



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuroendocrinología

Relevancia fisiológica del receptor a estrógenos β
(ER β) sobre el potencial metastásico en la línea celular
MDA-MB 231, proveniente de cáncer de mama.

TESIS

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Fisiológica

Presenta:

QFB Rubén Avalos López

Director de Tesis: D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán.

2017

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado, para la realización del proyecto mediante la beca como alumno de Maestría (709762).

Agradecimientos

Le doy gracias a mis padres por ser un gran ejemplo a seguir en mi vida, por haberme dado las herramientas para asegurarme un mejor futuro y por su apoyo, cariño y comprensión no solo a lo largo de estos dos años, sino a lo largo de toda mi vida.

A Evelyn por ser la persona más especial que conozco, por su apoyo incondicional en todo momento, por presionarme a ser mejor y ayudarme a lo largo de esta tesis, por ser mi soporte en buenos y malos momentos, y por un sinfín de cosas más muchas gracias

A mis hermanos Juan, Fina y Juanita, por ser comprensivos conmigo y aguantar mis desplantes de estrés, por ser parte fundamental de mi vida, por su apoyo, amor y comprensión en cada momento de mi vida, de corazón muchas gracias.

Agradezco de manera especial y sincera al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán por aceptarme en su laboratorio de investigación. Por su apoyo, confianza y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Le agradezco también siempre haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Neuroendocrinología por apoyarme en cada paso de esta tesis, a Kari por ayudarme a responder un sinfín de preguntas, a Lupita, Scarlett, Aron y Toño por enseñarme cada una de las metodologías, a July por haberme enseñado como se mantiene un cultivo celular, en general a todos y cada uno de los integrantes del laboratorio (Mariana, Eliud, Selene, Miri, Zuli, Max, Cecilia), por cada momento que he pasado con ustedes dentro y fuera del laboratorio.

Y por último a mis revisores de tesis el Dr. José Everardo Avelino Cruz, la Dra. Ma. Rosa Padros Semorile y la Dra. Maricarmen Cortés Sánchez, por haberseme guiado con sus sugerencias y aportes durante el desarrollo de esta tesis.

Muchas Gracias a todos

ÍNDICE

ABREVIATURAS-----	viii
RESUMEN-----	ix
INTRODUCCIÓN-----	1
Cáncer-----	2
ANTECEDENTES-----	4
Cáncer de mama-----	4
Factores de riesgo-----	6
Patogénesis-----	10
Transición epitelio mesénquima-----	11
Receptores a estrógenos-----	13
ER β -----	14
ER β y cáncer-----	15
JUSTIFICACIÓN -----	17
HIPÓTESIS-----	18
OBJETIVO GENERAL-----	19
Objetivos particulares-----	19
MATERIALES Y MÉTODOS-----	20
Cultivo de la línea tumoral MDA-MB 231-----	20
Ensayo de migración en cámaras <i>transwell</i> y cierre de herida-----	20
Ensayo de proliferación (Conteo celular)-----	21
Experimentos de RT-PCR-----	21
Análisis estadístico-----	23
RESULTADOS-----	24

17 β -estradiol estimula la proliferación celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231-----	24
17 β -estradiol estimula la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231-----	25
DPN exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231-----	27
DPN estimula la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231-----	28
PHTPP antagonista del ER β disminuye la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB 231-----	30
PHTPP disminuye la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231-----	30
La activación del ER β ayuda a mantener el fenotipo mesénquimal de la línea celular MDA-MB 231-----	33
DISCUSIÓN -----	38
CONCLUSIÓN-----	42
BIBLIOGRAFÍA-----	43
MATERIAL SUPLEMENTARIO-----	52

ABREVIATURAS

ACS – American Cancer Society

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARNm - Ácido ribonucleico mensajero

BRCA1 – Breast cancer 1(gen)

CDH1 - Cadherina 1

DPN - Diarilpropionitrilo

E₁ - Estrona

E₂ – Estradiol

E₃ - Estriol

EMT –Transición Epitelio Mesénquima

ER – Receptor a Estrógenos

ERE – Elemento Responsivo a Estrógenos

ER α – Receptor a Estrógenos Alfa

ER β – Receptor a Estrógenos Beta

GPER – Receptor a Estrógenos acoplado a proteínas G

HCC – Carcinoma Hepatocelular

HER2 – Receptor 2 de factor de crecimiento epidermal

INEGI – Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía

LBD – Dominio de unión a ligando

MTE – Transición mesénquima epitelio

OMS – Organización Mundial de la Salud

PALB2 - Partner and localizer of BRCA2 (Por sus siglas en ingles)

PHTPP – 4-[2-Phenyl-5,7-*bis*(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl]phenol

PI3K - Fosfoinositol 3-quinasa

PR – Receptor a Progesterona

TNBC – Cáncer de Mama triple negativo

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública tanto en México como en el mundo entero, representa el primer lugar en casos de incidencias y el segundo lugar en casos de muerte entre todos los diferentes tipos de cáncer en la población femenina adulta. Evidencias científicas han establecido un correlato positivo entre la activación del receptor a estrógenos β y la progresión del cáncer de mama triple negativo, observándose un aumento en sus múltiples capacidades metastásicas, tales como proliferación, migración e invasión, para lo cual es importante que la célula tumoral mantenga un fenotipo mesénquimal.

En el presente trabajo decidimos evaluar el efecto que ejerce la activación del receptor a estrógenos β (ER β) sobre la capacidad proliferativa, migratoria y sobre el mantenimiento del fenotipo mesénquimal en las células MDA-MB 231, con el fin de mantener su alto potencial metastásico.

Experimentos de RT-PCR muestran que la línea celular MDA-MB 231 expresa a nivel de ARNm el ER β . La presencia de 17 β -estradiol y DPN, agonistas del ER β modifica la capacidad proliferativa de estas células, además de provocar cambios en su capacidad migratoria de manera cualitativa y cuantitativa de manera dosis dependiente.

La capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 está correlacionada con su fenotipo mesénquimal, el cual se sabe es mantenido en parte por la expresión de factores de transcripción relacionados con la transición epitelio mesénquima, tales como SNAIL-1, SNAIL-2, y ZEB-1. La presencia tanto de 17 β -estradiol como DPN incrementa los niveles de expresión del ARNm que codifica para dichos factores de transcripción de manera significativa.

Estos efectos son específicos ya que la unión del antagonista selectivo del ER β PHTPP, disminuye de manera significativa la capacidad proliferativa y migratoria de la línea tumoral MDA-MB 231, así como los niveles de expresión a nivel de ARNm de los factores de transcripción asociados a la transición epitelio mesénquima SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1.

En el presente trabajo, la evidencia experimental sugiere que la activación del ER β , podría ser un factor determinante en el aumento de la capacidad migratoria de las células tumorales de mamá triple negativo. Y que la exacerbación de la capacidad migratoria es mediada hasta cierto punto, por la sobre expresión de los factores de transcripción asociados al mantenimiento del fenotipo mesénquimal (SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1).

La identificación de los elementos moleculares responsables de la capacidad migratoria de las células tumorales permitirá a corto, mediano y largo plazo el diseño de antagonistas específicos que inhiban o reduzcan de manera efectiva la capacidad metastásica de las células tumorales, asegurando un mejor pronóstico de vida de los pacientes afectados por cáncer de mama.

INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento excesivo y descontrolado de las células, las cuales pueden llegar a invadir y dañar tejidos u órganos, provocando finalmente la muerte del individuo. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula requiere de la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes, cuyas causas pueden ser intrínsecas (genéticas) o extrínsecas (epigenéticas) (Hannahan & Weinberg, 2000).

La célula tumoral es el resultado de mutaciones que ocurren en genes que regulan la proliferación y la homeostasis celular, tales como oncogenes, genes supresores de tumores y genes que codifican para proteínas que reparan el ADN (Kinzler & Vogelstein, 1998).

En nuestro organismo, existen al menos 200 tipos diferentes de células, por lo que en un principio, cualquiera de ellas puede potencialmente originar un tumor, sin embargo, el 90% de los tumores son generados por células de tipo epitelial. Una célula epitelial normal presenta un fenotipo diferenciado polarizado con uniones intercelulares que restringen la movilidad y mantienen por lo tanto la integridad del tejido. Durante la progresión de un tumor epitelial, las células presentan una reducción en la expresión de marcadores epiteliales, provocando una pérdida de uniones intercelulares y de polaridad epitelial. Estos cambios van acompañados con un incremento en la expresión de marcadores mesénquimales, así como en la capacidad migratoria de la célula lo que incrementa su potencial invasivo. El proceso mediante el cual la célula cambia su fenotipo epitelial a un fenotipo mesénquimal se denomina Transición Epitelio-Mesénquima (EMT por sus siglas en inglés, Epithelial to mesenchymal transition) (Thiery & Sleeman, 2006; Gotzmann *et al.*, 2004; Hay ED, 1995).

Cáncer

La OMS define al cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que pueden invadir otros tejidos y órganos del organismo, proceso conocido como metástasis (OMS, 2015). El cáncer se ha convertido en una de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, aquejando principalmente a la población adulta. El cáncer al progresar y desarrollarse induce metástasis, que es la principal causa de muerte por cáncer en las personas. La OMS ha reportado que en el año 2012 hubo más de 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo. El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en las mujeres adultas, ocupando el primer lugar de incidencia a nivel mundial y el segundo lugar como causa de muerte (OMS, 2015). Solamente en los Estados Unidos de América, se diagnosticaron 232,670 nuevos casos de cáncer de mama, sumándose a los 3.1 millones de casos ya registrados (DeSantis *et al.*, 2014). En México, la Secretaría de Salud reportó la muerte de 14 mujeres al día por cáncer de mama en el año 2014 (INEGI, 2014).

Se ha considerado que el desarrollo del cáncer está relacionado con defectos en los circuitos regulatorios de la proliferación celular y la homeostasis. Hanahan y Weiberg en 2011 consideraron diez alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente facilitan el crecimiento de células tumorales (Figura 1).



Figura 1 Características que facilitan el crecimiento de células tumorales. (Imagen modificada de Hanahan y Weiberg, 2011).

Existen diferentes tipos de cáncer, siendo los más comunes:

- Cáncer de Mama
- Cáncer de pulmón
- Cáncer de vejiga
- Cáncer de colon
- Cáncer endometrial
- Cáncer de próstata
- Cáncer del riñón
- Cáncer de páncreas
- Leucemia
- Melanoma

La siguiente tabla muestra el número estimado de nuevos casos y muertes para cada tipo cáncer (NCI, 2016).

Tipo de Cáncer.	Estimación de casos nuevos.	Muertes estimadas.
Mama (Femenino - Masculino)	246,660 - 2,600	40,450 - 440
Pulmonar	224,390	158,080
Próstata	180,890	26,120
Colon y rectal	134,490	49,190
Vejiga	76,960	16,390
Melanoma	76,380	10,130
Riñón	62,700	14,240
Leucemia	60,140	24,400
Endometrial	60,050	10,470
Pancreático	53,070	41,780

Tabla 1: Tipos de Cáncer más comunes, estimación de casos nuevos y muertes estimadas (Tabla modificada de NCI, 2016).

En la tabla 1 podemos observar que el cáncer de mama tiene una mayor estimación de nuevos casos y de muertes. Según datos del INEGI en 2013 el 29.5% de las principales causas de morbilidad hospitalaria por neoplasias se debe al cáncer de mama en mujeres de 20 años o más. Para las mujeres de 30 a 74 años, la incidencia y mortalidad es más alta para cáncer de mama, el cual es dependiente de la edad, al pasar de 38 egresos por cada 100 mil mujeres de 30 a 39 años a 176 por cada 100 mil mujeres de 65 a 74 años, observándose la tasa de mortalidad más alta en el grupo de mujeres de 60 a 64 años (INEGI 2016).

ANTECEDENTES

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común que se presenta en la población femenina adulta de todo el mundo, representando el 16% del total de los casos de

cáncer para esta población (OMS, 2015; NCI, 2016). A nivel mundial, se estima que cada año se detectan 1.5 millones de casos nuevos y hay 570,000 decesos por esta causa, siendo el tipo de cáncer de mayor incidencia entre las mujeres (OMS, 2016) a pesar de la mejora en las técnicas diagnósticas y refinamiento en las modalidades de tratamiento. En 2014, del total de casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana de 20 años y más, el de mama es el de mayor presencia con 19.4 por ciento (INEGI, 2016).

Se observa una variación en la incidencia de cáncer de mama a nivel mundial, por ejemplo, para Estados Unidos de América, la incidencia es de 99.4 casos nuevos por cada 100,000 personas (OMS, 2016). En México, para el año 2015, la incidencia de cáncer de mama entre la población de mujeres de 20 años y más, es de 27.9 casos nuevos por cada 100,000 personas (Figura 2).

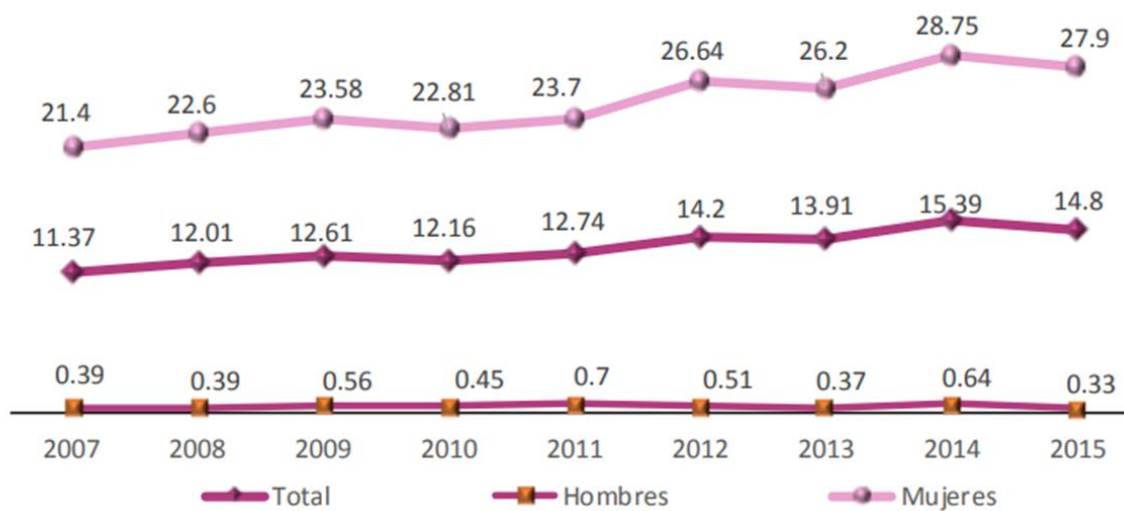


Figura 2. Incidencia de tumores malignos de mama en población de 20 años y más por sexo. Serie anual de 2007-2015 por cada 100,000 habitantes de cada sexo. (Figura modificada de INEGI, 2016)

La mayoría de los casos de cáncer de mama inician en las células epiteliales que recubren los ductos, mientras que otros se originan en las células lobulillares (ACS, 2008).

Factores de Riesgo

Género.

El cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres estadounidenses, representando el 29% de los cánceres diagnosticados recientemente. Los hombres generalmente tienen un bajo riesgo de desarrollar cáncer de mama de alrededor del 1% (Alteri *et al.*, 2016).

Edad.

La incidencia de cáncer de mama y las tasas de mortalidad generalmente aumentan con la edad. Durante 2008-2012, la media de edad en el momento del diagnóstico de cáncer de mama fue de 61.24 años. Esto significa que la mitad de las mujeres que desarrollaron cáncer de mama tenían 61 años de edad o menos al momento del diagnóstico (Alteri *et al.*, 2016).

Origen étnico.

Entre las edades de 60 y 84 años, las tasas de incidencia de cáncer de mama son notablemente más altas en mujeres de raza blanca que en mujeres de raza negra. Sin embargo, las mujeres de raza negra tienen una mayor tasa de incidencia antes de los 45 años y tienen más probabilidades de morir de cáncer de mama en cada edad (Figura 3) (Howelader *et al.*, 2011).

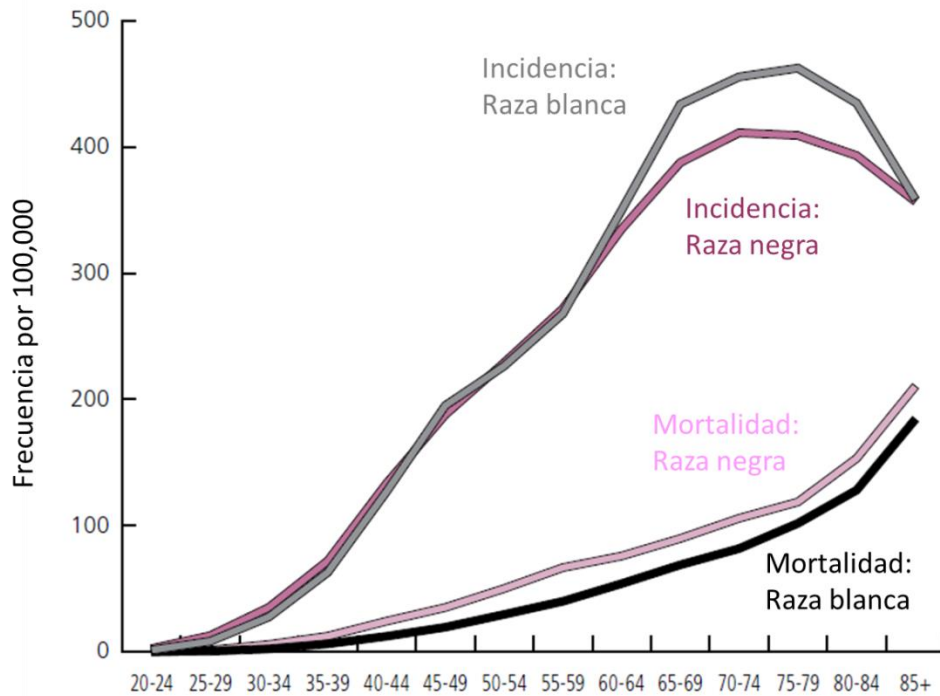


Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad por cáncer de mama femenino según la edad, EE.UU., 2008-2012. (Imagen modificada de Alteri *et al.*, 2016)

La Figura 4 muestra la incidencia de cáncer de mama y las tasas de mortalidad por raza durante el período de tiempo 2008-2012. Las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de mama son más bajas entre las mujeres hispanas, indios americanos y asiáticos, por otro lado, la mayor incidencia la presentan las razas blancas seguida de las razas negras, sin embargo, la tasa de mortalidad es mayor en mujeres de raza negra (Copeland *et al.*, 2015; Howelader *et al.*, 2011).

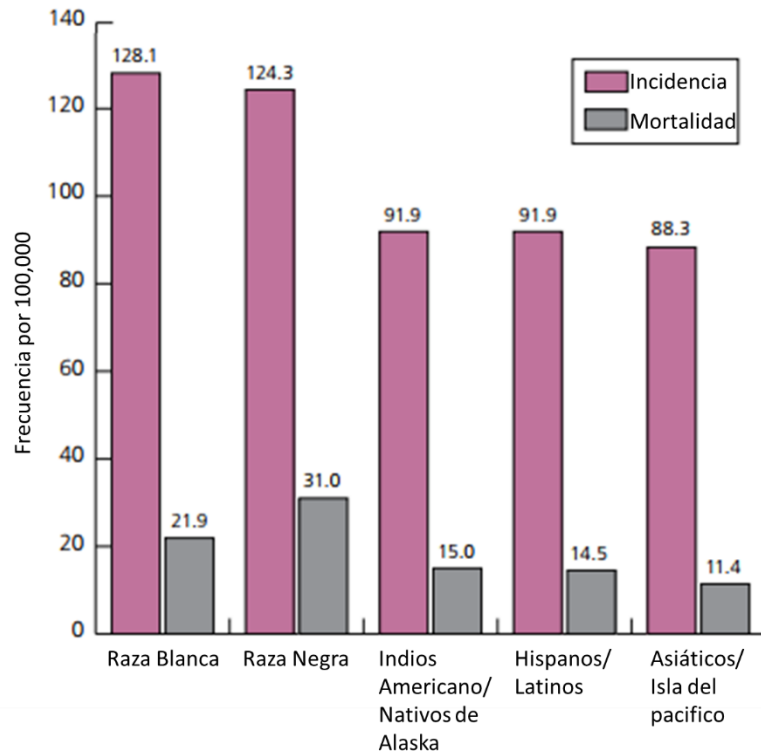


Figura 4: Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en mujeres por raza y etnicidad, EE.UU., 2008-2012 (Imagen modificada de Alteri et al., 2016).

Sobrepeso y obesidad.

La obesidad aumenta el riesgo de cáncer de mama posmenopáusico (Marmot *et al.*, 2007). El riesgo es aproximadamente 1,5 veces más alto en las mujeres con sobrepeso y aproximadamente 2 veces más en las mujeres obesas que en las mujeres delgadas (La Vecchia *et al.*, 2011). El riesgo de cáncer de mama asociado con el exceso de peso es en parte probablemente debido, al tejido adiposo, porque es la mayor fuente de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas. Esta asociación también podría explicarse por los niveles más altos de insulina entre las mujeres obesas (Alteri *et al.*, 2016).

Factores químicos: humo del tabaco, alcohol.

Las investigaciones limitadas pero acumuladas, indican que el tabaquismo puede aumentar ligeramente el riesgo de cáncer de mama, particularmente el tabaquismo

intensivo a largo plazo y entre las mujeres que comienzan a fumar antes de su primer embarazo (Dossus *et al.*, 2014; Secretan *et al.*, 2009). Estudios han confirmado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de cáncer de mama en las mujeres en aproximadamente el 7% - 10% por cada 10mL de alcohol consumido por día en promedio (Liu *et al.*, 2015; Hamajima *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011). Las mujeres que consumen de 2-3 bebidas alcohólicas por día tienen un riesgo 20% mayor de padecer cáncer de mama en comparación con mujeres no bebedoras (Singletary & Gapstur, 2001).

Factores hormonales.

El uso reciente de hormonas menopáusicas (también denominadas terapia hormonal o terapia de reemplazo hormonal) con estrógeno combinado y progestina aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama, con un mayor riesgo asociado con el uso prolongado (Chlebowski *et al.*, 2013; Manson *et al.*, 2013). El riesgo también es mayor para las mujeres que inician la terapia hormonal poco después del inicio de la menopausia en comparación con aquellas que comienzan a usarlas más tarde (Beral *et al.*, 2011; Chlebowski *et al.*, 2011).

Predisposición genética.

Las mutaciones hereditarias (alteraciones genéticas) en BRCA1 y BRCA2, los genes de susceptibilidad al cáncer de mama mejor estudiados, representan del 5% al 10% de todos los cánceres de mama femeninos, y un estimado del 5% al 20% del cáncer de mama masculino (Schwartz *et al.*, 2008; Turnbull & Anderson, 2011). Estas mutaciones son muy raras mucho menos del 1% en la población general, pero ocurren con mayor frecuencia en ciertos grupos étnicos o geográficamente aislados, como los de ascendencia judía de Ashkenazi (Europa Oriental) (alrededor del 2%) (Schwartz *et al.*, 2008; Gabai-Kapara *et al.*, 2014). En comparación con las mujeres de la población general que tienen un riesgo del 7% de desarrollar cáncer de mama a los 70 años, se estima que el riesgo medio para los portadores de mutaciones BRCA1 y BRCA2 es entre 57%-65% y 45%-55%, respectivamente (Antoniou *et al.*, 2003; Mavaddat *et al.*,

2013). Mutaciones en PALB2, un gen diferente que trabaja con BRCA2, parecen conferir un riesgo similar a las mutaciones de BRCA2 (Antoniou *et al.*, 2014).

Patogénesis

El 95% de los cánceres de mama son carcinomas, es decir, que surgen de los elementos epiteliales de la mama. Los cánceres de mama se dividen en dos tipos principales, carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo o infiltrante. El carcinoma *in situ* puede surgir en el epitelio ductal o lobular, pero permanece confinado allí, sin rebasar la membrana basal subyacente, por lo cual tiene un bajo potencial metastásico. Cuando existe una extensión de la malignidad ductal o lobular más allá de la membrana basal que constituye el borde epitelial, entonces la neoplasia maligna se considera carcinoma ductal u lobular invasivo (Richie & Swanson, 2003). El carcinoma invasivo, a veces denominado carcinoma ductal infiltrante, es el tipo más común de cáncer de mama. Alrededor del 80 % de todos los casos de cáncer de mama son carcinomas ductales invasivos (*breastcancer.org*).

Los cánceres de mama se clasifican en tres grupos principales en base a marcadores moleculares que reflejan las terapias dirigidas disponibles:

- Los receptores de estrógenos (ER) o receptor de progesterona (PR) positivo.
- Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) positivo (amplificación de *erbB2*) con o sin ER y PR positividad.
- Cáncer de mama triple negativo: se define por la ausencia de expresión de ER, PR y HER2.

La terapia dirigida es disponible para las primeras 2, pero no hay opciones de tratamiento estándar para el cáncer de mama triple negativo (TNBC). Este tipo de cáncer representa del 10-20% de todos los cánceres de mama (Hon *et al.*, 2016). Los TNBC son un grupo heterogéneo de tumores con una característica común: una naturaleza claramente agresiva con tasas más altas de recaída y una supervivencia global más corta en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Dent *et al.*,

2007). El tumor triple negativo tiene un fenotipo más agresivo y un peor pronóstico debido a la alta propensión a la metástasis y la ausencia de tratamientos dirigidos específicos. Los TNBC afectan más frecuentemente a los pacientes más jóvenes y de manera preferencial a las mujeres afroamericanas, asociadas a mutaciones del gen BRCA (Carey *et al.*, 2006). Los pacientes con esta forma de cáncer no se benefician de terapias dirigidas hormonales debido a la pérdida de receptores diana. Aunque estos pacientes responden a los agentes quimioterapéuticos tales como taxanos y antraciclina mejor que otros subtipos de cáncer de mama, el pronóstico es pobre y la recurrencia es alta (Yao *et al.*, 2017). La media de supervivencia para las mujeres con TNBC metastásico es inferior a un año, y casi todas mueren de su enfermedad a pesar de la quimioterapia sistémica agresiva y tóxica (Dent *et al.*, 2007; Brinton *et al.*, 1995).

Las principales características de los cánceres de mama triple negativo son las siguientes (Yao *et al.*, 2017):

- Mayor frecuencia en mujeres jóvenes (<50 años),
- Mayor frecuencia en mujeres afroamericanas y etnias negras,
- Alta quimiorresistencia (Fisher *et al.*, 1990)
- Poca asociación entre el tamaño tumoral y la metástasis en ganglios linfáticos,
- Mayor agresividad con una mayor probabilidad de metástasis cerebrales
- Alta probabilidad de recurrencia durante el primer y tercer años después del diagnóstico (Harbeck & Gnant, 2016).

Un paso clave durante el desarrollo y progresión del cáncer es la invasión y posterior colonización de un órgano diana, por lo que la célula cambia de un fenotipo epitelial a un fenotipo migratorio, proceso que se llama transición epitelio mesénquima.

Transición epitelio mesénquima

La idea de que las células epiteliales pueden disminuir las características epiteliales y adquirir características mesenquimatosas surgió a partir de las observaciones hechas por Elizabeth Hay (Hay, 1995). Inicialmente descrito como " transformación epitelial a

mesénquimal", este proceso de diferenciación es ahora comúnmente conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), por otro lado, el proceso inverso de fenotipo mesénquimal a epitelial se conoce como transición mesénquimal-epitelial (MET). La capacidad de las células epiteliales para la transición a las células mesénquimales y de regresar nuevamente a un fenotipo epitelial, parcial o totalmente, ilustra una plasticidad inherente del fenotipo epitelial. Durante EMT, las células epiteliales pierden sus uniones y la polaridad apical-basal, reorganizan su citoesqueleto, también experimentan un cambio en los programas de señalización que definen la forma celular y reprograman la expresión génica; esto aumenta la motilidad de las células individuales y permite el desarrollo de un fenotipo invasivo (Thiery *et al.*, 2009; Thiery & Sleeman, 2006). EMT es integral para el desarrollo, y los procesos subyacentes se reactivan en la cicatrización de heridas, la fibrosis y la progresión del cáncer (Thiery *et al.*, 2009; Kalluri & Weinberg, 2010; Champman, 2011).

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y la activación del fenotipo mesénquimal implican la sobre-expresión de algunos factores de transcripción, incluyendo Snail, Twist y Zeb. Estas proteínas se unen a la región promotora de los genes asociados con la adhesión célula-célula y reprimen su transcripción, que es el paso clave de inicio de EMT. Snail juega un papel crítico en la regulación de EMT. Snail-1 y Snail-2 se unen al promotor de *CDH1* que codifica para E-cadherina, y reprimir su transcripción (Hansen *et al.*, 2008; Briehner & Yap, 2013). La acumulación de Snail-1 en el núcleo se asocia con una disminución de la abundancia de E-cadherina y la inducción de fenotipos metastásicos en el cáncer de mama (Cavallaro & Christofori, 2004). Se ha reportado que las células tumorales aisladas de pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) metastásico tenían 20 veces más Snail-1 que las células aisladas de pacientes con HCC no metastásico (Lehembre *et al.*, 2008). Snail-2 también tiene un papel bien establecido en la inducción de EMT durante la metástasis del cáncer (Toivola *et al.*, 2005; Yilmaz & Christofori, 2010). Por otro lado, Zeb tienen un papel esencial en el desarrollo de la cresta neural y han atraído un interés sustancial como reguladores de la progresión del cáncer (Xu *et al.*, 2009). Zeb se unen a las cajas E y funcionan como represores transcripcionales y/o activadores, reprimiendo así algunos genes de unión y polaridad epitelial, activando los genes

mesénquimales que definen el fenotipo de la transición epitelio-mesénquima (Peinado *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009).

La EMT se ha demostrado que es un paso crucial en la diseminación y progresión del cáncer, por otro lado, se ha demostrado que un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama es el uso prolongado de estrógenos (Henderson *et al.*, 1988). Existen dos hipótesis actuales para explicar esta relación (Knudson, 1971), la primera hipótesis refiere a que la unión de estrógenos a su receptor (ER) estimula la proliferación de las células mamarias, aumentando la síntesis de ADN, elevando el riesgo de errores durante la replicación, lo que puede dar como resultado las mutaciones perjudiciales que interrumpen los procesos celulares normales, tales como apoptosis, proliferación celular o la reparación del ADN. En la segunda hipótesis, el metabolismo de los estrógenos conduce a la producción de subproductos genotóxico que podría dañar directamente al ADN, lo que resulta en mutaciones puntuales. Hay pruebas de que el estrógeno puede actuar a través de ambos mecanismos para iniciar y/o promover el cáncer mamario (Henderson & Feigelson, 2000; Barclay, 2003)

Receptores a estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas lipofílicas clásicamente asociados a la regulación de la función reproductora femenina. La estrona (E₁), el estradiol (E₂) y el estriol (E₃), son las tres formas de estrógeno sintetizado a partir del colesterol en los ovarios y en menor medida en las glándulas suprarrenales (Petrone *et al.*, 2014).

Los estrógenos regulan una gama de procesos fisiológicos incluidos su papel en la reproducción, el sistema inmunológico, en el sistema nervioso y en el sistema cardiovascular (Edwards, 2005). Además, la señalización de estrógenos juega un papel importante en el cáncer de mama y ovario entre otros tipos de cáncer (Lange *et al.*, 2007). La señalización de estrógenos está mediada al menos por tres receptores, incluidos los receptores nucleares ER α y ER β , y el transmembranal GPER, receptor de siete dominios transmembrana acoplado a una proteína G (GPCR) (Prossnitz *et al.*, 2008). Estos tres receptores pueden mediar eventos de transcripción de genes, ya sea

directamente, como en el caso de ER α y ER β (Edwards, 2005), o indirectamente como en el caso de GPER (Albanito *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2009). ER α , ER β y GPER también puede mediar eventos de señalización rápida a través de la activación de MAPK, PI3K, Src cinasa y vías relacionadas (Lange *et al.*, 2007; Prossnitz *et al.*, 2008). En este trabajo nos centraremos principalmente en el receptor a estrógenos beta (ER β).

La unión de E₂ al receptor a estrógenos β , incrementa la transcripción de genes específicos que contienen en su región promotora elementos de respuesta o responsivos a estrógenos (ERE). Sin embargo, el papel específico que juega el ER β en la fisiología celular se desconoce de manera precisa.

ER β

El receptor a estrógenos β , fue descubierto en 1996 (Kuiper *et al.*, 1996, Mosselman *et al.*, 1996) y se presenta de manera predominante en la mama (Kuiper *et al.*, 1996). El ER β pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y se clasifica como un receptor nuclear de tipo I, ya que reside en el citosol de manera libre, una vez que se une el estrógeno, el complejo ligando-receptor es translocado al núcleo para unirse al ERE contenido en la región promotora de genes específicos y así regular la transcripción. Se han descrito cinco isoformas del ER β : ER β ₁, ER β ₂, ER β ₃, ER β ₄, ER β ₅, siendo la más abundante y ampliamente estudiada la isoforma ER β ₁ (Mosselman *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998). Sin una comprensión global de la singularidad y la similitud funcional de estas isoformas, la importancia biológica de la señalización de ER β sigue siendo incompleta (Leung *et al.*, 2006).

Los ER β tienen una homología con respecto al ER α de aproximadamente 16% en la región N-terminal, 95% en el dominio de unión al ADN, 55% de homología en el dominio de unión al ligando y el 18% de homología está presente en el dominio C-terminal (Kuiper *et al.*, 1996). El dominio de unión al ligando de ER (LBD) está compuesto de 12 α -hélices. El sitio de unión al ligando de ER β difiere en sólo dos posiciones de aminoácidos a la del ER α . Sin embargo, las diferencias de aminoácidos

que no forman parte directamente de la cavidad de unión al ligando, así como el tamaño más pequeño de la cavidad de unión del ER β , pueden contribuir a la identificación de compuestos que muestren la selectividad del receptor (Haldosén *et al.*, 2014). Se han identificado algunos ligandos ER β selectivos, uno de los más estudiados es el diarilpropionitrilo (DPN).

ER β y cáncer

El estrógeno es esencial para el crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias y se ha asociado con la promoción y el crecimiento del cáncer de mama. En el tejido mamario normal, el ER β es el receptor a estrógenos más ampliamente expresado, y se expresa tanto en células luminales como mioepiteliales, así como en algunas células del estroma circundante (Speirs *et al.*, 2002).

La mayoría de los cánceres de mama humanos son inicialmente dependientes de estrógenos y experimentan regresión cuando se les priva de su hormona de soporte (Haldosén *et al.*, 2014). La presencia de cantidades significativas de ER α en el cáncer de mama en el momento del diagnóstico se toma como una indicación de la dependencia hormonal (Huang *et al.*, 2005). Sobre esta base, el tratamiento con compuestos antagonistas al ER α , tales como tamoxifeno es la primera línea para la terapia adyuvante. La introducción de antagonistas de receptores a estrógenos para el tratamiento del cáncer de mama, que responde a las hormonas representa un gran avance en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el ER α no es un marcador perfecto para la capacidad de respuesta a los antiestrógenos, ya que sólo el 70% de los casos ER α positivos responden a tamoxifeno (Haldosén *et al.*, 2014). Es importante destacar que el 30-40% de los pacientes que reciben tratamiento con tamoxifeno eventualmente recaerán. Por lo tanto, la resistencia a la terapia endocrina es un problema clínico importante por lo que es de importancia buscar nuevos blancos farmacológicos.

Los estudios clínicos muestran que, aunque la expresión de ER β disminuye durante la progresión del tumor (Roger *et al.*, 2001, Palmieri *et al.*, 2002 , Speirs *et al.*, 2002 , Koehler *et al.*, 2005 , Zhao *et al.*, 2008), una gran proporción, entre 39 y 77% de todos

los tumores de cáncer de mama coexpresan ambos receptores a estrógenos (Fuqua *et al.*, 2003 , Shaaban *et al.*, 2003 , O'Neill *et al.*, 2004 , Speirs *et al.*, 2004 , Saunders 2006 , Honma *et al.*, 2008 , Novelli *et al.*, 2008 , Shaaban *et al.*, 2008 , Li *et al.*, 2010 una ,Marotti *et al.*, 2010 , Murphy & Leygue 2012 , Powell *et al.*, 2012 , Braun *et al.*, 2013). Por lo tanto, en este tipo de tumores, el ER β puede ser considerado un marcador potencial, que podrían mejorar el uso de la terapia endocrina. Los dominios de unión al ADN de los receptores a estrógenos son altamente conservados y comparten entre 46% y 73% de los sitios de unión a la cromatina (Matthews & Gustafsson 2003), aunque también se han definido distintas regiones de unión para cada receptor (Charn *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 2010, Grober *et al.*, 2011).

Por otro lado, la función del ER β en el cáncer de mama no se ha entendido claramente (Leygue & Murphy 2013), por ejemplo, en los tumores triple negativos, que son los tumores más agresivos y de pobre pronóstico de vida, presentan altos niveles de expresión del ER β (Fuqua *et al.*, 2003). Yi-feng y colaboradores en 2004 en la línea celular MDA-MB 435 observan que al sobre expresar el ER beta, tanto su isoforma beta 1 como su isoforma beta 2 aumenta la capacidad proliferativa de estas células, siendo este efecto es independiente de estradiol (Yi-feng *et al.*, 2004). Guerini y colaboradores en 2005 en células de cáncer de próstata tratadas con metabolito de la dihidrotestosterona el cual bloquea el receptor a estrógenos beta observan una disminución de la capacidad migratoria de las células (Guerini *et al.*, 2005), por su parte Hou y col en 2014 en células de cáncer de endometrio observaron un aumento de la capacidad migratoria e invasiva de estas células al sobre expresar tanto el ER alfa como el beta (Hou *et al.*, 2014). Una serie de estudios realizados sugieren un papel bi-funcional del ER β , un efecto apoptótico (Leygue & Murphy 2013) y un efecto anti-apoptótico (Jonsson *et al.*, 2014). Dejando en claro el potencial papel que pudiera estar realizando el ER β_1 en el desarrollo y progresión del cáncer de mama triple negativo.

JUSTIFICACION.

El cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia en las mujeres adultas a nivel mundial, cada año se detectan 1.38 millones de nuevos casos y fallecen 458 mil, siendo la metástasis la principal causa de muerte. Del 10-20% de los cánceres de mama son triple negativo (ER-, PR-, HER2-) (Lehmann *et al.*, 2011). El tratamiento de pacientes con este subtipo de cáncer de mama ha sido difícil debido a la heterogeneidad de la enfermedad y la ausencia de dianas moleculares bien definidos (Carey *et al.*, 2007; Pegram *et al.*, 1998; Wiggans *et al.*, 1979). Los tumores triple negativos son generalmente más grandes en tamaño y son biológicamente más agresivos (Haffty *et al.*, 2006). Menos del 30% de las mujeres con esta forma de cáncer sobreviven 5 años, y casi todos mueren de la enfermedad a pesar de la quimioterapia adyuvante, que es la base del tratamiento (Dent *et al.*, 2007).

En los tumores triple negativos hay una sobre-expresión del ER- β , por lo que el propósito general del presente proyecto es investigar si la activación selectiva del ER β exacerba el potencial metastásico de las células tumorales triple-negativo MDA-MB 231, y de esta manera poderlo proponer como un nuevo blanco farmacológico para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

HIPÓTESIS.

La activación del receptor a estrógenos β exacerba el potencial metastásico de las células triple negativo MDA-MB 231.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel fisiológico que ejerce el receptor a estrógenos β (ER β) sobre el potencial metastásico en las células de cáncer de mama MDA-MB 231.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto que ejerce la activación del ER β por estradiol (E₂) o un agonista específico (DPN), sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231.
2. Determinar si la presencia de DPN ayuda a mantener el fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231, regulando los niveles de expresión de los factores de transcripción relacionados con la transición epitelio-mesénquima.
3. Investigar si la presencia de PHTPP, antagonista del ER β , es capaz de revertir el fenotipo mesénquimal en las células MDA-MB 231, así como su capacidad proliferativa y migratoria.

MATERIALES Y METODOS.

Cultivo celular de la línea tumoral MDA-MB 231

Las células MDA-MB 231 son una línea celular de cáncer de mama proveniente de adenocarcinoma de mama grado IV. Las células crecen en modalidad de monocapa y fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm² de superficie, con medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico, se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda y una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 7 días se sometieron las células a un proceso de tripsinización, el cual consiste en los siguientes pasos: 1) retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con 5 ml de PBS estéril (contiene NaCl, KCl, KH₂PO₄ Y Na₂HPO₄), 2) adicionar 2ml de una solución de tripsina al 0.25% disuelta en 453mM de EDTA, con el fin de despegar las células del piso del matraz, 3) adicionar al matraz 4 ml de medio de cultivo, y con ayuda de una pipeta serológica despegarlas mecánicamente, la suspensión celular se transfiere a un tubo cónico y se centrifuga a 1,500 rpm por 5 minutos se elimina el sobrenadante y la pastilla celular se resuspende en medio de cultivo fresco, a partir del cual se tomaran alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células para los experimentos realizados en el presente trabajo.

Ensayo de migración en cámaras *transwell* y cierre de herida

Para el ensayo de migración se utilizaron Cámaras Transwell® con membranas de policarbonato y poros de 8 µm de diámetro. Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos bajo condiciones de cultivo estándar, una vez que las células alcanzaron la confluencia requerida se inició el tratamiento con DPN a diferentes concentraciones durante el tiempo establecido. Una vez terminado el periodo de incubación se obtuvo de cada condición experimental una suspensión celular a una concentración final de 3x10⁵ células/ml en medio de cultivo libre de suero. Se agregaron 750 µl de medio de cultivo completo en la parte inferior de la cámara transwell, suplementado con DPN

para mantener la condición experimental, y en la parte superior de la membrana de policarbonato del inserto de la cámara transwell se sembraron 30,000 células en un volumen de 300 μ l. Las células se incubaron a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO₂ por 12 horas. Al finalizar el tiempo, las células que permanecen sobre la membrana del inserto fueron retiradas con un hisopo de algodón. Las células que migran quedaron adheridas en la membrana interna de la membrana del inserto, las cuales fueron fijadas con una solución metanol/acetona (dilución 1:1) durante 20 minutos y teñidas con cristal violeta (0.05%) por 20 minutos. Para poder contar las células se tomaron microfotografías de 5 campos aleatorios con el objetivo 10x en un microscopio de campo claro y una cámara modelo c10 plus Jenoptick empleando el programa pro 2.1, estas se analizaron por medio del programa *Image J*.

Ensayo de proliferación (Conteo celular)

Las células MDA-MB 231 fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron un 40% de confluencia se dio inicio al tratamiento con DPN. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se realizó el recuento celular con un citómetro de flujo portátil (Scepter 2.0).

Experimentos de RT-PCR.

Se evaluaron los niveles de expresión del ARNm que codifica para los siguientes factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima: *SNAIL-1*, *SNAIL-2*, *TWIST*, *ZEB1*.

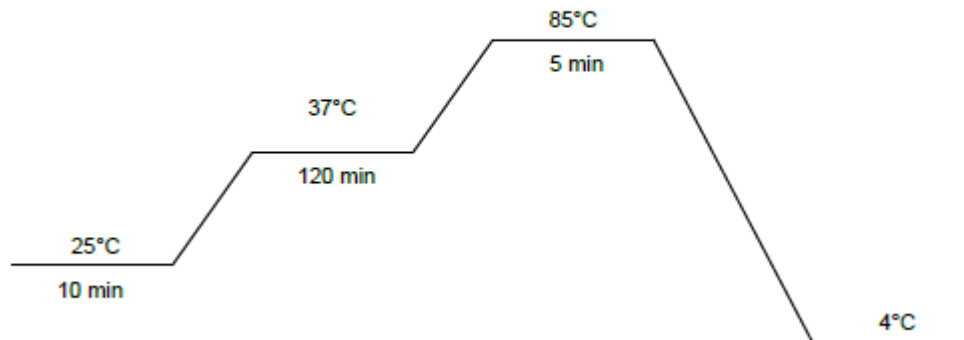
Esta técnica consta de 4 pasos, extracción de ARN total; segundo paso, síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído (transcripción reversa); tercer paso, amplificación del ADNc (reacción en cadena de la polimerasa); y cuarto paso, separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico.

a) Extracción de ARN total.

La extracción de ARN total de las células MDA-MB 231 se llevó a cabo mediante un kit comercial Quick RNA™ Mini-Prep de Zymo Research. Las células MDA-MB 231 fueron sembradas en placas de seis pozos en ausencia y presencia de DPN y de PHTTP. A partir del ARN total extraído se evaluó su calidad y cantidad por espectrofotometría. El ARN total se mantuvo congelado a -20°C para periodos cortos o a -70°C para periodos largos de almacenamiento.

b) Síntesis de ADNc – Transcripción reversa (RT).

La transcripción reversa es el proceso mediante el cual el ARN se utiliza como molde para la síntesis de ADN complementario (ADNc) gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa. Para realizar la síntesis del ADNc se llevó a cabo con $2\ \mu\text{g}$ de ARN procedente de las células MDA-MB 231 utilizando un kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. El proceso se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf) bajo las siguientes condiciones:



c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para amplificar una secuencia de ADN, generando cientos de millones de copias. Se emplea la enzima termoestable Taq polimerasa y una cadena de ADN simple como molde.

La mezcla de reacción se realizó mediante el kit Dream Taq PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific cuyos componentes son: dNTPs, enzima Taq polimerasa, MgCl₂ y una solución buffer. A esta mezcla se adicionaron los oligonucleótidos sentido y anti-sentido para la amplificación específica.

d) Separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico.

La separación de los productos obtenidos (amplicones) se realizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% disuelto en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA). Las condiciones para la corrida electroforética son de 65 V durante 90 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular para ADN para calcular el tamaño aproximado de las bandas obtenidas (1000 pb, DNA Loading Dye Thermo Scientific) La imagen se obtuvo en un fotodocumentador de geles (ChemiDoc, Bio-Rad). La densitometría de las bandas se realizó mediante el software *Image J*.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y gráficos se utilizó el programa Sigma Plot 11.0 (Jandel Corporation, EUA). Se empleó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa *p* deberá ser menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados

17 β -estradiol estimula la proliferación celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231.

Inicialmente, se decidió evaluar si la presencia de 17 β -estradiol estimula la capacidad proliferativa de las células tumorales MDA-MB 231, por lo cual se incubaron las células en presencia de 17 β -estradiol a una concentración de 10 nM durante 48 horas, para el conteo celular se cosecharon las células y con ayuda del citómetro portátil Scepter 2.0 se realizó el conteo celular, observando un aumento significativo en el porcentaje de células mantenidas en presencia de 17 β -estradiol, casi un 20% de incremento con respecto a la condición control (Figura 5A). De manera complementaria, evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, el cual es considerado ampliamente como un marcador nuclear de proliferación celular, observando un incremento del 60% en las células tratadas con 17 β -estradiol en los experimentos de RT-PCR de punto final (Figura 5B). Los resultados de estos experimentos iniciales muestran claramente que la presencia de 17 β -estradiol estimula la proliferación de las células MDA-MB 231.

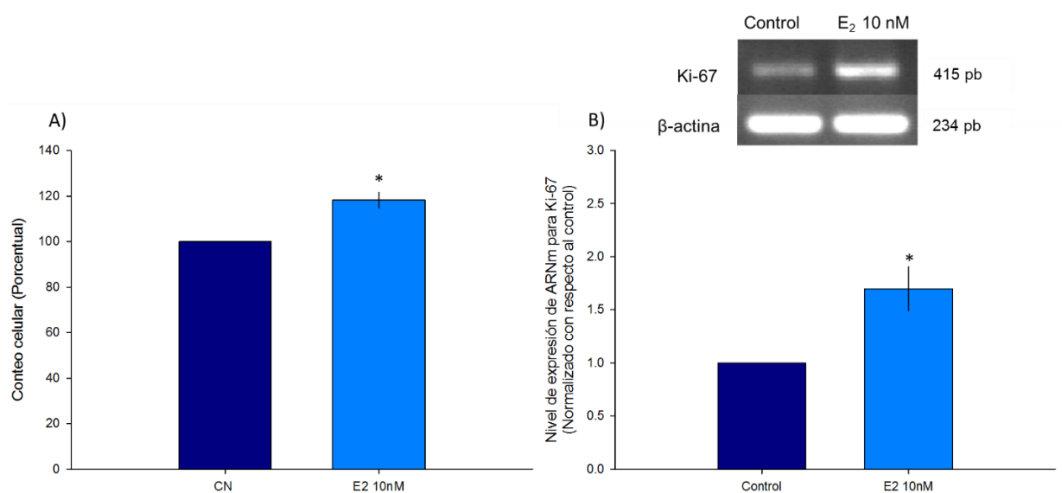


Figura 5. Proliferación celular en células MDA-MB 231 tratadas con E₂: Las células fueron tratadas durante 48 horas con E₂ a una concentración de 10nM. **A)** Se evaluó la capacidad proliferativa de las células mediante un contador de células (scepter 2.0) se observa un incremento significativo en las células tratadas con E₂ de aproximadamente un 20% con respecto al control, n=3. **B)** Se cuantificó el nivel de expresión a nivel de ARNm de Ki-67 como marcador molecular de proliferación, se observa un incremento significativo de aproximadamente un 75% con respecto al control, n=4. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

17 β -estradiol estimula la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231.

Evaluamos a continuación los efectos del 17 β -estradiol sobre la capacidad migratoria en nuestro modelo experimental, para lo cual realizamos un ensayo cualitativo (cierre de herida) y un ensayo cuantitativo (cámara transwell). Para el ensayo de cierre de herida, se observa claramente una disminución del 30% en el área de herida cuando las células MDA-MB 231 fueron mantenidas en presencia de 10 nM de 17 β -estradiol por 48 horas (Figura 6A). El efecto estimulador del 17 β -estradiol sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 se confirma en los ensayos en cámaras transwell, donde se presenta un incremento de 4 veces en el número de células que migran cuando se mantienen en presencia del estrógeno (Figura 6B) con respecto a la condición control. Experimentos previos en el laboratorio muestran que la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 depende al menos parcialmente de la expresión de la subunidad α del canal de sodio Na_v 1.5 (Ruiseco, 2015). Evaluamos de manera preliminar el nivel de expresión del ARNm que codifica para la subunidad Na_v 1.5 en células control y tratadas con 17 β -estradiol por 48 horas. La Figura 6C muestra claramente como el estradiol induce un incremento significativo del 30% en los niveles de expresión del ARNm de la subunidad Na_v 1.5, sugiriendo la participación de estos canales de sodio en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

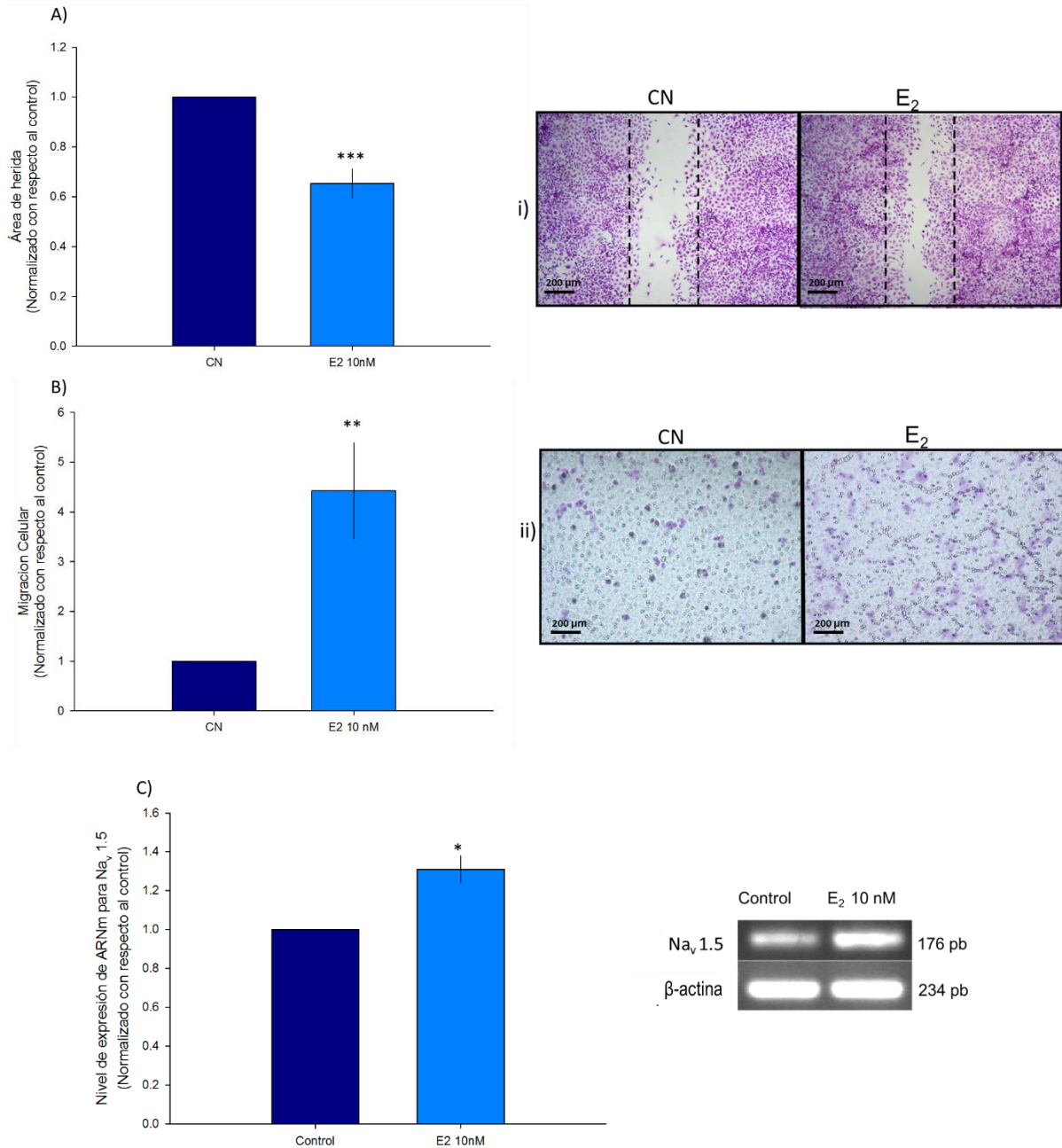


Figura 6. Migración celular en células MDA-MB 231 tratadas con E₂: Las células fueron tratadas durante 48 horas con E₂ a una concentración de 10nM. **A)** Se analizó la capacidad migratoria de la célula mediante la técnica de cierre de herida, se observa una reducción en el área de herida en las células tratadas con E₂, aproximadamente de un 30% con respecto al control. **i)** Imagen representativa obtenida con ayuda de un microscopio con un aumento de 20X sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Mediante la técnica de cierre de herida, donde se observa una disminución de la herida en el grupo tratado con E₂ con respecto al control. **B)** Se evaluó la capacidad migratoria de las células mediante cámaras Tranwell, se observa un incremento significativo en las células tratadas con E₂ de aproximadamente un 4.5 veces con respecto al control, n=3. **ii)** Imágenes representativa de la membrana inferior de la cámara Transwell en donde se visualiza una mayor migración celular con el tratamiento con E₂ comparada con el control. **C)** Se cuantifico el nivel de expresión a nivel de ARNm de Na_v 1.5 como marcador molecular de migración, se observa un incremento significativo de aproximadamente un 30% con respecto al control, n=4. **p*≤0.05, ***p*≤0.01 y ****p*≤0.001

DPN exacerba la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231

Hasta el momento se ha descrito que el 17 β -estradiol estimula la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, sin proponer todavía la vía de señalización responsable, ya que el efecto del estradiol puede estar mediado ya sea por la activación del ER β o del GPER, ya que estas células no expresan el ER α . Para resolver esta incógnita, decidimos emplear un agonista específico para el ER β , el DPN. Decidimos evaluar si la presencia de DPN por 48 horas, tiempo igual al empleado anteriormente con el estradiol, estimula la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231. Las células fueron mantenidas a diferentes concentraciones de DPN, al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas y contadas, observando un efecto dosis-dependiente del DPN sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231. A partir de una concentración de 250 nM de DPN se pueden observar cambios significativos en el número de células, superior al 10% (Figura 7A). El efecto del DPN sobre la proliferación celular, fue complementado con ensayos de RT-PCR de punto final para evaluar los niveles de expresión de ARNm que codifica para Ki-67. En la gráfica de la Figura 7B se observa claramente un efecto dosis-dependiente del DPN sobre el nivel de expresión de Ki-67, observando una diferencia significativa a partir de una baja concentración de DPN, 10nM (45%), alcanzando un valor máximo a partir de 250 nM, 250% de aumento con respecto a la condición control.

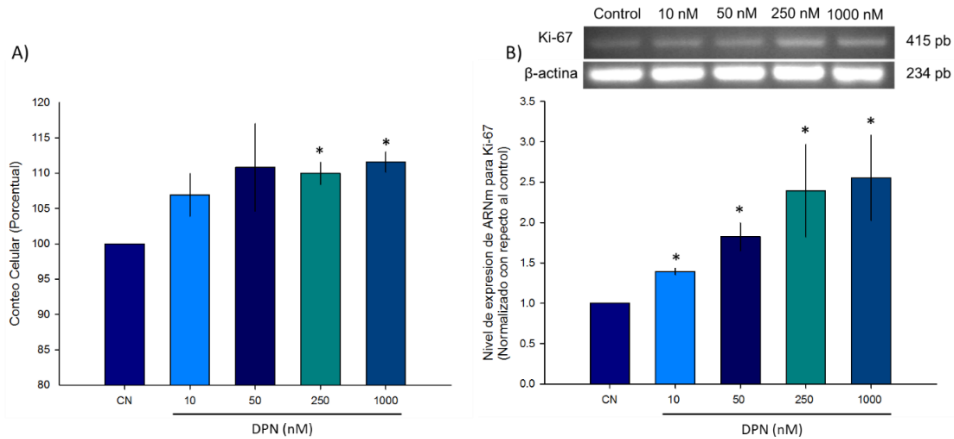


Figura 7. Proliferación celular en células MDA-MB 231 tratadas con DPN: Las células fueron tratadas durante 48 horas con DPN a diferentes concentraciones (10nM, 50nM, 250nM, 1000nM). **A)** Se evaluó la capacidad proliferativa de las células mediante un contador de células (scepter 2.0), se observa un incremento en las células tratadas con DPN obteniendo un aumento significativo en las dosis de 250nM y 1000nM de aproximadamente un 12% con respecto al control, n=3. **B)** Se cuantifico el nivel de expresión a nivel de ARNm de Ki-67 como marcador molecular de proliferación, se observa un incremento significativo dosis dependiente de DPN con respecto al control, n=4. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

DPN estimula la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231.

El siguiente paso fue investigar, si el DPN además de estimular la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, afecta en el mismo sentido la capacidad migratoria. Para ello evaluamos el área de herida y las células que migran en una cámara transwell en presencia y ausencia de DPN. El tratamiento con DPN a diferentes concentraciones por 48 horas disminuye significativamente el área de la herida de manera dosis dependiente con respecto al control (10 nM (23%), 50 nM (35%), 250 nM (50%) y 1000 nM (60%), lo que se traduce en una mayor capacidad migratoria de estas células (Figura 8A). Al realizar el conteo celular de las células que migran en las cámaras transwell se observa un resultado similar (Figura 8B). A partir de 10 nM hay un incremento del 35%, mientras que a 50 nM hay un aumento del 100%, el cual se mantiene más o menos constante a concentraciones mayores de DPN, 250 y 1000 nM. Posteriormente, evaluamos el nivel de expresión a nivel de ARNm que codifica para la subunidad $Na_v 1.5$, observando un incremento significativo en su nivel de expresión y que este era dependiente de la concentración empleada (Figura 8C). Estos resultados sugieren que el efecto reportado por el 17β -estradiol sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231 es mediado por la activación del ER β .

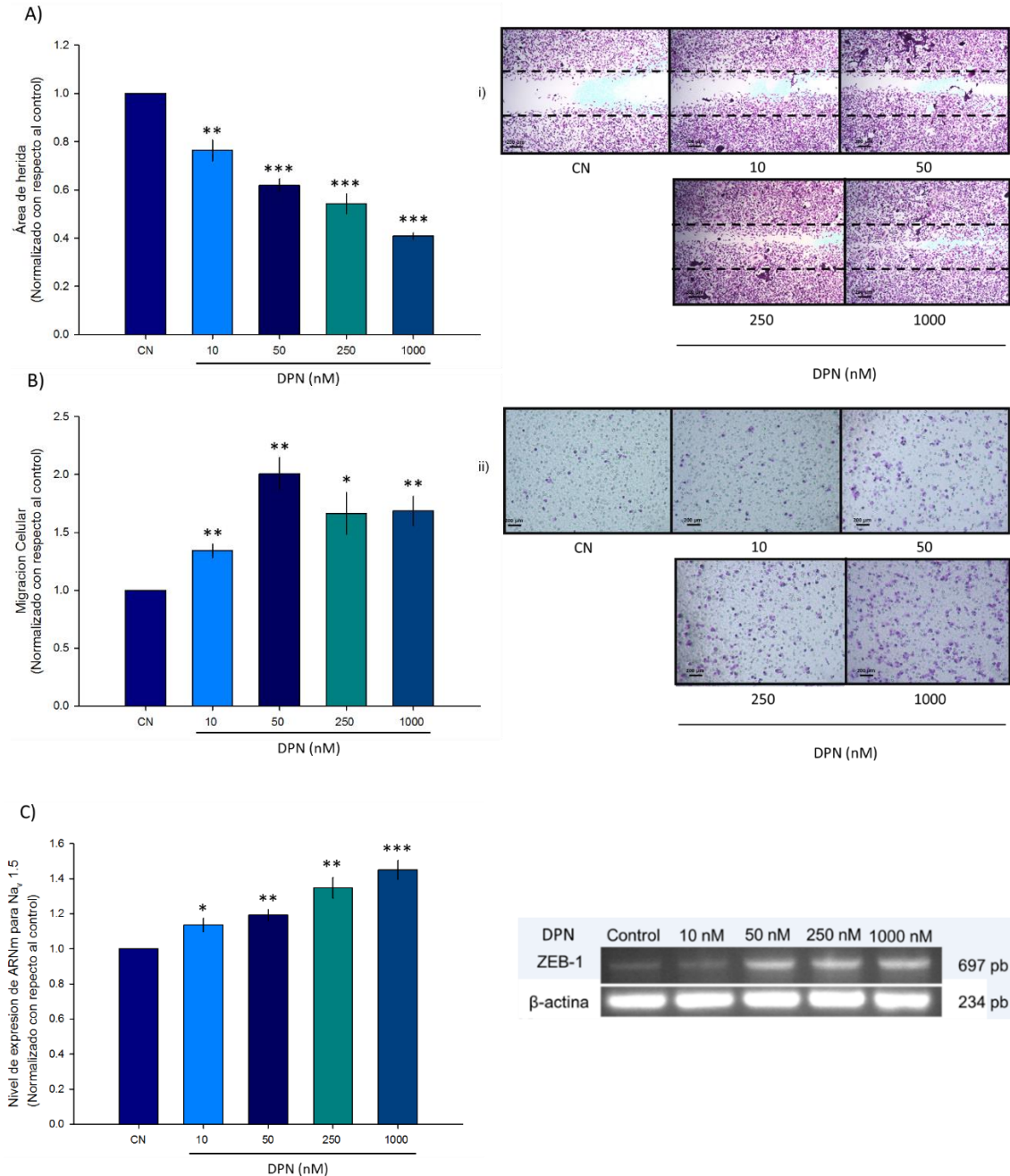


Figura 8. Migración celular en células MDA-MB 231 tratadas con DPN: Las células fueron tratadas durante 48 horas con DPN a diferentes concentraciones (10nM, 50nM, 250nM y 1000nM). **A)** Se analizó la capacidad migratoria de la célula mediante la técnica de cierre de herida se observa una reducción significativa de manera dosis respuesta en el área de herida en las células tratadas con DPN con respecto al control. **a)** Imágenes representativas obtenidas con ayuda de un microscopio con un aumento de 20X sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 mediante la técnica de cierre de herida donde se observa una disminución del área de herida en los grupos tratados con DPN de manera dosis respuesta con respecto al control. **B)** Se evaluó la capacidad migratoria de las células mediante cámaras Tranwell, se observa un incremento significativo en las células tratadas con DPN con respecto al control, n=3. **b)** Imágenes representativas de la membrana inferior de la cámara Transwell en donde se visualiza una mayor migración celular con el tratamiento con DPN comparada con el control. **C)** Se cuantificó el nivel de expresión a nivel de ARNm de Na_v 1.5 como marcador molecular de migración, se observa un incremento significativo dosis dependiente con respecto al control, n=4. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

PHTPP antagonista del ER β disminuye la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB 231.

Con el fin de corroborar si el ER β participa en la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231, evaluamos el efecto que ejerce un antagonista específico para este receptor, el PHTPP, sobre dichas capacidades. Las células fueron mantenidas en la presencia de 5 nM de PHTPP por 48 horas, observando que hay una disminución significativa tanto en el número de células (Figura 9A) como en el nivel de expresión de Ki-67 (Figura 9B).

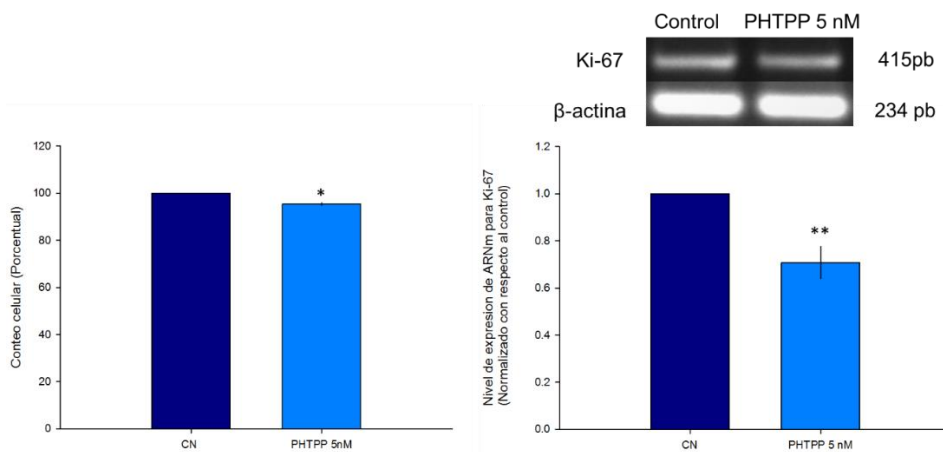


Figura 9. Proliferación celular en células MDA-MB 231 tratadas con PHTPP: Las células fueron tratadas durante 48 horas con PHTPP a una concentración de 10nM. **A)** Se evaluó la capacidad proliferativa de la células mediante un contador de células (scepter 2.0), se observa una disminución significativa en las células tratadas con PHTPP de aproximadamente un 7% con respecto al control, n=3 **B)** Se cuantificó el nivel de expresión a nivel de ARNm de Ki-67 como marcador molecular de proliferación, se observa una disminución significativa de aproximadamente un 30% con respecto al control, n=4. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

PHTPP disminuye la migración celular de la línea celular tumoral MDA-MB 231.

La segunda parte de la evaluación del efecto del PHTPP incluye analizar el área de herida en células tratadas con este antagonista y células control. El tratamiento con 5 nM de PHTPP por 48 horas impide el cierre de herida aproximadamente un 15% con respecto a la condición control (Figura 10A), lo que se traduce como una reducción en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Experimentos de migración en cámaras transwell nos permitió corroborar cuantitativamente el efecto de PHTPP sobre

la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, ya que se observa una disminución del 53% con respecto a la condición control (Figura 10B). Esta reducción en la capacidad migratoria de las células se ve acompañada por una disminución del 18% en el nivel de expresión del ARNm que codifica para la subunidad $Na_v 1.5$ (Figura 10C). Los resultados obtenidos con el DPN y PHTTP dejan en claro la participación del $ER\beta$ tanto en la capacidad proliferativa como en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

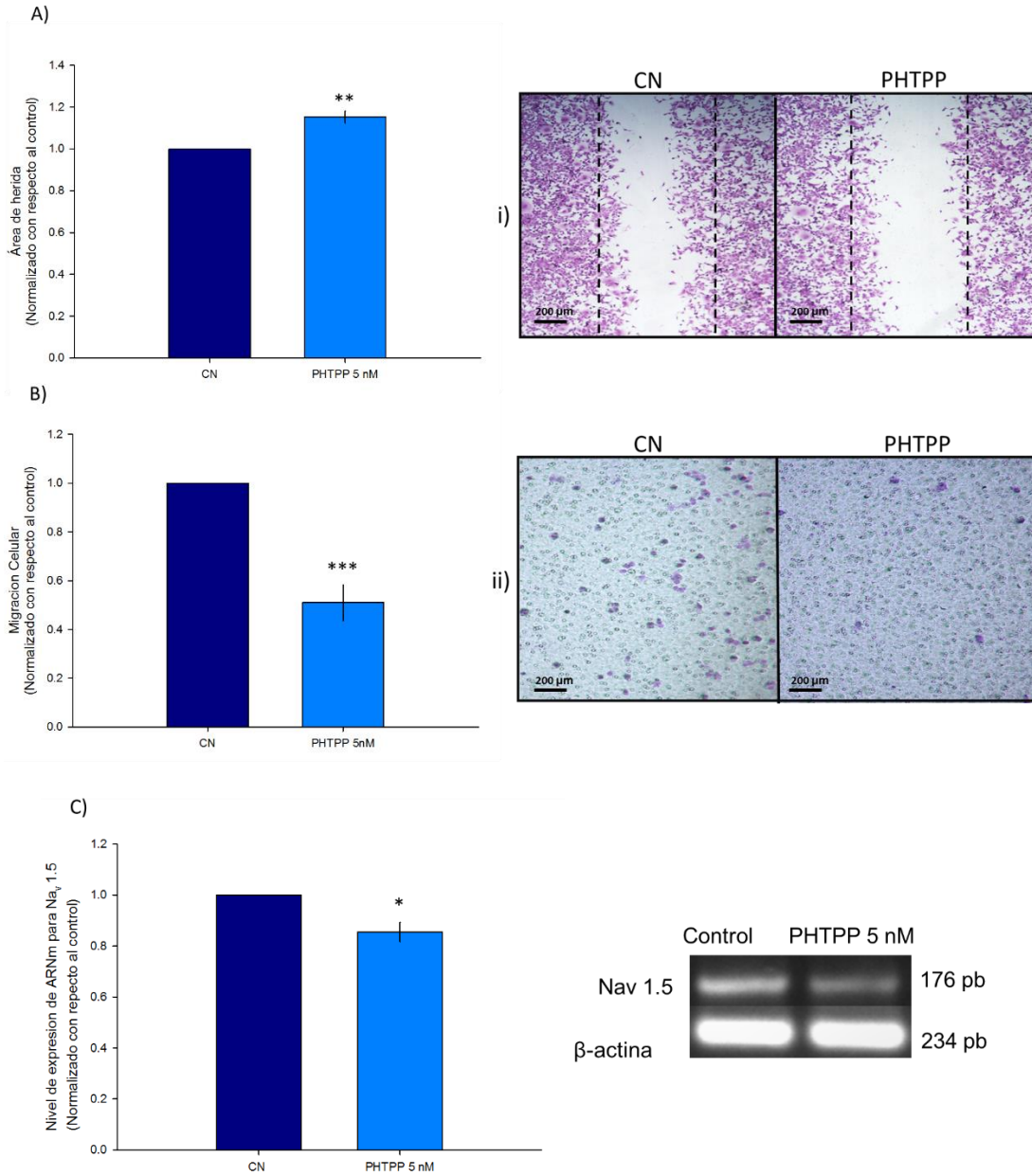


Figura 10. Migración celular en células MDA-MB 231 tratadas con PHTPP: Las células fueron tratadas durante 48 horas con PHTPP a una concentración de 5nM. **A)** Se analizó la capacidad migratoria de la célula mediante la técnica de cierre de herida, se observa que el tratamiento con PHTPP impide el cierre de herida en las células MDA-MB 231 con respecto al control. **a)** Imágenes representativas obtenidas con ayuda de un microscopio con un aumento de 20X sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 mediante la técnica de cierre de herida, donde se observa un incremento del área de herida en los grupos tratados con PHTPP con respecto al control. **B)** Se evaluó la capacidad migratoria de las células mediante cámaras Tranwell, se observa una disminución significativa de la capacidad migratoria de las células tratadas con PHTPP con respecto al control, n=3. **b)** Imágenes representativas de la membrana inferior de la cámara Transwell en donde se visualiza una menor migración celular en las células tratadas con PHTPP comparada con el control. **C)** Se cuantificó el nivel de expresión a nivel de ARNm de Nav_v 1.5 como marcador molecular de migración, se observa una disminución significativa en las células tratadas con PHTPP con respecto al control, n=4. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

La activación del ER β ayuda a mantener el fenotipo mesénquimal de la línea celular MDA-MB 231.

Es un hecho que las células con alto potencial metastásico, se caracterizan por presentar un fenotipo mesénquimal, el cual es determinado por la expresión de diferentes factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima tales como SNAIL-1, SNAIL-2, y ZEB-1 entre otros. Decidimos investigar si el 17 β -estradiol a través de la activación del ER β ayuda a mantener el fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231 influyendo positivamente sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para cualquiera de los tres factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima: SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1.

Las células MDA-MB 231 al ser mantenidas en presencia de 17 β -estradiol por 48 horas muestran un incremento significativo y diferencial en los niveles de expresión del ARNm que codifica para SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB1 (Figura 11). Por ejemplo, para Snail-1 se observa un aumento significativo de aproximadamente un 380% con respecto a la condición control (Figura 11A), para SNAIL-2 el incremento es menor, aproximadamente 35% (Figura 11B) y para ZEB-1 el cambio es aún más modesto de solamente el 18% con respecto a la condición control (Figura 11C).

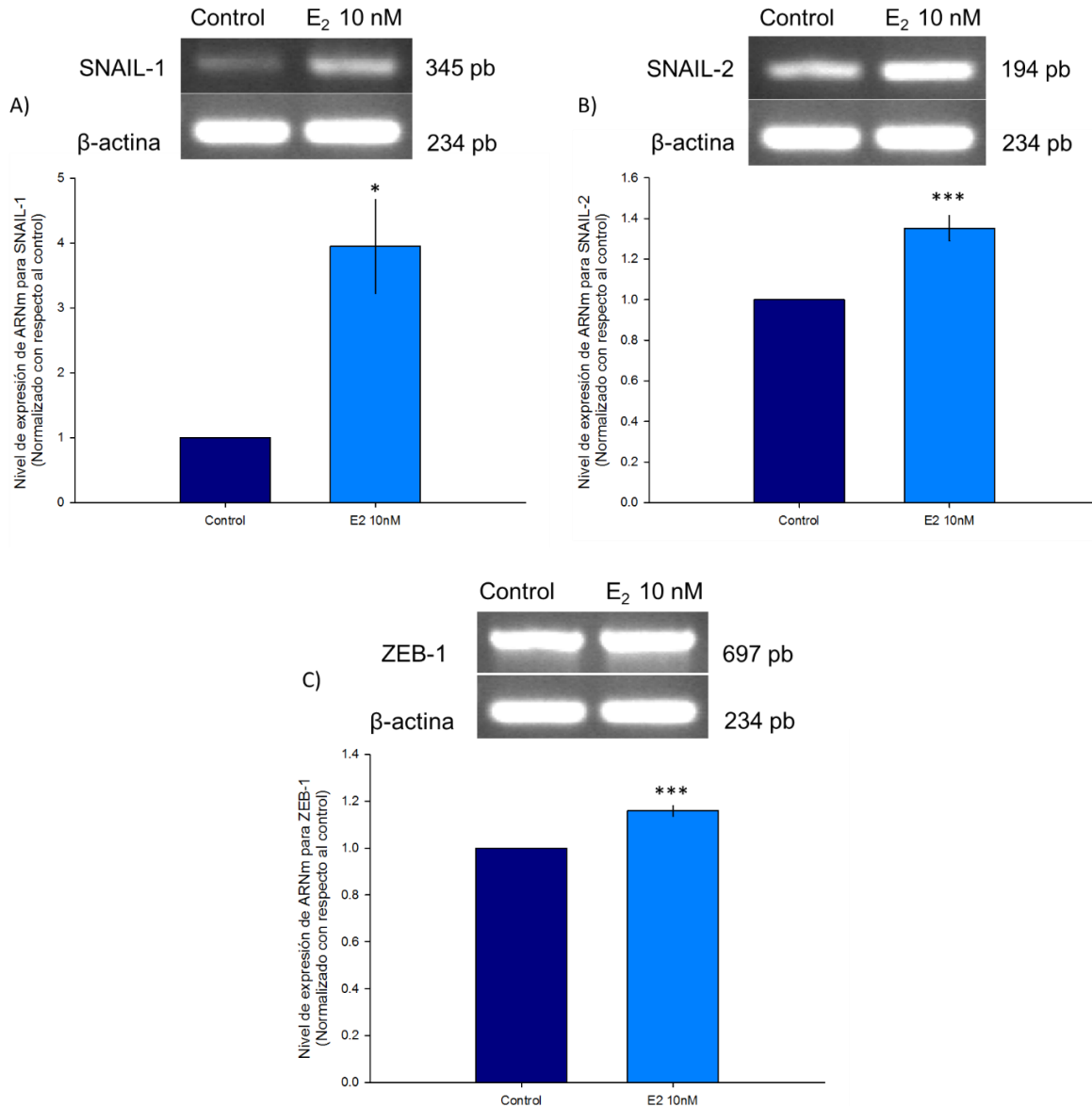


Figura 11. Nivel de expresión de ARNm que codifica para factores de transcripción asociados con el fenotipo mesénquimal en células MDA-MB 231 tratadas con E₂: Las células fueron tratadas durante 48 horas con E₂ a una concentración de 10nM se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. **A)** Se evaluó la expresión de SNAIL-1, se observa un incremento significativo en las células tratadas con E₂ de aproximadamente un 4 veces más con respecto al control, n=4 **B)** Se cuantifico el nivel de expresión de SNAIL-2, se observa un incremento significativo de aproximadamente un 35% con respecto al control, n=4. **C)** Se analizó la expresión de ZEB-1, Se observa un aumento significativo de un 18% de las células tratadas con respecto al control n=3. ** $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

El efecto observado por 17 β -estradiol es completamente mimetizado por DPN, agonista selectivo del ER β , apoyando la participación de este receptor en el mantenimiento del fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231 (Figura 12).

La presencia de DPN induce un incremento significativo dosis-dependiente en los tres factores de transcripción asociado con la transición epitelio-mesénquima. En el caso de SNAIL-1, que es donde se observa el mayor efecto estimulador, se alcanza un valor máximo de 400% con respecto a la condición control a la concentración de 1,000 nM de DPN (Figura 12A), y para SNAIL-2 y ZEB-1, a la misma concentración de DPN, se alcanzan valores máximos de 170 y 190% respectivamente (Figura 12B y Figura 12C).

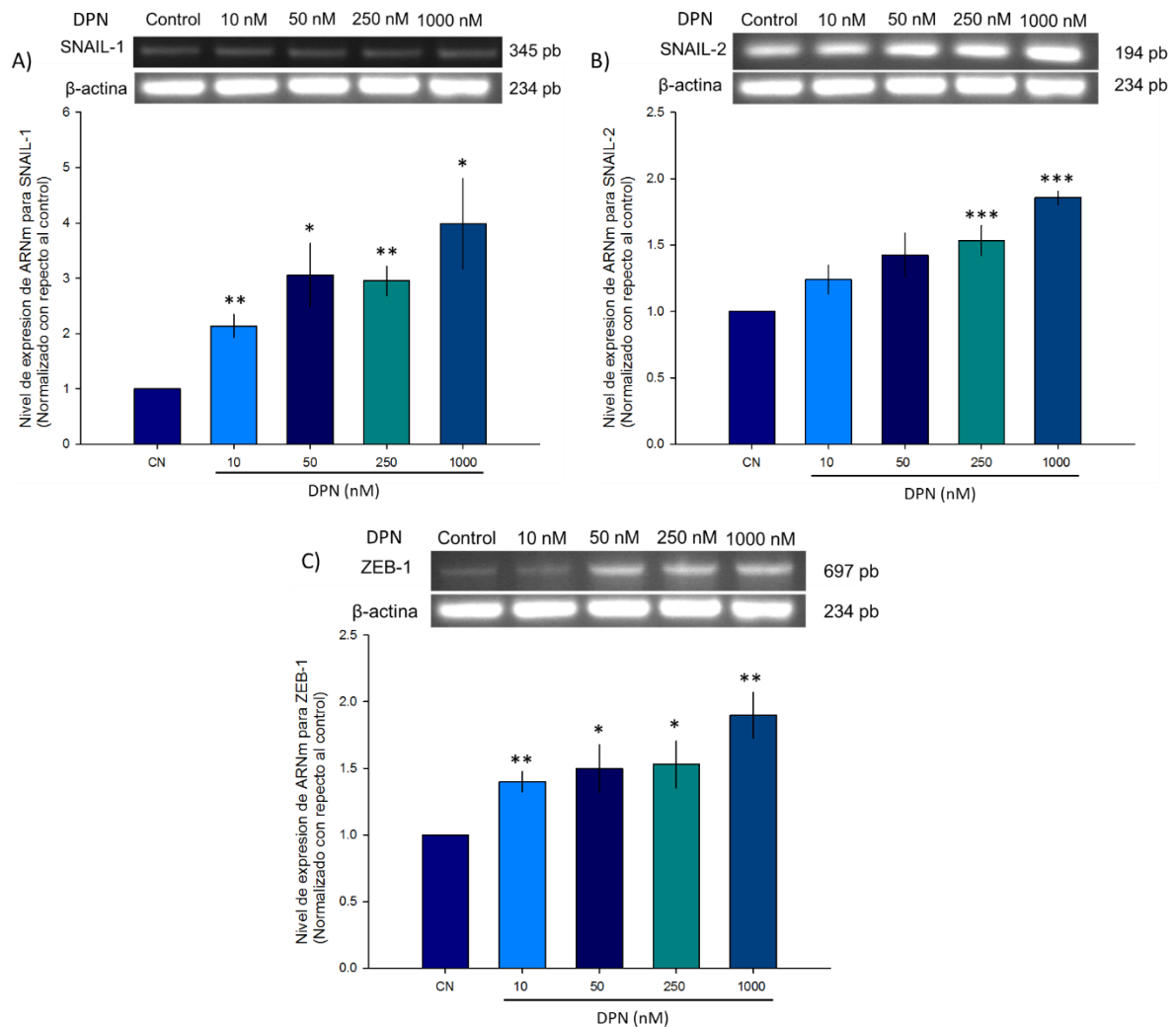


Figura 12. Nivel de expresión de ARNm que codifica para factores de transcripción asociados con el fenotipo mesénquimal en células MDA-MB 231 tratadas con DPN: Las células fueron tratadas durante 48 horas con DPN a diferentes concentraciones (10nM, 50nM, 250nM y 1000nM). Se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. **A)** Se evaluó la expresión de SNAIL-1, se observa un incremento significativo en las células tratadas con DPN de aproximadamente un 4 veces más con respecto al control, n=4 **B)** Se cuantificó el nivel de expresión de SNAIL-2, se observa un incremento significativo de aproximadamente un 35% con respecto al control, n=4. **C)** Se analizó la expresión de ZEB-1, Se observa un aumento significativo de un 18% de las células tratadas con respecto al control n=3. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

De manera complementaria, evaluamos el efecto de PHTPP sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para los tres factores de transcripción: SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1 en las células MDA-MB 231. Al bloquear la activación del ER β con PHTPP se observa una disminución significativa en los niveles de expresión de los tres factores de transcripción asociado con la transición epitelio mesénquima. Para el caso de SNAIL-1 se presenta una reducción del 25% con respecto a la condición control (Figura 13A), para SNAIL-2 la reducción es del 20% (Figura 13B) y para ZEB-1 es del 15% (Figura 13C). El análisis estadístico muestra que estos cambios son estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran por vez primera que la activación del ER β influye positivamente en el potencial metastásico de las células MDA-MB 231, analizando de manera particular su capacidad proliferativa y su capacidad migratoria.

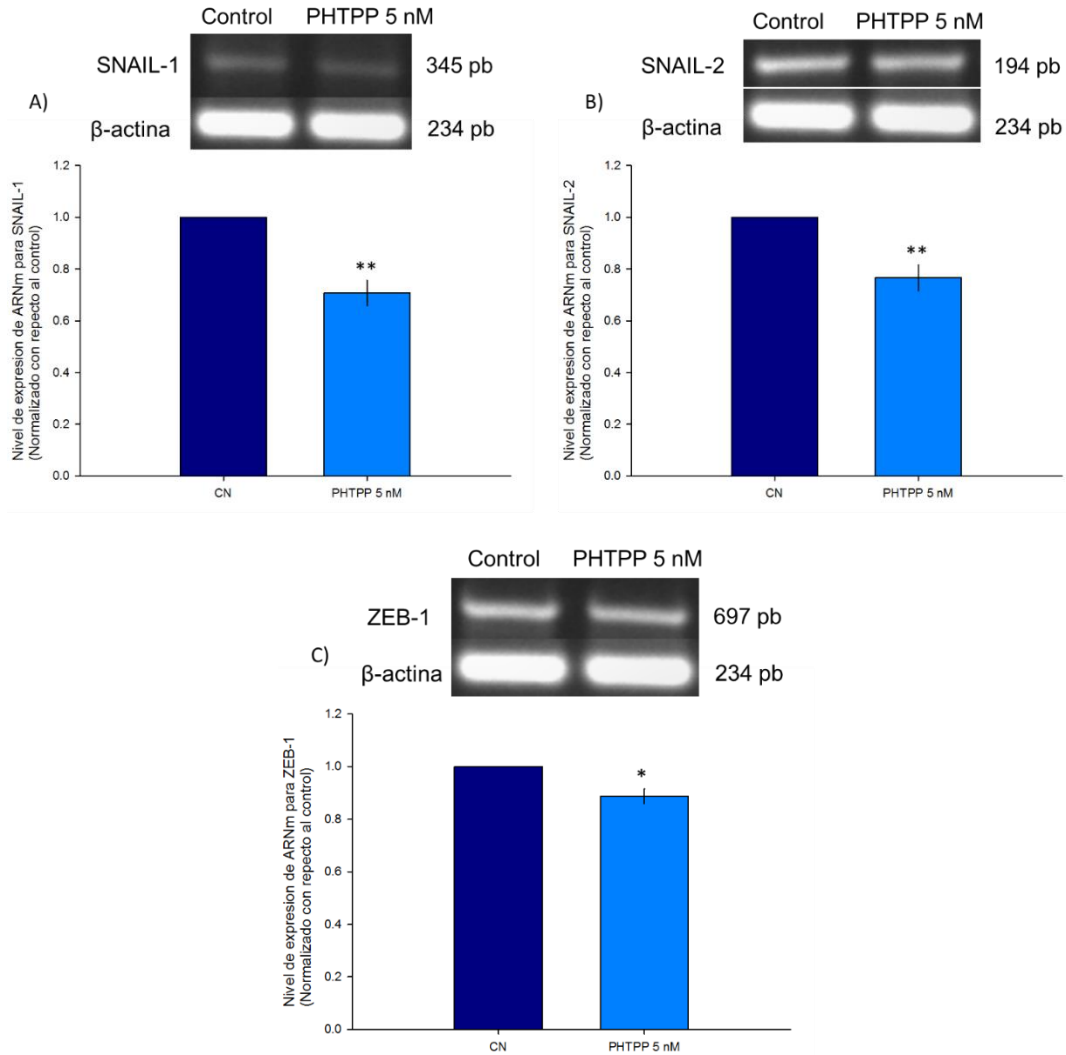


Figura 13. Nivel de expresión de ARNm que codifica para factores de transcripción asociados con el fenotipo mesénquimal en células MDA-MB 231 tratadas con PHTPP: Las células fueron tratadas durante 48 horas con PHTPP a una concentración de 10nM se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. **A)** Se evaluó la expresión de SNAIL-1, se observa un incremento significativo en las células tratadas con PHTPP de aproximadamente un 4 veces más con respecto al control, n=4 **B)** Se cuantifico el nivel de expresión de SNAIL-2, se observa un incremento significativo de aproximadamente un 35% con respecto al control, n=4. **C)** Se analizó la expresión de ZEB-1, Se observa un aumento significativo de un 18% de las células tratadas con respecto al control n=3. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

Discusión.

El cáncer de mama se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es el cáncer de mayor incidencia en mujeres adultas y la segunda causa de muerte en esta población. Aproximadamente del 10 al 20% de los cánceres de mama diagnosticados no expresan tres receptores de membrana característicos de las células epiteliales normales de mama, como son el ER α , EP y HER2, por lo que se le ha denominado cáncer de mama triple negativo (Lehmann *et al.*, 2011). La metástasis es la condición más agresiva del cáncer, ya que menos del 22% de las mujeres con cáncer de mama metastásico sobreviven más de 5 años (ACS, 2008). El cáncer de mama triple negativo presenta el fenotipo más agresivo y el peor pronóstico de vida para los pacientes, debido a la alta propensión a la metástasis y la ausencia de tratamientos dirigidos específicos. Recientemente se ha observado una sobreexpresión del ER β en los tumores triple negativo, sin conocerse a detalle su relevancia fisiológica, por lo que el propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto que ejerce la activación del ER β sobre el potencial metastásico en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB 231.

El ER β está presente entre el 50 y el 80% de los tumores y líneas celulares triple negativo (Shanle *et al.*, 2013; Chen & Russo, 2009; Wisinski *et al.*, 2016). Experimentos iniciales realizados de RT-PCR confirmaron que nuestro modelo experimental, las células MDA-MB 231 expresa el ARN que codifica para este receptor. Durante el desarrollo y progresión del cáncer, las células incrementan su capacidad proliferativa de manera significativa al reducirse la presencia y la capacidad de respuesta a las moléculas supresoras de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011). En la actualidad existe un gran debate acerca del papel que juega el ER β en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, algunos estudios sostienen que la activación y/o expresión del ER β disminuye la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama (Rizza *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2001; Paruthiyil *et al.*, 2004; Reese *et al.*, 2014), mientras que otros estudios muestran el efecto contrario, es decir, la activación del ER β aumenta la proliferación de manera significativa en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (Yi-Feng *et al.*, 2004; Tonetti *et al.*, 2003). Bajo nuestras condiciones experimentales, observamos que la presencia tanto de E₂ como de DPN

(agonista selectivo para ER β) aumentan de manera significativa la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, tanto en el conteo celular como en la expresión del marcador nuclear de proliferación, Ki-67. El efecto de DPN sobre la proliferación celular es dosis-dependiente, nuestros resultados coinciden con los reportados por Yi-Feng y colaboradores en el 2004.

La migración celular es una propiedad fundamental en casi todas las células animales, diversos procesos fisiológicos dependen de ella, tales como el desarrollo embrionario, vascularización, formación de tejidos, reparación de heridas, respuesta inmune, con el fin de mantener la homeostasis del organismo (Rorth, 2009). La migración celular, por otro lado, también participa en procesos patofisiológicos como es la metástasis de las células tumorales, que van del tejido de origen a un tejido u órgano distal.

El efecto que ejerce la activación del ER β en la migración celular depende del tipo celular que este bajo estudio, por ejemplo, Guerini en el 2005 y Piccolella en el 2014, reportaron que la activación del ER β mediante un metabolito de la dihidrotestosterona reduce la capacidad migratoria de células de cáncer de próstata (Guerini *et al.*, 2005; Piccolella *et al.*, 2014); Hou y colaboradores en el 2014, observaron un aumento en la capacidad migratoria de células de cáncer de endometrio al haber una sobre-expresión del ER β (Hou *et al.*, 2014); Piperigkou y colaboradores en el 2016, por su parte, mostraron que una disminución en la expresión del ER β en células de cáncer de mama, disminuye significativamente su capacidad migratoria (Piperigkou *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos, tanto de cierre de herida como en cámaras transwell, muestran claramente que la activación del ER β ya sea con E₂ o con DPN, exacerba de manera significativa la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

Recientemente se ha detectado en las células MDA-MB 231 la expresión funcional de la subunidad α del canal Nav 1.5 mediante la técnica de *patch clamp*, siendo esta isoforma ampliamente expresada cuando se compara con una línea celular de bajo potencial metastásico, MCF-7 (Fraser *et al.*, 2005). Se ha considerado un rasgo clásico en la progresión tumoral la sobre-expresión del ARNm que codifica para Nav1.5, asociándolo con la capacidad migratoria de las células cancerosas (Onkal & Djamgoz,

2009; Gao *et al.*, 2010). Basado en estas evidencias, decidimos investigar si el incremento observado en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 cuando es activado el ER β , es acompañado por un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para el canal de sodio Nav 1.5. Los resultados obtenidos por RT-PCR muestran que efectivamente, la activación del ER β estimula la expresión del ARNm de dicho canal, asociándolo positivamente con su capacidad migratoria, ya que otros experimentos muestran que al inhibir estos canales con 10 μ M de TTX, se ve reducida de manera significativa la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 (Fernández-Gallardo *et al.*, 2016).

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia Snail, participan de manera significativa en el desarrollo, progresión y metástasis del tumor. Esta familia de factores de transcripción reprime la expresión de E-Cadherina, principal marcador del fenotipo epitelial (Craene *et al.*, 2005). La inducción de la expresión de esta familia de factores ha sido asociada a factores de crecimiento como FGF (Ciruna *et al.*, 2001), TGF β (Valdés F *et al.*, 2002) y EGF por medio de la activación de Src y Ras (Craene *et al.*, 2005), mientras que la expresión del factor de transcripción Twist es inducida por los factores de crecimiento HRG, IGF, EGF, HGF y PDGF (Kim *et al.*, 2011).

Nuestros resultados muestran que la activación de ER β induce un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1 en las células MDA-MB 231, sin observarse cambios significativos en la expresión de TWIST, el cual se ha visto asociado a la capacidad migratoria de otros modelos tumorales, por ejemplo, en próstata (Kwok *et al.*, 2005), útero (Kyo *et al.*, 2006) y células MDA-MB 468 (Lo *et al.*, 2007). Nuestros datos son apoyados por Piperigkou y colaboradores, quienes observaron que la activación del ER β induce un aumento en la expresión de marcadores mesénquimales (Piperigkou *et al.*, 2016). Cualquiera de los factores de transcripción asociados a la EMT reprime la expresión de E-cadherina, reduciendo la expresión de marcadores de fenotipo epitelial y favoreciendo la expresión de marcadores de fenotipo mesénquimal. Se ha reportado recientemente que Twist, además, estimula la expresión de Snail-2, lo cual de alguna manera pudiera sugerir la existencia de un sistema de retroalimentación positiva para

mantener el fenotipo mesénquimal y asegurar la capacidad migratoria de las células tumorales.

En nuestras condiciones experimentales observamos que cuando las células MDA-MB 231 son mantenidas en presencia de un antagonista selectivo del ER β (PHTPP), se presenta una reducción significativa en su potencial metastásico. La capacidad proliferativa de las células, tanto en el conteo celular como en los niveles de expresión del marcador nuclear, Ki-67 se ve disminuida. Esta observación fue igualmente observada por Lombardi y colaboradores en 2016, quienes evaluaron la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231 por ensayos de MTT (Lombardi *et al.*, 2016). Con respecto a la capacidad migratoria, se observa un fenómeno similar, el bloqueo del ER β la reduce de manera significativa la migración. Hsu y colaboradores en el 2013 observan una reducción en la capacidad proliferativa y la capacidad invasiva en células de cáncer de vejiga tratadas con PHTPP de manera dosis dependiente (Hsu *et al.*, 2013). Mientras que Yan y colaboradores en 2015, no observaron ningún cambio en la capacidad migratoria de células tumorales de ovario (Yan *et al.*, 2015).

La reducción en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 cuando son expuestas crónicamente al bloqueador del ER β (PHTPP) va acompañada por una disminución significativa en los niveles de expresión del ARNm que codifica para el Nav 1.5 y los factores de transcripción asociados al fenotipo mesénquimal (SNAIL-1, SNAIL-2 y ZEB-1). Esta es la primera vez que se reporta en la literatura la probable participación del ER β en el mantenimiento del fenotipo mesénquimal de las células de cáncer de mama triple negativo.

Los resultados presentados en el trabajo, sugieren al ER β como un probable y novedoso blanco farmacológico para el tratamiento efectivo del cáncer de mama triple negativo, así como la identificación de los elementos moleculares responsables de la capacidad metastásica de las células tumorales, representa una excelente oportunidad para el uso de antagonistas específicos que inhiban o reduzcan de manera efectiva dicha capacidad, asegurando con esto un mejor pronóstico de vida de los pacientes afectados por cáncer de mama.

CONCLUSIÓN.

1. El 17β -estradiol (E_2) estimula la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.
2. El efecto del 17β - estradiol es mediado por la activación del $ER\beta$.
3. La activación del $ER\beta$, ayuda a mantener el fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231, favoreciendo su capacidad migratoria.

BIBLIOGRAFÍA.

- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., ... & Maggiolini, M. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer research*, 67(4), 1859-1866.
- Alteri, R. Bertaut, T. Brinton, L. Fedewa, S. Freedman, R. Gansler, T. Gaudet, M., ... & Xu, J. (2016) Breast cancer: Facts & Figures 2015-2016. *American Cancer Society*, 1-44.
- American Cancer Society. (2008). *Cancer facts & figures*. The Society.
- Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., ... & Tomiak, E. (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497-506.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., ... & Pasini, B. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.
- Barclay, L. (2003). More evidence linking estrogen plus progestin therapy to breast cancer. *JAMA*, 289, 3243-53.
- Beral, V., Reeves, G., Bull, D., Green, J., & Million Women Study Collaborators. (2011). Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), 296-305.
- Braun, L., Mietzsch, F., Seibold, P., Schneeweiss, A., Schirmacher, P., Chang-Claude, J., ... & Aulmann, S. (2013). Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling—prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Modern Pathology*, 26(9), 1161-1171.
- Brieher, W. M., & Yap, A. S. (2013). Cadherin junctions and their cytoskeleton (s). *Current opinion in cell biology*, 25(1), 39-46.
- Brinton, L. A., Daling, J. R., Liff, J. M., Schoenberg, J. B., Malone, K. E., Stanford, J. L., ... & Hoover, R. N. (1995). Oral contraceptives and breast cancer risk among younger women. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(11), 827-835.
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., ... & Perou, C. M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2329-2334.
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., ... & Deming, S. L. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 295(21), 2492-2502.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(2), 118.

Chapman, H. A. (2011). Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annual review of physiology*, 73, 413-435.

Charn, T. H., Liu, E. T. B., Chang, E. C., Lee, Y. K., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (2010). Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors α and β : mutual restriction and competitive site selection. *Molecular endocrinology*, 24(1), 47-59.

Chen, J. Q., & Russo, J. (2009). ER α -negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(2), 162-175.

Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (2011). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama*, 306(17), 1884-1890.

Chlebowski, R. T., & Anderson, G. L. (2011). The Influence of Time From Menopause and Mammography on Hormone Therapy-Related Breast Cancer Risk Assessment.

Chlebowski, R. T., Manson, J. E., Anderson, G. L., Cauley, J. A., Aragaki, A. K., Stefanick, M. L., ... & Qi, L. (2013). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(8), 526-535.

Ciruna B., Rossant J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*, 1, 37-49.

Copeland G, Lake A, Firth R, et al. (2015). Volume Two: Registry-specific Cancer Incidence for the United States, Canada and North America. Springfield, IL: Nor

Craene B., Roy F., Berx G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cellular Signalling* 17, 535-547.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429-4434.

DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., ... & Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(4), 252-271.

Dossus, L., Boutron-Ruault, M. C., Kaaks, R., Gram, I. T., Vilier, A., Fervers, B., ... & Chang-Claude, J. (2014). Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. *International journal of cancer*, 134(8), 1871-1888.

Edwards, D. P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 335-376.

Feng, Y., Manka, D., Wagner, K. U., & Khan, S. A. (2007). Estrogen receptor- α expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14718-14723.

Fernandez-Gallardo M, González-Ramírez R, Sandoval A, Felix R, Monjaraz E. (2016). Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* 11:e0167445.

- Fisher, B., Redmond, C., Legault-Poisson, S., Dimitrov, N. V., Brown, A. M., Wickerham, D. L., ... & Glass, A. G. (1990). Postoperative chemotherapy and tamoxifen compared with tamoxifen alone in the treatment of positive-node breast cancer patients aged 50 years and older with tumors responsive to tamoxifen: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-16. *Journal of Clinical Oncology*, *8*(6), 1005-1018.
- Fraser SP., Diss JK., Chioni AM., Mycielska ME., Pan H., Yamaci RF., et al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* *11*: 5381–5389.
- Fuqua, S. A., Schiff, R., Parra, I., Moore, J. T., Mohsin, S. K., Osborne, C. K., ... & Allred, D. C. (2003). Estrogen Receptor β Protein in Human Breast Cancer Correlation with Clinical Tumor Parameters. *Cancer research*, *63*(10), 2434-2439.
- Gabai-Kapara, E., Lahad, A., Kaufman, B., Friedman, E., Segev, S., Renbaum, P., ... & Mandell, J. B. (2014). Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(39), 14205-14210.
- Gao R., Shen Y., Cai J., Lei M., Wang Z. (2010). Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* *23*: 1293–1299.
- Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., Schulte-Hermann, R., Foisner, R., Beug, H., & Mikulits, W. (2004). Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *566*(1), 9-20.
- Grober, O. M., Mutarelli, M., Giurato, G., Ravo, M., Cicatiello, L., De Filippo, M. R., ... & Tarallo, R. (2011). Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC genomics*, *12*(1), 1.
- Guerini, V., Sau, D., Rusmini, P., Ciana, P., Maggi, A., Martini, P. G., & Poletti, A. (2005). The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol (3beta-Adiol) inhibits migration of prostate cancer cell by activation of the estrogen receptor beta.
- Haffty, B. G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S. A., Weidhaas, J., Toppmeyer, D. (2006). Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(36), 5652-5657.
- Haldosén, L. A., Zhao, C., & Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, *382*(1), 665-672.
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al.,. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *British journal of cancer*, *87*(11), 1234.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*:57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.

- Hansen, S. M., Berezin, V., & Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cellular and molecular life sciences*, 65(23), 3809-3821.
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2016). Early breast cancer: treatment concepts and biology.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20.
- Henderson, B. E., & Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427-433
- Henderson, B. E., Ross, R. K., & Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer research*, 48(2), 246-253.
- Hon, J. D. C., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V. Y., ... & Lee, P. (2016). Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *American journal of cancer research*, 6(9), 1864.
- Honma, N., Horii, R., Iwase, T., Saji, S., Younes, M., Takubo, K., ... & Sakamoto, G. (2008). Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(22), 3727-3734.
- Hou, X., Zhao, M., Wang, T., & Zhang, G. (2014). Upregulation of estrogen receptor mediates migration, invasion and proliferation of endometrial carcinoma cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncology reports*, 31(3), 1175-1182.
- Howlander, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., ... & Cho, H. (2011). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011. *Also available online Last accessed December, 1.*
- Hsu, I., Chuang, K. L., Slavin, S., Da, J., Lim, W. X., Pang, S. T., ... & Yeh, S. (2013). Suppression of ER β signaling via ER β knockout or antagonist protects against bladder cancer development. *Carcinogenesis*, 35(3), 651-661.
- Huang, H. J., Neven, P., Drijkoningen, M., Paridaens, R., Wildiers, H., Van Limbergen, E., ... & Christiaens, M. R. (2005). Hormone receptors do not predict the HER2/neu status in all age groups of women with an operable breast cancer. *Annals of oncology*, 16(11), 1755-1761
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI). Octubre 2016. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf
- Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 10, noviembre de 2015, de <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es#tipos>
- Jonsson, P., Katchy, A., & Williams, C. (2014). Support of a bi-faceted role of estrogen receptor β (ER β) in ER α -positive breast cancer cells. *Endocrine-related cancer*, 21(2), 143-160.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1786.

- Kim H., Meyer A., Wagner J., Alford S. et al. (2011). Signaling Network State Predicts Twist-Mediated Effects on Breast Cell Migration Across Diverse Growth Factor Contexts. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.11.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science*, 280(5366), 1036-1037.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823
- Koehler, K. F., Helguero, L. A., Haldosén, L. A., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocrine Reviews*, 26(3), 465-478.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5925-5930.
- Kwok W.K., Ling M.T., Lee T.W. et al. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implications as a therapeutic target. *Cancer Res*, 65, 5153-62.
- Kyo S., Sakaguchi J., Ohno S. et al. (2006). High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and effects patient survival. *Hum Pathol*, 37, 431-8.
- La Vecchia, C., Giordano, S. H., Hortobagyi, G. N., & Chabner, B. (2011). Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *The oncologist*, 16(6), 726-729.
- Lange, C. A., Gioeli, D., Hammes, S. R., & Marker, P. C. (2007). Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 171-199.
- Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., ... & Jonkers, J. (2008). NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *The EMBO Journal*, 27(19), 2603-2615.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietersen, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.
- Leung, Y. K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S. M. (2006). Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13162-13167.
- Leygue, E., & Murphy, L. C. (2013). A bi-faceted role of estrogen receptor β in breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 20(3), R127-R139.
- Li, Y., Wang, J. P., Santen, R. J., Kim, T. H., Park, H., Fan, P., & Yue, W. (2010). Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology*, 151(11), 5146-5156.
- Liu, Y., Nguyen, N., & Colditz, G. A. (2015). Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's Health*, 11(1), 65-77.

- Lo H.W., Hsu S.C., Xia W., Ca X., et al. (2007). Epidermal growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to induce Epithelial-mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. *Cancer Res* 19:9066-9076.
- Lombardi, A. P. G., Pisolato, R., Vicente, C. M., Lazari, M. F. M., Lucas, T. F., & Porto, C. S. (2016). Estrogen receptor beta (ER β) mediates expression of β -catenin and proliferation in prostate cancer cell line PC-3. *Molecular and cellular endocrinology*, 430, 12-24.
- Manson, J. E., Chlebowski, R. T., Stefanick, M. L., Aragaki, A. K., Rossouw, J. E., Prentice, R. L., ... & Wactawski-Wende, J. (2013). Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *Jama*, 310(13), 1353-1368.
- Marmot, M., Atinmo, T., Byers, T., Chen, J., Hirohata, T., Jackson, A., ... & Mann, J. (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective.
- Marotti, J. D., Collins, L. C., Hu, R., & Tamimi, R. M. (2010). Estrogen receptor- β expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern Pathology*, 23(2), 197-204.
- Matthews, J., & Gustafsson, J. Å. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β . *Molecular interventions*, 3(5), 281.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., ... & Davidson, R. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(11), 812-822.
- Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., ... & Willson, T. M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(1), 75-78.
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*, 392(1), 49-53.
- Murphy, L. C., & Leygue, E. (2012, January). The role of estrogen receptor- β in breast cancer. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 30, No. 01, pp. 05-13). Thieme Medical Publishers.
- Novelli, F., Milella, M., Melucci, E., Di Benedetto, A., Sperduti, I., Perrone-Donnorso, R., ... & Buglioni, S. (2008). A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. *Breast Cancer Research*, 10(5), 1.
- O'Neill, P. A., Davies, M. P. A., Shaaban, A. M., Innes, H., Torevell, A., Sibson, D. R., & Foster, C. S. (2004). Wild-type oestrogen receptor beta (ER β 1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers. *British journal of cancer*, 91(9), 1694-1702.
- Onkal R. & Djamgoz MB. (2009). Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *Eur J Pharmacol* 625: 206–219.

Organización Mundial de la Salud. Fact Sheet. No. 297. Octubre 2015.
<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>

Palmieri, C., Cheng, G. J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Weihua, Z., Van Noorden, S., ... & Gustafsson, J. A. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *9*(1), 1-13.

Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., & Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO journal*, *28*(5), 523-532.

Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., & Leitman, D. C. (2004). Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer research*, *64*(1), 423-428.

Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., ... & Slamon, D. J. (1998). Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *Journal of Clinical Oncology*, *16*(8), 2659-2671.

Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews. Cancer*, *7*(6), 415.

Petrone, A. B., Simpkins, J. W., & Barr, T. L. (2014). 17 β -estradiol and inflammation: implications for ischemic stroke. *Aging and disease*, *5*(5), 340.

Piccolella, M., Crippa, V., Messi, E., Tetel, M. J., & Poletti, A. (2014). Modulators of estrogen receptor inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. *Pharmacological research*, *79*, 13-20.

Piperigkou, Z., Bouris, P., Onisto, M., Franchi, M., Kletsas, D., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2016). Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. *Matrix Biology*, *56*, 4-23.

Powell, E., Shanle, E., Brinkman, A., Li, J., Keles, S., Wisinski, K. B., ... & Xu, W. (2012). Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ER α and ER β . *PloS one*, *7*(2), e30993.

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., & Hathaway, H. J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.*, *70*, 165-190.

Reese, J. M., Suman, V. J., Subramaniam, M., Wu, X., Negron, V., Gingery, A., ... & Pockaj, B. A. (2014). ER β 1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ER α -positive and-negative breast cancer. *BMC cancer*, *14*(1), 749.

Richie, R. C., & Swanson, J. O. (2003). Breast cancer: a review of the literature. *JOURNAL OF INSURANCE MEDICINE-NEW YORK THEN DENVER--*, *35*(2), 85-101.

- Rizza, P., Barone, I., Zito, D., Giordano, F., Lanzino, M., De Amicis, F., ... & Gustafsson, J. A. (2014). Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast cancer research*, 16(1), R21.
- Roger, P., Sahla, M. E., Mäkelä, S., Gustafsson, J. Å., Baldet, P., & Rochefort, H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer research*, 61(6), 2537-2541.
- Rørth, P. (2009). Collective cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 407-429.
- Ruiseco, K. Monjaraz, E. Lopez, J. (2015). La activación del receptor “Toll-like 4” (TLR-4) por lipopolisacárido (LPS) estimula la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB 231, provenientes de cáncer de mama. *Neuroendocrinología*, 1-72.
- Saunders, P. (2006). Estrogen Receptor Beta: The ‘New’ Estrogen Receptor Implicated in Breast Cancer. *cancer*, 25, 26.
- Schwartz, G. F., Hughes, K. S., Lynch, H. T., Fabian, C. J., Fentiman, I. S., Robson, M. E., ... & Winchester, D. J. (2008). Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007. *Cancer*, 113(10), 2627-2637.
- Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish.
- Shaaban, A. M Speirs, V., Green, C. A., &. (2008). Oestrogen receptor β immunohistochemistry: time to get it right?. *Journal of clinical pathology*, 61(10), 1150-1151.
- Shaaban, A. M., Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, Ellis IO, Robertson JF, Paish EC, Saunders PT *et al.*,. 2008 Nuclear and cytoplasmic expression of ERb1, ERb2, and ERb5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 14 5228–5235.
- Shaaban, A. M., O'Neill, P. A., Davies, M. P., Sibson, R., West, C. R., Smith, P. H., & Foster, C. S. (2003). Declining estrogen receptor- β expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *The American journal of surgical pathology*, 27(12), 1502-1512.
- Shanle, E. K., Zhao, Z., Hawse, J., Wisinski, K., Keles, S., Yuan, M., & Xu, W. (2013). Research resource: global identification of estrogen receptor β target genes in triple negative breast cancer cells. *Molecular endocrinology*, 27(10), 1762-1775.
- Singletary, K. W., & Gapstur, S. M. (2001). Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Jama*, 286(17), 2143-2151.
- Speirs, V., Carder, P. J., Lane, S., Dodwell, D., Lansdown, M. R., & Hanby, A. M. (2004). Oestrogen receptor β : what it means for patients with breast cancer. *The lancet oncology*, 5(3), 174-181.
- Speirs, V., Skliris, G. P., Burdall, S. E., & Carder, P. J. (2002). Distinct expression patterns of ER α and ER β in normal human mammary gland. *Journal of clinical pathology*, 55(5), 371-374.
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(2), 131-142.

- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, *139*(5), 871-890.
- Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J., & Omary, M. B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in cell biology*, *15*(11), 608-617.
- Tonetti, D. A., Rubenstein, R., DeLeon, M., Zhao, H., Pappas, S. G., Bentrem, D. J., ... & Jordan, V. C. (2003). Stable transfection of an estrogen receptor beta cDNA isoform into MDA-MB 231 breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *87*(1), 47-55.
- Turnbull, C., & Rahman, N. (2008). Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, *9*, 321-345.
- Valdés F., Alvarez A.M., Locascio A., Vega S. et al. (2002). The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol Cancer Res* 1:68-78.
- Wiggans, R. G., Woolley, P. V., Smythe, T., Hoth, D., Macdonald, J. S., Green, L., & Schein, P. S. (1979). Phase-II trial of tamoxifen in advanced breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *3*(1), 45-48.
- Wisinski, K. B., Xu, W., Tevaarwerk, A. J., Saha, S., Kim, K., Traynor, A., ... & Harter, J. (2016). Targeting estrogen receptor beta in a phase 2 study of high-dose estradiol in metastatic triple-negative breast cancer: a Wisconsin Oncology Network Study. *Clinical breast cancer*, *16*(4), 256-261.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, *19*(2), 156.
- Yan, Y., Jiang, X., Zhao, Y., Wen, H., & Liu, G. (2015). Role of GPER on proliferation, migration and invasion in ligand-independent manner in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Cell biochemistry and function*, *33*(8), 552-559.
- Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X. (2017). Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon?. *Oncotarget*, *8*(1), 1913.
- Yi-Feng, H., Sheng-Tao, Y., He-Cheng, L., Wu, J., Jin-Song, L., Liu, G., ... & Shao, Z. M. (2004). ER [beta] exerts multiple stimulative effects on human breast carcinoma cells. *Oncogene*, *23*(34), 5799.
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular Cancer Research*, *8*(5), 629-642.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, *6*(003).
- Zhao, C., Gao, H., Liu, Y., Papoutsis, Z., Jaffrey, S., Gustafsson, J. Å., & Dahlman-Wright, K. (2010). Genome-wide mapping of estrogen receptor- β -binding regions reveals extensive cross-talk with transcription factor activator protein-1. *Cancer research*, *70*(12), 5174-5183.

MATERIAL SUPLEMENTARIO.

Nivel de expresión a nivel de ARN mensajero que codifica para ER β en células tratadas con 17 β -estradiol

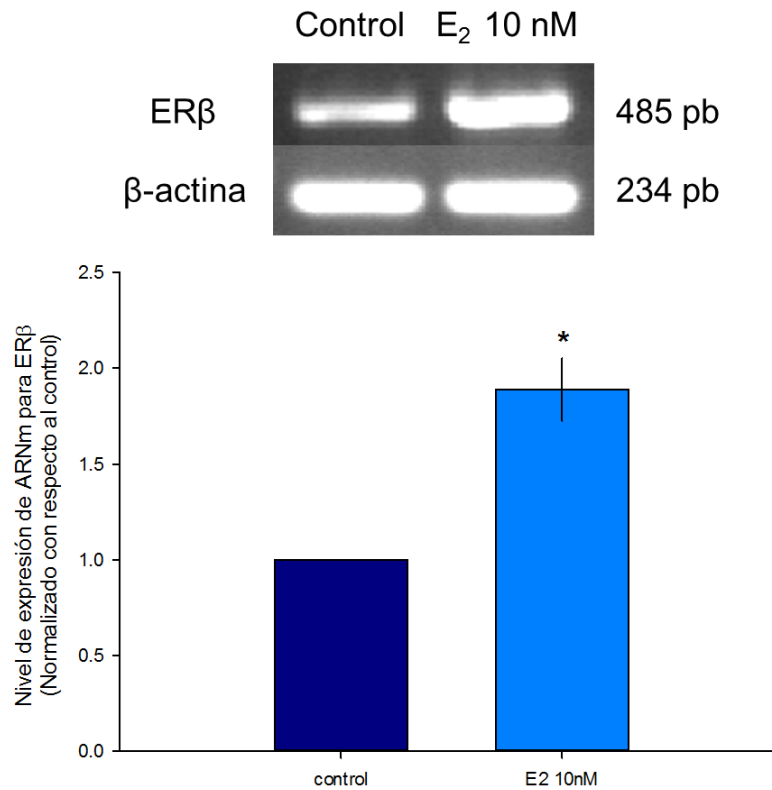


Figura 14. Nivel de expresión de ARNm que codifica para el ER β en células MDA-MB 231 tratadas con 17 β -estradiol: Las células fueron tratadas durante 48 horas con 17 β -estradiol a una concentración de 10nM. Se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. Se observa que la expresión del ER β incrementa de manera significativa cuando las células son tratadas con 17 β -estradiol aproximadamente un 85% con respecto al control, n=3 **B** * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

Nivel de expresión a nivel de ARN mensajero que codifica para ERβ en células tratadas con diferentes concentraciones de DPN

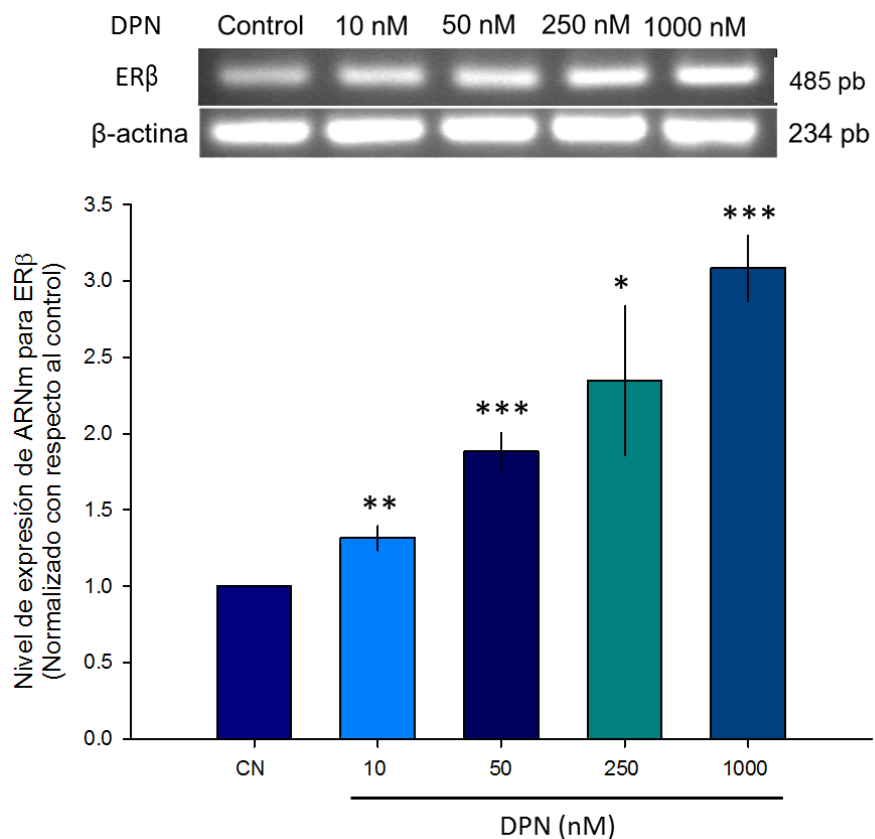


Figura 15. Nivel de expresión de ARNm que codifica para el ERβ en células MDA-MB 231 tratadas con DPN: Las células fueron tratadas durante 48 horas con DPN a diferentes concentraciones (10nM, 50nM, 250nM y 1000nM). Se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. Se observa que la expresión del ERβ incrementa de manera significativa de manera dosis dependiente observando un aumento a partir de la concentración de 10nM de aproximadamente un 40%, obteniendo el mayor aumento en la concentración de 1000nM de aproximadamente 3 veces con respecto al control. n=4 **B** * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

Nivel de expresión a nivel de ARN mensajero que codifica para ER β en células tratadas con PHTPP

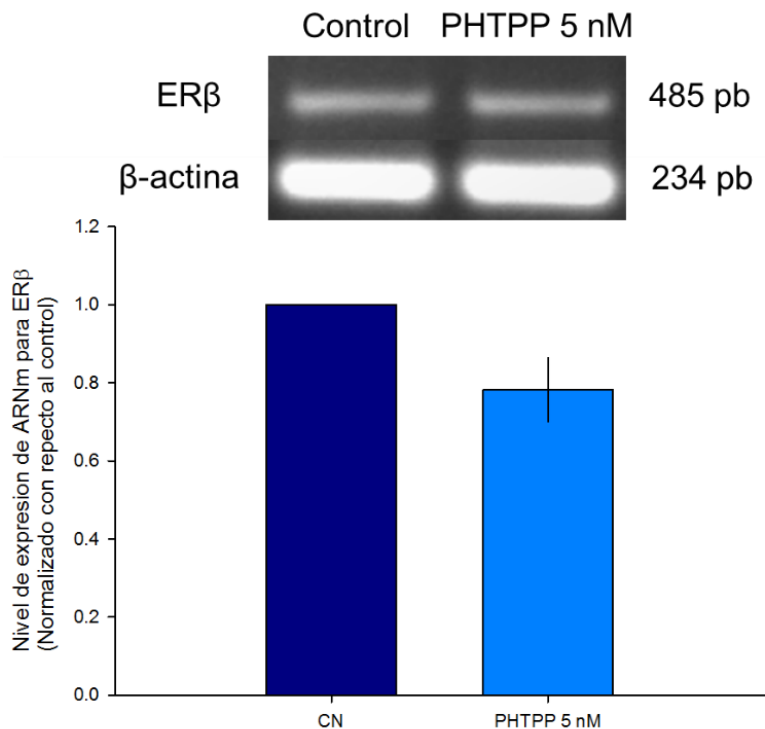


Figura 16. Nivel de expresión de ARNm que codifica para el ER β en células MDA-MB 231 tratadas con PHTPP: Las células fueron tratadas durante 48 horas con PHTPP a una concentración de 5nM. Se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. No se observan cambios en los niveles de expresión del ER β en las células tratadas con PHTPP, n=3 **B** * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$

Nivel de expresión a nivel de ARN mensajero que codifica para SNAIL-2 en células tratadas con concentraciones equimolares de PHTPP y DPN

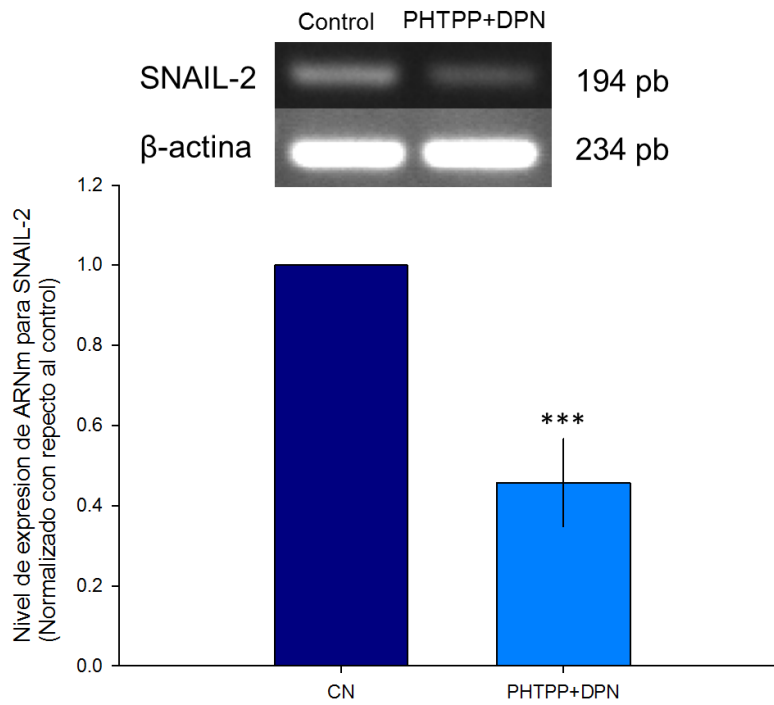


Figura 17. Nivel de expresión de ARNm que codifica para el SNAIL-2 en células MDA MB-231 tratadas con PHTPP y DPN: Las células fueron tratadas con concentraciones equimolares de PHTPP y DPN (50nM) durante 48 horas. Se realizó la técnica de RT-PCR de punto final y posteriormente se realizó la densitometría. Se observa que los niveles de expresión de SNAIL-2 disminuyen de manera significativa en las células tratadas con DPN y PHTPP aproximadamente un 55% con respecto al control, n=3 **B** * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$