

Tesis defendida por
Rosalinda Mejía Rodríguez
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité

Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Miembro del Comité

Dr. Israel Marck Martínez Pérez
Miembro del Comité

Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias de la vida con orientación
en Biotecnología Marina

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Enero, 2015

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Evaluación de la posible intervención de Cadherinas en la
muerte de células de cáncer de mama en presencia de
proteínas Cry de *Bacillus Thuringiensis***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Rosalinda Mejía Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2015

Resumen de la tesis que presenta **Rosalinda Mejía Rodríguez**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Evaluación de la posible intervención de Cadherinas en la muerte de células de cáncer de mama en presencia de proteínas Cry de *Bacillus Thuringiensis*

Resumen elaborado por:

Rosalinda Mejía Rodríguez

Las proteínas Cry de *Bacillus Thuringiensis*, tienen la capacidad de actuar como oncotoxina matando células tumorales *in vivo* e *in vitro*.

Esta capacidad se le atribuye a la posible interacción con proteínas de adhesión cadherinas y se ha descrito que el mecanismo de la proteína Cry desencadena el bloqueo de una cascada de señalización que activa genes involucrados en la proliferación celular, logrando tanto la inhibición de proliferación y migración celular como la muerte celular programada.

En este trabajo se diseñaron tres RNA de interferencia para cadherina 11 y se comprobó que dicha cadherina está involucrada en la muerte de células de cáncer de mama MDA-MB-231 cuando interviene la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Adicionalmente por medio de inmunofluorescencia indirecta se evaluaron cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 y HaCat, se observó que existe un equilibrio entre ambas cadherinas que permite la transición en células cancerígenas de epiteliales a mesénquimales.

Con los resultados obtenidos en éste trabajo, Cadherina 11 y proteína Cry, prometen ser buenos candidatos para futuras terapias alternativas contra el cáncer.

Palabras clave: **Cadherina 11, RNAi, proteína Cry, *Bacillus Thuringiensis*, cáncer**

Abstract of the thesis presented by **Rosalinda Mejía Rodríguez**, as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Evaluation of the possible intervention of cadherins in the death of breast cancer cells in presence of *Bacillus Thuringiensis* Cry proteins

Abstract by:

Rosalinda Mejía Rodríguez

Bacillus Thuringiensis Cry proteins have the capacity to act as oncotoxin, killing tumor cells in vivo and in vitro. This capacity is attributing to the possible interaction with cadherins due has been described that Cry proteins block a signaling pathway, that activates genes involved in cell proliferation, cell migration, and apoptosis.

Additionally, three interference RNA for cadherin 11 tested, established that cadherin 11 is involved in MDA-MB-231 breast cancer cells death in presence of *Bacillus Thuringiensis* Cry proteins.

Additionally using immunofluorescence we evaluated cadherin E and cadherin 11 in MDA-MB-231 and HaCat cells. Results obtained shown a balance between both cadherins, which permit the transition of epithelial to mesenchymal cancer cells. The results suggest cadherin 11 and Cry protein, promise to be good candidates for future alternative cancer therapies.

Keywords: **Cadherin 11, RNAi, Cry protein, *Bacillus Thuringiensis*, cancer**

Dedicatoria

A mis padres Rosalinda Rodríguez Pacheco y David Mejía Ramírez, que nunca han dejado de creer y confiar en mí. Que gracias a su amor, a todas sus enseñanzas, a su esfuerzo, a los valores que me inculcaron y a la educación que me han brindado, he podido llegar tan lejos.

A mis hermanos Omar y Guillermo, que siempre me apoyan, me aconsejan, me hacen reír y me contagian su felicidad y locura.

Porque ustedes han sido mi energía y fortaleza, porque a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes y porque éste logro también es de ustedes. Gracias infinitas.

¡Los quiero tanto!

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en particular al departamento de Biotecnología Marina del posgrado de Ciencias de la vida, por permitirme realizar mi maestría y por la beca terminal que me fue proporcionada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado en el periodo Agosto 2012 - Agosto 2014.

A mi director de tesis, el Dr. Jorge Olmos Soto, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Por su confianza, apoyo y orientación durante la realización de la tesis. Y por facilitarme una beca en el último periodo de estancia en el laboratorio.

A mis sinodales, el Dr. José de Jesús Paniagua Michel y el Dr. Israel Marck Martínez Pérez, por sus valiosas observaciones y aportaciones durante el desarrollo de la tesis.

A la técnico M.C. Rosalía Contreras Flores, por su ayuda y consejos durante la realización del trabajo de tesis en el laboratorio. No me basta un agradecimiento profesional, gracias Rosy por tu confianza y amistad, por todos los consejos, las pláticas, risas y enseñanzas que me brindaste.

A mis compañeros de laboratorio Karina Espinoza, Silvia Pitones y Christian Hernández, gracias por compartir conmigo sus conocimientos que fueron indispensables para iniciar mi trabajo de tesis.

Al personal administrativo de CICESE, especialmente a Adriana Mejía, por su ayuda y disposición.

A la Dra. Rosa Muriño por permitirme hacer uso del microscopio invertido de epifluorescencia y a Fausto Villavicencio por su ayuda y asesoría para el adecuado manejo del microscopio.

A Marisela Garduño por su ayuda en un momento crucial del trabajo de tesis.

Gracias a Vanessa Millán, Julia Canizales, Paola Torres, Keren Lozada, Kevin Ramos, al grupo de teatro de CICESE, a mis compañeros de Ciencias de la Vida y de otras áreas de CICESE, por todas las experiencias y enseñanzas que compartieron conmigo.

Gracias Laura López y Patricia paredes, por su amistad, alegría y por tanto café.

Gracias Cristina Sánchez García por tu amistad incondicional, por pasar por mí a la central el día que llegué a Ensenada y darme hospedaje en tu casa, porque fuiste un gran apoyo, por toda tu ayuda, tus consejos, locuras, risas, pláticas y bellas experiencias.

Gracias a toda mi familia y amigos de Querétaro, por todo su apoyo, amor y buena vibra.

Muchas Gracias a ti Christian Hernández por todo tu apoyo, tu ayuda, por desvelarte conmigo cuando me tocaba hacer inmunos, por escucharme y aconsejarme, por tu optimismo, pero sobre todo gracias por tanto amor y felicidad.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Cáncer.....	4
2.1.1 Importancia del ciclo celular en cáncer.....	4
2.1.2 Mantenimiento de señales proliferativas	5
2.1.3 Evasión de supresores de crecimiento.....	6
2.1.4 Resistencia a la muerte celular.....	7
2.1.5 Angiogénesis.....	7
2.1.6 Metástasis	8
2.1.7 Vía de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt)	9
2.2 Cadherinas	11
2.3 RNAi	14
2.4 Proteína Cry	16
3. Justificación e Hipótesis	19
3.1 Justificación	19
3.2 Hipótesis.....	19
4. Objetivos	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. Materiales y Métodos	21
5.1 Cultivo celular.....	21
5.2 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 y HaCat....	22
5.2.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia	
Indirecta en caja de cultivo celular de 96 pozos	22
5.3 Diseño y construcción de RNAi	23
5.3.1 Oligonucleótidos.....	23
5.3.2 Vectores de expresión.....	24
5.3.3 Hibridación de oligonucleótidos y ligación en pSilencer	
2.1-U6 hygro.....	25
5.3.4 Células competentes y transformación de <i>E. Coli</i> por	
shock térmico	26

Tabla de contenido (continuación)

	Página
5.3.5 Extracción de DNA plasmídico (DNAP)	27
5.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa. PCR	27
5.3.7 Digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.....	29
5.3.8 Secuenciación	30
5.4 Transfección de células MDA-MB-231 con pSilencer-shRNA	30
5.4.1 Cantidad óptima de células MDA-MB-231 para transfección	30
5.4.2 Determinación de la concentración óptima de higromicina	31
5.4.3 Transfección de células MDA-MB-231	31
5.4.4 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 Transfectadas.....	32
5.5 Evaluación de los efectos del RNAi en presencia de proteínas Cry de B. T.	32
5.5.1 Viabilidad celular. Evaluación de proteína Cry de B. T. en células MDA-MB-231 transfectadas	32
6. Resultados	34
6.1 Evaluación de la presencia de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 y HaCat, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta	34
6.2 Diseño y construcción de RNAi	37
6.2.1 Transformación de <i>E. Coli</i> DH5 α por shock térmico	37
6.2.2 Extracción de DNAP	38
6.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa. PCR	42
6.2.4 Digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.....	43
6.2.5 Secuenciación	44
6.3 Transfección de células MDA-MB-231 con los diferentes shRNA's	45
6.3.1 Determinación de cantidad óptima de células MDA-MB-231 para transfección y concentración óptima de higromicina como antibiótico de selección.....	45
6.3.2 Transfección	46
6.3.3 Detección de receptores de membrana. Inmunofluorescenci Indirecta.....	48
6.4 Evaluación de los efectos de RNAi en presencia de proteína Cry	55
6.4.1 Viabilidad celular	55
7. Discusión	58
7.1 Generalidades	58
7.2 Evaluación de la presencia de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 y HaCat mediante la técnica de inmunofluorescencia Indirecta.....	58
7.2.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en cajas de cultivo celular de 96 pozos	58
7.2.2 Inmunofluorescencia indirecta	59
7.2.3 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231	60
7.2.4 Evaluación de cadherinas E y 11 en células HaCat	63

Tabla de contenido (continuación)

	Página
7.3 Transfección.....	64
7.4 Evaluación de los efectos de RNAi en presencia de proteína Cry	66
Conclusiones.....	69
Perspectiva	70
Referencias bibliográficas.....	71
Anexos	78

Lista de Figuras

Figura	Página
1	Proceso de metástasis 8
2	Esquema de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 kinasa..... 10
3	Estructura de las cadherinas clásicas y su interacción con proteínas citoplasmáticas 12
4	Cadherina 11 y su isoforma..... 13
5	Representación de la organización para la prueba de inmunofluorescencia 22
6	Diseño y construcción de RNAi..... 24
7	Vectores de expresión para siRNA. 25
8	Representación de la organización para la prueba de viabilidad celular.. 33
9	Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 a diferentes confluencias. 35
10	Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células HaCat a diferentes confluencias..... 36
11	Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferentes confluencias en células MDA-MB-231 y HaCat..... 37
12	Transformantes con pSilencer 2.1-U6 hygro. 38
13	Evaluación de DNAp en el gel de agarosa. 39
14	Evaluación de DNAp en ausencia de inserto en geles de agarosa. 42
15	Fragmentos amplificados en la PCR. 43

Lista de Figuras (continuación)

Figura	Página
16 Digestión del plásmido pSilencier 2.1-U6 hygro con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.	43
17 Secuenciación.	44
18 Concentración óptima de higromicina para seleccionar clonas post transfección.	45
19 Crecimiento de las células MDA-MB-231 en experimentos post transfección.	46
20 Transfección de células MDA-MB-231.	47
21 Pérdida de morfología en células MDA-MB-231 transfectadas.	48
22 Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt a diferentes confluencias.	50
23 Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAiso a diferentes confluencias.	51
24 Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt/iso a diferentes confluencias.	52
25 Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferentes confluencias en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt.	53
26 Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferentes confluencias en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAiso.	53

Lista de Figuras (continuación)

Figura	Página
27 Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferentes confluencias en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt/iso.....	54
28 Representación de la célula MDA-MB-231 y cadherina 11 post transfección.	56
29 Cadherina E en células MDA-MB-231.....	62
30 Morfología de células con cadherinas E y 11.....	64
31 Prueba de herida en placa con células MDA-MB-231 y HaCat.....	68

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Genes involucrados en el ciclo celular y en el desarrollo de cáncer.	5
2 Expresión de cadherinas en líneas celulares de cáncer de mama.....	14
3 Especificaciones de la preparación de muestras para transformación por shock térmico	26
4 Características de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.	28
5 Especificaciones para preparar cóctel de PCR.	28
6 Condiciones del termociclador para la PCR.	28
7 Especificaciones del cóctel para la digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII	30
8 Número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina 11 en diferentes confluencias.....	54
9 Número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina E en diferentes confluencias.....	55
10 Viabilidad y porcentajes de muerte de MDA-MB-231 post transfección en presencia de proteína Cry.	56

1. Introducción

En un organismo sano existe un balance entre la muerte celular y la renovación tisular, la alteración de éste equilibrio por la pérdida de control en el ciclo celular, puede causar cáncer, que junto con las enfermedades infecciosas, las cardiopatías y la diabetes son las principales causas de muerte entre los seres humanos.

El cáncer constituye un grupo de enfermedades que han afectado a los seres humanos desde tiempos ancestrales. Existen registros de cáncer de hueso en momias egipcias del año 1600 a.c., y el caso más antiguo de cáncer de mama data del año 1500 a.c. (Akulapalli, 2009) reportado en manuscritos; incluso, se tiene registro del tratamiento proporcionado para mejorar la calidad de vida.

Esta enfermedad es un proceso que se desarrolla a partir de mutaciones en células somáticas y alteraciones genéticas acumuladas con el paso del tiempo (Sandal, T. 2002; Willingham *et al.*, 2004). Se caracteriza por un crecimiento anormal de células, que adquieren la capacidad de inducir angiogénesis y metástasis. Dicho crecimiento se debe a la activación de oncogenes que favorecen la proliferación celular o a la inactivación de genes supresores que se encargan de frenar el ciclo celular, logrando afectar tanto la sobrevivencia celular como la regulación de apoptosis (Burgués *et al.*, 2005; Escandón *et al.*, 1992; Sandal, T. 2002; Sherr, C. J. 1996). A su vez generan una reprogramación del metabolismo y evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

Existen diversos factores que pueden inducir el desarrollo de cáncer, por lo que es posible que todas las líneas celulares del organismo puedan sufrir, en algún momento de la vida, la transformación neoplásica (Organización mundial de la salud, 2014; Rojas, 1996).

Tan sólo entre el 2008 y el 2012, el cáncer causó alrededor de 7 millones de defunciones en el mundo por año (Organización mundial de la salud, 2014). Los tipos de cáncer que causan más muertes cada año son el de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. A nivel mundial, los cinco tipos de cáncer más comunes en la mujer son,

por orden de frecuencia, los de mama, pulmón, estómago, colon/recto y cuello del útero. Y de éstos, el cáncer de mama es el tumor maligno de mayor mortalidad en el mundo (Brandan y Villaseñor, 2006; Jemal *et al.*, 2011; Sergio y Marino, 2006; Kanaul y Nigenda, 2009; Romero y Santillan, 2008).

Se prevé que para el año 2030 las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13.1 millones (Organización mundial de la salud, 2014).

Entre las afecciones que sufren las células cancerosas, se encuentra la alteración de la adhesión celular que se logra a través de diversas proteínas entre ellas las cadherinas, las cuales en células sanas tienen una participación importante en la regulación de varios procesos celulares, necesarios para el desarrollo del organismo como la morfogénesis, la estabilización, diferenciación y el establecimiento de la polaridad de los tejidos. La cadherina E por ejemplo, es la más abundante en el organismo, ya que se encuentra en todos los epitelios, la pérdida o disminución de su expresión o función en carcinomas epiteliales, ha sido considerada como la razón principal para la ruptura del contacto estrecho célula-célula del tejido epitelial, conduciendo a la progresión de tumores a un estado invasivo. Se sabe que la cadherina N promueve la motilidad e invasión celular con el decremento de expresión de cadherina E. Por otro lado, la cadherina 11 está relacionada con la agresividad del cáncer de mama, próstata y de otros carcinomas, se sabe que su expresión en células tumorales regula la interacción con fibroblastos u osteoblastos, además de facilitar la invasión a través del estroma y el hueso (Nieman *et al.*, 1999).

Previamente por medio de anticuerpos específicos contra cadherina E y cadherina 11 se determinó que en la línea celular Hacat, que son células inmortalizadas de queratinocitos, el receptor mayoritario es el de cadherina E (Nuñez 2013). Y se confirmó que en células cancerosas MDA-MB-231 se encuentra el receptor para cadherina 11 (Nieman *et al.*, 1999; Nuñez 2013; Pishvaian *et al.*, 1999).

Aunado a éstas aportaciones científicas, en 2011 se reportó que proteínas Cry de *Bacillus Thuringiensis* tienen actividad citocida sobre células de cáncer cervicouterino *in vitro* e *in vivo* (Mendoza, 2011).

Posteriormente se mostró, que dichas toxinas también tienen actividad citócida en células MDA-MB-231 de cáncer de mama (Nuñez, 2013). Como es sabido, las toxinas Cry tienen la capacidad de interactuar con diferentes receptores de membrana y se cree que el receptor de membrana más abundante en dicha línea celular puede ser el de cadherina 11. Por lo tanto, la posible interacción entre la oncotoxina y cadherina 11 podría explicar el bloqueo de la vía de señalización PI3K/Akt en células de cáncer de mama MDA-MB-231, así como la regulación positiva de apoptosis y la formación de un poro en membrana que conlleva a lisis celular (Nuñez, 2013).

Dichos resultados indican que posiblemente el receptor de membrana cadherina 11, pudiera ser blanco potencial para ser utilizado como intervención terapéutica contra el cáncer sin dañar células sanas, como se mostró con los queratinocitos humanos, aunque no se descarta la participación de otros receptores en la regulación de este proceso. Por lo que en este trabajo se propone determinar la posible participación de cadherina 11 en presencia de las toxinas Cry por medio de la construcción de RNAi, de esta forma, si se logra comprobar que la interacción entre dichas proteínas permiten la regulación de la muerte celular, se podrían diseñar tratamientos para evitar la proliferación, invasión y migración celular.

2. Antecedentes

2.1 Cáncer

2.1.1 Importancia del Ciclo celular en cáncer

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (Meza-Junco *et al.*, 2006). Su estudio ha permitido conocer cómo la integridad de la replicación del genoma es mantenida por las funciones coordinadas de los puntos de restricción y de los sistemas de reparación del DNA (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). Se conocen nueve tipos de proteínas que se encargan de controlar la entrada y progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo celular:

- 1.-Proteín-quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo.
- 2.-Ciclinas que se unen a las CDKs y controlan su capacidad de fosforilación.
- 3.-Inhibidores de CDK (CKIs) como p21 y p27.
- 4.- y 5.-Complejo de proteína del retinoblastoma (pRb) y Factor de transcripción E2F, que inducen el paso de fase G1 a fase S al activar la maquinaria de síntesis del DNA.
- 6.-Factor de maduración-promoción (MPF), que fosforila proteínas implicadas en la ruptura de la membrana nuclear y la degradación de ciclinas.
- 7.-Complejo promotor de anafase (APC), el cual favorece la progresión de la fase M.
- 8.-Ubiquitinas y proteosomas, responsables de la degradación de ciclinas y CKIs.
- 9.-Proteína p53 encargada de activar a la p21, que es una CKI que inhibe la fosforilación de la pRb, impidiendo la liberación de E2F para detener el ciclo de la fase G1 e inducir apoptosis, también puede detener el ciclo en G2 con la activación de otras proteínas, de igual forma activa genes reparadores de DNA protegiendo de mutaciones y confiriendo estabilidad genética. Y otras proteínas como factores de crecimiento, proteínas promitóticas de la familia linfoma de células B-2 (Bcl-2) y proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Burgués *et al.*, 2005).

Las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras del ciclo celular lo que no permite la reparación del daño al DNA o la inducción de apoptosis, por lo que el ciclo celular se repite indefinidamente a pesar de los errores en el genoma. Dichas mutaciones afectan genes que codifican componentes de los mecanismos del control del ciclo celular (Tabla 1).

Tabla 1. Genes involucrados en el ciclo celular y en el desarrollo de cáncer Tomado de Peralta-Zaragoza *et al.*, (1997, p. 454).

CATEGORÍAS DE GENES CELULARES INVOLUCRADOS EN EL CICLO CELULAR Y EN EL DESARROLLO DE CÁNCER			
Categoría	Gen*	Función	Alteración
I	<i>c-ras, c-myc, c-abl, c-Src, c-fos, c-jun, c-ets</i>	Factores de transcripción y transducción	Aumento de su función
II	<i>p53, Rb, APCI, MPCI, p16, p21, p27, Wt</i>	Puntos de control del ciclo celular. Crecimiento y proliferación	Degradación o pérdida de la función
III	A) <i>bcl-2, bax</i> B) <i>p53, c-myc</i> , factores solubles como TNF y FAS	Inhiben apoptosis Inducen apoptosis	Expresión ganancia de la función Degradación o pérdida de la función

* Incluye a proto-oncogenes, oncogenes y genes supresores

2.1.2 Mantenimiento de señales proliferativas

La comunicación intercelular por medio de vías de señalización es importante para el desarrollo embrionario, diferenciación de los tejidos y respuesta sistémica a heridas e infecciones. En gran parte dichas vías son reguladas por factores de crecimiento que pueden influir en la proliferación celular, por vías positivas o negativas e inducir una serie de respuestas en células blanco. La interacción de un factor de crecimiento con su receptor por una unión específica, activa una cascada de fosforilación que regula la progresión del ciclo y el crecimiento celular. A menudo estas señales son capaces de influenciar a diversos niveles aspectos importantes en el contexto celular, como la sobrevivencia y el metabolismo energético (Hanahan y Weinberg, 2011; Meza-Junco *et al.*, 2006).

Las células cancerígenas adquieren la capacidad de mantener la señalización de proliferación mediante proliferación autócrina, estimulación parácrina, sobre expresión de receptores de membrana, alteraciones estructurales en receptores, activación constitutiva de señalización positiva y desregulación de los circuitos de regulación negativa (Higareda, A., 2012).

Los procesos de regulación por retroalimentación positiva y negativa también contribuyen a la progresión del ciclo celular. Los controles negativos de dicha progresión están presentes durante el desarrollo, diferenciación, senescencia y muerte celular y pueden tener una función importante en la prevención del desarrollo de cáncer. Los genes que codifican para proteínas que participan en dicha regulación, son llamados genes supresores de tumores, los cuales constituyen los puntos de control del ciclo celular, regulando los procesos de replicación, activación transcripcional, progresión del ciclo y apoptosis (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997).

2.1.3 Evasión de supresores de crecimiento

Existe una gran variedad de genes supresores de tumores, entre los cuales podemos encontrar los que codifican factores de transcripción (P53, WT1), reguladores del ciclo celular (Rb, p16), componentes que regulan las vías de señalización (NF1), fosfatasa de fosfoinosítida (PTEN) y proteínas que regulan la elongación de la polimerasa II de RNA (VHL). Entre todos ellos, los más comunes son los que codifican las proteínas de p53 y Rb, que son encargados de controlar la proliferación, senescencia y apoptosis en la célula (Karp, G. 2006).

La pérdida de la función de p53 está asociada con la inmortalización y/o transformación *in vitro* y al desarrollo de neoplasias *in vivo*. Se sabe que alta concentración de dicha proteína incrementa los niveles de los complejos CDK-ciclina, que a su vez modulan la expresión celular, específicamente en la interrupción del paso de la fase G1 a la fase S, y esto permite la reparación del DNA dañado antes de que continúe el ciclo. Las células con p53 mutado no interrumpen el ciclo celular aun después de que el DNA ha sufrido daño (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). De igual forma, pierden la función para la supresión del crecimiento celular; promueven el crecimiento tumoral y favorecen la inmortalización celular (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Las proteínas Rb se encargan de regular la activación de transcripción de varios genes, los cuales a su vez regulan enzimas que sintetizan nucleótidos y polimerizan el DNA. Su actividad está principalmente asociada a inhibición de la proliferación celular por contacto célula-célula, por falta de estímulos anti proliferativos como TGF-B1 o TNF-a (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997).

Los oncogenes son protooncogenes alterados que codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno (Karp, G. 2006). Dicha transformación resulta de la activación o mutación de genes reguladores clave que codifican productos con diferentes efectos en el crecimiento y diferenciación celular (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Algunos oncogenes que mutan con frecuencia en los tumores humanos son: RAS, el cual codifica una proteína de unión con GTP que regula una vía de proliferación celular. RAF que codifica cinasas de proteínas citoplásmicas y encabeza la cascada de la MAP cinasa, que es la principal vía de señalización para controlar el crecimiento celular. MYC que codifica factores de transcripción nuclear y se encarga de controlar la progresión en la fase G1 del ciclo celular. Y el oncogen BCL2 que codifica una proteína que inhibe apoptosis, manteniendo a las células vivas y en proliferación a pesar del daño en su genoma (Karp, G. 2006).

2.1.4 Resistencia a la muerte celular

La muerte celular programada o apoptosis es crucial durante la embriogénesis, en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto, eliminando células dañadas, en la defensa contra infecciones y en la regulación del proceso fisiológico de envejecimiento.

Las células cancerosas han desarrollado diversas estrategias para limitar o evadir la apoptosis, entre ellas se encuentra la pérdida de la función supresora de p53; la sobre expresión de reguladores anti apoptóticos como Bcl-2, o señales de sobrevivencia como el factor de crecimiento similar a la insulina (Igf) tipo 1 y 2; la regulación negativa de factores pro apoptóticos como Bax y Bim; o eliminando la transducción de los ligandos de los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Hanahan *et al.*, 2011).

2.1.5 Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso necesario para lograr la expansión del tumor primario, con el secuestro de vasos sanguíneos de tejido circundante las células cancerígenas son capaces de entrar en circulación y sin importar su origen histológico penetrar el sub

epitelio de la membrana basal para poder continuar con su expansión en nervio y músculo (Liotta y Steler, 1991). La neovascularización tumoral es mediada principalmente por el factor de crecimiento endotelial vascular-(VEGF), aunque también se ve favorecida por miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos FGF o por ligandos transmembranales DLL4 de receptores NOTCH. Éstos últimos pueden ser sobre expresados en las células tumorales por oncogenes como RAS y MYC, que como ya se ha mencionado, se ven involucrados en la proliferación celular (Ferrera, N. 2010).

2.1.6 Metástasis

La metástasis es una serie de mutaciones que produce una cascada de pasos secuenciales involucrados en múltiples interacciones huésped-tumor que ocurren en subpoblaciones de un tumor primario, teniendo como resultado una pequeña fracción de células que adquieren la capacidad de migrar, infiltrarse e invadir los tejidos de un órgano adyacente o a distancia, proliferando y formando nuevos focos tumorales (Figura 1) (Arvelo y Poupon, 2001; Hunter *et al.*, 2008; Liotta y Steler, 1991).

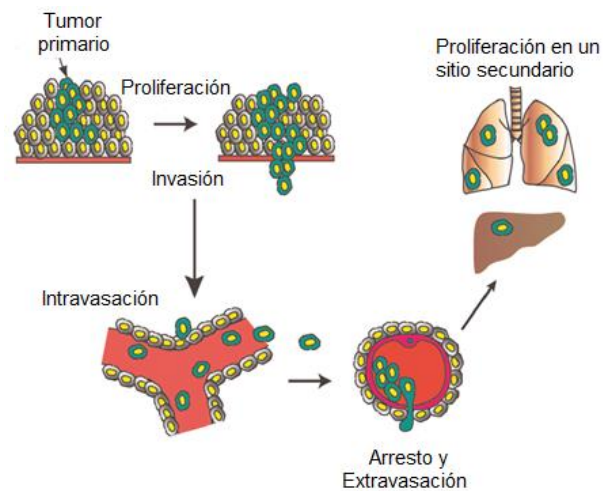


Figura 1. Proceso de metástasis. Se requiere la proliferación del tumor primario y la invasión a través de los tejidos adyacentes y membranas basales, mediante vasos sanguíneos o canales linfáticos, que llevan a las células a un órgano diana distante. Posteriormente, las células tumorales son detenidas en los pequeños vasos sanguíneos dentro del nuevo órgano, por lo general hay una extravasación en el tejido circundante y por consiguiente una proliferación en el sitio secundario. Todos estos pasos se realizan mientras las células tumorales evaden señales apoptóticas y respuestas inmunológicas del organismo. Modificado de Hunter *et al.*, 2008.

El proceso de metástasis puede dividirse en tres etapas, adhesión mediante una variedad de receptores superficiales, degradación proteolítica de la matriz y migración o locomoción. Muchos modelos de cáncer en animales han revelado la presencia de ciertos factores con la capacidad de estimular o inhibir la motilidad celular. Estos factores con frecuencia se expresan de forma aberrante en los tejidos neoplásicos dando cabida a un terreno fértil para las migraciones celulares que caracteriza la invasión tumoral primaria (Arvelo y Poupon, 2001).

Durante la invasión y migración se crean interacciones entre las células tumorales y la membrana plasmática, donde intervienen factores de crecimiento, moléculas de adhesión intracelular o a membrana basal, como cadherinas, integrinas, cateninas y otras moléculas de adhesión (Burgués *et al.*, 2005; Gilbey *et al.*, 2004; Welch, D., 2006).

2.1.7 Vía de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt)

La vía de señalización de la fosfatidilinositol3-kinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular, es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina kinasa, los cuales autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS). La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p10). La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteínasa Akt (Figura 2) (Pinzón *et al.*, 2009).

La señalización por Akt juega un papel importante en la supervivencia celular e inhibición de la apoptosis. Inactiva varios factores proapoptóticos como BAD, procaspasa-9 y factores de transcripción FKHR, de igual forma inactiva p53 mediante la activación de MDM2, lo que permite que una célula maligna resista a la apoptosis, sobreviva y prolifere.

PI3K controla transcripción, traducción, metabolismo, crecimiento y proliferación celular. Interactúa con los mecanismos de control de la energía celular y el metabolismo de la glucosa, además está involucrado en los procesos de regulación del ciclo celular al

fosforilar p21 y p27, favoreciendo su translocación al citoplasma y por tanto su degradación. Adicionalmente controla la angiogénesis y la senescencia a través de mecanismos como la activación transcripcional del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la expresión del factor 1 α de hipoxia (H1F1 α).

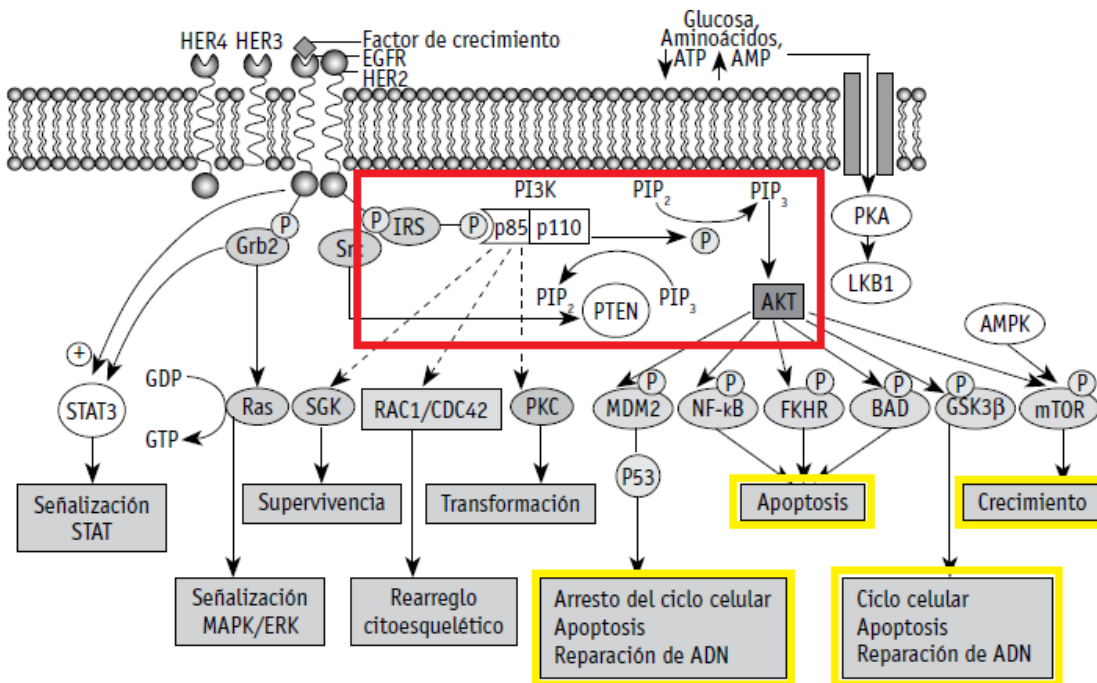


Figura 2. Esquema de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa. En rojo se enmarca la cascada de señales tras estimular receptores de membrana. En amarillo se enmarcan los efectos provocados por la activación de dicha vía. Modificado de Pinzón et al., 2009.

PTEN es una proteína supresora de tumores que se expresa durante la señalización de daño celular, bloqueando la supervivencia de la célula mediante p53, dependiente e independiente de la vía PI3K/Akt.

Dicha proteína se une a p53, favoreciendo su estabilidad e impidiendo la activación inhibitoria de MDM2 sobre la misma, de esta manera se mantiene activa p53 para inhibir la proliferación celular y promover los procesos de reparación por medio de la apoptosis. De esta manera, se protege tanto la integridad genómica como cromosómica de una célula y un tejido en general.

La inhibición de los componentes de la vía PI3K/Akt, puede evitar la resistencia a quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y a los agentes dirigidos en el tratamiento contra el cáncer (Pinzón et al., 2009).

En el cáncer de mama existen importantes interacciones entre los receptores de estrógenos y las kinasas, incluyendo a los miembros de la vía PI3K, los cuales se ven involucrados en la resistencia anti estrogénica. Por tanto, el estado de activación de la vía PI3K contribuye a la resistencia tumoral ante ciertas terapias, lo mismo que ante quimioterapia y radioterapia (Bachman *et al.*, 2004). Las anomalías en la vía son comunes en cáncer y participan en la transformación neoplásica (Kang *et al.*, 2005).

En contraste con p53 y otras vías supresoras tumorales, la vía del PI3K se activa en el cáncer, convirtiéndola en un blanco terapéutico óptimo, ya que es más fácil inhibir los eventos de activación que reemplazar la pérdida de la función supresora de tumores.

Dado que la vía del PI3K es importante para numerosas funciones celulares normales y, en particular, para la vía de señalización de la insulina, la mayor limitante para la implementación de medicamentos que inhiban esta vía, probablemente, será la identificación de blancos y fármacos que garanticen un índice terapéutico suficiente y confiable en la práctica clínica (Pinzón *et al.*, 2009).

2.2 Cadherinas

Las cadherinas forman parte de una familia de glicoproteínas transmembranales que son dependientes de calcio y son responsables de la adhesión célula-célula, por tanto, son de vital importancia para el mantenimiento de la arquitectura de los órganos y tejidos.

Se clasifican en cinco subfamilias de acuerdo a la estructura de sus dominios extracelulares y organización genómica, tipo I o clásicas, tipo II o atípicas, desmocolinas, desmogleínas y protocadherinas.

Cuentan con una región variable de dominios extracelulares (EC) que unen de manera homofílica a las cadherinas que se encuentran sobre células adyacentes, algunas de ellas también disponen de una región transmembranal y un dominio intracelular que interactúa con proteínas denominadas cateninas (α catenina, β catenina y p120), que unen a las cadherinas con la actina del citoesqueleto (Figura 3) (Nieman *et al.*, 1999; Gumbiner, B., 2000; Ivanov *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005).

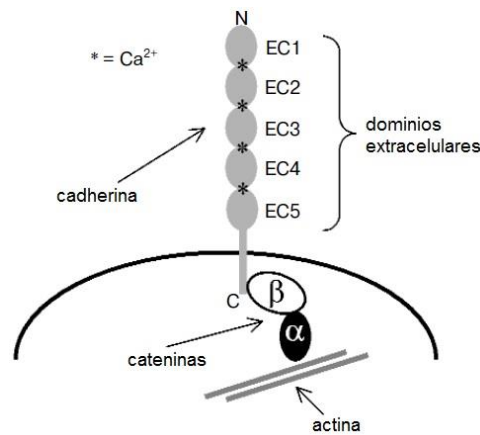


Figura 3. Estructura de las cadherinas clásicas y su interacción con proteínas citoplasmáticas. β catenina se une directamente a la cadherina siendo un enlace para α catenina y la actina del citoesqueleto (Ivanov *et al.*, 2001).

Las cadherinas clásicas se caracterizan por su dominio citoplasmático altamente conservado y son hasta el momento las más estudiadas, en éste grupo se encuentran la cadherina E, la P y la N. Por el contrario, las cadherinas de tipo II, como la cadherina 11, no conservan un dominio citoplasmático debido a una pequeña pero significativa variación de aminoácidos.

La pérdida de cadherina E en carcinomas epiteliales es considerada la razón principal para la ruptura del contacto estrecho célula-célula, dirigiendo la progresión de tumores a un estado invasivo metastásico, adicionalmente proporciona un estímulo oncogénico liberando β catenina de la membrana, donde ésta puede viajar al núcleo y activar genes como c-myc y ciclina D1, que son esenciales en la proliferación e invasión tumoral (Nieman *et al.*, 1999; Peifer y Polakis, 2000; Sarrio *et al.*, 2009).

En cáncer de mama, la expresión de cadherina E es reducida cerca del 50% en los tumores ductales y completamente perdida en la mayoría de los carcinomas lobulares (Berx y Van-Roy, 2001).

Con la pérdida de cadherina E, cadherina N se sobre expresa en líneas tumorales invasivas y tejidos de mama, próstata y melanomas. Se sabe que al transfectar células de mama MCF o BT20 con cadherina N, e inocularlas en ratones desnudos, se induce invasión y migración, por lo que se propone que dichos efectos pueden estar regulados

por el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y otras cadherinas, como cadherina 11 (Nieman *et al.*, 1999).

Cadherina 11 también es conocida como cadherina osteoblasto (OB-cadherina) ya que se descubrió por primera vez en osteoblastos de ratón. Cuenta con dos isoformas, la primera interactúa con β -catenina y otras proteínas intracelulares, tales como P120 y α -catenina, importantes para la señalización y la motilidad. La segunda contiene los mismos dominios extracelulares que la primera, solo que tiene un sitio de corte y empalme alternativo entre los exones 13 y 14 que resulta en la inclusión de 179 pb de secuencia intrónica única, para truncar el dominio transmembranal, por lo que no interactúa con cateninas (Figura 4) (Feltes *et al.*, 2007, Kawaguchi *et al.*, 1999).

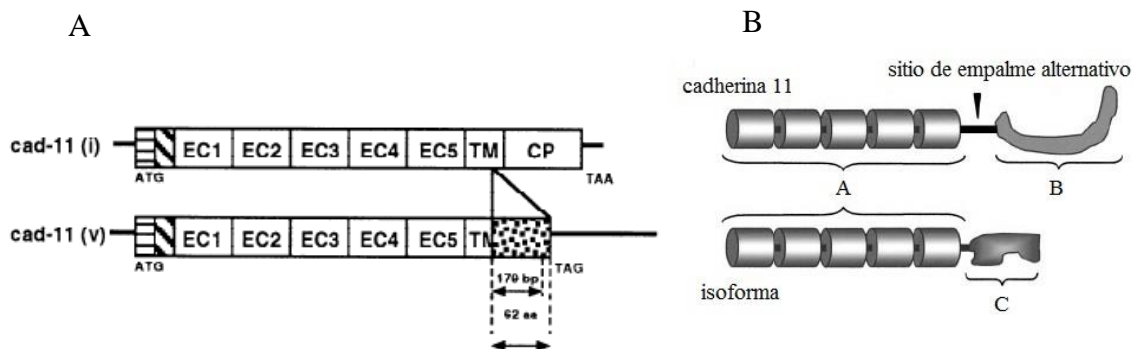


Figura 4. Cadherina 11 y su isoforma. En A se muestra el esquema de la estructura del gen de cadherina 11 y su isoforma, las cajas rayadas representan el péptido señal, EC1-EC5 indican los dominios extracelulares, TM el dominio transmembranal, CP el dominio citoplasmático, la caja punteada destaca la inserción de los 179 pb que codifican a la cadherina isoforma y la línea sólida indica regiones no codificantes. En B se aprecia la estructura de cadherina 11 y su isoforma, en A, se observa que la región extracelular es idéntica en ambas proteínas, mientras que después del empalme alternativo se obtienen diferentes regiones transmembranales y citoplásmicas, como se observa en B y C, para cadherina 11 y su isoforma, respectivamente. (Kawaguchi *et al.*, 1999., Feltes *et al.*, 2007).

Cadherina 11 tiene la capacidad de promover motilidad en células epiteliales de manera similar a cadherina N (Nieman *et al.*, 1999; Feltes *et al.*, 2007; Kawczenski, F.A., 2008), e inclusive su expresión ectópica puede beneficiar la migración celular y la metástasis (Nieman *et al.*, 1999; Pishvaian *et al.*, 1999; Yong *et al.*, 2014).

Se ha observado que cadherina 11 es sobre expresada en distintos tipos de cáncer, incluyendo mama, próstata, osteosarcoma y colon (Waltregny *et al.*, 2002; Sarrio *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2014).

En la Tabla 2 se resumen trabajos en diversas líneas celulares de cáncer de mama donde han evaluado la presencia de ciertas cadherinas, de β catenina y motilidad, donde sugiere Nieman (1999) que la invasión se correlaciona más con la expresión de cadherina N y cadherina11, que a la falta de cadherina E.

Tabla 2. Expresión de Cadherinas en líneas celulares de cáncer de mama Tomado de Nieman et al., (1999, p. 633).

Cell line	E-cadherin	N-cadherin	P-cadherin	Cadherin-11	β -Catenin	Motility
MCF-7	+* [‡]	-*	-*	-*	+* [¶]	No* [‡]
BT-20	+*	-*	+*	-*	+*	No*
SUM149	+*	-*	+*	-*	+*	No*
SKBr3	-* [‡]	-*	-*	-*	-* [¶]	No* [‡]
MDA-MB-453	-* [‡]	-*	-*	-*	-* [¶]	No [‡]
SUM1315	-*	-*	+*	\pm *	+*	No*
MDA-MB-435	-* [‡]	+*	-*	-*	+* [¶]	Yes [§]
MDA-MB-436	-* [‡]	+*	-*	-*	+* [¶]	Yes [‡]
BT549	-* [‡]	+*	+*	-*	+* [¶]	Yes [‡]
Hs578t	-* [‡]	+*	-*	-*	+* [¶]	Yes* [‡]
SUM159PT	-*	+*	-*	-*	+*	Yes*
MDA-MB-231	-*	-*	-*	+* [†]	+*	Yes* [†]

*Current study; [‡]Sommers et al., 1991; [§]Frixen et al., 1991; [¶]Sommers et al., 1994; [†]Pierceall et al., 1995; [†]Pishvaian et al., 1999.

2.3 RNAi

El RNA interferente (RNAi) es un proceso de supresión génica mediado por RNA de doble cadena (dsRNA), que cuando es introducido a una célula u organismo inicia una compleja cascada de eventos, los cuales terminan degradando RNA mensajero (RNAm) de secuencia homóloga al dsRNA originalmente introducido (Hannon, G. J., 2002, Vaca, L., 2004).

El RNAi puede reducir (*know-down*) o eliminar (*knock-out*) la expresión de un gen en células de mamíferos *in vitro* e inclusive en animales *in vivo*. El dsRNA que produce interferencia es reconocido a nivel celular por una maquinaria que regula la degradación o supresión específica del RNAm que contiene la secuencia complementaria de un pequeño RNA interferente (siRNA) introducido o producido (Correa et al., 2007, Sean y Blau, 2006).

La interferencia mediante RNA es un fenómeno evolutivamente conservado de regulación a nivel post transcripcional, que permite silenciar genes por reconocimiento de la secuencia de nucleótidos específicos, ya que se ha descrito como un mecanismo de defensa genómico, de un sistema inmune primitivo capaz de proteger la integridad

del genoma ante la actividad de algunos virus, transposones y otros elementos genómicos transponibles (Correa *et al.*, 2007, Plasterk, R. H. 2002).

Este mecanismo de interferencia ha sido reportado en protozoarios, plantas, hongos, insectos y mamíferos. En animales el proceso fue nombrado RNA de interferencia, en plantas silenciamiento génico post transcripcional "PTGS" y en hongos se conoció como represión génica (Valencia, Y. R., 2010).

La primera fase del complejo de señalización de la interferencia con RNA está a cargo de una RNAasa III denominada Dicer, ésta ribonucleasa fragmenta el dsRNA en porciones de 19-25 nucleótidos de longitud, los denominados siRNA, los cuales son reconocidos por un complejo enzimático formado por varias proteínas llamado RISC, que contiene una helicasa, la cual se encarga de separar las dos hebras del siRNA. Una vez que el RISC se queda con la cadena sencilla antisentido o también llamada cadena guía, una proteína homologa a Dicer denominada Dicer2 con actividad de nucleasa se encarga de degradar el RNAm complementario a la secuencia del siRNA, lo que ocasiona una disminución de la expresión de esa proteína en particular (Correa *et al.*, 2007; Vaca, L., 2004).

Cuando se comenzó a utilizar el RNAi como herramienta experimental, se observó que los dsRNA mayores a 30 pares de bases, desencadenaban una respuesta celular de degradación, por la activación de la respuesta del interferón mediante proteína kinasa activada con RNA (PKR), que es parte del funcionamiento normal de la célula en respuesta a agentes infecciosos o virales (Correa *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2006). Posteriormente se demostró que si el dsRNA era de unos 19-25 pares de bases (siRNA) podía inducir el silenciamiento específico mediante el complejo RISC (Elbashir *et al.*, 2001).

Existen seis métodos para producir siRNAs: síntesis química, transcripción in vitro, digestión de grandes dsRNA, expresión de cassettes por PCR, expresión por vectores virales y por plásmidos. Éstos últimos han demostrado un incremento en el tiempo de silenciamiento debido a que utilizan promotores de RNA polimerasa para la transcripción de pequeñas horquillas de RNA (shRNA) dentro de la propia célula.

Los shRNAs son sintetizados a partir de una sola hebra que codifica para la secuencia sentido de 19 nucleótidos, seguida de 5-10 nucleótidos que forman la estructura de horquilla o *loop* y la secuencia antisentido que es complementaria a la secuencia sentido. Cuando éstos vectores están dentro de la célula el shRNA es transcrito mediante un promotor eucariote de polimerasa como H1 y U6, posteriormente es procesado por Dicer para producir siRNA y finalmente dirigidos hacia su objetivo por el complejo RISC (Banan and Puri, 2004).

El RNAi ha sido utilizado como herramienta para el análisis genómico global, para el estudio de nuevos fármacos, en el tratamiento de pacientes con VIH, Hepatitis virales y con gran énfasis en el cáncer, donde se ha utilizado para identificar los genes críticos para el crecimiento, la diferenciación y la muerte de las células, para proteger las células de la invasión de los virus, para inhibir la génesis del cáncer, y para investigar los mecanismos moleculares de otras enfermedades. Estos pequeños fragmentos de RNA tienen un futuro muy prometedor en la identificación y caracterización de los RNAm específicos para los genes alterados en los diversos cánceres, en la reducción del costo en investigación y desarrollo, así como en la posible formulación de fármacos para una medicina personalizada en el futuro. De hecho, los nuevos tipos de medicamentos de genes tales como oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos 2' - 5' y dúplex de siRNA son buenas alternativas para superar los trastornos funcionales del genoma, tales como diferentes tipos de cáncer (Banerjee, D., 2001; Michalides, R., 1999; Skkipper, M., 2013; Tan and Yin, 2005).

2.4 Proteínas cry

Bacillus thuringiensis es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, quimioorganótrofa y con actividad de catalasa, caracterizada por formar esporas y cristales en su fase estacionaria de crecimiento, como respuesta a la escasez de nutrientes en el medio y mecanismo de supervivencia ante un ambiente hostil. Dichos cristales están compuestos por una mezcla de proteínas denominadas δ endotoxinas, conocidas también como proteínas Cry y Cyt (Ito *et al.*, 2004, Hernández, G., 2014).

Estas proteínas son ampliamente utilizadas como base molecular para la elaboración de bioinsecticidas, ya que se sabe que son tóxicas para las larvas de algunos insectos

de varios órdenes, e incluso a los nematodos, ácaros y protozoos, pero no patógenas para los mamíferos, aves, anfibios o reptiles (Ito *et al.*, 2004).

A partir del año 2000 se comenzaron a descubrir proteínas Cry, no insecticidas y no hemolíticas pero altamente citotóxicas en una amplia gama de células de mamíferos, incluyendo células de cáncer humano (Mizuki *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004; Mendoza, A., G. 2011).

Las toxinas Cry requieren de un receptor específico de membrana plasmática sobre las células para lograr su efecto, en insectos se han descrito cuatro tipos de receptores membranales, cadherinas, glicofosfatidilinositol anclado a aminopeptidasa, glicofosfatidilinositol anclado a fosfatasa alcalina y glicoconjugados (Mendoza, A. G., 2011).

De acuerdo a Bravo (2011), la proteína ya solubilizada en el interior del intestino del insecto tiene una conformación monomérica, la cual se une a proteínas de anclaje como glicofosfatidilinositol unido a aminopeptidasa y glicofosfatidilinositol unido a fosfatasa alcalina, que posteriormente facilitan la unión del monómero con el receptor de cadherina, lo que induce una proteólisis que facilita la formación de oligómeros que se unirán nuevamente a las proteínas de anclaje, para finalmente ser insertadas en la membrana y poder llevar a cabo la formación de poros, que van a provocar un desequilibrio osmótico, lisis celular y la muerte del insecto (Mendoza, A. G., 2011; Hernández, G. C., 2014).

Por otro lado se propone, que la unión de monómeros a receptores de cadherina desencadena una cascada de señalización que lleva a la muerte celular (Zhang *et al.*, 2005).

En el año 2011, Mendoza aisló e identificó diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* de la región Ensenada-Tijuana, de las cuales encontró dos cepas con actividad citotóxica para líneas celulares de cáncer cervicouterino y en tumores *in vivo* en ratones desnudos. Describió que estas toxinas activan una cascada de caspasas que generan muerte celular por apoptosis *in vitro* e *in vivo*, induciendo necrosis hemorrágica del tumor.

Posteriormente en el 2013, Nuñez evaluó dichas proteínas en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y en células de queratinocitos HaCat, concluyendo que las toxinas Cry presentan una mayor actividad citotóxica por la línea MDA-MB-231, debido a la interacción con receptores de membrana cadherina 11, lo que ocasiona una inhibición de la vía PI3K/Akt bloqueando tanto la proliferación como la migración celular e induciendo apoptosis.

3. Justificación e Hipótesis

3.1 Justificación

Se especula cual podría ser el mecanismo de acción de cadherina 11 en el bloqueo de la cascada de señalización de la vía PI3K/Akt en presencia de proteína Cry, más no se conoce de forma certera.

Por lo que en este trabajo se pretende determinar si existe o no un mecanismo de interacción entre proteína Cry y cadherina 11, que pudiera ser responsable del control del proceso de muerte en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Para ello se diseñará un RNA de interferencia contra cadherina 11 que nos permitirá evaluar los efectos anticancerígenos que logra la proteína Cry en células MDA-MB-231 y determinar si dicho proceso se deben a la interacción de ambas proteínas.

Al conocer los efectos del RNAi sobre cadherina 11 podremos saber si es por medio de su mecanismo de acción que se logra una inhibición de la activación de genes encargados de proliferación celular. De esta forma, cadherina 11 se podría utilizar como posible diana para futuras intervenciones terapéuticas en la lucha contra el cáncer evitando la proliferación, invasión y migración celular.

3.2 Hipótesis

La interferencia de la traducción de cadherina 11 en células de cáncer de mama MDA-MB-231, evitará que la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* restablezca apoptosis y disminuya la proliferación y migración celular.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

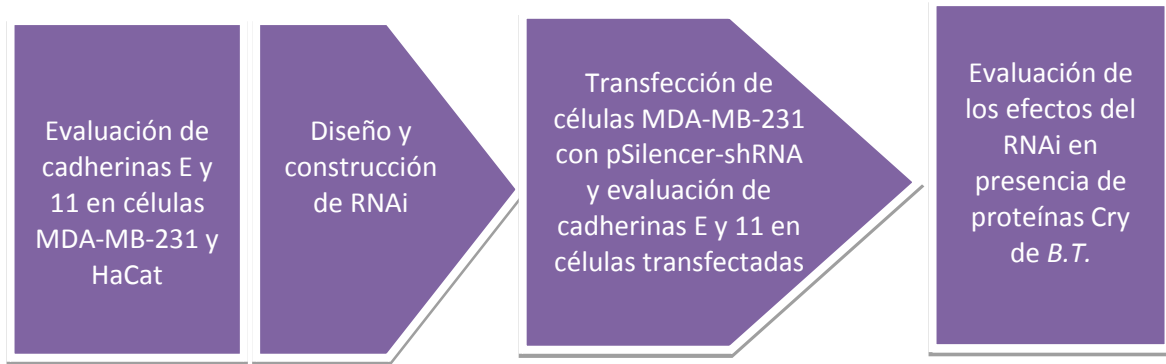
Determinar si cadherina 11 está involucrada en la muerte de células de cáncer de mama MDA-MB-231 cuando interviene la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* por medio de un bloqueo con RNAi.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de cadherina E y cadherina 11 en diferentes etapas de crecimiento de las células MDA-MB-231 y HaCat.
- Evaluar la presencia de cadherina E y cadherina 11 en diferentes etapas de crecimiento de células MDA-MB-231 transfectadas con RNAi de cadherina 11.
- Demostrar que al interferir la traducción de cadherina 11, la toxina Cry no tiene efecto tóxico en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

5. Materiales y Métodos

El desarrollo experimental de este trabajo se dividió en cuatro etapas:



5.1 Cultivo celular

Se utilizaron células de cáncer de mama MDA-MB-231, originalmente recuperadas de efusión pleural con morfología de epitelio y caracterizada por ser un cáncer altamente agresivo, como principal línea de interés en éste trabajo (American Type Culture Collection-ATCC). Y células inmortalizadas de queratinocitos humanos HaCat, que permanecen como no tumorigénicos, fungiendo como células comparativas en las diferentes pruebas.

Las células se conservaban en nitrógeno líquido, para descongelarlas se colocaron en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos o hasta que se descongelara el vial. De inmediato se pasó el contenido a un tubo con 4 ml de medio sin suplementar y se centrifugaron durante 4 minutos a 1200 rpm y 4° C. El paquete celular fue recuperado y re suspendido en 1 ml de medio suplementado que posteriormente se pasó a una caja de cultivo de 75 cm² con 9 ml de medio suplementado. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) de Invitrogen y 2% de antibiótico comercial anti-anti (penicilina/estreptomicina) de Invitrogen. Las células fueron monitoreadas diariamente en un microscopio invertido Olympus CKX41, y de forma rutinaria las cajas se mantuvieron incubadas a 37°C y en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Cada tercer día se hizo un re cambio de medio y al alcanzar un 80% de confluencia celular se

realizaron sub cultivos, manteniendo un crecimiento constante para futuros experimentos.

Para hacer un sub cultivo de células se retiró el medio, se realizaron 3 lavados con 5 ml de PBS 1x pH7 cada uno, las células MDA-MB-231 se disociaron con 1 ml de tripsina (0.25%) durante 1 minuto dentro de la incubadora, HaCat se disoció con 1 ml de tripsina y 1 ml de verseno durante 7 minutos dentro de la incubadora, posteriormente se tomaron 250 μ l de la mezcla disociada y se mezclaron con 10 ml de medio suplementado en una caja nueva.

5.2 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 y HaCat

5.2.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en caja de cultivo celular de 96 pozos.

En cajas de cultivo con 96 pozos se evaluaron diferentes cantidades de células MDA-MB-231, para que después de ser incubadas en un volumen total de 200 μ l de medio suplementado bajo condiciones rutinarias durante 48 horas, alcanzaran baja, media y alta confluencia celular.

Se utilizaron 3 cajas de cultivo con 96 pozos, para el control, cadherina 11 y cadherina E, las células fueron distribuidas de la manera que se muestra en la Figura 5.

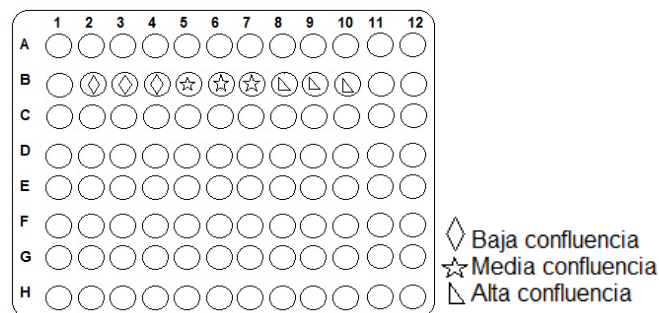


Figura 5. Representación de la organización para la prueba de inmunofluorescencia. En filas diferentes se evaluaron HaCat, MDA-MB-231 y sus respectivas clonas transfectadas.

Alcanzada la confluencia deseada se retiró el medio de cada pozo y se lavó dos veces con 100 μ l de PBS. Se les agregó 100 μ l de solución fijadora (NaPo4 30mM, formaldehído al 3 % y glutaraldehído al 0.3 %) durante 15 minutos a temperatura

ambiente. De inmediato se realizaron 5 lavados con 100 μ l de PBS cada uno, para quitar el exceso. Posteriormente las células fueron bloqueadas con 100 μ l de SFB al 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente (Nieman et al., 1999) y agitación constante. A continuación se prepararon los anticuerpos primarios (1:100 en PBS) E-cadherin goat polyclonal y OB-cadherin goat polyclonal de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Nuñez, 2013) y se adicionaron 100 μ l a cada pozo, en el caso de la caja control únicamente se agregaron 100 μ l de PBS, las cajas fueron incubadas durante 12 horas a 4°C.

Se realizaron 2 lavados con 100 μ l de PBS cada uno y se adicionaron 100 μ l del anticuerpo secundario (1:400 en PBS) mouse anti goat acoplado al fluoróforo Texas Red de Santa Cruz Biotechnology, Inc., el cual se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 2 lavados con 100 μ l de PBS cada uno.

El anticuerpo secundario es fotosensible, por lo que toda su manipulación se realizó en obscuridad, al finalizar la inmunofluorescencia las cajas se cubrieron con papel aluminio para resguardarlas hasta su observación en el microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axionvert 200.

5.3 Diseño y construcción de RNAi

5.3.1 Oligonucleótidos

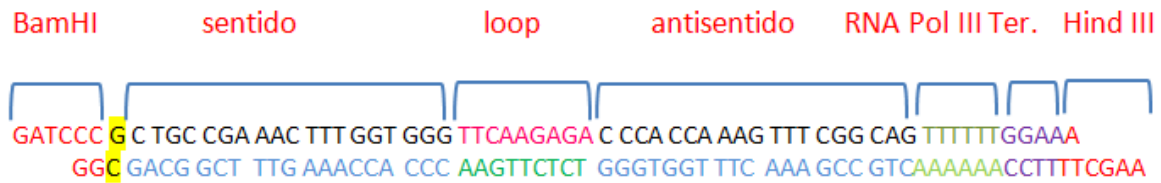
El diseño de los oligonucleótidos que se utilizaron para la producción de shRNA consta de una secuencia sentido publicada por Byers en el 2004, con el número de acceso en GenBank AC_000148.1 y su complementaria como antisentido, se utilizaron tres secuencias diferentes que reconocen el dominio de cadherina 11, cadherina 11 variante o isoforma y ambas. Entre la secuencia sentido y antisentido se encuentran nueve nucleótidos encargados de formar la horquilla o loop (Salvi et al., 2004), en los extremos se ubican secuencias específicas para las enzimas de restricción BamHI y Hind III, adicionalmente se encuentra un templado de poli T como sitio de terminación

de la RNA polimerasa III, una fusión de 5' GGAA 3' que favorece la estructura del shRNA y una base púrica después de la secuencia de la enzima BamHI, esto con el fin de facilitar la transcripción de la RNAPol III (Fig. 6).

A.

<i>Reconocimiento</i>	<i>Secuencia sentido</i>
Cadherina 11	GTCATCGACATCCACGCTG
Variante o Isoforma	GAGGGGGGTTCCATTAAGC
Cadherina 11/Isoforma	CTGCCGAAACTTTGGTGGG

B.



C.

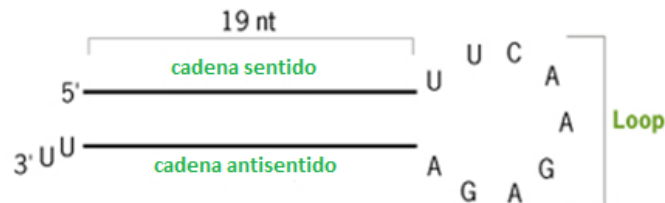


Figura 6. Diseño y construcción de RNAi. A. Secuencias utilizadas para diseñar los shRNA. B. Representación de la estructura de cDNA que sirve como plantilla para la producción de RNAi. C. Estructura final que se obtendrá del shRNAi. Modificado de <http://www.invitrogen.com>.

5.3.2 Vectores de expresión

La secuencia del inserto de cDNA de interés fue ligada en el plásmido pSilencer 2.1-U6 Hygro, el cual tiene una longitud de 4.4 kb, expresa siRNA dentro de las células de mamífero utilizando el promotor humano U6 para la polimerasa III (Chen et al., 2009, Li et al., 2008, Salvi, 2004, Yan et al., 2013, Yi-hua et al., 2004, Zhuang et al., 2008), y el promotor T7 que aumenta la producción de siRNA's. Contiene el gen de resistencia a

ampicilina para selección en bacterias e higromicina para la selección en células eucariotas. Cuenta con sitios de restricción para las enzimas Hind III y BamH I al extremo 5' y 3' de los oligonucleótidos de DNA, respectivamente. Y es adecuado para clonar en cepas de *E. coli* como DH5 α y TOP10 (Figura 7). El vector de expresión pSilencer hygro siRNA incluye un plásmido circular control negativo que expresa un shRNA con homología limitada a cualquier secuencia conocida en genoma de humano, ratón o rata, que puede usarse como control de transfección y un fragmento de DNA que transcribe un shRNA para GFP que en este caso se utilizó como control de ligación.

Durante la clonación en *E. coli* con los vectores de interés, se utilizó el plásmido PDG585 obtenido del laboratorio de Microbiología Molecular de CICESE como control de transformación y posteriormente como referencia de peso molecular.

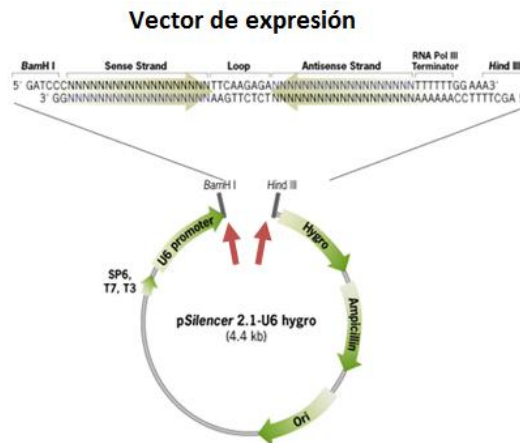


Figura 7. Vector de expresión para siRNA. Se observa el mapa del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro, señalando con flechas rojas los sitios donde se inserta la secuencia previamente diseñada. Vectores de expresión (2013) Recuperado 8 de junio de: <http://www.invitrogen.com>

5.3.3 Hibridación de oligonucleótidos y ligación en pSilencer 2.1-U6 hygro

Para construir la estructura de la secuencia del cDNA que sirvió para transcribir al RNAi se hibridaron los oligonucleótidos, preparando una mezcla de 2 μ l de cada una de las secuencias y 46 μ l de 1x DNA Annealing Solution (Life technologies) para obtener un volumen final de 50 μ l; ésta mezcla se calentó a 90°C durante 3 minutos y posteriormente se incubó a 37° C grados por 1 hora. Terminada la hibridación se ligó de inmediato en el plásmido pSilencer 2.1-U6 Hygro. Para ello se diluyó el templado anidado 1:10 y se preparó una reacción con 1 μ l de la dilución, 1 μ l de 10x T4 DNA

buffer ligasa (Promega), 1 μ l de plásmido pSilencer 2.1-U6 Hygro, 1 μ l T4 DNA ligasa (Promega) y 6 μ l de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 10 μ l; de igual forma se preparó otra mezcla pero ahora con 7 μ l de agua libre de nucleasas y sin producto de hibridación funcionando así como control de ligación. Posteriormente las mezclas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente.

5.3.4 Células competentes y transformación de *E. Coli* DH5 α por choque térmico

El protocolo para preparar células competentes se encuentra en la sección de anexos. Para la transformación por choque térmico se prepararon 5 muestras como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones de la preparación de muestras para transformación por choque térmico.

Tubo	Descripción	<i>E. coli</i> DH5 α . (μ l)	Producto de ligación o plásmido (μ l)
1	pSilencer circular C-	50	2
2	pSilencer + fragmento de interés	50	10
3	pSilencer + GFP	50	10
4	C-	50	----
5	C+ plásmido PDG6535	50	2

Todos los tubos fueron incubados en hielo durante 30 minutos, posteriormente se les dio un shock térmico, 2 minutos a 42° C y 2 minutos en hielo. Enseguida se les agregó 900 μ l de medio LB Miller (ver preparación en sección de Anexos) y se mantuvieron en agitación constante a 250 rpm, 37° C durante 1 hora. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 1 minuto, para descartar 700 μ l del sobrenadante y poder concentrar las células al re suspender el pellet en los 200 μ l de medio restante. Finalmente se sembraron en cajas de agar LB Miller-Amp¹⁰⁰ e incubaron a 37° C 12-24 horas.

Para conservar y aumentar la masa de las colonias con resistencia al antibiótico, algunas colonias se resembraron en cajas de agar LB Miller-Amp¹⁰⁰ y simultáneamente

se crecieron en 3 ml de medio líquido LB Miller-Amp¹⁰⁰, se incubaron a 37° C 12-24 horas y el cultivo líquido se mantuvo en constante agitación a 250 rpm durante 8 horas.

5.3.5 Extracción de DNA plasmídico (DNAP)

Se hizo extracción de DNAP de las colonias crecidas en medio líquido LB Miller-Amp¹⁰⁰, para recuperar gran cantidad de plásmido PDG585 y pSilencer 2.1-U6 hygro de cada una de las transformaciones realizadas. Las células fueron lisadas con una solución Tris-HCl 1 M y EDTA 0.5 M, adicionalmente una solución SDS 10% y NaOH 10 N ayudó a disolver la membrana plasmática y a desnaturalizar proteínas, finalmente el DNAP se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, el protocolo completo se describe en la sección de Anexos. El DNAP purificado fue re suspendido en 80 µl de agua de PCR y almacenado a -20° C.

Las muestras extraídas fueron evaluadas en electroforesis de geles de agarosa al 1.2 % para verificar el tamaño esperado, para lo cual se mezclaron 5 µl de muestra con 1 µl del buffer de carga 10X de Invitrogen. Se corrieron en una cámara horizontal con buffer TBE 1x a 50 V por 15 minutos y 100 V durante 45 minutos. Se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador con cámara de luz UV (302nm, Mod. LSM-20E, UVP, Inc).

5.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó una amplificación de 661 pb de un fragmento del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro para verificar la ligación de nuestros fragmentos de interés.

Los oligos utilizados para la reacción fueron diseñados con el software SnapGene(Snap Gene® Viewer 2.1, GSL Biotech LLC, disponible en <http://www.snapgene.com> consultado en septiembre del 2013) basados en la secuencia del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro publicada en la página web de life technologies y sintetizados por IDT (Tabla 4). Fueron re suspendidos en buffer TE y utilizados a una concentración de 200 ng/µl.

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Secuencia	Longitud pb	Dirección	Tm ° C
GCAGATTGTA CTGAGAGTGC	20	Forward	54
CTCACTAAAGGGAGGAGAAGC	21	Reverse	55

Para realizar la amplificación se prepararon las muestras como se indica en la Tabla 5 y se utilizó un termociclador Bio-RAD iCycler bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5. Especificaciones para preparar el cóctel de PCR.

Componente	Volumen por reacción (µl)
DNAp	1
Taq polimerasa Invitrogen	0.25
Oligo Forward	1
Oligo Reverse	1
dNTP's	1
MgCl ₂ Invitrogen	1.5
Buffer 10X Invitrogen	5
Agua PCR	39.25

Tabla 6. Condiciones del termociclador para la PCR.

Ciclo	Etapas	Temperatura	Tiempo
1 (1x)	1	95° C	1 minuto
2 (25x)	1	95° C	1 minuto
	2	52° C	1 minuto
	3	72° C	2 minutos
3 (1x)	1	72° C	10 minutos
Ciclo 4 (1x)	Etapa 1	4° C	∞

Los productos de PCR fueron evaluados en electroforesis de geles de agarosa al 1.2 % para verificar el tamaño esperado, para lo cual se mezclaron 5 µl de muestra con 1 µl del buffer de carga 10X de Invitrogen. A la par se cargaron 5 µl del marcador de peso

molecular TrackIt™ de Invitrogen para poder identificar el peso de la muestra de interés. Se corrieron en una cámara horizontal con buffer TBE 1x a 50 V por 15 minutos y 100 V durante 45 minutos. Se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador con cámara de luz UV (302nm, Mod. LSM-20E, UVP, Inc).

5.3.7 Digestión con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III

El plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro fue sometido a digestión enzimática con la finalidad de que liberará el fragmento previamente ligado, esta técnica es otra forma de asegurar que el vector contiene el cDNA molde con el que se transcribirá el shRNA de interés.

Se utilizaron las enzimas fast digest de Thermo Scientific Bam HI y Hind III siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó un cóctel como se indica en la Tabla 7, las muestras fueron incubadas en un termociclador Bio-RAD iCycler durante 2 horas a 37° C y para inactivar las enzimas se aumentó la temperatura a 80° C durante 5 minutos. Posteriormente los fragmentos obtenidos fueron evaluados en un gel de agarosa al 2% para verificar los tamaños de los productos y confirmar la liberación del fragmento de interés, para lo cual se mezclaron 10 µl de muestra con 2 µl del buffer de carga 10X de Invitrogen. A la par se cagaron 5 µl del marcador de peso molecular TrackIt™ de Invitrogen para tener una referencia y comparar los fragmentos obtenidos. Se corrieron en una cámara horizontal con buffer TBE 1x a 50 V por 15 minutos y 100 V durante 45 minutos. Se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador con cámara de luz UV (302nm, Mod. LSM-20E, UVP, Inc).

Tabla 7. Especificaciones del cóctel para la digestión con las enzimas de restricción Bam H1 y Hind III.

Componentes	Para DNAP		Para producto de PCR	
	Digestión sencilla μl	Doble digestión μl	Digestión sencilla μl	Doble digestión μl
Agua libre de nucleasas	15	14	17	16
Buffer 10xFast Digest	2	2	2	2
DNA	2	2	10	10
Enzima Fast Digest	1	1 de c/u	1	1 de c/u
Volumen final	20	20	30	30

5.3.8 Secuenciación

Se cuantificaron las muestras, colocando 3 μl de muestra de DNAP en una celda de cuarzo más 1497 μl de agua destilada y se leyeron en el espectrofotómetro HACH DR 5000 en un rango de longitud de onda de 260-280 nm. Para obtener la concentración en ng/ μl de cada muestra, se multiplicó la absorbancia a A260 nm por el factor de dilución por 50 ng/ μl . Algunos datos obtenidos, fueron corroborados en un nanodrop Thermo scientific.

Se enviaron a SEQXCELL alícuotas de 50 μl de volumen total a una concentración de 200 ng/ μl del DNAP de interés y de 30 μl de volumen total a una concentración de 10 μM de oligo forward.

5.4 Transfección de células MDA-MB-231 con pSilencer-shRNA

5.4.1 Cantidad óptima de células MDA-MB-231 para transfección

En una caja de cultivo de 6 pozos, se colocaron las siguientes cantidades de células 60 000, 80 000, 100 000, 150 000, 200 000, 300 000, con 2 ml de medio suplementado de manera rutinaria y tras 24 horas se seleccionó la cantidad que obtuviera aproximadamente 50-70 % de confluencia celular, que es el óptimo para realizar la transfección.

5.4.2 Determinación de la concentración óptima de higromicina

En cajas de cultivo celular de 6 pozos, se colocaron 100,000 células en cada pozo en un volumen total de 2 ml de medio suplementado para evaluar diferentes concentraciones de higromicina B (Sigma) para determinar la concentración mínima que matara al 100% de las células en 14 días, para posteriormente utilizarla en la selección celular durante la transfección.

Las células se incubaron bajo condiciones rutinarias y después de 72 horas se les adicionó 1 ml de medio con higromicina a las diferentes concentraciones a probar, 300 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 700 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 900 $\mu\text{g/ml}$ y 950 $\mu\text{g/ml}$ cada una por triplicado. Las células se mantuvieron durante 14 días bajo las mismas condiciones de incubación, cada tercer día se lavaron con PBS 1x pH7 y se re cambió el medio con la concentración de antibiótico determinada, cada 2 días se examinaron las células y se fotografiaron para comparar los cambios que presentaban a lo largo de las dos semanas.

5.4.3 Transfección de células MDA-MB-231

Se cultivaron 100,000 células en cada pozo en cajas de 6 durante 24 horas con medio suplementado. Se utilizaron dos controles, células sin transfectar en medio libre de antibiótico de selección y células sin transfectar en medio con antibiótico de selección.

La transfección se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante del reactivo escort IV de Sigma. Las siguientes cantidades son para un pozo de 35 mm. Se prepararon dos mezclas, en un tubo cónico se diluyó el DNAp (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1:100 en medio libre de suero y antibiótico. En un segundo tubo se preparó una mezcla liposomal 6:100 de escort IV en medio libre de suero y antibiótico.

Para formar el complejo de transfección, el DNAp se adicionó a la preparación liposomal y se mezcló gentilmente, posteriormente se agregaron 800 μl de medio sin suplementar y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente, se le adicionó 1 ml de medio suplementado con 20 % de SFB. Después de incubar las células durante 24 horas, se les retiró el medio e inmediatamente se les agregó los 2 ml

de la solución DNAp-liposoma, se incubaron bajo condiciones rutinarias durante 24 horas. Se retiró el medio y se reemplazó con 2 ml de medio suplementado de manera rutinaria sin antibiótico de selección y se incubaron por 24 horas más. Después de las 48 horas se les adicionó la higromicina como antibiótico de selección a la concentración determinada en el apartado 5.3.2.

Las células se mantuvieron con higromicina durante 3 semanas con recambio de medio cada tercer día para seleccionar la clona estable que se retó con la proteína Cry de *B. T.*

Posterior a las 3 semanas, las células que resistieron a la higromicina, fueron monitoreadas y se mantuvieron con re cambios de medio con higromicina bajo condiciones rutinarias, hasta alcanzar confluencia adecuada para ser disgregadas con tripsina y evaluar los efectos del RNAi.

5.4.4 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231 transfectadas

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, estandarizada en la sección 5.2.1, se evaluó la cantidad de receptores de cadherinas detectados a través de anticuerpos anti cadherina E y anti cadherina 11 en células transfectadas.

5.5 Evaluación de los efectos del RNAi en presencia de proteínas Cry de *B.T.*

5.5.1 Viabilidad celular. Evaluación de proteína Cry de *B. T.* en células MDA-MB-231transfectadas.

En una caja de cultivo de 96 pozos, se colocaron 10,000 células de cada una de las clonas de MDA-MB-231 a evaluar, en un volumen total de 100 μ l de medio suplementado en el orden que se muestra en la Figura 8, el control negativo contenía células con medio, el control positivo células con DMSO y el blanco únicamente medio sin suplementar. Las células fueron incubadas durante 24 horas bajo condiciones rutinarias.

Posteriormente se re cambió el medio por 100 μ l de medio sin suplementar y se incubaron 24 horas más.

Después de las 48 horas de incubación se prepararon dos cocteles, uno para evaluar la toxina con 80 μ l de medio sin suplementar y 20 μ l de proteína Cry por pozo. Y otro como control positivo con 80 μ l de medio sin suplementar y 20 μ l de DMSO por pozo. Se sustituyó el medio de las células con los respectivos cocteles y se incubaron durante 2 horas.

A continuación a cada pozo se le adicionó 100 μ l con medio sin suplementar y MTT (5 mg/ml en PBS) 1:1, se incubaron durante 2 horas más (Nuñez, 2013)

Se retiró el medio con mucho cuidado para no dañar los cristales formados y se agregó a cada pozo 100 μ l de isopropanol frío para disolver los cristales en agitación constante. Finalmente las muestras se analizaron en un lector de placas de BIO RAD 680 a una longitud de onda de 490 nm. (Nuñez, 2013)

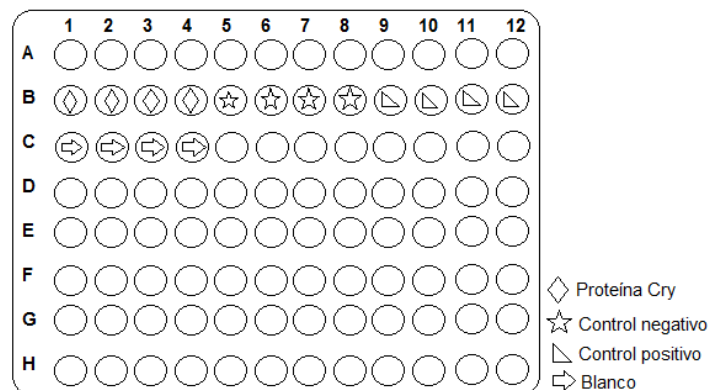


Figura 8. Representación de la organización para la prueba de Viabilidad celular. Se utilizaron dos filas para evaluar MDA-MB-231 y dos filas para cada clona, (MDA-MB-231-shRNAcdh11, MDA-MB-231-shRNAiso y MDA-MB-231-shRNAcdh11/iso).

6. Resultados

6.1 Evaluación de la presencia de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 y HaCat, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

En cajas de 96 pozos, se colocaron 1000 células para obtener confluencia baja, 3000 células para confluencia media y 9000 células para confluencia alta, todas las células alcanzaron la confluencia deseada después de 48 horas de incubación.

Se analizó la presencia de receptores de membrana de cadherina 11 y cadherina E en diferentes confluencias tanto en células MDA-MB-231 como en HaCat. Se observó que ambos receptores se encuentran en las dos líneas celulares independientemente de la confluencia y que la cantidad de receptores detectados si es dependiente de la confluencia, a mayor confluencia, mayor detección de receptores.

En células MDA-MB-231 se detectó mayor presencia de receptores de cadherina 11 comparado con los de cadherina E (Figura 9), de forma contraria, la línea celular HaCat presentó elevadas cantidades de receptores de cadherina E comparados con los obtenidos para cadherina 11 (Figura 10).

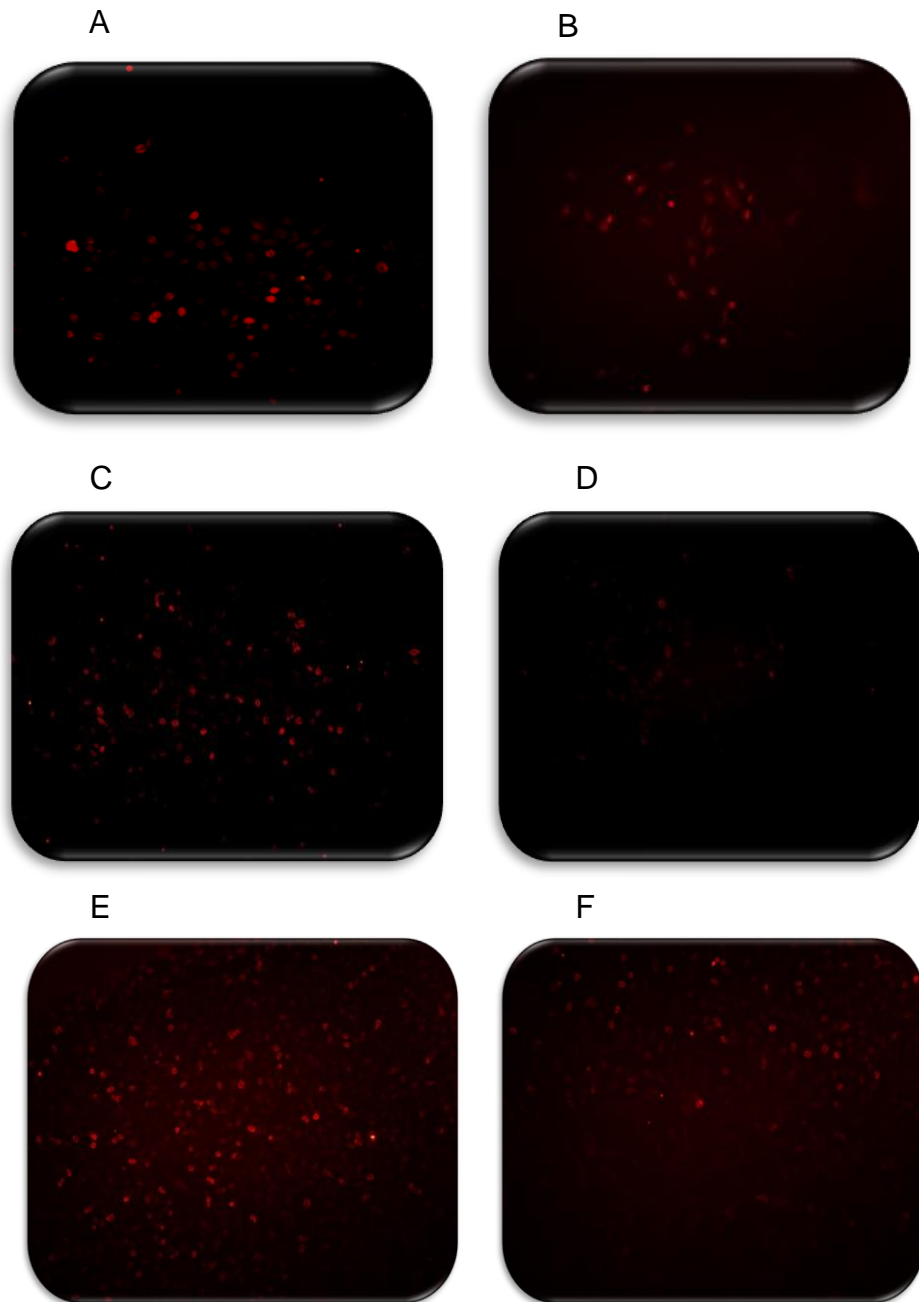


Figura 9. Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 a diferentes confluencias. Fotografías representativas de la detección de cadherina 11 en confluencia baja (A), confluencia media (C) y confluencia alta (E). De igual forma, la detección de cadherina E en confluencia baja (B), confluencia media (D) y confluencia alta (F).

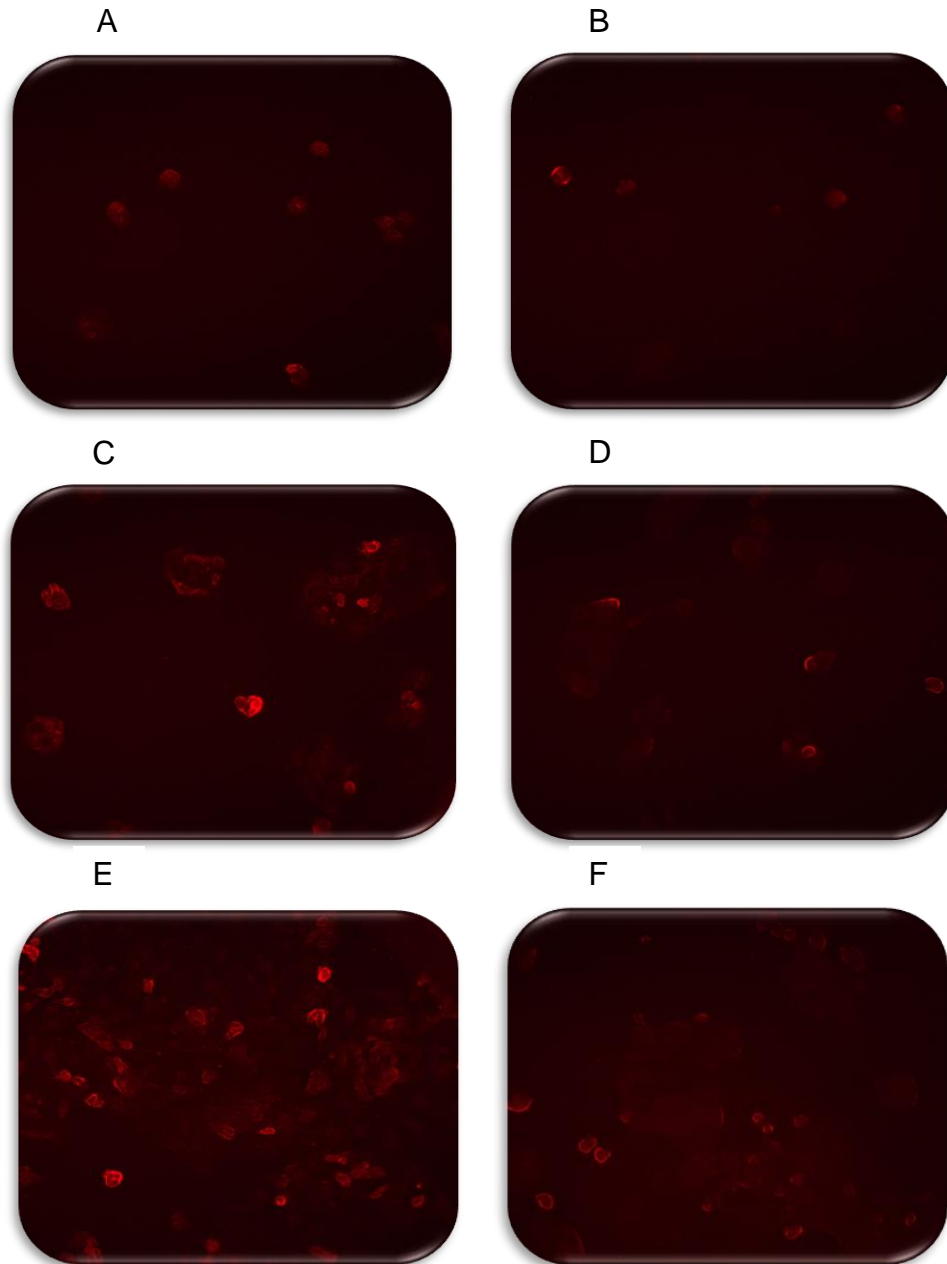


Figura 10. Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células HaCat a diferentes confluencias. Fotografías representativas de la detección de cadherina E a confluencia baja (A), confluencia media (C) y confluencia alta (E). De igual forma, la detección de cadherina 11 en confluencia baja (B), confluencia media (D) y confluencia alta (F).

Se fotografiaron cada uno de los pozos y se cuantificaron las células marcadas con anticuerpos anti cadherina 11 y anti cadherina E, con la finalidad de obtener un panorama de la distribución de receptores cadherina en ambas líneas celulares y determinar si existía un patrón entre la cantidad de éstos y la confluencia.

En las células MDA-MB-231 se observó que en confluencia baja y alta, cadherina 11 presenta el doble de receptores que los de cadherina E, en el caso de confluencia media, cadherina 11 se encuentra tres veces más que cadherina E. Por el contrario, en células HaCat se detectó el doble de receptores de cadherina E que de cadherina 11 en todas las confluencias (Figura 11).

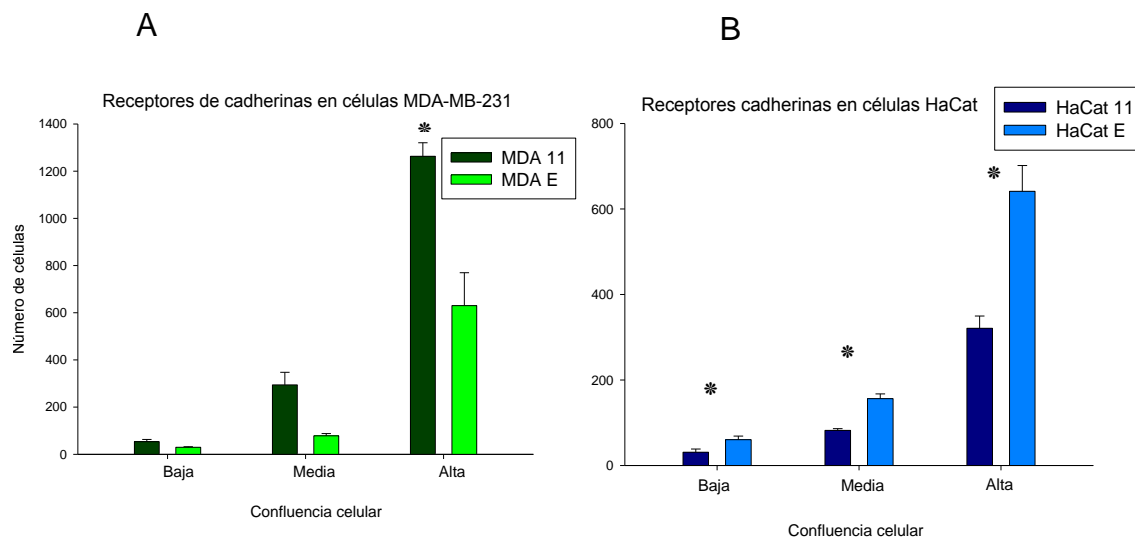


Figura 11. Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferente confluencia en células MDA-MB-231 y HaCat. Se muestran dos histogramas donde se observa la cantidad de células MDA-MB-231 (A) y HaCat (B), que presentan cadherina 11 y cadherina E, a baja, media y alta confluencia. Media \pm EE. * < 0.05, T student pareada.

6.2 Diseño y construcción de RNAi

6.2.1 Transformación de *E. Coli* DH5 α por choque térmico

Con el fin de verificar que la ligación del plásmido con el inserto de interés y el fragmento de GFP, al igual que el plásmido pSilencer control negativo se encontrara en buenas condiciones, se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron cajas de LB Miller-amp¹⁰⁰ con un número considerable de colonias para las muestras

PDG585 (P1), pSilencer C-, pSilencer cadherina 11 (shRNAwt), p Silencer cadherina 11 isoforma (shRNAiso), pSilencer cadherina 11/cadherina 11 isoforma (shRNAwt/iso) y pSilencer GFP (Figura 12 A). Una caja LB Miller-Amp¹⁰⁰ con tan solo 5 colonias resultado del plásmido más ligasa, sin inserto. Y una caja más sin colonias, resultado de un buen control negativo.

Todas aquellas bacterias que crecieron bajo dichas condiciones, indicaban resistencia a ampicilina, la cual había sido conferida por la adquisición del plásmido pSilencer 2.1-U6 Hygro o PDG585 durante la transformación. Para mantener un resguardo de las células resistentes se seleccionaron colonias aleatoriamente y se sembraron en cajas LB Miller-Amp¹⁰⁰ como se observa en la Figura 12 B.

6.2.2 Extracción de DNAp

Además del resguardo que se hizo en medio sólido, se crecieron colonias aleatoriamente de pSilencer H, ISO, WT, pSilencer GFP, pSilencer C- y colonias de PDG585 en medio líquido LB Miller-Amp¹⁰⁰ para posteriormente hacer una extracción de DNAp y recuperar la mayor cantidad posible de plásmido, en el caso de pSilencer para su futuro uso en la transfección de células MDA-MB-231.

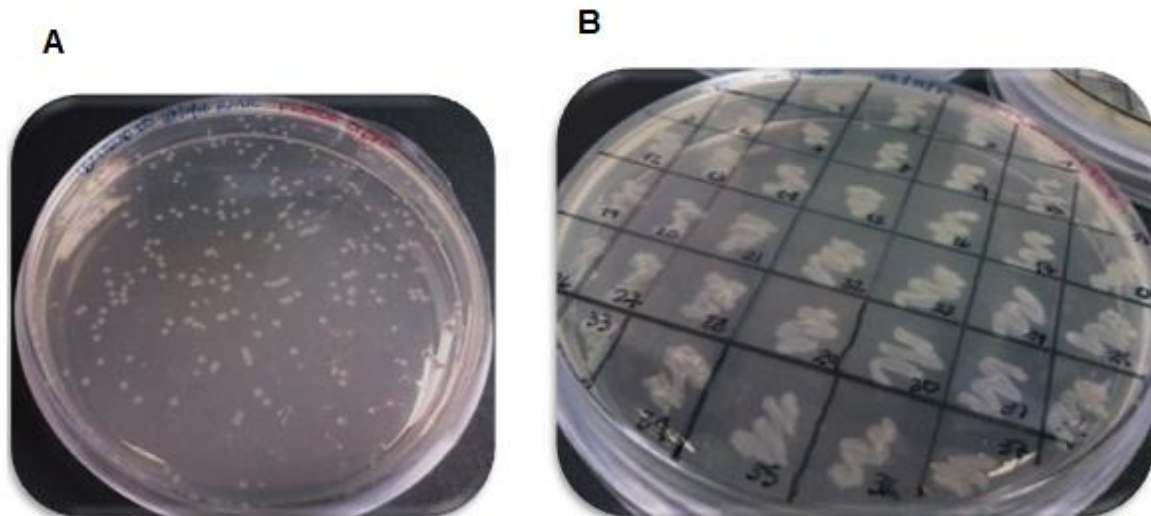


Figura 12. Transformantes con pSilencer 2.1-U6 hygro. En la fotografía A se muestran las colonias de la muestra pSilencer C- crecidas en agar LB Miller-Amp¹⁰⁰. Y en la fotografía B se observa la resiembra de las colonias que lograron adquirir el vector de expresión, para su resguardo.

En la Figura 13 se muestran un gel de agarosa al 1.2 % donde se evaluó el material obtenido de la extracción de DNAP y una tabla que indica la muestra que contiene cada carril en el gel. El peso del plásmido PDG585 es de 8,000 pb aproximadamente y se ubica en el carril 1. El peso del plásmido pSilencer 2.1-U6 es de 5000 pb aproximadamente y se ubican del carril 2 al 6 en el orden que se describe en la Figura 13.

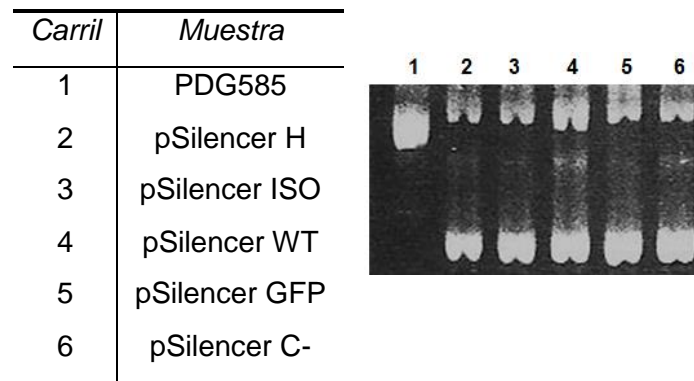


Figura 13. Evaluación de DNAP en gel de agarosa. Se muestra el orden en el que se cargaron las muestras en el gel y el bandeo obtenido en cada carril.

Aunado a esto, en la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos a partir de la extracción del DNAP de colonias que crecieron al transformarse con plásmido y ligasa en ausencia de inserto.

La falta de DNAP en éstas muestras sugieren que algunos plásmidos lograron cerrarse en presencia de ligasa otorgando de ésta manera la resistencia a ampicilina de las pocas células transformadas y durante el proceso de extracción se pierde al ser linearizado.

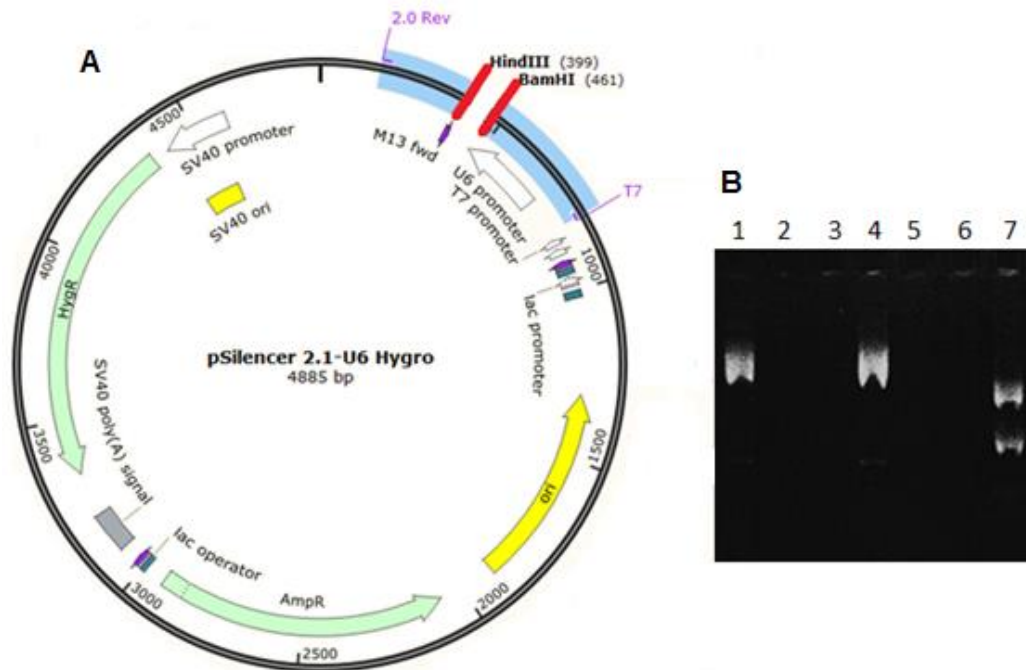


Figura 14. Evaluación de DNAP en ausencia de inserto en gels de agarosa. En la imagen A se muestra el mapa del plásmido de interés sin el inserto de cDNA, entre líneas de color rojo se delimita el espacio donde normalmente se hace la ligación de los oligonucleótidos que servirán de base para la transcripción de shRNA. En la imagen B se muestra la fotografía resultante del gel de agarosa, en el carril 1 DNA comparativo del plásmido PDG585, carril 2 y 3 muestra sin inserto, carril 4 PDG585, en el carril 5 y 6 muestra sin inserto, finalmente en el carril 7 muestra con inserto.

6.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificó un fragmento de 661 pb que incluye el fragmento de interés, en la Figura 15 A se muestra el mapa del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro en el cual se resalta con azul la zona de amplificación y con flecha roja se indica el sitio donde debe encontrarse la ligación de los oligonucleótidos para shRNA.

Todas las muestras analizadas amplificaron un fragmento por encima de los 600 pb. Del carril 1 al 6 se observan las muestras de H, ISO, WT, GFP, pSilencerC- y PDG585, respectivamente (Figura 15 B).

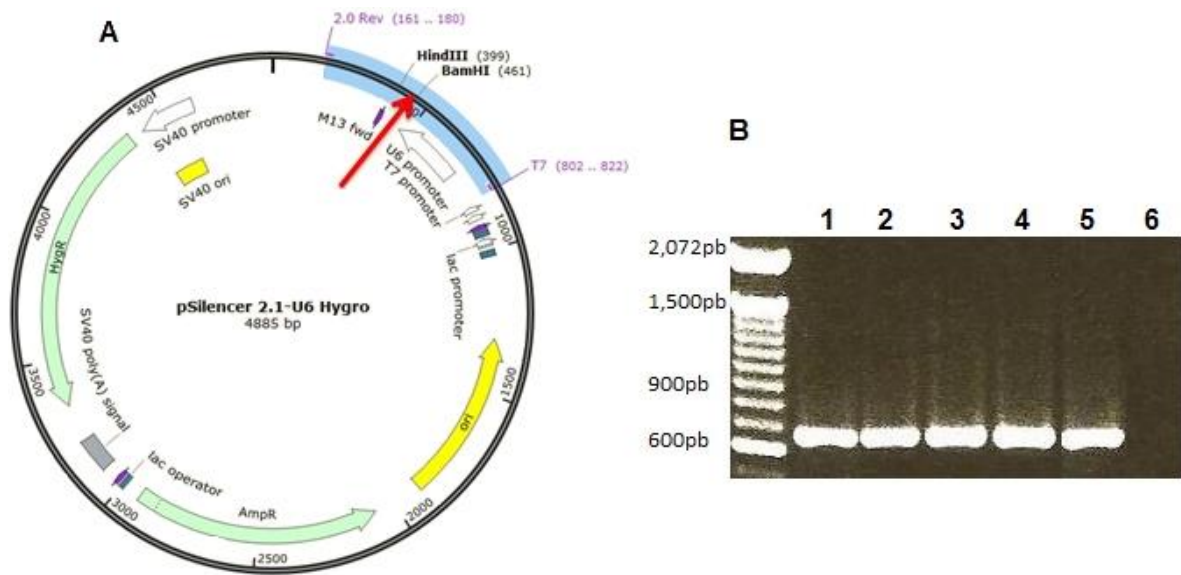


Figura 15. Fragmentos amplificados en la PCR. En A se muestra el mapa del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro. En B se observa la fotografía del gel de agarosa, con la amplificación de un fragmento superior a 600 pb para todas las muestras, la amplificación del plásmido PDG585 fue utilizado como control negativo.

6.2.4 Digestión con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III

En la Figura 16 A se ilustra el fragmento de 661 pb que se obtiene de la amplificación por PCR, con líneas rojas se delimitan las tres secciones que se obtienen al digerir la muestra y se observa el número de bases que constituye a cada una.

La fotografía que se observa en la Figura 16 B muestra el resultado de la digestión de shRNAwt/iso, shRNAiso, shRNAwt y pSilencerC- con una o ambas enzimas.

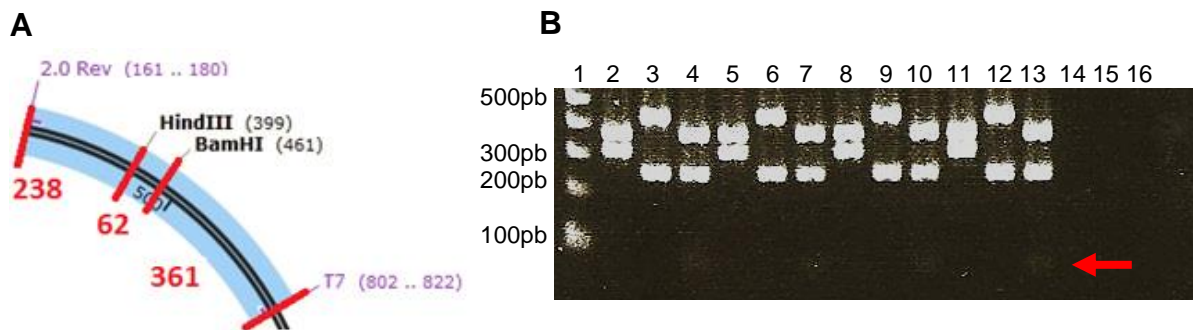


Figura 16. Digestión del plásmido pSilencer 2.1-U6 hygro con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III. En A se muestra la representación del fragmento amplificado por la PCR donde se indican los sitios de corte de cada enzima y el número de pares de bases que conforma cada segmento. En B se muestra del carril 2 al 4 la muestra shRNAwt/iso, de 5 al 7 la muestra shRNAiso, del 8 al 10 la muestra shRNAwt, del 11 al 13 pSilencerC- y del 14 al 16 un control negativo. Las muestras de los carriles 2, 5, 8, 11 y 14 fueron tratadas con la enzima Bam HI, las muestras de los carriles 3, 6, 9, 12 y 15 fueron tratadas con la enzima Hind III, las muestras de los carriles 4, 7, 10, 13 y 16

fueron tratadas con ambas enzimas. El corte realizado con la enzima Bam HI da como resultado dos fragmentos, uno de 361 pb y otro de 300 pb. La enzima Hind III proporcionó dos fragmentos, unos de 238 pb y otro de 423 pb. El corte realizado por ambas enzimas mostró tres fragmentos, uno de 238 pb, otro de 361 pb y uno muy pequeño de 62 pb, con el cual se obtuvo una banda muy tenue y es señalada con la flecha roja.

6.2.5 Secuenciación

La secuenciación presentó ciertos inconvenientes, debido a que en los resultados entregados por la empresa SEQXCELL reportaban secuencias incompletas, a la formación de estructuras secundarias durante la secuenciación, lo que se atribuyó a la formación de la horquilla del shRNA. Sólo se obtuvieron de manera completa dos secuencias que pertenecen al shRNAH y al shRNAGFP, las cuales fueron alineadas con los nucleótidos de la secuencia sentido de la estructura del shRNA de interés en el programa Clustal W2, como se muestra en la Figura 17. A pesar de éstos detalles, los resultados obtenidos por la PCR, los cortes con enzimas de restricción y posteriormente la transfección, nos indican que todas las clonas seleccionadas para los experimentos contaban con el inserto de interés.



Figura 17. Secuenciación. Se muestra la alineación de una parte de la secuenciación junto con los nucleótidos que conforman la secuencia sentido de la shRNA. En A se muestra la alineación del shRNAH y en B se observa el shRNAGFP.

6.3 Transfección de células MDA-MB-231 con los diferentes shRNA's

6.3.1 Determinación de cantidad óptima de células MDA-MB-231 para transfección y concentración óptima de higromicina como antibiótico de selección.

Después de cultivar diferentes cantidades de células, 60 000, 80 000, 100 000, 150 000, 200 000, 300 000 en cajas de 6 pozos, se observó que 100 000 células es la cantidad adecuada para llevar a cabo la transfección, de igual manera, después de mantener las células durante 14 días con higromicina a concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 700 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 900 $\mu\text{g/ml}$ y 950 $\mu\text{g/ml}$, se determinó que la concentración óptima para seleccionar clonas transfectadas con higromicina es de 950 $\mu\text{g/ml}$. En la Figura 18 se observa cómo con el paso de los días las células se van despegando y deformando en presencia de higromicina.

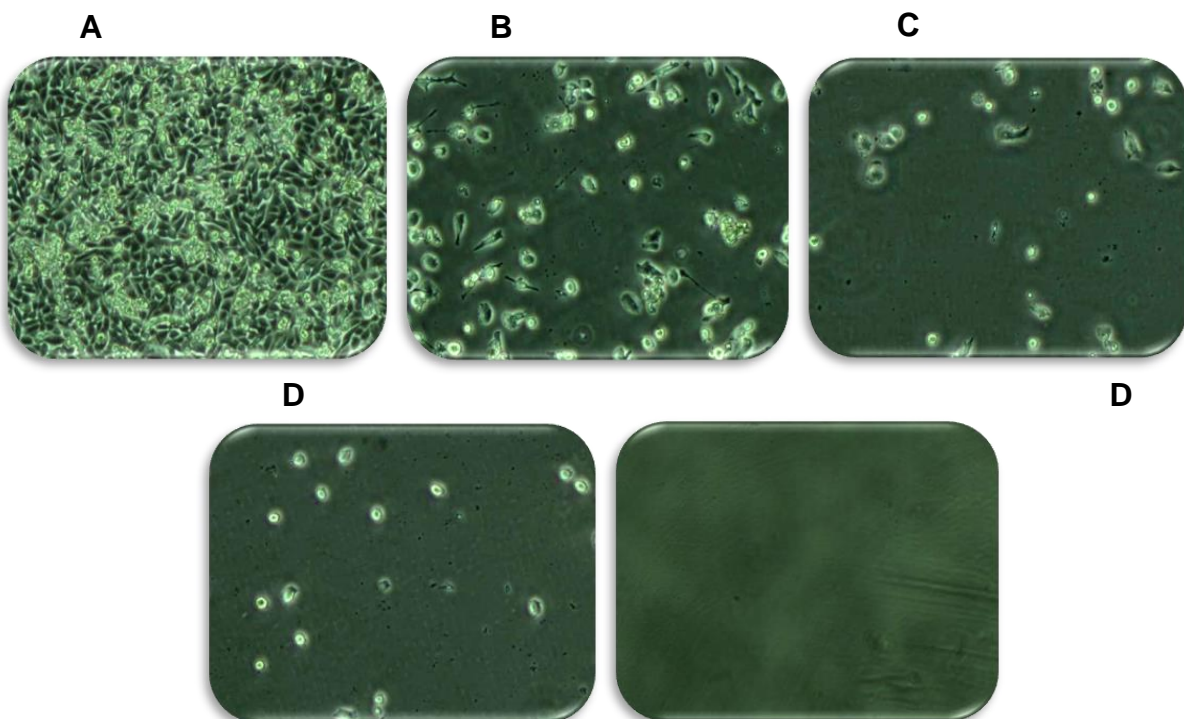


Figura 18. Concentración óptima de higromicina para seleccionar clonas post transfección. Fotografías con objetivo 4x, de las células que se mantuvieron con 950 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de higromicina. En A se observan las células control, las cuales permanecieron durante 14 días con re cambio de medio y sin antibiótico de selección, en B se muestra las células después de 8 días con higromicina, en C se aprecian las células a los 10 días de selección, la fotografía D corresponde a las células después de 12 días con antibiótico de selección y finalmente en E se muestra la ausencia de células después de 14 días con higromicina.

6.3.2 Transfección

Después de la transfección, las células se mantuvieron con antibiótico de selección durante 3 semanas, las células no transfectadas y sin antibiótico, presentaron un crecimiento normal, manteniendo la morfología característica y una rápida proliferación como se observa en la Figura 19 A, B y C. Las células sin transfectar y con antibiótico, crecieron lentamente durante un par de días y posteriormente con el paso del tiempo se deformaron y despegaron, perdiéndose en cada lavado, como se aprecia en la Figura 19 D, E y F.

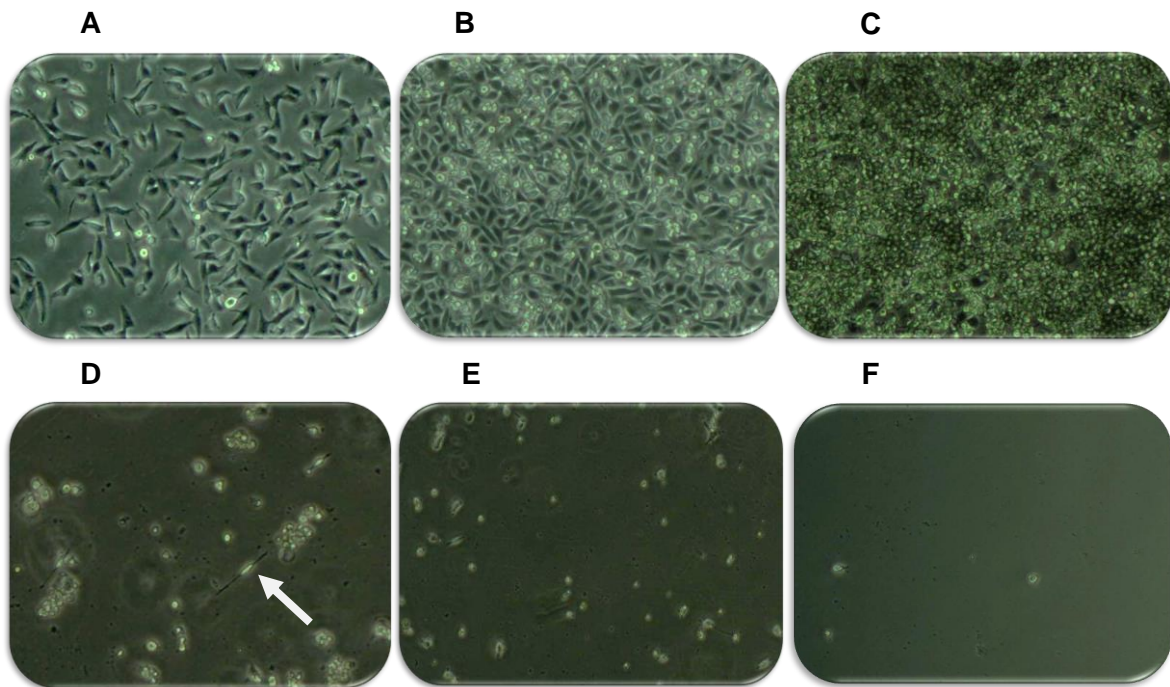


Figura 19. Crecimiento de células MDA-MB-231 en experimento post transfección. En A, B y C se muestran las células no transfectadas y sin antibiótico de resistencia, al día 0, día 4 y a la tercera semana, respectivamente. Las células permanecieron adheridas con su característica morfología alargada y crecimiento disperso. En D, E y F se observan las células sin transfectar y con higromicina, a los 10 días, 12 días y 14 días, respectivamente. Las células se alargaron hasta parecer hilos como se muestra con la flecha blanca en la fotografía D, otras se fragmentaban y despegaban, permaneciendo flotando en el medio hasta perderse durante los re cambios de medio.

Las células que fueron transfectadas y que se mantuvieron con higromicina durante tres semanas, presentaron un comportamiento similar al de aquellas células no transfectadas y mantenidas con antibiótico, la diferencia fue que a partir de la tercer semana se comenzaron a observar pequeños cúmulos de células en monocapa que formaban círculos (Figura 20 A), dichas células no presentaron deformaciones y permanecieron adheridas, con el tiempo los círculos fueron aumentando su diámetro

lentamente, hasta unirse entre ellos (Figura 20 B), perdiendo su crecimiento disperso característico (Figura 20 C), pero adquiriendo cierto parecido al particular crecimiento de células HaCat (Figura 20 D y E). Las células MDA-MB-231 shRNAwt y MDA-MB-231 shRNAiso lograron alcanzar una confluencia del 90% 33 días después de la transfección, bajo condiciones rutinarias y con re cambio de medio con higromicina. Las células MDA-MB-231 shRNAwt/iso alcanzaron una confluencia del 90 % 48 días después de la transfección.

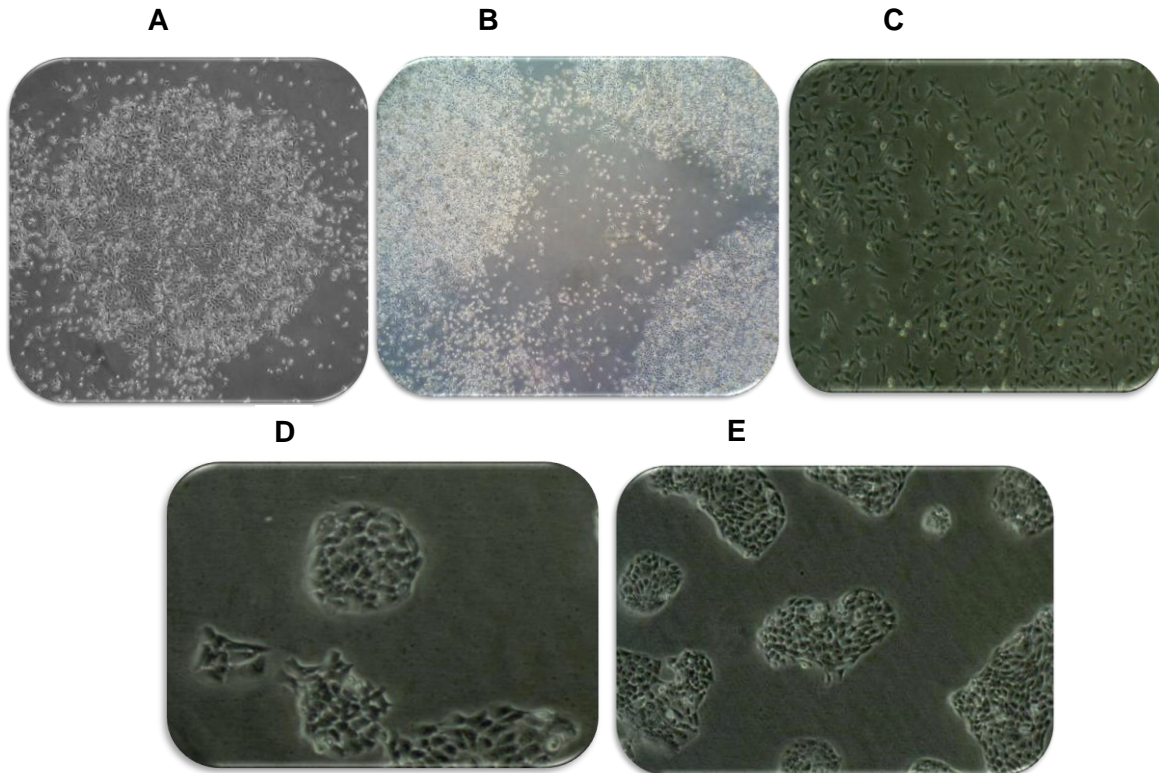


Figura 20. Transfección de células MDA-MB-231. En A se observan las células transfectadas después de 3 semanas con higromicina, comenzando a formar una monocapa en forma de círculo, la cual creció conservando la monocapa esférica, hasta toparse con otras monocapas, como se aprecia en la imagen B, perdiendo su característico crecimiento disperso como se observa en C con células MDA-MB-231 sin transfectar. En D y E se muestra la forma característica en la que crece HaCat, siendo muy similar al comportamiento que adquirieron las células transfectadas.

Aunado a esto, con la transfección las células presentaron cambios morfológicos, los cuales se apreciaron al formarse las monocapas, las células crecieron muy pegadas unas con otras, como si estuvieran comprimidas, perdiendo su forma alargada y mostrándose más circulares (Figura 21 B), muy parecido al crecimiento característico de las células HaCat (Figura 21 C).

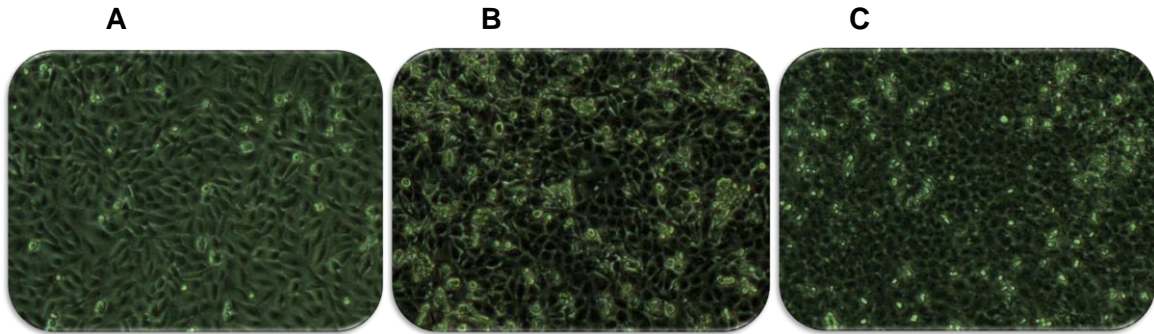


Figura 21. Pérdida de morfología en células MDA-MB-231 transfectadas. En A se observan células MDA-MB-231 sin transfectar. En B se aprecian células transfectadas y en C se muestran células HaCat.

Cuando las células alcanzaron el 90 % de confluencia, fueron disociadas con tripsina para preparar experimentos. Con las células restantes se hicieron sub cultivos, en el caso de las células con shRNA wt o shRNA iso, permanecieron 24 horas sin higromicina para que las células se adhirieran correctamente, posteriormente permanecieron bajo condiciones rutinarias y se observó que obtuvieron el 90% de confluencia en menor tiempo, al hacer el segundo sub cultivo, las células comenzaron a perder adherencia y presentaron una morfología alargada como hilos, lo cual nos indicó la pérdida de los plásmidos. En el caso de las células transfectadas con shRNAwt/iso, en el primer sub cultivo se utilizaron 12 μ l de higromicina (50 mg/ml) en un volumen total de 3 ml de medio suplementado, con la finalidad de mantener el plásmido dentro de la célula y la adhesión de las mismas.

6.3.3 Detección de receptores de membrana. Inmunofluorescencia indirecta

Con la finalidad de verificar y fortalecer las observaciones resultantes de la transfección y analizar la disminución de la traducción de receptores cadherina 11 provocada por la interferencia de los diferentes plásmidos, así como el comportamiento de cadherina E en ausencia o baja de cadherina 11, a todas las células se les aplicó inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti cadherina 11 y anti cadherina E.

En la Figura 22 se muestran fotografías que representan la presencia tanto de cadherina 11 como de cadherina E en células transfectadas con shRNAwt, donde

permanece intacta cadherina 11 isoforma. Se observa que la cantidad de receptores de cadherina 11 es menor comparados con los de cadherina E.

En la Figura 23 se muestran las fotografías representativas de células transfectadas con shRNAiso, donde permanece intacta cadherina 11 wt, marcadas con anticuerpos para cadherinas E y 11. Se puede apreciar que cadherina 11 nuevamente presenta una considerable disminución comparada con los resultados obtenidos para cadherina E.

En la Figura 24 se muestran fotografías representativas de la presencia de las cadherinas E y 11 en células transfectadas con shRNAwt/iso. Se aprecia que a pesar de estar interfiriendo la traducción de cadherina 11 y de su isoforma, se detecta baja concentración de las mismas, comparada con las células sin transfectar.

Tanto en la Figura 22, 23 y 24, se aprecia un aumento en la detección de cadherina E, comparando lo encontrado en células MDA-MB-231, sin transfección, como se mostró en la Sección 6.1

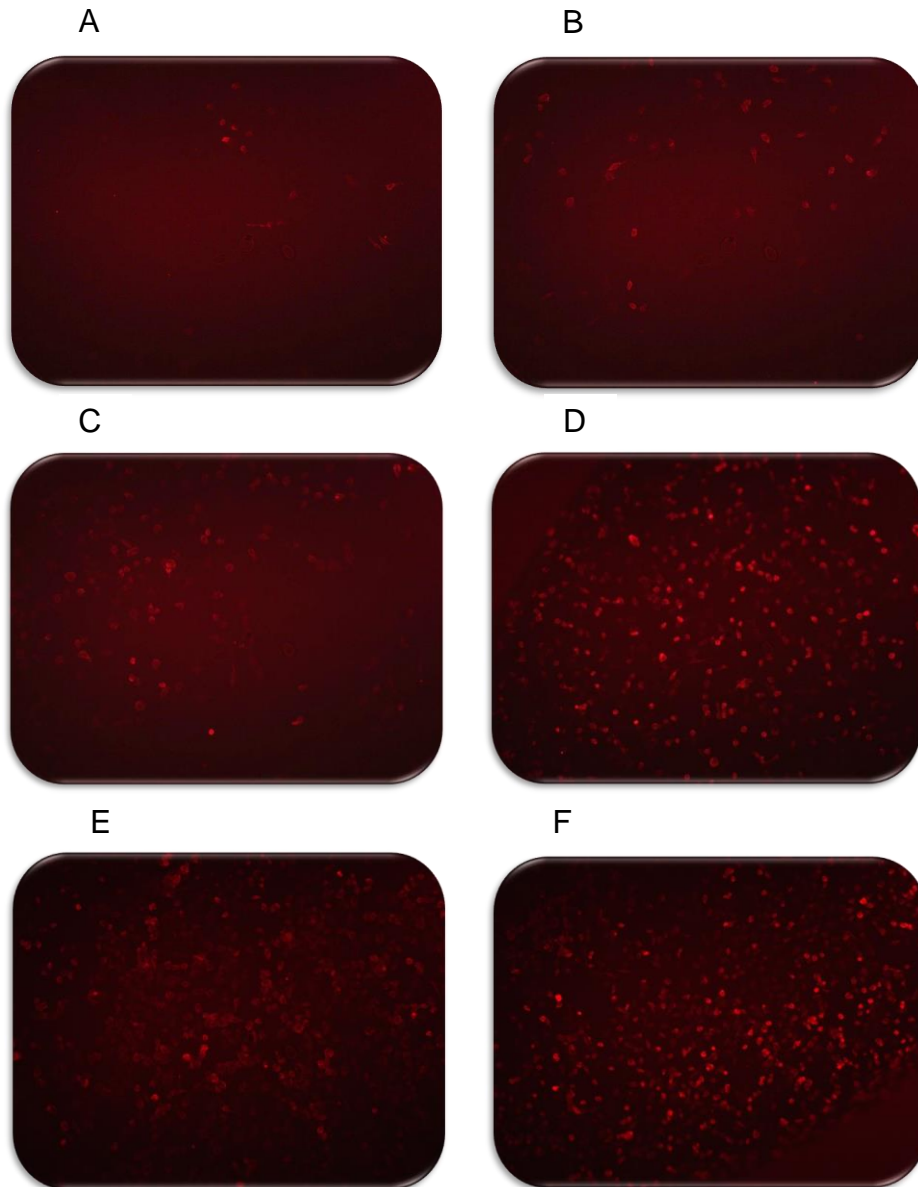


Figura 22. Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt a diferentes confluencias. Fotografías representativas de la detección de cadherina 11 a confluencia baja (A), confluencia media (C) y confluencia alta (E). De igual forma, la detección de cadherina E en confluencia baja (B), confluencia media (D) y confluencia alta (F).

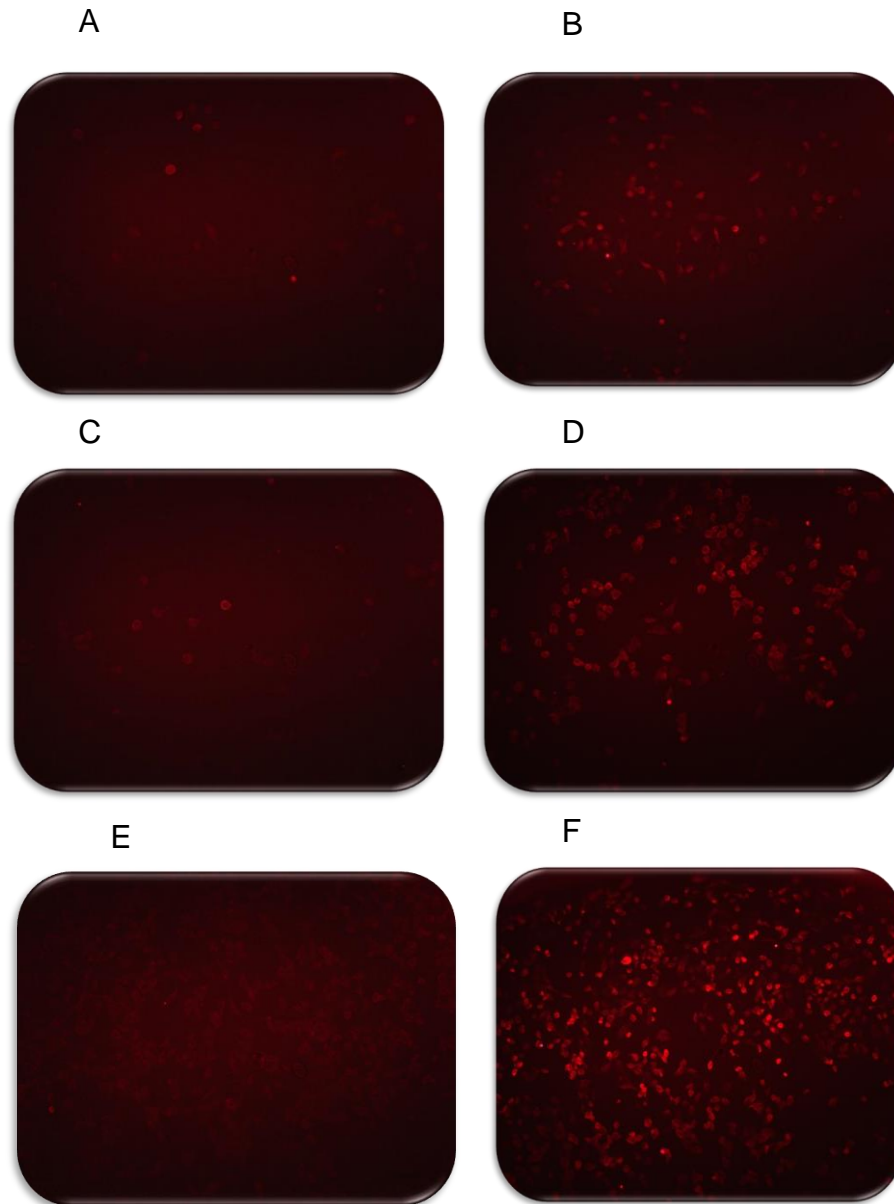


Figura 23. Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAiso a diferentes confluencias. Fotografías representativas de la detección de cadherina 11 a confluencia baja (A), confluencia media (C) y confluencia alta (E). De igual forma, la detección de cadherina E en confluencia baja (B), confluencia media (D) y confluencia alta (F).

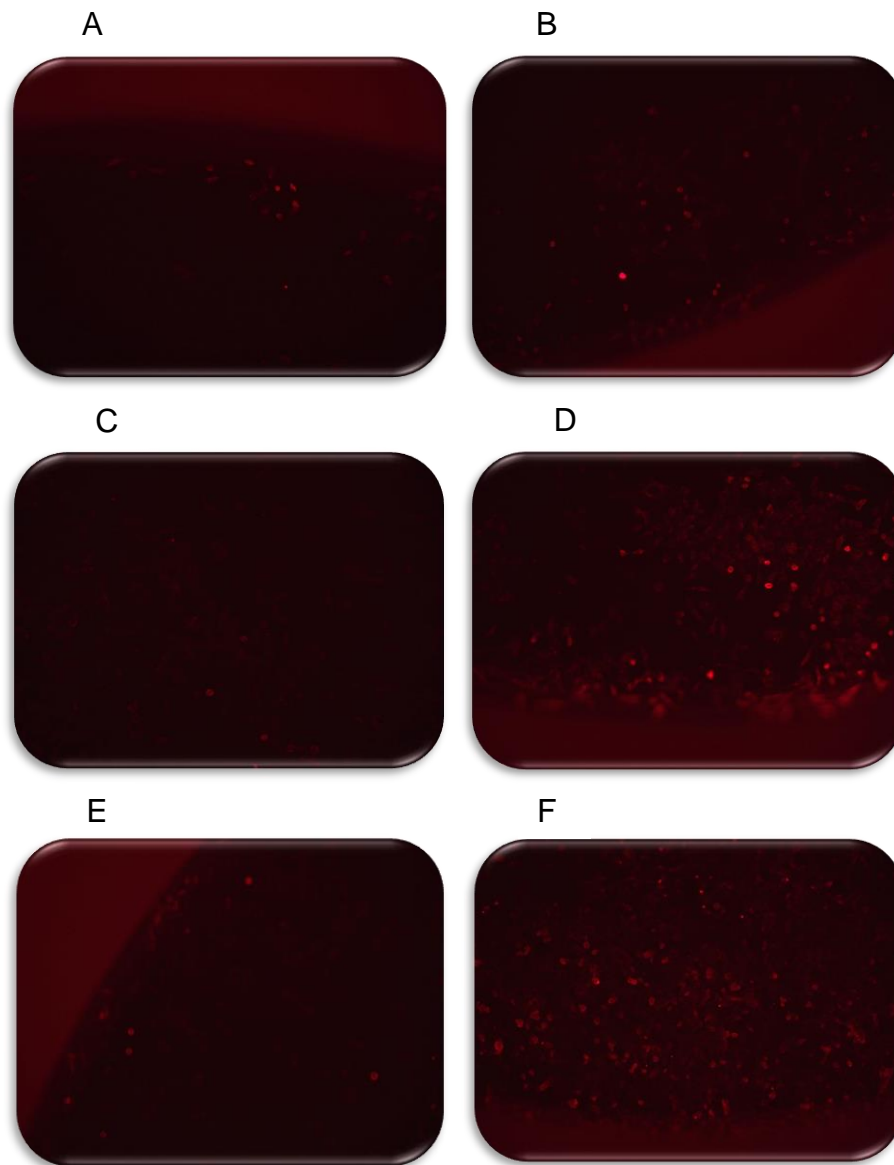


Figura 24. Detección de receptores de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt/iso a diferentes confluencias. Fotografías representativas de la detección de cadherina 11 a confluencia baja (A), confluencia media (C) y confluencia alta (E). De igual forma, la detección de cadherina E en confluencia baja (B), confluencia media (D) y confluencia alta (F).

A partir de las imágenes obtenidas con la inmunofluorescencia indirecta en células transfectadas MDA-MB-231 shRNAwt y shRNAiso, se obtuvo un histograma con el número de células marcadas con los diferentes anticuerpos en las tres confluencias determinadas. Se observa la clara disminución de cadherina 11 isoforma al bloquear la traducción de cadherina 11 wt (Figura 25) así como de cadherina 11 wt al bloquear la traducción de cadherina 11 iso (Figura 26).

En la Figura 27 se aprecia que a pesar de encontrar presencia de cadherina 11 se encuentra disminuida.

Receptores de cadherinas en células MDA-MB-231 transfectadas shRNA wt

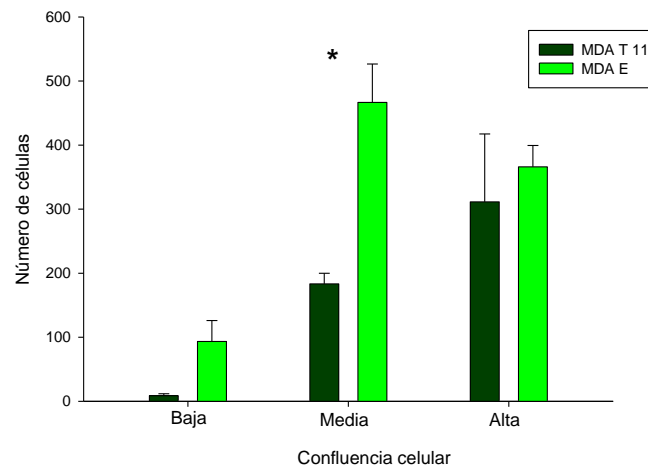


Figura 25. Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferente confluencia en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt. Se muestra un histograma donde se observa la cantidad de células MDA-MB-231 que presentan cadherina 11 en el color oscuro y cadherina E en color claro, a baja, media y alta confluencia. Media \pm EE. * < 0.05, T student pareada.

Receptores de cadherinas en células MDA-MB-231 transfectadas shRNA ISO

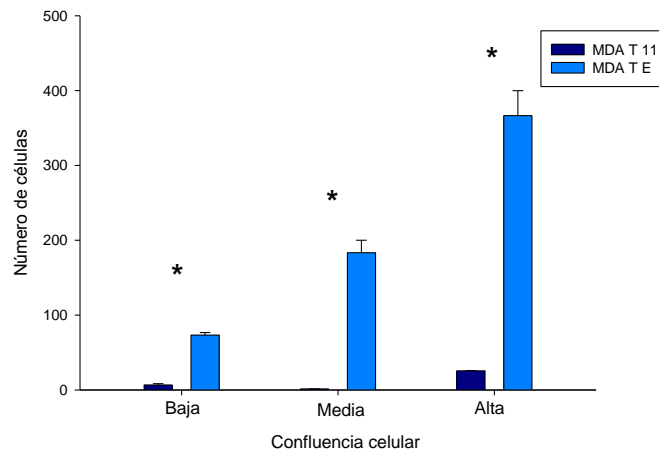


Figura 26. Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferente confluencia en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAiso. Se muestra un histograma donde se observa la cantidad de células MDA-MB-231 que presentan cadherina 11 en el color oscuro y cadherina E en color claro, a baja, media y alta confluencia. Media \pm EE. * < 0.05, T student pareada.

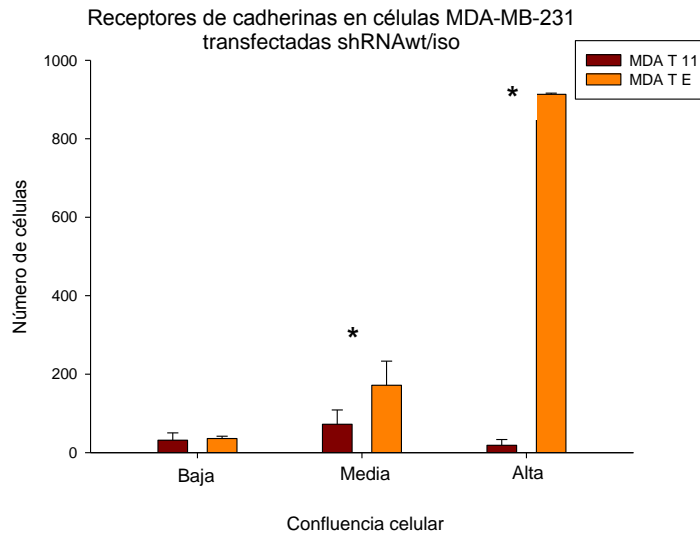


Figura 27. Comparación del número de células marcadas con anticuerpos anti cadherinas a diferente confluencia en células MDA-MB-231 transfectadas con shRNAwt/iso. Se muestra un histograma donde se observa la cantidad de células MDA-MB-231 que presentan cadherina 11 en color café y cadherina E en color naranja, a baja, media y alta confluencia. Media \pm EE. * < 0.05, T student pareada.

En la Tabla 8 se muestra un panorama general del número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina 11, de los histogramas de las Figuras 11 A, 25, 26 y 27, respectivamente. Dónde se aprecia claramente la disminución de cadherina 11 en las tres confluencias, lo que nos indica que el diseño y construcción del RNAi fue exitoso.

En el caso de las células transfectadas con shRNAwt/iso donde se detectó cadherina 11 a pesar de que se esperaba ausencia de la misma, sugiere que tuvimos un fenómeno de knockdown, donde únicamente se logra disminuir la expresión genética, por lo que sigue ocurriendo traducción de cadherina 11.

Por otra parte se puede apreciar que las células con el plásmido shRNAwt presentan mayor detección de cadherina 11, lo que podría indicar que cadherina 11 isoforma se encuentra en mayor proporción en la célula.

Tabla 8. Número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina 11 en diferentes confluencias.

Confluencia celular	Número de células Cadherina 11			
	MDA-MB-231	MDA-MB-231 shRNAwt	MDA-MB-231 shRNAiso	MDA-MB-231 shRNAwt/iso
Baja	54	9	7	32
Media	294	183	2	72
Alta	1263	367	27	19

En la Tabla 9 se muestra un panorama general del número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina E, de los histogramas 11B, 25, 26 y 27, respectivamente.

Donde se puede apreciar que comparando los número de las células MDA-MB-231, con el de las células transfectadas, hubo un aumento considerable en la cantidad de receptores de cadherina E post transfección. Lo que sugiere que el motivo por el cual se observó un lento crecimiento y un cambio morfológico en células transfectadas, puede deberse a que cadherina E fue dominante y de esta forma las células presentaban un comportamiento epitelial.

Tabla 9. Número de células marcadas con anticuerpo anti cadherina E en diferentes confluencias.

Confluencia celular	Número de células Cadherina E			
	MDA-MB-231	MDA-MB-231 shRNAwt	MDA-MB-231 shRNAiso	MDA-MB-231 shRNAwt/iso
Baja	30	93	73	36
Media	78	467	183	172
Alta	630	328	367	913

6.4 Evaluación de los efectos de RNAi en presencia de proteínas Cry

6.4.1 Viabilidad celular

En el ensayo de viabilidad se utilizó el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT, el cual es transformado a formazan por medio de la enzima succinato deshidrogenasa que se encuentra en la mitocondria, el formazan se presenta en cristales de color púrpura, por lo que los pozos con células vivas presentan dicha tonalidad. De esta manera entre más células vivas, mayor intensidad en el color.

Las células evaluadas, se dividieron en 4 grupos, MDA-MB-231 sin transfectar, MDA-MB-231 transfectada con shRNAiso, donde se bloquea cadherina 11 isoforma y permanece cadherina 11 wt, MDA-MB-231 transfectada con shRNAwt, donde se bloquea cadherina 11 wt y permanece cadherina 11 iso y MDA-MB-231 transfectada con shRNAwt/iso donde se bloquean ambos receptores (Figura 28).

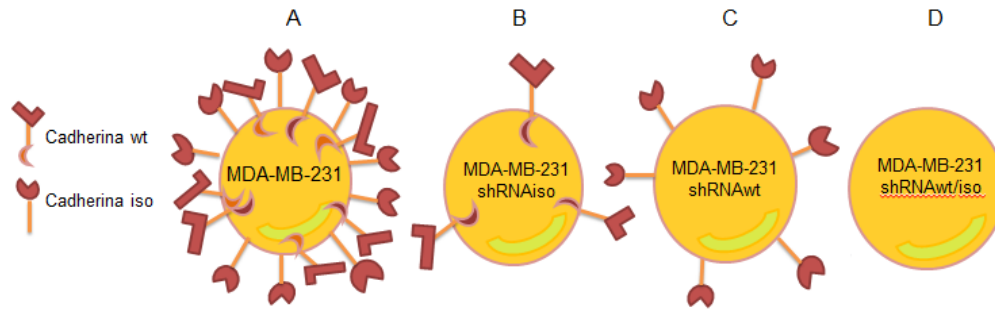


Figura 28. Representación de la célula MDA-MB-231 y cadherina 11 post transfección. En A se ejemplifica MDA-MB-231 sin transfectar, presentando ambos receptores en la membrana. En B se muestra una célula transfectada con shRNAiso, mostrando en membrana cadherina 11 wt. En C se observa una transfección con shRNAwt, mostrando en membrana cadherina 11 iso. En D se encuentra una célula transfectada con shRNAwt/iso, provocando ausencia de cadherina 11.

El lector de placas proporcionó la absorbancia de cada pozo evaluado y se obtuvo el promedio de las réplicas para las células con proteína, los controles y el blanco de cada grupo de células. El dato obtenido para el control negativo fue considerado como la máxima absorbancia, partiendo de eso, se obtuvo el porcentaje de muerte para las células que fueron incubadas con proteína cry (Tabla 10). El dimetil sulfoxido o DMSO es tóxico para las células, por lo que fue utilizado como control positivo.

	A	B	C
	Proteína OD	Control negativo OD	Proteína % muerte
MDA-MB-231	0.333	0.53	37
MDA-MB-231 shRNAwt	0.308	0.408	24
MDA-MB-231 shRNAiso	0.272	0.333	18
MDA-MB-231 shRNAwt/iso	0.262	0.485	45

Tabla 10. Viabilidad y porcentajes de muerte de MDA-MB-231 post transfección en presencia de proteína cry. De la columna A y B se muestran los promedios de absorbancia de las células con proteína cry y el control negativo, de los cuatro grupos evaluados. En la columna C se observa el porcentaje de muerte con el uso de proteína cry.

El control negativo para los 4 grupos contenía células con medio, las cuáles no fueron sometidas a ningún tratamiento, por lo que su absorbancia fue considerada el 100% de viabilidad de cada grupo. El ensayo comenzó con el mismo número de células para

todos los grupos, después de 48 horas observamos diferentes absorbancias en los controles negativos, lo que nos indica que el crecimiento entre las células de cada grupo fue diferente.

Se aprecia que para las células MDA-MB-231 se obtuvo 0.53 nm en el control negativo como su absorbancia máxima, para MDA-MB-231 shRNAwt 0.408 nm, para MDA-MB-231 shRNAiso 0.333nm y para MDA-MB-231 shRNAwt/iso 0.485 nm. Es decir, las células MDA-MB-231 shRNAiso fueron las que presentaron el menor crecimiento, cerca de la mitad del alcanzado por las MDA-MB-231.

Cuando las células fueron incubadas con proteína Cry, MDA-MB-231 shRNAwt/iso se vio más afectada, alcanzando un 45% de células muertas, por el contrario, MDA-MB-231shRNAiso con cadherina 11 wt intacta presenta menos daño con tan sólo el 18% de células muertas. Por otro lado, las células con shRNAwt con cadherina 11 iso intacta presentaron un 24% de muerte, lo que sugiere que la proteína cry pudiera estar relacionada en mayor proporción con cadherina 11 iso.

Contrario a lo esperado, observamos que las células MDA-MB-231 shRNAwt/iso, a pesar de que fueron las que tardaron 48 días en alcanzar 90 % de confluencia en cajas de cultivo celular de 6 pozos, crecieron a una velocidad similar a la de las células no transfectadas MDA-MB-231 y presentaron el mayor porcentaje de muerte.

7. Discusión

7.1 Generalidades

El diagnóstico molecular en cáncer de mama se basa en tres pruebas estándares, las cuales consisten en la detección de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), cuando estas pruebas son positivas, el cáncer es tratado con diversos fármacos. En ocasiones las pruebas de detección para éstos receptores son negativas a pesar de la existencia de cáncer, cuando esto sucede se trata de un cáncer triple negativo. Alrededor del 10 al 20% de los casos de cáncer de mama son considerados triple negativo. Este tipo de cáncer suele ser más agresivo y facilita la metástasis.

Actualmente es tratado mediante quimioterapia y terapia de radiación, por lo que el interés por descubrir terapias alternativas y menos invasivas ha aumentado en farmacéuticas y laboratorios de investigación.

MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama con diagnóstico triple negativo, por lo que conocer y comprender su funcionamiento es de vital importancia para proponer y diseñar terapias dirigidas.

La propuesta de evaluar la posible participación de cadherina 11, en el efecto anticancerígeno logrado por la actividad de proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* en células MDA-MB-231, hizo destacar a cadherina 11 y proteína Cry como candidatos para idear futuras terapias alternativas.

7.2 Evaluación de la presencia de cadherina 11 y cadherina E en células MDA-MB-231 y HaCat mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

7.2.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en cajas de cultivo celular de 96 pozos

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se realiza en portaobjetos, su metodología comienza disociando células mediante el uso de tripsina, para posteriormente adherirlas

y fijarlas en portaobjetos e iniciar el experimento. El comportamiento de las células en un experimento se puede ver afectado rápidamente ya que depende del espacio disponible para crecer, el estadio en el que se encuentren las células, los receptores de membrana y la comunicación que logren establecer con células vecinas. El uso de tripsina justo antes de comenzar un experimento puede estar alterando el comportamiento celular, por lo que es importante establecer una metodología que nos permita simular las condiciones que tienen las células *in vivo*, para minimizar alteraciones en la célula y en su medio que puedan afectar la cantidad de receptores en membrana y el ciclo de la célula.

Por tal motivo, se propuso realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta en cajas de cultivo celular de 96 pozos. Dicha técnica garantiza que las células presentarán un comportamiento realista en diferentes confluencias, ya que permite homogenizar el cultivo, al mantener a las células en condiciones rutinarias durante 48 horas previas al experimento. Adicionalmente evita el uso de tripsina, debido a que las células se encuentran adheridas en un espacio adecuado para llevar a cabo la metodología y no es necesario su reubicación.

7.2.2 Inmunofluorescencia indirecta

En éste trabajo se observó que la confluencia celular favorece la detección de receptores de cadherinas E y 11, es decir, a mayor confluencia celular se detecta mayor proporción de receptores. Ambas cadherinas se detectaron en células MDA-MB-231 y células HaCat. La diferencia radica en que cada línea celular posee una cadherina dominante en una proporción 2:1, cadherina 11 en células MDA-MB-231 y cadherina E en células HaCat. Lo que sugiere que aquella cadherina dominante confiere el rasgo característico a cada línea celular. Es decir, MDA-MB-231 presenta mayor proporción de cadherina 11, la cual es conocida por inducir proliferación y migración celular, generando células cancerosas muy agresivas. Por el contrario, HaCat presenta mayor proporción de cadherina E, la cual es conocida por brindar un fenotipo epitelial.

Vale la pena recordar que para que una célula crezca y sobreviva, no es suficiente la presencia de nutrientes, sino también las señales químicas provenientes de otras células, generalmente de células vecinas. La mayoría de las moléculas de señalización extracelular que afectan la división, el crecimiento y la supervivencia celulares son proteínas solubles secretadas por otras células o proteínas unidas a receptores de membrana en células aledañas. La integración de las señales extracelulares permite que un número relativamente pequeño de moléculas señalizadores, utilizadas en distintas combinaciones, ejerzan un control sutil y complejo sobre el comportamiento celular (Karp, G. 2006).

Por lo cual, podemos inferir que la relación entre confluencia celular y cantidad de receptores de cadherinas detectadas en este trabajo, se debe a que la comunicación celular se ve limitada por el espacio disponible que tienen las células para crecer y la distancia que hay entre ellas.

7.2.3 Evaluación de cadherinas E y 11 en células MDA-MB-231

Diversos autores han mencionado que la línea celular MDA-MB-231 únicamente cuenta con cadherina 11 (Nieman *et al.*, 1999; Pishvaian *et al.*, 1999; Feltes *et al.*, 2002; Sarrio *et al.*, 2009; Yong *et al.*, 2011; Nuñez 2013). Contrario a lo anterior, en este trabajo se demostró mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta que las células MDA-MB-231 adicionalmente presentan cadherina E.

Dicho acontecimiento no es extraño, ya que durante la metástasis las células tumorales se convierten en células migratorias que durante la extravasación al sitio secundario, requieren reconocimiento de y adhesión a las células endoteliales vasculares, al igual que la degradación de la matriz, para lograr invadir el nuevo tejido u órgano. Para llevar a cabo este proceso se necesita una transición de células mesenquimales a células epiteliales, donde se ven involucradas ciertas proteínas, tales como cadherinas E y 11 (Chao *et al.*, 2010; Gunasinghe *et al.*, 2012).

Se han documentado casos donde describen sucesos similares, por ejemplo, Chao y colaboradores en el 2010 inyectaron células MDA-MB-231 en mama de ratones

desnudos, después de 30 días los evaluaron y encontraron metástasis en pulmón con detección positiva de cadherina E, a lo que denominaron re expresión de cadherina E.

Otro ejemplo, en 1993 analizaron tumores primarios de cáncer colorectal y nódulos metastásicos, observaron que en aquellos donde obtenían un resultado negativo en la detección de cadherina E en tumor primario, era más frecuente que tuvieran metástasis y que siguiera negativa la detección de cadherina E, aunado a eso encontraron que en 9 de 26 casos, a pesar de tener un tumor primario con detección de cadherina E negativa, después de la metástasis el diagnóstico se volvía positivo. Ellos lo atribuyeron a que el tumor secundario pudo haber sido derivado de un tumor primario mal diagnosticado (Dorudi *et al.*, 1993).

Por lo anterior, se puede inferir que la existencia tanto de cadherinas epiteliales como de mesenquimales en una célula cancerosa, es indispensables para cubrir sus necesidades y así poder seguir creciendo y haciendo metástasis.

Dicho proceso es muy similar al del desarrollo embrionario, conocido como transición epitelial o mesénquimal (EMT o MET), esencial para la gastrulación, la formación de la cresta neural y el desarrollo de los órganos (Chao *et al.*, 2010).

Por lo que se ha especulado que la EMT es el principal mecanismo para que las células tumorales obtengan habilidad invasiva, permitiendo la separación de las células del tumor primario promoviendo su migración (Sarrío *et al.*, 2008; Trimboli *et al.*, 2008).

La EMT puede estar controlada mediante la metilación de la región promotora de cadherina E, debido a que en modelos experimentales donde se aplicó un tratamiento de desmetilación en células de cáncer de mama y próstata, observaron reactivación de la expresión de VHL y p16 que son genes supresores de tumores, de igual forma encontraron una activación de cadherina E en células Hs578 y MDA-MB-231 (Graff *et al.*, 1995).

Aunado a esto, en el año 2006, Lombaerts y colaboradores hicieron un estudio donde analizaron la expresión de cadherina E en 27 líneas de cáncer de mama, señalando

que se han identificado proteínas represoras de cadherina E, entre las que se encuentran SNAI1/SNAIL, ZFHX1B/SIP1, SNAI2/SLUG, TWIST1 y DeltaEF1. Al igual que proteínas que promueven la sobre expresión de la misma, tales como AML1, p300 y HNF3. Sugiriendo también, que existe un control celular para poder hacer la transición EMT en donde no sólo intervienen las cadherinas, si no un grupo de genes.

Adicionalmente, evaluaron cadherina E en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, encontrando negativas a las células MDA-MB-231 mediante western blot, pero positivas mediante citometría de flujo, por lo que concluyen que el promotor de cadherina E es parcialmente metilado y posiblemente en éstas células el promotor sea dinámico y reversible. (Figura 29) De igual forma se detectaron proteínas SNAI1 y SNAI2, represoras de cadherina E.

Benton en 2009, publicó que un incremento en la concentración de laminina 1 da como resultado mayor adhesión celular y expresión de cadherina E, por lo que la señala como un promotor de progresión tumorigénica.

Con base en lo anterior podemos inferir que para mantener el equilibrio entre cadherinas E y 11, durante la transición EMT, se ven involucrados diversos mecanismos y que la relación entre ambas proteínas es indispensable en células cancerígenas.

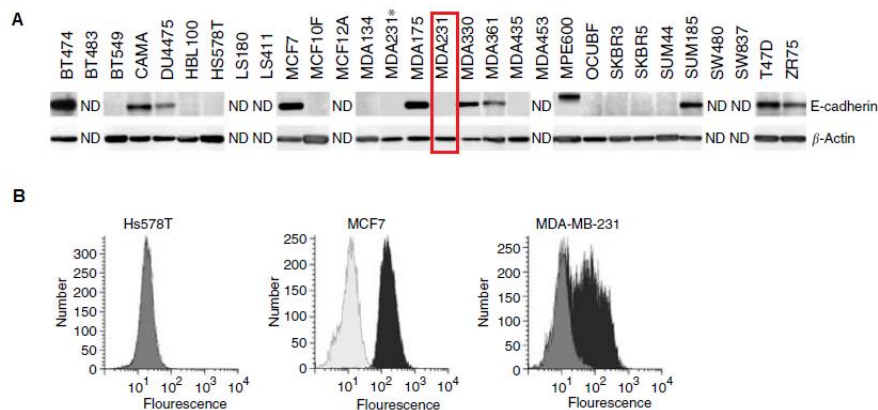


Figura 29. Cadherina E en células MDA-MB-231. En A se muestra el resultado del western blot para detectar cadherina E en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, en rojo se enmarca el resultado negativo obtenido con células MDA-MB-231. En B, se aprecia la detección de cadherina E por medio de citometría de flujo, en células Hs578T con resultado negativo, células MCF7 con resultado positivo y células MDA-MB-231 con dos sub poblaciones, una carente de cadherina E y otra débilmente positivo. Modificado de Lombaerts *et al.*, 2006.

7.2.4 Evaluación de cadherinas E y 11 en células HaCat

HaCat es una línea celular de queratinocitos humanos que fue inmortalizada con poliomavirus SV40 encargado de suprimir la traducción de p53 favoreciendo la proliferación, por lo tanto alteraron el crecimiento de éstas células y lograron conservar su orden estructural *in vitro* y diferenciación de tejido epidérmico cuando eran trasplantadas en ratones desnudos (Boukamp *et al.*, 1988).

HaCat tiene un crecimiento característico de epitelio y cuenta en mayor proporción con cadherina E (Furukawa *et al.*, 1998, Hung *et al.*, 2006). Adicionalmente se ha detectado cadherina P y cadherina N, ésta última asociada, al igual que cadherina 11, con células mesenquimales (Maeda *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se logró detectar por primera vez cadherina 11 en células HaCat, en menor proporción que cadherina E.

En la Figura 11 B, se muestra el histograma con el número de células detectadas en inmunofluorescencia indirecta y se aprecia que se mantiene un patrón, en donde cadherina E, supera por el doble a cadherina 11. Dicho patrón no se ve alterado por la relación que existe entre el número de receptores de cadherinas y la confluencia celular.

Observando la Figura 11 A, podemos apreciar que se presenta un patrón similar en células MDA-MB-231, pero de forma inversa, en donde cadherina E, se ve superada por cadherina 11, lo que indica nuevamente, que la cadherina dominante otorga la característica epitelial o mesenquimal a la célula.

Maeda en el 2006 mostró que si a células de epidermis humana A431 que presentan cadherinas E y P, le transfectan cadherina R, la cual es asociada con células mesenquimales, provocan pérdida de cadherina E. Tal suceso lo atribuye a que existe un reemplazo de cadherinas y por tal motivo la célula adquiere características mesenquimales. Otra explicación podría ser que la invasión celular se correlaciona más con la expresión de cadherinas mesenquimales como cadherina N y cadherina 11, que a la falta de cadherina E. Nieman (1999)

7.3 Transfección

Post transfección se observó que las células presentaron cambio de morfología y alteración del crecimiento. Logrando cierto parecido al comportamiento de la línea celular HaCat, la cual es conocida por tener cadherina E como receptor mayoritario.

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-20 se caracterizan por presentar cadherina E, tienen baja velocidad de invasión y presentan una morfología tipo epitelial (Figura 30 A y B). Similar a lo observado en las células MDA-MB-231 transfectadas, lo que fortalece los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia indirecta. La célula cuenta con ambas proteínas en membrana, al bloquear cadherina 11, cadherina E se ve favorecida provocando que las células adquirieran morfología epitelial (Figura 20 A).

Por el contrario, la línea celular de cáncer de mama SUM1315 presenta cadherina P y cadherina 11, alta velocidad de crecimiento y poca interacción célula-célula (Figura 30 C), muy similar a MDA MB 231 (Figura 20 C).

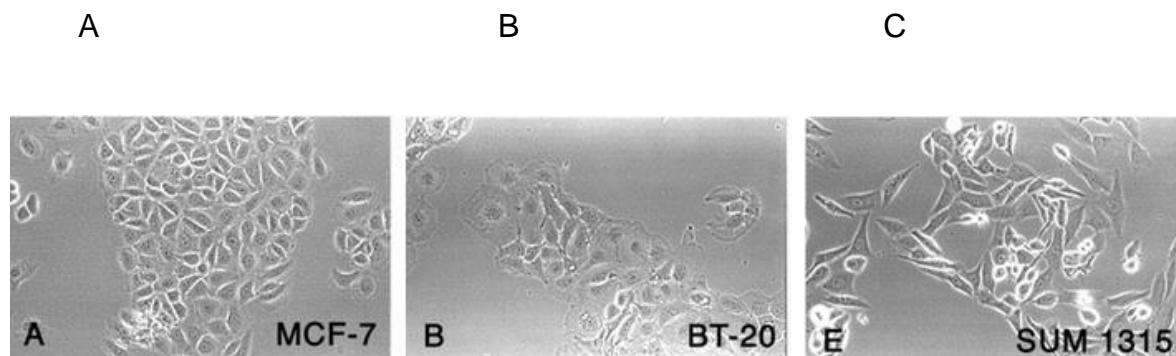


Figura 30. Morfología de células con cadherinas E y 11. Fotografías de tres típicas líneas celulares que presentan cadherina E (A y B) y cadherinas P y 11 (C). (Nieman *et al.*, 1999)

Las células transfectadas tardaron más de un mes en alcanzar confluencia del 90 % en un pozo de 35 mm, normalmente MDA-MB-231 logra el 90% de confluencia en 3 días en una caja de cultivo celular de 25 cm². Entre los 3 grupos de células transfectadas también hubo diferencias, se observó que MDA-MB-231 shRNAwt creció más rápido que MDA-MB-231 shRNAiso y MDA-MB-231 shRNAwt/iso, siendo ésta última la más lenta.

Aunado a esto, Assefnia (2013) interfirió la traducción de cadherina 11 wt en células MDA-MB-231, por medio de una transfección con un vector lentiviral. Obteniendo como resultado cambio de morfología como el descrito en el presente trabajo y alteración en el crecimiento, aproximadamente un mes en alcanzar confluencia deseada en pozos de 35 mm.

Lo que sugiere que la cadherina 11 es indispensable para la proliferación y por lo tanto es la responsable de la agresividad en esta línea celular.

Por otra parte, el dominio citoplasmático de cadherina 11 interactúa con β catenina, éste a su vez con α catenina, la cual se une a la actina del citoesqueleto.

La β catenina además de participar en el complejo de adhesión, está involucrada en la transducción de señales, para lograrlo debe traslocarse al núcleo, lo cual depende de los niveles de proteína libre en citoplasma. Normalmente cuando β catenina no se encuentra unida a cadherina es fosforilada por el complejo GSK/Apc para ser degradada en proteosoma.

En células cancerígenas, el complejo de fosforilación GSK/Apc se ve afectado, dando como resultado una acumulación de β catenina en citoplasma, lo cual favorece su migración al núcleo, donde se une a factores de transcripción TCF/LEF, activando genes como *cmyc* y ciclina D1, involucrados en proliferación.

Podemos encontrar cadherina 11 wt en corazón, cerebro, placenta, pulmón y hueso, de igual forma, cadherina 11 isoforma también es detectada pero en menor cantidad. A ciencia cierta no se sabe cuál es el papel de la isoforma, se cree que está involucrada en la diferenciación de osteoblastos y se encuentra en grandes cantidades en células cancerígenas, por lo que se sugiere es la responsable del grado de agresividad en dichas células (Kawaguchi *et al.*, 1999, Kawczenski, 2008).

Es importante resaltar que cadherina 11 isoforma no cuenta con el dominio citoplasmático. En la Tabla 8 observamos que las células con el plásmido shRNAwt presentan mayor detección de cadherina 11, lo que podría indicar que cadherina 11 isoforma se encuentra en mayor proporción en la célula.

Con base en lo anterior, se sugiere que la isoforma favorece la acumulación de β catenina en el citoplasma para mantener proliferación constante. Al interferir la traducción de cadherina 11, este proceso se ve afectado y es por eso que disminuye la velocidad de crecimiento en las células transfectadas.

7.4 Evaluación de los efectos de RNAi en presencia de proteínas Cry

Se observaron diferentes velocidades de crecimiento entre los tres grupos de células transfectadas. Cabe destacar que aquellas células transfectadas con shRNAwt y cadherina isoforma intacta presentaron mayor crecimiento comparadas con las células transfectadas con shRNAiso, lo que concuerda con lo antes mencionado, la isoforma de cadherina 11 favorece las condiciones de proliferación al permitir la acumulación de β catenina en citoplasma.

Las células con cadherina 11 isoforma intacta presentaron un 24% de muerte, por el contrario, las células donde se interfirió la traducción de cadherina 11 isoforma presentaron un 18 % de muerte, lo que sugiere que la proteína Cry podría tener mayor interacción con cadherina 11 isoforma, que es precisamente la responsable de la agresividad de ésta línea celular.

Por otro parte, Nuñez en el 2013, señaló que la proteína Cry además de tener una posible interacción con los receptores de cadherina 11 en las células MDA-MB-231, favorecía la formación de un poro en membrana que conlleva a lisis celular.

En este trabajo se observó que post transfección, la detección de células marcadas con anticuerpos anti cadherina 11 disminuyó considerablemente tanto en células con shRNAwt como con shRNAiso, y casi en su totalidad en la doble mutante shRNAwt/iso, sin embargo, la técnica de inmunofluorescencia indirecta no proporciona el número de receptores que hay en cada célula.

Con base en lo anterior, se puede decir que el efecto de la proteína Cry observado en células MDA-MB-231 shRNAwt/iso, puede ser originado por el aumento de proteína Cry disponible en el medio, debido a la falta de receptores de cadherina 11. Por lo que se sugiere que dicha proteína se acumula en membrana, provocando lisis celular, y es así

como incrementa el número de células muertas comparado con aquellas células no transfectadas.

Las prueba de viabilidad celular se realizaron en confluencia alta, en la Tabla 8 podemos observar que en confluencia alta MDA-MB-231 shRNAwt/iso presentó disminución de cadherina 11 y en la Tabla 9, podemos apreciar que en confluencia alta MDA-MB-231 shRNAwt/iso presentó sobre expresión de cadherina E, comparando los niveles detectados en células sin transfectar.

Por lo que se sugiere que el crecimiento que presentan las células MDA-MB-231 shRNAwt/iso puede ser atribuido a la sobre expresión de cadherina E.

Aunado a esto, Nuñez en el 2013 obtuvo resultados similares al realizar una prueba de herida en placa con células MDA-MB-231 y HaCat en presencia de proteína Cry. La técnica consiste en crear una brecha sobre una monocapa celular y tras un periodo de tiempo observar si las células son capaces de proliferar y cerrar el espacio ocasionado por la herida, a pesar de estar en presencia de proteínas Cry. Observó que aún en presencia de la oncoproteína las células HaCat lograban proliferar y cerrar la herida en un lapso de 48 horas (Figura 31). Concluyó que dicho fenómeno se debe a que la proteína Cry no es afín al receptor de cadherina E y por lo tanto no altera su crecimiento.

Con base en lo anterior, se infiere que el crecimiento observado en células MDA-MB-231 shRNAwt/iso durante la prueba de viabilidad celular del presente trabajo, se debe a que la sobre expresión de cadherina E no se ve afectada por proteína cry.

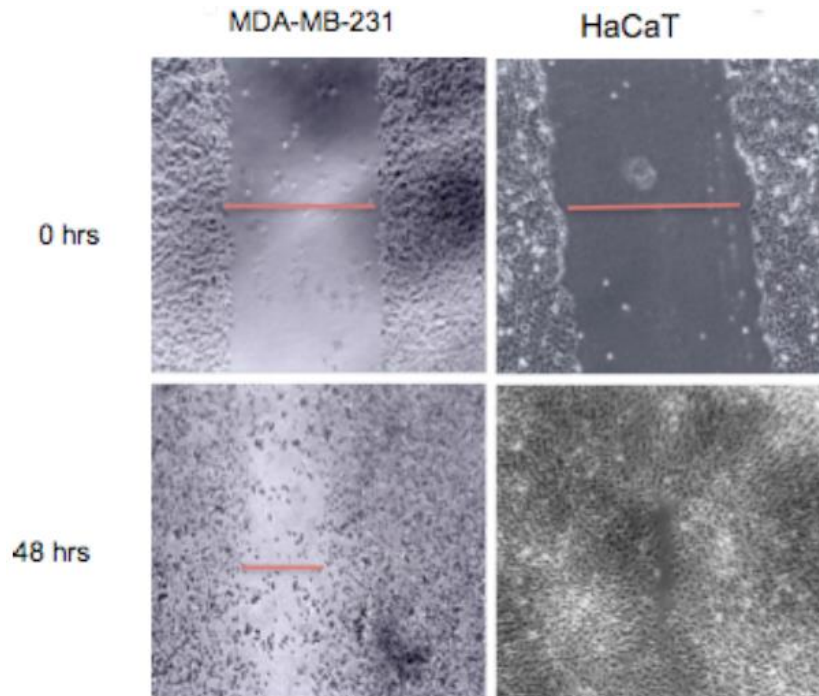


Figura 31. Prueba de herida en placa con células MDA-MB-231 y HaCat. En las imágenes superiores se muestran las heridas (brechas) causadas en una monocapa de células MDA-MB-231 (izquierda) y de células HaCat (derecha). Se marca con rojo el espacio que separa a las células. En las imágenes inferiores se aprecia que después de 48 horas las células HaCat han tenido mayor proliferación que las células MDA-MB-231. (Nuñez, 2013)

Conclusiones

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se observó que la confluencia celular aumenta la densidad de receptores de cadherinas, tanto en células MDA-MB-231 como en células HaCat.

De igual forma se determinó que las células MDA-MB-231 presentan receptores de cadherinas E y 11, siendo los de cadherina 11 los que se encuentran en mayor proporción (2:1). De manera contraria, en células HaCat, se presentan receptores de cadherinas E y 11, siendo los de cadherina E los que se encuentra en mayor proporción (2:1).

La técnica de transfección y las pruebas de viabilidad celular, permitieron establecer que Cadherina 11 isoforma es la responsable de la proliferación celular y agresividad en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Aunado a esto, se determinó que Cadherina 11 está involucrada en la muerte de células de cáncer de mama MDA-MB-231, vía señalización cuando interviene la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. Así como también está involucrada en la muerte de células de cáncer de mama MDA-MB-231, vía formación de poro cuando interviene la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* en altas concentraciones o cuando el receptor de cadherina 11 no se encuentra presente.

Perspectivas

En futuros experimentos, se puede diseñar un RNA de interferencia para cadherina E y transfectar células MDA-MB-231 para evaluar su comportamiento en presencia de proteína Cry de *Bacillus Thuringiensis*.

Con el objetivo de extender el conocimiento adquirido y fortalecer los resultados de este trabajo, sería interesante probar proteína Cry de *Bacillus Thuringiensis* en células no inmortalizadas y no tumorigénicas.

Para profundizar en el mecanismo de acción que existe entre la interacción de proteína Cry de *Bacillus Thuringiensis* y cadherina 11, se propone investigar vías de señalización como AKT y WNT en células transfectadas con los interferentes obtenidos en este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Akulapalli, S. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1–4
- Arvelo, F. and Poupon, M-F. 2001. Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Científica Venezolana*, 52, 304-312.
- Assefnia, S., Dakshannamurthy, S., Auvil, G. J. M., Hampel, C., Anastasiadis, P. Z., Kallakury, B., Uren, A., Foley, D. W., Brown, M. L., Shapiro, L., Brenner, M., Haigh, D. and Byers, S. W. (2013). Cadherin 11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis common target, common therapies. *Oncotarget*. 5 (6), 1458-1474.
- Banan, M. and Puri, N. (2004). The Ins and Outs of RNAi in Mammalian Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5, 441-450.
- Bachman, K. E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J. and Szabo, S. (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 3(8), 772-5.
- Banerjee, D. (2001) Genasense (Genta Inc.). *Current Opinion in Ivestigational drugs*, 2(1), 574-580.
- Benton, G., Crooke, Elliot and George, Jay. (2009). Laminin-1 induces E-cadherin expression in 3-dimensional cultured breast cancer cells by inhibiting DNA methyltransferase 1 and reversing promoter methylation status. *FASEB Journal*. 23 (11): 3884-3895).
- Berx, G. and Van-Roy, F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast cancer Res*, 3(5), 289-293.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, 106, 761-771.
- Brandan, M. y Villaseñor, Y. (2006). Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología*, 1, 147-162.
- Burgués, G. J., Pontones, M. J., Vera, D. C., Jimenez, C.J. y Ozonas, M. M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp*, 29 (9), 846-859.
- Byers, W., S. (2004). *Cadherin-11 and Breast cancer*. Tesis Ph. D. Georgetown University, Washington, D. C. 83p

- Chen, L., Endler, A., Uchida, K., Horiguchi, S., Morizane, Y., Lijima, O., Toi, M. & Shibasaki, F. (2009). Int6/eIF3e Silencing Promotes Functional Blood Vessel Outgrowth and Enhances Wound Healing by Upregulating HIF2 α Expression. *Journal of the American Heart Association*, 93, 19-31.
- Correa, A. M. F., Adjounian, H y Adjounian, S. H. (2007). Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 27, 22-30
- Dangler, A., C. (1996). Generation of Nucleic Acid Probe Molecules. In: Bej, A.K. (Ed.) *Nucleic Acid Analysis. Principle and Bioapplications*. (pp. 1-29). Wiley-Liss.
- Dehesa-Zentella A., Frías, S. y Galicia-Vázquez, G. (2007). Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico*, 31, 172-195.
- Dorudi, S., Sheffield, J. P., Poulson, R., Northover, J. M. A. and Hart, I. R. 1993. E-Cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and In Situ hybridization study. *American Journal of Pathology*. 142 (4), 981-986.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 24, 494-8.
- Escandón, C., Benítez, M., Navarrete, J., Vásquez, J., Martínez, O. y Escobedo, J. (1992). Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*, 34 (6), 607-614.
- España, U. M. (2012). *Identificación de posibles factores de Myzus Persicae implicados en la transmisión del virus del grabado del tabaco (TEV) y estrategias para interferir su expresión*. Tesis Doctorado en ciencias. Universidad de Barcelona. 189p.
- Feltes, M. C., Kudo, A., Blaschuk, O. and Byers, W. Stephen. (2007). An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res*, 62, 6688-6697.
- Ferrera, N. (210). Pathways mediating VEGF- independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 21-26.
- Furukawa, F. Fujii, K., Horiguchi, Y., Matsuyoshi, N., Fujita, M., Toda, K. I., Imamura, S., Wakita, H., Shirahama, S. and Takigawa, M. (1998) Role of E- and P-cadherin in the human skin. *Microscopy Research and Technique*, 38, 343-352.
- Gilbey, A. M., Burnett, D., Coleman, R. E. and Holen, I. (2004). The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol*, 57, 903-11.

- Graff, J. R., Herman, J. G., Lapidus, R. G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D. F., Isaacs, W. B., Pitha, P. M., Davidson, N. E. and Baylin, S. B. (1995). E cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Research*. 55: 5195-5199.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*, 148 (3), 399-404.
- Gunasinghe, D., Wells, A., Thompson, E. W. and Hugo, H.J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonization in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 31: 469-478.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 114, 646-674.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418,(6894) 244-251.
- Hernández, G. C. (2014). *Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en Bacillus Thuringiensis*. Tesis de Maestría en ciencias. CICESE. 64p.
- Higareda, A. AJ. (2012). *Análisis de los patrones de expresión y fosforilación proteica en líneas celulares de cáncer cervico uterino*. Tesis Doctorado UNAM. 130p.
- Huang, C., Lira, C., Chu, K., Bilen, A. M., Lee, Y., Ye, X., Kim, S. M., Ortiz, A., Wu, F. L., Logothetis, C. J., Yu-Lee, L and Lin, S.(2010). Cadherin 11 increases migration and invasion of prostate cancer cell an enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res*, 70(11), 4580-4589.
- Hung, C.F., Chiang, H. S., Lo, H. M., Jian, J. S. and Wu, W. B. (2006). E-cadherin and its downstream catenins are proteolytically cleaved in human HaCat keratinocytes exposed to UVB. *Journal compilation*, 15, 315-321.
- Hunter, K. W., Crawford, N. PS. And Alsarraj, J. (2008). Mecanismos of metastasis. *Breast Cancer Res*, 10, 1-10.
- Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutumi, K., Mizuki, E., Akao, T. and Ohba, M. (2004). A Bacillus thuringiensis cristal protein with selective cytotoxic action to human cell. *J. Biol. Che.*, 279, 21282-21286.
- Ivanov, D. B., Philippova, M. P. and Tkachuk, V. A. (2001).Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry*, 66, 1450-1464.
- Jemal, A., Bray, F., Melissa, M., Ferlay, J., Ward, E. & Forma, D. (2011). Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
- Kanaul, F. and Nigenda, G. (2009). Cáncer de mama en México: Una prioridad apremiante. *Salud pública*, 51 (2), 335-344.

- Kang, S., Bader, A. G. and Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci.* 102(3):802-7.
- Karp, G. (2006). *Biología celular y molecular Conceptos y experimentos*. (4ª Ed.) San Diego, California. Mc Graw Hill.
- Kawaguchi, J., Takeshita, S., Kashima, T., Imai, T., Machinami, R. and Kudo, A. (1999). Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *Journal of bone and mineral research.* 14 (5): 764-775.
- Kawczenski, F.A., (2008). *Regulation of cadherin-11 by GSK3 and TGFB1 in cáncer cell*. Tesis Doctorado en ciencias. Georgetown University. 149 p.
- Kowalski, P. J., Rubin, M. A. and Kleer, C. G. (2003). E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*, 5(6), 217-222.
- Lee, D. M., Kiener, H. P., Agarwal, S. K., Noss, E. H., Watts, G.F., Chisaka, O., Takeichi, M. & Brenner, M. B. (2007). Cadherin-11 in Synovial Lining Formation and Pathology in Arthritis. *Science*, 315 (5814), 1006-1010.
- Liotta, L. A. and Steler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*, 51, 5054-5059.
- Lombaerts, M., Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, JWF., Zimmerman, RME., Oosting, J., Eijk, R., Eilers, PH., Water, B., Cornelisse, CJ., and Cleton-Jansen, A-M. (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer.* 94 (5): 661-671.
- Maeda, M., Johnson, E., Mandal, S.H., Lawson, K. R., Keim, S. A., Svoboda, R. A., Caplan, S., Wahl, J. K., Wheelock, M.J. and Johnson, K. R. (2006). Expression of inappropriate cadherins by epithelial tumor cells promotes endocytosis and degradation of E-cadherin via competition for p120. *Oncogene*, 25 (33), 4595-4604.
- Mendoza, A., G. (2011). *Aislamiento y Caracterización de Toxinas Cry de Bacillus thuringiensis con Actividad Citócidica sobre Células de Cáncer Cervicouterino in vitro e in vivo*. Tesis Doctorado en ciencias. CICESE. 139 p.
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A. y Aguayo-González, A., (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación clínica*, 58,56-70.
- Michalides R. (1999). Prognosis for G1 cell-cycle regulators: useful for predicting course of disease and for assessment of therapy in cancer. *J Pathol*, 188,341-343.

- Mizuki, E., Park, Y., Saitoh, Y., Yamashita, S., Akao, T, Higuchi, K. and Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus Thuringiensis*. *Clinical and diagnostic Laboratory immunology*, 7(4), 625-634.
- Nieman T. M., Prudoff, S. R., Johnson, R. K. and Wheelock, J. M. (1999). N-Cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-Cadherin expression. *JCB*, 147 (3), 631-644.
- Nakamura, L. Y., Esparza, A. M., Garrido, O. L., Palomar, O. V. y Gallardo-Pérez, J. (2009). Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquímica*, 34 (1), 26-36.
- Nuñez, R. A. (2013). *Aislamiento y caracterización de toxinas de bacillus sp que inhiban la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer a través de la inactivación de la vía PI3K/AKT*. Tesis Maestría en ciencias. CICESE. 63 p.
- Organización mundial de la salud. (2014). *Cáncer*. Recuperado el 16 de febrero de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- Peifer, M. and Polakis, P. (2000). Wnt Signaling in Oncogenesis and Embryogenesis: a Look Outside the Nucleus. *Science*, 287 (5458), 1606-1609.
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz –Benítez, C.E. y Madrir-Mariana, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Méx*, 39, 451-462.
- Pherson, K., Steel, C. & Dixon, JM. (2000). Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*, 321, 624-628.
- Pinzón, C. E., Serrano, M. L. y Sanabria, M. C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud*, 7(2), 47-66.
- Pishvaian, M.J., C.M. Feltes, P. Thompson, M.J. Bussemakers, J.A. Schalken y Byers, S. W. (1999). Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 15, 947–952.
- Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296, 1263-1265.
- Romero, M. y Santillan, L. (2008). Frecuencia de los factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obstet*, 76(11), 667-672.
- Rojas, E. O. (1996). *Inmunología*. (1ª ed.) México. Panamericana.
- Salvi, A., Arici, B. y De Petro, G. (2004). Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 671-678.

- Sánchez, S. L., Hernández, V. V. y López, M. R. (2005). Papel de las cadherinas en la metástasis. *REB*, 24, 97-103.
- Sandal, T. (2002). Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist*, 7, 73-81.
- Sarrio, D., Rodríguez-Pinilla, SM., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*, 68 (4), 989-997.
- Sarrio, D., Palacios, J., Hergueta-Redondo, M., Gómez, L. G., Cano, A. and Moreno-Bueno, G. (2009). Functional characterization of E- and P- cadherin in invasive breast cancer cell. *BMC Cancer*, 9, 74-79.
- Sean, G. L. and Blau, H. M. (2006). A brief history of RNAi the silence of the genes. *FASEB J*, 20(9), 1293-129.
- Sergio A., Rodríguez, C. and Marino, G. (2006). Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obstet*, 74, 585-93.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-1677.
- Skkiper, M. (2013). A panoramic view of cancer. *Nature Reviews, Cancer*, 13, 755-763.
- Trimboli, A. J., Fukino, k., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson M. L., Eng, C., Ostrowski, M. C. and Leone, G. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res*. 68: 937-945.
- Vectores de expresión (2013) Recuperado el 8 de junio de: <http://www.invitrogen.com>
- Tan, F. L. and Yin, J. Q. (2005). Application of RNAi to cancer research and therapy. *Frontiers in Bioscience*, 10, 1946-1960.
- Vaca, L. (2004). RNA Interferente: una herramienta y un novedoso mecanismo de regulación génica. *Mensaje Bioquímico*, 28, 45-60.
- Valencia, Y. R. (2010). *El papel de la proteína de estrés térmico (HSI 70) en la infección del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) con el virus del síndrome de la mancha blanca WSSV*. Tesis Maestría en ciencias. UABC. 148 p.
- Vázquez-Ortiz, G., Piña-Sánchez, P. y Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA. *Revista de Investigación Clínica*, 58, 335-349
- Waltregny, D., Alami, Y., Clause, N., de Leval, J. and Castronovo, V. (2002). Over expression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate*, 50, 162-169.

- Welch, D.R., (2006). Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions?. *Breast Dis*, 26, 3-12.
- Willingham, A. T., Deveraux, Q.L. & Hampton, G. M. (2004). RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene*, 23, 8392-400.
- Yan, Z., Wang, J., Wei, G., Ya-Xi, Z., Yong-Kun, W., Zhu-Qing, Z., Hui, Z. & Cong-Jun, W. (2013). RNAi silencing of c-Myc inhibits cell migration, invasion, and proliferation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line: c-Myc silencing in hepatocellular carcinoma cell. *Cancer Cell International*, 13, 1-6.
- Yi-hua, W., Shuang, L., Guo, Z., Cui-qi, Z., Hong-xia, Z., Xiao-bo, Z. & Lan-ping, Q. (2004). Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *BioMed Central Ltd*, 7(2), 220-228.
- Yong, L., Fengmei, C., Bei, H., Dahai, L., Jaejik, K. and Shuang, H. (2014). HOXC8 promotes breast tumorigenesis by transcriptionally facilitating cadherin-11 expression. *Oncotarget*, 5, 2596-2607.
- Zhang, X., Candas, M.m Griko, N., Rose-Young, L. and Bulla, J. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12 (11), 1407-1416.

Anexos

1.- Protocolos

I. Preparación de células competentes

- 1.- Estriar *E coli* DH5 α sobre una placa de agar LBM e incubar overnight a 37°C
- 2.- Sembrar una colonia aislada en 5ml de LBM líquido. Incubar overnight a 37°C y 250 rpm.
- 3.- Diluir el cultivo en LBM líquido 1:50 e incubar 37°C y 250 rpm hasta obtener una OD_{600nm} de 0.4-0.5.
- 4.- Dividir los 50 ml en 2 tubos cónicos y centrifugar 10 minutos a 2500 rpm y 4°C.
- 5.- Desechar el sobrenadante, resuspender con 12.5 ml de CaCl₂ frío 100 mM y mezclar suavemente.
- 6.- Incubar en hielo 20 minutos, centrifugar a 250 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender con 2.5 ml de CaCl₂ frío 100 mM y mezclar suavemente.
- 8.- Las células competentes se pueden utilizar de inmediato o almacenarlas en glicerol al 15%.

II. Extracción de DNA plasmídico

- 1.- Dividir los 3 ml de suspensión bacteriana en dos pases de 1.5 ml en un tubo eppendorf y centrifugarlos a 14,000 rpm durante 1 minuto.
2. Decantar el sobrenadante y resuspender las células con 100 μ l de la solución 1 fría y vórtex.
- 3.- Agregar 150 μ l de la solución 2, mezclar por inversión suavemente e incubar en hielo durante 5 minutos.
- 4.- Adicionar 200 μ l de la solución 3, mezclar por inversión suavemente e incubar en hielo durante 10 minutos.
- 5.- Centrifugar las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos.

- 6.- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo evitando tocar el precipitado. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos y volver a separar el sobrenadante en otro tubo nuevo. Agregar 4 μ l de RNAsa e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- 7.- Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol al 96% y mantener en congelador durante 30 minutos. Invertir intermitentemente para mezclar.
- 8.- Centrifugar las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos.
- 9.- Decantar el sobrenadante, lavar el DNAp con 500 μ l de etanol al 70% e invertir varias veces.
- 10.-Centrifugar las muestras a 14,000 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante. Dejar secar a temperatura ambiente no más de 10 minutos.
- 11.- Resuspender en 80 μ l de buffer TE o agua libre de nucleasas.
- 12.- Almacenar a -20°C.

NOTA: La preparación de las soluciones utilizadas en dicho protocolo, se describen en la sección de Anexos, 2.-Medios y soluciones.

2.- Medios y soluciones

Medio LB Miller

Bacto-triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 1%

Agar 1.5%

Solución 1 para extracción de DNAp

Preparar una solución de 100 ml que contengan 5 ml de Tris-HCl 1M pH 8 y 2 ml de EDTA 0.5M pH8.

Solución 2 para extracción de DNAp

Preparar una solución de 50 ml que contenga 5 ml de SDS al 10% y 1 ml de NaOH 10 N

Solución 3 para extracción de DNAp

Acetato de sodio o potasio 3 M pH 5.5