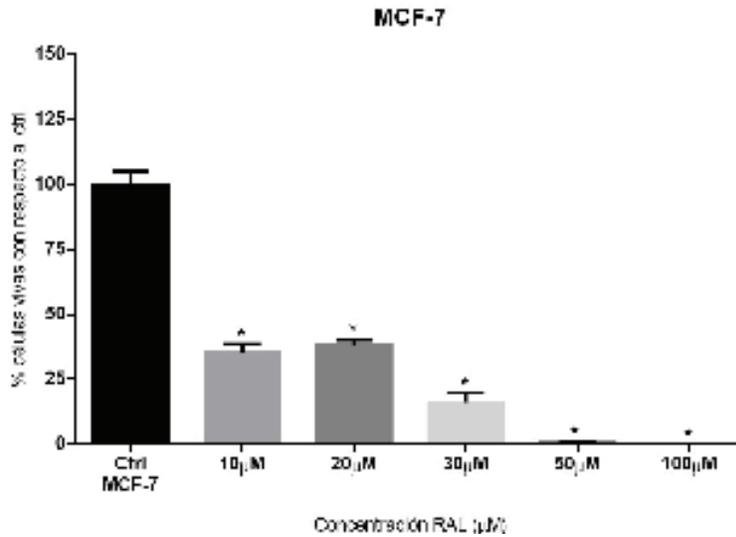


Figura 17. Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

Por su parte el tratamiento con el fármaco TRA en las células positivas al RE registró diferencia significativa con respecto al control en todas las concentraciones utilizadas (Figura 18).

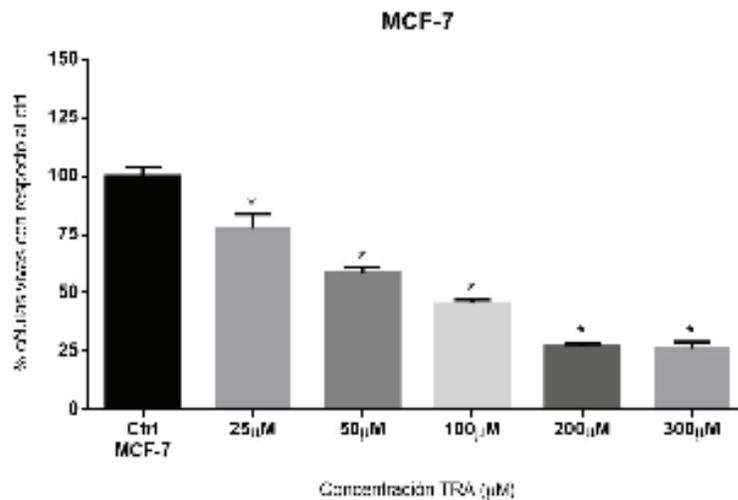


Figura 18. Efecto del tranilast en la proliferación de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

7.1.2 Tratamientos combinados

Para los tratamientos en combinación se utilizaron las concentraciones de 10 y 20 μM de RAL en conjunto con la concentración de 300 μM de TRA.

En el tratamiento de la concentración combinada de 10 μM de RAL y 300 μM de TRA se observó un menor efecto (45.4%) en la reducción del número de células vivas que la concentración combinada de 20 μM de RAL y 300 μM de TRA, en la cual se registró una disminución de aproximadamente 75% con respecto al control, sin embargo, dicha disminución es estadísticamente igual a las causadas por los tratamientos individuales de ambos fármacos (Figura 19).

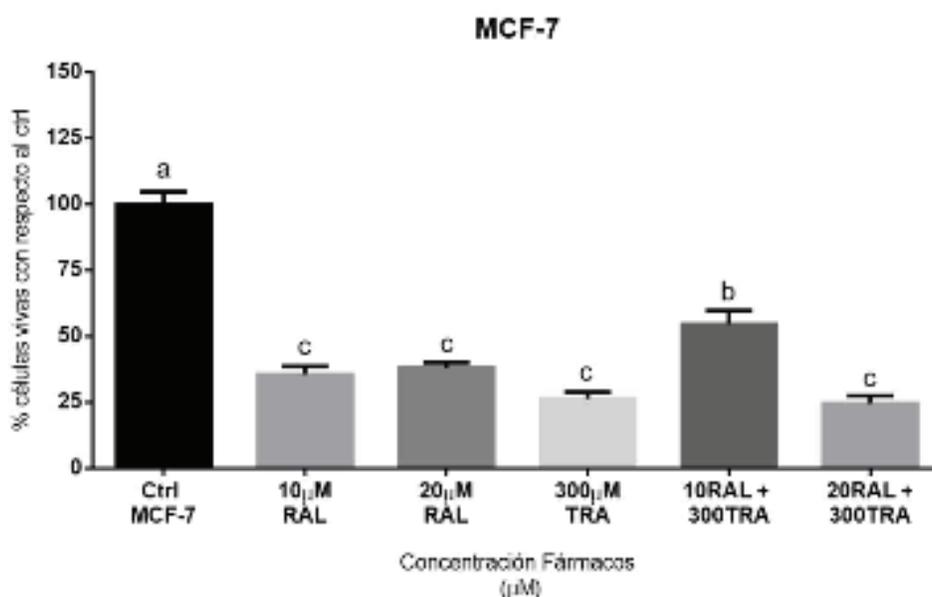


Figura 19. Comparación de los efectos individuales y combinados de raloxifeno y tranilast en células receptor de estrógeno positivas.

Porcentaje relativo con respecto al control de células vivas con 48 horas de tratamiento. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

7.1.3 Cuantificación de proteínas

De acuerdo con la respuesta observada en los tratamientos combinados se optó por utilizar la combinación de 20 μM de RAL y 300 μM de TRA para evaluar los cambios en la expresión proteica de E-cadherina. Registrando una disminución significativa con respecto al control de la expresión de E-cadherina en todos los tratamientos utilizados. Cabe señalar que entre tratamientos no existe diferencia significativa (Figura 20).

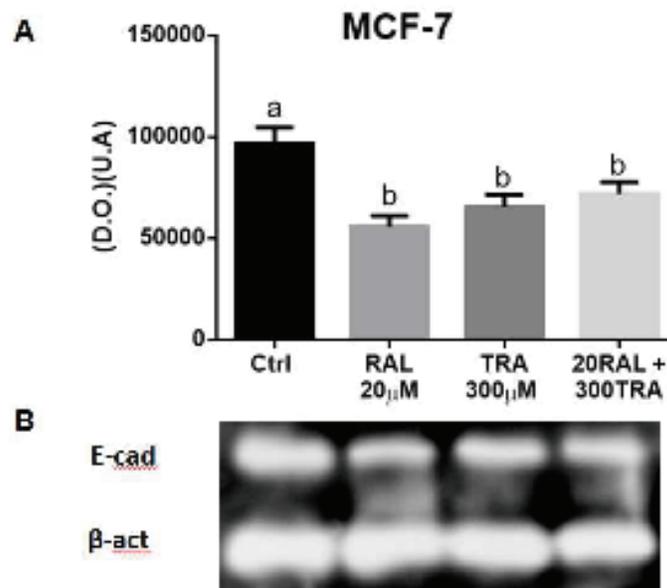


Figura 20. Expresión proteica de E-cadherina en células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.

A. Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría óptica. **B.** Intensidad de las bandas de E-cadherina y β -actina en cada uno de los grupos estudiados. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Densidad óptica (D.O.)

*Unidades arbitrarias (U.A.)

*Micro molar (μM)

7.1.4 Evaluación de la migración celular

Se realizaron de manera adicional al proyecto ensayos de migración celular, donde se observó que el tratamiento individual de 20 μM RAL genera una mayor disminución con respecto al control que el tratamiento individual de TRA y la combinación de 20 μM de RAL y 300 μM de TRA (Figura 21).

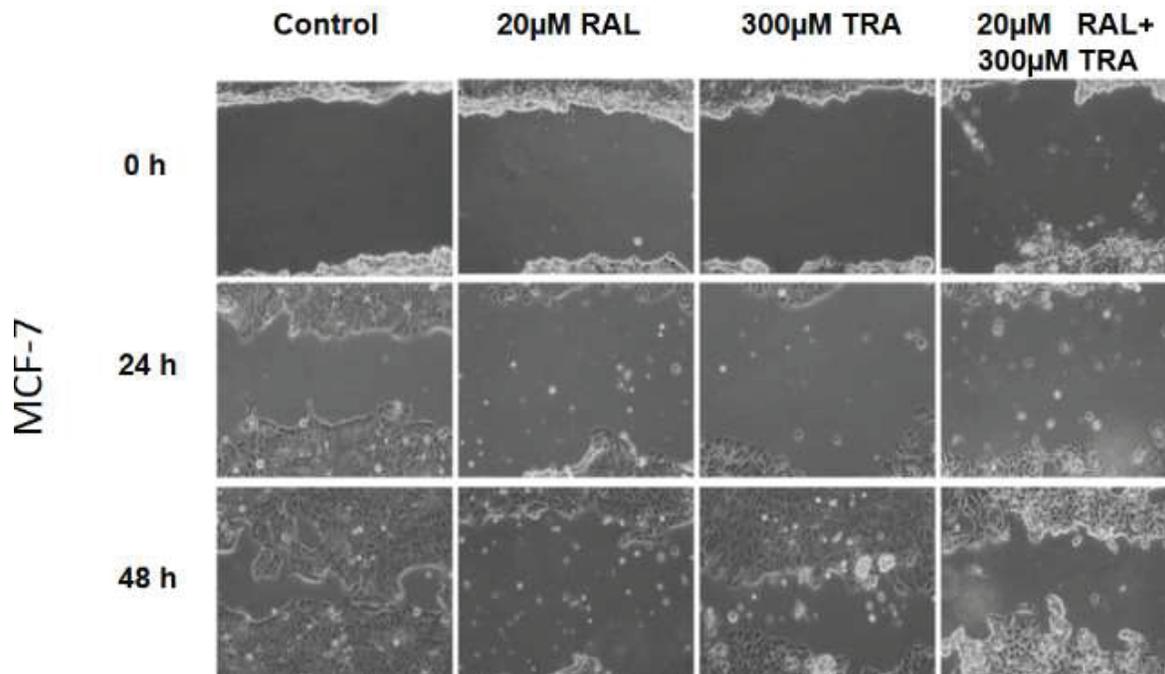


Figura 21. Efecto en la migración de células receptor de estrógeno positivas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.

7.2 Células negativas al RE

7.2.1 Curva de concentración-respuesta

Al igual que para las células positivas al RE el efecto del fármaco RAL en las células negativas al RE (MDA-MB-231) mostró ser dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, ya que se observó una diferencia significativa con respecto al control en la concentración de 30 μM en el caso del tratamiento de 24 h (Figura 22), mientras, que en el tratamiento con duración de 48 h la disminución significativa se registró en todas las concentraciones probadas (Figura 23).

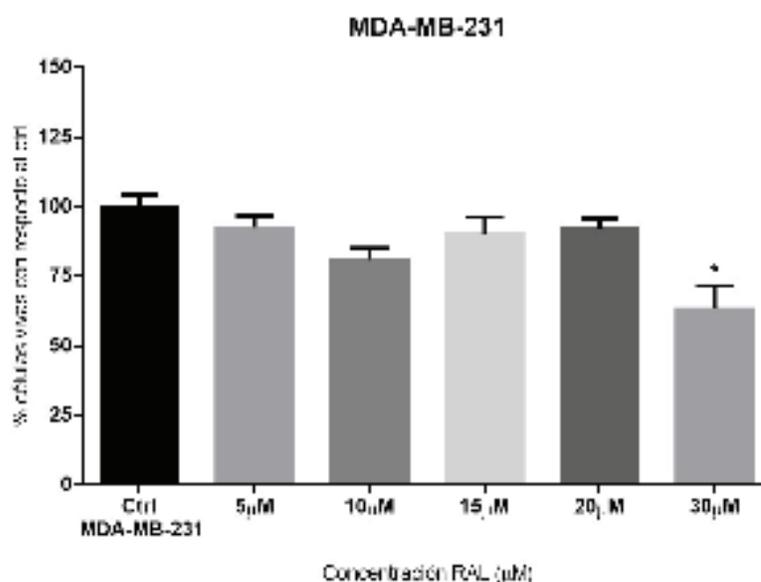


Figura 22. Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 24 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

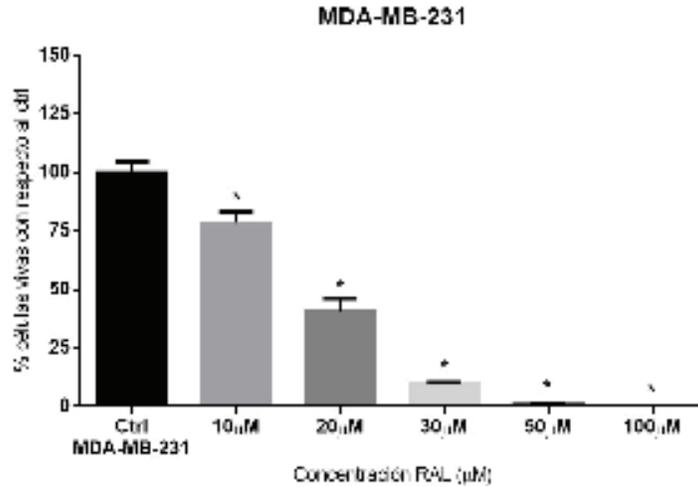


Figura 23. Efecto del raloxifeno en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

Por lo que respecta al fármaco TRA en las células negativas al RE, la diferencia significativa se mostró en el grupo correspondiente a la concentración de $300\mu\text{M}$ (Figura 24).

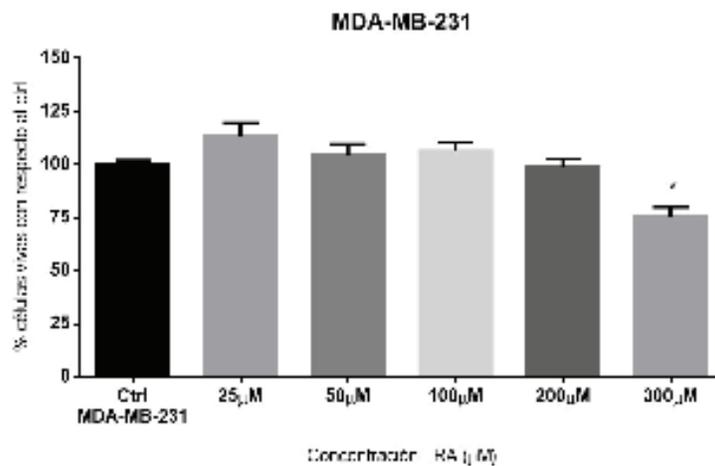


Figura 24. Efecto del tranilast en la proliferación de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento.

Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Se realizaron ANOVA y Dunnett ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

7.2.2 Tratamientos combinados

Con el objeto de valorar el potenciamiento entre ambos fármacos en la inhibición de la proliferación celular, los tratamientos en combinación fueron realizados con las concentraciones de 300 μM de TRA en conjunto con 10 μM y 20 μM de RAL.

En las células negativas al RE los tratamientos combinados de 10 μM y 20 μM de RAL con 300 μM de TRA registraron una disminución significativa con respecto al control, no obstante, la disminución observada en estos tratamientos es menor a la registrada por el tratamiento individual de 20 μM de RAL (Figura 25).

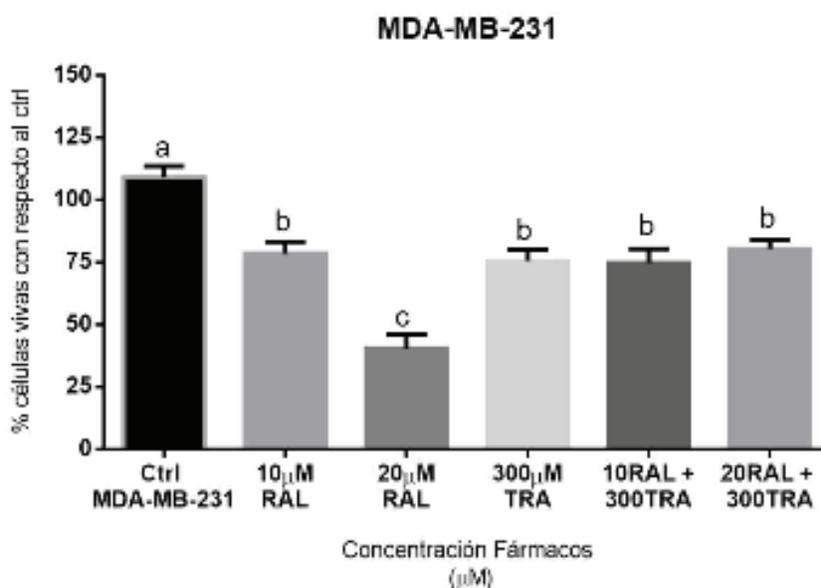


Figura 25. Comparación de los efectos individuales y combinados de raloxifeno y tranilast en células receptor de estrógeno negativas.

Porcentaje relativo con respecto al control de células vivas con 48 horas de tratamiento. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

7.2.3 Cuantificación de proteínas

Con base en lo registrado en los tratamientos combinados se decidió utilizar la combinación de 20 μM de RAL y 300 μM de TRA para evaluar los cambios en la expresión proteica de E-cadherina y snail en las células RE negativas

encontrándose que ninguno de los tratamientos probados genera cambios significativos en la expresión de las proteínas de interés (Figura 26 y 27).

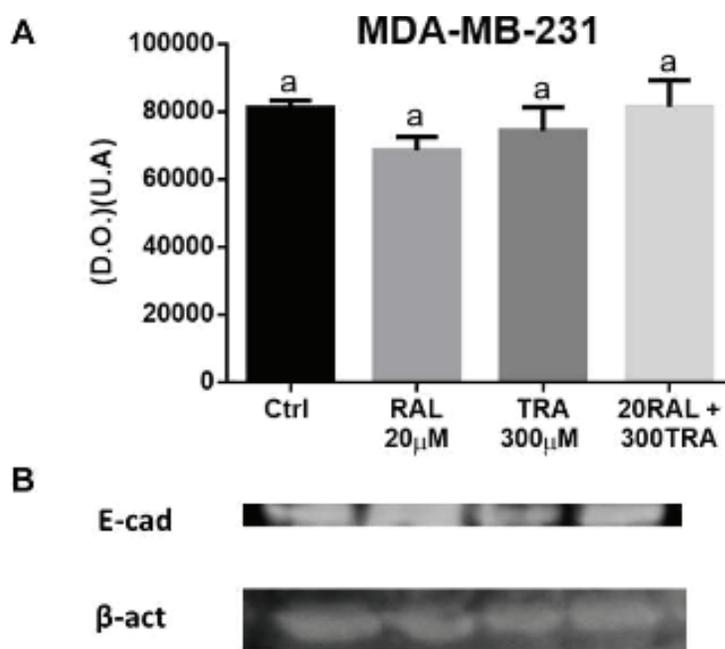


Figura 36. Expresión proteica de E-cadherina en células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.

A. Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría óptica. **B.** Intensidad de las bandas de E-cadherina y β -actina en cada uno de los grupos estudiados. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Densidad óptica (D.O.)

*Unidades arbitrarias (U.A.)

*Micro molar (μ M)

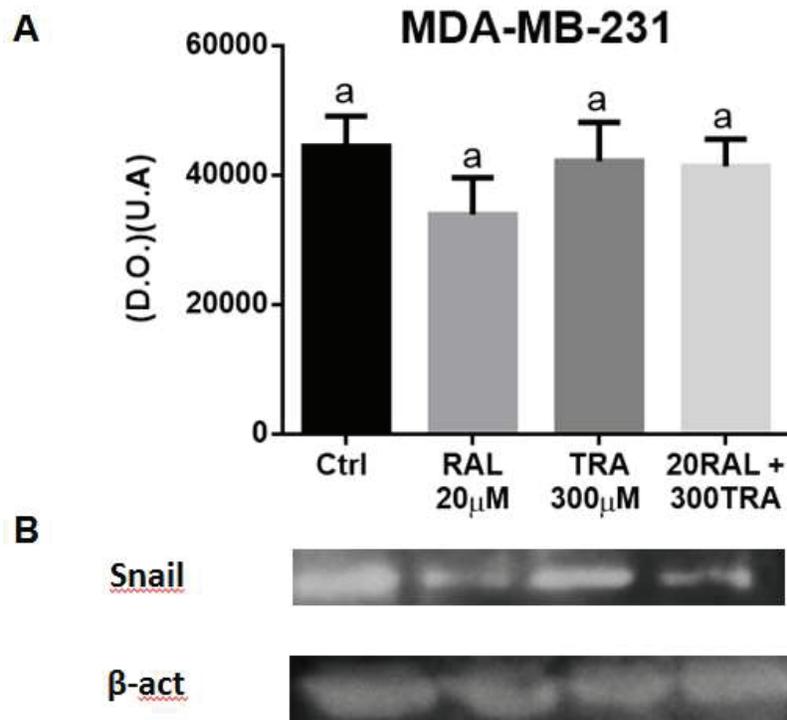


Figura 47. Expresión proteica de snail en células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.

A. Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría óptica. **B.** Intensidad de las bandas de snail y β -actina en cada uno de los grupos estudiados. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Densidad óptica (D.O.)

*Unidades arbitrarias (U.A.)

*Micro molar (μ M)

7.2.4 Cambios en la localización subcelular de snail

De acuerdo con la respuesta observada en el análisis de proteínas se evaluaron los cambios en la localización del factor de transcripción snail, registrándose una disminución significativa con respecto al control en todos los tratamientos probados de la localización de la proteína de interés en el núcleo, no obstante, el tratamiento de 300 μM de TRA presento la mayor diferencia (Figura 28).

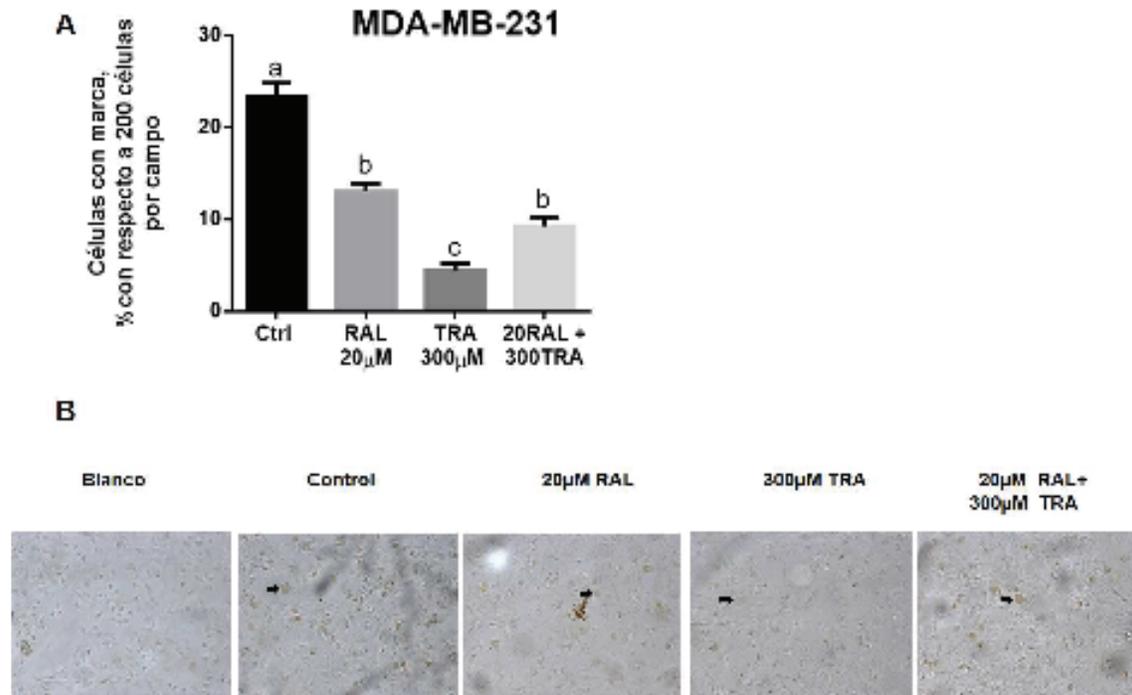


Figura 28. Expresión proteica de snail en el núcleo de las células receptor de estrógeno negativas.

A. Análisis estadístico de la marca observada en el núcleo de las células negativas al receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast. **B.** Micrografías de las células en cada uno de los grupos estudiados (marca señalada por una flecha negra). El grupo blanco representa a las células que fueron expuestas solamente al anticuerpo secundario. Los resultados mostrados representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

*Micro molar (μM)

7.2.5 Evaluación de la migración celular

Al igual que en las células RE positivas se decidió evaluar los cambios en el comportamiento migratorio de las células con la finalidad de complementar la información obtenida encontrándose que todos los tratamientos generan una disminución de migración, no obstante, en el tratamiento combinado de 20 μ M RAL con 300 μ M de TRA se observa una mayor disminución con respecto al control y en los tratamientos individuales de TRA y RAL (Figura 29).

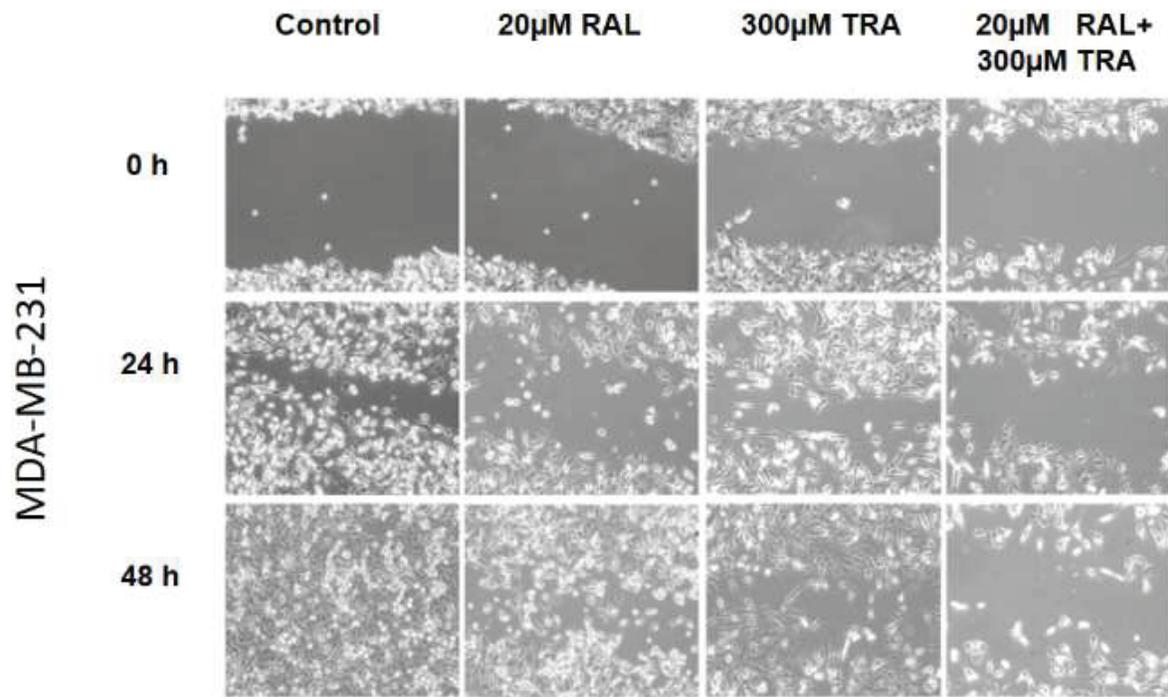


Figura 29. Efecto en la migración de células receptor de estrógeno negativas con 48 horas de tratamiento individual y combinado de raloxifeno y tranilast.

8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Células positivas al RE

8.1.1 Curvas concentración-respuesta

En el caso de las células positivas al RE (MCF-7) se observó una disminución en la cantidad de células vivas dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al fármaco RAL (Figura 16 y 17), encontrándose una disminución significativa en todas las concentraciones probadas a 48 h de tratamiento, cabe destacar que las concentraciones de 10 y 20 μ M tuvieron un comportamiento similar (Figuras 17).

Estos resultados son consistentes con reportes previos en los que se muestra que las concentraciones entre 10 y 25 μ M de RAL inducen la disminución del número de células mediante diversos mecanismos siendo el mecanismo principal el antagonismo del RE, lo cual genera inhibición de la proliferación, mediante el acoplamiento del RAL al dominio de unión al ligando del receptor, impidiendo de esta manera el alineamiento correcto de la hélice 12 bloqueando la interacción con los coactivadores (May, 2014).

Además, se sabe que el RAL es capaz de iniciar el proceso de autofagia a través del incremento de los niveles de LC3-II, lo cual es propiciado por el bloqueo del RAL al receptor purinérgico P2, generando reducción en la activación de la vía de señalización ATP-AMPK en células positivas (MCF-7) y negativas al RE (SKBr-3). Esta reducción de la activación de la vía ATP-AMPK ocasiona una disminución de la proliferación celular cercana al 50% posterior a la exposición a 10 μ M por 48 h (Kim y col., 2015).

Por su parte, el efecto de disminución en la proliferación de TRA se correlaciona con la detención del ciclo celular y la apoptosis, sin embargo, la forma en que su efectúa depende de las características de cada tipo celular. Las células RE positivas MCF-7 TRA podría disminuir la expresión de CDK2 y aumentar la expresión de p53 y p21, reduciendo la proliferación celular (Shime y col., 2002). Además, se sabe que

TRA es capaz de reducir la fosforilación de ERK deteniendo de esta forma la transición G1-S del ciclo celular (Chakrabarti y col., 2009). Asimismo, TRA aumenta los niveles de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) activa en células RE positivas y RE negativas lo que indica que TRA está relacionado con la inducción de la apoptosis (Subramaniam y col., 2011). Con base en lo anterior se podría explicar por qué la inhibición del crecimiento fue mayor en ER células positivas (Figura 18).

8.1.2 Cuantificación de proteínas

En los tratamientos combinados, el análisis por *western blot* de la expresión proteica de E-cadherina mostró una disminución significativa con respecto al control (Figura 20).

Dado que trabajos recientes establecen una relación inversa del RE, MTA3 y E-cadherina con snail (Dhasarathy y col., 2007), se podría inferir que la disminución de E-cadherina estaría relacionada con la reducción de la expresión proteica de MTA3, puesto que se ha reportado que la expresión de esta proteína es dependiente de la activación del RE (Fujita y col., 2003).

La proteína MTA3 es una subunidad del complejo represor Mi-2/NuRD encargada de la represión de factores de transcripción como snail y slug (Fujita y col., 2003), por lo que una baja expresión de la misma se relaciona con un aumento en la expresión de snail y una baja expresión de E-cadherina (Dhasarathy y col., 2007).

Se observa un comportamiento similar en las células expuestas al TAM donde registraron una disminución gradual de MTA3 en células RE positivas MCF-7 expuestas a 1 μ M de TAM por 7 días (Fujita y col., 2003).

Debido a que el fármaco RAL es un MSRE de segunda generación podría estar ejerciendo el mismo efecto en la expresión proteica de MTA3 que su antecesor TAM (Figura 30).

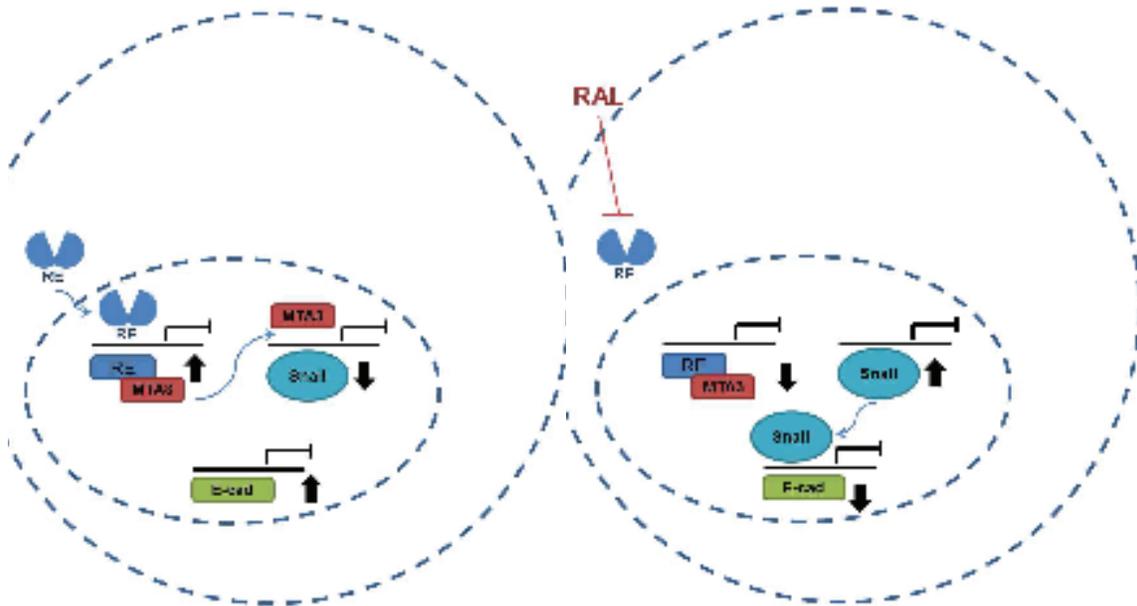


Figura 30. Mecanismo de acción propuesto para el efecto del raloxifeno en la expresión proteica de MTA3, E-cadherina y snail en células RE positivas. Figura de nuestra autoría basada en los reportes de Fujita y col., 2003 y Dhasarathy y col., 2007.

Por su parte, el fármaco TRA no se había relacionado anteriormente con el efecto reductor de la expresión de E-cadherina. Sin embargo, tras analizar los resultados es posible observar una tendencia hacia una pérdida de la expresión de E-cadherina por efecto del TRA. Esta tendencia podría estar relacionada con el antagonismo ejercido hacia el receptor del factor transformante β (Darakhshan y Pour, 2015) lo cual influiría directamente en la expresión proteica de snail. No obstante, para comprobarlo se necesitaría un mayor tiempo de exposición a los fármacos, así como la evaluación de la expresión proteica del RE y MTA3.

8.13 Migración celular

Con base en lo observado en los resultados del *western blot* se decidió realizar el ensayo herida, con el propósito de documentar la migración celular inducida por el efecto de los fármacos tanto individualmente como en combinación. Encontrándose que pese a que el tratamiento con 20 μM de RAL generó una disminución significativa con respecto al control de la expresión proteica de E-cadherina en el ensayo herida dicho tratamiento registró el menor cierre de la luz de la herida con respecto al control (Figura 21). Estos datos sugieren que la disminución de la migración celular ejercida por el RAL no se relaciona con la expresión proteica de E-cadherina, sino con otras proteínas como el RFCE (receptor del factor de crecimiento epidermal), puesto que la vía de señalización de este receptor se encuentra ligada a la apoptosis celular mediante la internalización del mismo. Lo anterior fue reportado por Kim y col., en el 2015 donde demostraron que el RAL es capaz de inducir autofagia en las células RE positivas MCF-7 mediante el incremento de la expresión de las proteínas relacionadas a la formación de vesículas.

8.2 Células negativas al RE

8.2.1 Curvas concentración-respuesta

Al igual que para las células positivas al RE el efecto del fármaco RAL en las células negativas al RE (MDA-MB-231) mostró ser dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, observándose una diferencia significativa con respecto al control en la concentración de 30 μM en el caso del tratamiento de 24 h, sin embargo, en el tratamiento con duración de 48 h la disminución significativa se registró en todas las concentraciones probadas (Figuras 22 y 23). Lo anterior es consistente con lo reportado por Todorova y col., en el 2011 y Taurin y col., en el 2013, en donde se demostró que el RAL es capaz de disminuir la proliferación celular de células negativas al RE mediante diversos mecanismos diferentes al antagonismo del RE α . Los mecanismos alternativos al RE α son la disminución de la captación de

glutamina, la disminución de la expresión proteica del transportador de glutamina ASCT2 (Todorova y col., 2011) y la disminución de la expresión del RFCE así como su internalización en endosomas lo que promueve la activación de la caspasa-3, es decir, la apoptosis celular (Taurin y col., 2013) (Figura 22 y 23).

Por otra parte, la disminución de la proliferación celular generada por el TRA se ha relacionado en este tipo de celular al arresto del ciclo celular mediante la disminución de la activación de ERK, lo cual genera arresto en la fase G1-S (Figura 24) (Chakrabarti y col., 2009).

8.2.2 Cuantificación de proteínas, cambios en la localización subcelular de snail

En las células RE negativas ninguna de los tratamientos probados de los fármacos generó cambios significativos en la expresión proteica de E-cadherina. En lo que respecta al RAL se cree que al no estar presente el ligando de unión primario del fármaco (RE α) el mecanismo de acción de estas células no está relacionada con la expresión de la proteína de E-cadherina (Taurin y col., 2013) (Fig. 26).

Por otro lado, la disminución de la expresión de proteína E-cadherina relacionada con el TRA no había sido reportada con anterioridad por lo que posiblemente se deba al arresto celular generado por este medicamento, además de que se ha documentado anteriormente que el efecto de TRA en estos tipos específicos de células genera disminución de síntesis de ADN (Nie y col., 1997) (Figura 26).

Con lo que respecta a la expresión proteica de snail, no registró cambios significativos con ninguno de los fármacos probados individualmente y en combinación (Figura 27). Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por Ohshio y col., en el 2013 en donde mencionan que la concentración de 100 μ M de TRA genera cambios significativos en la expresión de las proteínas E-cadherina, slug y twist, en células de carcinoma de pulmón de Lewis de ratón (LLC1); así como en lo observado en nuestro análisis de inmunocitoquímica de estas células (Figura 28), donde se encontró que el grupo de TRA mostraba una un menor número de células con la expresión de la proteína.

Esta inconsistencia se podría explicar por las características de las técnicas, llevándonos a pensar que el bloqueo de la vía de TGB- β por TRA previamente propuesto por Chakrabarti y col., 2009 podría influenciar en la expresión y la actividad de snail (Muqbil y col., 2014) (Figura 31).

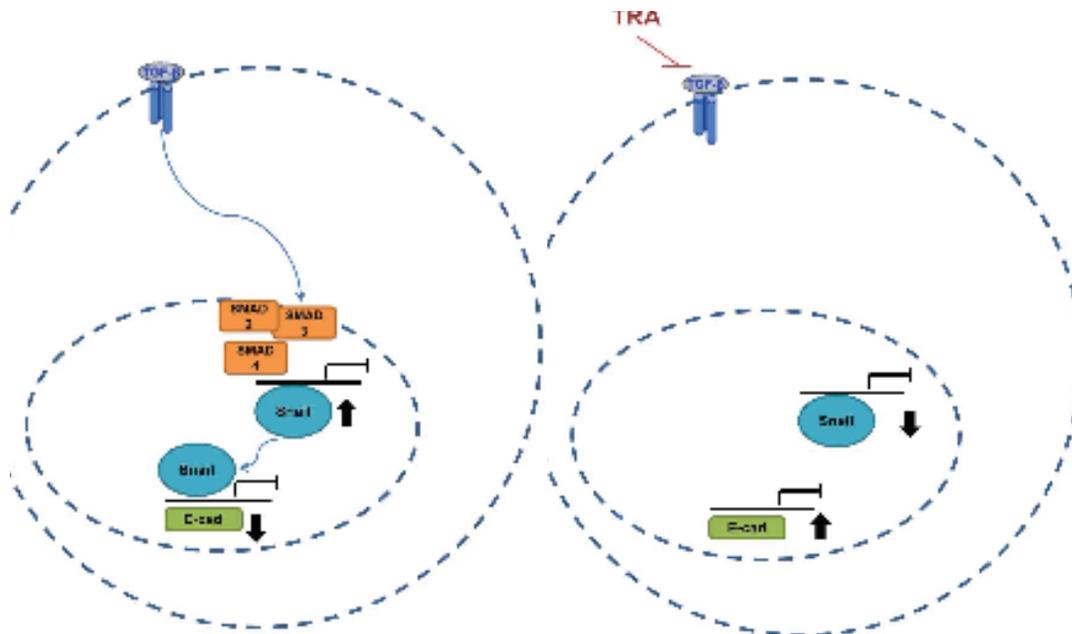


Figura 31. Mecanismo de acción propuesto para el efecto del tranilast en la expresión proteica snail en células RE negativas. Figura de nuestra autoría basada en los reportes de Chakrabarti y col., 2009.

8.2.3 Migración celular

Por último, se observó reducción en la migración celular con respecto al control por efecto del tratamiento con la combinación de ambos fármacos y de manera individual. Estos resultados son consistentes con los previamente reportados para RAL por Taurin y col., 2013 y para TRA con Chakrabarti y col., 2009 y Subramaniam y col., 2011. Además, es posible observar que en el caso de células negativas al receptor de estrógeno, la combinación mostró una mayor inhibición de la migración celular con respecto al control. Este efecto puede estar dado por la suma de los efectos de los fármacos, es decir, la generación de la apoptosis dada por RAL (Kim y col., 2015) más el arresto celular (Chakrabarti y col., 2009 y Subramaniam y col.,

2011) y disminución de la expresión del factor de transcripción snail en el núcleo dirigido por TRA. Además, posiblemente se encuentre involucrada la disminución de la expresión proteica de las integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha v\beta 6$ reportado por Ohshio y col., 2013, en LLC1 por efecto de la TRA; ya que estas integrinas están relacionadas con las características migratorias e invasivas de las células, por lo que su disminución podría ayudar a explicar los resultados del ensayo herida.

9.0 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este proyecto se puede concluir:

1. El RAL y el TRA de manera individual y en combinación, disminuyen la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231.
2. El RAL y el TRA tiene menor efecto antiproliferativo en células negativas al receptor de estrógenos (MDA-MB-231) que en células positivas a dicho receptor (MCF-7).
3. La combinación de 20 μ M de RAL y 300 μ M de TRA, no tiene efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 ni en las MDA-MB-231.
4. Los tratamientos individuales y el combinado de RAL y TRA, disminuyen la expresión proteica de E-cadherina de las células MCF-7 en la misma proporción; sin embargo, en las células MDA-MB-231 no se modifica.
5. El RAL a 20 μ M, el TRA a 300 μ M y la combinación de éstos, disminuyen la migración celular en células MCF-7 y en MDA-MB-231.
6. El RAL a 20 μ M tiene mayor efecto antimigratorio que el TRA o la combinación de ambos, en células MCF-7.
7. En células MDA-MB-231, la combinación de los fármacos tiene mayor efecto antimigratorio que los tratamientos individuales.
8. En las células MDA-MB-231, ninguno de los fármacos modifica la expresión proteica total de snail; sin embargo, todos los fármacos disminuyen su presencia en el núcleo.

10.0 REFERENCIAS

- aecc, Asociación española contra el cáncer, 2016a. Sobre el cáncer, ¿Qué es el cáncer?, consultado 18/10/2016 en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/elcancer/Paginas/%C2%BFQu%C3%A9eselc%C3%A1ncer.aspx>
- aecc, Asociación española contra el cáncer, 2016b. Cáncer de mama: Tipos, consultado 18/10/2016 en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/anatomia.aspx>
- aecc, Asociación española contra el cáncer, 2016c. Cáncer de mama: Tipos, consultado 18/10/2016 en: <https://www.aecc.es/sobreelcancer/cancerporlocalizacion/cancermama/paginas/tipos.aspx>
- aecc, Asociación española contra el cáncer, 2016d. Tratamiento hormonal en el cáncer de mama, consultado 18/10/2016 en: <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/TRATAMIENTOS/HORMONOTERAPIA/Paginas/tratamientohormonalenelcancerdemama.aspx>
- Alberts B. y col., Molecular Biology of the Cell, 2002. The molecular basis of cancer-cell behavior, consultado 26/02/2016 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>
- ATCC, Documentación de la línea celular MCF-7, 2016a. Consultado 18/10/2016 en: <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#documentation>
- ATCC, Documentación de la línea celular MDA-MB-231, 2016b. Consultado 18/10/2016 en: <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#documentation>

Bland Kirby I. y Copeland III Edward M., (2007), La mama, manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas, consultado 20/02/2016 en: <https://books.google.com.mx/books?id=01yvtLPQD7QC&printsec=frontcover&dq=,+La+mama,+manejo+multidisciplinario+de+las+enfermedades+benignas+y+malignas&hl=es&sa=X&ei=NKz8VKWQIlqeyATB9oDoBQ&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=%2C%20La%20mama%2C%20manejo%20multidisciplinario%20de%20las%20enfermedades%20benignas%20y%20malignas&f=false>

Boticario Boticario Consuelo, Cascales Angosto María, 2012. Innovaciones del Cáncer, Universidad Nacional de Educación a Distancia, consultado 25/10/2016 en: http://books.google.com.mx/books?id=uL2ROFbshOsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Cai Weijia, Ye Qing, She Qing-Bai, 2014. Loss of 4E-BP1 function induces EMT and promotes cancer cell migration and invasion via cap-dependent translational activation of snail, *Oncotarget*, 5(15):6015-6027.

Cazap Eduardo, Buzaid Antonio Carlos, Garbino Carlos, de la Garza Jaime, Orlandi Francisco Javier, Schwartzmann Gilberto, Vallejos Carlos, Guercovich Andres, 2008. Breast cancer in Latin America, Results of the Latin America and Caribbean Society of Medical Oncology/Breast Cancer Foundation Expert Survey, *Guidelines for International Breast Health and Cancer Control-Implementation*, 113(8):2359-2365.

Chakrabarti Rabindranath, Subramaniam Venkateswaran, Abdalla Salma, Jothy Serge, Prud'homme Gérald J., 2009. Tranilast inhibits the growth and metastasis of mammary carcinoma, *Anti-Cancer Drugs*, 20:334-345.

Cirillo Francesca, Nassa Giovanni, Tarallo Roberta, Stellato Claudia, de Filippo Maria Rosaria, Ambrosio Concetta, Baumann Marc, Nyman Tuula A., Weisz Alessandro, 2013. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator activity in human breast cancer cells: Identification of novel

nuclear cofactors of antiestrogen-ER α complexes by interaction proteomics, *Journal of Proteome Research*,12:421-431.

Crowley Leonard V., 2014. Una introducción a la enfermedad humana, correlaciones en patología y fisiopatología, consultado 07/02/2016 en: <https://books.google.com.mx/books?id=33aEBgAAQBAJ&pg=PA353&dq=estructur+de+los+lobulillos+mamarios&hl=es&sa=X&ei=qDf5VIT7BlmTyQTgo4CACQ&ved=0CDAQ6AEwBDgU#v=onepage&q=estructur%20de%20los%20lobulillos%20mamarios&f=false>

Cui Jie, Shen Yong, Li Rena, 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain, *Trends Mol Med*, 19(3):197-209.

Fujita Naoyuki, Jaye David L., Kajita Masahiro, Geigerman Cissy, Moreno Carlos S., Wade Paul A., 2003. MTA3, Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cáncer, *Cell Press*, 113:207-209.

Darakhshan Sara, Bidmeshkipour Ali, Mansouri Kamran, Saeid Hakhamaneshi Mohammad, Ghanbari Ali, 2014. The effects of Tamoxifen in combination with Tranilast on CXCL12-CXCR4 Axis and invasion breast cancer cell lines, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2):683-693.

Darakhshan Sara, Bidmeshkipour Ali, 2015. Tranilast: A review of its therapeutic applications. *Pharmacological Research* 91:15-28.

Davis Nicole M., Sokolosky Melissa, Stadelman Kristin, Abrams Stephen L., Libra Massimo, Candido Saverio, Nicoletti Ferdinando, Polesel Jerry, Maestro Roberta, D'Assoro Antonio, Drobot Lyudmyla, Rakus Dariusz, Gizak Agnieszka, Laidler Piotr, Dulinska-Litewka Joanna, Basecke Joerg, Mijatovic Sanja, Maksimovic-Ivanic Danijela, Montalto Giuseppe, Cervello Melchiorre, Fitzgerald Timothy L., Demidenko Zoya N., Martelli Alberto M., Cocco Lucio, Steelman Linda S., McCubrey James A., 2014. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention, *Oncotarget*, 5 (13): 4603-4650.

Dhasarathy Archana, Kajita Masahiro, Wade Paul A., 2007. The transcription factor snail mediates epithelial to mesenchymal transitions by repression of estrogen receptor alpha, *Mol Endocrinol*, 21(12):2907-2918.

DrugBank, Open Data Drug and Drug Target Data Base 2014. consultado 25/10/2016 en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00481>

Espinós J., Reyna C., De la Cruz S., Olier C., Hernández A., Fernández Hidalgo O., Santisteban, García Foncillas J., 2008. Tratamiento hormonal del cáncer de mama, *Rev Med Univ Navarra*, 52(1):40-48.

Fan Ping, Jordan V. Craig, 2014. Acquired resistance to selective estrogen modulators (SERMs) in clinical practice (tamoxifen & raloxifene) by selection pressure in breast cancer cell populations, *ELSERVIER Steroids* 90:44-52.

Hanahan Douglas, Weinberg Robert A., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell Press*, 100:57-70.

Hemachandra L.P. Madhubhani P., Patel Hitisha, Chandrasena R. Esala P., Choi Jaewoo, Piyankarage Sujeewa C., Wang Shuai, Wang Yijin, Thayer Emily N., Scism Robert A., Michalsen Bradley T., Xiong Rui, Siklos Marton I., Bolton Judy L., Thatcher Gregory R.J., 2014. SERMs attenuate estrogen-induced malignant transformation of human mammary epithelial cells by upregulating detoxification of oxidative metabolites, *AACR Journals, Cancer Prevention Research*, 7:505-515.

INC, Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU., 2016a, Información general sobre el cáncer de seno, consultado 18/10/2016 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

INC, Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU., 2016b. Estadios del cáncer de seno (mama), consultado 18/10/2016 en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page2#Keypoint8>

- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2016a. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero), datos nacionales, consultado 18/10/2016 en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2016b. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer de mama (19 de octubre), datos nacionales, consultado 18/10/2016 en: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
- Infocáncer, Infocáncer México, 2016. Cáncer en cifras, Estadísticas 2008, Defunciones, consultado 18/10/2016 en: <http://www.infocancer.org.mx/cncer-en-cifras-con487i0.html>
- Jiménez-Salazar Javier Esteban, González-Núñez Leticia, Konigsberg-Fainstein Mina, Gómez-Quiroz Luis Enrique, Zentella-Dehesa Alejandro, Damián-Matsumura Pablo, 2012. Estructura y función de las uniones estrechas en la trsicion epitelio-mesenquima (TEM) y la tumorogénesis del cáncer de mama humano, REB 31(2):49-59.
- Kaneyama Tomoki, Kobayashi Satoshi, Aoyagi Daiju, Ehara Takashi, 2010. Tranilast modulates fibrosis, epithelial-mesenchymal transition and peritubular capillary injury in unilateral ureteral obstruction rats, *Experimental Pathology*, 564-573.
- Kaufhold Samantha, Bonavida Benjamín, 2014. Central role of snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33:62.
- Kim Dong Eun, Kim Yunha, Cho Dong-Hyung, Jeong Seong-Yun, Kim Sung-Bae, Suh Nayoung, Lee Jung Shin, Choi Eun Kyung, Koh Jae-Young, Hwang Jung Jin, Kim Choung-Soo, 2015. Raloxifene induces autophagy-dependent cell death in breast cancer cells via the activation of AMP-activated protein kinase, *Molecules and Cells*, 38(2):138-144.

- Kotiyal Srishti, Bhattacharya Susinjan, 2014. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets, *ELSERVIER Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(1):112-116.
- Lee Wen-Ling, Cheng Ming-Huei, Chao Hsiang-Tai, Wang Peng-Hui, 2008. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from Tamoxifen to Raloxifene, *ELSERVIER Journal of Obstetrics and Gynecology*, 40(1):24-31.
- Le Vay David, Anatomía y fisiología humana, consultado 25/10/2016 en: <https://books.google.com.mx/books?id=gkqKyVVH3OQC&printsec=frontcover&dq=le+vay+2004&hl=es&sa=X&ved=0CB4Q6AEwAGoVChMlt8LCmr6zxwIVC52ACh1nEADs#v=onepage&q=le%20vay%202004&f=false>
- Li Sha-Sha, Liu Qi-Feng, He Ao-lin, Wu Fu-Rang, 2014. Tranilast attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in the NRK-52E cells, *Pak. J. Pharm. Sci.* 27(1):51-55.
- Li Shuang, Li Qin, 2014. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review), *International Journal of Oncology*, 44:1806-1812.
- Lin Yiwei, Wu Yadi, Li Junlin, Dong Chenfang, Ye Xiaofeng, Chi Young-In, Evers B. Mark, Zhou Binhua P., 2010. *The EMBO Journal*, 29:1803-1816.
- Liu Wen, Vivian Carolyn J., Brinker Amanda E., Hampton Kelsey R., Lianidou Evi, Welch Danny R., 2014. Microenvironmental influences on metastasis suppressor expression and function during a metastatic cells journey, *Cancer Microenvironment*, 7(3):117-31.
- Lodish Harvey, Berk Arnold, Zipursky S. Lawrence, Matsudaira Paul, Baltimore David, Darnell James, 2005. *Biología celular y molecular*, consultado 25/10/2016 en: <https://books.google.com.mx/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA946&dq=genes+supresores+de+tumores&hl=es&sa=X&ei=qATwVLedPIWeyASM1o>

DwDw&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=genes%20supresores%20de%20tumores&f=false

Martinkovich Stephen, Shah Darshan, Lobo Planey Sonia, Amott A. Jhon, 2014. Selective strogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility, *Clinical Interventions in Aging*,9:1437-1452.

May Felicity EB, 2014. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer, *Cancer management and Research*, 6:225-252.

Muqbil Irfana, Wu Jack, Aboukameel Amro, Mohammad Ramzi M., Azmi Asfar S., 2014. snail nuclear transport: the gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition?, *ELSERVIER Seminars in Cancer Biology*, 27:39-45.

Nie Lin, Oishi Yumiko, Doi Ichiro, Shibata Horishi, Kojima Itaru, 1997. Inhibition of proliferation of MCF-7 breast cáncer cells by a blocker of Ca²⁺-permeable channel, *Cell Calcium*, 22(2):75-82.

Nieto M. Angela, 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription, factors, *Nature Reviews*, 3:155-166.

OCM, Organización del cáncer de mama (Breastcancer.org), 2016a. El cáncer de mama, consultado 18/10/2016 en: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama

OCM, Organización del cáncer de mama (Breastcancer.org), 2016b. Factores de riesgo del cáncer de mama, consultado 18/10/2016 en: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/riesgo/factores

- OCM, Organización del cáncer de mama (Breastcancer.org), 2016c. Tipos de cáncer de mama, consultado 18/10/2016 en: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
- OCM, Organización del cáncer de mama (Breastcancer.org), 2016d. Tratamiento para el cáncer de mama con receptores de hormonas positivos, consultado 18/10/2016 en: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal/tratamientos_rhpositivos
- OCM, Organización del cáncer de mama (Breastcancer.org), 2016e. Evista, consultado 02/06/2016 en: <http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/hormonoterapia/msre/evista>
- Ohshio Yasuhiko, Teramoto Koji, Hashimoto Masayuki, Kitamura Shoji, Hanaoka Jun, Kontani Keiichi, 2013. Inhibition of transforming growth factor- β release from tumor cells reduces their motility associated with epithelial-mesenchymal transition, *Oncology Reports*, 30:1000-1006.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2016a, Cáncer: Datos y cifras, consultado 18/10/2016 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2016b, Cáncer de mama: prevención y control, consultado 18/10/2016 en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- Pubchem, Open Chemistry Database 2016. Consultado 18/10/2016 en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5035>
- Qiagen, 2016. Vía de señalización del estrógeno, consultado 18/10/2016 en: <https://www.qiagen.com/mx/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details/?pwid=166>
- Reimers Laura, Crew Katherine D., 2012. Tamoxifen y Raloxifene vs Exemestane for Chemoprevention, *Curr Breast Cancer Rep*, 4(3):207-215.

SAC, American Cancer Society, 2016a. ¿Qué es el cáncer de seno?, consultado 18/10/2016 en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-que-es-que-es-cancer-de-seno>

SAC, American Cancer Society, 2016b, Tipos de cáncer de seno, consultado 18/10/2016 en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-what-is-breast-cancer-types>

SAC, American Cancer Society, 2016c. Tratamiento del cáncer de seno invasivo según la etapa, consultado 18/10/2016 en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-por-etapa>

Senra Varela A., 2002. El cáncer: epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención, consultado 08/03/2016 en: <http://books.google.com.mx/books?id=miybptbrsM8C&printsec=frontcover&dq=senra+varela&hl=es&sa=X&ei=jck2VMWNDZGAYgTQsoHgBw&ved=0CC8Q6AEwAg#v=onepage&q=senra%20varela&f=false>

Shime Hiroaki, Kariya Masatoshi, Orii Ayaka, Momma Chika, Kanamori Tananobu, Fukuhara Ken, Kusakari Takashi, Tsuruta Yuko, Takakura Kenji, Nikaido Toshio, Fujii Shingo, 2002. Tranilast inhibits the proliferation of uterine leiomyoma cells *in vitro* through G1 arrest associated with the induction of p21 and p53, *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(12):5610-5617.

Smith Steven Christopher, Theodorescu Dan, 2009. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins, *Nat Rev Cancer*, 9(4):253-264.

Subramaniam Venkateswaran, Ace Olga, Prud'homme Gerald J., Jothy Serge, 2011. Tranilast treatment decreases cell growth, migration and inhibits

colony formation in human breast cancer cells, *ELSEVIER Experimental and Molecular Pathology*, 90(1):116-122.

Takai Massaki, Terai Yoshito, Kawaguchi Hiroshi, Ashihara Keisuke, Fujiwara Satoe, Tanaka Tomochito, Tsunetoh Satoshi, Tanaka Yoshimichi, Sasaki Hiroshi, Kanemura Masanori, Tanabe Akiko, Ohmichi Masahide, 2014. The EMT related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer, *Journal of Ovarian Research* 7:76.

Tan Sing-Huang, Lee Soo-Chin, Goh Boon-Cher, Wong John, 2008. Pharmacogenetics in breast cancer therapy, *Clinical Cancer Research*, 14:8027-8041.

Taurin Sebastien, Allen Kirstie M., Scandlyn Marissa J., Rosengren Rhonda J., 2013. Raloxifene reduces triple-negative breast cancer tumor growth and decreases EGFR expression, *International Journal of Oncology*, 43:785-792.

Todovora Valentina K., Kaufmann Yinhong, Luo Shaoke, Klimberg V. Suzanne, 2011. Tamoxifen y Raloxifeno suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake, *Cancer Chemother Pharmacol*, 67:285-291.

Wang Yifan, Zhou Binhua P., 2013. Epithelial-mesenchymal Transition, A Hallmark of breast cancer metastasis, *Cancer Hallm* 1(1)38:49.

Weinberg Robert A., 2014. *The Biology of Cancer*, consultado 17/02/2016 en: <https://books.google.com.mx/books?id=MzMmAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=the+biology+of+cancer&hl=es&sa=X&ei=BBo5VeKpNNHksATnjlHQAQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=the%20biology%20of%20cancer&f=false>

Wen Liu, Carolyn J. Vivian, Amanda E. Brinker, Kelsey R. Hampton, Evi Lianidou, Danny R. Welch, 2014. Microenvironmental influences on metastasis

suppressor expression and function during a metastatic cell's journey, Springer Cancer Microenvironmental, 7:117-131.

Wijnhoven B.P.L., Dinjens W.N.M., Pignatelli M., 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer, British Journal of Surgery, 87:992-1005.

Wren Barry G., 2007. The origin of breast cancer, The Journal of North American Menopause Society, 14(6):1060-1068.

Yan Min, Schwaederle Maria, Arguello David, Millis Sherri Z., Gatalica Zoran, Kurzrock Razelle, 2015. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37, 992 patients, Cancer Metastasis Rev, 34(1):157-64.