

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina**

**Interacción entre los receptores a estrógenos mitocondriales y la ATP
sintasa en células de cáncer de mama.**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Aimée Ferrá Molina

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Aimée Ferrá Molina

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la
Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Aimée Ferrá Molina © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Aimée Ferrá Molina** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Interacción entre los receptores a estrógenos mitocondriales y la ATP sintasa en células de cáncer de mama.

Resumen aprobado por:

Dra. Carolina Álvarez Delgado
Directora de Tesis

En México, el cáncer de mama es el más frecuente en mujeres. El crecimiento y la supervivencia de las células de mama normales y transformadas dependen del estradiol (E2), que actúa a través de los receptores a estrógenos (ER) alfa y beta (ER α y ER β), por lo que se considera que esta hormona es esencial para la progresión del cáncer sensible a hormonas. La reciente localización de los ERs en la mitocondria ha sido de gran importancia debido a que concuerda con estudios previos que demuestran los beneficios del E2 sobre la estructura y función mitocondrial. La localización mitocondrial de estos receptores y su actividad E2 dependiente como factores de transcripción en el DNA mitocondrial (mtDNA) apoyan la idea de que los efectos estrogénicos sobre la mitocondria pueden estar modulados por los receptores a estrógenos mitocondriales (mtERs). Además, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial está implicada en el cáncer y otras enfermedades humanas. En este trabajo, se estudió la interacción entre los receptores a estrógenos y la ATP sintasa en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-474 mediante el análisis de la expresión de proteínas y el estudio de sus interacciones por coimmunoprecipitación. Se demostró la interacción de ER α con la ATP sintasa en la fracción mitocondrial y citoplasmática de la línea celular MCF-7 pero no en BT-474. Este es el primer estudio donde se demuestra la interacción ER α -ATP sintasa en la línea celular MCF-7. Este resultado es de gran importancia puesto que representa un posible blanco terapéutico para cánceres sensibles a hormonas esteroides.

Palabras clave: receptores a estrógenos, mitocondria, ATP sintasa

Abstract of the thesis presented by **Aimée Ferrá Molina** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Interaction between mitochondrial estrogen receptors and ATP synthase in breast cancer cells

Abstract approved by:

Dra. Carolina Alvarez Delgado
Thesis Advisor

Breast cancer is the most frequent cancer type in Mexican women. Growth and survival of healthy and breast cancer cells depend on estradiol (E2), which acts through two estrogen receptor subtypes: ER α and ER β . Thus, the E2-ERs signaling pathway is important for hormone-sensitive cancer progression. The effects of E2 on mitochondrial structure and function are not clearly elucidated. Recently, the presence of estrogen receptors in the mitochondrion and their E2-dependent transcriptional activity were demonstrated in different cell types. This supports the idea that E2 actions on mitochondria are modulated through resident mitochondrial estrogen receptor (mtERs). Moreover, mitochondrial dysfunction has been associated with cancer and other human diseases. In this study we studied the protein-protein interactions between ERs and ATP synthase in the MCF-7 and BT-474 breast cancer cell lines. Western blotting and co-immunoprecipitation were used to analyze these interactions. We detected an interaction between ER α and ATP synthase in mitochondrial and cytoplasmic fractions of the MCF-7 cell line but not in the BT-474 cell line. Our results are the first to prove that there is an interaction between ER α receptors and the ATP synthase in MCF-7 cells. These novel results could represent a potential therapeutic target for the treatment of hormone sensitive breast cancer

Keywords: estrogen receptors, mitochondria, ATP synthase

Dedicatoria

A mis padres.

Por su gran inspiración para siempre alcanzar mis sueños.

A Leo.

Por su eterno apoyo y amor incondicional.

Agradecimientos

A la primera persona que quiero agradecer es a mi tutora, la Dra. Carolina Álvarez por todas sus enseñanzas, por dedicarme el tiempo necesario, por ser una excelente guía en el mundo de los Westerns, por contagiarme el amor por las mitocondrias pero principalmente por ser la mejor investigadora. Carol: son personas como tú, con tanta entrega, amor y dedicación a lo que hacen quienes inspiran a seguir adelante en el camino de la ciencia.

A mi comité de tesis: a la Dra. Patricia Juárez por su orientación, consejos y apoyo en la técnica de PCR en tiempo real y al Dr. Miguel Ángel del Río por sus aportaciones y consejos en la escritura de mi tesis. Gracias a ambos por hacerme crecer profesionalmente.

A mi grupo de trabajo: el equipo mitocondria —el codón AAA—. Adriana, Alberto y Aldo, por inyectar el entusiasmo y la alegría al trabajo en el laboratorio. Gracias por sus sugerencias, comentarios y aportaciones, éstas siempre enriquecieron el proyecto.

A mis amigos de la maestría: Nayeli, por compartir tus conocimientos de PCR en tiempo real, fue la mejor forma de compartir las vacaciones. También, por todos tus abrazos de buenos días. Alejandra, por ayudarme en la extracción de RNA, obtención de cDNA y en mis dudas del laboratorio. Eres el ejemplo perfecto de la dedicación. A Lupita, Zazueta, Andrea, Danna, Pamela, Dulce y Vanessa por todas sus buenas vibras y ánimos por alcanzar cada paso en la maestría.

A mi gran amiga Briceida, gracias por alegrarme la vida, por todos los consejos y por motivarme en esos días en los que sólo quieres descansar. Qué bueno encontrarte en la vida.

A mis padres, por ser un gran ejemplo a seguir. Son las personas más trabajadoras que he conocido. Quiero agradecerles infinitamente todo el apoyo y el esfuerzo que han dado para que llegara a este punto de mi vida. Los admiro mucho, tengo mucho que aprender de ustedes.

A mis hermanos, por todo su apoyo, su amor y sus porras cada vez que terminaba un avance de tesis o mi escritura de tesis. Ahora sí tendré más tiempo de pasarla con ustedes, mis compañeros de aventuras.

A mi segunda madre, Marcela. Gracias por apoyarme, ofrecer tus buenos consejos y por alegrarme con deliciosas comidas.

Al amor de mi vida, Leonardo, porque gracias a ti alcancé la meta. Estuviste a mi lado apoyándome todo el tiempo, animándome cuando no salía lo que esperaba y siempre me dabas los mejores consejos. Eres el mejor, gracias infinitas.

A CICESE, al Posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica por darme la oportunidad de realizar la maestría y formar parte de su equipo.

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante la maestría (Beca No.340046) dentro del programa de becas de posgrado.

Tabla de Contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cáncer de mama.....	2
1.1.2 Línea celular MCF-7	3
1.1.3 Línea celular BT-474	3
1.1.4 Receptores a estrógenos.....	4
1.1.5 Isoformas de receptores a estrógenos.....	5
1.1.6 Efecto del estradiol sobre la expresión del mRNA y de la proteína de los receptores a estrógenos.....	7
1.1.7 Efecto del E2 en la localización subcelular de los ERs.....	8
1.1.8 Efecto estrogénico sobre la mitocondria	9
1.1.9 Efecto del estradiol sobre la expresión y actividad de la ATP sintasa mitocondrial.	10
1.1.10 Interacciones entre los receptores a estrógenos y proteínas mitocondriales.....	11
1.2 Justificación	12
1.3 Hipótesis.....	13
1.4 Objetivos	13
1.4.1 Objetivo General	13
1.4.2 Objetivos Específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología	14
2.1 Cultivo celular.....	14
2.2 Fraccionamiento subcelular.	14
2.3 Análisis de la expresión de proteínas.....	15
2.4 Detección de interacciones proteína-proteína por coimmunoprecipitación.	15
2.5 Aislamiento de RNA.....	16

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)	17
2.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	18
Capítulo 3. Resultados	19
3.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer	19
3.2 Evaluación de la presencia del complejo ATP sintasa-ERs y su localización subcelular en células de cáncer de mama sensibles a hormonas	19
3.4 Expresión de mRNA de ER α y ER β en MCF-7 y BT-474	23
3.5 Modelo de translocación mitocondrial para los mtERs	26
Capítulo 4. Discusión	28
Capítulo 5. Conclusiones	33
Perspectivas	33
Literatura citada	34

Lista de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de las estructuras proteínicas de ER α y ER β	4
Figura 2. ER α e isoformas.....	6
Figura 3. Isoformas de ER β humano	7
Figura 4. Fotografías de células de cáncer de mama	19
Figura 5. Interacción ER α -ATP sintasa en MCF-7	20
Figura 6. Interacción ER α -ATP sintasa en BT-474	21
Figura 7. Expresión de isoformas de ER α y ER β	22
Figura 8. Expresión de isoformas de ER α y ER β	23
Figura 9a. Expresión relativa de mRNA de ER α	24
Fig 9b. Curva de amplificación de ER α	25
Figura 10a. Expresión relativa de mRNA de ER β	25
Fig 10b. Curva de amplificación de ER β	26
Figura 11. Interacción de ER α -HSP70 en MCF-7	27

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el PCR punto final.....	17
---	----

Capítulo 1. Introducción

Los estrógenos regulan el crecimiento y la diferenciación de una amplia gama de tejidos incluyendo el sistema reproductivo, la glándula mamaria, el sistema nervioso central y el músculo esquelético (Zhao, 2008). La exposición a estrógenos se ha asociado a un mayor riesgo de padecer cáncer de mama. Esta asociación se debe a que los estrógenos afectan la tasa de la división celular, lo cual se manifiesta en la proliferación de células epiteliales de la mama. Este proceso es susceptible a errores genéticos durante la replicación del DNA lo cual resulta en un fenotipo maligno (Chen *et al.*, 2008).

El estradiol (E2) es uno de los principales estrógenos y la mayoría de sus efectos fisiológicos son regulados por los receptores a estrógenos (ERs). Existen varios efectos estrogénicos sobre la mitocondria como: la reducción del estrés oxidativo; la inhibición de la apoptosis; la formación de crestas mitocondriales; el aumento de la actividad y expresión de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), entre otros. Recientemente, estos receptores fueron detectados en la mitocondria y se ha demostrado que regulan la transcripción del DNA mitocondrial (mtDNA) y la vía intrínseca (mitocondrial) de apoptosis (Chen *et al.*, 2004).

La localización mitocondrial de estos receptores y su actividad como factores de transcripción del mtDNA apoyan la hipótesis de que los efectos estrogénicos sobre la mitocondria están modulados por los receptores a estrógenos mitocondriales (mtERs).

De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial está implicada en el cáncer y otras enfermedades humanas. El estudio de la función de los mtERs ayudará a crear nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. Recientemente se demostró que mtER β interactúa con la ATP sintasa mitocondrial en el cerebro, sin embargo aún no se ha comprobado la función de esta interacción (Álvarez-Delgado *et al.*, 2010). Estas interacciones aún no se han estudiado en una línea celular de cáncer hormonodependiente por lo cual se decidió estudiarlas.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la interacción entre mtERs y ATP sintasa en células de cáncer de mama sensibles al E2, considerando que son un buen modelo para estudiar la función de la interacción debido a que presentan ambos receptores y se ha comprobado la interacción con otras proteínas mitocondriales. El encontrar la interacción mtERs- ATP sintasa tiene la finalidad de que en un futuro se pueda utilizar como un blanco terapéutico.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres a nivel mundial. La incidencia en México en el año 2014 fue de 20,444 casos diagnosticados. A su vez, el 15.8 % de las muertes por cáncer en México se deben al cáncer de mama (OMS, 2014).

Normalmente, la glándula mamaria es un tejido que consiste en un arreglo de 15-18 lóbulos y una red de ductos ramificados que terminan en el pezón. Cada lóbulo se divide en 20-40 lobulillos, los cuales se concentran en un ducto terminal. El conjunto de un lóbulo y un ducto terminal se conoce como “unidad lobular ductal terminal”, la cual es la unidad funcional de la glándula mamaria. Existen diferentes tipos de cáncer de mama, que se caracterizan por el tipo de células de las cuales se originan. El tipo de cáncer que predomina es el carcinoma de origen epitelial. Un tipo de carcinoma muy conocido es el adenocarcinoma, que tiene su origen en células que constituyen el revestimiento interior de glándulas externas (Smalley y Ashworth, 2003).

Los diferentes tipos de cáncer de mama surgen predominantemente a partir de células epiteliales que recubren los ductos y lóbulos de la glándula mamaria. Los tipos de cáncer de mama más comunes son el carcinoma ductal y el carcinoma lobular, los cuales a su vez se clasifican en carcinomas *in situ* e invasivos, dependiendo su estadio. Se les considera *in situ* cuando las células permanecen recubriendo los ductos o lóbulos y no han invadido otros tejidos. Es invasivo cuando las células rompen la membrana basal de los ductos e invaden el estroma y otras áreas del tejido mamario. La metástasis ocurre cuando las células migran desde el sitio primario del tumor a través de la circulación sanguínea o linfática a otros órganos. La carcinogénesis en el tejido mamario implica una serie de etapas preinvasivas en las cuales una célula normal se transforma. Algunas de las etapas preinvasivas son la hiperplasia y el carcinoma *in situ*. (Beckmann *et al.*, 1997).

A los cánceres que se originan y que progresan estimulados por la acción de hormonas se les denomina hormonodependientes. Tal es el caso de algunos cánceres de mama que responden a la acción de los estrógenos. El estradiol (E2) es uno de los principales estrógenos implicados en la carcinogénesis (Saha Roy y Vadlamudi, 2012). El receptor a estrógenos (ER) está implicado en la progresión del cáncer de mama debido a que la mayoría (70%) de este tipo de cánceres son hormonodependientes (Lumachi *et al.*, 2013). El cáncer de mama ha sido clasificado en dos grupos principales dependiendo de la presencia o ausencia del ER. Con base en el perfil de expresión genética se considera que existen dos subtipos de

tumores ER+: luminal A y luminal B. Los tumores ER- comprenden también dos subtipos: HER2 y tipo basal (Tamimi *et al.*, 2008).

1.1.2 Línea celular MCF-7

MCF-7 es una línea celular no invasiva que deriva de una efusión pleural tomada de una paciente de 69 años con adenocarcinoma de mama metastásico (Levenson y Jordan, 1997). La siglas MCF-7 hacen referencia a la Fundación de Cáncer de Michigan, encargada de aislar y cultivar la línea celular; el número siete corresponde al número de intentos para generar la línea celular (Lee *et al.* 2015).

Debido a que expresan ERs, la línea celular MCF-7 es una de las más utilizadas en el estudio del cáncer de mama hormonodependiente. Inclusive se ha convertido en un modelo ideal para estudiar la respuesta hormonal en la célula (Holliday y Speirs, 2011).

Además de expresar ERs, esta línea celular expresa receptores a andrógenos, progestágenos y glucocorticoides (Lee *et al.*, 2015).

En este sentido, las células MCF-7 se consideran un modelo ideal para estudiar la respuesta tumoral a la terapia endocrina y para conocer los efectos biológicos de estas hormonas (Levenson y Jordan, 1997).

Se decidió utilizar esta línea celular por ser un buen modelo para el estudio de las interacciones entre los ERs y proteínas mitocondriales, ya que expresa ER α y ER β y es una línea sensible a E2 con fenotipo no invasivo.

1.1.3 Línea celular BT-474

La línea celular BT-474 es una línea invasiva de cáncer de mama que fue generada a partir de una muestra de una paciente de 60 años con carcinoma ductal invasivo. Los carcinomas ductales comienzan en los conductos lácteos y se les llama invasivos cuando se propagan hacia los tejidos mamarios que los rodean.

Entre las características de esta línea celular se encuentran la formación de parches de células adherentes y un crecimiento lento, tardando hasta un mes en llegar a una confluencia del 80% después de activadas. Al igual que MCF-7, la línea BT-474 expresa ambos ERs. Se decidió utilizar esta línea celular como modelo de una línea sensible a E2 pero con un fenotipo invasivo.

1.1.4 Receptores a estrógenos

Uno de los principales estrógenos es el 17 β -estradiol, el cual desencadena diversos efectos fisiológicos en distintos tejidos y tipos celulares. Se ha demostrado que esta hormona participa en procesos tan variados como la regulación de la función cardíaca y la neuroprotección (Sotoca et al., 2012).

La mayoría de los efectos fisiológicos del E2 son regulados por dos tipos de ER: el receptor a estrógenos alfa (ER α) y el receptor a estrógenos beta (ER β). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares e inicialmente fueron descritos como factores de transcripción nuclear (Chen *et al.*, 2005). ER α y ER β se encuentran codificados en distintos genes nucleares por lo cual son considerados subtipos y no isoformas. ER α está codificado en el gen *Esr1* y tiene un peso molecular aproximado de 61-67 KDa; ER β está codificado por *Esr2* con un peso molecular aproximado de 50-56 KDa (Álvarez Delgado, 2011).

La proteína de los ERs está estructurada en seis dominios (A-F) con distintas funciones. Los extremos amino terminal (dominios A/B) y carboxilo terminal (dominio F) presentan funciones de transactivación. El dominio C contiene el sitio de unión al DNA (DBD), el dominio D es la región tipo bisagra y el dominio E contiene el sitio de unión al ligando (LBD). ER α y ER β presentan 96 % de identidad en el dominio de unión al DNA y 59.1 % en el dominio de unión al ligando, por lo que se consideran secuencias relativamente conservadas. A pesar de esto, pueden tener funciones diferentes, incluso opuestas, en ciertos contextos fisiológicos (Álvarez Delgado, 2011; Fig.1).

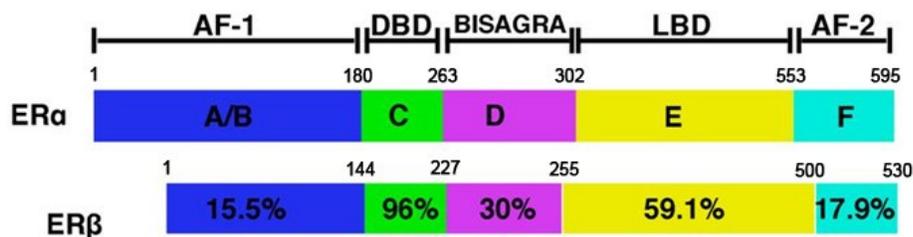


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras proteicas de ER α y ER β . Las letras (AF) indican los diferentes dominios funcionales de las proteínas. Los porcentajes indican el grado de identidad de cada dominio entre ER α y ER β . Modificado de (Álvarez Delgado, 2011).

La afinidad de ER α al E2 es mayor que la afinidad del ER β , ($k_d = 0.1$ nM) para ER α y ($k_d = 0.4$ nM) para ER β (Kuiper *et al.*, 1997). Esta diferencia en la afinidad por el ligando hace que los ERs tengan diferentes efectos. A ER α generalmente se le atribuyen funciones relacionadas con la reproducción, mientras que a ER β se le asocia con funciones del sistema nervioso central (Weiser *et al.* 2008).

Se ha demostrado que los ERs se encuentran principalmente en el núcleo (nERs), la membrana celular (mERs) y recientemente se han detectado en las mitocondrias (mtERs) de distintos tejidos y tipos celulares (Álvarez-Delgado *et al.*, 2010).

En 2001, Monje y Boland realizaron la primera detección de los ERs en mitocondrias de útero y ovario de conejo. A partir de estos resultados varios grupos de investigación han reportado la presencia de ER α y ER β en mitocondrias de diversos tejidos y tipos celulares (Monje y Boland, 2001).

Ambos receptores se han detectado en las mitocondrias de diversos tejidos y se ha sugerido que los ERs podrían regular de manera tejido-específica la función mitocondrial, ya que la distribución y cantidad de los mtERs varía entre tipos celulares (Alvarez Delgado y Cerbón Cervantes, 2011).

A pesar del gran interés por los mtERs, aún se desconocen los mecanismos de su translocación a la mitocondria. Muchas proteínas mitocondriales tienen señales de localización mitocondrial en el NH-terminal, las cuales pueden ser presecuencias, señales de importación mitocondrial (mTPS) o secuencias internas que las dirigen a la mitocondria. Actualmente sólo existe un artículo donde se identificó por un método *in silico* una región interna de aminoácidos básicos (aminoácidos 220-270) en ER β , en donde se sugiere que esta región podría funcionar como mTPS (Chen *et al.*, 2004).

Se han descrito tres mecanismos de acción para el E2: la vía genómica o lenta, la vía no genómica o rápida y la vía mitocondrial. En la vía genómica, los ERs activados por E2 se translocan al núcleo, se unen a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y activan la transcripción de genes blanco. En la vía no genómica, el E2 se une a receptores membranales y citoplasmáticos. Una vez unidos se activan vías de señalización que involucran cascadas de proteínas quinasas. Por último, la vía mitocondrial activa ERs que se localizan en la mitocondria, lo cual induce la transcripción de genes blanco en el DNA mitocondrial (Luo y Kim, 2015). Cabe resaltar que se han detectado secuencias similares a los EREs en el DNA mitocondrial en la línea celular MCF-7. Estos EREs están implicados en la transcripción de genes mitocondriales como COI y COII (subunidad I y II de la citocromo c oxidasa; Chen *et al.*, 2004).

1.1.5 Isoformas de receptores a estrógenos.

La gran variedad de efectos del E2 depende de la expresión de isoformas que resultan de la edición alternativa del mRNA inmaduro de ER α y ER β . La expresión diferencial y localización subcelular de estas isoformas son muy importantes en la respuesta al E2, dado que cada isoforma tiene diferente estructura, patrón de translocación, actividad transcripcional y afinidad por el E2 (Weiser *et al.*, 2008; Álvarez-Delgado *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que ER α presenta más de veinte variantes en cáncer de mama y otros tumores. Algunas de las isoformas de ER α son las siguientes: ER $\alpha\Delta 2$, ER $\alpha\Delta 3$, ER $\alpha\Delta 4$, ER $\alpha\Delta 5$, ER $\alpha\Delta 6$, ER $\alpha\Delta 7$, las cuales son el resultado de deleciones de exones mediante edición alternativa (Fig.2; Sotoca *et al.*, 2012).

Las isoformas de ER α tienen diferentes características estructurales: tanto ER $\alpha\Delta 3$ como ER $\alpha\Delta 4$, carecen de un dominio de unión al DNA; las isoformas ER $\alpha\Delta 4$ y ER $\alpha\Delta 5$ no presentan un dominio de unión al ligando; y por último, ER $\alpha\Delta 5$ y ER $\alpha\Delta 7$ no tienen extremo carboxilo terminal (AF-2; Fig.2; Sotoca *et al.*, 2012).

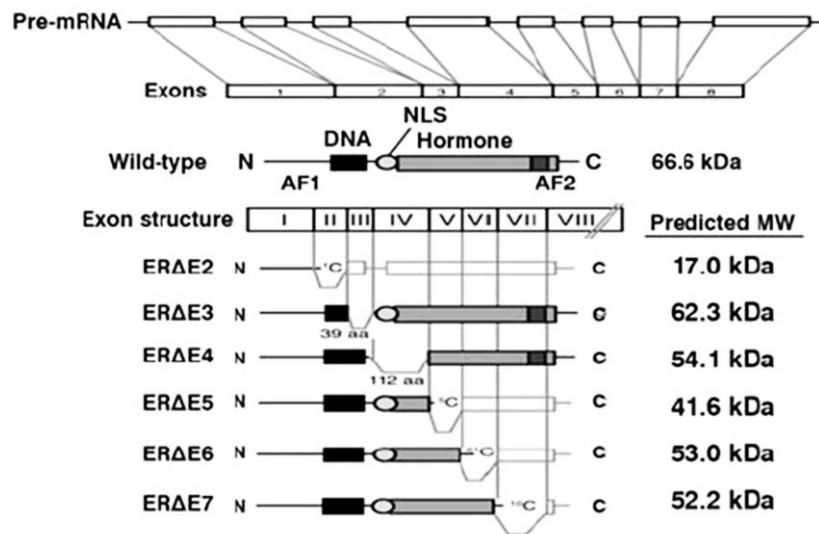


Figura 2. ER α e isoformas. Representación esquemática de la estructura protéica del ER α y seis isoformas (tomado de Al-bader *et al.*, 2010).

Se han caracterizado cinco isoformas de ER β en humanos, con distintos pesos moleculares: ER- β 1, ER- β 2, ER- β 3, ER- β 4 y ER- β 5. Los pesos moleculares de las isoformas van desde 53 KDa a 63 KDa (Fig.3). La expresión de las isoformas de ER β en humano varía en tejidos y líneas tumorales (Tong *et al.*, 2002).

Las isoformas de ER β son el resultado de la edición alternativa de los exones 8 y 9. La isoforma ER- β 1 es una proteína sin deleciones que contiene la hélice 11, hélice 12, un dominio de unión al ligando y el extremo carboxilo terminal activo (AF-2). La isoforma ER- β 2 presenta un acortamiento en la hélice 11, mientras que en la hélice 12 presenta diferente orientación que sus homólogos. Las isoformas ER- β 2 a ER β 5 comparten las siguientes características: carecen del extremo carboxilo terminal (AF-2), se dimerizan con ER- β 1 y no se unen al ligando (Sotoca *et al.*, 2012).

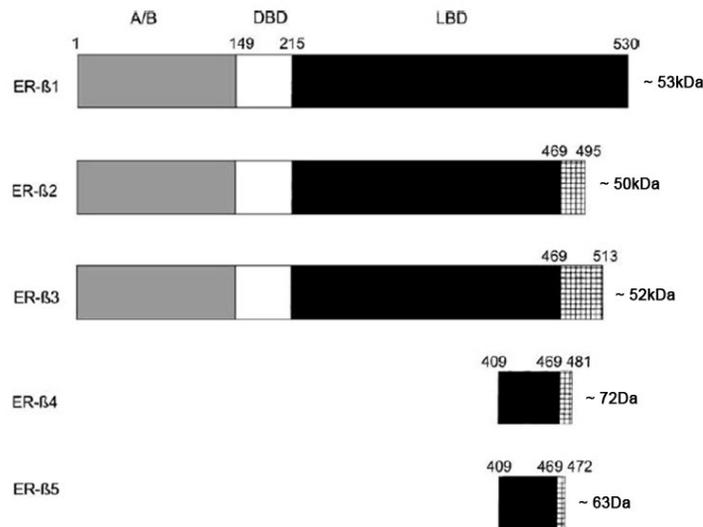


Figura 3. Isoformas de ER β humano. Las barras negras representan las secuencias de LBD conservadas y las barras cuadrículadas representan las secuencias que varían entre las isoformas. Modificado de Tong *et al.*, 2002.

1.1.6 Efecto del estradiol sobre la expresión del mRNA y de la proteína de los receptores a estrógenos.

Con respecto a los efectos del E2 sobre los niveles de proteína de los ERs, Saceda y colaboradores determinaron que después de un tratamiento de 6 h con 1 nM de E2 los niveles de proteína de los ERs disminuían (Saceda *et al.*, 1988). Cabe resaltar que este estudio se realizó previo al descubrimiento del ER β por lo cual se reporta en general una disminución para los ERs.

Nephew y colaboradores compararon los niveles de mRNA de ER α uterino en ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas con 4 μ g/kg de E2. A las 24 h post tratamiento hubo un aumento del mRNA de ER α , y los niveles de mRNA regresaron a niveles similares al control 72 h después del tratamiento. La proteína de ER α disminuye entre 3-6 h después del tratamiento. Sin embargo, a las 24-72 h post tratamiento los niveles de proteína de ER α también fueron similares al control (Nephew *et al.*, 2000). También observaron que cuando se combinó el tratamiento de E2 con ciclohexamida (inhibidor de la síntesis de proteínas) el efecto del E2 sobre los niveles de mRNA de ER α fue el mismo. Los autores sugieren que el aumento del mRNA de ER α mediante E2 ocurre independientemente de la síntesis de proteínas en el útero de la rata. En general, en este estudio demuestran que una dosis de 4 μ g/kg de E2 regula de manera diferencial y transitoria tanto el mRNA como la proteína de ER α de forma célula-específica (Nephew *et al.*, 2000).

En otro estudio realizado por Vladusic y colaboradores se evaluó la expresión del mRNA de ER α y ER β en líneas celulares de cáncer de mama. Se demostró que el E2 puede disminuir o aumentar el nivel de mRNA de ER α dependiendo de la línea celular. En la mayoría de las líneas celulares, incluyendo a MCF-7, el E2 disminuye el mRNA de ER α , mientras que en otras líneas como T47D lo aumenta (Vladusic *et al.*, 2000). El efecto del E2 sobre la expresión de mRNA de ER β se estudió utilizando células T47D tratadas con 9 nM de E2 durante 3, 6, 24, 48 y 72 h; la expresión se analizó por un ensayo de protección de RNAsa, aislando el RNA total en cada punto del tratamiento. De esta forma se demostró que el E2 regula a la alta el mRNA de ER β a las 6 h de tratamiento. Este efecto se mantuvo hasta las 72 h después del tratamiento (Vladusic *et al.*, 2000). El mRNA de ER α también presentó una regulación a la alta con el mismo esquema de tratamiento; sin embargo, el mRNA de ER β aumentó 20 veces más que el control y el mRNA de ER α aumentó sólo 2 veces más que el control (Vladusic *et al.*, 2000).

En conjunto, los resultados de los estudios anteriores muestran que el efecto del E2 sobre la expresión de mRNA de los ERs es diferencial y depende de la línea celular; mientras que los niveles de proteína tienden a disminuir con el tratamiento de E2.

1.1.7 Efecto del E2 en la localización subcelular de los ERs

El E2 afecta la localización subcelular de los ERs en distintos tipos celulares, incluyendo células de cáncer de mama como MCF-7. En estas células se ha observado que la translocación de los ERs desde el núcleo a la mitocondria incrementa con un tratamiento de 3 h con 10 o 100 nM de E2. Estos resultados fueron los primeros en demostrar que el E2 estimula la importación de ambos receptores a la mitocondria. Es interesante que el E2 no sólo tiene efectos sobre los niveles de mRNA y proteína de los ERs, sino que también afecta la distribución subcelular de estas proteínas. También se registraron las cantidades relativas de ER α y ER β en la fracción citosólica, nuclear y mitocondrial de células MCF-7 después del tratamiento con 100 nM E2 por 12 h. A través de este experimento se pudo estimar el porcentaje de ERs en cada fracción relativa al homogenado total. Los resultados de estos experimentos indican que ER α está representado por un 10% en la fracción citosólica, un 70% en la fracción nuclear y un 12% en la fracción mitocondrial. A su vez, ER β presentó un porcentaje de alrededor de 50% en la fracción citosólica, 26% en la fracción nuclear y 18% en la fracción mitocondrial. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de ER α y ER β y se expresaron en términos de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína subcelular. Además mediante inmunohistoquímica utilizando microscopía confocal se demostró experimentalmente que

ambos mtERs se localizan específicamente en la matriz mitocondrial de las células MCF-7 y que existe más proteína de ER β en la fracción mitocondrial (Chen *et al.*, 2004).

A partir de este estudio se han realizado varias investigaciones en las cuales se ha reportado la presencia tanto de ER α como de ER β en mitocondrias de células de corazón (Yang *et al.*, 2004), cristalino (Cammarata *et al.*, 2004), hueso (Solakidi *et al.*, 2005), cerebro (Álvarez-Delgado *et al.*, 2010), entre otros. En este contexto, es posible que los mtERs tengan un papel importante en la regulación del metabolismo energético mitocondrial de estos tejidos (Chen *et al.*, 2009).

1.1.8 Efecto estrogénico sobre la mitocondria

La mitocondria es un organelo que está implicado en diversos procesos celulares como la regulación de concentraciones de calcio, la producción de la mayoría del ATP mediante la fosforilación oxidativa, el control de la apoptosis, entre otros. Las funciones de la mitocondria dependen de la integridad estructural de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). La CRM consiste en cinco complejos: El complejo I (NADH-ubiquinona reductasa), II (succinato deshidrogenasa), III (CoQ-citocromo c reductasa), IV (citocromo c oxidasa) y V (ATP sintasa). La CRM está conformada por más de 80 proteínas, 13 de ellas están codificadas en el DNA mitocondrial, que se transcribe y traduce dentro de la mitocondria. Las demás proteínas están codificadas en el DNA nuclear, se transcriben en el núcleo, se traducen en el citosol y se importan a la mitocondria. Por lo anterior, el ensamblaje final de la CRM depende tanto del núcleo como de la mitocondria (Alvarez Delgado y Cerbón Cervantes, 2011).

El E2 preserva la estructura mitocondrial mediante la reducción del estrés oxidativo; la inhibición de la apoptosis y la inhibición de la liberación de citocromo c dependiente de calcio (Jazbutyte *et al.*, 2009). Además, estrógenos como el etinil estradiol y el E2 promueven la función mitocondrial mediante el aumento de la producción de ATP y el incremento de la síntesis de proteínas de la CRM. El E2 también tiene un efecto positivo sobre la ultraestructura mitocondrial. Se ha comprobado que esta hormona favorece la formación de crestas mitocondriales; provoca un aumento en el número de mitocondrias por célula y preserva la estructura de las membranas y de la matriz mitocondrial (Chen *et al.*, 2005).

Otro de los blancos mitocondriales del E2 es el mtDNA. Su regulación es importante debido a que codifica 13 proteínas esenciales de la CRM. Se ha demostrado que el E2 induce la transcripción de la COI y COII (Chen *et al.*, 2004), dos de las proteínas codificadas en el mtDNA. A su vez, se ha demostrado que el E2 induce la expresión de tres subunidades que forman parte del complejo piruvato deshidrogenasa y

aconitasa 2 y regula a la baja la malato deshidrogenasa. Estas dos enzimas participan en el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Nilsen *et al.*, 2007).

Los resultados de diferentes estudios indican que el E2 puede mejorar la función mitocondrial en los diferentes aspectos mencionados, demostrando la importancia de esta hormona en el mantenimiento del balance bioenergético de la célula (Chen *et al.*, 2009).

La reciente localización de los ERs en la mitocondria de diferentes tejidos y tipos celulares apoya esta nueva idea de que los efectos estrogénicos en la mitocondria pueden estar regulados por los mtERs. Esto es de gran importancia, debido a que la disfunción mitocondrial está involucrada en muchas enfermedades humanas como el cáncer (Álvarez Delgado y Cerbón Cervantes, 2011).

1.1.9 Efecto del estradiol sobre la expresión y actividad de la ATP sintasa mitocondrial.

La función principal de la mitocondria es producir ATP mediante la ATP sintasa y regular el balance energético de la célula (Irwin *et al.*, 2008). La ATP sintasa también es un blanco del E2. Específicamente, se demostró que en mitocondrias de cerebro de ratas tratadas con E2 hay un aumento de la expresión de las subunidades α y β de la porción catalítica (F1-ATP sintasa) de la holoenzima. Los efectos del E2 sobre la ATP sintasa afectan el metabolismo energético de la célula, evidenciando la importancia del estudio de los efectos del E2 sobre esta enzima (Nilsen *et al.*, 2007; Irwin *et al.*, 2008).

La actividad de la holoenzima depende de la coordinación entre la síntesis e hidrólisis de ATP, para lo cual la ATP sintasa tiene proteínas reguladoras como la proteína de sensibilidad a la oligomicina (OSCP). La proteína OSCP forma parte del brazo periférico de la ATP sintasa y se requiere para que el gradiente de protones y la síntesis de ATP estén acoplados. Algunos autores han sugerido que el E2 puede unirse directamente y modular la actividad de la ATP sintasa. En este contexto, se ha demostrado que el E2 inhibe la actividad de hidrólisis de ATP de la FOF1-ATPasa. Otros estudios *in vitro* demuestran que los estrógenos pueden aumentar o inhibir la actividad de ATP sintasa en ciertos tejidos de manera dosis-dependiente (Zheng y Ramirez, 1999b).

1.1.10 Interacciones entre los receptores a estrógenos y proteínas mitocondriales.

En un estudio realizado por Álvarez y colaboradores se demostró la expresión de mtERs en distintas áreas del cerebro de ratas de diferentes edades. En este mismo estudio se demostró que la ATP sintasa interactúa con mtER β , pero no con mtER α (Álvarez-Delgado *et al.*, 2010).

En otros estudios también se ha demostrado que los ERs pueden interactuar con diversas proteínas mitocondriales en diferentes tejidos y tipos celulares. Una de estas proteínas es la enzima mitocondrial 17 β -HSD10 que participa en el metabolismo de estrógenos, convirtiendo 17 β -estradiol a estrona. Esta enzima se ha detectado en un complejo con ER α en mitocondrias de cardiomiocitos de rata (Jazbutyte *et al.*, 2009).

Otra proteína mitocondrial que interactúa con los ERs es HADHB, la cual participa en la β - oxidación de ácidos grasos. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, inmunofluorescencia y microscopía confocal, se comprobó la interacción de HADHB con ER β (Zhenqi Zhou *et al.*, 2012b) y ER α (Z. Zhou *et al.*, 2012a). Aunque existe una interacción de HADHB con ambos receptores, dicha interacción tiene diferente efecto sobre la actividad de la enzima: mientras ER α estimula la actividad de HADHB, ER β la inhibe. Estos resultados sugieren que los ERs pueden afectar diferencialmente el estrés oxidativo celular a través de la modulación de la beta oxidación en células de cáncer de mama (Zhou *et al.*, 2012a).

Hasta el momento se ha demostrado la presencia de ERs en la mitocondria en diversos modelos pero se desconoce el alcance de todas sus funciones. Por lo tanto, es importante estudiar aspectos funcionales de estas proteínas residentes de la mitocondria, como las interacciones con diferentes proteínas mitocondriales. Esta información ayudará a esclarecer los procesos de carcinogénesis dependientes de E2.

1.2 Justificación

La interacción de los receptores a estrógenos con diferentes enzimas mitocondriales involucradas en la esteroidogénesis (17β -HSD10) y el metabolismo (HADHB y ATP sintasa) puede modificar su actividad, y por lo tanto, utilizarse como un blanco terapéutico.

El estudio de la interacción entre los mtERs y la ATP sintasa es fundamental puesto que la ATP sintasa es una enzima esencial en la fosforilación oxidativa y su actividad se ve afectada por las concentraciones de E2. Por lo tanto, el efecto del E2 sobre esta enzima afecta directamente el metabolismo energético de la célula y como consecuencia, su estudio es importante en el contexto de patologías mitocondriales. Los resultados del estudio de la función e interacciones de los mtERs pueden aplicarse para entender los mecanismos de carcinogénesis y otras enfermedades dependientes del E2.

En este trabajo se investigará la posible interacción entre los ERs y la ATP sintasa. Esta interacción representaría otro nivel de regulación estrogénica en la mitocondria que podría ser un nuevo blanco terapéutico en el cáncer de mama sensible a hormonas.

1.3 Hipótesis

Dado que la ATP sintasa es una enzima mitocondrial regulada por E2 y que interactúa con ER β en un tejido sensible al E2, se espera que la ATP sintasa interactúe con los ERs en células de cáncer de mama sensible a hormonas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar si existe una interacción entre los receptores a estrógenos y la ATP sintasa en células de cáncer de mama sensibles a hormonas.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Corroborar la presencia de receptores a estrógenos en células de cáncer de mama sensibles a hormonas.
2. Evaluar la presencia del complejo ATP sintasa-ERs en células de cáncer de mama sensibles a hormonas.
3. Estudiar la localización subcelular del complejo ATP sintasa-ERs.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Las líneas celulares MCF-7 (HTB-22) y BT-474 (HTB-20) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Para el cultivo y el crecimiento de las líneas celulares se utilizaron los medios recomendados por la ATCC.

La línea celular MCF-7 se mantuvo en medio EMEM (Corning), el cual contiene 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, piruvato de sodio y se suplementó con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco), 0.01mg/mL de insulina humana y 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco).

La línea celular BT-474 se mantuvo en medio SF (Corning) que contiene L-glutamina, 1.0 g/L BSA, se suplementó con 10 % SBF (Gibco) y 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco).

Las líneas celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de dióxido de carbono. Cada tercer día el medio de cultivo se retiró y reemplazó por medio de cultivo nuevo. Cuando las células presentaron 80% de confluencia, se subcultivaron utilizando el método sugerido por la ATCC para cada línea celular.

Antes de sembrar las células para los experimentos se criopreservaron al menos once tubos con aproximadamente un millón de células con el fin de mantener las líneas celulares con sus características iniciales. Para esto se siguió el protocolo de criopreservación de la ATCC de cada una de las líneas celulares.

2.2 Fraccionamiento subcelular.

Con el fin de obtener proteínas mitocondriales, citoplasmáticas y nucleares en fases separadas y estudiar la localización subcelular de la posible interacción entre los ER y la ATP sintasa, se realizó un fraccionamiento subcelular de las líneas celulares. Para esto, se utilizó el kit de fraccionamiento "Cell Fractionation Kit-Standard" (ab109719, Abcam). La técnica se basa en un método rápido para obtener fracciones citosólicas, mitocondriales y nucleares mediante una secuencia de extracciones selectivas que se obtienen usando detergentes y centrifugaciones. En el primer paso la membrana plasmática se permeabiliza selectivamente con el detergente I. La fracción citosólica se separa del resto de la célula mediante una centrifugación de 10,000 x g x 1 min a 4 °C. En el segundo paso, la fracción mitocondrial es

extraída con el detergente II y se separa de la fracción nuclear mediante una centrifugación de 10,000 x g x 1 min a 4 °C. Por último, los núcleos se lisaron con solución amortiguadora RIPA (PBS 1X, NP-40 1 % v/v, desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.1 %, inhibidores de proteasas (04693159001) de Roche).

2.3 Análisis de la expresión de proteínas

Para la obtención de proteínas totales, las células MCF7 y BT474 fueron lisadas mecánicamente mediante 30 pases con una jeringa de 21G en 1 mL de solución amortiguadora RIPA (PBS 1X, NP-40 1 % v/v, desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.1 %, inhibidores de proteasas (04693159001) de Roche). El lisado celular se centrifugó a 16,595 rpm x 30 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -20 °C. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Primero se utilizaron 60 V durante 30 min hasta pasar el gel concentrador. Después se cambió el voltaje a 100 V y se corrió 1 h antes de transferirse a una membrana de PVDF por electrotransferencia en una cámara semi húmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente por 2 h con leche en polvo 5 % w/v en TBS-Tween 0.1 % v/v. El Western blot se realizó con los anticuerpos de Santa Cruz anti ER α (MC20: sc-542; 0.8 μ g/mL), anti-ER β (1531: sc-53494; 0.4 μ g/mL), anti-F1-ATP sintasa (A-8: sc-74549; 0.2 μ g/mL), cabra anti-ratón IgG-HRP (sc-2005; 0.05 μ g/mL), cabra anti-conejo IgG-HRP (sc-2004; 0.04 μ g/mL) y anti-GAPDH (G-9: sc-365062 0.2 μ g/mL)). Las bandas se detectaron mediante un método quimioluminiscente en el equipo ChemiDoc MP de Bio-Rad.

Se utilizó la técnica de Western blot para corroborar la expresión de ER α y ER β en las líneas celulares elegidas para el estudio. Una vez realizados los ensayos de coimmunoprecipitación se realizaron Western blots para la detección de la proteína contra la que se inmunoprecipitó y para la detección de las posibles interacciones.

2.4 Detección de interacciones proteína-proteína por coimmunoprecipitación.

Para evaluar si existen interacciones proteína-proteína entre los ERs y la ATP sintasa se realizó la técnica de coimmunoprecipitación (CoIP). Todos los pasos y centrifugaciones de la CoIP se realizaron a 4 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-ER α (MC20: sc-542), anti-ER β (1531: sc-53494) anti-F1-ATP sintasa (A-8: sc-74549), anti HSP70 (MA3-028)) y anti-GAPDH (G-9: sc-365062). Todos los anticuerpos y la proteína A/G-Agarosa utilizados en la CoIP fueron de la marca Santa Cruz con excepción de anti

HSP70 de Thermo Fisher Scientific. La proteína total se obtuvo como se indica en la sección 2.3. Adicionalmente, se obtuvo la proteína mitocondrial y citosólica como se indica en la sección 2.2.

Para las CoIP, se utilizaron entre 100-500 µg de proteína total (input) o de cada fracción y se ajustaron los volúmenes con solución amortiguadora RIPA. Se agregaron 2 µg de anticuerpo anti ERα (MC-20) y las muestras se incubaron a 4 °C por 2 h en agitación constante. En este punto se consideraron controles negativos de CoIP (500 µg o 11 µg de proteína sin anticuerpo). Posteriormente, se agregaron 20 µL de Proteína A/G Agarosa (sc-2003) a todas las muestras y se dejaron toda la noche en agitación a 4°C.

Las muestras se centrifugaron a 1000 x g por 2-5 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. La pastilla se lavó 2 veces con 500 µL de RIPA y los inmunocomplejos se desnaturalizaron en 40 µl de amortiguador Laemmli 2X (SDS 0.1 %, azul de bromofenol 0.2 %, β-mercaptoetanol 10 %, glicerol 20 % y Tris HCl 150 mM; pH 6.8). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis por Western blot.

2.5 Aislamiento de RNA

El aislamiento de RNA se realizó mediante el kit "GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit" (1002012371, Sigma Aldrich). El RNA total se obtuvo a partir de células de MCF-7 y BT-474 a una confluencia de 80 %. El método de extracción de RNA consiste en lisar y homogenizar las células en solución amortiguadora con tiocionato de guanidina que asegura la desnaturalización de macromoléculas e inactivación de RNAsas. Posteriormente, se agregó etanol que ayuda a que el RNA se una a la membrana de sílica durante la centrifugación. Por último se realizó un lavado para retirar contaminantes y se eluyó el RNA en 500 µL de solución de elución. El RNA se cuantificó por espectrofotometría en un Nanodrop Lite (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 y 260/280 nm. La integridad del RNA se evaluó en un gel de agarosa al 2 % disuelto en 50 mL de TAE 1X, al cual se le agregaron 7 µL de bromuro de etidio. Se cargaron 500 ng de cada muestra y se corrió en una cámara de electroforesis con solución amortiguadora TAE 1X a 100 V durante 35 min.

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la Tabla 1 se presentan las secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido para ERα y ERβ utilizados, junto con los tamaños de los productos de PCR esperados. Los oligonucleótidos que se usaron

permiten la detección de las isoformas de ER α sin deleciones y con deleción de los exones 3 ($\Delta 3$) y 5 ($\Delta 5$); y las isoformas de ER $\beta 1$, ER $\beta 2$ y ER $\beta 5$.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el PCR punto final y en la expresión de genes por qRT-PCR.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del producto esperado
ER$\alpha\Delta 3$	S: ATGGAATCTGCCAAGAAGACT	281bp wt; 165bp $\Delta 3$
	A: GCGCTTGTGTTTCAACATTCT	
ER$\alpha\Delta 5$	S: CTCATGATCAAACGCTCTAAG	466bp wt; 328bp $\Delta 5$
	A: ATAGATTTGAGGCACACAAAC	
ERβ-I	S: CGATGCTTTGGTTTGGGTGAT	268bp ER $\beta 1$
	A: GCCCTCTTTGCTTTTACTGTC	
ERβ-II	S: CGATGCTTTGGTTTGGGTGAT	214bp ER $\beta 2$; 295bp ER $\beta 5$
	A: CTTTAGGCCACCGAGTTGATT	

S: sentido; A: Antisentido Modificado de: Bader *et al.*, 2010

El programa de PCR fue el siguiente: 2 min a 50 °C (1 ciclo); 10 min a 95 °C (1 ciclo); 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C (60 ciclos), seguido de un paso de disociación por 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C (1 ciclo).

2.7 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

El RT-PCR es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA), en donde una hebra de RNA se retrotranscribe en cDNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa (AB-1247, Thermo scientific). Se preparó una primera mezcla a la cual se le agregaron 0.5 μ L dNTPs (10 μ M); 0.5 μ L oligoDT (500 ng/ μ L); 250 ng del templado de RNA; 5.107 μ L de agua libre de DNasas. Posteriormente se preparó una segunda mezcla a la cual se le agregaron 2 μ L de solución amortiguadora 5X; 1 μ L DTT (0.1 M); 0.063 μ L de SuperScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ L; Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 65 °C, 5 min a 42 °C (en estos cinco minutos se agregó la segunda mezcla); 60 min a 42 °C y una etapa final de 4 °C. La muestra se utilizó para qPCR pero antes se realizó una PCR de punto final para corroborar que los oligonucleótidos amplificaran.

2.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La expresión de mRNA para ER α y ER β se determinó mediante qPCR (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) y Hot-START-IT SYBR Green (Affymetrix). Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 0.4 μ L de oligonucleótido sentido (10 μ M), 0.4 μ L de oligonucleótido antisentido (10 μ M), 5 μ L de Hot-START-IT SYBR Green, 1.7 μ L de agua libre de DNAsas, 2.5 μ L de cDNA obtenido en el paso 2.6.

El programa de qPCR fue el siguiente: 40 ciclos de 95 °C 2 min; 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s; 95 °C 1 min; 55 °C 1 min; 95 °C 30 s y por último, un ciclo a 12 °C durante 59 min.

La cuantificación de la expresión génica se realizó de manera relativa en la cual se expresa el cambio en los niveles de expresión de mRNA. La cuantificación relativa se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar (ER α y ER β) contra un gen control también conocido como gen de referencia o gen normalizador. En este estudio se utilizó como gen de referencia a la proteína ribosomal L32 (RPL32) con el cual los niveles de mRNA se normalizaron.

Para medir la expresión génica relativa se calculó lo siguiente: cantidad de mRNA del gen de estudio/cantidad de mRNA del gen de referencia, lo cual se usa para comparar la cantidad de mRNA del gen de estudio de las muestras. Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio para obtener la cantidad total de mRNA del gen de estudio para cada línea celular.

Los datos de fluorescencia fueron procesados por el software del termociclador obteniéndose los parámetros de eficiencia y el ciclo umbral (CT), a su vez se calcularon de manera manual para corroborar los datos. El parámetro de CT indica el número de ciclos en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral dado. La comparación de CT entre las muestras permite calcular la cantidad inicial de las moléculas de cDNA que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad de DNA en una muestra, menor el número de ciclos CT que se requiere para alcanzar este umbral (Aguilera *et al.*, 2014).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer

El cultivo de las líneas celulares se realizó de acuerdo a la descripción de la sección 2.1. Se cultivaron dos líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (HTB-22) y BT-474 (HTB-20) provenientes de la ATCC.

En la figura 4, se muestran las fotografías de las dos líneas celulares con una confluencia del 80%. Como se esperaba, la línea celular MCF-7 presenta un crecimiento en monocapa y la línea celular BT-474 presenta un crecimiento en parches.

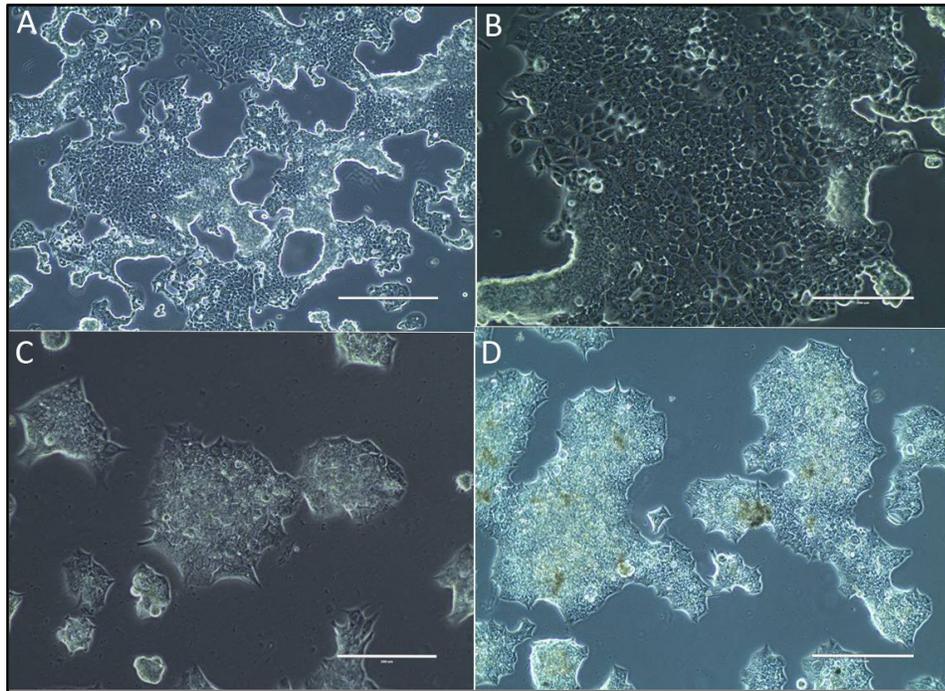


Figura 4. Fotografías de células de cáncer de mama. A y B: MCF-7 HTB22. C y D: BT-474 HTB-20. Las fotografías se tomaron con un microscopio invertido con un objetivo 20X. La barra indica 1000 μm .

3.2 Evaluación de la presencia del complejo ATP sintasa-ERs y su localización subcelular en células de cáncer de mama sensibles a hormonas

Con el fin de demostrar la interacción entre ATP sintasa-ERs, se diseñaron experimentos de CoIP de ER α en proteína total, proteína mitocondrial y citosólica en las líneas celulares MCF-7 y BT-474. Esto permitió conocer cuál es su localización subcelular en caso de que se demuestre la interacción.

En la línea celular MCF-7 se encontró que existe una interacción entre ER α y la ATP sintasa (Fig.5, segundo panel, a). Además, se determinó que la localización subcelular del complejo ER α -ATP sintasa es principalmente mitocondrial, pero también se detectó en la fracción citosólica (Fig. 5, segundo panel, b).

Debido a que se inmunoprecipitó ER α , se realizaron Western blots para la detección de ER α para verificar la correcta realización de la técnica.

En la figura 5, se detecta únicamente la expresión de ER α en las muestras inmunoprecipitadas (IP). Este resultado representa el control positivo debido a que se inmunoprecipitó ER α .

Para corroborar que las interacciones entre ER α -ATP sintasa son específicas, se realizaron Western blots para la detección de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una proteína principalmente citoplasmática con escasas probabilidades de interactuar con la ATP sintasa mitocondrial (Fig.5). En la figura 5, se detectó la expresión de GAPDH en proteína total como se esperaba.

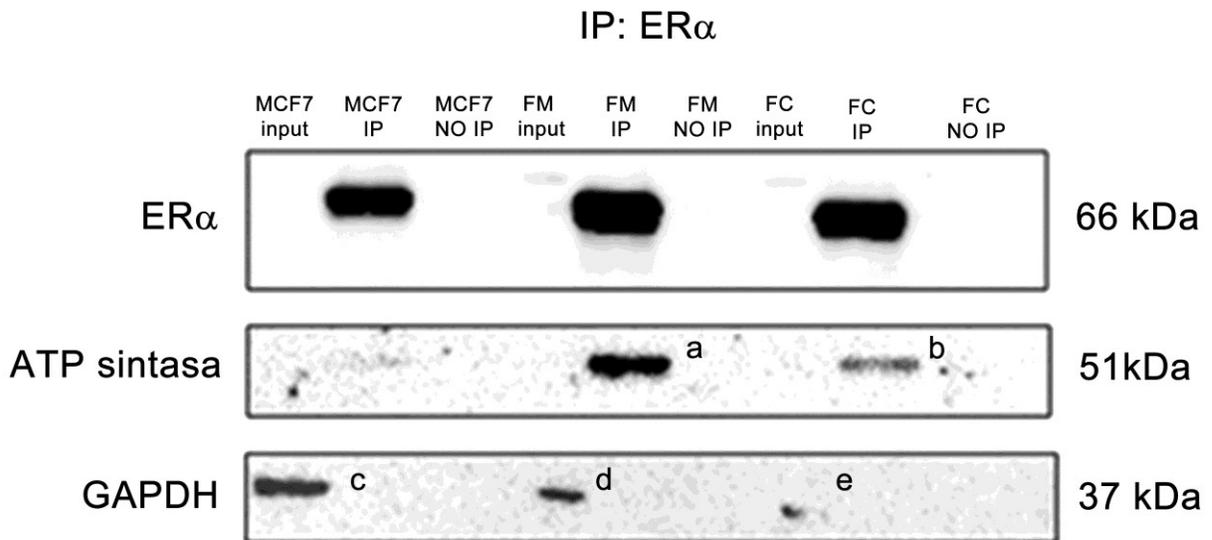


Figura 5. Interacción ER α -ATP sintasa en MCF-7. MCF-7 input: control de expresión de proteína total. MCF-7 IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína total. MCF-7 NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína total. FM input: control de expresión de proteína mitocondrial. FM IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FM NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FC input: control de expresión de proteína citosólica. FC IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. FC NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. Panel superior, Western blot contra ER α (control positivo de CoIP). Panel intermedio, Western blot contra ATP sintasa, se muestra el complejo de interacción ER α -ATP sintasa. Tercer panel, Western blot contra GAPDH (control de especificidad de la interacción ER α -ATP sintasa). La letra a, indica la interacción de ER α -ATP sintasa en la fracción mitocondrial. La letra b, indica la interacción de ER α -ATP sintasa en la fracción citosólica. La letra c, indica expresión de GAPDH en proteína total. La letra d, indica expresión de GAPDH en fracción mitocondrial y la letra e, ausencia de expresión en fracción citosólica. La figura representa los resultados de dos experimentos independientes.

En cuanto a la línea celular BT-474, no se detectó la interacción entre ER α y la ATP sintasa. Sólo se corroboró la expresión de ER α como control positivo de la CoIP y la expresión de GAPDH en proteína total (Fig.6).

No se pudo evaluar si existe interacción de ER β -ATP sintasa en ambas líneas celulares debido a que se tuvieron problemas con la detección usando el anticuerpo anti ER β .

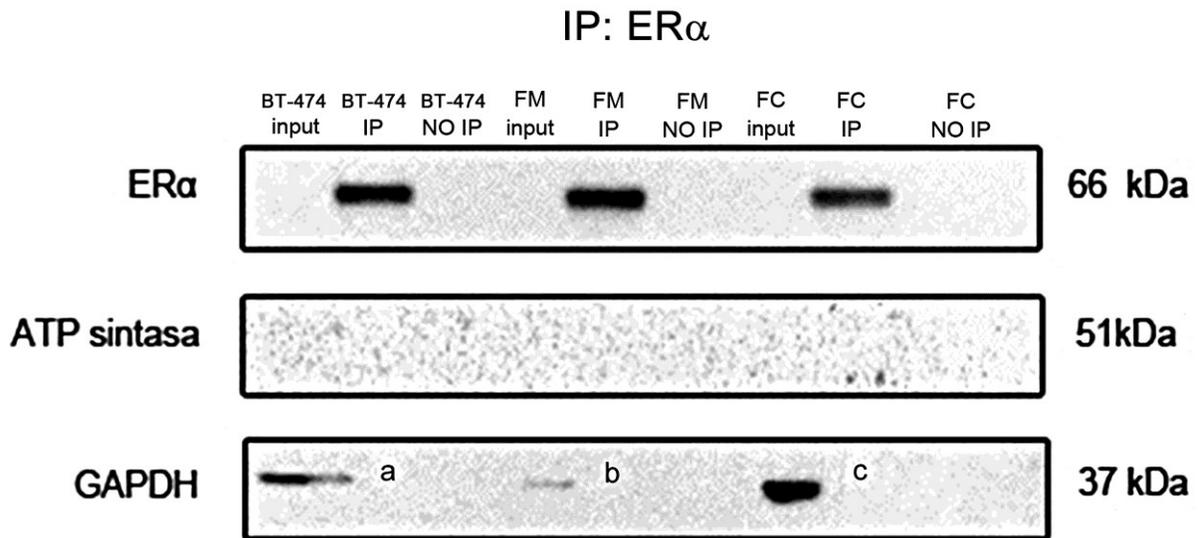


Figura 6. Interacción ER α -ATP sintasa en BT-474. BT-474 input: control de expresión de proteína total. BT-474 IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína total. BT-474 NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína total. FM input: control de expresión de proteína mitocondrial. FM IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FM NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FC input: control de expresión de proteína citosólica. FC IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. FC NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. Panel superior, Western blot contra ER α (control positivo de CoIP). Panel intermedio, Western blot contra ATP sintasa, se muestra la ausencia del complejo de interacción ER α -ATP sintasa. Tercer panel, Western blot contra GAPDH (control de especificidad de la interacción ER α -ATP sintasa). La letra a, indica expresión de GAPDH en proteína total. La letra b, indica expresión de GAPDH en fracción mitocondrial. La letra c, indica expresión de GAPDH en fracción citosólica. La figura representa los resultados de dos experimentos independientes.

3.3 Expresión de isoformas de ER α y ER β en MCF-7 y BT-474

La expresión de mRNA del ER β fue analizada por qRT-PCR y de esta manera corroborar si efectivamente no se expresa la proteína o si la ausencia de la banda esperada se debe al anticuerpo. Primero fue necesario realizar un PCR punto final para corroborar si los oligonucleótidos diseñados amplificaban correctamente.

Se probaron los siguientes oligonucleótidos para ER α en la línea celular MCF-7: primero, ER α Δ 3 el cual amplifica la isoforma *wild type* de ER α y la isoforma Δ 3. Después, ER α Δ 5 el cual amplifica la isoforma *wild type* y la isoforma Δ 5. En el caso del ER β , se probaron los siguientes oligonucleótidos: ER β I, que amplifica la isoforma ER β I; y ER β II, que amplifica las isoformas ER β 2 y ER β 5.

En la línea celular BT-474 se probaron los siguientes oligonucleótidos para el ER α : ER α Δ 5, que amplifica la isoforma *wild type* y la isoforma Δ 5; para ER β los oligonucleótidos: ER β I que amplifica la isoforma ER β I.

En la línea celular MCF-7 se detectó la expresión de las siguientes isoformas: ER α Δ 3 con un peso esperado de 281 pb; ER α Δ 5 con un peso esperado de 466 pb; ER β I con un peso esperado de 268 pb y ER β II con un peso esperado de 214 pb (Fig. 7 y 8).

En la línea celular BT-474 se detectó la expresión de las siguientes isoformas ER α Δ 5 y ER β I en los pesos esperados (Fig. 7).

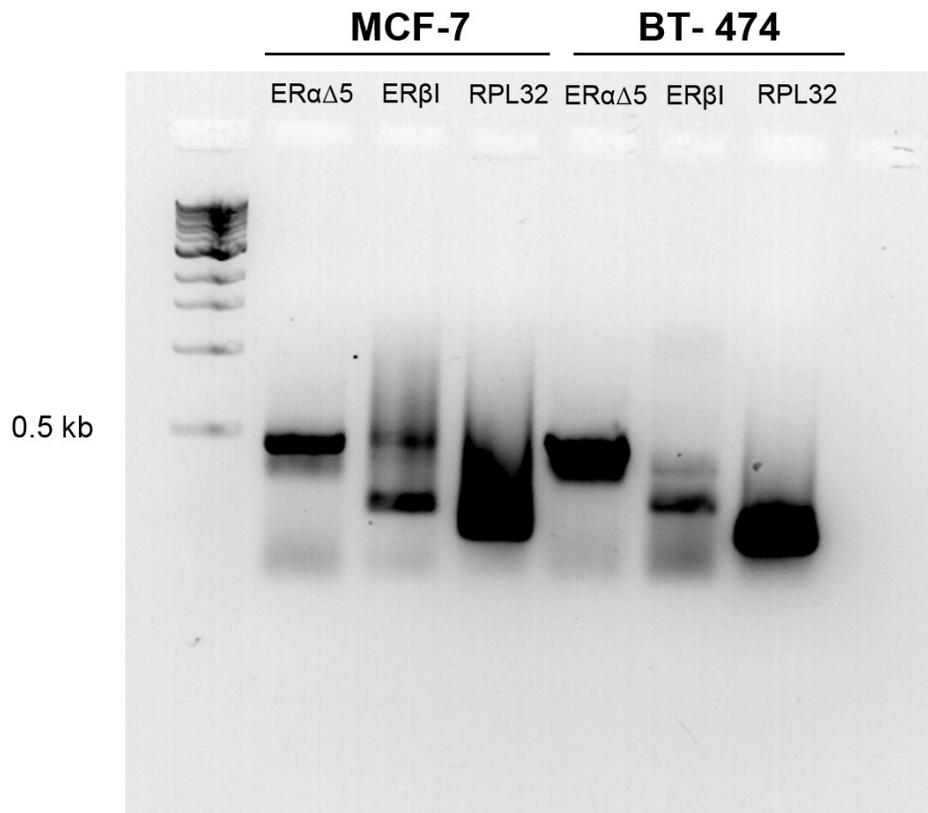


Figura 7. Expresión de isoformas de ER α y ER β . Se corrió un gel de agarosa al 2 % a 100 V por 45 min. Tanto en la línea celular MCF-7 como en BT-474 se detecta la expresión de ER α Δ 5 y ER β I. Como control se utilizó el gen RPL32 el cual amplifica en 219 pb.

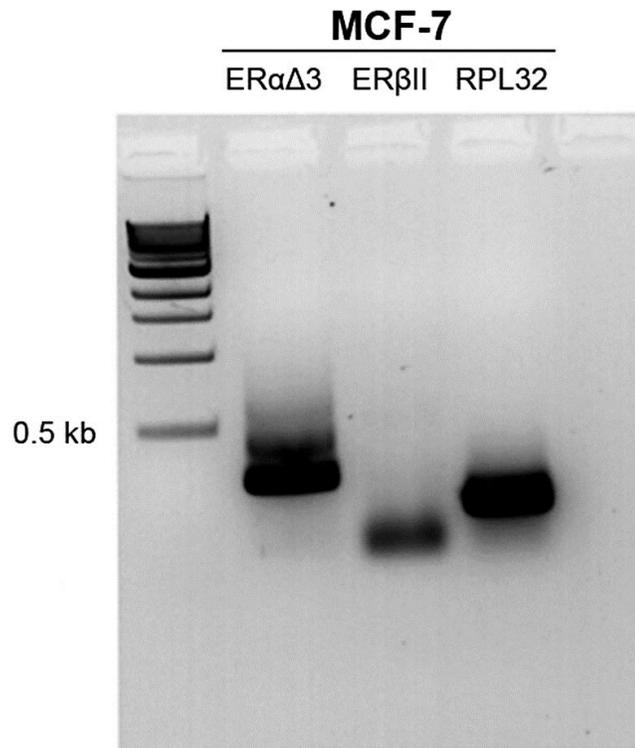


Figura 8. Expresión de isoformas de ER α y ER β . Se corrió un gel de agarosa al 2 % a 100 V por 45 min. En la línea celular MCF-7 se detecta la expresión de ER α Δ 3 y ER β II. Como control se utilizó el gen RPL32 el cual amplifica en 219 pb.

3.4 Expresión de mRNA de ER α y ER β en MCF-7 y BT-474

Primero, se hizo una prueba de amplificación con las mismas condiciones que el PCR punto final con los pares de oligonucleótidos ER α Δ 5 y ER β I para ambas líneas celulares. En donde sí se obtuvo expresión de mRNA, pero su CT donde comienza la amplificación fue de 37. Lo cual indica que es muy poco el mRNA.

Con el objetivo de reducir el CT y estandarizar el protocolo se decidió hacer una segunda prueba, esta vez con las condiciones mencionadas en la sección 2.8 en la línea MCF-7. En esta segunda prueba se detectó el mRNA de ER α Δ 5 en MCF-7 con un CT de 28, lo cual indica mayor cantidad de mRNA sin embargo, no se detectó el mRNA para ER β I.

Se realizó una tercera prueba con las condiciones de la sección 2.8 con la finalidad de seleccionar aquellas muestras con un CT menor a 28. En la línea celular MCF-7 se probaron el par de oligonucleótidos ER α Δ 3 y ER β II, para BT-474 se probaron los oligonucleótidos ER α Δ 3, ER β I y ER β II. Todos los oligonucleótidos presentaron amplificación de mRNA con excepción de ER β I. Por lo tanto, se compararon los resultados obtenidos de las pruebas y se seleccionó el set de oligonucleótidos ER α Δ 5 con un CT menor al de ER α Δ 3 y ER β II el cual amplificó en ambas líneas.

Tanto en MCF-7 como en BT-474 se demostró que sí se expresa el mRNA de ER α . La expresión de mRNA en ambas líneas es muy similar (Fig.9a). Para línea celular MCF-7 presentó un CT de 30 y en BT-474 un CT de 28 (Fig. 9b).

También se demostró la expresión de mRNA de ER β en la línea celular MCF-7 y en BT-474. En la figura 10a se muestra que presenta mayor expresión de ER β en MCF-7 que en BT-474. Se presentó un CT de 32 para MCF-7 y un CT de 34 para BT-474 (Fig. 10b).

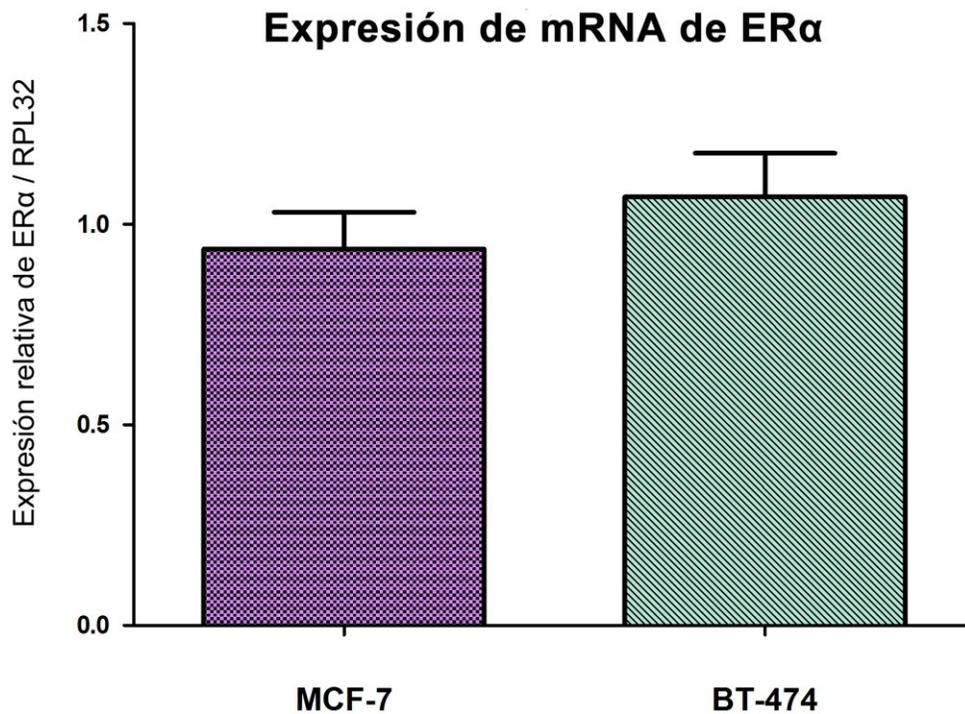


Figura 9a. Expresión relativa de mRNA de ER α . Al gen constitutivo RPL32 se utilizó como gen de referencia para realizar la expresión relativa. Las barras de error indican la desviación estándar.

Curva de amplificación de ER α Δ 5

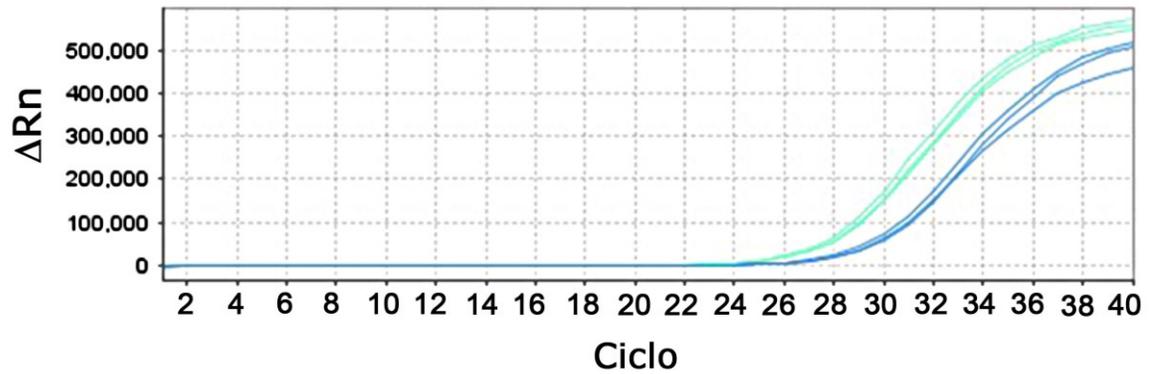


Fig 9b. Curva de amplificación de ER α . El ΔRn indica el cambio de intensidad de fluorescencia del producto amplificado en base al número de ciclos. Las líneas azul marino indican que MCF-7 presenta un CT de 30 y las líneas azul claro indican que BT-474 presenta un CT de 28.

Expresión de mRNA de ER β

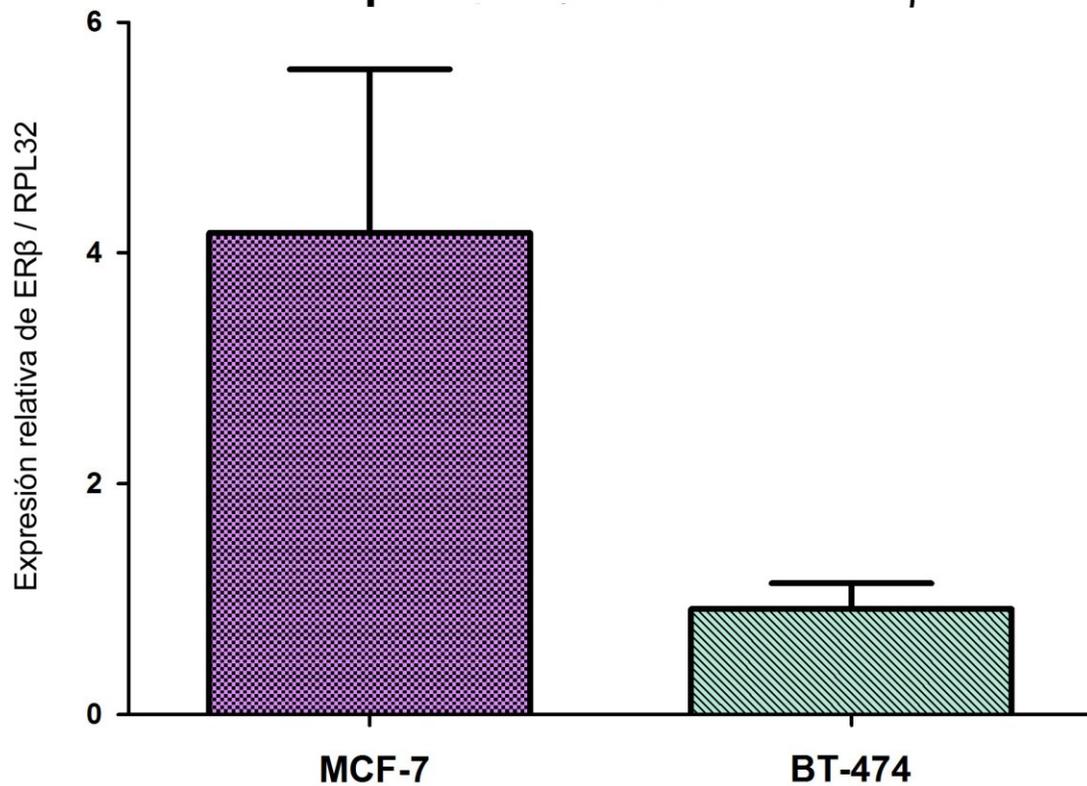


Figura 10a. Expresión relativa de mRNA de ER β . Al gen constitutivo RPL32 se utilizó como gen de referencia para realizar la expresión relativa. Las barras de error indican la desviación estándar.

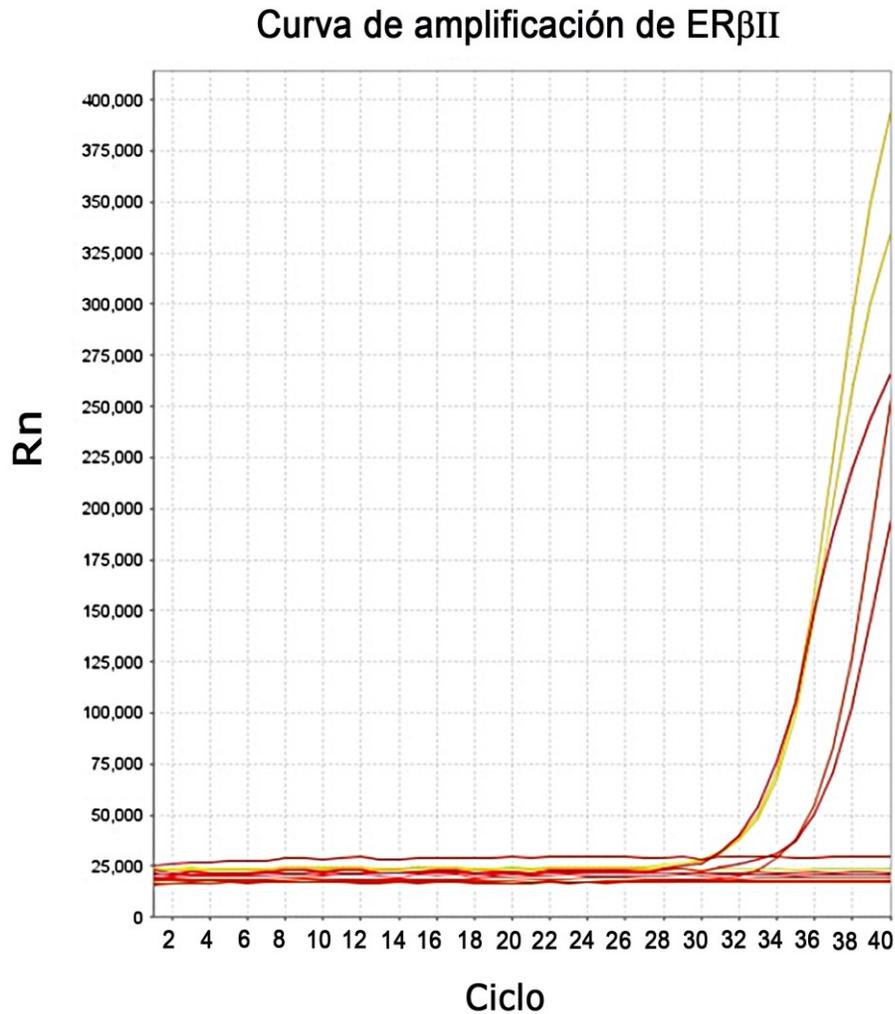


Fig 10b. Curva de amplificación de ER β . El Rn indica la intensidad de fluorescencia del producto amplificado en base al número de ciclos. Las líneas amarillas indican que MCF-7 presenta un CT de 32 y las líneas rojas indican que BT-474 presenta un CT de 34.

3.5 Modelo de translocación mitocondrial para los mtERs

De manera complementaria que se realizaron los experimentos propuestos para cumplir los objetivos de este trabajo se investigó cómo se translocan los ERs a la mitocondria.

Hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo de translocación de los ERs a la mitocondria, ya que no presentan señales de importación que los dirija a este organelo mediante el mecanismo clásico y se ha demostrado que se localizan en la matriz mitocondrial (Chen *et al.*, 2004).

Por lo anterior, se decidió investigar la posibilidad de que la importación sea a través de las proteínas de choque térmico. Se ha demostrado que la proteína citoplasmática HSP27 es necesaria para que ER α se

transloque a la membrana celular (Razandi *et al.*, 2010). Lo cual indica que es posible que la asociación de los mtERs a proteínas citoplasmáticas como HSP70 les confiera la capacidad de translocarse a la mitocondria.

Para esto, se diseñaron dos experimentos independientes de CoIP en donde se inmunoprecipitó ER α en la línea celular MCF-7, se realizó un Western blot contra ER α como control positivo de la coinmuprecipitación el cual se muestra en el panel superior de la figura 11. Después se realizó un Western blot contra HSP70, que se muestra en el segundo panel de la figura 11, el cual indicó si existe o no el complejo ER α -HSP70.

En el segundo panel de la figura 11, se muestra que sí existe interacción entre de ER α y HSP70 en la fracción mitocondrial, lo cual sugiere que es posible que la HSP70 esté involucrada en la importación de ER α a la mitocondria. Sin embargo, se requieren más experimentos para corroborar este resultado.

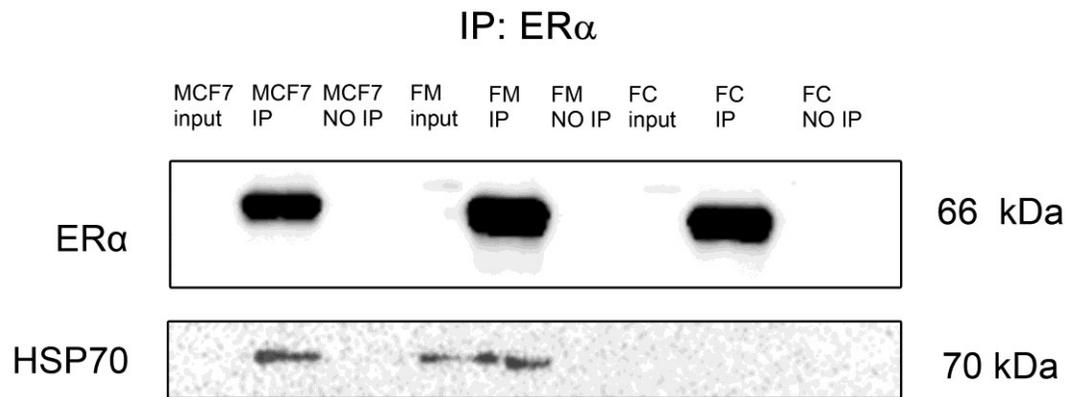


Figura 11. Interacción de ER α -HSP70 en MCF-7. MCF-7 input: control de expresión de proteína total. MCF-7 IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína total. MCF-7 NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína total. FM input: control de expresión de proteína mitocondrial. FM IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FM NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína mitocondrial. FC input: control de expresión de proteína citosólica. FC IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. FC NO IP: control negativo de inmunoprecipitación de proteína citosólica. Primer panel, Western blot contra ER α (control positivo de CoIP). Segundo panel, Western blot contra HSP70 donde se muestra la interacción entre ER α y HSP70). La figura representa los resultados de dos experimentos independientes.

Capítulo 4. Discusión

El presente es el primer trabajo en el que se encuentra la interacción entre ER α y la ATP sintasa. Esta interacción se detectó en la fracción mitocondrial de células MCF-7 (Fig. 5, segundo panel, a) y esto comprueba la hipótesis del trabajo. Previamente, se demostró que los mtERs interactúan con diversas proteínas mitocondriales en distintos tejidos y tipos celulares sensibles al estradiol, como cerebro de rata (Álvarez-Delgado *et al.*, 2010) e incluso pueden modular su actividad (Zhou *et al.*, 2012a).

Sin embargo, estas interacciones aún no se habían estudiado en una línea celular de cáncer hormonodependiente. El hecho de estudiar y demostrar la interacción ER α -ATP sintasa en MCF-7 es fundamental ya que representa un nuevo nivel de regulación estrogénica en la mitocondria. La presencia de esta interacción es relevante ya que podría representar un blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer dependiente de hormonas. Si la interacción modificara la actividad de la enzima, podría utilizarse como un nuevo blanco molecular ya que la actividad de la ATP sintasa está relacionada con la adaptación metabólica del cáncer a su ambiente hostil. En este contexto, una posibilidad sería el diseño de una terapia selectiva que modificara la actividad de la ATP sintasa a través de antiestrógenos dirigidos directamente a los mtER sin afectar la función de los ER nucleares y citoplasmáticos.

Con respecto a lo anterior, ya existen estudios previos que demuestran la modificación de la actividad de la ATP sintasa utilizando estrógenos. Uno de estos estudios es el de Zheng y Ramírez que demuestran cómo el E2 inhibe la actividad de la ATP sintasa mediante la unión a OSCP, pero aún se desconoce si esta unión es mediante mtERs (Zheng & Ramirez, 1999). El estudio del efecto sobre la ATP sintasa es importante dado que esta enzima es la fuente principal de energía de la célula. Por lo tanto, es necesario realizar nuevos experimentos para conocer si la interacción participa en la regulación de la actividad de la ATP sintasa a la baja o a la alta.

En este trabajo, también se observó la interacción de ER α -ATP sintasa en la fracción citosólica (Fig.5, segundo panel, b), lo cual es evidencia relevante de la localización de la ATP sintasa en otros sitios subcelulares además de la membrana interna mitocondrial. Recientemente, se ha reportado la existencia de ATP sintasa ectópica, la cual se localiza en la membrana celular. La ATP sintasa ectópica participa en diferentes procesos, desde mediar el pH intracelular, la respuesta celular a agentes antiangiogénicos y la homeostasis del colesterol (Chi & Pizzo, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, la existencia de ATP sintasa ectópica explica en parte la localización de la interacción ER α -ATP sintasa en la fracción citosólica. Es posible que durante el primer paso del fraccionamiento subcelular, en el que se permeabiliza la

membrana, la ATP sintasa ectópica se haya solubilizado y, de esta forma, se logre detectar en la fracción citosólica.

En cuanto a la expresión de los ER, se ha demostrado que la expresión de ER α disminuye conforme aumenta la invasividad de las células cancerosas (Thomas & Gustafsson, 2011). La invasividad de la línea celular puede influir en la expresión de los ERs, disminuyendo la expresión de los ERs y por lo tanto las probabilidades de interacción. Al haber menos proteína hay menos probabilidad que los ERs presentes interactúen con la ATP sintasa

En este estudio no se detectó la interacción entre ER α - ATP sintasa en la línea celular BT-474 (Fig. 6, segundo panel). Dado que sí se detectó ER α por Western blot en el inmunoprecipitado, es improbable que la ausencia de detección se deba a un error técnico. Esta línea celular, en comparación con MCF-7, se caracteriza por ser invasiva, lo cual puede haber influido en la ausencia de la interacción. Es probable que haya menor expresión de ER α debido a su grado de invasividad y por lo tanto no se haya logrado detectar la interacción de ER α -ATP sintasa (Fig.6, segundo panel).

En relación con lo anterior, se ha demostrado que la expresión de la subunidad beta de la ATP sintasa disminuye en distintos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama, lo cual es una característica de la progresión del cáncer (Cuezva *et al.*, 2002; Isidoro *et al.*, 2004). Esto sugiere que la ausencia de interacción entre ER α -ATP sintasa en BT-474 pueda ser resultado de la disminución en la expresión de ATP sintasa debido al grado de invasividad de la línea celular. Al igual que la expresión de los ERs, al haber menos expresión de ATP sintasa, hay menos probabilidad de interacción (Fig. 6, segundo panel).

En cuanto al ER β , no se logró comprobar si existe interacción con ATP sintasa en ninguna de las líneas celulares. A pesar de repetir el experimento, no se detectó la expresión de ER β . Es posible que este resultado esté relacionado al anticuerpo utilizado. Una forma de confirmar esto implica realizar nuevos experimentos cambiando el anticuerpo por el de otro fabricante.

También se decidió analizar la expresión del mRNA de los ER para dar una posible explicación a la ausencia de detección de la proteína de ER β . Para esto, se realizaron experimentos de qRT-PCR. Mediante el análisis de expresión de mRNA mediante qRT-PCR se comprobó que sí se expresa ER β a nivel de mensajero, pero posiblemente el anticuerpo no fue capaz de detectar la proteína. En estos análisis de expresión de mRNA, se demostró la expresión de mRNA de ER β en la línea celular MCF-7 y en BT-474. En la figura 10a, se muestra la mayor expresión de ER β en MCF-7 comparada con BT-474. Este resultado puede deberse a que la línea celular BT-474, al ser una línea celular invasiva en comparación con MCF-7, presenta menor expresión de ER β . La pérdida de expresión de ER β conforme aumenta la progresión del

cáncer ha sido registrado como un posible acontecimiento que conduce al desarrollo de cáncer de mama (Zhao, 2008).

De la misma manera, se demostró la expresión de mRNA de ER α en ambas líneas celulares. En contraste con el resultado de ER β , la expresión de mRNA de ER α en ambas líneas es muy similar (Fig. 9a). Las diferencias de expresión del mRNA de ER β en ambas líneas celulares reflejan la distribución diferencial reportada anteriormente para estos receptores (Fig. 10a; Tong *et al.*, 2002)).

Con respecto al resultado anterior, Leung y colaboradores evaluaron la expresión de isoformas de ER β en diversos tejidos y líneas celulares de cáncer, incluyendo MCF-7 mediante qRT-PCR y demostraron una gran variación en la expresión entre tejidos y líneas celulares (Leung *et al.*, 2006). Nuestros resultados del análisis de mRNA están de acuerdo con lo reportado por Leung, en el sentido de que se demuestra cómo cada línea celular tiene un patrón específico de expresión de isoformas de los ER, lo cual hace más complejo el entendimiento de la acción de los ERs.

Con respecto a la detección de isoformas de los ER, se realizó el análisis de expresión de isoformas de ER β en el cual se detectó la expresión de la isoforma ER β 1 en la línea celular MCF-7 y en BT-474, así como la expresión de la isoforma ER β 2 en la línea celular MCF-7. A su vez, se detectó la isoforma ER α Δ 5 en ambas líneas celulares y la isoforma ER α Δ 3 en MCF-7. Indiscutiblemente es necesario realizar un estudio completo de la expresión de las diferentes isoformas de ER α y ER β en ambas líneas celulares para tener una mejor comprensión de cuáles son las isoformas predominantes.

En este estudio se demostró que tanto ER α como ER β se localizan en la mitocondria, lo cual confirmó lo reportado por varios grupos de investigadores (Chen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Álvarez-Delgado *et al.*, 2010). La localización mitocondrial de los mtERs explica una de las nuevas funciones demostradas de los ERs que es la regulación de los efectos estrogénicos sobre la función mitocondrial, lo cual tiene implicaciones importantes dado que la disfunción mitocondrial está involucrada en muchas enfermedades como el cáncer. Las modificaciones bioenergéticas son un aspecto muy importante que llevan a la disfunción mitocondrial debido a que la mitocondria está implicado en el metabolismo de rutas generadoras de energía y es el principal productor de ATP de la célula. Se conoce que las células cancerosas difieren de las células normales en que necesitan una gran cantidad de energía para sobrevivir y para su crecimiento. En las células cancerosas predomina la glucólisis en contraste con las células normales que prevalece la fosforilación oxidativa para la producción de energía (Chen *et al.*, 2008).

Una de las primeras evidencias moleculares de una alteración general en la función bioenergética mitocondrial la demostraron Cuezva y colaboradores, quienes indicaron la disminución de la expresión de la ATP sintasa en carcinomas humanos. Específicamente, se demostró que en hepatocarcinomas humanos hay una disminución de la expresión de la β -F1-ATPasa, componente esencial de la holoenzima ATP sintasa; así como de la HSP60, una chaperona de la mitocondria. A su vez, se demostró que en carcinoma de riñón y de colon hay una disminución de la expresión de la β -F1-ATPasa correlacionado con un aumento en la expresión de GAPDH. En conjunto, estas observaciones sobre la disminución de la fosforilación oxidativa y el aumento de la glucólisis, sugieren un posible biomarcador predictivo de cáncer (Cuezva *et al.*, 2002). Evidentemente para demostrar si existe una desregulación bioenergética asociados al cáncer, es necesario realizar una comparación en la expresión de ATP sintasa y GAPDH entre células normales y células cancerosas, lo cual no se puede demostrar con los resultados del presente trabajo.

En el presente estudio se detectó la proteína ATP sintasa en ambas líneas celulares, como se esperaba. Sin embargo, sólo se detectó la interacción con ER α en la línea MCF-7. Esto puede deberse a que, como se mencionó, BT-474 expresa menos ER α debido al grado de invasividad de la línea lo cual pudo haber afectado la interacción (Thomas & Gustafsson, 2011). En la línea celular MCF-7 no se detectó interacción entre la proteína GAPDH y el ER α (Fig.5, tercer panel, e), como se esperaba para una proteína citosólica con escasas probabilidades de interactuar con una proteína mitocondrial. Sin embargo, sí se detectó GAPDH en la fracción mitocondrial total. GAPDH es una proteína principalmente citosólica, sin embargo, se le ha detectado en la membrana externa de la mitocondria participando en procesos de apoptosis, como la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que es un paso crucial en la vía intrínseca de la apoptosis (Tarze *et al.*, 2007). De esta manera, los datos obtenidos sobre la localización mitocondrial de GAPDH podrían deberse a que algunas de las células están en un proceso natural de apoptosis en cultivo.

En la línea celular BT-474, se detectó la expresión de GAPDH en la fracción citosólica y este resultado coincide con lo esperado (Fig.6, tercer panel, c). Al igual que en la línea MCF-7, se detectó una banda de menor intensidad en la fracción mitocondrial (Fig. 5, tercer panel, d).

Otro aspecto importante a investigar es el mecanismo de translocación de los ERs a la mitocondria. Se conoce que la mayoría de las proteínas mitocondriales presentan señales de localización mitocondrial o secuencias internas que las dirigen a la mitocondria donde son reconocidas por la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM). Sin embargo, el 30% de las proteínas mitocondriales no presentan señales ni pre secuencias que la dirijan a la mitocondria (Diekert *et al.*, 1999). En relación con

lo anterior, se ha reportado que existen proteínas que se importan por medio de las proteínas de choque térmico HSP70/90 mediante la interacción con TOM70/90 (Li *et al.*, 2009). Una evidencia más a la posible importación de los ERs a la mitocondria mediante las proteínas de choque térmico se observó en un estudio donde se comprobó que la HSP27 es necesaria para que ER α se transloque a la membrana celular (Razandi *et al.*, 2010).

Es probable que la asociación de los ERs a las proteínas de choque térmico (HSP70/90) les confiera la capacidad de translocarse a la mitocondria. En distintos estudios han reportado posible modelos de importación donde HSP70/90 son necesarias para la importación de proteínas mitocondriales que carecen de pre secuencias o señales de localización mitocondrial (Simpkins *et al.*, 2008; Álvarez Delgado, 2011).

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se realizaron experimentos preliminares para comenzar a investigar si la proteína de choque térmico HSP70 estaba involucrada en la importación de ERs a la mitocondria. Se demostró que sí existe una interacción entre ER α y HSP70 en la fracción mitocondrial de la línea celular MCF-7 (Fig.11, segundo panel). Este resultado sugiere que HSP70 podría participar en el mecanismo de importación de ER α a la mitocondria.

En este trabajo se encontró que existe una interacción entre ER α y la ATP sintasa en MCF-7. Este resultado aporta información sobre otro nivel de regulación estrogénica en células de cáncer sensibles a E2. Sin embargo, aún es necesario investigar la función de esta interacción y determinar tanto la función de los mtERs como el mecanismo de translocación de los ERs a la mitocondria para poder diseñar una terapia selectiva dirigida a la interacción ER-ATP sintasa.

Capítulo 5. Conclusiones

Se encontró por primera vez que mtER α interactúa con la ATP sintasa en células MCF-7, pero no en células BT-474. Este resultado es de gran importancia ya que es un posible blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer sensible a hormonas.

Se comprobó la expresión de mRNA de ER α y ER β en MCF-7 y BT-474. El nivel de expresión de mRNA de ER β fue mayor en MCF-7 que en BT-474 probablemente debido al grado de invasividad de esta línea celular. El nivel de expresión de ER α fue similar en ambas líneas celulares.

Perspectivas

1. Estudiar cuál es la función de ATP sintasa en la interacción con ER α en la línea celular MCF-7.
2. Evaluar la presencia del complejo ATP sintasa-ER β en MCF-7 y BT-474.

Literatura citada

- Aguilera, P. Ruiz-Tachiquín, M. Rocha-Munive, M. G. Pineda-Olvera, B. Cháñez-Cárdenas, M.E. 2014 PCR en tiempo real. En: Cornejo-Romer, A. Serrato-Díaz, A. Rendón-Aguilar, B. Rocha-Munive, M.G. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. ISBN: 978-607-8246-72-4
- Al-bader, M., Al-saji, S., Ford, C. H. J., Francis, I., Al-ayadhy, B. 2010. Real-Time PCR : Detection of Oestrogen Receptor- α and - β Isoforms and Variants in Breast Cancer, *Anticancer Research*, 30, 4147–4156.
- Álvarez Delgado, C. 2011. Patrón de expresión de los receptores a estrógenos mitocondriales en el cerebro de rata durante el envejecimiento. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 66 pp.
- Álvarez-Delgado, C., Cerbón, M. 2011. Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo. En: Camacho-Arroyo, I., Morales-Montor, J. (Eds.), *Efectos no reproductivos de las hormonas sexuales*. Editorial UAM-PUIS. México. ISBN 978-607-477
- Álvarez-Delgado, C., Mendoza-Rodríguez, C. A., Picazo, O. y Cerbón, M. 2010. Different expression of α and β mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 580–585. doi:10.1016/j.exger.2010.01.015
- Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnüren, H. G., Gusterson, B. A. y Bender, H. G. 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75(6), 429–439. doi:10.1007/s001090050128
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brinton, R. D. 2008. Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: Therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(13–14), 1504–1511. doi:10.1016/j.addr.2008.06.003
- Cammarata, P. R., Chu, S., Moor, A., Wang, Z., Yang, S. H., Simpkins, J. W. 2004. Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 78(4), 861–871. doi:10.1016/j.exer.2003.09.027
- Chen, J. Q., Brown, T. R., Yager, J. D. 2008. Mechanisms of hormone carcinogenesis: Evolution of views, role of mitochondria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 630, 1–18. doi:10.1007/978-0-387-78818-0_1
- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., Yager, J. D. 2009. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(10), 1540–1570. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.06.001

- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J. D. 2004. Mitochondrial localization of ER α and ER β in human MCF7 cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 286(6), E1011–E1022. doi:10.1152/ajpendo.00508.2003
- Chen, J., Yager, J. D., Russo, J. 2005. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1746(1), 1–17. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.08.001
- Chi, S. L., Pizzo, S. V. 2006. Cell surface F1Fo ATP synthase: A new paradigm? *Annals of Medicine*, 38(6), 429–438. doi:10.1080/07853890600928698
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., López de Heredia, M., Krajewski, S., Santamaría, G., Hoguen, K., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M., Reed, J. C. 2002. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Research*, 62(1), 6674–6681.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., Lill, R. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96(21), 11752–11757.
- Holliday, D. L., Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 215. doi:10.1186/bcr2889
- Irwin, R. W., Yao, J., Hamilton, R. T., Cadenas, E., Brinton, R. D., Nilsen, J. 2008. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology*, 149(6), 3167–3175. doi:10.1210/en.2007-1227
- Isidoro, A., Martínez, M., Fernández, P. L., Ortega, A. D., Santamaría, G., Chamorro, M., Reed, J.C., Cuezva, J. M. 2004. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *The Biochemical Journal*, 378, 17–20. doi:10.1042/BJ20031541
- Jazbutyte, V., Kehl, F., Neyses, L., Pelzer, T. 2009. Estrogen receptor α interacts with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(4), 450–454. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.139
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J. A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138(3), 863–870. doi:10.1210/endo.138.3.4979
- Lee, A. V., Oesterreich, S., Davidson, N. E. 2015. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073–djv073. doi:10.1093/jnci/djv073
- Leung, R. Y., Mak, P., Leung, Y., Mak, P., Hassan, S., Ho, S. 2006. Estrogen receptor (ER) - β isoforms : A key to understanding ER- β signaling. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103(35), 13162–13167. doi:10.1073/pnas.0605676103
- Levenson, A. S., Jordan, V. C. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57(15), 3071–3078.

- Li, J., Qian, X., Hu, J., Sha, B. 2009. Molecular chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23852–23859. doi:10.1074/jbc.M109.023986
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., Basso, S. M. M. 2013. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 596–604. doi:10.2174/092986713804999303
- Luo, T., Kim, J. K. 2015. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview. *Canadian Journal of Cardiology*. 32(8), 1017-1025. doi:10.1016/j.cjca.2015.10.021
- Monje, P., Boland, R. 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β isoforms in rabbit uterus and ovary. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(3), 467–479. doi:10.1002/jcb.1182
- Nephew, K. P., Long, X., Osborne, E., Burke, K. A., Ahluwalia, A., Bigsby, R. M. 2000. Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biology of Reproduction*, 62(1), 168–177. doi:10.1095/biolreprod62.1.168
- Nilsen, J., Irwin, R. W., Gallaher, T. K., Brinton, R. D. 2007. Estradiol *in vivo* regulation of brain mitochondrial proteome. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(51), 14069–14077. doi:10.1523/JNEUROSCI.4391-07.2007
- OMS. 2014. Perfil oncológico de México. Consultado el 7 de julio, 2016 en: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/>
- Razandi, M., Pedram, A., Levin, E. R. 2010. Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), 3249–61. doi:10.1128/MCB.01354-09
- Saceda, M., Lippman, M. E., Chambon, P., Lindsey, R. L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M., y Martin, M. B. 1988. Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Molecular Endocrinology*, 2(12), 1157–1162. doi:10.1210/mend-2-12-1157
- Saha Roy, S., Vadlamudi, R. K. 2012. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *International Journal of Breast Cancer*, 2012, 1-8. doi:10.1155/2012/654698
- Simpkins, J. W., Yang, S. H., Sarkar, S. N., Pearce, V. 2008. Estrogen actions on mitochondria-Physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 51–59. doi:10.1016/j.mce.2008.04.013
- Smalley, M., Ashworth, A. 2003. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature Reviews. Cancer*, 3(11), 832–844. doi:10.1038/nrc1212
- Solakidi, S., Psarra, A. M. G., Sekeris, C. E. 2005. Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: Localization of ER α in the nucleoli and ER β in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1745(3), 382–392. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.05.010

- Sotoca, A. M., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M., Gustafsson, J. 2012. Human ER α and ER β splice variants: understanding their domain structure in relation to their biological roles in breast cancer cell proliferation. En: Ekinci, D. (Ed.), *Biochemistry*. Intech. 141-158pp.
- Tamimi, R. M., Baer, H. J., Marotti, J., Galan, M., Galaburda, L., Fu, Y., Deitz, A., Connolly, J., Schnitt, J., Colditz, G. A., Collins, L. C. 2008. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma *in situ* and invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 10(4), 1–9. doi:10.1186/bcr2128
- Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., Brenner, C. 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, 26(18), 2606–20. doi:10.1038/sj.onc.1210074
- Thomas, C., Gustafsson, J. 2011. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 11(8), 597–608. doi:10.1038/nrc3093
- Tong, D., Schuster, E., Seifert, M., Czerwenka, K., Leodolte, S., Zeillinger, R. 2002. Expression of estrogen receptor β isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71(3), 249–55. doi:10.1023/a:1014465916473
- Vladusic, E. A., Hornby, A. E., Lakins, J., Lupu, R. 2000. Expression and regulation of estrogen receptor β in human breast tumors and cell lines. *Oncology Reports*, 7, 157–167. doi: 10.3892/or.7.1.157
- Weiser, M. J., Foradori, C. D., Handa, R. J. 2008. Estrogen receptor β in the brain: From form to function. *Brain Research Reviews*, 57(2), 309–320. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.013
- Yang, S.-H., Liu, R., Perez, E. J., Wen, Y., Stevens, S. M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J. W. 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4130–4135. doi:10.1073/pnas.0306948101
- Zhao, C. 2008. Estrogen receptor β : an overview and update, *Nuclear Receptor Signaling*, 6, 1–10. doi:10.1621/nrs.06003
- Zheng, J., Ramirez, V. D. 1999a. Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial FOF1-ATP synthase / ATPase. *Journal of steroid biochemistry and Molecular Biology*, 68, 65–75.
- Zheng, J., Ramirez, V. D. 1999b. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton FOF1-ATPase activity by estrogens: Comparison with Na⁺, K⁺-ATPase of porcine cortex. *European Journal of Pharmacology*, 368(1), 95–102. doi:10.1016/S0014-2999(99)00012-6
- Zhou, Z., Zhou, J., Du, Y. 2012a. Estrogen receptor α interacts with mitochondrial protein HADHB and affects β -Oxidation activity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(7), doi:10.1074/mcp.M111.011056
- Zhou, Z., Zhou, J., Du, Y. 2012b. Estrogen receptor β interacts and colocalizes with HADHB in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.