



“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO”

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.**

**“Participación de la vía PI3K/Akt en la mediación del efecto
citotóxico inducido por TNF- α ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

Zitlal-lin Victoria Ávila.

Directora de Tesis: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

MÉXICO, D. F. 2012

CONTENIDO.

Abreviaturas.....	10
Resumen.....	12
Glándula mamaria y cáncer.....	16
Clasificación del cáncer de mama.....	18
Factores de Riesgo para el desarrollo del cáncer mamario.....	24
Hormonas y Cáncer de mama.....	26
Glucocorticoides.....	26
Historia.....	27
Glucocorticoides naturales.....	28
Glucocorticoides sintéticos.....	29
Estructura y función de los receptores de glucocorticoides.....	30
Respuestas originadas por los glucocorticoides.....	32
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.....	33
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).....	34
Aplicaciones terapéuticas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).....	34
Descripción de TNF.....	35
Inducción de la síntesis de TNF.....	35
Mecanismos de acción de TNF α	36
Señalización de TNF α	39
Descripción de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).....	41
Proteína Akt.....	43
Descripción de Akt.....	43
Estructura de Akt.....	45
Descripción de la vía PI3K/Akt.....	45
Eventos regulados por la vía PI3K/Akt.....	46
PI3K/Akt en cáncer.....	47
DESARROLLO.....	49

Planteamiento del problema y justificación .	49
Hipótesis	50
OBJETIVOS.	51
General.	51
Particulares.	51
MATERIALES Y MÉTODO.	53
Cultivo celular.	53
Material farmacológico.	53
Ensayo de viabilidad celular por incorporación de colorante cristal violeta.	54
Pruebas dosis respuesta.	54
Obtención de extractos proteicos.	56
Cuantificación proteica.	56
Análisis proteico por medio del método de electroforesis SDS-PAGE.	56
Evaluación del estado fosforilado de Akt a través del método de Western Blot.	57
Análisis Estadístico.	58
RESULTADOS.	59
Curva de crecimiento para la línea celular ZR-7530.	60
En células zr-7530 el TNF α induce muerte celular de manera tiempo y dosis dependiente.	62
El tratamiento de las células ZR-7530 con 5ng/ml de TNF α y concentraciones crecientes de dexametasona durante 24 horas muestra una supresión dosis dependiente de la muerte inducida por la citocina	63
La vía de señalización PI3K no esta involucrada en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico de TNF α .	64
La fosforilación de Akt inducida por TNF α y Dexametasona es bloqueada por Wortmanina.	66
DISCUSIÓN.	67
CONCLUSIONES.	69
BIBLIOGRFIA.	76

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

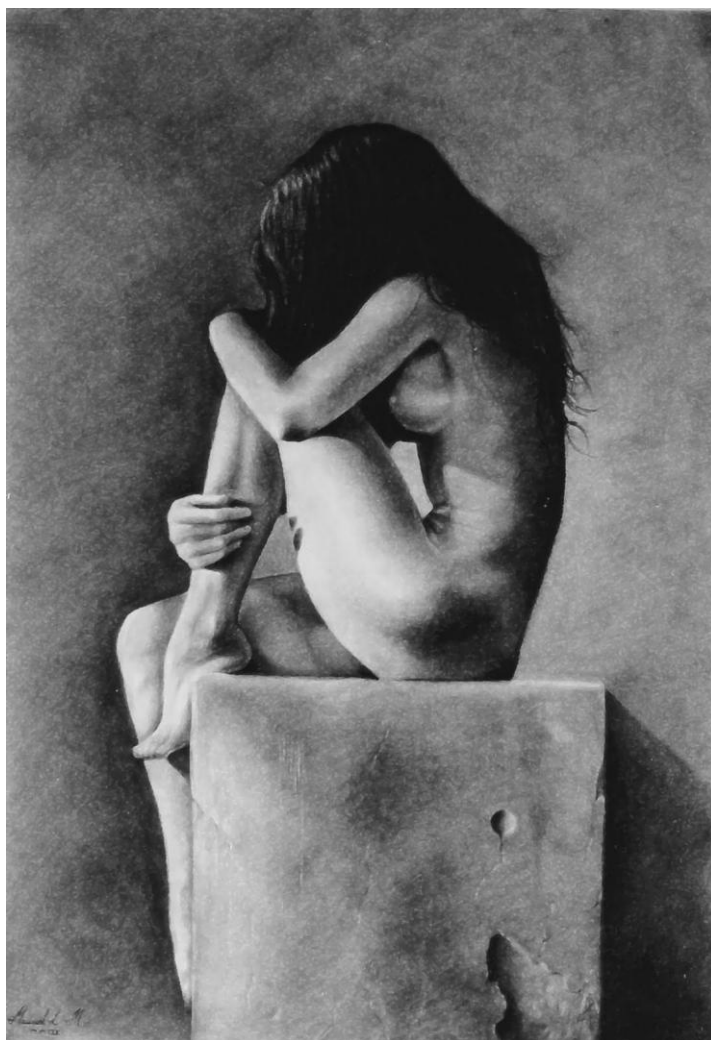
Tabla 1. Situación del cáncer mamario en la República Mexicana	15
Tabla 2. Situación del cáncer mamario en la República Mexicana	15
Tabla 3. Categorización T, N, M para el cáncer mamario.	23
Tabla 4. Estadios de clasificación para el cáncer mamario.....	24
Tabla 5.Receptores descritos para la familia de TNF.....	37
Tabla 6.Receptores de TNF α	37
Tabla 7.Clases pertenecientes a la familia de PI3K.	42
Tabla 8.Isoformas conocidas de Akt.....	44
Tabla 9.Función y alteración de las isoformas de Akt..	44
Tabla 10. Sobre expresión de las distintas isoformas de Akt dentro del cáncer.	48

CUADROS.

MÉTODO.....	52
Concentraciones utilizadas de dexametasona.....	53
Pruebas dosis respuesta.	55
ANEXO.	70

FIGURAS.

Fig. 1 Estructura de la glándula mamaria .	17
Fig. 2 Cáncer Lobulillar.	19
Fig. 3 Cáncer Ductal.	20
Fig. 4 Metástasis.	21
Fig. 5 Secreción de cortisol regulado por HPA.	27
Fig.6 Estructura del receptor de glucocorticoides.	31
Fig. 7 Respuestas relacionadas con TNFR1 y TNFR2.	38
Fig. 8 Vía de TNF.	40
Fig. 9 Vía de señalización de PI3K/Akt.	46
Fig. 10 Curva de crecimiento de la línea celular ZR-7530.	59
Fig. 11 Observación morfológica de células ZR-7530.	61
Fig. 12 Evaluación del porcentaje de supervivencia celular con tratamientos de TNF α a distintas concentraciones.	62
Fig. 13 Efecto de las distintas concentraciones de dexametasona sobre células ZR-7530 estimuladas con 5ng/ml de TNF α .	63
Fig. 14 Efecto de protección para las células ZR-7530 otorgado por dexametasona a una concentración de 10 mM en un tiempo de 24horas.	64
Fig. 15 Inmunoblot del estado fosforilado de Akt.	65
Fig. 16 Inmunoblot del nivel de fosforilación de Akt.	66



“La ciencia no puede decirnos adónde ir, pero después de tomada esta decisión en otro terreno, sí puede decirnos la mejor manera de llegar”

Carroll. Lewis.

“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas”

Mario Benedetti.

DEDICATORIA.

A mis padres Joel Victoria y Ana María Ávila, porque gracias a ustedes puedo concluir esta etapa en mi vida, gracias por todo su apoyo incondicional y por todo el esfuerzo que han hecho para formarme, muchas gracias por todo lo que han inculcado en mí, con todo mi cariño les dedico esta tesis.

A mi esposo, por estar dispuesto a apoyarme desde el inicio de la carrera, por todos y cada uno de los momentos en los que me alentaste a seguir con tu incondicional apoyo muchísimas gracias amor.

A mi hijo, porque eres el motivo de muchísimas cosas en mi vida, porque pese a tu pequeña edad, siempre comprendiste muy bien mi deseo de realizarme no solo como tu mamá, te dedico este trabajo porque en un futuro quiero que logres todo lo que te propongas, quiero que vivas pleno y siempre muy feliz, te adoro hijo mío.

A mis hermanas que también han sido un motor para lograr mis propósitos, gracias por estar incondicionalmente para mí las quiero mucho.

A quien prometí que haría cosas buenas con mi vida, te dedico el término de otra etapa más.

A todos y cada uno de los integrantes de mi familia por estar para mí cuando los necesito, con sus ejemplos, consejos y todo su amor, sin olvidar a nadie me permito agradecer muy particularmente a una gran señora de ejemplo en mi vida a la Sra. Julia Santiago, muchísimas gracias por ser parte fundamental de mi vida abuelita, la quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios.

A la UNAM, la máxima casa de estudios por todas y cada una de las experiencias brindadas.

A mi directora de tesis la M en C. Catalina Machuca Rodríguez, ya que sin su dirección este trabajo no hubiera podido realizarse, muchísimas gracias profesora, por su confianza, paciencia, experiencia y conocimientos compartidos, los cuales fueron fundamentales para mi formación profesional.

A todos y cada uno de los asesores que con sus atinadas observaciones contribuyeron a mejorar este proyecto.

Al profesor Ernesto Mendoza, por cada uno de sus atinados consejos y por la enorme disposición que siempre muestra para cada uno de los integrantes del laboratorio.

A cada uno de mis compañeros por hacer de mi estancia en el laboratorio y en la facultad una grata experiencia.

A mi colega Carolina Serrano, sin ti mi querida amiga mi paso por la facultad no hubiera sido lo mismo, muchísimas gracias por todas y cada una de las cosas que hemos vivido juntas, gracias a ti me llevo el mejor sabor de boca en ésta etapa de mi vida.

ABREVIATURAS.

aa: Aminoácidos.

FADD: Del inglés Fas-associated death domain protein.

ACTH: Hormona Adenocorticotropina.

TRADD: TNFR1-associated death domain protein.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

Akt: Adenosina tirosina quinasa.

TRAF: Del inglés Factor-associated TNF receptor.

ATCC: American Type Culture Collection.

CaCu: Cáncer cervicouterino.

CaMa: Cáncer de Mama.

CONAPO: Consenso Nacional de Población.

CRH: Hormona liberadora de corticotropina.

DBD: Dominio de unión al ADN.

MHC: Complejo Mayor de histocompatibilidad del inglés Major

Histocompatibility Complex

Dex: Dexametasona

DSCI: Cáncer ductal *in situ*.

GC: Glucocorticoide (s).

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos.

GR: Receptor de glucocorticoide

GRE: Elementos de respuesta a glucocorticoides

HGR: Receptor de glucocorticoide humano.

HPA: Eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal.

ICC: Cáncer invasivo infiltrante.

ILC: Cáncer lobulillar invasivo o infiltrante.

IDC: Cáncer ductal invasivo o infiltrante.

kD: Kilodalton

LBD: Dominio de unión al ligando.

LT: Linfotóxina.

LCSI: Cáncer lobulillar *in situ*.

NTD: Dominio inmunogenético.

PH: Dominios con homología a plectrina

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa.

RE: Receptor de estrógenos.

RG: Receptor de glucocorticoides.

RM: Receptor de mineralocorticoides.

RFLP: Fragmentos de restricción

SRT: Microsatélites

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa ó caquexina.

TNF β : Factor de Necrosis Tumoral beta o linfotóxina.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

UICC: Unión Internacional de la lucha contra el cáncer.

Resumen.

A nivel internacional una de cada ocho mujeres tiene o desarrolla cáncer mamario en algún momento de su vida, es decir que el 12% de la población femenina actual en todo el mundo puede llegar a desarrollar esta enfermedad.

Cada año se reportan un millón de nuevos casos, de los cuales aproximadamente la mitad ocurren en los países desarrollados y es en éstos donde se registran la mayoría de las muertes a causa del cáncer mamario.

En México los registros epidemiológicos muestran que los casos de cáncer mamario van en aumento así como la tasa de mortalidad debido a esta patología, actualmente en nuestro país esta enfermedad en mujeres, ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasia maligna representando un problema de salud importante en nuestro país.

Esta enfermedad es asociada a múltiples factores, cuyos efectos actúan sinérgicamente predisponiendo a la transformación celular maligna, estos estímulos tanto exógenos como endógenos desregulan funciones importantes tales como la multiplicación y muerte celular, alterando de manera importante el equilibrio celular, el cual es clave para el funcionamiento correcto de la célula.

En este trabajo se analizó la participación de la vía de transducción PI3K/Akt en la regulación del efecto citotóxico de TNF α , mediado por el glucocorticoide dexametasona en células ZR-7530 de cáncer mamario.

Demostrando que el glucocorticoide dexametasona es capaz de otorgar una protección ante el efecto citotóxico inducido por TNF α en células ZR-7530 de cáncer de mama.

Además se destaca que dicha protección no es dependiente de la fosforilación de Akt en este sistema.

INTRODUCCIÓN.

SITUACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA (CaMa).

El cáncer de tipo mamario, es el más común entre las mujeres a nivel mundial, ya que representa el 16% de todos los cánceres femeninos, se estima que en 2004 murieron 519000 mujeres debido a esta patología y aunque es una enfermedad considerada del mundo desarrollado, la mayoría es decir el 69% de las muertes a causa de la enfermedad se registran en países en vías de desarrollo (OMS, 2004 y Porter, 2008).

La incidencia del CaMa es considerada variable a nivel mundial, ya que se presentan tasas de 99.4 casos por cada 100 000 mujeres en América del Norte, en Europa Oriental, América del Sur y Asia Occidental, se llegan a presentar incidencias moderadas aunque existen registros de su constante aumento, por otro lado se reporta que las incidencias más bajas se encuentran en la mayoría de los países africanos sin dejar de lado el constante incremento de nuevos casos (OMS, 2012).

La variación de casos de cáncer alrededor del mundo ha contribuido a evaluar la dimensión del problema, por ejemplo en Estados Unidos y la mayoría de los países industrializados, este tipo de cáncer ha sido diagnosticado en un 75% de las mujeres posmenopáusicas, mientras que en países orientales como Japón, se estima que la incidencia es cinco veces menor que en E.U (De Vita *et al.* 2000).

En América del Norte por ejemplo se han reportado tasas de supervivencia variantes que van desde el 80% ó más casos, en Suecia y Japón se reporta aproximadamente un 60% de casos y en países de ingresos bajos esta cifra alcanza una tasa del 40% (Coleman *et al.* 2008; Knaul *et al.* 2008).

Para México por ejemplo, los datos estadísticos de casos de mujeres que han cursado con un cáncer mamario también representan una prioridad emergente de salud (Lee *et al.* 2010) ya que los casos de cáncer reportados para la población mexicana superan ya el número de muertes a causa del cáncer cervicouterino (CaCu) (Lozano, 2008).

Datos obtenidos de el consejo Nacional de Población (CONAPO) estimaron que dentro de la población mexicana femenina de 40 años y más en el año 2005, se alcanzó una cifra de 14,104,971 la cual representa el 26.8% de la población femenina total. En el año 2010 este grupo fue de de 16, 778,929 representando el 12.6% de mujeres entre 40 y 49 años de edad y el 13.6% de mujeres entre 50 y 69 años.

El aumento de la población femenina hace estimar que para el año 2020 el grupo de mujeres podrá ser de 22, 545,450 lo cual representaría el 14% y 18.4% de casos de cáncer correspondientes a mujeres de 40 y 49 años de edad respectivamente (CONAPO, 2012).

A partir del año 2006 para la población de mujeres mexicanas, el CaMa se convirtió en la primer causa de muerte, de acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2009 ocurrieron 4,964 muertes atribuidas al cáncer mamario, lo cual representó el 2% del total de defunciones ocurridas en mujeres significando que en ese último año murieron 14 mujeres por día a causa del cáncer de mama (INEGI, 2009).

Al igual que en el resto del mundo, la tasa de mortalidad a causa de esta enfermedad va en aumento conforme a la edad, así la tasa de mortalidad con respecto a dicha enfermedad en el año 2009 dentro del grupo de mujeres de entre 40 y 49 años se reporto en 14.9 por cada 100 000 mujeres, dentro de las mujeres de entre 50 y 59 años edad fue de 29.1, en mujeres de 60 y 69 años de 37.0 y en las de 70 y mas la mortalidad fue de 53.1 por cada 100 000. Sin embargo en la última década, se ha observado que la tendencia es ascendente en todos los grupos de edad, aunque con un mayor incremento en las mujeres de 60 años en comparación con las mujeres de 40 a 59 años (INEGI, 2009).

Por lo anterior, en este sentido resulta importante conocer la magnitud de este padecimiento entre la población femenina mexicana (tablas 1 y 2), por ejemplo, los casos de mayor incidencia, se reportan en el Distrito Federal con aproximadamente el 64.74% de los casos, seguido de Jalisco con un 55.40% y Aguascalientes con un 46.62%, en contraparte la incidencia más baja se reporta en el estado de México con 1.75%, Hidalgo con un 2.89% y Tlaxcala con apenas el 1.85% de casos (INEGI, 2012).

Entidad Federativa	Porcentaje de casos reportados para CaMa en un grupo de 1000,000 mujeres.
Baja California Norte	15.41
Baja California Sur	22.29
Chihuahua	19.67
Coahuila	19.06
Distrito Federal	64.74
Jalisco	55.40
Nayarit	17.74
Nuevo León	24.64
Oaxaca	8.34
San. Luis Potosí	10.46
Sinaloa	21.49
Tamaulipas	26.75
Veracruz	16.34
Yucatán	17.85
Zacatecas	8.62

Tabla 1. Situación del cáncer mamario en la República Mexicana (Datos tomados de INEGI 2012).

Entidad Federativa	Porcentaje de casos reportados para CaMa en un grupo de 1000,000 mujeres.
Aguascalientes	46.15
Campeche	5.40
Chiapas	3.15
Colima	16.47
Durango	15.42
Estado de México	1.75
Guanajuato	12.15
Guerrero	4.33
Hidalgo	2.89
Michoacán	9.28
Morelos	8.90
Puebla	12.65
Querétaro	13.25
Quintana Roo	6.32
Sonora	17.88
Tabasco	12.24
Tlaxcala	1.85

Tabla 2. Situación del cáncer mamario en la República Mexicana (Datos tomados de INEGI 2012).

Actualmente, se estima que la incidencia y la mortalidad seguirán en aumento de manera importante debido al envejecimiento poblacional, a los cambios en patrones reproductivos, a una mayor prevalencia de los factores de riesgo y a los problemas para el acceso oportuno a detección, el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado (NOM-041-SSA2-2011).

Esta situación en el país representa un reto en materia de salud por ello, la realización de estudios de investigación deben contribuir a comprender mejor el comportamiento de la glándula mamaria cuando ésta posee alteraciones que derivan en un CaMa (López *et al.* 2009).

GLÁNDULA MAMARIA Y CÁNCER.

La mama es una glándula modificada que se encuentra en la parte media del tórax, cuya función primordial es la de secretar leche (Hennighausen, 1998).

Desde el punto de vista embriológico, la mama se origina como un engrosamiento a manera de banda en la epidermis, donde un pequeño segmento de ésta en la región torácica, produce pequeñas invaginaciones que dan origen a la forma anatómica mamaria tal como se conoce actualmente (Duffy *et al.* 2003).

La mama como se muestra en la figura 1, está compuesta de 12 a 20 lóbulos que se dividen en lobulillos, éstos se diferencian en alvéolos secretorios y convergen debajo del pezón en forma de conductos secretores de leche, tales conductos mamarios se encuentran tapizados por una capa interna de células epiteliales y una capa externa de células mioepiteliales (Kirby *et al.* 2007), a su vez estos lóbulos y lobulillos se encuentran sostenidos por un tipo de almacén compuesto por tejido fibroso conocido como ligamento de Cooper (Vadivelu *et al.* 2008).

ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

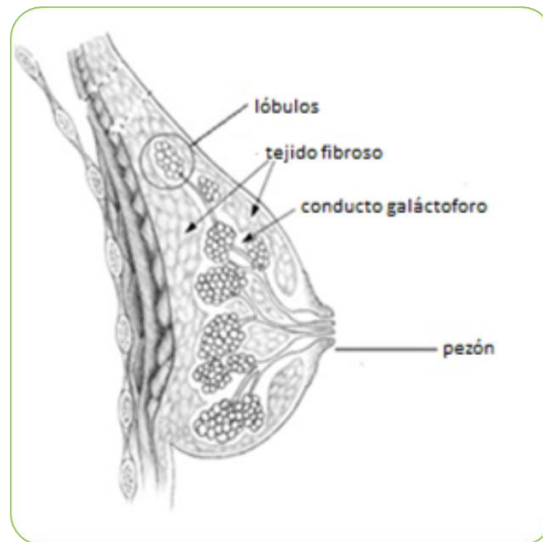


Fig. 1.- La imagen muestra la anatomía que conforma a la glándula mamaria, se observa el cumulo de lóbulos en forma de racimo llamados lóbulos, los cuales se encuentran conectados por pequeños tubos conocidos como conductos galáctoforos, los cuales convergen en el pezón, también se observa el tejido fibroso que da sostén a la mama conocidos como suspensorios de Cooper (tomado y modificado de www.cancervic.org)

El tamaño y forma de la mama es variable, por lo cual ésta glándula es considerada un órgano en constante evolución, considerando que sufre diversas modificaciones durante las distintas etapas por las que atraviesa, por ejemplo a lo largo de la adolescencia, el embarazo, la lactancia y las distintas fases del ciclo menstrual (Beers *et al.* 1999).

En términos generales es aceptado y reconocido que el factor más importante para los cambios por los cuales atraviesa la mama a lo largo del desarrollo y sus distintas fases, es determinado por la influencia hormonal (Olsson *et al.* 2003).

Debido a esto, las células que conforman a la glándula mamaria deben estar finamente reguladas en proliferación, supervivencia y diferenciación (Beers *et al.* 2007), ya que al originarse un desbalance dentro del desarrollo mamario, el control y la organización celular se pierde de tal forma que la glándula mamaria puede ser susceptible a la transformación celular maligna y derivar en una patología como el cáncer (Dickson *et al.* 2000; De Vita *et al.* 2000).

Este desbalance es promovido por un mensaje celular anómalo que genera la acumulación dinámica de cambios a nivel genómico (Abate-Shen, 2002) otorgando a las células que conforman la mama nuevas características como:

- Autosuficiencia.
- Insensibilidad a señalamientos antiproliferativos.

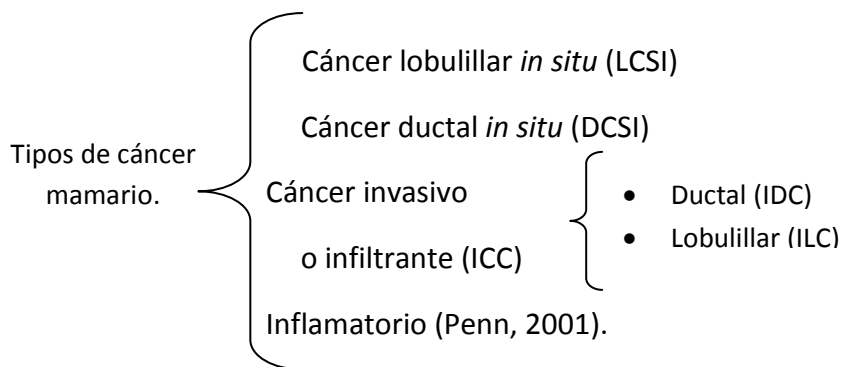
- Pérdida del recambio celular.
- Divisibilidad descontrolada.
- Angiogénesis aumentada.
- Invasión tisular (Hanahan and Weinberg, 2000).

Estas características, promueven el establecimiento de una o varias poblaciones celulares con una capacidad de proliferación descontrolada de las células que conforman conductos y lobulillos mamarios (IMSS, 2008; Van de Viver *et al.* 2002), promoviendo la pérdida de su funcionalidad y otorgándoles la capacidad para diseminarse y crecer (Fidler, 2003; Eusebi *et al.* 1994).

CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.

Las alteraciones derivadas de la pérdida de la función celular, pueden ser detectadas a distintos niveles dentro del desarrollo de la patología mamaria lo cual contribuye a establecer una clasificación del CaMa que se establece de acuerdo a tres factores importantes

- Sitio en el que se origina el carcinoma o tumor.
- Grado de invasión.
- Apariencia de las células vistas bajo el microscopio (Burstein *et al.* 2008; Susan, 2010).



El término *in situ* hace referencia a un tipo de cáncer de mama no invasivo, el vocablo significa “en el sitio,” por lo cual el cáncer no invasivo es un crecimiento anormal de las células que aún se localiza dentro del área donde se origina.

Cáncer lobulillar *in situ* (Fig. 2).

Hace referencia al tipo de cáncer no invasivo, cuyas células alteradas se restringen a los lobulillos (Dillon *et al.* 2010).

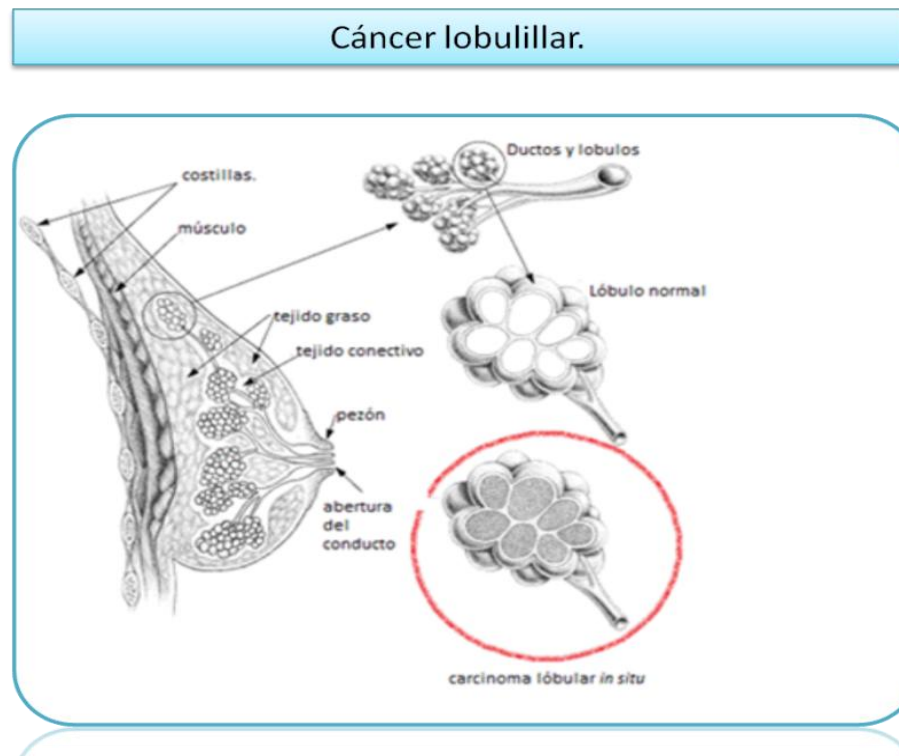


Fig. 2. Se observa una proliferación celular descontrolada que deriva en el desarrollo anómalo de las células que integran a los lóbulos de la glándula mamaria, dichas células ocupan el lumen de lóbulos y lobulillos, originando una alteración denominada carcinoma lobulillar *in situ* (Tomado y modificado de www.cancervic.org).

Cáncer ductal *in situ* (Fig.3)

Este término se utiliza para describir una etapa temprana del cáncer, y se refiere al confinamiento de las células alteradas que se restringen a los conductos galactóforos (Giuliano *et al.* 2011).

Cáncer Ductal.

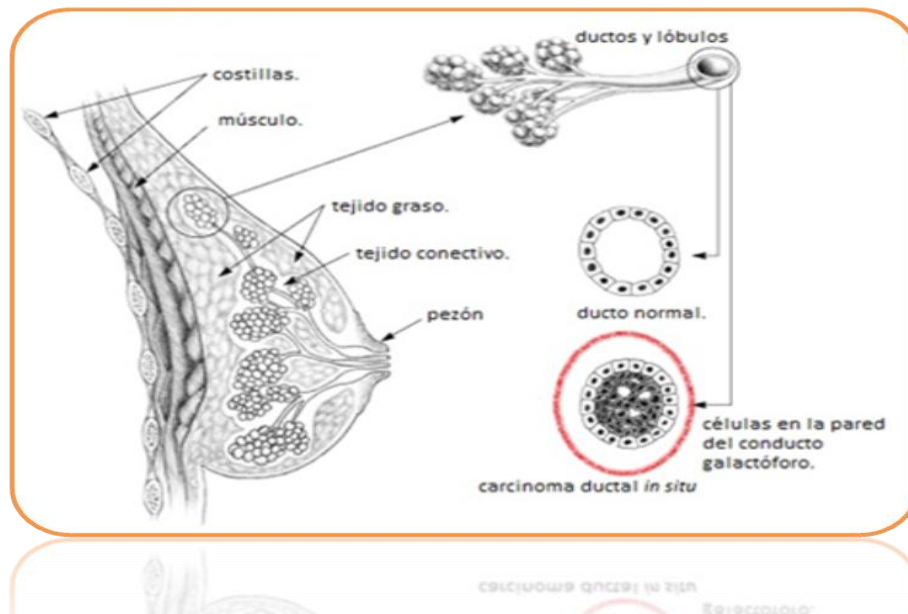


Fig. 3. En el DCSI, se observa la acumulación de células transformadas dentro de los conductos galactóforos (tomado y modificado de www.cancervic.org)

Cáncer invasivo ó infiltrante (ICC)

El término invasivo hace referencia células alteradas que pueden extenderse a otras partes del cuerpo.

Cáncer lobulillar invasivo (ILC).

Este término se utiliza para referirse a un tipo de cáncer que comienza en los lobulillos y puede propagarse a otras partes del cuerpo a través de un proceso conocido como metástasis (López *et al.* 2005).

Cáncer ductal invasivo (IDC).

Este tipo de cáncer mamario, inicia en un canal o conducto galáctoforo de la mama, penetra a través de la pared del conducto creciendo en el tejido adiposo del seno.

En este tipo de cáncer las células también poseen la capacidad de propagarse hacia otras partes del cuerpo, y generar un proceso conocido como metástasis (Beth *et al.* 2010).

Dicha metástasis (Fig. 4) se genera cuando las células transformadas pierden los contactos y adhesiones específicas con otras células, originando procesos de migración e invasión del estroma (cáncer invasivo) pudiendo alcanzar los vasos sanguíneos (Giuliano *et al.* 2011) y afectar principalmente a ganglios linfáticos, pulmón y hueso (Tong and Hotamisligil, 2007).

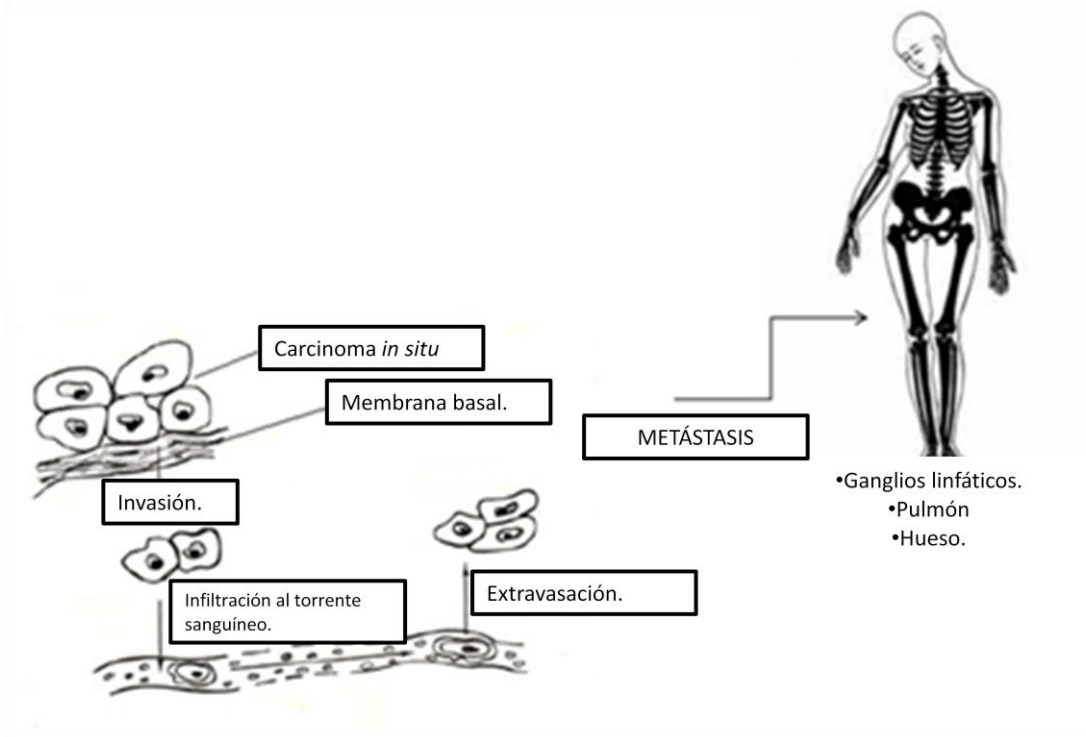


Fig. 4. El proceso de metástasis inicia con la migración de células transformadas, hacia tejido conectivo o adiposo de la mama, adquiriendo una capacidad infiltrante hacia el torrente sanguíneo y a través de este alcanzar y colonizar otras regiones y tejidos del cuerpo como ganglios linfáticos, pulmón y hueso.

Cáncer inflamatorio.

Es el tipo de cáncer de mama menos conocido y menos frecuente, ya que solo se reporta en el 1% de los casos (Secretaría de Salud, 2002).

Como característica dentro de este tipo de cáncer, la piel del pecho se ve inflamada y roja, pudiendo esparcirse y desarrollarse de manera muy distinta al cáncer lobular y ductal, ya que las células del cáncer de mama inflamatorio crecen en los estrechos vasos linfáticos bloqueándolos y causando el aspecto inflamado del pecho (Secretaría de Salud, 2002), esta patología mamaria de tipo inflamatoria es considerada como la más agresiva dentro del cáncer mamario, ya que al crecer en los vasos linfáticos le permite migrar mucho más rápidamente a ganglios linfáticos del pecho y a otras partes del cuerpo (Avivar, 2006).

Los anteriores tipos de cáncer, son subclasificados por el área clínica, y se basa en los hallazgos durante la exploración física, ésta relaciona las características del tumor y las lesiones ganglionares, regionales o la presencia de células infiltrantes que pudieran derivar en una metástasis (Giuliano *et al.* 2011).

Los diferentes estadios clínicos considerados en esta clasificación, indican la probabilidad teórica de la extensión del padecimiento o los hallazgos del inicio del cáncer, para poder establecer y dar seguimiento de una mejor manera a los tratamientos (American Joint Commite on Cancer Breast, 2010).

Dicha clasificación se basa en un sistema de estatificación, que es una manera estandarizada de los especialistas en el tratamiento del CaMa utilizado para resumir la información sobre cuánto se ha propagado la enfermedad sobre la mama, este sistema comúnmente utilizado es el que se conoce como sistema TNM del American Joint Comité on Cancer (AJCC) (American Joint Comité on Cancer Breast, 2010).

Este sistema, categoriza al cáncer de acuerdo al estadio de desarrollo con las siguientes letras T, N y M (tabla 3).

La letra T seguida de un número del 0 al 4 que describe el tamaño del tumor y su propagación a la piel o a la pared torácica debajo del seno, así los números T mayores indican un tumor grande y/o una propagación más extensa a los tejidos adyacentes.

La letra N seguida de un número del 0 al 3 indica si el cáncer se ha propagado o no a los ganglios linfáticos y de ser así indica cuantos ganglios se encuentran afectados.

La letra M seguida de un número del 0 al 1 indica si el cáncer se ha propagado o no a los órganos distantes, tales como pulmones o huesos (Abeloff *et al.* 2008).

Así pues las categorías del tumor indican lo siguiente:

CATEGORÍA	INDICACIÓN
TX	No se puede evaluar el tumor
T0	No hay evidencias de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ ó enfermedad de Pagget, del pezón sin masas tumorales asociadas
T1 a,b y c	Tumor de 2cm o menor diámetro
T2	Tumor de más de 2cm, pero no mayor a 5cm
T3	Tumor que mide más de 5cm de diámetro
T4	Tumor mayor a 5cm, crece hacia la pared torácica o piel, aquí se incluye el cáncer inflamatorio.
NX	Los ganglios adyacentes no se pueden evaluar.
N0	El cáncer no se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes
N0 (I+)	No se observan células cancerosas en ganglios linfáticos axilares.
N0 (mol +)	Propagación del cáncer de 1 a 3 ganglios axilares y/o se encuentra poca invasión en ganglios linfáticos mamarios internos
NI	Hay micrometástasis, entre 1 y 3 ganglios, el área de propagación mide 2mm o menos de diámetro, pero tiene por lo menos 200 células cancerosas o mide 0.2mm de ancho
N1mi	Propagación del cáncer de entre 1 y 3 ganglios linfáticos, el tumor mide más de 2mm
NI a, b y c	Propagación del cáncer a entre 4 y 9 ganglios linfáticos y el tumor mide de 2mm de diámetro
NII a y b	Propagación del cáncer a 10 o más ganglios linfáticos axilares y/o en cuatro ganglios mamarios, el tumor mide más de 2mm
MX	No se puede evaluar la presencia de propagación a distancia.
M0	No se encuentra propagación a distancia en radiografías, por examen físico u otros estudios de imagen
cM0(i+)	Se encuentran pequeños números de células cancerosas en la sangre o medula ósea (MO) o se encuentran áreas pequeñas de propagación del cáncer en ganglios alejados del seno, el tumor mide más de 0.2mm
MI	Hay propagación a órganos distantes.

Tabla 3. Datos tomados de American Joint Committee on Cancer Breast, 2010.

Una vez determinadas las categorías T, N y M esta información se combina en un agrupamiento por etapas, dichas etapas se expresan en números romanos del I (etapa menos avanzada) hasta IV (etapa más avanzada) (Burstein *et al.* 2008).

ESTADÍO	TUMOR	GANGLIO	METÁSTASIS
0	TIS	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T3	N1	M0
	T2	N0	M0
IIIA	T3	N2	M0
	T2	N2	M0
	T1	N2	M0
	T0	NI Y N2	M0
IIIB	Cualquier T	Cualquier N	M0
	T4	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 4. Datos tomados de American Joint Committee on Cancer Breast, 2010.

Para el diagnóstico clínico y clasificación del cáncer, es importante considerar una serie de estímulos que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad mamaria, ya que estos juegan un papel importante en la predisposición de la mujer para el desarrollo del cáncer (American Cancer Society, 2012).

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER MAMARIO.

Un factor de riesgo es un estímulo que aumenta la posibilidad de un individuo para el desarrollo del cáncer (Roth, 1997), dentro de los factores que contribuyen al desarrollo de CaMa podemos encontrar los siguientes:

Edad.

El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta a medida que la mujer envejece, la mayoría de los casos de cáncer mamario reportados pertenecen a mujeres mayores de 50 años (INEGI, 2011).

Antecedentes personales de cáncer mamario:

Una mujer con historia de haber padecido cáncer de mama en un seno, tiene una probabilidad anual del 1% al 2% de desarrollar un segundo cáncer (Avis *et al.* 2005).

Antecedentes familiares.

Otro factor importante es la historia familiar, donde podemos encontrar dos niveles de riesgo.

- El primero relacionado a la predisposición genética, ya que existen reportes sobre la participación de genes (BCRA1 y BCRA2) que se asocian con un mayor riesgo para desarrollar cáncer de mama.
- El segundo, se relaciona con la incidencia familiar, representado por una historia familiar con múltiples parientes que presenten o hayan tenido cáncer de mama (MacKenzie, 1996).

Celulares.

La estimulación o inhibición de la proliferación de células epiteliales glandulares malignas, es influenciada por múltiples factores, dentro de los cuales se encuentran:

- Factores de crecimiento epidérmico (EGF)
- Factor de crecimiento similar a insulina 1 y 2 (IGF1, IGF2)
- Varias citocinas como, IL2, IL10, IL4, etc (Theriault, 1996).

Estiló de vida.

Buenos o malos hábitos de vida, por ejemplo dentro de la alimentación con una ingesta aumentada de grasa animal, proteínas, alcohol entre otros juegan un papel importante como factor de riesgo que estimule el desarrollo de la enfermedad (Hortobagyi *et al.* 1998).

Como otro factor importante relacionado con el desarrollo de cáncer mamario, se encuentran las hormonas, por lo cual su participación dentro de ésta patología mamaria se trata de manera más detallada.

HORMONAS Y CÁNCER DE MAMA.

La relación entre cáncer de mama y las hormonas, es conocida desde hace más de 100 años, cuando Beatson en 1896 sugirió que las secreciones provenientes del ovario, eran las responsables del crecimiento del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas, demostrando que la ovariectomía producía una marcada reducción del tamaño del tumor mamario, al identificarse ésta relación hormona-cáncer la supresión hormonal se estableció como el primer tratamiento exitoso para el cáncer de mama, sin embargo a partir de identificar dicha relación también se genera el paradigma del papel de las hormonas dentro del proceso del cáncer humano (Edwards, 2005; Clemos; Goss, 2001).

Estudios posteriores, contribuyeron a la caracterización de moléculas ubicadas en la membrana celular encargadas de introducir las hormonas al núcleo celular, identificadas como receptores estrogénicos, demostrando la existencia de estos receptores en el 60% de los tumores de cáncer de mama contra un 40% que no lo poseían, por lo que a tumores que expresaban dichos receptores estrogénicos se les otorgo el término hormonodependiente el cual hizo referencia al comportamiento celular y biológico influenciado por hormonas (Bautista *et al.* 1998).

Actualmente dicho término se mantiene en uso y ha contribuido a relacionar la influencia hormonal con el desarrollo mamario y sus alteraciones (Flototto *et al.* 2001; Weigel, 2001).

GLUCOCORTICOIDES.

Dentro de las hormonas importantes que se relacionan con el control del desarrollo mamario, se encuentran los glucocorticoides (GC), estas hormonas circulan en la sangre y se asocian a moléculas transportadoras tales como la globulina y la albúmina, uniéndose a ligandos endógenos y/o sintéticos respectivamente (Brann, 1995).

El control de su secreción (figura 5) está dado por un mecanismo de retroalimentación, donde interviene la hormona adenocorticotrópica (ACTH) de la hipófisis, cuando los niveles de hidrocortisona bajan debido a un estrés o cualquier otro estímulo que rompa la homeostasis, el hipotálamo es estimulado para que segregue la hormona liberadora de corticotropina (CRH), esta hormona y los bajos niveles de GC promueven la liberación de ACTH de la pituitaria anterior, así la ACTH es llevada por la sangre hasta las glándulas suprarrenales, donde estimula la secreción de GC restableciendo la homeostasis (Huerta *et al.* 2010; Peter *et al.* 2006; Goodman y Gilman. 2003; Umland *et al.* 2002).

Secreción de Cortisol regulada por HPA.

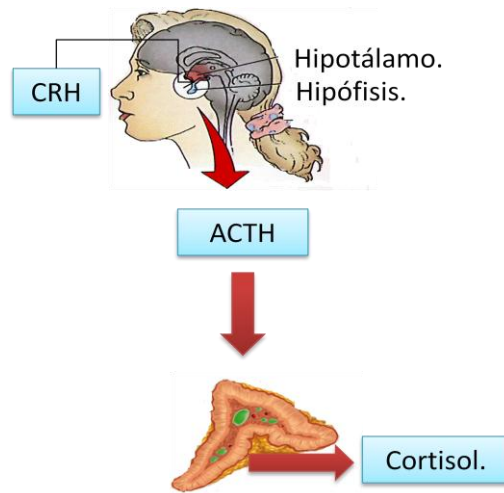


Fig. 5. La regulación de la secreción de glucocorticoides está dada por la regulación del eje HPA (eje hipotálamico-hipofisiario adrenal), los estímulos recibidos por el hipotálamo, estimulan la secreción de CRH(hormona liberadora de corticotropina), que a su vez estimula la producción de adrenocorticotropina (ACTH) a su vez una aferencia en las glándulas suprarrenales estimula la producción de cortisol.

HISTORIA.

La relación de los GC con el CaMa, inicia a partir de los años 50 al ser identificada su relación con el proceso de inflamación, motivo por el cual se le confieren propiedades antiinflamatorias, tal cualidad en sus inicios fue observada en la artritis reumatoide, sin embargo son relativamente recientes los avances sobre el conocimiento de los GC en cuanto a sus mecanismos moleculares de acción (Hermoso *et al.* 2003).

En la década de los 90 con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, se les comienza a brindar una gran importancia ya que estudios de secreción hormonal (Scharovsky *et al.* 2012), condujeron a la identificación de dichas moléculas como moduladoras esenciales de diversos procesos celulares, tales como:

- Transducción de señales.
- Comunicación intracelular
- Metabolismo (Winer *et al.* 2005).

Con la identificación de su actividad moduladora, se iniciaron los primeros intentos para sintetizar y fabricar corticoides que se adaptaran mejor al tratamiento de diferentes enfermedades.

Así se consiguió aislar la cortisona, la cual es considerada como una hormona biológicamente inerte y cuya forma activa natural es la hidrocortisona o cortisol (Gambacciani *et al.* 2003).

Una vez identificada se inicio la obtención de nuevos compuestos sintéticos, por lo cual actualmente estas hormonas de tipo glucocorticoideo pueden clasificarse en dos grandes grupos que se mencionan a continuación (Adcock *et al.* 2000).

CORTICOIDES NATURALES.

Se sabe que en el ser humano, se vierten a la circulación solo siete corticoides, de los cuales únicamente tres son secretados en cantidades fisiológicamente importantes (corticosterona, cortisol y aldosterona) (Font *et al.* 2004).

Estos corticoides son producidos en las glándulas suprarrenales y suelen dividirse en tres grupos, de acuerdo con su origen y sus efectos principales.

En la zona fascicular; se producen esteroides que regulan sobre todo el metabolismo glucídico, los llamados glucocorticoides (cortisol y corticosterona), en la zona glomerular; se producen corticoides que interviene en la regulación del metabolismo hidrosalino a los cuales se les conoce como mineralocorticoides (aldosterona y desoxicortisona), finalmente en la zona reticular; se sintetizan esteroides análogos a los producidos por las gónadas, hormonas gonadales (dihidroepiandosterona, androstenodiona y testosterona) (Beers *et al.* 1999).

Generalmente en la corteza suprarrenal de un adulto sano se puede producir, aproximadamente de 10 a 12mg de cortisol por metro cuadrado de superficie corporal cada día (Dickson *et al.* 2000).

CORTICOIDES SINTÉTICOS.

Con el inicio de la síntesis de la cortisona, comenzaron sus aplicaciones terapéuticas, sin embargo se observaron algunos efectos fisiológicos que constituían un grave inconveniente al emplearlo a dosis elevadas y durante periodos de tiempo prolongados.

Lo anterior motivó a la búsqueda de nuevos compuestos para los cuales se pudiera obtener un desdoblamiento de las acciones metabólicas y anti-inflamatorias (Nemere *et al*, 2003), a estos nuevos compuestos se les denominó corticoides sintéticos.

Dentro de este grupo destacan los siguientes.

- Prednisona ó prednisolona: GC con acción de vida media biológica que va de entre 18 y 36 h.
- Metilprednisona ó Metilprednisolona: GC con acción de vida media biológica de entre 18 y 36h.
- Triamcinolona: GC con acción de vida media biológica de entre 18 y 36 h.
- Parametasona: GC con acción de vida media de entre 36 y 54 h.
- Betametasona: GC con acción de vida media de entre 36 y 54h.
- Dexametasona: GC con acción de vida media de entre 36 y 54 h (Bosscher and Haegeman, 2009).

Estas hormonas glucocorticoideas ya sean naturales o sintéticas actúan en tejidos blancos a través de receptores específicos, los cuales se han encontrado de manera sobre expresada dentro del cáncer mamario (Persson,2000) y establecen una estrecha relación con la expresión y regulación de genes, así como de vías de control celular (Pathak *et al*. 2000) tanto en tejido normal como en tejido maligno (Muti,2004), por lo que es importante conocer un poco más a detalle la interacción de las hormonas con sus receptores y los efectos sobre el control celular de la glándula mamaria.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES.

El receptor de glucocorticoide (RG) pertenece a una superfamilia de receptores hormonales, que regula la transcripción de factores activados por ligandos (Gross and Cidlowski, 2008).

La unión del RG con su ligando genera un cambio conformacional para la activación, una vez activo se promueve su unión a una secuencia específica del ADN (secuencias conocidas como elementos de respuesta hormonal o HRE) (Botino,2010; Bosscher and Haegeman, 2009), cuando los complejos lipídicos interactúan con el material genético se altera el nivel de transcripción generando respuestas de activación o represión, controlando de esta forma la expresión de genes vinculados con procesos de inflamación, en respuesta al estrés, homeostasis de la glucosa y metabolismo lipídico (Choi *et al.* 2001; Saito *et al.* 2004).

Estas respuestas generadas por el RG, dependen en gran manera de la isoforma específica con la cual los ligandos interaccionan (Leung *et al.* 2003), por lo que actualmente se conoce que existen dos isoformas altamente homólogas del receptor conocidas como $RG\alpha$ y $RG\beta$ (Yudt and Cidlowski, 2002; Newton and Holden, 2007).

Estas formas son idénticas en 727 aminoácidos (aa), pero difieren en otros aminoácidos no homólogos, dentro de los cuales se reportan 50 aa y un peso molecular de 97 kD para la isoforma $RG\alpha$ y 15 aa para la Isoforma $RG\beta$ quien tiene un peso molecular de 94kD (Oakley *et al.* 1999; Saito *et al.* 2004).

Ambas isoformas, se encuentran presentes en casi todos los tejidos humanos, aunque se ha reportado que el $RG\alpha$ es la isoforma predominante en el citoplasma en ausencia del ligando de GC como parte del complejo hetero oligomérico que contiene proteínas de shock térmico (HSP) (Kino and Chousos, 2001) y es la única isoforma que tiene capacidad para unirse a una hormona y por lo tanto para realizar funciones de activación o represión reguladas por su estructura (Vallejo *et al.* 2005), la cual se integra por tres dominios funcionales distintos (Fig. 6):

- Dominio N-terminal o dominio inmunogenético (NTD).
- Dominio de unión al ADN (DBD).
- Dominio de unión al ligando (LBD).

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES.

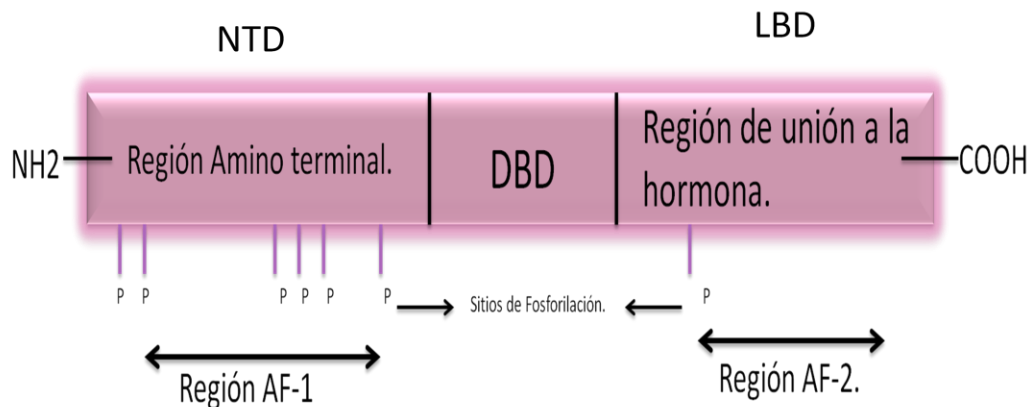


Fig. 6. Estructura funcional del receptor de glucocorticoides, se observan sus tres dominios, amino terminal, en el centro se observa la región de unión al ADN y el dominio de unión carboxiterminal cuya región se une a la hormona, se muestran algunos sitios de fosforilación así como la región independiente de ligando Af-1 y unión dependiente de ligando Af-2, las cuales se relacionan con la activación de la actividad transcripcional (Tomado y modificado de www.archbronconeumol.org).

El dominio NTD posee una zona de transactivación, donde se ubica una región conocida como función de activación (AF-1) ó independiente de hormona (Pelai *et al.* 2003), este dominio se localiza entre los aminoácidos 77 y 262 y juega un papel importante en la interacción del receptor con las moléculas iniciadoras de la transcripción a través de coactivadores, moduladores y factores de transcripción, como la ARN polimerasa II, proteína vinculante TATA (TBP) entre otras (Davies *et al.* 2008).

El dominio de unión al ADN (DBD) correspondiente a esta isoforma se ubica en medio de ambos dominios y es integrado por los aminoácidos 420-480, dentro de este dominio se ubican dos dedos de zinc, a través de los cuales el GR α se une a secuencias específicas del ADN (Savory *et al.* 1999; Suo *et al.* 2001)

Al dominio LBD, lo integran 12 α hélices arregladas en forma de sándwich de tres capas, donde las hélices 1-3 corresponden a la capa exterior, las hélices 6, 7, y 10 integran la capa interna, las hélices conocidas como 5,8 y 9 conforman la capa media creando una cavidad para la unión del ligando (Saito *et al.* 2004), las hélices 3, 4, 12 y 11 forman el sitio de unión y anclaje para el GC, dentro de este dominio se localiza una región conocida como AF-2, la cual es altamente conservada y posee secuencias importantes para la dimerización del receptor y

translocación nuclear, así como la unión a proteínas de shock térmico y la interacción con coactivadores (Nicolaidis *et al.* 2010) capaces de modular otras cascadas de transducción de señales a través de interacciones proteína-proteína con factores de transcripción específicos, que pueden ser importantes en la supresión de la inflamación (Boonyaratankornkit *et al.* 2007).

Por otro lado la isoforma RG β es formado por un mecanismo alternativo de maduración del pre-ARNm del RG, este puede encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma compartiendo el extremo N-terminal de la isoforma alfa (Schauf *et al.* 2008).

Este receptor codifica para una serie de aminoácidos no homólogos en la región C-terminal, que a nivel nuclear carece total o parcialmente del dominio de ligando (LBD) y en su lugar se encuentra una secuencia de empalme variante específica de aminoácidos C-terminal (Otto C *et al.* 1997), la cual muestra una actividad negativa sobre la transcripción (Van der Vaart and Schaaf, 2009; Oakley *et al.* 1996).

RESPUESTAS ORIGINADAS POR LOS GLUCOCORTICOIDES.

El acoplamiento de GC con su receptor genera distintas respuestas dentro de la actividad celular en el ser humano, por lo que se les ha relacionado con la modulación de la expresión del 10% de los genes así como con vías reguladoras, encargadas de la supervivencia celular (Harrison *et al.* 2005).

La relación GC con la actividad celular hace que estas hormonas sean consideradas fundamentales para la vida ya que un aumento o disminución de su secreción se asocia a patologías como:

- Hipertensión
- Diabetes
- Obesidad.
- Alteraciones reproductivas.
- Cáncer mamario (Tliba *et al.* 2007).

Con respecto al cáncer mamario, la actividad glucocorticoidea puede relacionarse con respuestas que no requieren de la actividad transcripcional, ya que se ha reportado que los GC son capaces de activar la cascada de quinasas a través del acoplamiento con receptores de membrana.

Dentro de estas quinasas se encuentra Akt, y aunque el mecanismo a través del cual el RG es capaz de activar a PI3K para la fosforilación de Akt no es bien conocido, se cree que se requiere de la asociación de RG de membrana con la subunidad p85 de PI3K, para generar respuestas de proliferación y supervivencia celular (Brivanlou and Darnell, 2002).

Otro de los efectos de los GC, se relaciona con la inhibición de la secreción de citocinas y sus efectos pleiotrópicos ya que actúan como inmunosupresores y antiinflamatorios (como la dexametasona), lo cual indica que estas moléculas pueden actuar sobre diversos tipos celulares para mantener la homeostasis y reparación del organismo en respuesta a un estímulo de estrés (Lars *et al.* 2006).

Así mismo existen reportes que mencionan la capacidad de los GC sintéticos como dexametasona, para inhibir el efecto citotóxico del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en distintos tipos celulares sin embargo esta respuesta depende en mucho sobre el tipo celular sobre el cual actuó el GC sintético y se desconoce el mecanismo por el cual dexametasona ejerce tal efecto (Messmer *et al.* 2001).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF).

Debido a la relación de los GC con la supresión del efecto de citocinas como TNF, es importante conocer un poco acerca de este factor por lo cual dentro de su historia podemos encontrar lo siguiente.

Su estudio inicio en 1940 al ser detectado en el suero de ratones tratados con la endotoxina Bacillus de Calmette-Guerin (BCG), debido a su capacidad para producir necrosis hemorrágica así como la muerte de determinadas líneas celulares tumorales, también se le reconoció como mediador de la caquexia que se produce en animales con infecciones crónicas, esta propiedad justificó su denominación como “caquectina” (Campbell *et al.* 2003).

Fue aislado en 1975 por Lloyd Oíd, al detectar un péptido de origen macrófagico responsable de la necrosis hemorrágica observada en tumores de ratones tratados con la endotoxina BCG (Chen and Goeddel, 2002).

Posteriormente Bleutier y colaboradores en 1985 aislaron la caquectina comprobando que su extremo aminoterminal poseía una gran homología con las secuencias del TNF humano, tras ello llegaron a la conclusión de que ambas proteínas, eran la misma molécula (Kollias *et al.* 2010).

En ese mismo año varios grupos de investigadores identificaron el gen que codifica a esta proteína, observando su estrecha relación con el gen de linfotóxina o TNF- β (Kollias *et al.* 2010).

En los años siguientes, se desarrollaron distintos estudios que contribuyeron a caracterizar los receptores de TNF y con ello se establecieron las relaciones existentes entre esta citocina y diferentes cuadros patológicos, dentro de los cuales se sabe que juega un papel decisivo (MacEwan, 2002).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α).

Este factor es una citocina pleiotrópica que posee propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales capaz de actuar en estrecha coordinación con citocinas como IL-1 y el interferon- γ (Kawano *et al.* 2012), en suma a dichos efectos, también se le relaciona con el proceso de mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares, lo cual corrobora su importante relación en condiciones fisiológicas como patológicas (Paula *t al.* 2004).

APLICACIONES TERAPEUTICAS DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α).

Inicialmente las investigaciones se centraron en el análisis de las propiedades antitumorales que posee esta citocina con la finalidad de utilizarlo como un agente terapéutico, sin embargo dada su elevada toxicidad sistémica su aplicación terapéutica quedo limitada a su administración intratumoral (Kuchroo *et al.* 2001).

Y aunque aun se siguen proponiendo nuevas perspectivas tales como la posibilidad de introducir el gen de TNF α en células tumorales diana con el fin de promover su propia síntesis en el lugar donde tiene que actuar como agente antitumoral obviando así sus efectos sistémicos (Kir *et al.* 2012), es importante considerar que los posibles efectos antitumorales dependen en gran manera de la línea celular sobre la que actúen, ya que en algunos sistemas celulares el TNF α se ha demostrado que es capaz de inducir la proliferación celular (Eustice,2006), por lo cual su utilidad terapéutica actual en el cáncer debe de ser estudiada de forma aislada.

DESCRIPCIÓN DE TNF α .

TNF α es un trímero con forma de cono constituido por tres subunidades idénticas, esta citocina posee en su totalidad 157 aminoácidos (aa) y se le atribuye un peso aproximado de 17.3 kD (Aikawa *et al.* 2010).

Dentro de sus características podemos encontrar que posee secuencias que contienen residuos de triptófano bien conservados entre especies, las cuales también se encuentran presentes en el conocido TNF β o linfotóxina, estos residuos poseen una gran importancia ya que el cambio de estos por fenilalanina da lugar a una reducción de su actividad (Horruchi *et al.* 2010).

De igual manera encontramos que este factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), posee tres residuos de histidina localizados en las posiciones 15, 73 y 78 donde una modificación en el residuo 15 da lugar a la disminución o pérdida de su actividad, lo cual es un indicador de que este aminoácido está en el sitio de unión al receptor de TNF α o en una posición muy cercana a él (Castro *et al.* 2003).

Por otro lado existen descripciones sobre una forma de TNF unida a la membrana nuclear, de un peso aproximado de 26 kD, que corresponde al producto no procesado de la traducción del ARNm del TNF, dicha forma unida a la membrana es activa e incluso considerada más potente que TNF en su forma secretada, lo cual apoya la importancia de la acción local de TNF por interacción celular (Horruchi *et al.* 2010).

Con respecto a su genética podemos encontrar que los genes que codifican para este factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) se localiza en el cromosoma 6, donde se ubica un complejo de histocompatibilidad (MHC) al cual se une TNF α , posibilitando la interrelación entre los componentes responsables del reconocimiento y los efectores del sistema inmune, evidenciando el papel del gen de TNF α en las enfermedades inflamatorias (Zhang *et al.* 2012; Bradley, 2008; Cornelis, 1999; D'Alfonso, 1996).

INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE TNF α .

La síntesis del factor de necrosis tumoral conocido como TNF α se lleva a cabo de forma específica en cada tejido, aunque su síntesis ha sido estudiada principalmente sobre la línea monocito macrófago ya que ésta es su principal fuente de producción en el hombre (Fang *et al.* 2012).

Sin embargo su expresión y síntesis también puede ocurrir en respuesta a un estímulo en células como:

- Neutrófilos.
- Células NK.
- Linfocitos T

Y en células que responden a un estímulo patológico (Leumbruno *et al.* 2008) como:

- Hepatocitos
- Células tumorales.

Observando que este $\text{TNF}\alpha$, es capaz de estimular su proliferación celular (Wu and Zhou, 2010).

Existe una gran variedad de estímulos capaces de inducir la síntesis de $\text{TNF}\alpha$, los cuales se relacionan con su regulación a nivel transcripcional como un mecanismo de control sumamente importante (Fang *et al.* 2012).

Generalmente ésta citocina posee una transcripción basal y puede incrementarse en gran manera ante estímulos celulares patológicos, llegando a involucrar varias vías de señalización, dentro de las cuales se encuentra PI3K, la cual regula la actividad de Akt (Yoshino *et al.* 2011; Chuang *et al.* 2008).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE $\text{TNF}\alpha$.

El $\text{TNF}\alpha$ ejerce su acción a través de la unión a receptores celulares específicos, estos receptores están presentes en todas las células del organismo a excepción de los glóbulos rojos (MacEwan, 2002).

De acuerdo al tipo celular, existen de 100 a 10000 sitios de unión para $\text{TNF}\alpha$ en cada célula, aunque esta unión es esencial, no es suficiente para manifestar un efecto citotóxico, ya que se requiere de la internalización de $\text{TNF}\alpha$ así como de distintas interacciones proteína-proteína para ejecutar dicha acción.

La expresión del receptor de $\text{TNF}\alpha$, así como la sensibilidad celular a dicha citocina, probablemente está modulada por la actividad de proteínas quinasas y su respuesta depende en gran manera del tipo celular sobre el cual este actuando por ejemplo; en varias líneas celulares se ha demostrado que $\text{TNF}\alpha$ es capaz de ejercer un efecto citotóxico debido al

aumento de la expresión de sus receptores, sin embargo también existen reportes sobre el efecto contrario en donde dicho factor promueve la proliferación celular, lo cual se correlaciona con la reducción de la afinidad de unión de TNF con sus receptores (Tsay *et al.* 2012).

Dentro de la familia de receptores para TNF se encuentran los siguientes:

RECEPTOR	DESCRIPCIÓN
Fas/Apo 1	Antígeno de superficie que puede iniciar la muerte celular.
CD27	Antígeno identificado en timocitos y linfocitos T activados
CD30	Antígeno activador de linfocitos T
Virus	Codifican genomas a receptores solubles homólogos a los de TNF, e inhiben la respuesta inmune por la unión de TNF.
Proteína 65 ECP	Receptor que presenta repeticiones cis.
4-IBB	Se une a una variedad de componentes de matriz extracelular, permitiendo establecer relación entre la arquitectura celular de la familia de TNFR

Tabla5. Receptores que integran a la familia de receptores para TNF (Bull *et al.* 2008)

Estos receptores se relacionan con el inicio de la señalización para la proliferación y muerte celular, dichas señales son requeridas para el desarrollo y funcionamiento normal de la célula, por lo que una excesiva señalización de estos receptores conduce a reacciones tales como: la inflamación, daño tisular y choque séptico, por lo que la desregulación de su expresión génica así como el aumento de su producción, altera la homeostasia del organismo (Loreto,2010), en específico para TNF α , se encuentran reportados dos receptores conocidos como:

TIPO	NOMBRE DEL RECEPTOR	TAMBIÉN CONOCIDO COMO
I	TNF-R1	p55 ó p60
II	TNF-R2	p80 ó p75

Tabla6. Receptores conocidos para TNF α (Thommesen and Laegreid, 2004).

Ambos receptores regulan en forma cooperativa o independiente un amplio rango de respuestas celulares (Fig. 7) dentro de las cuales se encuentran:

- Proliferación
- Diferenciación.
- Citotoxicidad
- Muerte celular (Kollias, 1999).

Respuestas relacionadas con TNFR1 Y TNFR2

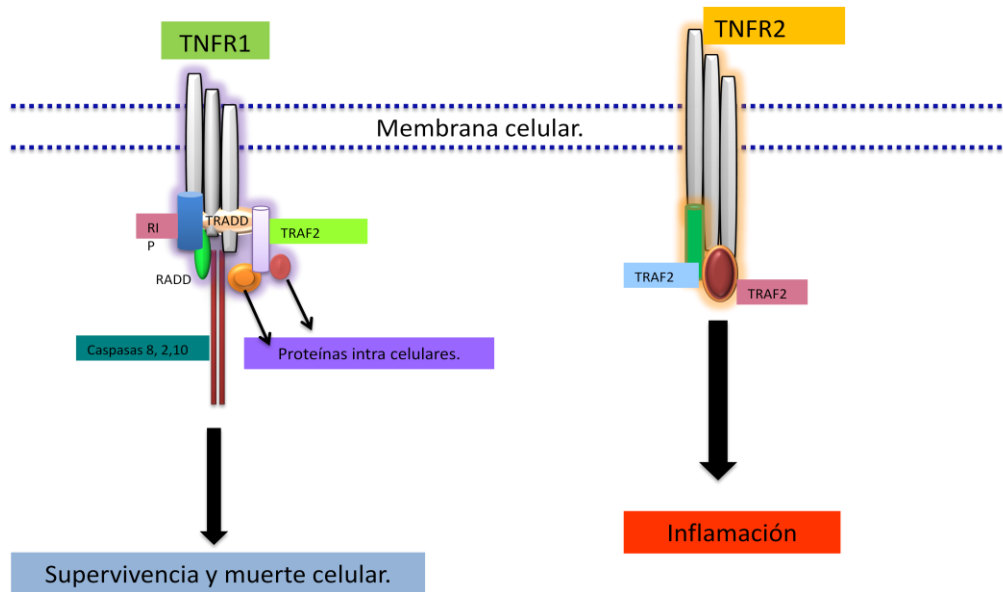


Fig. 7. Acoplamiento de los receptores de TNF (TNFR1 y TNFR2) con proteínas citoplasmáticas, las cuales generan segundos mensajeros que ejecutan respuestas de supervivencia y muerte celular así como de inflamación imagen modificada de www.immunityageing.com

Estos dos receptores, guardan una estrecha afinidad y parece ser que ambos participan en procesos similares dentro de la muerte celular y la citotoxicidad, aunque existen reportes sobre TNFR1 donde se destaca su participación de manera más estrecha con la muerte celular y el efecto citotóxico, mientras que al TNFR2 se le relaciona mayormente con el efecto de inflamación (Thommesen and Laegreid, 2004).

Los dos receptores descritos para TNF α son en un 28% homólogos en sus dominios extracelulares, sin embargo difieren significativamente en los intracelulares, ya que TNFR1 puede inducir efectos de muerte pero de igual forma es capaz de activar señales de sobrevivencia y proliferación, a través de la inducción de citocinas y de genes inmunoreguladores así como de metaloproteínas (Masaki *et al.* 2008).

SEÑALIZACIÓN DE TNF α .

La señalización de TNF α tiene lugar tras unirse a sus receptores, a dicha unión le sigue un proceso de internalización del complejo TNF α -receptor y de la degradación de éste por hidrolasas lisosomales, sin embargo el mecanismo a través del cual TNF α regula sus efectos celulares parece involucrar la señalización a través del reclutamiento de moléculas que se unen a un ligando (Masaki *et al.* 2008).

Esta unión es capaz de disparar respuestas celulares (Figura 8) de muerte o sobrevivencia, a través de la unión de proteínas citoplasmáticas que se adhieren al receptor de 55kD conocido como TNFR1.

SEÑALES DE MUERTE Y SUPERVIVENCIA ACTIVADAS POR TNF α .

Dentro de la proteínas que se unen al TNFR1 para disparar señales de muerte se encuentra Fas, el cual junto con el receptor de TNF α posee una región importante para la transmisión de la señal de muerte celular (Kelly *et al.* 2010) a través de la interacción con la proteína FADD (Fas-associated death domain protein), formando un heterodimero que se conoce como el traductor proximal de la actividad de muerte celular del receptor Fas (Baud, 2001).

Sin embargo también puede encontrarse otra proteína conocida como TRADD (TNFR1-associated death domain protein), identificado como el traductor proximal de la muerte celular mediado por el receptor TNFR1, el cual actúa de forma similar a FADD (Kawasaki *et al.* 2002).

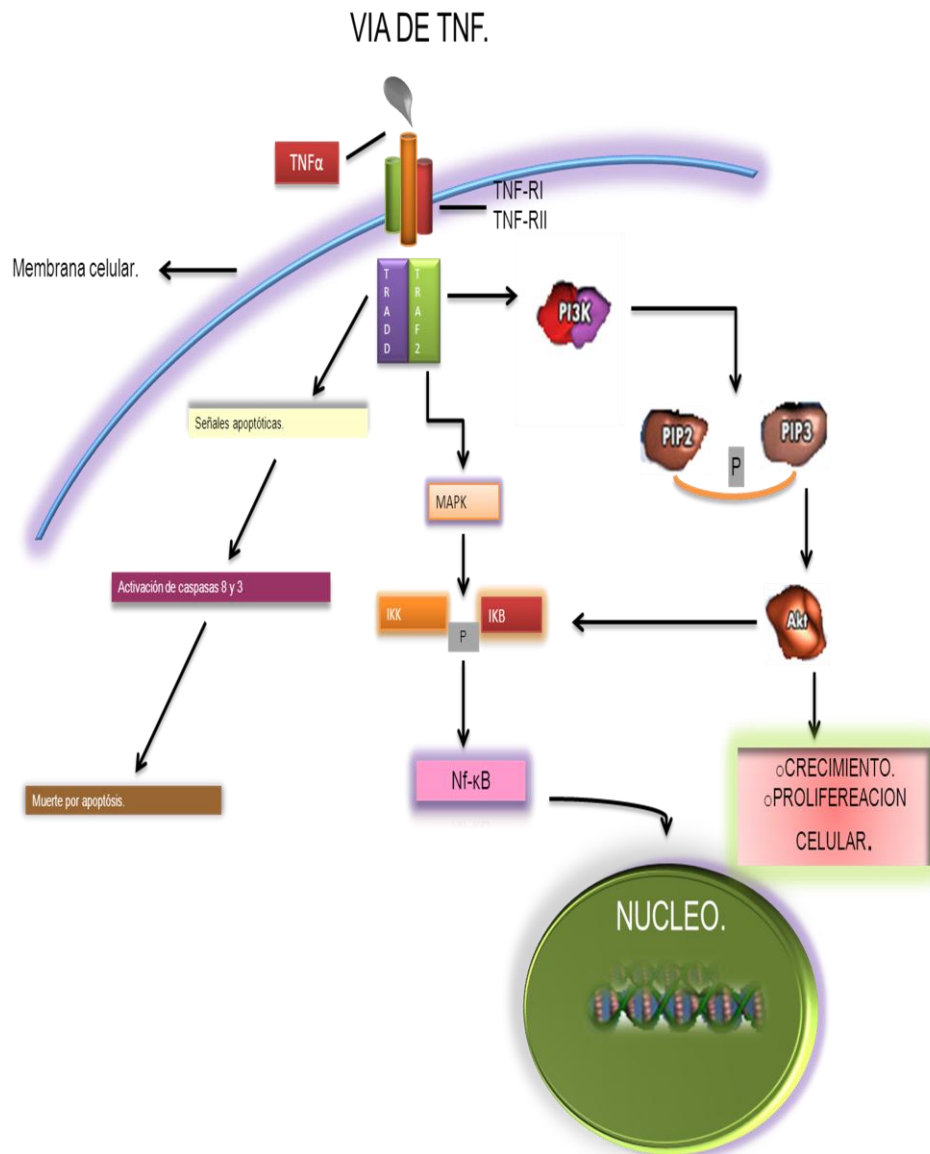


Fig 8. A nivel de membrana celular, se encuentran los receptores triméricos para TNF α (TNFRI y TNFRII) estos, promueven el reclutamiento de proteínas de señal intracelular tales como TRADD y TRAF2, las cuales pueden generar una respuesta de muerte celular a través de la activación de caspasas o bien, generan estímulos para receptores de tirosina quinasa, tales estímulos activan vías de supervivencia y proliferación celular, dentro de las cuales se encuentra PI3K, quien a través de procesos de fosforilación, genera mensajeros conocidos como PIP2 y PIP3, siendo este último el que se une a la región PH de AKT para activarla, una vez activa se generan inhibidores de muerte, trayendo como consecuencia el estímulo de la proliferación celular.

Cada una de estas proteínas poseen una región de muerte, la cual se relaciona con los receptores de TNF, y permiten la interacción entre el receptor y las moléculas traductoras, al unirse TNF α a su receptor TNFR1 provoca la trimerización del receptor, originando la transmisión de la señal a través de la región de muerte citoplasmática, reclutando a proteínas intracelulares como TRADD, este requiere de la unión a FADD para inducir la muerte celular a través de la activación de una cascada de proteasas que tienen como resultado la muerte celular (Jaruga-Killeen and Rayford, 2005).

Así mismo el TNFR1 induce otra vía de muerte celular a parte de la ya descrita, esta tiene lugar a través de otra proteína llamada RIP, la cual corresponde a una proteína de serina treonina que posee una región de dominio de muerte a través de la cual interacciona con TRADD, sin embargo a través de esta proteína NF-kB también puede ser activada mediante la interacción de TRAF2 (Factor-associated TNF receptor), este factor pertenece al grupo de proteínas implicadas en la transmisión de señales desde el receptor de TNF que posee gran afinidad para el receptor TNFR2 (Waetzig *et al.* 2005).

Este TRAF2, es capaz de mediar un efecto protector ante la señal de muerte, ya que puede regular la activación de factores protectores como NF-kB y vías como PI3K (la cual se describe más adelante).

Por lo que TNF α a través de las interacciones con sus receptores, es capaz de estimular de manera antagónica tanto efectos de muerte como de supervivencia (Fig 8) (Thommesen and Laegreid, 2004).

DESCRIPCIÓN DE FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASA (PI3K).

La vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa conocida como PI3K juega un papel muy importante en la transducción de señales de distintas vías relacionadas con TNF α y otros mensajeros secundarios, los estímulos extracelulares que inducen a PI3K y a los fosfolípidos producto de su actividad, pueden ser dependientes de la activación de un receptor citosólico para regular numerosos aspectos del crecimiento proliferación y supervivencia celular (Kevin *et al.* 2010). Por ello las distintas alteraciones genéticas como amplificaciones, mutaciones y rearrreglos cromosómicos pueden comprometer la activación de ésta vía (Anne *et al.* 2001), favoreciendo el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y frecuentemente, una mayor resistencia a tratamientos (Pitt *et al.* 2008).

La activación de la vía PI3K, puede generarse a través de distintos receptores tales como:

- Receptores acoplados a tirosin quinasas pertenecientes a la familia de src quinasas.

- Receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (insulin-like growth factor I receptor).
- Receptores transmembranales acoplados a proteínas G.
- Receptores de la familia de $TNF\alpha$ (Harrington *et al.* 2004).

Al localizarse en la membrana citoplasmática la PI3K cataliza grupos fosfatos, generando fosfoinositoles fosforilados los cuales funcionan como reguladores intermediarios para la señalización celular (Rochelle *et al.* 2010).

En la actualidad se reportan ocho tipos de PI3K en mamíferos, las cuales se clasifican en tres clases con distinta actividad tal como lo muestra la siguiente tabla:

Clases descritas para la familia de PI3K.

Clase	Tipo	Sub unidad	Isoforma	Función	Dominio	Activación	
I	A	Catalítica p110.	p110 $\alpha/\beta/\delta$	Auto fosforila PIP2 en PIP3	Unión al oncogén Ras, PK catalítico	RTK, RAS	
		Adaptador/Regulador P85.	p85 α/β , p55 γ/α , p50 α	Activa proteínas G, inhibe a p110	Unión a Rct, PKC, SHP1, Rac, Rho, RH, Ras mutada y Src.		
I	B	Catalítica p110 γ	p110 α/γ	Fosforila PIP2 en PIP3	PIK, quinasa de unión a Ras.	Proteínas G	
		Adaptador/Regulador p101		Regula actividad de p110			
II		Monomérica p110	Mamíferos C2 $\alpha/\beta/\gamma$	Productos PIP y PIP2, activa Rho-GT P asas, Rho A, rac-1 y Cdc 42	Une lípidos independientemente de Ca ²⁺	RTK, integrinas	Carece de subunidad regulatoria
III		Catalítica Vps34, 100 kDa.		Tiene como producto PIP2	Se piensa que son fundamentales en el tráfico vesicular.		
		Adaptadora					

Tabla 7. Muestra una breve descripción de las 3 clases pertenecientes a la familia de PI3k (datos tomados de Gayard *et al.* 2010).

La selectividad por el sustrato y la preferencia en la expresión de cada subunidad regulatoria y catalítica, es determinada por el tipo celular sobre el cual se expresan (Gayard *et al.* 2010).

Es importante destacar que debido a la regulación dada por cada una de estas clases para la actividad de PI3K, esta vía puede ser inhibida de manera irreversible a través de la clase 1 y 2 por el fármaco conocido como Wortmanina y Ly2940002 (Turck *et al.* 2004), donde el primero se une de manera covalente al aminoácido lisina de la subunidad catalítica p110 inhibiendo la activación de PI3K (Smith, 2004).

PROTEÍNA Akt.

Akt o también llamada quinasa B, es considerada el homólogo del oncogén viral v-Akt (retrovirus Akt8), el cual se vincula con los linfomas en ratón y posee una actividad elevada en humanos (Cornero, 2010).

A lo largo de su historia, podemos encontrar que en sus inicios fue conocido como RAC-PK, por su relación con la proteína quinasa A (PKA) y C (PKC) en humanos, posteriormente en los años 90 se demostró que PKB se encontraba regulada por PI3K debido a la relación directa con procesos tales como la muerte celular, la proliferación y la sobrevivencia celular (Majumder *et al.* 2005)

Esta relación estableció un vínculo existente entre PI3K y Akt, motivo por el cual se dio a conocer como una vía integrada (Coffer *et al.* 1998).

DESCRIPCIÓN DE Akt.

Akt pertenece a una gran familia de quinasas, que incluye a las quinasas PKA y PKC, quienes conservan un alto grado de homología, Akt regula procesos fisiológicos que controlan diferentes funciones celulares, su actividad es modulada por la cascada de señalización PI3K y es activada en respuesta a los diversos estímulos extracelulares (Hanks *et al.* 1995).

Al relacionarse en procesos celulares de gran importancia, una actividad anormal de la vía origina una respuesta proliferativa y de supervivencia, este comportamiento se relaciona con múltiples tipos de cáncer (Marina *et al.* 2011).

La respuesta originada por Akt depende de cada una de sus isoformas específicas, de las cuales se conocen tres y se muestran en la siguiente tabla.

**ISOFORMAS ESPECÍFICAS CONOCIDAS
PARA Akt.**

Akt 1 ó PKB α
Akt 2 ó PKB β
Akt3 ó PKB γ

Tabla 8. Isoformas de Akt (información tomada de Murthy *et al.* 2000).

Dichas isoformas, son homologas en su secuencia proteica de un 85% al 100% y existen reportes que indican la participación de estas isoformas cuya función específica es relacionada con el cáncer, tal como lo muestra la siguiente tabla.

ISOFORMA	FUNCIÓN	ALTERACIÓN EN EL TUMOR	TIPO DE CÁNCER DONDE SE VE IMPLICADA
Akt1	Sobrevivencia celular	Amplificada	Estómago
Akt2	Homeostasis de la glucosa	Amplificada/Mutada	Ovario, páncreas y colorrectal
Akt3	Sobrevivencia celular	Sobre expresada	Seno y próstata

Tabla 9. Isoformas de Akt reportadas en el cáncer (información tomada de Leonel *et al.* 2011).

Estas distintas funciones, generan cierta selectividad para las aberraciones durante la génesis tumoral, por ello los distintos inhibidores selectivos de las isoformas, podrían ser necesarios para poder alcanzar una buena eficacia (Peng *et al.* 2003).

ESTRUCTURA DE Akt.

El comportamiento de Akt, esta dado por su estructura, por lo cual es importante describirla de manera breve destacando que las tres isoformas conservan la siguiente forma.

Esta posee un dominio amino-terminal con homología a pleckstrina (PH), el cual regula las interacciones proteína-proteína o de lípidos-proteína, de igual forma la integra un dominio central de quinasa serina (Ser 473) treonina (Thr 308) y un domino regulador carboxiterminal que interactúa con 3'-fosfoinositoles (PIP), generados por PI3K, este dominio es el que contribuye al reclutamiento de Akt (Gonzales *et al.* 2005), para el proceso de activación de señales de muerte, proliferación y supervivencia celular (Lynch,1999).

DESCRIPCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt.

Dicha vía es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana, dentro de los cuales se encuentra los TNF α ó GC, el complejo formado, a su vez fosforila la unidad p85 de PI3K, conduciéndola a un cambio conformacional que a su vez promueve la unión de la subunidad catalítica p110 para su activación (fig. 9) (Semir *et al.* 2011).

PI3K de forma activa, fosforila el fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), el cual activa a la proteína Akt (Pitt *et al.* 2008).

La Akt, actúa sobre distintos blancos responsables de los efectos de la vía, por lo cual la activación anormal de ésta conduce a una respuesta proliferativa y de resistencia a la muerte que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer (Altamore and Testa, 2005).

Vía de señalización PI3K/Akt.

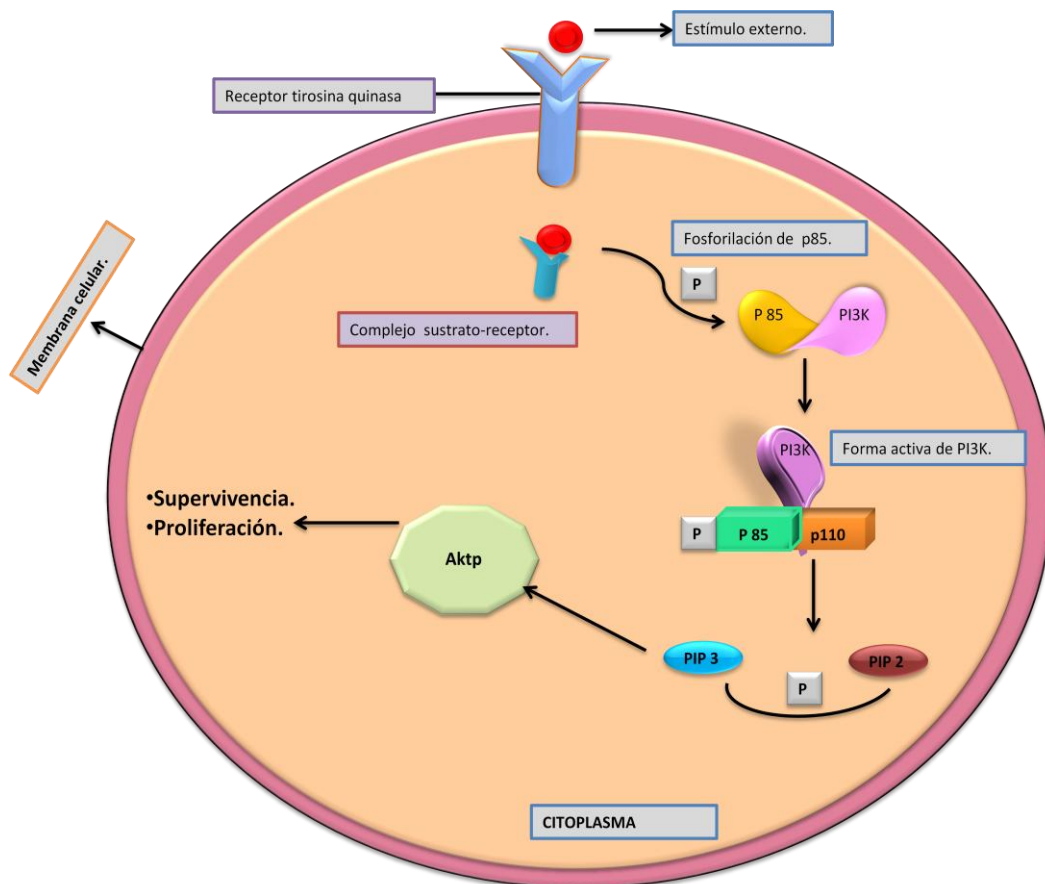


Fig9. La activación del receptor de membrana, como consecuencia de un estímulo fisiológico fosforila el sustrato del receptor de $TNF\alpha$, el cual a su vez fosforila a la subunidad catalítica p85 de PI3K, originando un cambio estructural de la proteína, lo cual promueve la unión catalítica con p110 para activar a PI3K, una vez activa se generan segundos mensajeros conocidos como PIP2 y PIP3 quienes a través de la fosforilación activan a la proteína Akt, la cual regula procesos de supervivencia y la proliferación celular.

EVENTOS REGULADOS POR PI3K/Akt.

Al bifurcarse esta vía en distintos puntos, pueden originarse varias respuestas y dichos nodos identificados dentro de la vía, se ven implicados como puntos fundamentales en desenlaces particulares tales como la supervivencia celular y la inhibición de la muerte celular (Ji *et al.* 2003).

Existen reportes sobre la importancia de PI3K/Akt dentro de procesos de proliferación y supervivencia celular (Vivanco *et al.* 2002) por ejemplo, la señalización por Akt inactiva

varios factores de muerte celular como BAD, procaspasa 9 y factores de transcripción FKHR (forhead) (Chen *et al.* 2001).

Sin embargo otros factores de transcripción pueden incrementar la expresión de genes de supervivencia, que son activados por Akt incluyendo CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico, mediante la fosforilación directa de NF-κB (Hemmesy *et al.* 2005).

La activación del factor de transcripción Nf-κB a través de Akt, se genera inicialmente mediante la fosforilación y activación de las IKK, que favorecen su translocación al núcleo promoviendo la transcripción de genes protectores de muerte celular (Osak *et al.* 2004).

Otro efecto de Akt relacionado con la supervivencia celular, es la inactivación del gen supresor de muerte p53 que se da por la habilidad de Akt para fosforilar y activar directamente a MDM2 (proteína que regula negativamente a p53) (Nicola *et al.* 2004).

Cuando la vía PI3K/Akt se encuentra en un estado de activación permanente, el anterior mecanismo permite que una célula, aun en malas condiciones resista a la muerte, sobreviva y prolifere contribuyendo de esta manera a la inestabilidad cromosómica, característica de la carcinogénesis (Prosenjit *et al.* 2003).

PI3K/Akt EN CÁNCER.

El estado de activación de la vía PI3K contribuye a la resistencia tumoral ante ciertas terapias por lo que las anomalías dentro de ésta vía son comunes en diversos tipos de cáncer y las distintas moléculas que se involucran con ella participan en la transformación neoplásica, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Molécula involucrada	Forma alterada en el tumor	Tipo de cáncer	Frecuencia
PTEN	Mutación somática	Glioma, próstata, endometrio, ovario, cánc er de mama, colon rectal, leucemia.	Mayor al 50%
	Expresión disminuida		
	Metilación		
	Perdida de la heterocigocidad		
	Mutación germinal		
p85	Activación de mutaciones.	Ovario, colon, linfoma, pulmón.	Raramente conocido.
	Deleción		
	Amplificada	Cáncer de mama, ovario, cérvix, pulmón, vejiga.	25 al 50%
	Mutación		
Akt1	Amplificación	Estomago, Ovario, Páncreas	Baja.
Akt2	Amplificación	Ovario, páncreas.	Baja.
Akt3	Sobre expresada	Cáncer de mama, Próstata.	Baja.

Tabla 10. Muestra las sobre expresión reportada para Akt en los distintos tipos de cáncer (Información tomada de Samuels *et al.* 2004; Osak *et al.* 2004)

Por lo anterior PI3K es considerado un blanco frecuente de estudio (Cambell *et al.* 2004), ya que en muchos casos los efectos oncogénicos de estas anomalías están mediados al menos parcialmente por la señalización de PI3K/Akt, cuya modulación es requerida para el óptimo funcionamiento celular, por lo cual al verse comprometida y/o alterada pudiera atribuírsele gran relación con la génesis tumoral (Rodriguez-Vicciana *et al.* 1997; Chen *et al.* 2011).

DESARROLLO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En México, el cáncer ocupa la segunda causa de muerte en mujeres, en particular el cáncer de mama se coloca como la primer causa de muerte superando al cáncer cervicouterino (CaCu).

El cáncer mamario es el resultado, de la alteración de los mecanismos de regulación celular, tales como la muerte, supervivencia y proliferación.

Estos mecanismos se basan en formas complejas de comunicación intracelular, que permiten a la célula mantener su auto regulación para llevar a cabo procesos y funciones especializadas, por ello cuando las células reciben algún estímulo que contribuya a su transformación maligna, éstas ignoran las señales normales de comunicación y comprometen algunas vías reguladoras de los mecanismos ya mencionados.

Debido a esto, es importante analizar en detalle uno de los probables mecanismos por los cuales las células de cáncer de mama susceptibles a estrógenos ZR-7530, pueden ser capaces de evadir la señal de muerte celular, cuando se ve involucrado un estímulo hormonal como puede ser un glucocorticoide ya sea de tipo natural o sintético, pudiendo comprometer a vías relacionadas con el mecanismo de proliferación y supervivencia celular.

Se sabe que el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) es una citocina capaz de inducir muerte celular en distintos tipos celulares, sin embargo dicho proceso de muerte es susceptible de ser bloqueado por glucocorticoides tal como lo es la dexametasona y aunque el mecanismo a través del cual se lleva a cabo dicha protección no es del todo conocido, se sabe que en algunos sistemas se promueven señales de proliferación y sobrevivencia a través de la participación de vías como PI3K/Akt, por ello este trabajo se enfoca en evaluar la participación de la vía PI3K/Akt en la modulación del efecto citotóxico de $TNF\alpha$ en respuesta al glucocorticoide sintético dexametasona, en células de cáncer mamario ZR-7530.

HIPÓTESIS.

Dado de PI3K es una molécula asociada a supervivencia y proliferación esperamos que la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por $TNF\alpha$ involucre la participación de esta molécula.

OBJETIVOS.

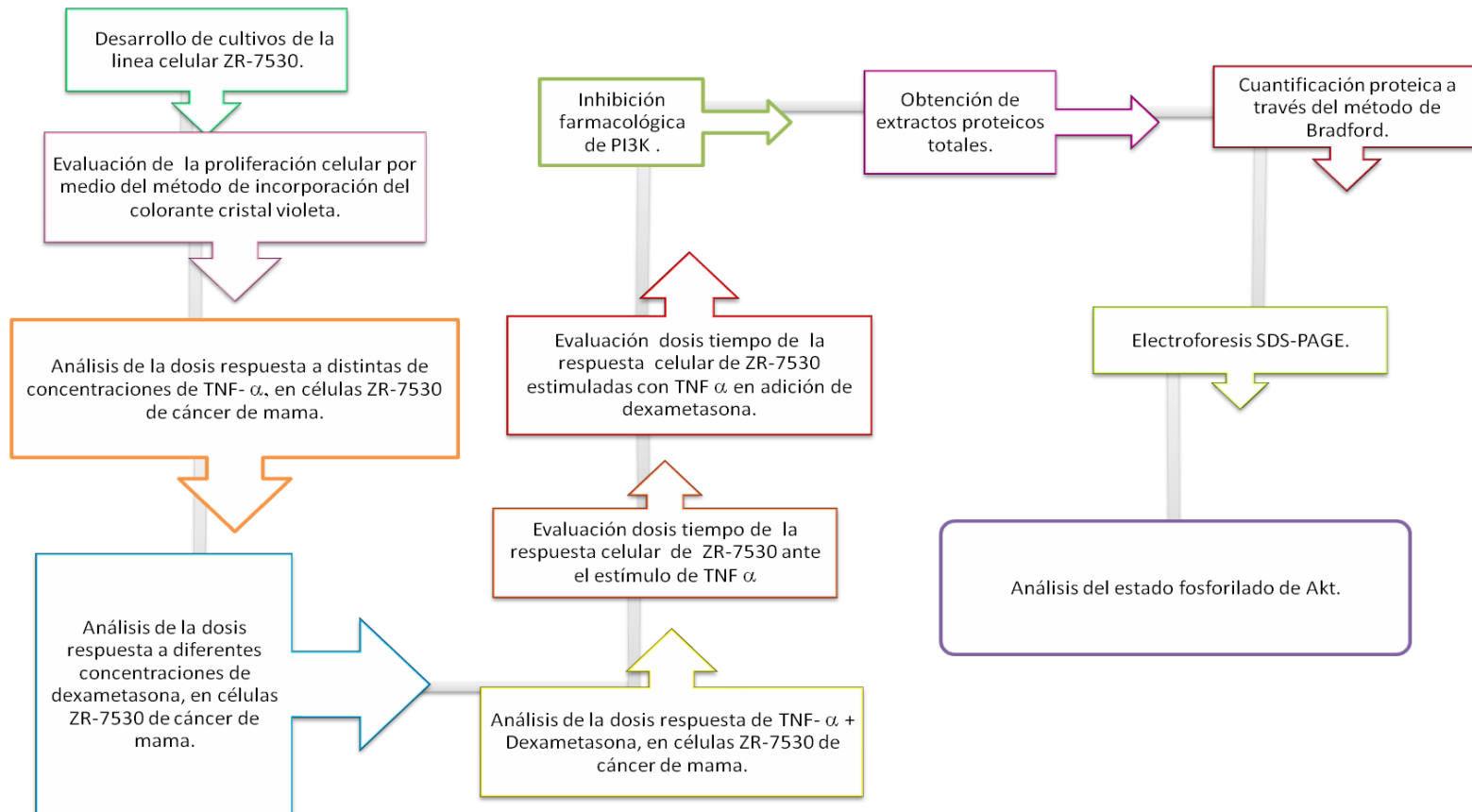
GENERAL.

- Ⓢ Determinar la participación de la vía PI3K/Akt, en el efecto de protección mediado por dexametasona ante el efecto citotóxico de TNF α sobre la línea celular ZR-7530 de cáncer de mama.

PARTICULARES

- Ⓢ Evaluar el efecto citotóxico de TNF α sobre células ZR-7530 de cáncer de mama a través de un análisis dosis respuesta a distintas concentraciones de la citocina.
- Ⓢ Analizar el efecto de la dexametasona sobre células ZR-7530 de cáncer de mama estimuladas con TNF- α .
- Ⓢ Analizar el estado fosforilado de Akt en células ZR- 7530 de cáncer mamario por medio de la técnica Western Blot.

MÉTODO



MATERIALES Y MÉTODO.

CULTIVO CELULAR.

Como material biológico se utilizaron células de cáncer mamario ZR-7530 obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection), como fuente de citocina se utilizó el TNF α recombinante murino (R&D USA).

Las células ZR-7530 se cultivaron de la siguiente manera:

Se colocaron 10 000 células en cada pozo de la placa para cultivo (Corning USA de 48 pozos), se adicionó medio de cultivo DMEM (Sigma Chemical USA), suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFBi) (Hyclone USA) (Apéndice 2) al 10%, los cultivos se mantuvieron en incubadora Nuair, USA a 37°C con 5% de CO₂ y una atmósfera de saturación de humedad al 95%.

Una vez establecidas las condiciones requeridas por la línea celular, se permitió la proliferación celular a un tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas, sin cambios del medio DMEM (Sigma Chemical USA).

MATERIAL FARMACOLÓGICO.

Como fuente de glucocorticoide se utilizó dexametasona (Sigma Chemical USA) la cual se preparó a las siguientes concentraciones.

Concentración de dexametasona.
0.001 μ M
0.01 μ M
0.1 μ M
1 μ M
10 μ M
100 μ M

Como inhibidor de la vía PI3K se utilizó Wortmanina (Sigma Chemical USA) a una concentración de 1 μ M.

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR INCORPORACION DE COLORANTE CRISTAL VIOLETA.

La técnica para evaluar la viabilidad celular se realizó por la incorporación de cristal violeta.

Una vez transcurrido el tiempo de proliferación celular establecido (24, 48, 72 y 96h) y al final de cada tratamiento sobre las células ZR-7530, se retiró el medio de cultivo por medio de lavados con PBS, posteriormente las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % durante un tiempo aproximado de 20 minutos, a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se retiró el fijador y se realizaron 2 lavados celulares con PBS a un pH 7.3.

Se adicionó colorante cristal violeta al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico (Sigma Chemical USA) 200 mM pH 6.0. Después de 20 minutos de agitación, se retiró el exceso de colorante por medio de lavados continuos con agua destilada, se dejó secar y posteriormente el colorante unido a la proteína celular se solubilizó en 1ml de ácido acético (Sigma Chemical) al 10 %, finalmente se evaluó la cantidad de colorante incorporado a las células a través de la medición de la absorbancia a 590nm en un lector de elisa (Thermo scientific Genesis 20).

PRUEBAS DOSIS RESPUESTA.

Con el fin de analizar el efecto dosis respuesta de las células ZR-7530 de cáncer de mama ante el estímulo de TNF α y dexametasona, se establecieron tratamientos a diferentes concentraciones y tiempos establecidos que van de las 24, 48, 72 y 96h.

Cada prueba se realizó por triplicado y fue contrastada con respecto a su propio control celular sin tratamiento.

Los tratamientos aplicados a las células ZR-7530 se establecieron de la siguiente manera:

Tratamiento establecido para la evaluación dosis respuesta de TNF α aplicado a células ZR-7530.

DOSIS	TIEMPO EN HORAS
2.5ng/ml	24 , 48, 72 y 96 h
5ng/ml	24 , 48, 72 y 96 h
7.5ng/ml	24 , 48, 72 y 96 h
10ng/ml	24 , 48, 72 y 96 h

Tratamiento establecido para la evaluación dosis respuesta de ZR-7530 ante el estímulo del GC sintético dexametasona.

DOSIS	TIEMPO EN HORAS
0.001 μ M	24 , 48, 72 y 96 h
0.01 μ M	24 , 48, 72 y 96 h
0.1 μ M	24 , 48, 72 y 96 h
1 μ M	24 , 48, 72 y 96 h
10 μ M	24 , 48, 72 y 96 h
100 μ M	24 , 48, 72 y 96 h

Una vez evaluada la respuesta celular a distintas concentraciones de ambos tratamientos a través de un análisis morfológico celular, se tomó la dosis letal media mostrada con el tratamiento de TNF α así como la dosis de dexametasona que mostró una respuesta de recuperación celular mayor, para establecer el siguiente tratamiento sobre la línea celular ZR-7530 de cáncer de mama.

Tratamiento establecido para la evaluación dosis respuesta de ZR-7530 ante el estímulo de TNF α + GC sintético dexametasona.

DOSIS	TIEMPO
5 ng/ml de TNF α + 10 μ M de Dexametasona.	24 , 48, 72 y 96 h

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

Las células se lavaron dos veces con 1ml de PBS (Apéndice 3) frío, posteriormente se aspiró totalmente y se añadieron 100 µl de amortiguador de lisis RIPA (Apéndice 5) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, se incubó 20 minutos a 4°C, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos, se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo debidamente etiquetado para su posterior análisis.

CUANTIFICACIÓN PROTEICA.

Se determinó la concentración proteica por el método de Bradford (Sigma Chemical), el cual se basa en la unión de un colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas, formando un complejo proteína-colorante capaz de cambiar su espectro de absorción de 495nm a 595nm, este cambio es directamente proporcional a la concentración de proteína presente (Bradford M, 1976).

Para determinar la concentración proteica se contrastó contra una curva proteica de una concentración conocida de albumina sérica bovina a una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10mg/ml.

ANÁLISIS PROTEICO POR MEDIO DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

La electroforesis SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli 1970, se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes como beta-mercaptoetanol y SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas, promoviendo su separación como cadenas polipeptídicas aisladas.

Para este trabajo se prepararon las muestras de proteína diluyéndolas en 5 µl de buffer de carga (Anexo 12), las muestras se colocaron en baño maría a 95°C durante 5 minutos para disociar los complejos poliproteicos.

Se utilizaron 40 mg de proteína para correr un gel desnaturante de poliacrilamida al 10%.

La electroforesis se realizó con voltaje constante de 100 V por 2 horas en una cámara vertical (Biorad USA) y se utilizaron marcadores de peso molecular Amersham Rainbow en el rango 200 a 16 kD.

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (Hyclone) a corriente constante de 300 A durante 2 horas utilizando para este fin buffer de transferencia (Anexo 14).

EVALUACIÓN DEL ESTADO FOSFORILADO DE Akt A TRAVÉS DEL METODO DE WESTERN BLOT.

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloqueó con leche descremada al 5 % (p/v) en un buffer TBS (Anexo 15) durante toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron 2 veces con solución TBS en agitación ligera, después fueron incubadas con el anticuerpo antiAkt policlonal obtenido de Santa Cruz Biothecnology, a una dilución 1:1000 en Albumina al 1 % y TBS durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween (Anexo 16) por un periodo de diez minutos cada uno.

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en condiciones de agitaciones constante con un anticuerpo secundario antiratón conjugado con peróxidasa de rábano obtenido de Santa Cruz Biothecnology.

Para completar el estudio con la detección de la presencia de proteínas, se aplicó un método quimioluminiscente, incubando la membrana con el reactivo Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Rockford, IL, EE UU) siguiendo el protocolo estándar.

Finalmente se expuso la membrana a un film fotográfico (MIN-R Mammography film, Kodak, Rochester, NY, EE UU), a distintos tiempos de exposición.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada uno de los ensayos dosis respuesta se realizó por triplicado, de igual forma cada inmunoblot se realizó al menos tres veces de manera independiente, por lo cual se reporta como el promedio de al menos tres experimentos realizados independientemente, donde las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar, en los casos pertinentes se realizó una prueba de T de student para determinar la significancia estadística.

Por lo que en este trabajo se muestran únicamente las imágenes más representativas.

RESULTADOS.

CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA LINEA ZR-7530.

Debido a que el crecimiento celular es un componente esencial de la función celular, el conocer éste comportamiento nos permitió establecer un mejor diseño experimental.

Por lo cual iniciamos nuestro estudio con el análisis de la velocidad de crecimiento que se define como el cambio en el número de células por unidad de tiempo, que para este trabajo se establecieron de 24, 48, 72 y 96 h.

CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR ZR-7530.

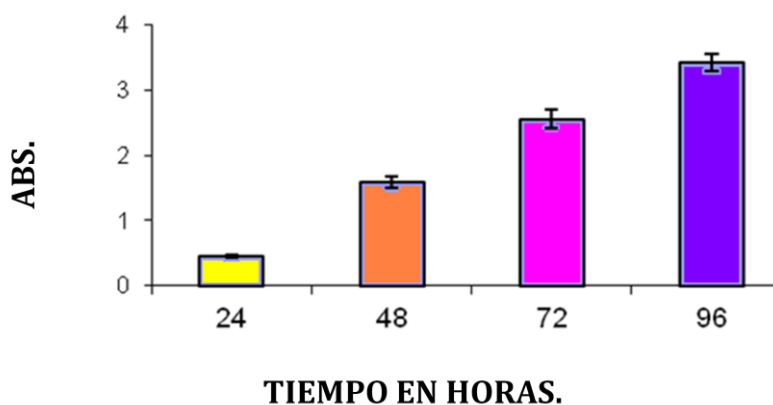


Fig.10.El tiempo de duplicación celular para la línea celular ZR-7530 de cáncer mamario, se analizó a través de la densidad óptica posterior a la incorporación del colorante cristal violeta, observando que el tiempo de duplicación mínimo requerido por esta línea celular es de 24 h alcanzando un punto máximo de duplicación a las 96horas de acuerdo a las condiciones de cultivo establecidas en el laboratorio.

Observando que el tiempo de duplicación de la masa celular para la línea ZR-7530, requiere de un tiempo de duplicación mínimo de 24 horas, tal como se observa en el gráfico, que de igual forma muestra el incremento progresivo de esta línea celular de manera exponencial de acuerdo a cada unidad de tiempo establecido, observando que el punto máximo de de duplicación se alcanza a una unidad de tiempo de 96 horas.

Este comportamiento de crecimiento, nos permitió establecer que el mejor tiempo para la aplicación de los distintos tratamientos puede iniciarse a las 24 horas.

LA DEXAMETASONA CONFIERE PROTECCIÓN CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DEL TNF- α .

Una vez establecido el tiempo de duplicación celular, se corroboró la respuesta de las células ZR-7530 al GC sintético dexametasona y a la citocina TNF α descritas por Messmer UK 2001 y Oh HY 2006, a través de un análisis morfológico de la respuesta celular con la finalidad de establecer las concentraciones y tiempos de estímulo citotóxico con TNF α y la concentración mínima a la cual dexametasona es capaz de bloquear el efecto inducido por TNF α .

Se observó que TNF α , es capaz de inducir un efecto citotóxico a una concentración de 5ng/ml (Fig. 11 C), sin embargo se mostro que el GC dexametasona es capaz de suprimir el efecto citotóxico de TNF α a una concentración de 10 μ M en un tiempo de 24 horas (Fig. 11 D), tal efecto fue contrastado con respecto al control celular (Fig. 11 A).

Observación morfológica de células ZR-7530.

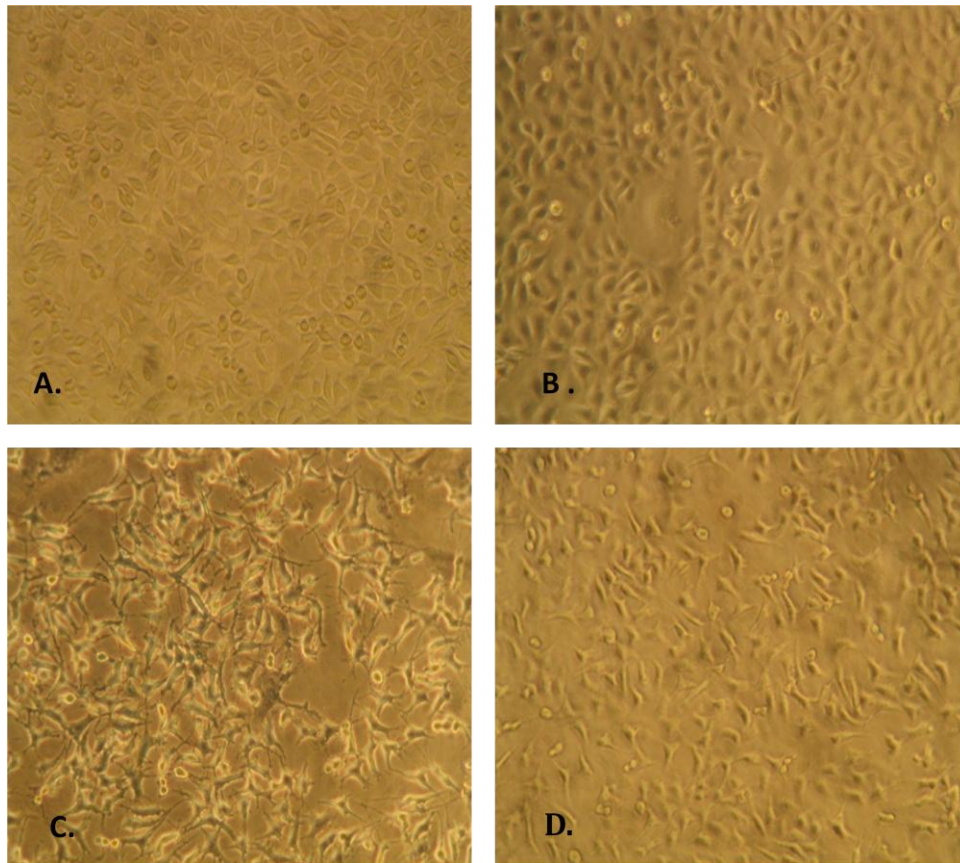


Fig. 11. A) La imagen corresponde al control celular de ZR-7530 sin ningún estímulo, B) Se observan a las células ZR-7530 tratadas con 10 μ M de dexametasona por 24 h, C) Muestra a las células ZR-7530 tratadas solamente con 5ng/mL de TNF α durante 24h, D) Células ZR-7530 tratadas con 5ng/mL de TNF α en adición de 10 μ M de dexametasona a un tiempo de 24h.

Para este trabajo también se analizó el efecto dosis respuesta del GC dexametasona, al adicionarla antes de TNF α , con la citocina y después de la citocina, con la finalidad de evaluar algún efecto que pudiera anteceder a la respuesta de protección celular.

Con estas pruebas se puso de manifiesto que el efecto protector otorgado por dexametasona (Fig. 11B) no se ve modificado al pre tratar a las células ZR-7530 con dexametasona antes del estímulo de TNF α , por lo cual se pudo establecer que el proceso de transducción generado por el GC dexametasona o por la citocina TNF α se manifiestan de manera independiente.

EN CÉLULAS ZR-7530 EL TNF α INDUCE MUERTE CELULAR DE MANERA TIEMPO Y DOSIS DEPENDIENTE.

La respuesta tiempo dosis dependiente generada por TNF α se determinó a través del análisis de la viabilidad celular de ZR-7530 (Fig.12), mostrando que a las 24 horas de tratamiento con 5ng/ml de TNF α la viabilidad celular se reducía hasta un 53.9 % con respecto al control celular sin tratamiento, incrementándose la pérdida de la población celular hasta alcanzar una reducción máxima del 21.2 % a las 96 horas de tratamiento.

Los resultados obtenidos de esta evaluación, nos permitieron estandarizar los tratamientos a una concentración de 5ng/ml de TNF α , a un tiempo de 24 horas para todos los experimentos que se muestran a lo largo de este trabajo.

Evaluación del porcentaje de supervivencia celular con tratamientos de TNF α a distintas concentraciones y tiempos.

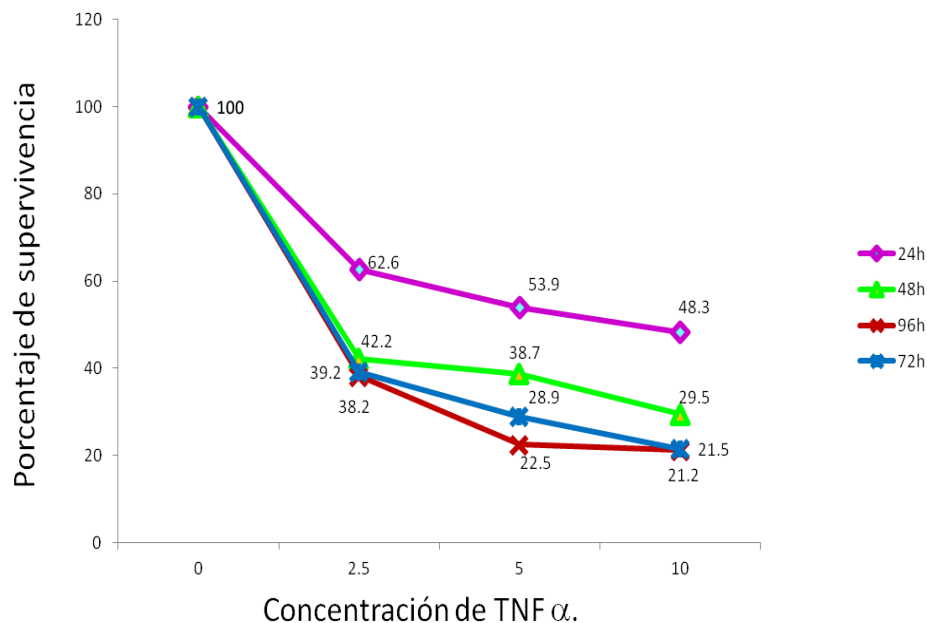


Fig. 12. En el grafico se muestra el decremento de la población celular ZR-7530 en respuesta al estímulo con distintas concentraciones de la citocina TNF α (2.5, 5 y 10ng/ml),tal disminución de la población celular se agudiza conforme aumenta el tiempo de exposición que va de las 24h a las 96 h, alcanzando un punto máximo de pérdida de la población celular del 88.3% a las 96h, corroborando el efecto citotóxico de TNF α .

EL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS ZR-7530 CON 5ng/ml DE TNF α Y CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DEXAMETASONA DURANTE 24 HORAS MUESTRA UNA SUPRESIÓN DOSIS DEPENDIENTE DE LA MUERTE INDUCIDA POR LA CITOCINA.

Se analizó que el efecto de muerte celular inducido por TNF α a una concentración de 5ng/ml, es capaz de ser anulado de manera dosis dependiente, al tratar a células ZR-7530 con distintas concentraciones de dexametasona que van de 0.001 μ M hasta 10 μ M (Fig. 13), mientras que una dosis mayor de 100 μ M ejerce un efecto toxico por sí misma.

Efecto de las distintas concentraciones de dexametasona sobre células ZR-7530 estimuladas con 5ng/ml de TNF α .

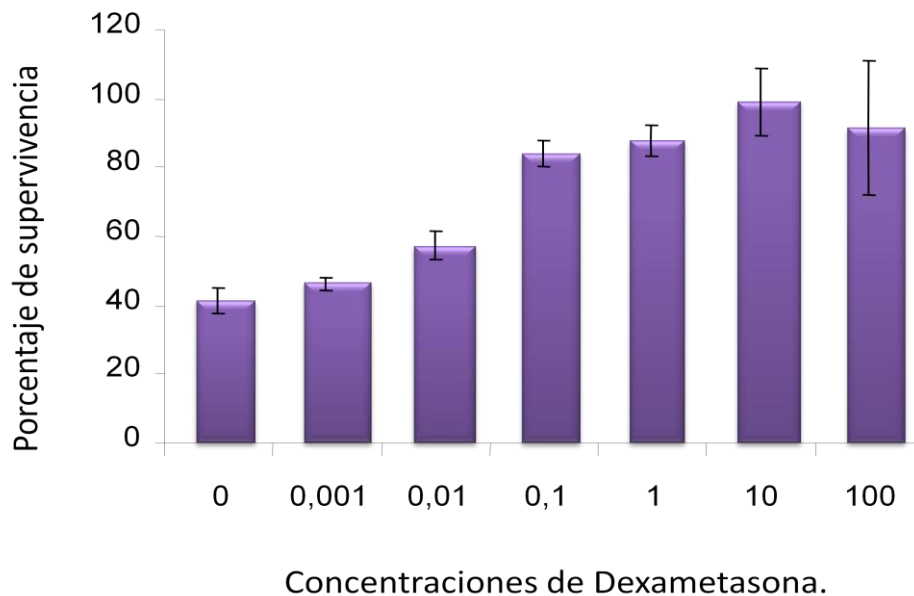


Fig. 13. El gráfico muestra el efecto protector otorgado por GC sintético dexametasona a distintas concentraciones sobre células ZR-7530 estimuladas con TNF α a una concentración de 5ng/ml, observándose que a concentraciones crecientes de dexametasona la protección celular se incrementa, alcanzando un máximo de protección ante el efecto citotóxico de TNF α con una concentración de 10 μ M de dexametasona.

Demostrando que el GC dexametasona es capaz de otorgar una recuperación celular del 100% ante el efecto citotóxico inducido por TNF α a una concentración de 10 μ M en un tiempo de 24 horas (Fig. 14), incluso observándose que dicha protección es capaz de mantenerse a tiempos prolongados de exposición tales como a 72horas de tratamiento con TNF α (datos no mostrados).

Efecto de protección para celulas ZR-7530 otorgado por dexametasona a una concentración de 10 μ M en un tiempo de 24 horas.

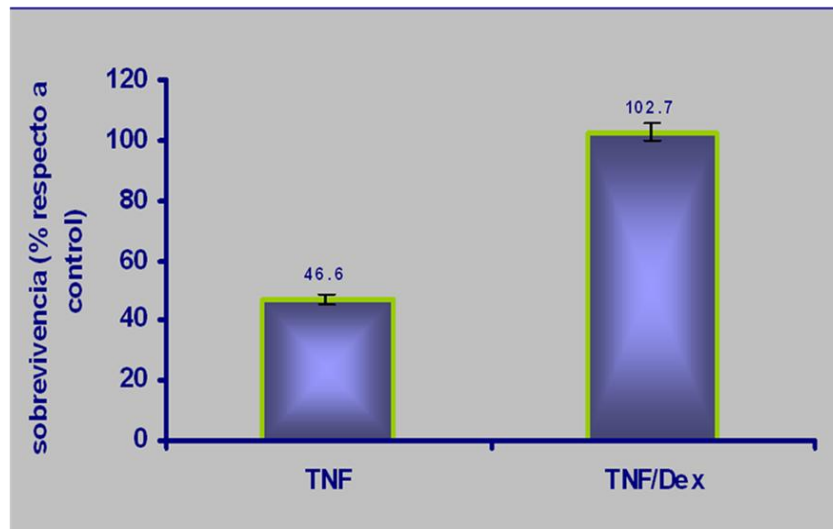


Fig. 14. La primer barra del grafico muestra el efecto citotóxico de TNF α a una concentración de 5ng/ml que se refleja en el decremento de de la población celular en un 53.4%, mientras que la segunda barra muestra el efecto protector otorgado por dexametasona a una concentración de 10 μ M que se refleja con una recuperación de la población celular del 100% en un tiempo de 24h.

LA VÍA DE SEÑALIZACION PI3K NO ESTA INVOLUCRADA EN LA PROTECCIÓN MEDIADA POR DEXAMETASONA CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DE TNF- α .

Dentro de las respuestas generadas por los GC debido a las interacciones con sus receptores a nivel citoplasmático, se encuentra la activación de la vía PI3K/Akt, por lo que al observar un efecto protector otorgado por el GC dexametasona ante el estímulo de TNF α sobre células ZR-7530, analizamos la partición de PI3K mediante su inhibición

farmacológica con Wortmanina a una concentración de 1 μ M, tomando en cuenta el estado fosforilado de Akt como un indicador de la activación de PI3K.

Para este estudio, la proteína Akt fue detectada por el método de Western Blot a través de anticuerpos que reconocen los residuos de serina 472 y 473 en su forma fosforilada.

Se observó que un estímulo con 5ng/ml de TNF α sobre células ZR-7530 es capaz de inducir un aumento transitorio en la fosforilación de Akt, ya que se muestra un pico de activación por encima del control celular a los 10 minutos de tratamiento mientras que el tratamiento con dexametasona sola o en presencia de TNF α , induce niveles similares de fosforilación de Akt (Fig. 15), aunque estos niveles de fosforilación parecen ser menores a los inducidos solamente con TNF α .

Inmunoblot del nivel de fosforilación de Akt.

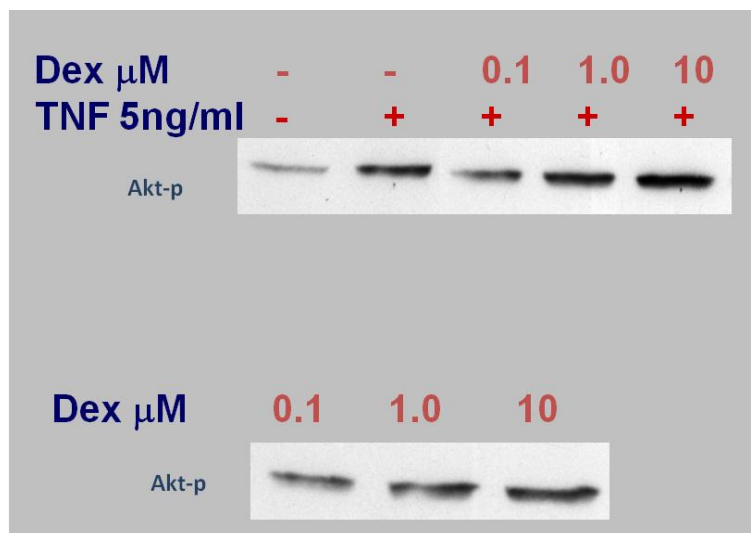


Fig. 15. El inmunoblot muestra un aumento transitorio en el estado de fosforilación de Akt con un tratamiento de 5ng/ml de TNF α con respecto al control celular, mientras que dexametasona sola y en presencia de TNF α es capaz de inducir niveles similares de fosforilación de Akt.

El análisis de este comportamiento, permitió establecer el tiempo para la evaluación de Akt para la siguiente prueba.

LA FOSFORILACIÓN DE Akt INDUCIDA POR TNF α Y DEXAMETASONA ES BLOQUEADA POR WORTMANINA.

El tratamiento farmacológico con Wortmanina aplicado sobre ZR-7530, tuvo como finalidad inhibir la capacidad de Akt para fosforilarse en respuesta a TNF α , dexametasona o ambas, por lo cual se observó que el nivel total de proteína Akt fosforilada (Akt_p) no se modifica en presencia del fármaco.

Este comportamiento permitió establecer que el bloqueo de PI3K con Wortmanina no tienen un efecto significativo sobre la protección otorgada por dexametasona ante el efecto citotóxico inducido por TNF α (Figura 16).

Inmunoblot del nivel de fosforilación de Akt.

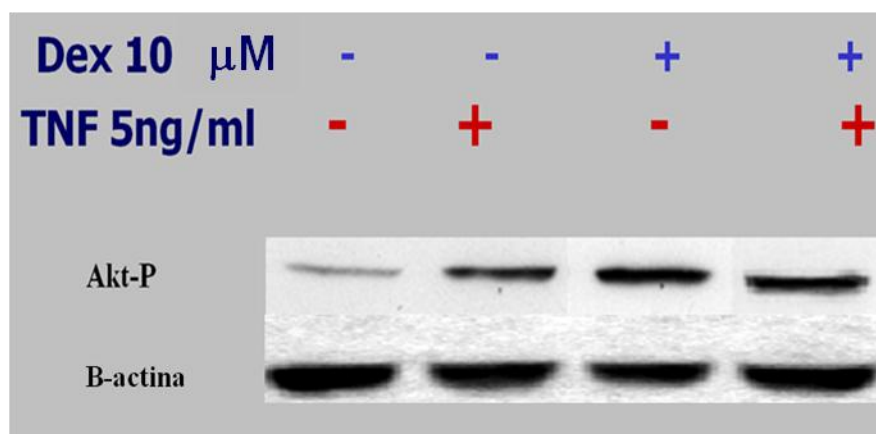


Fig. 16 inmunoblot de extractos totales de proteínas de células ZR-7530 tratadas con 1 mM de Wortmanina, donde se observa que no existe significancia alguna con el nivel de fosforilación de Akt que relacione a PI3K con la protección otorgada por dexametasona ante el efecto de muerte de TNF α .

Determinando entonces que la participación de la vía PI3K en células ZR-7530 de cáncer de mama, no se involucra con la protección conferida por dexametasona ante el efecto de muerte celular inducido por TNF α .

DISCUSIÓN.

Al observar la capacidad del GC dexametasona para conferir una protección a las células de cáncer mamario ZR-7530 ante el efecto de muerte inducido por TNF α , se atribuyo tal efecto a la capacidad de respuesta de los GC con sus receptores para activar vías citoplasmáticas de señalización relacionadas con la proliferación celular dentro de las cuales se encuentra PI3K/Akt (Cato *et al.* 2002; Downward,2000), ya que esta vía se ha demostrado, puede ser activada en respuesta a diversos estímulos dentro de los cuales se encuentra la influencia hormonal que incluye a los glucocorticoides como dexametasona (Falkestein *et al.* 2000, Hunter,2000; Schlessinger, 2000).

Estas respuestas glucocorticoide receptor, que pudieran llegar a comprometer a la vía PI3K en un proceso de cáncer (Yarden *et al.* 2001), se demostró que no sufren de ninguna alteración al bloquear la vía PI3K con un fármaco específico como wortmanina determinando a través de este trabajo que la protección otorgada por el GC sintético dexametasona (Fig.14) es independiente de la vía PI3K/Akt (Fig. 17) en células ZR- 7530 de cáncer de mama, pudiendo ser que tal efecto de protección se correlacione mejor con la activación a nivel nuclear, de la transcripción de factores tales como NF-kB (Gustin *et al.* 2004) ó por otro probable mecanismo de la dexametasona para promover la protección a través del fortalecimiento de señales de supervivencia (Albarrán, 2001).

Por ejemplo algunos estudios sobre células tratadas con dexametasona (Deregowski *et al.* 2002) demuestran que se requiere de la expresión de distintas proteínas de supervivencia celular como Bcl-2 y c-IAP1, que pueden ser inducidas en presencia del GC en distintos tipos celulares (Belvis *et al.* 2001).

Para este trabajo pudiera ser que el efecto de protección se relacione con el requerimiento de la expresión de moléculas de supervivencia celular específicas, dependientes de dexametasona ya que existen estudios que correlacionan un incremento en la susceptibilidad a TNF α con la disminución de c-IAP1 (Deregowski *et al.* 2002).

Es importante destacar que el GC dexametasona, para nuestro sistema celular ZR-7530, PI3K no contribuye a la protección otorgada por dexametasona, sin embargo es importante plantear como perspectiva el análisis de la activación de NF-kB como un factor importante para la regulación celular.

Ya que el análisis de la influencia hormonal en relación a el efecto protector otorgado por dexametasona en un cáncer ginecológico como lo es el CaMa, podría representar un punto clave para el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas al proponer un tratamiento de inhibición localizada de otros factores dentro de los cuales pudiera encontrarse NF-kB.

La recuperación celular observada en este trabajo (fig. 13 y 14), corrobora el compromiso que se origina en el cáncer mamario hormono dependiente, ante la constante o prolongada exposición a estrógenos, con la proliferación y supervivencia de células neoplásicas (Untch *et al.* 2010).

Lo anterior corrobora que no únicamente existe una sola vía ejecutora para una señal, sino que esta puede alternarse o interrumpirse al activar segundos mensajeros para originar una nueva respuesta (Aggarwal, 2003).

Y aunque en este estudio la expresión de Akt, no correlaciona la activación de PI3K (Fig. 16), puede ser que para otros sistemas celulares, dicha proteína pudiera jugar un papel muy importante en el compromiso generado con la proliferación celular.

En relación a nuestros resultados con tratamientos a distintas concentraciones de TNF α (Fig.11Cy 12), para observar el efecto citotóxico, se corrobora que las concentraciones utilizadas que van de 0.1 a 10ng/ml, dependen en gran manera del tipo celular sobre el cual actúan (Messmer *et al.* 2001) y en cuanto a las concentraciones utilizadas de dexametasona, también se correlacionan con lo reportado por otros autores ya que mencionan un efecto de protección a concentraciones que van de 0.1 hasta 50 μ M de dexametasona tal efecto de protección o no, también se relaciona con el tipo celular sobre el que actúa (Oh *et al.* 2006).

CONCLUSIONES.

- El glucocorticoide sintético dexametasona, es capaz de otorgar una protección total a las células ZR-7530 de cáncer de mama, ante el estímulo citotóxico inducido por TNF- α .
- La vía PI3K/Akt no participa, dentro del proceso de protección celular otorgado por dexametasona en células ZR-7530 de cáncer de mama.

ANEXOS

1) Medio de cultivo DMEM (Sigma Chemical).

Componentes	Peso molecular	Concentración (mg / L)	mM
Aminoácidos			
Glicina	75	37,5	0,5
L-Alanina		8,9	∞
L-Arginina clorhidrato		84	∞
L-Asparagina		13,2	∞
L-ácido aspártico		13,3	∞
L-Cistina 2HCl		63	∞
L-ácido glutámico		14,7	∞
Clorhidrato de L-histidina-H ₂ O		42	∞
L-isoileucina		105	∞
L-leucina		105	∞
L-lisina clorhidrato		146	∞
L-metionina		30	∞
L-fenilalanina		66	∞
L-prolina		11,5	∞
L-serina		52,5	∞
L-Treonina		95	∞
L-triptófano		16	∞
L-Tirosina disódico dihidrato de la sal		104	∞
L-Valina		94	∞
Vitaminas			
Fosfato de ácido ascórbico		2,5	∞
Cloruro de colina		4	∞
D-pantotenato de calcio	477	4	0,00839
Ácido Fólico	441	4	0,00907
Niacinamida		4	∞
Clorhidrato de piridoxina		4	∞
Riboflavina		0,4	∞
Clorhidrato de tiamina		4	∞
i-Inositol		7,2	∞
Las sales inorgánicas			
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	111	200	1,8
Nitrato férrico (Fe (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O)		0,1	∞
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)		97,67	∞
Cloruro de potasio (KCl)		400	∞
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)		3700	∞
Cloruro de sodio (NaCl)		6400	∞
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O)		125	∞

Proteínas		
Albumax® II	400	∞
La transferrina humana (Holo)	7,5	∞
La insulina recombinante completa de la cadena	10	∞
Elementos Traza		
metavanadato de Amonio	0,0003	∞
Sulfato cúprico	0,00125	∞
Cloruro manganoso	0,00005	∞
Selenita de sodio	0,005	∞
Otros Componentes		
D-glucosa (dextrosa)	4500	∞
Etanolamina	1,9	∞
glutación (reducido)	307	1
Rojo de fenol	15	∞
Piruvato de sodio	110	

2) Desactivación de suero fetal bovino (SFBi)

La botella de suero fetal bovino (Hyclone USA) se dejó descongelar a temperatura ambiente; una vez atemperada se pasó a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos, con el fin de inactivar proteínas de bajo peso molecular que pudieran llegar a interferir con el crecimiento celular.

Una vez desactivado se trasvaso en alícuotas de 50mL para un manejo más cómodo.

3) Solución PBS.

Se preparó un litro de solución para el cual se requirieron los siguientes reactivos.

Reactivo	Unidades g/L
Cloruro de magnesio	0.1
Cloruro de calcio	0.1
Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato monoácido de sodio	2.16
Fosfato diácido de potasio	0.2

El cloruro de magnesio y de calcio se disolvieron por separado en 100mL de agua bidestilada, las sales restantes se disolvieron en 800mL de agua bidestilada, ambas soluciones se mezclaron y se ajustó el pH 7.3 y se aforó a 1000mL

4) Colorante Cristal Violeta.

500 mL de cristal violeta en una solución amortiguadora de ácido fórmico al 0.1% de la siguiente manera.

REACTIVO.

3.96g de hidróxido de sodio

4.28 mL de ácido fórmico a una concentración de 200mM

1g de cristal violeta

El pH se ajustó a 6.0

5) RIPA

REACTIVOS

20mM de fosfato sódico a un pH 7.4

150mM de NaCl

5mM de EDTA (Sigma chemical)

1% de tritón X-100.

1% de aprotinina

2mM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride Gibco)

6) Inhibidores de proteasas.

10 µg/mL de leupeptina

7) Inhibidores de fosfatasa

2mM de Na_3VO_4

50mM de NaF

8) Reactivo de Bradford.

50mg de Azul de Coomasie (G-250)
25 mL de etanol
50 mL de acido fosfórico

Esta solución se mantuvo en agitación por 60 minutos, finalmente se aforo a 100mL con agua destilada.

Se filtro y conservo en un frasco ámbar a 4°C.

Se estableció un patrón de albumina sérica bovina (BSA)de 10mg/ml para el análisis proteico.

9) Dexametasona.

Formula : C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Peso molecular : 392.46 g/mol

10) Gel concentrador.

125mM de Tris-HCL pH6.5
0.1% de SDS
4% acrilamida: Bisacrilamida (29:1)
0.1% persulfato amónico.
26 µM TEMED

11) Gel separador.

38mM de Tris-HCL pH8.8
0.1% SDS
0.1% persulfato amónico
8.6 µM TEMED
4% acrilamida: Bisacrilamida (29:1)

12) Tampón de carga para electroforesis 4x.

250mM Tris-HCL pH 6.8
40% glicerol
8.2% de SDS
64mM b-mercaptoetanol
Azul de bromofenol

13) Tampón para revelado.

25mM Trizma Base
192mM glicina
0.1% SDS

14) Tampón para transferencia.

50mM Trizma base
348mM glicina
0.1% SDS
20% metanol

15) TBS.

20mL de Tris 1M pH 7.5
30mL de NaCl
Se aforó a 1 litro

16) TBS- Tween.

TBS Tween: a 500mL
de TBS se le adiciono
500 μ L de Tween 20.

17) Solución de bloqueo.

Leche descremada al 5% (p/v) en un buffer TBS compuesto por 20 mL de Tris 1M
pH7.5 más 30mL de NaCl 5mL

Bibliografía

Abate-Shen C, 2002. Deregulated home box gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2 (10): 777-85

Abeloff MD *et al.* 2008. Cancer of the breast. In Abeloff MD *et al.* *Clinical Oncology* 4th ed. Philadelphia, Elsevier 1875-1943.

Adcock IM *et al.* 2000. Molecular mechanism of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis* (55):256-60

Aggarwal BB, 2003. Signaling pathways of the TNF super family: a double edged sword. *Nat Rev Immunol* (3): 745-756

Altmore D and Joseph R Testa. 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogen* 24: 7455-64

American Cancer Society Cancer, 2012. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, Ga: American Cancer Society 2012

American Joint Committee on Cancer Breast, 2010. In *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed New York. Springer 347-369

Anne Brunet, 2001. Transcription-dependent and independent control neuronal survival by the PI3K- AKT signaling pathway *J. Biochem* (11): 297-305

Avis N *et al.* 2005. Quality of life among younger women with breast cancer. *J Clin Oncol* (23): 3322-3330

Avivar A *et al.* 2006. Moderate over expression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS* (22):5222-5226

Baud V, 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* (9): 372-7

Bautista *et al.* 1998. In breast cancer, amplifications of the steroid receptor co-activator gene ALB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res* (12): 2925-2929

Beatson GT, 1896. On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for new methods of treatment with illustrative cases. *Lancet* (2): 104-07

Beers M *et al.* 1999. Manual Merck de diagnóstico y terapéutica. 10ª edición. Ediciones Harcourt S,A. Madrid España 1829-1840

Beers M *et al.* 2007. Manual Merck de diagnóstico y tratamiento. 11ª edición. Madrid España. Elsevier pp. 2326-2337

Belvis *et al.* 2001. Therapeutic Benefit of a Dissociated Glucocorticoid and the Relevance of In Vitro Separation of Transrepression from Transactivación Activity, *Journal Immunology* (166): 1975-82

Beth A *et al.* 2010. Ductal Carcinoma In situ of the breast: A systematic review of incidence, treatment and outcomes. *JNCI J Natl Cancer Inst* (3): 170-178

Boonyaratanakornkit V *et al.* 2007. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids *Semin Reprod Med* 25:139-53

Botino MC *et al.* 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina* (70): 173-184

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* (72):248-254.

Bradley JR *et al.* 2008. TNF mediated inflammatory disease. *J Pathol* (214): 149-160

Brann DW *et al.* 1995. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J steroid Biochem Mol Biol* (52):113-133

Brivanlou AH and Darnell JE,2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* (295): 813-8

Bryan T Hemessy *et al.* 2005. Exploiting the PI3K/AKT Pathway to cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug discovery* (49): 667-76

Bull MJ *et al.* 2008. The Death receptor 3 TNF like protein IA pathway drives adverse bone pathology in inflammatory arthritis. *JEM Home* 205 (11): 2457-64

Burstein HJ *et al.* 2008. Malignant tumors of the breast In: De Vita VT *et al.* De Vita and Rosenberg's Cancer Principles and Practice of Oncology 8th ed. Philadelphia, Pa:Lippincott Williams and wilkins 1606-1654

Cambell G *et al.*2004. Mutation o the PI3KCA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* (21):767-81

Campbell IK,2003. Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumor necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology* (81):354-366

Carlos Smith Ríos, 2004. Evaluación de la vía PI3K y ERK1/2 sobre el control de la alcalinización intracelular inducida por PAF en neutrófilos de bovino. 2004. Presenta Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile para obtener el grado de químico.

Castro Gómez JC *et al.* 2003. Producción de TNF α por monocitos de pacientes con formas clínicas diversas de tuberculosis y polimorfismo genético en locus humano 308. *Enfermedades del tórax* 14 (1): 81-94

Castro Gomez JC *et al.* 2003. Producción de TNF-alfa por monocitos de pacientes con formas clivas diversas de tuberculosis y polimorfismo genético en locus humano. *Peru enfermedades del tórax* 14(1): 81-94

Cato AC *et al.* 2002.Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* RE 9

Chen G and Goeddel DV. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway *Science* (296): 634-1635

Chen Sun *et al.* 2011. The role of phosphatidylinositol 3- kinase signaling pathways in pancreatic cancer. *Elsevier pancreatology* 11 (2): 252-260

Chen X *et al.* 2001. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogen* (42): 6073-83

Choi KC *et al.* 2001. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology* (142):2351-60

Chuang MJ *et al.* 2008. Tumor- derived tumor necrosis factor- alpha promotes progression and epithelial- mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* (99): 905-913

Clemens M Goss P. 2001. Mechanisms of disease: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344(4):276-285

Coffer P *et al.* 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* (333):1-13

Coleman *et al.* 2008. Cancer Survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* (9): 730-56

CONAPO- Estimaciones de Población 1990- 2012 (Dirección General de Información en salud (DGIS). Base de datos de estimaciones de población 1990- 2012, COLMEX: [en línea]: Sistema Nacional de Información en salud (SINAIS). [México]: Secretaria de Salud <[http:// www.sinais.salud.gob.mx](http://www.sinais.salud.gob.mx)> consulta 08 de abril 2012.

Cornelis LV *et al.* 1999. Tumor necrosis factor gene polymorphism as severity markers in rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum* (58):120-126

Cornero Amancio, 2010. The PI3K/AKT pathway in cancer. *Current Pharmaceutical Design* 16(1):34-44

- D'Alonso S *et al.* 1996. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF α) chain. Encoding gene. *In* Immunogenetics (44): 321-322
- Davies L *et al.* 2008. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol* 22 (6):1331-44
- De Bosscher K and Haegeman G. 2009. Minireview: Latest Perspectives on Anti-inflammatory Actions of Glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 23(3): 281:91
- De Vita V *et al.* 2000. *Cáncer Principios y práctica de oncología*. Editorial Medica Panamericana, 5^o edición. Madrid
- Delves PJ, 2006. *Inmunología*. Editorial Médica Panamericana. España.
- Deregowaki VS *et al.* 2002. Identification of cytokine-induced nuclear factor kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* (64):873-81
- Dickson RB, *et al.* 2000. Estrogen Receptor – Mediated Processes in Normal and Cancer cells. *J Natl Cancer inst Monog* (27): 135-45
- Dillon DA, *et al.* 2010. Pathology of invasive breast cancer. In Harris JR, *et al.* *Diseases of the breast*. 4th ed. Philadelphia Pa: Lippincott- Williams and Wilkins 374-407
- Downward J. 2000. The ins and outs of signaling. *Nature* (411): 759-62
- Duffy SW *et al.* 2003. The relative contributions of screened- detected in situ and invasive breast cancer in reducing mortality from the diseases. *Eur j Cancer* 39 (2): 1755-60
- Edwards DP, 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev Physiol* (67): 335-376
- Emi Aikowa N *et al.* 2010. Immunogenicity of anti TNF- alpha agents in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy inmunol* 38(2-5): 82-89
- Eusebi V *et al.* 1994. Solitary fibrous tumor (myofibroblastoma) of the breast. *Springer Virchows Archive* (425): 89-92

Eustice C, 2006. What is tumor necrosis factor? Williams, 2008. Textbook of Endocrinology. Kronenberg. 11th ed. Saunders, An Imprint of Elsevier.

Ewa Jaruga-Killeen and Walter Rayford, 2005. TNF receptor 1 is involved in the induction of apoptosis by the cyclin dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in the prostate cancer cell line PC-3. FASEB Journal 19 (1): 139-141

Falkestein E *et al.* 2000. Nongenomically initiated steroid actions. Eur J Clin Invest 30 (3): 51-54

Fang YS *et al.* 2012. Tumor necrosis factor α pathway plays a critical role in regulating interferon γ – induced protein-10 production in initial allogeneic human monocyte endothelial cell interaction. Pubmed Transplant Proc 44 (4): 9993-5

Fidler IJ, 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” Hypothesis revisited. Nat Rev Cancer (3): 453:58

Flototto T *et al.* 2001. Hormones and hormone antagonists: mechanism of action in carcinogenesis of endometrial and breast cancer. Horm Metab Res 33: 451-457

Font J *et al.* 2004. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas. 2ªed. Barcelona MRA.

Gambacciani M *et al.* 2003. Hormone replacement therapy and endometrial ovarian and colorectal cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab (17):139-47

Gayad Sandra E *et al.* 2010. Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway: New hope for breast cancer patients. Accent Patents on anti-cancer Drug Discovery 5 (1): 29-57

Georg H Waetzig *et al.* 2005. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-1. FASEB Journal 19 (5): 0019-0091

Giuliano AE *et al.* 2011. Axillar Dissection vs No Axillary Dissection in Women with Invasive Breast Cancer and sentinel node metastasis. JAMA 305 (6):569-75

Gonzales E *et al.* 2005. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 311; (269): 27, 36319-3636.

Goodman y Gilman. 2003. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 10ª edición, McGraw Hill Interamericana Mexico D.F

Gross KL and Cidlowski JA. 2008. The glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab.* 19 (9):331-9

Gustin JA *et al.* 2004. Cell Type-specific expression of the I κ B kinases determines significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation. *J Biol. Chem* 279:1615-20

Hanahan D and Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Hanks S *et al.* 1995. Protein kinases. The eukaryotic protein kinase super family; kinase (catalytic) domain structure and classification *FASEB J.* (8):576-596

Harrington LS *et al.* 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* (166):213-223

Harrison *et al.* 2005 *Principios de Medicina Interna.* Decimosexta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid.

Hennighausen L and Robinson GW. 1998. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell* (1): 467-475

Hermoso M *et al.* 2003. Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids. *IUBMB Life* (55):497-504

Horruchi T *et al.* 2010. Transmembrane TNF a structure function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49 (7). 1215-28.

Hortobayi *et al.* 1998. Treatment of Breast Cancer. *Journal of Medicine* (339): 974-84

Hunter T. 2000. Signaling and beyond. *Cell* (100): 113-27

IMSS, 2008. Guía práctica para el tratamiento de cáncer de mama

INEGI 2009 <http://www.inegi.org.mx> consultado 8 de abril 2012

INEGI 2011 <http://www.inegi.org.mx> consultado 8 de abril 2012

INEGI 2012 <http://www.inegi.org.mx> consultado 8 de abril 2012

Jara Albarrán A, 2001. Endocrinología. Primera Edición. Edit. Panamericana. Madrid.

Jauregui-Huerta F *et al.* 2010. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Immunol Rev* 6(3): 195-204

JiLuo *et al.* 2003. Targeting the PI3K- AKT pathway in human cancer: rationale and premise *Cancer cell* 4 (4): 257-62

Kawano Y *et al.* 2012. Regulation of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor – alpha-induced interleukin-8 production by amnion-derived (WISH) cells. *Clin Exp Obstet Gynecol* PMID (22):675-954

Kawasaki H *et al.* 2002. Identification of genes that function in the TNF alpha mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribosome. *Nat Biotechnol* 20 (84) :376-80

Kelly ML *et al.* 2010. TNFR2 not TNFR1, enhances mesenchymal stem cell- mediated cardiac protection following acute ischemia. *NCBI shock* 33 (6) 602-7

Kevin D Courtney *et al.* 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* (28):1075-1083.

Kino T and Chousoso GP, 2001. Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J endocrinol* 169 (3): 437-45

Kir HM *et al.* 2012. Effects of chronic kidney disease and type of dialysis on serum levels of adiponectin, TNF-alpha and high sensitive C-reactive protein. *Clin Lab.* PMID 22(78):35-80.

Kirby Bland I *et al.* 2007 La mama. Edit Panamericana 3th edición. New York

Knaul FM *et al.* 2008. Breast Cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive Health Matters* 16 (32):113-123

Kollias G *et al.* 1999. The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organs inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 58 (supply 1):132-139

Kollias G *et al.* 2010. TNF Pathophysiology Molecular and Cellular Mechanism, current directions in autoimmunity. Edith. A.N. Theofilopoulos Vol II.

Kuchroo VK *et al.* 2001. Cytokines and autoimmune diseases. Nicholson LB, editors. New Jersey, NJ Humana Press; 2001. P.3-422.

Laemli *et al.* 1970 Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685

Lars Fredriksson, 2006. Tumor Necrosis Factor- α in temporomandibular Joint Synovial Fluid Predicts Treatment effects on pain by intra articular glucocorticoid treatment. *Vía clínica. Mediators of inflammation* (6): 594-625

Lee B *et al.* 2010. Bases Moleculares del cáncer y desarrollo del tratamiento selectivo. Elsevier *Surg Clin N Am* 89: 1-15

Leonel F *et al.* 2011. Targeting the Phosphatidylinositol 3- Kinase signaling Pathway in breast cancer. *The Oncologist*. 16 (4): 404-414.

Leumbruno JP *et al.* 2008. The safety of anti- tumor necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis and exposure adjusted pooled analyses of serious adverse events. *Ann Rheum Dis*.

Leung DY *et al.* 2003. Update on glucocorticoid action and resistance. *J allergy Clin Immunol* 111:3-22

López Carillo *et al.* 2009. Detección del cáncer de mama en México: síntesis de los resultados de la encuesta nacional de salud reproductiva. *Salud Pública en México* 51 (21): 345-349

López Valle MA *et al.* 2005. Carcinoma lobulillar infiltrante de mama: etapa clínica, características radiológicas e histológicas. *Ginecol Obstet Mex* 73:629-36

Loreto Carmona Ortells, 2010. Terapias anti TNF y neoplásicas. *Reumatología Clínica*. 2 (6): 102-105.

Lozano R *et al.* 2008. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1976-2006. *Competitividad y Salud Fundación Mexicana para la salud*.

Lynch Dk, 1999. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase and indirect mechanism. *Oncogen Dec* (23; 18(56):8024-32

M Osak *et al.* 2004. PI3K-AKT pathway its functions and alterations in human cancer. *Springer link Apoptosis* 9 (6): 667-76

Majumder PK *et al.* 2005. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 24:7465-7474,

Masaki Fujita *et al.* 2008. TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to legionella pneumophila- induced mortality in mice. *Citokine* 44 (2) 298-303.

McEwan DJ, 2002. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. *Pubmed NCBI Cell signal* 14 (6): 477-92

McKenzie K *et al.* 1996. Molecular Genetics of human breast cancer. *Prog Clin Biol Res* (394):185-209

Messmer UK *et al.* 2001. Dexamethasone inhibits TNF- alpha-induced apoptosis and IAP protein down regulation in MCF7 cells. *Br J Pharmacol* (133):467-76

Murthy SS *et al.* 2000. "Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization". *Cytogenet. Cell Genet.* 88 (1–2): 38–40

Muti P *et al.* 2004. Endogenous sex hormones and subsequent breast cancer in premenopausal women. *International Journal of cancer* 112(2):312-8

Nemere I *et al.* 2003. Membrane receptors for steroid hormones signal transduction and physiological significance. *J cell Biochem* (88):438-45

Newton R and Holden NS, 2007. Transrepression and Transactivation: a Distressing Divorce for Glucocorticoid Receptor? *Mol Pharmacol* (72):799-809

Nicola J *et al.* 2004. Increased Constitutive activity of PKB in tamoxifen resistant breast cancer. MCF7 cells. *Springer link* 253 (1-2): 241-246

Nicolaidis NC *et al.* 2010. The human glucocorticoid receptor, molecular basis of biologic function. *Steroids* 75 (1): 1-12

NORMA oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.

Oakley RH *et al.* 1999. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanism of action. *J. Biol Chem* 274(39): 437-66

Oh HY *et al.* 2006. Dexamethasone protects primary cultures hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by up regulation of cFLIP. *Cell Death Differ* (13): 512-23

Olsson HL *et al.* 2003. Hormone replacement therapy containing progestin's and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden. *Cáncer* (97): 1387-92

OMS. 2004. Carga Mundial de Morbilidad.

OMS. 2012. Nota Descriptiva N° 297.

Otto C *et al.* 1997. Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice J Biol Chem 272(42): 26665-8

Pathak DR *et al.* 2000. Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white population. En National Action Plan on breast cancer workshop on multicultural aspects of breast cancer etiology. *Cáncer* 1(88):1230-8

Paula A *et al.* 2004. Polimorfismo del TNF- en autoinmunidad y tuberculosis. *Biomédica* 2004; 24(Supl):43-51

Pelai G *et al.* 2003. Molecular mechanism of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci* (72):1549-61

Peng XD *et al.* 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt 1 and Akt2. *Genes* 1: 17 (11):1352-65

Penn LZ, 2001. Apoptosis modulators as cancer therapeutics. *Curr Opin Investing Drug* (2): 684-692

Persson I, 2000. Estrogens in the causation of the breast, endometrial and ovarian cancer-evidence and hypothesis from epidemiological findings *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74(5): 357-64

Pitt SC *et al.* 2008. The phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in medullary thyroid cancer. *Surgery* (144): 721-724

Porter P, 2008. Westernizing women's risk? Breast cancer in lower- income countries. *N. England J Med*; (358): 213-216.

Prosenjit Sen *et al.* 2003. Involvement of the AKT/PKB signaling pathways with diseases processes. *Molecular and cellular biochemistry* 253 (1): 341-346

Riggio M *et al.* 2011. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis* 33(3):509-518

Rochelle L *et al.* 2010. Distinct Biological Roles for the AKT family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 1(70): 4260-66

Rodriguez-vicciana P *et al.* 1997. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* (3):457-67

Roth JA *et al.* 1997. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J Nat Cancer Inst.* (89): 21-39

Saito T *et al.* 2004. Overexpression of estrogenreceptor-alpha gene suppresses gap junctional intercellular communication in endometrial carcinoma cells. *Oncogene* (23): 1109-16

Samuels Y *et al.* 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 23 (304): 554-570

Savory JG *et al.* 1999. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 19 (2): 1025-37

Scharovsky G *et al.* 2012. Inmunomodulacion y angiogenesis en la terapia oncológica de la investigación básica a la clínica. *Medicina Buenos Aires* (72):47-57

Scharovsky G *et al.* 2012. Inmunomodulacion y antiangiogenesis en la terapéutica oncológica de la investigación básica a la clínica. *Medicina Buenos Aires* 72: 47-57

Schauf MJ *et al.* 2008. Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. *Endocrinology* 149 (4): 1591-9

Schlessinger J, 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* (103): 211-25

Secretaria de Salud, 2002. Programa de Acción: Cáncer de Mama. México

Semir D *et al.* 2011. Pleckstrin homology domain-interacting protein (PHP) as a marker and mediator of melanoma metástasis. PNAS 109(18): 7067-7072

Setoguchi S *et al.* 2006. Tumor necrosis factor alpha antagonist use and cancer in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum (54): 2757-64

Suo Z *et al.* 2001. Estrogen receptor alpha and C-ERBB4 expression in breast carcinomas. Virchows (439): 62-69

Susan G, 2010. Carcinoma ductal in situ kamen for the cure. Saint Louis. 1-887

Theriault R, 1996. Medical treatment of bone metastases. In Harris JR, et al. Diseases of the breast. Lippincott- Raven, Philadelphia 819-26

Thommesen L and Laegreid A, 2004. Distinct difference between TNFR1 and TNFR2 mediated activation of NF-kB. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38(3): 281-89

Tliba O *et al.* 2007. Cytokines induce an early steroid resistance in airway smooth muscle cells: novel role of interferon regulatory factor-1. Am J Respire Cell Mol Biol 38 (4): 463-72

Tong Q and Hotamisligil GS, 2007. Developmental biology: cell fate in the mammary gland. Nature 445(7129): 724-6

Tsay TB *et al.* 2012. TNF alpha decreces infection- induced lung injury in burn through negative of TIR 4 /iNOS. J Sur Res s0022-4804 (12) 0076-5

Turck F *et al.* 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. Plant Physiol 134: 1527-35

Umland SP et al, 2002. Review of the molecular and cellular mechanism of action of glucocorticoids for use is asthma. Pulm Pharmacol Ther.(15):35-50

Untch M *et al.* 2010. Clinical practice decisions in endocrine therapy. Cancer Investigation 28 (Supply) 1:4-13.

Vadivelu N *et al.* 2008. Pain after mastectomy and breast reconstruction. *Am Surg* (74): 285-96

Vallejo G *et al.* 2005. Progestin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces proliferation of endometrial stromacells. *Mol Endocrinol* (19):3023-37

Van de Viver M *et al.* 2002. A gene- expression signature as a predictor of survival in breast cáncer. *N Engl J Med* (347): 1999-2009

Van der Vaart M and Schaaf, 2009. Naturally occurring C- terminal splice variants of nuclear receptors. *NRS* (7):e007

Vivanco I *et al.* 2002. The phosphatidylinositol 3-quinasa? Akt in human cancer. *Nat Rev Cancer* (2):489-501.

Weigel NL *et al.* 2001. Estrogen and progesterone action, en De Groot L, et al. *endocrinology*. Philadelphia WB Saunders 2053-2060.

Winer EP *et al.* 2005. Beyond anatomic staging: Is it time to take a leap into the molecular era? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. Alexandria, Va: American Society of Clinical Oncology.

www.archbronconeumol.org

www.cercervic.org

www.immunityageing.com

Y Wu and BP Zhou, 2010. TNF α /NF- κ B/signal pathway in cancer cell migration and invasion *British Journal of cancer* 102: 639-644

Yarden RI *et al.* 2001. Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: A possible mechanism to modulate growth. *J Cell Biochem* 81:232-246.

Yoshino Y *et al.* 2011. Superoxide anion contributes to the induction of tumor necrosis factor alpha (TNF α) through activation of the MKK 316- p38 MAPK cascade in rat microglia. *Pub Med Brain Res* (1422):1-12

Yudt MR and Cidlowski JA, 2002. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16(8): 1719-26

Zhang L *et al.* 2012. Single Nucleotide polymorphisms of genes for EGF TGF- B and TNF α in patients with pancreatic carcinoma. *Cáncer genomics proteomics* 9 (5): 287-95